

УДК 577.152.1

ХАРАКТЕРИСТИКА КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЛАВОЦИТОХРОМ *c* СУЛЬФИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Thioalkalivibrio paradoxus**

© 2021 Т.В. Тихонова**, А.В. Лильина, Е.М. Осипов, Н.С. Шипков,
Н.И. Дергоусова, О.Г. Куликова, В.О. Попов

Федеральный исследовательский центр биотехнологии РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: ttikhonova@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 25.09.2020

После доработки 23.11.2020

Принята к публикации 23.11.2020

Флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа (FCC) считается одним из основных ферментов дыхательного цикла сероокисляющих бактерий. FCC катализирует окисление сульфид- и полисульфид-ионов до молекулярной серы с переносом электронов на цитохром *c*. Каталитически активная форма фермента представляет собой нековалентно связанный гетеродимер, состоящий из FAD- и гем-связывающих субъединиц. В геноме бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* обнаружено 5 копий генов гомологичных FCC со степенью идентичности аминокислотных последовательностей 54–36%. При росте бактерии на тиоцианате или тиосульфате как основных источниках энергии синтезируются продукты разных копий генов FCC. В настоящей работе выделена и охарактеризована FCC, которая синтезируется при росте *Tv. paradoxus* на тиоцианате. Показано, что FCC окисляет сульфид и не окисляет другие восстановленные соединения серы, такие как тиосульфат, сульфит, тетраионат и молекулярную серу, а также не катализирует обратную реакцию восстановления серы до сульфида. Охарактеризованы кинетические параметры реакции окисления сульфид-иона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сероокисляющие бактерии, флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа, тиоцианатдегидрогеназа, ферментативная кинетика.

DOI: 10.31857/S0320972521030106

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные сероокисляющие γ -протеобактерии рода *Thioalkalivibrio* являются галоалкалофильными облигатными автотрофами, обитающими в содовых озерах Африки, Центральной Азии и Северной Америки [1–4]. Микробные сообщества этих озер приспособились к росту в экстремальных условиях щелочных pH (до 11) и высоких концентраций соли (до 4 М Na⁺). Основным источником энергии для литотрофных микробных сообществ в содовых озерах является окисление восстановленных соединений серы, таких как тиосульфат, сульфид, полисульфид и молекулярная сера [1].

Десять из 85 штаммов *Thioalkalivibrio*, обитающих в содовых озерах, способны расти на тиоцианате (SCN⁻) как единственном источнике энергии [2, 5]. Наиболее исследованные из них – *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1, *Thioalkalivibrio nitratireducens* ALEN 2 и *Thioalkalivibrio thio-cyanoxidans* ARh 2T [6–11]. На рис. 1 представлены основные пути метаболизма соединений серы в энергетическом цикле бактерий рода *Thioalkalivibrio*, основанные на анализе геномов и транскриптомов бактерий *Thioalkalivibrio* [6].

Одним из центральных ферментов серного метаболизма у сероокисляющих бактерий является флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа (FCC) [12–16], которая катализирует окисление сульфид- и полисульфид-ионов до молекулярной серы с переносом электронов на цитохром *c*. Каталитически активная форма FCC представляет собой нековалентно связанный гетеродимер, состоящий из флавин-связывающей субъединицы (≈ 45 кДа) и моно- (≈ 10 кДа) [13, 14] или ди- (≈ 25 кДа) [12, 15, 16] гем *c*-связывающей субъединицы. Флавин-связывающая субъединица FCC содержит ковалентно связанную посредством простой тиоэфирной связи молекулу флавинадениндинуклеотида (FAD).

Принятые сокращения: MM – молекулярная масса; *SutC* – цитохром *c* из сердца лошади; FCC – флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа; TcDH – тиоцианатдегидрогеназа; TrFCC – флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1; SQR – сульфид : хиноноксидоредуктаза.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-320, 08.03.2021.

** Адресат для корреспонденции.

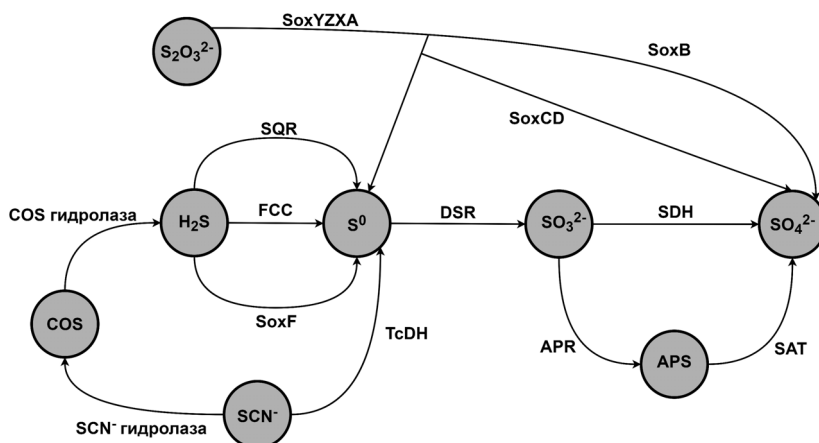


Рис. 1. Схема окислительного этапа серного цикла у бактерий рода *Thioalkalivibrio* [6]. SQR – сульфид: хиноноксидоредуктаза; FCC – флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа; SoxYZXAB и SoxCD – компоненты сероокисляющей системы Sox; TcDH – тиоцианатдегидрогеназа; DSR – диссимиляторная сульфитредуктаза; SDH – сульфитдегидрогеназа; APR – аденозин-5'-фосфосульфатредуктаза; SAT – сульфатаденилилтрансфераза

