БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 12, с. 1918 – 1927

УДК 577.152.1

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

© 2020 М.С. Мунтян[1]*, Д.А. Морозов[1], Ю.Ф. Леонова[2], Т.В. Овчинникова[2]

[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-*c*-оксидазы cbb_3-типа) было получено при изучении дыхательной цепи экстремально алкалифильной 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-*c*-оксидазы, являющейся продуктом оперона *ccoNOQP*. С помощью кроличьих поликлональных антител, полученных на предсказанную *C*-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 *c*. Определены теоретические значения pI субъединиц CcoN, CcoO и CcoP. Показано, что части субъединиц CcoO и CcoP, экспонированные в водную фазу на P-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-*c*-оксидаза *T. versutus* как по функции, так и по структуре демонстрирует приспособленность к экстремально щелочным условиям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Na^+-насос, цитохром-*c*-оксидаза, экстремофилия, алкалифилия, оксидаза cbb_3-типа.

DOI: 10.31857/S0320972520120143

ВВЕДЕНИЕ

У аэробных организмов биологически доступная энергия, высвобождающаяся в процессе дыхания, первично запасается в виде трансмембранного градиента ионов H^+ на внутренней мембране митохондрий (у эукариот) или на цитоплазматической мембране (у прокариот). Важнейшими механизмами, которые перекачивают ионы H^+ и генерируют трансмембранный градиент ионов H^+, являются кислородредуктазные электронтранспортные цепи (КР-ЭТЦ). В общем случае работа КР-ЭТЦ по перекачке ионов H^+ обеспечивается комплексами I, III и IV. Более 35 лет тому назад в КР-ЭТЦ морских алкалифильных бактерий впервые был обнаружен принципиально новый тип преобразователей энергии, активный при щелочных pH, – Na^+-перекачивающий фермент на уровне комплекса I, а именно, Na^+-НАДН-хинон-оксидоредуктаза (NQR) [1]. Появление и использование Na^+-насосов у алкалифилов, по гипотезе академика В.П. Скулачева, связаны с преимуществами энергетики, базирующейся на градиенте ионов Na^+ [2]. Предложенная гипотеза позволяет объяснить, как алкалифилы с Na^+-типом энергетики преодолевают проблему низкой величины протон-движущей силы, создающейся вследствие обращенного градиента концентрации ионов H^+ на их мембранах. В.П. Скулачев предположил, что в КР-ЭТЦ аэробных алкалифильных бактерий также может существовать и Na^+-перекачивающий комплекс IV [3]. Однако более трех с половиной десятков лет NQR оставался единственным компонентом аэробных дыхательных цепей, для которого была доказана способность запасать энергию в форме трансмембранного градиента ионов Na^+. В 2015 г. впервые

Принятые сокращения: ТМФД – N,N,N′,N′-тетраметил-*p*-фенилендиамин; СА – сульфат аммония; ЦО – цитохром-*c*-оксидаза; КР-ЭТЦ – кислородредуктазные электронтранспортные цепи; NQR – Na^+-НАДН-хинон-оксидоредуктаза; ТМБЗ – тетраметилбензидин.

* Адресат для корреспонденции.

получено доказательство функционирования в аэробной дыхательной цепи Na^+-перекачивающего комплекса IV, представленного цитохром-*c*-оксидазой (ЦО) cbb_3-типа у экстремально алкалифильной бактерии *Thioalkalivibrio versutus* [4]. До этого времени среди всех исследованных ЦО были известны только H^+-перекачивающие ферменты. ЦО являются представителями суперсемейства оксидаз с гем-медным биядерным каталитическим центром и подразделяются на три подсемейства: A, B и C. ЦО C-типа (оксидазы cbb_3-типа) считаются наиболее древними среди них [5, 6]. Несмотря на то, что ЦО C-типа широко распространены как среди патогенных, так и у ряда полезных в сельском хозяйстве бактерий, они изучены в наименьшей степени. В частности, несмотря на успех в получении рентгеновской структуры оксидазы cbb_3-типа [7], к настоящему времени механизм перекачки протонов ферментами данного типа малоизучен.

