

АДАПТАЦИЯ СТРУКТУРЫ КАНАЛОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ВОСЬМИГЕМОВОЙ НИТРИТРЕДУКТАЗЫ ИЗ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Thioalkalivibrio nitratireducens* К УСЛОВИЯМ ДЕФИЦИТА ПРОТОНОВ

© 2017 г. А.В. Попинако, Т.В. Тихонова, М.Ю. Антонов*,
К.В. Шайган**, В.О. Попов

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071, Москва, Ленинский просп., 33/2;

*Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, 677000, Якутск, ул. Белинского, 58;

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: popinakoav@gmail.com

Поступила в редакцию 09.09.16 г.

Знание адаптационных механизмов белков из экстремофильных организмов открывает перспективы для разработки новых биокатализаторов, устойчивых к экстремальным условиям. В настоящей работе проведено исследование структурной адаптации каналов активного центра восьмигемовой нитритредуктазы из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* к функционированию в условиях высоких рН. Сравнительный анализ структур восьмигемовых нитритредуктаз из организмов, адаптированных к разным рН, выявил уникальные адаптационные механизмы, свойственные *Thioalkalivibrio nitratireducens*, важные для связывания редких протонов (протонный канал), а также миграции субстрата и продукта в каналах активного центра (организация сетей водородных связей).

Ключевые слова: моделирование структуры по гомологии, структурная адаптация, галоалкалофильные и негалофильные нейтрофильные бактерии.

Экстремофильные организмы (термофилы, психрофилы, алкалофилы, ацидофилы, галофилы, пиезофилы) содержат уникальные белки, обладающие высокой стабильностью и активностью в экстремальных условиях среды обитания (высокие или низкие значения температуры и рН, повышенная соленость, высокое давление). Сравнительное исследование структур гомологичных белков из организмов, адаптированных к разным условиям обитания, позволяет выявить уникальные молекулярные механизмы адаптации, реализуемые в конкретном белковом семействе [1]. Анализ адаптационных механизмов белков из экстремофильных организмов открывает перспективы для разработки новых биокатализаторов, устойчивых к экстремальным условиям [2–6].

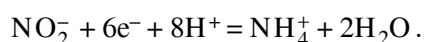
Алкалофильные организмы обитают в щелочных условиях (рН выше 9). Адаптация белков алкалофильных организмов к условиям дефицита протонов реализуется за счет увеличе-

ния содержания кислых аминокислотных остатков на поверхности молекулы (+DE-стратегия) [7]. Сети из отрицательных зарядов на поверхности белка участвуют в захвате редких протонов [8], тогда как область межсубъединичных контактов стабилизируется за счет гидрофобных взаимодействий [7,9]. Для ферментов из алкалофилов дополнительные механизмы адаптации связаны со сдвигом в щелочную область значения pK_a каталитических остатков активного центра, что может достигаться путем изменения числа водородных связей, образуемых каталитическими остатками, защиты каталитических центров белка от растворителя или изменения суммарного заряда белковой молекулы [9,10].

Целью данной работы является анализ механизмов структурной алкалоадаптации активного центра фермента на примере представителя семейства восьмигемовых нитритредуктаз (ONR – Octaheme Nitrite Reductases) – нитритредуктазы из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* [11], обладающей нитритредуктазной активностью в условиях дефицита протонов. Гены ONR обнаружены как

Сокращение: ONR – семейство восьмигемовых нитритредуктаз (family of Octaheme Nitrite Reductases).

в геномах галоалкалофильных бактерий (ha-ONRs), так и в геномах бактерий, обитающих в условиях нейтральных pH и низких концентраций солей (nnONRs). Белки семейства ONR характеризуются общим набором структурных признаков [12]. Ранее из близкородственных сероокисляющих галоалкалофильных бактерий *Tv. nitratireducens* и *Tv. paradoxus*, обитающих в содовых озерах [5], были выделены и охарактеризованы два представителя этого семейства. Оба белка характеризуются высокой нитритредуктазной активностью в реакции шести-электронного восстановления нитрита до аммония [12].