В геноме одного из тиоцианат-окисляющих штаммов *Tv. paradoxus* ARh 1 [6] содержится 5 копий генных кластеров, кодирующих белки, гомологичные FCC. Ген одной из пяти потенциальных FCC (далее *TrpFCC*) расположен в непосредственной близости с опероном, отвечающим за биосинтез тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) – ключевого белка метаболизма тиоцианата у бактерий рода *Thioalkalivibrio* [6, 7, 11]. Сравнительный анализ транскриптомов бактерии *Tv. thiooxyanoxidans* ARh 2T, выращенной с тиосульфатом и тиоцианатом в качестве источника энергии, показал, что экспрессия гена TcDH и окружающих его генов сильно возросла при росте клеток на тиоцианате. Максимальное повышение уровня экспрессии достигалось для генов TcDH (\log_2 отношения уровней экспрессии гена при росте на тиоцианате и тиосульфате составлял 7,5) и FCC (соответствующий логарифм отношения уровней экспрессии составлял 6,94 – для флавиновой субъединицы FCC и 5,82 – для гем-содержащей субъединицы FCC). Другие гены в кластере TcDH показывают изменение уровня экспрессии в диапазоне 3,95–6,75 [6]. Следовательно экспрессия гена FCC у бактерии *Tv. thiooxyanoxidans* повышается специфически и строго ассоциирована с уровнем экспрессии гена TcDH. Можно предположить, что аналогичная ситуация реализуется и для близкородственной бактерии *Tv. paradoxus* ARh 1. Таким образом, *TrpFCC* является необходимым компонентом метаболизма тиоцианата у бактерий *Tv. paradoxus*. Однако роль *TrpFCC* в метаболизме тиоцианата неочевидна, поскольку разложение тиоцианата (рис. 1) не включает образования сульфид-ионов. Было высказано предположение, что *TrpFCC* может

участвовать в переносе электронов, образующихся при окислении тиоцианата TcDH [6].

Ранее *TrpFCC* была выделена нами из бактерии *Tv. paradoxus*, выращенной на тиоцианате, где она является одним из мажорных белков периплазматической фракции. Методом рентгеноструктурного анализа получена пространственная структура *TrpFCC* [17]. Сравнительный анализ пространственной структуры *TrpFCC* и структур FCC из других организмов подтвердил, что *TrpFCC* содержит все характерные особенности активных центров сульфиддегидрогеназ (FCC и SQR), включая редокс-активные остатки цистеина, вовлечённые в окисление сульфидов с последующим переносом электронов на FAD. Дополнительным подтверждением участия *TrpFCC* именно в окислении сульфид-ионов до серы является присутствие дополнительного атома серы как продукта реакции на одном из каталитических цистеинов [17]. Подобные структуры с цепочками из двух или восьми атомов серы в активном центре были получены ранее для FCC из *Thermochromatium tepidum* [16] и SQR из *Aquifex aeolicus* [18, 19]. Электрон-транспортная субъединица *TrpFCC* содержит один домен, связывающий один гем *c*, координированный остатками His и Met. Укладка полипептидной цепи цитохромного домена аналогична укладке полипептидной цепи в *N*-концевом домене двухдоменных цитохромных субъединиц у других FCC. В пространственной структуре, полученной в работе Osipov et al. [17], *TrpFCC* находится в комплексе с медь-связывающим белком CopC, для гена которого также наблюдалось повышение уровня транскрипции при росте на тиоцианате. Предполагается [17], что комплекс *TrpFCC*–CopC является частью более крупного

периплазматического комплекса, который включает также TcDH. Роль комплекса может заключаться в окислении тиоцианата и утилизации образующейся серы.

Для проверки этих предположений в настоящей работе проведена функциональная характеристика *TrFCC*. Показано, что, подобно ранее описанному FCC, фермент обладает узкой субстратной специфичностью, катализируя окисление только сульфид-ионов. *TrFCC* не катализирует окисление других анионов, содержащих атом серы в восстановленном состоянии (тиосульфат, тетратионат, сульфит), а также окисление или восстановление молекулярной серы. Для реакции окисления сульфид-иона *in vitro* подобраны оптимальные условия и определены кинетические параметры реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка *TrFCC*. Биомасса *Tv. paradoxus* ARh 1 была выращена в колбах на минеральной $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ среде, содержащей 0,6 М общего Na^+ при pH 9,75, как описано ранее [5] с тиоцианатом натрия (10 мМ) в качестве источника энергии и азота. После поглощения всего тиоцианата в ростовую среду добавляли ещё одну порцию тиоцианата до концентрации 10 мМ. Концентрация ионов Cu^{2+} (в виде цитрата) в ростовой среде составляла 30 мкг/литр.