Объект наших исследований, экстремально гало- и алкалифильная серуокисляющая бактерия *T. versutus* из класса Gammaproteobacteria, населяет уникальную экологическую нишу – высокощелочные содовые озера Тувы (Сибирь) с pH 9,2–11,0 и соленостью до 4 М по натрию [8]. Исследования на многих экстремофильных видах зачастую сопряжены с трудностями культивирования, вследствие чего ряд первичных Na^+-насосов из таких объектов никогда не изучали на уровне организма-хозяина, и вся информация об этих ферментах была получена исключительно на трансгенных штаммах, не являющихся экстремофилами. Так, были изучены относительно просто устроенные Na^+-перекачивающие ферменты, состоящие только из полипептидов одного вида. Среди них Na^+-пирофосфатазы из *Methanosarcina mazei*, *Moorella thermoacetica*, *Thermotoga maritima* [9] и Na^+-протеородопсин из *Indibacter alkaliphilus* [10]. В отличие от указанных работ, в представленной работе, как и в наших более ранних исследованиях Na^+-насосов экстремофилов [4, 11, 12], экспериментальная часть выполнена с использованием клеток и клеточных препаратов организма-хозяина. Na^+-перекачивающая cbb_3-оксидаза *T. versutus* – это уникальный новый фермент, для которого только недавно доказана функция транспорта ионов Na^+, новая для всего класса оксидоредуктаз. Физико-химические свойства фермента ранее не были известны. В задачу настоящей работы входило изучение свойств фермента, что могло бы пролить свет на структурные факторы, повлиявшие на приобретение комплексом столь новой функции. В статье описан способ получения к комплексу cbb_3-оксидазы специфических антител, использованных как инструмент для идентификации и исследования фермента. Подход может использоваться в будущих работах и быть полезен другим исследователям. Исследование дает ключ к пониманию механизмов адаптации бактерии к условиям обитания, характеризующимся одновременно двумя экстремальными показателями – крайне щелочными pH и близкими к насыщающим концентрациями солей натрия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культивирование бактерии *T. versutus* (штамм *T. versutus* AL2) проводили в аэробных условиях, как описано Сорокиным и соавт. [13].

Определение нуклеотидной последовательности 3′-концевого фрагмента гена каталитической субъединицы Na^+-перекачивающей оксидазы *T. versutus*. Полинуклеотиды, содержащие 3′-концевой фрагмент гена каталитической субъединицы CcoN, получали путем ПЦР-амплификации с использованием геномной ДНК *T. versutus* в качестве матрицы и пары вырожденных праймеров, сконструированных на основе множественного выравнивания последовательностей того же оперона из девяти других видов протеобактерий: Fw, 5′–TTCGA(A,G)GG(C,T,G)CCGATGATGTCG–3′ и Rv, 5′–TT(C,G)GA(A,T,C,G)CCCCA(T,C)TG(A,G)AA(G,C,A)G–3′. ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 10–20 нг исследуемой ДНК, 2 пМ каждого праймера и 2 ед Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Россия) по следующей температурной схеме: стартовая денатурация – 94 °C, 3 мин, затем 30 циклов амплификации следующего температурного профиля: денатурация – 94 °C, 30 с, отжиг – 50 °C, 30 с и удлинение – 72 °C, 30 с. ДНК секвенировали в обоих направлениях с использованием автоматического четырехкапиллярного секвенатора ДНК «ABI Prism 3100-Avant» («Applied Biosystems», США) и набора реагентов «ABI Prism BigDye Terminator v. 3.1» в центре «Геном» Института молекулярной биологии им. Энгельгардта (РАН). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием сервера BLASTA и выравнивали с использованием программы ClustalW [14]. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *ccoN T. versutus* депонирована в базе данных GenBank (номер доступа: AM850129).

Выделение цитоплазматических мембран и экстракция мембранных цитохромов. Замороженные клетки *T. versutus* оттаивали и к полученной биомассе добавляли 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ фенил-

метилсульфонилфторид и 5 мкг/мл ДНКазы (конечные концентрации). Клетки разрушали двумя проходами через ячейку Френч-пресса («Aminco», США) при давлении 16 000 фунт/кв. дюйм. Из полученного гомогената цитоплазматические мембраны выделяли как описано ранее, но исключали обработку клеток лизоцимом [15]. Мембранные белки экстрагировали путем перемешивания суспензии цитоплазматических мембран в течение 15 мин при 4 °C в растворе, содержащем 30 мМ Mops-HCl, pH 7,5, 0,5 мМ ЭДТА, 5 мМ NaCl, 0,7 М KCl, 8–15% октил-β-D-глюкопиранозид (при соотношении 2,5 г на 1 г общего белка). После экстракции мембраны осаждали при 15 000 *g* в течение 15 мин при 4 °C. Супернатант, содержащий экстракт белков, фракционировали СА. Фракцию белков, образующую преципитат красного цвета при насыщающей концентрации СА 50–70% и обладающую полной дыхательной активностью, присущей мембранам, далее обозначали, как экстрагированные мембранные цитохромы «фракция 50–70%».

