

УДК 577.152.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ Na^+ -ПЕРЕКАЧИВАЮЩЕЙ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В МЕМБРАНАХ ЭКСТРЕМАЛЬНО АЛКАЛИФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Thioalkalivibrio*

© 2020 М.С. Мунтян^{1*}, Д.А. Морозов¹, Ю.Ф. Леонова², Т.В. Овчинникова²

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: muntyan@genebee.msu.ru

² ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.07.2020

После доработки 01.09.2020

Принята к публикации 01.09.2020

Впервые доказательство функционирования кислород-редуктазного Na^+ -насоса (Na^+ -перекачивающей цитохром-с-оксидазы *cbb*₃-типа) было получено при изучении дыхательной цепи экстремально алкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio versutus* [Muntyan, M. S., et al. (2015) Cytochrome *cbb*₃ of *Thioalkalivibrio* is a Na^+ -pumping cytochrome oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7695-7700]. В настоящей работе проведена иммунодетекция и идентификация этой Na^+ -перекачивающей цитохром-с-оксидазы, являющейся продуктом оперона *ccoNOQP*. С помощью кроличьих поликлональных антител, полученных на предсказанную С-концевую аминокислотную последовательность каталитической субъединицы, показано, что оксидаза *cbb*₃-типа синтезируется в клетках бактерии и локализуется в её мембранах; субъединица оксидазы с мол. массой 48 кДа является каталитической, CcoN; субъединицы с мол. массами 29 и 34 кДа, CcoO и CcoP, соответственно являются цитохромами с. Определены теоретические значения pI субъединиц CcoN, CcoO и CcoP. Показано, что части субъединиц CcoO и CcoP, экспонированные в водную фазу на Р-стороне цитоплазматической мембраны клеток, обогащены отрицательно заряженными аминокислотными остатками, в отличие от граничащих с водной фазой частей интегральной субъединицы CcoN. Таким образом, Na^+ -перекачивающая цитохром-с-оксидаза *T. versutus* как по функции, так и по структуре демонстрирует приспособленность к экстремально щелочным условиям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Na^+ -насос, цитохром-с-оксидаза, экстремофилия, алкалофилия, оксидаза *cbb*₃-типа.

DOI: 10.31857/S0320972520120143

* Адресат для
корреспонденции.

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в течение нескольких проектных периодов: геномные исследования (проекты 02-04-49107-а, 05-04-49504-а), исследование белков (проект 20-04-01105-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tokuda, H., and Unemoto, T. (1984) Na⁺ is translocated at NADH: quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*, *J. Biol. Chem.*, **259**, 7785-7790.
2. Skulachev, V. P. (1992) The laws of cell energetics, *Eur. J. Biochem.*, **208**, 203-209, doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17175.x.
3. Skulachev, V. P. (1984) Sodium bioenergetics, *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 483-485, doi: 10.1016/0968-0004(84)90317-7.
4. Muntyan, M. S., Cherepanov, D. A., Malinen, A. M., Bloch, D. A., Sorokin, D. Y., et al. (2015) Cytochrome *cbb*₃ of *Thioalkalivibrio* is a Na⁺-pumping cytochrome oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7695-7700, doi: 10.1073/pnas.1417071112.
5. Gribaldo, S., Talla, E., and Brochier-Armanet, C. (2009) Evolution of the haem copper oxidases superfamily: a rooting tale, *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 375-381, doi: 10.1016/j.tibs.2009.04.002.
6. Saraste, M., and Castresana, J. (1994) Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes, *FEBS Lett.*, **341**, 1-4, doi: 10.1016/0014-5793(94)80228-9.
7. Buschmann, S., Warkentin, E., Xie, H., Langer, J. D., Ermler, U., and Michel, H. (2010) The structure of *cbb*₃ cytochrome oxidase provides insights into proton pumping, *Science*, **329**, 327-330, doi: 10.1126/science.1187303.
8. Sorokin, D. Y., Banciu, H., Robertson, L. A., Kuenen, J. G., Muntyan, M. S., and Muyzer, G. (2013) Halophilic and haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria, in *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, (Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., eds) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 529-554, doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_77.
9. Malinen, A. M., Belogurov, G. A., Baykov, A. A., and Lahti, R. (2007) Na⁺-pyrophosphatase: a novel primary sodium pump, *Biochemistry*, **46**, 8872-8878, doi: 10.1021/bi700564b.
10. Li, H., Sineshchekov, O. A., da Silva, G. F., and Spudich, J. L. (2015) *In vitro* demonstration of dual light-driven Na⁺/H⁺ pumping by a microbial rhodopsin, *Biophys. J.*, **109**, 1446-1453, doi: 10.1016/j.bpj.2015.08.018.
11. Гришук Ю. В., Мунтян М. С., Попова И. В., Сорokin Д. Ю. (2003) Транспорт ионов, сопряженный с работой терминальной оксидазы экстремально щелочелюбивой солеустойчивой бактерии рода *Thioalkalivibrio*, *Биохимия*, **68**, 477-483.
12. Sorokin, D. Y., Muntyan, M. S., Toshchakov, S. V., Korzhenkov, A., and Kublanov, I. V. (2018) Phenotypic and genomic properties of a novel deep-lineage haloalkaliphilic member of the phylum *Balneolaeota* from soda lakes possessing Na⁺-translocating proteorhodopsin, *Front. Microbiol.*, **9**, 2672, doi: 10.3389/fmicb.2018.02672.
13. Sorokin, D. Y., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Tourova, T. P., Jones, B. E., et al. (2001) *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., novel and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 565-580, doi: 10.1099/00207713-51-2-565.
14. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680, doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
15. Muntyan, M. S., and Skripnikova, E. V. (1993) Two types of terminal oxidase in alkalotolerant *Bacillus* FTU, *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 142-146, doi: 10.1016/0005-2728(93)90136-4.
16. Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379, doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
17. Davis, B. J. (1964) Disk electrophoresis – II. Method and application to human serum proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
18. Thomas, P. E., Ryan, D., and Levin, W. (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome *P-450* on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **75**, 168-176, doi: 10.1016/0003-2697(76)90067-1.