После полной утилизации тиоцианата клетки из 10 литров культуры были осаждены центрифугированием («Hitachi», Япония) и промыты буфером, содержащим 20 мМ MOPS, pH 7,5 и 0,6 М NaCl. *TrFCC* выделяли из периплазматической фракции. Процедура выделения включала две стадии анионообменной хроматографии и стадию гель-проникающей хроматографии (гель-фильтрации). Для получения периплазматической фракции клетки инкубировали 10 мин в 42 мл лизирующего буфера (20 мМ MOPS, pH 7,5; 1 мг/мл лизоцим, 500 мМ сахараза) при комнатной температуре. Затем добавляли 63 мл воды Milli-Q и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) до концентрации 1 мМ и инкубировали 15 мин при 4 °С. Периплазматическую фракцию отделяли от сферопластов центрифугированием при 8000 об./мин, 30 мин («Allegra», США). Периплазматическую фракцию наносили на анионообменную колонку MonoQ 10/100 («GE Healthcare», США), уравновешенную 25 мМ MOPS, pH 7,5. Белки элюировали линейным градиентом 0–70% 1 М раствора NaCl в 25 мМ MOPS, pH 7,5. Хроматографию выполняли на приборе АСТА FPLC («GE Healthcare»,

США). Фракции, обладавшие сульфиддегидрогеназной активностью, были собраны при содержании 1М NaCl 30–40% и объединены. После диализа против 25 мМ MOPS, pH 7,5, объединённые фракции были повторно нанесены на колонку MonoQ 10/100, уравновешенную тем же буфером. FCC элюировали ступенчатым градиентом 1 М NaCl в 25 мМ MOPS, pH 7,5. Фракции, обладавшие сульфиддегидрогеназной активностью, элюировались при содержании NaCl – 42%. Завершающей стадией очистки являлась гель-проникающая хроматография на колонке Superdex 75 10/300 («GE Healthcare», США). Колонку уравновешивали 25 мМ MOPS, pH 7,5, 150 мМ NaCl.

Концентрацию белка определяли методом Бредфорда [20]. Чистоту белка анализировали методом Ds-Na-ПААГ электрофореза [21]. Идентификацию белков проводили методом MALDI-TOF MS на масс-спектрометре Ultraflex III MALDI-TOF/TOF («Bruker», Германия).

Определение ферментативной активности *TrFCC*. Ферментативная активность *TrFCC* измерялась спектрофотометрически при 30 °С с использованием спектрофотометра Cary 100 Bio («Thermo Scientific», США). Реакционная смесь содержала 50 мМ глицин-NaOH буфер, pH 9,5, 10 мкМ сульфид натрия и 14 нМ фермент; 20 мкМ цитохром *c* из сердца лошади (*CytC*) («Sigma», США) использовали как акцептор электронов. Реакцию инициировали сульфидом натрия. Начальные скорости ферментативной реакции рассчитывали из начальных участков кинетических кривых восстановления *CytC*, регистрируемых при 550 нм ($\epsilon_{550} = 22\,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). При расчётах вносили поправку на скорость неферментативной реакции, поэтому параллельно измеряли скорость восстановления *CytC* сульфидом натрия в отсутствие *TrFCC*. Кинетические измерения проводили в трех независимых повторах. Концентрацию сульфида натрия в растворе определяли с помощью реактива Элмана (DTNB, 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота). DTNB взаимодействует со свободными сульфгидрильными группами, образуя смешанный дисульфид и ярко-желтую 2-нитро-5-тиобензойную кислоту ($\epsilon_{412} = 14\,150 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Кинетические параметры сульфиддегидрогеназной реакции рассчитывали из зависимостей начальных скоростей реакции от концентрации субстратов.

В аналогичных условиях проверяли активность *TrFCC* в реакции окисления других субстратов, заменяя сульфид на 1 мМ тиосульфат, сульфит или тетратионат, как это было опи-

сано в работе Visser et al. [13]. Для проверки активности *Tr*FCC в реакции окисления элементарной серы использовали серу из гранул *Tv. paradoxus*, полученную при выделении *Tr*FCC. Суспензию серы получали, как это было описано в статье Rühl et al. [22], с небольшими модификациями: 0,1 г серы суспендировали в 5 мл 50 мМ глицин-NaOH буфера, pH 9,5. Затем 2%-ную суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Реакционную смесь, которая содержала 0,2%-ную суспензию серы, 20 мкМ *Sy*C и 52 нМ *Tr*FCC в 50 мМ глицин-NaOH буфере, pH 9,5, инкубировали на термощейкере («Eppendorf», США) при 30 °С. Из реакционной смеси периодически отбирали пробы, центрифугировали и снимали спектры для регистрации образования восстановленной формы *Sy*C. Аналогичный эксперимент проводили в отсутствие *Tr*FCC.

Для проверки способности *Tr*FCC катализировать обратную реакцию восстановления серы до сульфид-иона 0,2%-ную суспензию серы добавляли к предварительно восстановленной дитионитом *Tr*FCC и регистрировали изменение спектров *Tr*FCC. Окисление *Tr*FCC в присутствии серы указывало бы на наличие восстанавливающей активности [23]. Эту реакцию проводили в анаэробном боксе («Belle Technology», Великобритания) в атмосфере N₂ при остаточном содержании кислорода не выше 2 ppm. Все растворы предварительно продували аргоном высокой чистоты и выдерживали в анаэробном боксе в течение нескольких часов.

Определение продукта реакции. Для определения продукта реакции окисления сульфида ферментативную реакцию проводили до высоких степеней превращения. Добавление сульфида прекращали после выпадения визуально наблюдаемого осадка. Серные гранулы из бактерии *Tv. paradoxus* (стандарт) и полученный в реакции осадок растворяли в смеси хлороформ : метанол (1 : 9). Для идентификации продукта реакции был использован метод обращен-

но-фазовой хроматографии на колонке Nucleosil C18 («Sigma-Aldrich», США) в соответствии с предложенной ранее [24] и подробно описанной нами процедурой [11].