Иммунизация кролика и получение поликлональных антител. Для выработки у кролика поликлональных антител против каталитической субъединицы CcoN комплекса cbb_3-оксидазы использовали пептидо-белковый конъюгат, который получали путем инкубации 0,2 мкмоль синтетического олигопептида: KAEAREAQAA-STEARTA и 1 мг БСА с глутаровым альдегидом. После солюбилизации в PBS-буфере пептидо-белковый конъюгат в концентрации 1 мг/мл в суспензии с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1 использовали для иммунизации кролика линии «Серый великан» путем подкожных инъекций по 1 мл в каждый бок через каждые 30 дней в течение 3-х мес. По окончании периода иммунизации у кролика отбирали 10 мл крови для проверки титра антител и выделения из сыворотки фракции, обогащенной IgG, по стандартной методике путем высаливания СА. Полученную фракцию иммуноглобулинов хранили при 4 °C с добавлением нескольких кристаллов азида натрия и в дальнейшем использовали в качестве реагента, содержащего поликлональные антитела на синтезированный олигопептид.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг. Денатурирующий электрофорез проводили в 12%-ном ДСН-ПААГ с использованием Tris-Tricine буферной системы [16]. Перед электрофорезом образцы суспендировали в буфере для образцов, содержащем 3%-ный ДСН, и затем оставляли на 1 ч при 25 °C без кипячения. Неденатурирующий электрофорез проводили в 6%-ном ПААГ, содержащем 0,25%-ный Triton X-100, с использованием Tris-Tricine электродного буфера, содержащего 0,25%-ный Triton X-100 [17]. После завершения электрофореза в ПААГ выявляли: а) цитохромы по методу Thomas et al. [18], используя пероксидазную реакцию с тетраметилбензидином; б) белки, обладающие оксидазной активностью в растворе 2 мМ ТМФД при 37 °C, как описано ранее [19]. Для проведения иммунодетекции белки после электрофореза переносили на PVDF-мембраны Hybond-P («Amersham Phar-macia Biotech», Швеция) путем электроблоттинга при силе тока 200 мА в течение 1,5 ч по методу Towbin et al. [20]. Белки и полипептиды, перекрестно реагирующие с АТ, выявляли ECL-методом после обработки козьими антикроличьими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в соответствии с инструкциями производителя («Amersham Pharmacia Biotech»).

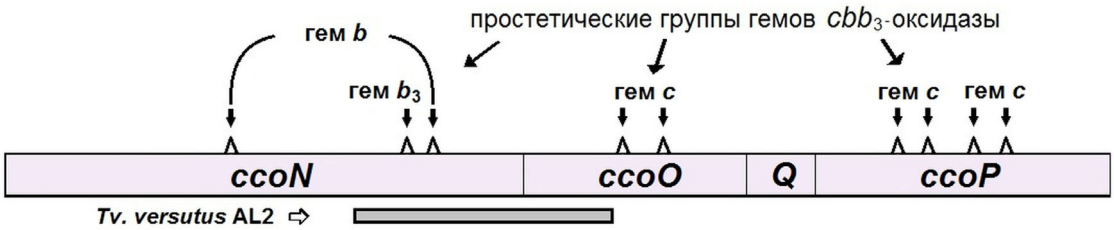
Определение *N*-концевой аминокислотной последовательности проводили, как описано ранее [21], путем отщепления аминокислотных остатков по методу Edman и хроматографии фенилтиогидантоиновых производных аминокислот с использованием секвенатора «Applied Biosystems 477A» (США) по стандартным программам.

Моделирование субъединиц cbb_3-оксидазы проводили в среде «SWISS-MODEL Server» с использованием пакета программ для гомологичного моделирования «SWISS-MODEL Workspace/GMQE» [22]. Теоретическое значение pI белковых молекул определяли с помощью программного средства «Compute pI/Mw tool» на сервере Expasy [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее нами установлено, что Na^+-перекачивающий комплекс IV у экстремально алкалифильной бактерии *T. versutus* представлен ЦО cbb_3-типа [4]. В настоящей работе для подготовки идентификации Na^+-перекачивающей ЦО методом иммуноферментного анализа была получена 3′-концевая нуклеотидная последовательность гена каталитической субъединицы CcoN (номер доступа в GenBank: AM850129). Схема иллюстрирует положение полученной последовательности на карте оперона *ccoNOQP*.