19. Muntyan, M. S., Bloch, D. A., Ustiyani, V. S., and Drachev, L. A. (1993) Kinetics of CO binding to H⁺-motive oxidases of the *caa*₃-type from *Bacillus* FTU and of the *o*-type from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **327**, 351-354, doi: 10.1016/0014-5793(93)81019-V.
20. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354, doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
21. Гринкевич В. А., Лысенко А. М., Мунтян М. С., Скрипникова Е. В., Африкян Э. К. (1997) Идентификация штамма *Bacillus* sp. FTU и изучение гомологии оксидаз *caa*₃-типа, *Биохимия*, **62**, 842-849.
22. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., et al. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W296-W303, doi: 10.1093/nar/gky427.
23. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, in *The Proteomics Protocols Handbook* (Walker, J. M., ed.) Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 571-607, doi: 10.1385/1-59259-890-0:571.
24. Toledo-Cuevas, M., Barquera, B., Gennis, R. B., Wikström, M., and García-Horsman, J. A. (1998) The *cbb*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*, a proton-pumping heme-copper oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 421-434, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00095-4.
25. Myllykallio, H., and Liebl, U. (2000) Dual role for cytochrome oxidase in clinically relevant proteobacteria, *Trends Microbiol.*, **8**, 542-543, doi: 10.1016/S0966-842X(00)91831-6.
26. Garcia-Horsman, J. A., Berry, E., Shapleigh, J. P., Alben, J. O., and Gennis, R. B. (1994) A novel cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks Cu_A, *Biochemistry*, **33**, 3113-3119, doi: 10.1021/bi00176a046.
27. Gray, K.A., Grooms, M., Myllykallio, H., Moomaw, C., Slaughter, C., and Daldal, F. (1994) *Rhodobacter capsulatus* contains a novel *cb*-type cytochrome *c* oxidase without a Cu_A center, *Biochemistry*, **33**, 3120-3127, doi: 10.1021/bi00176a047.
28. Rauhamäki, V., Bloch, D. A., and Wikström, M. (2012) Mechanistic stoichiometry of proton translocation by cytochrome *cbb*₃, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7286-7291, doi: 10.1073/pnas.1202151109.
29. Thöny-Meyer, L., Beck, C., Preisig, O., and Hennecke, H. (1994) The *ccoNOQP* gene cluster codes for a *cb*-type cytochrome oxidase that functions in aerobic respiration of *Rhodobacter capsulatus*, *Mol. Microbiol.*, **14**, 705-716, doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01308.x.
30. Zeilstra-Ryalls, J.H., Gabbert, K., Mouncey, N. J., Kaplan, S., and Kranz, R. G. (1997) Analysis of the *firL* gene and its function in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.*, **179**, 7264-7273, doi: 10.1128/jb.179.23.7264-7273.1997.
31. Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A., and Hennecke, H. (1996) A high-affinity *cbb*₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*, *J. Bacteriol.*, **178**, 1532-1538, doi: 10.1128/jb.178.6.1532-1538.1996.
32. Zufferey, R., Arslan, E., Thöny-Meyer, L., and Hennecke, H. (1998) How replacements of the 12 conserved histidines of subunit I affect assembly, cofactor binding, and enzymatic activity of the *Bradyrhizobium japonicum* *cbb*₃-type oxidase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 6452-6459, doi: 10.1074/jbc.273.11.6452.
33. Sorokin, D. Y., Cherepanov, A., de Vries, S., and Kuenen, G. J. (1999) Identification of cytochrome *c* oxidase in the alkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium '*Thioalcalomicrobium aerophilum*' strain AL 3, *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 91-99, doi: 10.1016/S0378-1097(99)00398-5.
34. Tsukita, S., Koyanagi, S., Nagata, K., Koizuka, H., Akashi, H., Shimoyama, T., Tamura, T., and Sone, N. (1999) Characterization of a *cb*-type cytochrome *c* oxidase from *Helicobacter pylori*, *J. Biochem.*, **125**, 194-201, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022259.
35. Urbani, A., Gemeinhardt, S., Warne, A., and Saraste, M. (2001) Properties of the detergent solubilised cytochrome *c* oxidase (cytochrome *cbb*₃) purified from *Pseudomonas stutzeri*, *FEBS Lett.*, **508**, 29-35, doi: 10.1016/S0014-5793(01)03006-X.
36. Granados-Baeza, M. J., Gómez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M. J., Romero, D., and Girard, L. (2007) Novel reiterated Fnr-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase *cbb*₃ in *Rhizobium etli* CFN42, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **20**, 1241-1249, doi: 10.1094/MPMI-20-10-1241.
37. De Gier, J. W. L., Lübben, M., Reijnders, W. N., Tipker, C. A., Slotboom, D. J., van Spanning, R. J., Stouthamer, A. H., and van der Oost, J. (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*, *Mol. Microbiol.*, **13**, 183-196, doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00414.x.
38. Raitio, M., and Wikström, M. (1994) An alternative cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* functions as a proton pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**, 100-106, doi: 10.1016/0005-2728(94)90140-6.
39. Arslan, E., Kannt, A., Thöny-Meyer, L., and Hennecke, H. (2000) The symbiotically essential *cbb*₃-type oxidase of *Bradyrhizobium japonicum* is a proton pump, *FEBS Lett.*, **470**, 7-10, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01277-1.
40. Kaim, G., and Dimroth, P. (1995) A double mutation in subunit *c* of the Na⁺-specific F₁F₀-ATPase of *Propionigenium modestum* results in a switch from Na⁺ to H⁺-coupled ATP synthesis in the *Escherichia coli* host cells, *J. Mol. Biol.*, **253**, 726-738, doi: 10.1006/jmbi.1995.0586.
41. Kaim, G., Wehrle, F., Gerike, U., and Dimroth, P. (1997) Molecular basis for the coupling ion selectivity of F₁F₀ ATP synthases: probing the liganding groups for Na⁺ and Li⁺ in the *c* subunit of the ATP synthase from *Propionigenium modestum*, *Biochemistry*, **36**, 9185-9194, doi: 10.1021/bi970831q.
42. Dimroth, P. (2000) Operation of the F₀ motor of the ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 374-386, doi: 10.1016/s0005-2728(00)00088-8.
43. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., and Kandori, H. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nat. Commun.*, **4**, 1-10, doi: 10.1038/ncomms2689.
44. Mamedov, M.D., Mamedov, A.M., Bertsova, Y.V., and Bogachev, A.V. (2016) A single mutation converts bacterial Na⁺-transporting rhodopsin into an H⁺ transporter, *FEBS Lett.*, **590**, 2827-2835, doi: 10.1002/1873-3468.12324.
45. Luoto, H. H., Baykov, A. A., Lahti, R., Malinen, A. M. (2013) Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1255-1260, doi: 10.1073/pnas.1217816110.
46. Luoto, H. H., Nordbo, E., Baykov, A. A., Lahti, R., and Malinen, A. M. (2013) Membrane Na⁺-pyrophosphatases can transport protons at low sodium concentrations, *J. Biol. Chem.*, **288**, 35489-35499, doi: 10.1074/jbc.M113.510909.
47. Efiok, B. J., Webster, D. A. (1990) A cytochrome that can pump sodium ion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 370-375, doi: 10.1016/s0006-291x(05)81067-8.