Биоинформатические методы. Для анализа использовали аминокислотную последовательность FCC, полученную по результатам MALDI TOF масс-спектрометрии (GenBank: AHE99077.1) генома бактерии *Tv. paradoxus* ARh 1. Поиск гомологов осуществлялся с использованием программы Protein BLAST на сервере NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Выравнивание аминокислотных последовательностей FCC из различных организмов выполнено программой BLAST COBALT (http://www.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi), полученные данные визуализировали с помощью MultalignViewer (Chimera).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гомологи FCC в геноме *Tv. paradoxus*. Известно, что в геноме бактерии *Tv. paradoxus*, как и в геноме близкородственной ей бактерии *Tv. nitratireducens*, имеется 5 копий генов белков, гомологичных FCC [6]. Идентичность аминокислотных последовательностей разных копий FCC из *Tv. paradoxus* составляет 40–54% по флавиновой и 36–40% – по гем-содержащей субъединицам (табл. 1).

Только один белок (FCC_5 в табл. 1) содержит двухгемовую субъединицу, все остальные являются одnogемовыми (количество генов определяется по числу гем-связывающих мотивов CXXCH в аминокислотной последовательности белка).

При росте бактерии с различными донорами электронов наблюдается экспрессия различных генов FCC. Согласно нашим неопубликованным данным, если донором электронов является тиосульфат, то экспрессируются белки FCC_3 и FCC_5. При росте на тиоцианате в присут-

Таблица 1. Идентичность флавиновой и гемовой субъединиц у пяти копий FCC в геноме *Tv. paradoxus* ARh 1

| FCC | Флавиновая субъединица | | Гемовая субъединица | |
|-------|------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| | Protein_ID | Идентичность, % | Protein_ID | Идентичность, % |
| FCC_1 | WP_006748978 | 100 | WP_006748977 | 100 |
| FCC_2 | WP_006746610 | 40 | WP_006746611 | 40 |
| FCC_3 | WP_006746125 | 54 | WP_006746124 | 36 |
| FCC_4 | WP_006747456 | 51 | WP_041483707 | 40 |
| FCC_5 | WP_006746847 | 49 | WP_006746848 | 38 |

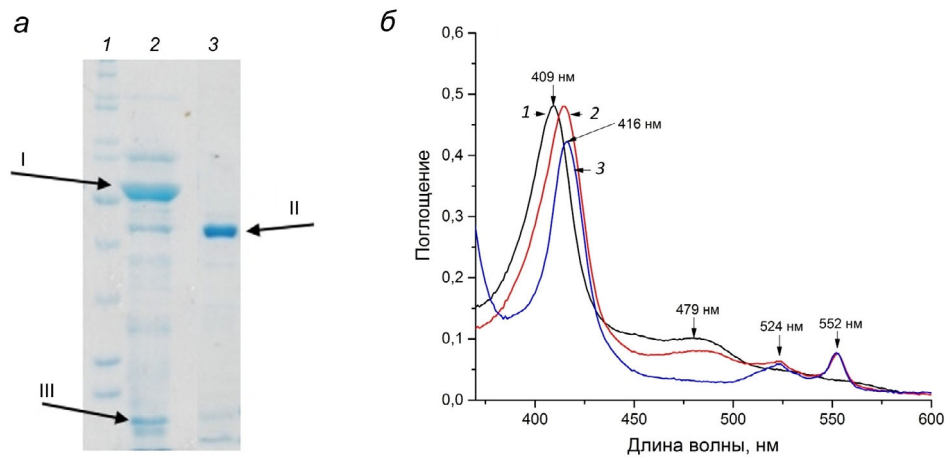


Рис. 2. Характеристика гомогенности и спектральных свойств препарата *TrpFCC*. *а* – Ds-Na-ПААГ электрофорез периплазматической фракции (дорожка 2) и конечного препарата *TrpFCC* (дорожка 3). На дорожках 2 и 3 обозначены FAD-содержащая субъединица *TrpFCC* с ММ 42 кДа (II), гем-содержащая субъединица двигалась с фронтом растворителя; TсDH (I) и медь-связывающий белок CopC (III). Дорожка 1 – маркеры ММ. *б* – Спектры окисленной (1) и восстановленной (2, 3) форм *TrpFCC*. Восстановление проводили с 1 мМ Na₂S (2) и 1 мМ Na₂S₂O₄ (3). Концентрация *TrpFCC* – 0,86 мкМ. На спектрах обозначены основные максимумы поглощения окисленной и восстановленной форм. (С цветным вариантом рис. 2 и 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ствии ионов Cu²⁺ бактерия *Tv. paradoxus* ARh 1 активно экспрессирует белок FCC_1 (далее *TrpFCC*) (табл. 1), который, наряду с TсDH и CopC, является мажорным белком периплазматической клеточной фракции в этих условиях (рис. 2, *а*). Полученные данные совпадают с результатами транскриптомного анализа, приведенными в работе Verben et al. [7], и указывают на потенциальное участие *TrpFCC* в процессе разложения тиоцианата. Для характеристики каталитических свойств *TrpFCC* был выделен из периплазматической фракции *Tv. paradoxus* ARh 1.

Физико-химические свойства *TrpFCC*. В полученном нами гомогенном препарате *TrpFCC* имеет молекулярную массу (ММ) ~50 кДа, согласно данным гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300, и состоит из двух субъединиц: FAD-связывающей с ММ ~42 кДа (рис. 2, *а*) и гем *с*-связывающей с ММ ~8 кДа.

Были измерены спектры окисленной и восстановленной формы *TrpFCC* с использованием в качестве восстановителя дитионита натрия, который способен полностью восстановить FAD и гем *с*, и сульфида натрия, который является основным субстратом FCC, т.е. должен в конечном итоге передавать электроны на гем *с* через FAD.