Эти данные были использованы нами при конструировании полипептида, который мог бы послужить антигеном для выработки антител на субъединицу CcoN при иммунизации кроликов. Варианты последовательностей пептидов, получаемые при конструировании, контролировали на уникальность и отсутствие совпадений со



Оперон *ccoNOQP* и расшифрованные фрагменты генов *T. versutus*. Предполагаемые сайты связывания простетических групп оксидазы cbb_3-типа показаны треугольниками, согласно данным для оперона *ccoNOQP Rhodobacter sphaeroides* [24]

структурой известных токсичных белков. С учетом этих условий был синтезирован 17-членный пептид, соответствующий предполагаемой *C*-концевой области субъединицы CcoN. Синтезированный пептид в составе конъюгата с БСА, имеющего структуру $(KAEAREAQAASTEARTA)_8$БСА, был использован для иммунизации кролика. В течение всего периода иммунизации поведение и состояние кролика не отличались от обычного, а аппетит животного был в норме. Эти наблюдения позволили сделать вывод, что сконструированный пептид не обладает токсическим действием. По окончании иммунизации из крови, забранной у кролика, проводили выделение фракции антител, обогащенной IgG. По титру полученных фракций IgG можно видеть, что в результате иммунизации кролика на пептидо-белковый конъюгат выработались антитела (рис. 1).

После электрофоретического разделения экстрагированных мембранных белков *T. versutus* (фракция 50–70%) в 6%-ном ПААГ в отсутствие денатурирующих агентов была проведена иммунодетекция с использованием полученного препарата антител к *C*-концевому фрагменту субъединицы CcoN (рис. 2). Поликлональные антитела, выработавшиеся на пептидо-белковый конъюгат, давали перекрестную реакцию только с одним гем-содержащим белковым комплексом в экстракте мембранных белков (рис. 2, *в*). Этот белковый комплекс обнаруживал оксидазную (рис. 2, *а*) и пероксидазную активность, характерную для гемов (рис. 2, *б*). По сумме перечисленных признаков можно было предположить, что белковый комплекс является cbb_3-оксидазой. Для определения субъединичного состава оксидазы cbb_3-типа белковый комплекс, перекрестно реагирующий с анти-CcoN-антителами, элюировали из соответствующих зон в 6%-ном ПААГ и подвергали разделению во втором направлении с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. На рис. 3 (дорожки *2* и *3*) показан результат разделения элюированных белков и последующей иммунодетекции анти-CcoN-антителами (дорожка *5*). Можно видеть, что анти-CcoN-антитела обладают хорошей специфичностью и предпочтительно связываются лишь с одной белковой полосой. Мол. масса субъединицы CcoN *T. versutus*, определенная с помощью белков-маркеров, составляет 48 кДа (рис. 3, дорожки *2*, *5*).

Поскольку в денатурирующих условиях белки теряют нековалентно связанные гемы, по окраске ДСН-ПААГ на гемы можно заключить, что полипептиды с мол. массами 34 и 29 кДа содержат ковалентно связанные гемы *c*, так же как субъединицы CcoO и CcoP известных оксидаз cbb_3-типа. На рис. 3 (дорожка *3*) видно, что субъ-

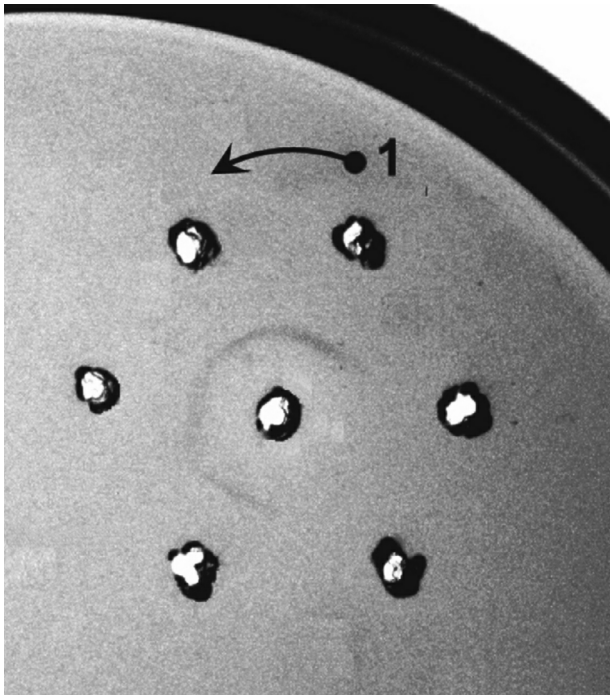


Рис. 1. Определение титра препарата антител с помощью двойной радиальной иммунодиффузии по Ухтерлони в 1%-ном агарозном геле. В центральной лунке: антиген – препарат синтезированного пептида в виде пептидно-белкового конъюгата; в 6-ти периферических лунках: последовательные разведения препарата антител, представленных фракцией иммуноглобулинов IgG из сыворотки иммунизированного кролика; стрелкой показано направление уменьшения степени разведения