48. Chung, Y. T., Stark, B. C., and Webster, D. A. (2006) Role of Asp544 in subunit I for Na⁺ pumping by *Vitreoscilla* cytochrome *bo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 1209-1214, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.184.
49. Efiok, B. J., and Webster, D. A. (1990) Respiratory-driven Na⁺ electrical potential in the bacterium *Vitreoscilla*, *Biochemistry*, **29**, 4734-4739, doi: 10.1021/bi00471a030.
50. Graf, S., Brzezinski, P., and von Ballmoos, C. (2019) The proton pumping *bo* oxidase from *Vitreoscilla*, *Sci. Rep.*, **9**, 4766, doi: 10.1038/s41598-019-40723-2.
51. Banciu, H. L., and Muntyan, M. S. (2015) Adaptive strategies in the double-extremophilic prokaryotes inhabiting soda lakes, *Curr. Opin. Microbiol.*, **25**, 73-79, doi: 10.1016/j.mib.2015.05.003.
52. Мунтян М. С., Морозов Д. А., Клишин С. С., Хитрин Н. В., Коломийцева Г. Я. (2012) Измерение электрического потенциала на мембранах экстремально щелочелюбивых бактерий рода *Thioalkalivibrio*, *Биохимия*, **77**, 1113-1121.
53. Krulwich, T. A., Liu, J., Morino, M., Fujisawa, M., Ito, M., and Hicks, D. B. (2011) Adaptive mechanisms of extreme alkaliphiles, in *Extremophiles handbook* (Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A. T., Robb, F. T., and Stetter, K. O., eds) Springer, Tokyo, pp. 119-139, doi: 10.1007/978-4-431-53898-1_2.6.
54. Krulwich, T. A., and Ito, M. (2013) Alkaliphilic prokaryotes, in *The prokaryotes – Prokaryotic Communities and Ecophysiology* (Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., eds) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 441-469, doi: 10.1007/978-3-642-30123-0_58.
55. Lewis, R. J., Belkina, S., and Krulwich, T. A. (1980) Alkalophiles have much higher cytochrome contents than conventional bacteria and than their own non-alkalophilic mutant derivatives, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 857-863, doi: 10.1016/0006-291x(80)90866-9.
56. Мунтян М. С., Попова И. В., Блох Д. А., Скрипникова Е. В., Устиян В. С. (2005). Энергетика щелочелюбивых представителей рода *Bacillus*, *Биохимия*, **70**, 171-176.
57. Krulwich, T. A., Ito, M., and Guffanti, A. A. (2001) The Na⁺-dependence of alkaliphily in *Bacillus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 158-168, doi: 10.1016/s0005-2728(00)00285-1.
58. Мунтян М. С., Блох Д. А. (2008) Измерение среднеточечного окислительно-восстановительного потенциала ковалентно-связанного цитохрома *c* в терминальной оксидазе алкалофильной бактерии *Bacillus pseudofirmus* FTU, *Биохимия*, **73**, 131-136.