Полученные спектры очень похожи на ранее опубликованные спектры FCC из других организмов (табл. 2). В спектре окисленной формы *TrpFCC* (рис. 2, *б*) виден характерный пик поглощения окисленной формы FAD при длине волны 480 нм. Другая полоса поглощения FAD при 450 нм менее выражена, как и у других FCC [13,

26], и, возможно, частично маскируется более интенсивным пиком поглощения гемовой субъединицы с максимумом при 409 нм. При восстановлении *TrpFCC* сульфидом натрия (в концентрации 1 мМ) происходит частичное восстановление FAD и практически полное восстановление гема *с*. Дальнейшее добавление сульфида натрия не приводит к дополнительному восстановлению *TrpFCC*. По-видимому, в этих условиях FAD, получив 2 электрона от сульфида, передает 1 электрон на гем *с* и остается в семихиноновой форме, в которой частично сохраняется пик поглощения при 480 нм. Введение в реакционную смесь дитионита натрия с редокс-потенциалом –560 мВ не изменяет степень восстановления гема *с*, но приводит к полному восстановлению FAD. Восстановленная форма *TrpFCC* характеризуется полосами поглощения восстановленной формы гема *с* при 416, 524 и 552 нм.

Характеристика каталитической активности *TrpFCC*. Структурные данные указывают, что *TrpFCC* является типичной флавоцитохром *с* сульфиддегидрогеназой. Поэтому в качестве основного субстрата для характеристики *TrpFCC* рассматривался сульфид-ион. В качестве акцептора электронов *in vitro* использовался цитохром *с* из сердца лошади, *CytC* (как в большинстве публикаций, посвященных характеристике каталитических свойств FCC [12, 13, 25–27]).

Оптимизация условий определения активности. *TrpFCC* расположена в периплазме галоалкалофильной бактерии *Tv. paradoxus*, имеющей значение pH ~9,0 и содержание соли ~1 М [9]. Для оптимизации условий определения актив-

Таблица 2. Спектральные и молекулярные свойства FCC из разных микроорганизмов

| Свойства FCC | <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i> ARh 1 | <i>Chromatium vinosum</i> [12] | <i>Chlorobium thiosulfatophilum</i> [25] | <i>Thiobacillus</i> sp. W5 [13] | <i>Thermochromatium tepidum</i> [26] |
|---|---|--------------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------------|
| Пики поглощения FAD _{ox} , нм | 450, 479 | 450, 480 | | 450, 480 | |
| Пики поглощения гема <i>c</i> _{ox} , нм | 409 | 410 | 410 | 410 | 410 |
| Пики поглощения гема <i>c</i> _{red} , нм | 416, 524, 552 | 416, 523, 552 | 417, 523, 553 | 416, 523, 552 | 416, 523, 552 |
| Нативный белок ММ, кДа | 50 | 77 | 58 | 51 | 68 |
| FAD-связывающая субъединица, ММ, кДа | 42 | 46 | 47 | 40 | 43 |
| Гем-связывающая субъединица, ММ, кДа | 7,3 (1 гем) | 21 (2 гема) | 11 (1 гем) | 11 (1 гем) | 25 (2 гема) |

ности и сравнения их с физиологическими условиями функционирования фермента проверяли влияние pH, природы буфера и ионной силы.

Для оценки влияния ионной силы в реакционную смесь добавляли NaCl. В 0,1 М NaCl активность фермента составляет ~50% от исходной (рис. 3, а). Можно предположить, что увеличение ионной силы ослабляет ионные взаимодействия сульфид-иона с белком или затрудняет электростатическое взаимодействие *SuS* с цитохром *c*-субъединицей FCC. Таким образом, оптимальными для кинетических экспериментов являются условия с низкой ионной силой.

Определение pH-оптимума проводили в диапазоне pH 7–10,5 с использованием двух буферных растворов: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,0–8,6, и 50 мМ глицин-NaOH, pH 8,6–10,5 (рис. 3, б). Эксперимент показал, что фермент имеет мак-

симальную активность в интервале pH от 8,5 до 9,0. Эти данные согласуются с тем, что *TrpFCC* является периплазматическим белком галоалкалофильной бактерии, для которой оптимальным условием для роста является pH 9–10 [9].

Наибольшую активность фермент проявлял в глициновом буфере, поэтому для проведения кинетических экспериментов были выбраны следующие условия: 25 мМ глицин-NaOH, pH 8,6.

В этих условиях была проверена активность *TrpFCC* с другими субстратами. *TrpFCC* не катализирует реакции окисления тиосульфата, сульфита, тетрагидрата и элементарной серы. Ранее подобный результат был получен для FCC из других источников [13]. Поскольку на первой стадии дыхательного цикла у *Tv. paradoxus* при росте на тиоцианате происходит окислительное разложение тиоцианата с образованием элемент-

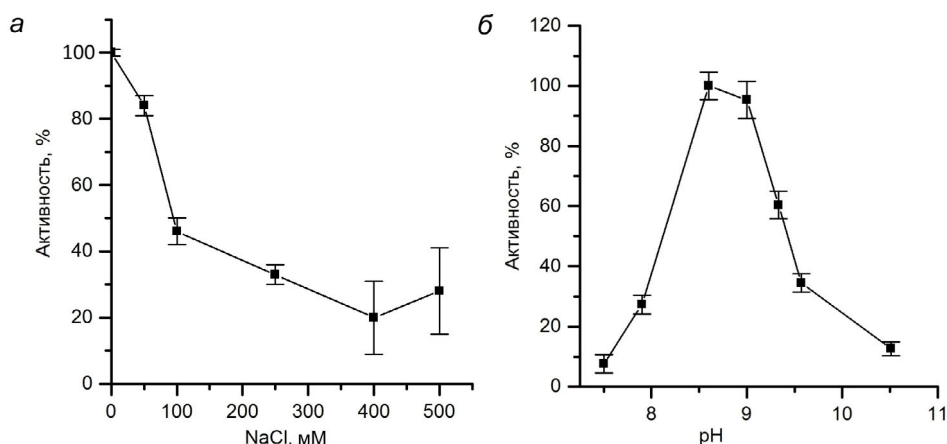


Рис. 3. Факторы, влияющие на каталитическую активность *TrpFCC*. а – Влияние ионной силы (концентрации NaCl) на активность *TrpFCC*. б – pH-Зависимость активности *TrpFCC*