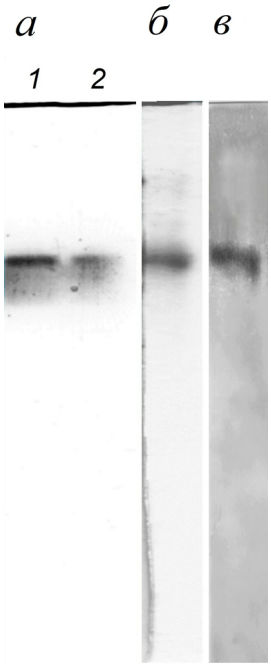


Рис. 2. Иммунодетекция комплекса cbb_3-оксидазы *T. versutus*. Электрофореграмма экстракта мембранных цитохромов (фракция 50–70%) *T. versutus* в 6%-ном ПААГ в отсутствие денатурирующих агентов (*а*, *б*); окраска на ТМФД-оксидазную активность (*а*) и на гем (*б*); фотореплика PVDF-мембраны на рентгеновской пленке после обработки первичными антителами кролика к субъединице CcoN *T. versutus* и флуоресцентной детекции по ECL-методу (*в*)

единица с мол. массой 34 кДа дает гораздо более интенсивную окраску на гем, чем субъединица с мол. массой 29 кДа. Подобное соотношение по окраске на гем описано для субъединиц CcoP и CcoO других известных ЦО cbb_3-типа, что объясняется присутствием двух гемов C в субъединице CcoP против одного в субъединице CcoO. Это дало основание предположить, что в препаратах из *T. versutus* субъединица с мол. массой 34 кДа является субъединицей CcoP, а субъединица с мол. массой 29 кДа – CcoO. Предположение подтвердилось после определения *N*-концевой аминокислотной последовательности полипептида с мол. массой 29 кДа. Эта последовательность состава – KHESVETN – оказалась идентичной *N*-концевому фрагменту субъединицы CcoO в комплексе cbb_3 из *T. versutus*, предсказанному по нуклеотидной последовательности соответствующего гена в полной нуклеотидной последовательности оперона *ccoNOQP* cbb_3-оксидазы *T. versutus* AL2 (код доступа в GenBank: HE575403.1), которая была нами определена позднее после определения 3′-концевой нуклеотидной последовательности гена каталитической субъединицы CcoN. Субъединицы CcoN, CcoO и CcoP – обязательные компоненты комплекса cbb_3 у известных представителей [5]. Таким образом, в настоящей работе удалось получить препарат IgG, специфичный к субъединице CcoN из комплекса оксидазы cbb_3-типа *T. versutus*, и установить, что Na^+-перекачивающая ЦО cbb_3-типа из экстремально алкалифильной бактерии *T. versutus* обладает общей структурой с представителями ЦО C-кластера [25]. Аминокислотная последовательность субъединиц комплекса, предсказанная по нуклеотидной последовательности оперона, имеет высокую гомологию с субъединицами комплекса cbb_3 из бактерии *P. stutzeri*. Высокая степень гомологии позволила провести гомологичное моделирование на основе данных о кристаллической структуре комплекса cbb_3 из бактерии *P. stutzeri* [7]. Результаты моделирования показывают, что части субъединиц CcoO и CcoP из *T. versutus*, экспонированные в водную фазу на стороне-P цитоплазматической мембраны, обогащены отрицательно заряженными аминокислотными остатками (рис. 4, *г*, *д*). В