IDENTIFICATION OF THE Na⁺-PUMPING CYTOCHROME OXIDASE IN MEMBRANES OF EXTREMELY ALKALIPHILIC BACTERIA *Thioalkalivibrio*

M. S. Muntyan^{1*}, D. A. Morozov¹, Y. F. Leonova², and T. V. Ovchinnikova²

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: muntyan@genebee.msu.ru

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

Received July 26, 2020

Revised September 1, 2020

Accepted September 1, 2020

For the first time, the functioning of the oxygen reductase Na⁺-pump (Na⁺-pumping cytochrome *c* oxidase of the *cbb*₃-type) was demonstrated by examining the respiratory chain of the extreme alkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio versutus* [Muntyan, M. S., et al. (2015) Cytochrome *cbb*₃ of *Thioalkalivibrio* is a Na⁺-pumping cytochrome oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7695-7700], a product of the *ccoNOQP* operon. In this study, we detected and identified this enzyme using rabbit polyclonal antibody against the predicted C-terminal amino acid sequence of its catalytic subunit. We found that the this *cbb*₃-type oxidase is synthesized in bacterial cells, where it is located in the membranes. The 48-kDa oxidase subunit (CcoN) is catalytic, while subunits CcoO and CcoP with molecular masses of 29 and 34 kDa, respectively, are cytochromes *c*. The theoretical *pI* values of the CcoN, CcoO, and CcoP subunits were determined. It was shown that parts of the CcoO and CcoP subunits exposed to the aqueous phase on the cytoplasmic membrane P-side are enriched with negatively charged amino acid residues, in contrast to the parts of the integral subunit CcoN adjacent to the aqueous phase. Thus, the Na⁺-pumping cytochrome *c* oxidase of *T. versutus*, both in function and in structure, demonstrates adaptation to extremely alkaline conditions.

Keywords: Na⁺-pump, cytochrome *c* oxidase, extremophily, alkaliphily, *cbb*₃-type oxidase