ной серы, было выдвинуто предположение, что FCC может катализировать обратную реакцию восстановления элементарной серы до сульфида с последующим окислением его, например, обратной диссимильаторной сульфитредуктазой (DSR на рис. 1), катализирующей взаимопревращение сульфит-иона в сульфид (или серу) и наоборот. Однако проведённый нами эксперимент показал, что элементарная сера не окисляет восстановленную форму *TrpFCC*, т.е. *TrpFCC* не переносит электроны на серу. Следует отметить, что поверхность FAD-содержащей субъединицы в области входа в сайт связывания сульфид-иона имеет положительный заряд [17], что не способствует связыванию такого гидрофобного незаряженного субстрата, как сера. Таким образом, *TrpFCC* не катализирует обратную реакцию восстановления серы до сульфида и, следовательно, не может участвовать в утилизации серы, образующейся при окислении тиоцианата. Поскольку в рамках проведённого исследования обнаружен только один субстрат для *TrpFCC* – сульфид-ион, что совпадает с данными, полученными для других FCC [12, 13], были охарактеризованы кинетические параметры этой реакции.

Определение кинетических параметров. Кинетика окисления сульфида натрия и восстановления *CytC* в отсутствие продуктов реакции опи-

сывается следующим уравнением для двухсубстратной реакции с образованием тройного комплекса [28]:

$$v = \frac{\left(\frac{V \cdot [CytC]}{K_{M, CytC} + [CytC]}\right) \cdot [S]}{\left(\frac{K_{i,S} \cdot K_{M, CytC} + K_{M,S} \cdot [CytC]}{K_{M, CytC} + [CytC]}\right) + [S]} = \frac{V_S^{каж} \cdot [S]}{K_{M}^{каж} + [S]}, \quad (1)$$

Наблюдаемые константы Михаэлиса ($K_M^{каж}$) равны $1,9 \pm 0,4$ мкМ для сульфида и 8 ± 3 мкМ – для *CytC* при фиксированной концентрации второго субстрата. Эти данные хорошо соотносятся с константами Михаэлиса, измеренными для FCC из *Thiobacillus* (K_M для сульфида – $1,7 \pm 0,4$ мкМ, K_M для цитохрома – $3,8 \pm 0,8$ мкМ) [13]. Максимальная удельная активность при данных концентрациях равнялась 54 ± 9 мкмоль (*CytC*)/мин на мг белка. Однако полученные константы являются кажущимися, поскольку являются функциями от концентрации второго субстрата. Эксперимент по определению истинных кинетических констант включал в себя измерение кинетических констант по сульфид-иону ($V_S^{каж}$, $K_M^{каж}$) при различных фиксированных концентрациях *CytC* (5, 8, 10, 20 мкМ):

$$V_S^{каж} = \frac{V \cdot [CytC]}{K_{M, CytC} + [CytC]}, \quad (2)$$

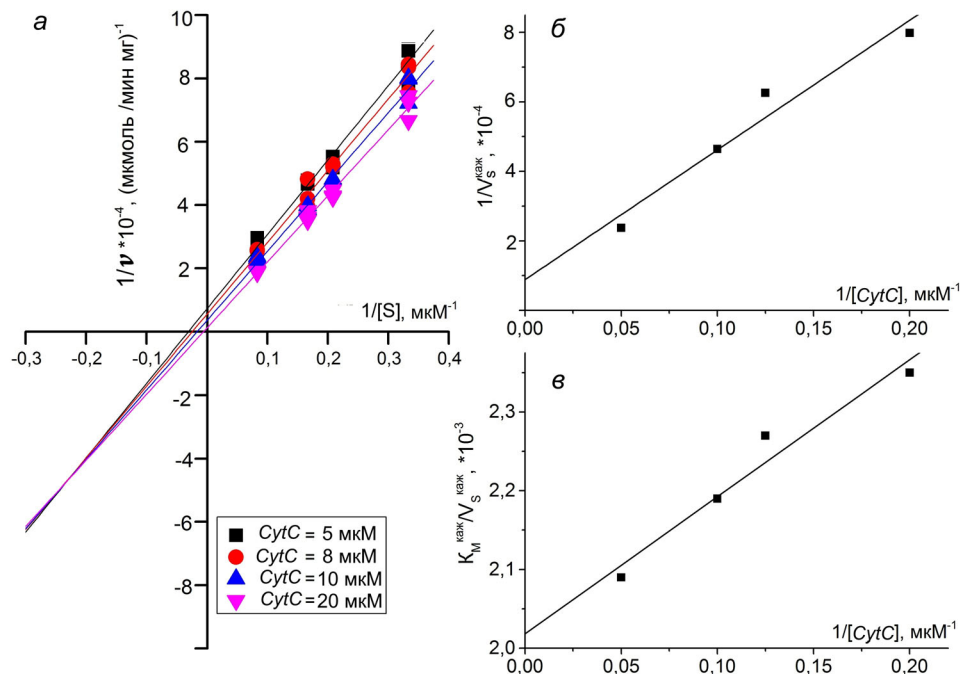


Рис. 4. Определение кинетических констант реакции окисления сульфид-ионов *TrpFCC*. *a* – График зависимости начальной скорости реакции от концентрации сульфида в двойных обратных координатах при различных фиксированных концентрациях *CytC*. *б* – График зависимости максимальной скорости реакции от концентрации *CytC* в двойных обратных координатах. *в* – График зависимости $K_M^{каж}/V_S^{каж}$ от обратной концентрации *CytC*

$$K_M^{\text{каж}} = \frac{K_{i,s} \cdot K_{M,CytC} + K_{M,s} \cdot [CytC]}{K_{M,CytC} + [CytC]}, \quad (3)$$