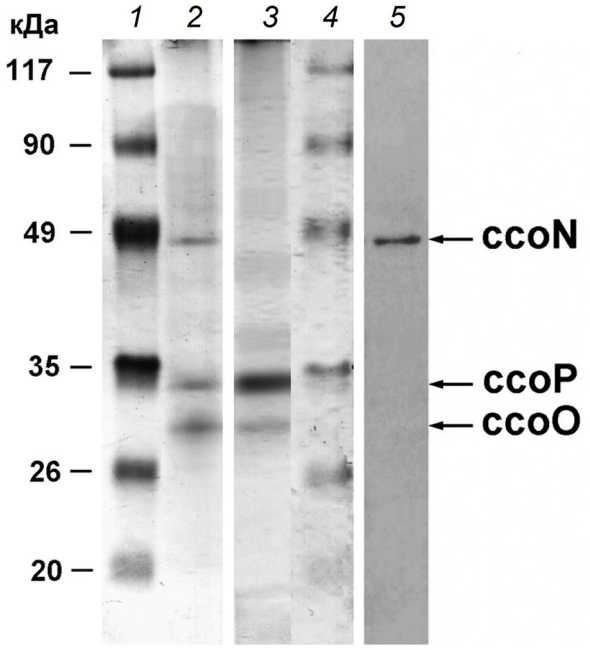


Рис. 3. Определение субъединичного состава и молекулярной массы субъединиц cbb_3-оксидазы *T. versutus* после электрофореза в 12%-ДСН-ПААГ. В дорожках слева направо: *1*, *4* – предокрашенные белки-маркеры; *2*, *3* – фракция белков с оксидазной активностью, элюированная из 6%-ного ПААГ после неденатурирующего электрофореза мембранных белков *T. versutus* (рис. 2, *а*); *5* – фотореплика PVDF-мембраны на рентгеновской пленке. Окраска: на белок – дорожки *1*, *2* (Кумасси R-250); на гемы – дорожки *3*, *4* (ТМБЗ); засветка рентгеновской пленки после флуоресцентного окрашивания PVDF-мембраны (ECL-метод), исходно обработанной первичными анителами кролика к субъединице CcoN *T. versutus*

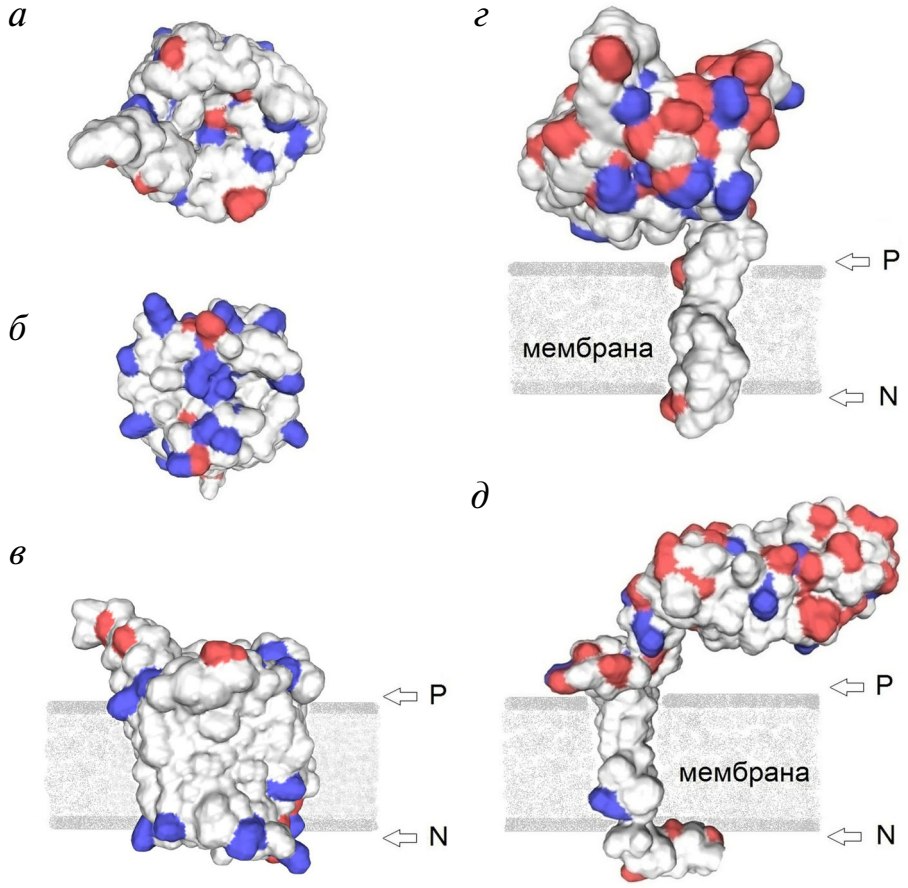


Рис. 4. Модели коровых субъединиц комплекса cbb_3 у экстремально алкалифильной бактерии *T. versutus*. Субъединица CcoN (*а*, *б*), вид в плоскости мембраны со стороны-P (*а*) и стороны-N (*б*). Субъединицы CcoN (*в*), CcoO (*г*) и CcoP (*д*), вид сбоку перпендикулярно плоскости мембраны. Стороны мембраны обозначены стрелками и буквами P и N. Отрицательно и положительно заряженные аминокислотные остатки на поверхности субъединиц окрашены соответственно в красный и синий цвета. При моделировании за эталон принимали трехмерную структуру гомологичных субъединиц комплекса cbb_3 *P. stutzeri* (номер доступа в PDB: 3MK7) [7]

субъединице CcoN, представленной полностью интегральным белком, напротив, суммарно превалируют положительно заряженные аминокислотные остатки (рис. 4, *а*, *б*, *в*). В соответствии с этими данными интегральная субъединица CcoN характеризуется pI с рассчитанным значением 9,2, а поверхность субъединицы, обращенная в цитоплазматический отсек, при pH < 9,2 заряжена положительно. У мембранных субъединиц CcoO и CcoP, имеющих большие периферические домены в периплазматическом отсеке, напротив, рассчитанные значения pI составили 4,51 и 4,44 соответственно, и при pH > 4,5 эти части молекул несут отрицательный заряд.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известные ЦО cbb_3-типа после выделения из мембран и очистки состоят из трех-четырех субъединиц [26, 27]. По данным, полученным в настоящем исследовании, cbb_3-оксидаза *T. versutus* состоит из трех субъединиц с мол. массами 48, 34 и 29 кДа, из которых медленно мигрирующая субъединица является каталитической, а две более подвижные – цитохромами *c*. По строению фермент сходен с известными гомологами из *R. sphaeroides* [26, 28], *Rhodobacter capsulatus* [29, 30], *Bradyrhizobium japonicum* [31, 32], *Thioalcalomicrobium aerophilum* AL3 [33], *H. pylori* [34], *P. stutzeri* [35], *Rhizobium etli* [36]. Сходство наблюдается не только на уровне субъединичного состава, но и на уровне аминокислотных последовательностей, степень гомологии которых у каталитических субъединиц комплекса из *T. versutus* и *P. stutzeri* достигает 69%. Однако те комплексы cbb_3-оксидаз из *Paracoccus denitrificans* [37, 38], *R. sphaeroides* [24], *H. pylori* [34] и *B. japonicum* [39], у которых были исследованы свойства молекулярных насосов, обнаруживают H^+-транспортную активность, в отличие от cbb_3-

оксидазы *T. versutus*. Последняя, в противоположность гомологам в вышеперечисленных видах бактерий, не только не производит закисления внешней среды в ответ на добавки кислорода к анаэробным суспензиям, но в присутствии ионов Na^+ и разобщителя-протонофора создает обратимое защелачивание, эквивалентное числу входящих протонов во внутреннее пространство клеток со стехиометрией $2H^+/e^-$ [11]. Эти результаты позволили нам предположить, что протоны входят внутрь клеток как противоионы в ответ на откачку ионов Na^+ из клеток *T. versutus* cbb_3-оксидазой. Функционирование на конце дыхательной цепи *T. versutus* первичного Na^+-насоса, предсказанного в обсуждаемой работе по данным косвенного метода [11], позднее было экспериментально доказано прямым методом с радиоактивным изотопом ^{22}Na [4]. Такое различие в ионной специфичности, как у высокогомологичных ЦО cbb_3-типа, известно и у других энергопреобразующих комплексов. Показано, что достаточно замены 1–3 аминокислотных остатков для изменения функции с Na^+- на H^+-перекачивающую или с H^+- на Na^+-перекачивающую в таких первичных ионных насосах, как АТРазы F_0F_1-типа [40–42], протеородопсины [43, 44], и с Na^+/H^+-перекачивающей на Na^+-перекачивающую в пирофосфатазах [45, 46]. Отдельного обсуждения заслуживают данные, полученные группой Webster et al., о транспорте ионов Na^+ с участием хинолоксидазы *bo*-типа из бактерии *Vitreoscilla* [47, 48]. Проведенный нами подробный анализ этих данных показал, что отсутствие теста с протонофором-разобщителем на системе, в которой была экспрессирована оксидаза *bo*-типа [49], не позволяет однозначно сделать вывод о ионной специфичности этого насоса и не исключает вторичный характер транспорта ионов Na^+. Описанное в этих работах явление можно было бы объяснить активностью Na^+/H^+-антипортера, работающего в паре с первичным H^+-насосом – оксидазой *bo*-типа, а не самой оксидазой *bo*-типа [4]. Позднее экспериментальные исследования Graf et al. показали, что оксидаза *bo*-типа из *Vitreoscilla* действительно является строгим H^+-насосом и не перекачивает ионы Na^+ [50]. Таким образом, описанная нами ЦО cbb_3-типа у представителей рода *Thioalkalivibrio* является первым доказанным первичным Na^+-насосом, функционирующим на конце аэробной дыхательной цепи.