где $K_{i,s}$ – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса ES.

Результаты представлены в виде первичных графиков в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 4, а). Прямые, соответствующие фиксированным концентрациям $CytC$, пересекались в точке с координатами $((1 - K_{M,s}/K_{i,s})/V; -1/K_{i,s})$. Пересечение с осью абсцисс соответствует $-1/K_M^{\text{каж}}$, с осью ординат $-1/V^{\text{каж}}$. Данный вид графика характерен для ферментативных реакций с образованием тройного комплекса.

Из вторичного графика в координатах $(1/V_S^{\text{каж}}; 1/[CytC])$ определяли значение $1/V$ по пересечению с осью ординат и $K_{M,CytC}/V$ – по тангенсу угла наклона (рис. 4, б):

$$\frac{1}{V_S^{\text{каж}}} = \frac{1}{V} + \frac{K_{M,CytC}}{V} \cdot \frac{1}{[CytC]}. \quad (4)$$

Для определения истинной константы Михаэлиса по сульфиду построен график в координатах $(K_M^{\text{каж}}/V_S^{\text{каж}}; 1/[CytC])$. Точка пересечения прямой с осью ординат дает значение $K_{M,s}/V$, по которому, зная максимальную скорость, можно определить искомую константу (рис. 4, в).

В результате обработки данных были получены следующие значения кинетических параметров:

$V = 80 \pm 40$ мкмоль $CytC$ /мин на мг белка,
 $k_{\text{cat}} = 0,67 \text{ с}^{-1}$;

$K_{M,CytC} = 26 \pm 1$ мкМ;

$K_{M,s} = 157 \pm$ мкМ.

Из-за особенностей субстратов мы не могли работать в области их насыщения, поскольку

для $CytC$ при больших концентрациях наблюдается слишком высокая оптическая плотность, а для сульфид-иона при высоких концентрациях становится существенным вклад неферментативного восстановления цитохрома *c*. В других посвящённых FCC работах измерение кинетических параметров также проводили в ненасыщающих концентрациях одного из субстратов, что не позволяет напрямую сравнивать полученные значения. По этой же причине различаются наблюдаемые и истинные значения K_M и V .

В заключение можно сказать, что *TrFCC* является типичной сульфиддегидрогеназой, катализирующей окисление сульфида с образованием элементарной серы и переносом электронов на цитохром *c*. Роль этого фермента в метаболизме тиоцианата осталась невыясненной. Однако проведённые нами предварительные эксперименты (результаты не приведены) показали, что присутствие каталитических количеств FCC в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH, приводит к изменению формы кинетических кривых и увеличению скорости реакции. Механизм наблюдаемого явления пока не установлен и является предметом последующего исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00314, характеристика фермента, ферментативная кинетика) и Министерства науки и высшего образования РФ (выделение фермента).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D., and Muyzer, G. (2014) Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes, *Extremophiles*, **18**, 791–809, doi: 10.1007/s00792-014-0670-9.
- Sorokin, D. Y., Banciu, H., Robertson, L. A., Kuenen, J. G., Muntyan, M. S., and Muyzer, G. (2013) in *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* (Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., eds) Springer, Berlin, pp. 529–554, doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_77.
- Sorokin, D. Y., Kuenen, J. G., and Muyzer, G. (2011) The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes, *Front. Microbiol.*, **2**, 44, doi: 10.3389/fmicb.2011.00044.
- Sorokin, D. Y., and Kuenen, J. G. (2005) Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 685–702, doi: 10.1016/j.femsre.2004.10.005.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., and Kuenen, J. G. (2001) Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 528–538, doi: 10.1128/AEM.67.2.528-538.2001.
- Berben, T., Overmars, L., Sorokin, D. Y., and Muyzer, G. (2017) Comparative genome analysis of three thiocyanate oxidizing *Thioalkalivibrio* species isolated from soda lakes, *Front. Microbiol.*, **8**, 254, doi: 10.3389/fmicb.2017.00254.
- Berben, T., Balkema, C., Sorokin, D. Y., and Muyzer, G. (2017) Analysis of the genes involved in thiocyanate oxidation during growth in continuous culture of the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh 2T using transcriptomics, *mSystems*, **2**, e00102-17, doi: 10.1128/mSystems.00102-17.
- Berben, T., Overmars, L., Sorokin, D. Y., and Muyzer, G. (2019) Diversity and distribution of sulfur oxidation-related genes in *Thioalkalivibrio*, a genus of chemolithoau-