Нужно отметить, что в течение долгого времени, до появления публикации в 2015 г. [4], убедительные доказательства наличия Na^+-перекачивающей активности в комплексе IV в литературе отсутствовали. Вероятно, причина этого заключается в выборе объектов исследований. Объекты наших исследований долгое время оставались недоступными для культивирования и функционального биохимического исследования из-за неразработанности биохимических подходов, а также малой изученности характеристик экологической ниши, содовых озер, в которых эти организмы обитают. Уникальность содовых озер по сравнению с солевыми озерами состоит в том, что они характеризуются более щелочными показателями pH (9,2–11,0) при близких к насыщающим концентрациям ионов натрия (до 4 М) с преобладанием карбонатных солей натрия [8]. Столь специфические условия, по-видимому, стали движущей силой приобретения обитателями таких водоемов ряда особых признаков [51], таких как функционирование Na^+-насоса с оптимумом при pH 9,5 на конце аэробной дыхательной цепи [4] и крайне высокое абсолютное значение электрического потенциала на мембранах, составляющее более –230 мВ [52] и превосходящее значение –180 мВ у алкалифильных видов *Bacillus* [53, 54]. И так же, как и у алкалифилов из других щелочных ниш, у *T. versutus* можно отметить повышенное содержание цитохромов группы *b* и *c* [55, 56] и преобладание отрицательно заряженных остатков в полипептидных цепях ЦО, описанное у экстремально алкалифильных видов *Bacillus* [53, 54]. Из данных, полученных в настоящей работе, следует, что в условиях высокощелочной среды обитания (pH 9,5–11,0), когда физиологические значения pH внутри клеток алкалифилов находятся в пределах 7,5–9,0 [57], поверхность комплекса cbb_3-оксидазы в клетках *T. versutus* со стороны цитоплазмы заряжена положительно (представлена в основном поверхностью субъединицы CcoN), а со стороны периплазмы – отрицательно (представлена в основном гидрофильными доменами субъединиц CcoO и CcoP). Таким образом, по сравнению с ферментами-гомологами из организмов, обитающих в нейтральных и умеренно-щелочных ареалах, у комплекса cbb_3-оксидазы *T. versutus* должен создаваться более низкий редокс-потенциал кофакторов, представленных гемами C в гидрофильных доменах субъединиц CcoO и CcoP на P-стороне мембран. Можно предполагать, что такая особенность, которая наблюдается и у алкалифильных бактерий рода *Bacillus* [53, 58], должна повышать эффективность передачи электронов от гемов C субъединиц CcoP и CcoO в активный центр фермента и приводить к созданию экономичной модели преобразователя энергии. Таким образом, Na^+-перекачивающая ЦО *T. versutus* как по функции, так и по строению демон-

стрирует приспособленность к экстремально щелочным условиям.

Наши исследования подтвердили гипотезу академика В.П. Скулачева о функционировании Na^+-перекачивающего преобразователя энергии на концевом отрезке КР-ЭТЦ у экстремально алкалифильных организмов. В настоящей работе впервые показано, что такой Na^+-насос имеет особые свойства, позволяющие организмам-хозяевам эффективно запасать энергию в условиях экстремально высоких значений pH и концентрации солей, когда протон-движущая сила на мембранах этих организмов низка.

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).

Благодарности. Авторы выражают благодарность В.П. Скулачеву за постоянное внимание к работе и плодотворное обсуждение результатов, Н.В. Поздняковой за помощь в работе с животными.

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликта интересов в финансовой или каких-либо иных сферах деятельности.

Соблюдение этических норм. Уход за кроликами и их использование в экспериментах осуществляли в соответствии с протоколами, разработанными и утвержденными Комитетом по этике работы с животными в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Все процедуры выполняли в соответствии с принципами Федерации сообществ по научным исследованиям с лабораторными животными (FELASA).

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. Грищук Ю. В., Мунтян М. С., Попова И. В., Сорокин 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 denitrificancs* 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. Schägger, 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., Ustiyan, 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 саа3-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 *fnrL* 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 F_1F_0-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 F_1F_0 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 F_0 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. Morozov[1], Y. F. Leonova[2], and T. V. Ovchinnikova[2]

[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 p*I* 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