- trophic and haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria, *Front. Microbiol.*, **10**, 160, doi: 10.3389/fmicb.2019.00160.
9. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., and Kuenen, J. G. (2002) *Thioalkalivibrio thiooxydans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 657–664, doi: 10.1099/00207713-52-2-657.
 10. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Sjollem, K. A., and Kuenen, J. G. (2003) *Thioalkalivibrio nitratireducens* sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1779–1783, doi: 10.1099/ijs.0.02615-0.
 11. Tikhonova, T. V., Sorokin, D. Y., Hagen, W. R., Khrenova, M. G., Muzer, G., et al. (2020) Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 5280–5290, doi: 10.1073/pnas.1922133117.
 12. Fukumori, Y., and Yamanaka, T. (1979) Flavocytochrome *c* of *Chromatium vinosum*. Some enzymatic properties and subunit structure, *J. Biochem.*, **85**, 1405–1414, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132467.
 13. Visser, J. M., de Jong, G., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G. (1997) A novel membrane-bound flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5, *Arch. Microbiol.*, **167**, 295–301, doi: 10.1007/s002030050447.
 14. Kostanjevecki, V., Brigé, A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Guisez, Y., and van Beeumen, J. (2000) A membrane-bound flavocytochrome *c*-sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic sulfur bacterium *Ectothiorhodospira vacuolata*, *J. Bacteriol.*, **182**, 3097–3103, doi: 10.1128/jb.182.11.3097-3103.2000.
 15. Chen, Z., Koh, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J., Bartsch, R., et al. (1994) The structure of flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium, *Science*, **266**, 430–432, doi: 10.1126/science.7939681.
 16. Hirano, Y., Kimura, Y., Suzuki, H., Miki, K., and Wang, Z.-Y. (2012) Structure analysis and comparative characterization of the cytochrome *c'* and flavocytochrome *c* from thermophilic purple photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*, *Biochemistry*, **51**, 6556–6567, doi: 10.1021/bi3005522.
 17. Osipov, E. M., Lilina, A. V., Tsallagov, S. I., Safonova, T. N., Sorokin, D. Y., et al. (2018) Structure of the flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase associated with the copper-binding protein CopC from the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1, *Acta Cryst.*, **D74**, doi: 10.1107/S2059798318005648.
 18. Marcia, M., Ermiler, U., Peng, G., and Michel, H. (2009) The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9625–9630.
 19. Brito, J. A., Sousa, F. L., Stelter, M., Bandejas, T. M., Vonrhein, C., et al. (2009) Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase, *Biochemistry*, **48**, 5613–5622.
 20. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
 21. He, F. (2011) Laemmli-SDS-PAGE, *Bio-101*, e80, doi: 10.21769/BioProtoc.80.
 22. Rühl, P., Pöll, U., Braun, J., Klingl, A., and Kletzin, A. (2017) A sulfur oxygenase from the haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* with atypically low reductase activity, *J. Bacteriol.*, **199**, e00675–16, doi: 10.1128/JB.00675-16.
 23. Ma, K., and Adams, M. W. (1994) Sulfide dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: a new multifunctional enzyme involved in the reduction of elemental sulfur, *J. Bacteriol.*, **176**, 6509–6517, doi: 10.1128/jb.176.21.6509-6517.1994.
 24. Alberta Environment and Parks (2015) *Development and Validation of Analytical Methods for Elemental Sulfur in Alberta Soils*, Prepared by Maxxam Analytics International Corporation for Alberta Environment and Parks, Edmonton, Alberta.
 25. Yamanaka, T. (1976) The Subunits of *Chlorobium* Flavocytochrome *c*, *J. Biochem.*, **79**, 655–660, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131110.
 26. Castillo, M., Bih-Show, L., and Ondrias, M. R. (1994) Characterization of flavocytochrome *c* 552 from the thermophilic photosynthetic bacterium *Chromatium tepidum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 262–266.
 27. Sorokin, D. Yu., de Jong, G. A. H., Robertson, L. A., and Kuenen, G. J. (1998) Purification and characterization of sulfide dehydrogenase from alkaliphilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria, *FEBS Lett.*, **427**, 11–14.
 28. Cornish-Bowden, A. (2012) *Fundamentals of enzyme kinetics*, Wiley-Blackwell, Fourth Edition, p. 422.

CATALYTIC PROPERTIES OF FLAVOCYTOCHROME *c* SULFIDE DEHYDROGENASE FROM HALOALKALIPHILIC BACTERIUM *Thioalkalivibrio paradoxus**

T. V. Tikhonova**, A. V. Lilina, E. M. Osipov, N. S. Shipkov,
N. I. Dergousova, O. G. Kulikova, and V. O. Popov

Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: ttikhonova@inbi.ras.ru

Flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase (FCC) is one of the central enzymes of oxidative sulfur metabolism in sulfur-oxidizing bacteria. FCC catalyzes oxidation of sulfide and polysulfide ions to elemental sulfur with cytochrome *c* as an electron acceptor. The catalytically active form of the enzyme is a noncovalently bound heterodimer composed of the flavin-binding and the heme-binding subunits. The *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1 genome contains five copies of the gene for FCC. The amino acid sequence identity between the different copies of FCC genes differs from 54 to 36%. When a bacterium grows on thiocyanate or thiosulfate as the main energy sources, the products of different copies of the FCC genes are synthesized. In this paper, we isolated and characterized FCC, which is synthesized during the growth of *Tv. paradoxus* on thiocyanate. FCC has been shown to oxidize sulfide and not to oxidize other reduced sulfur compounds, such as thiosulfate, sulfite, tetrathionate, and molecular sulfur, and does not catalyze the reverse reaction of sulfur reducing to sulfide. The kinetic parameters of the sulfide ion oxidation reaction are characterized.

Keywords: sulfur-oxidizing bacteria, flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase, thiocyanate dehydrogenase, enzyme kinetics