В растворе оба белка существуют в виде стабильных гомогексамеров [12]. Гексамерная структура сохраняется в интервале pH 5–11. NaCl в концентрации до 1 М стабилизирует структуру данного гексамера, повышая температуру ее плавления, определенную методами дифференциальной сканирующей калориметрии и кругового дихроизма от 71°C (в отсутствие соли) до 86°C в присутствии 1 М NaCl [13].

Методом рентгенструктурного анализа были определены структуры ONR, выделенных из бактерий *Tv. nitratireducens* (далее TvNiR) и *Tv. paradoxus* (TvPaR) [12,14]. Степень идентичности между последовательностями TvNiR и TvPaR составила 82%, пространственные структуры данных белков схожи ($rmsd = 0,565$), поэтому в дальнейшем рассматривалась более подробно изученная структура TvNiR. Согласно структурным данным, гексамер TvNiR имеет форму бипирамиды и представляет собой димер тримеров с общей площадью контактов 4850 Å² [14]. Субъединицы TvNiR содержат семь бисгистидин-координированных гемов типа с (гемы 1–3 и 5–8) и один гем (гем 4, каталитический), координированный в проксимальном положении аминокислотной группой лизина, а в дистальном положении молекулой воды (рис. 1).

В структуре мономера TvNiR локализованы внутренние полости: канал транспорта продукта из активного центра, канал транспорта субстрата [14] и возможный канал транспорта протонов к активному центру [15] (рис. 1). В протонном канале расположена цепочка из пяти молекул воды, связанных водородными связями друг с другом и с окружением (E302, N304, Y335, F344, Q360, Y473, N306, D346 и N306) [14]. В целом структуры данных каналов одинаковы у TvPaR и TvNiR. Аминокислотные

последовательности, образующие поверхности каналов, сходны у большинства ONR (рис. 1).

В данной работе исследование механизмов алкалоадаптации в активном центре ONR проводится на примере фермента TvNiR из сероокисляющей, облигатно хемоавтотрофной гаммапротеобактерии *Tv. nitratireducens*, обитающей в гиперсоленых содовых озерах [11], и гомологичного белка GsNiR (идентичность аминокислотных последовательностей 49%) из сульфатвосстанавливающей нейтрофильной негалофильной бактерии *Geobacter sulfurreducens*. Для сравнительного анализа структур TvNiR и GsNiR методом моделирования по гомологии нами была построена пространственная модель GsNiR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование по гомологии. Процедуру поиска шаблона проводили через сервер SWISS-MODEL [16]. Базируясь на результатах данного поиска, в качестве шаблона для построения модели была выбрана структура TvNiR (pdb code 2OT4) с наилучшим разрешением 1,5 Å [14]. Необходимое для моделирования по гомологии выравнивание аминокислотных последовательностей шаблона и мишени проводили с помощью программы T-COFFEE [17]. Построение модели структуры GsNiR на основе данного выравнивания проводили с помощью программы MODELLER [18]. Полученные модели были ранжированы в соответствии с moldpdf и DOPE score, была выбрана оптимальная модель с высоким рейтингом. Для уточнения модели была выполнена минимизация энергии в программе UCSF Chimera [19]. Для минимизации энергии модели были использованы параметры силового поля Amber [20]. Уточненные молекулы были проверены с помощью программы WHATIF [21]. Все расчеты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) [22].

Сравнительный анализ активных центров TvNiR и GsNiR. Визуализацию молекул TvNiR и GsNiR проводили с использованием UCSF Chimera [19]. Для предсказания расположения сигнальных пептидов для последовательности GsNiR использовали SignalP 4.1 server [23]. Различные типы контактов в молекулах TvNiR и GsNiR были рассчитаны с использованием программы Protein Interactions Calculator (PIC) server [24]. Расчет диаметра каналов активного центра TvNiR и GsNiR проводили в программе HOLE [25].

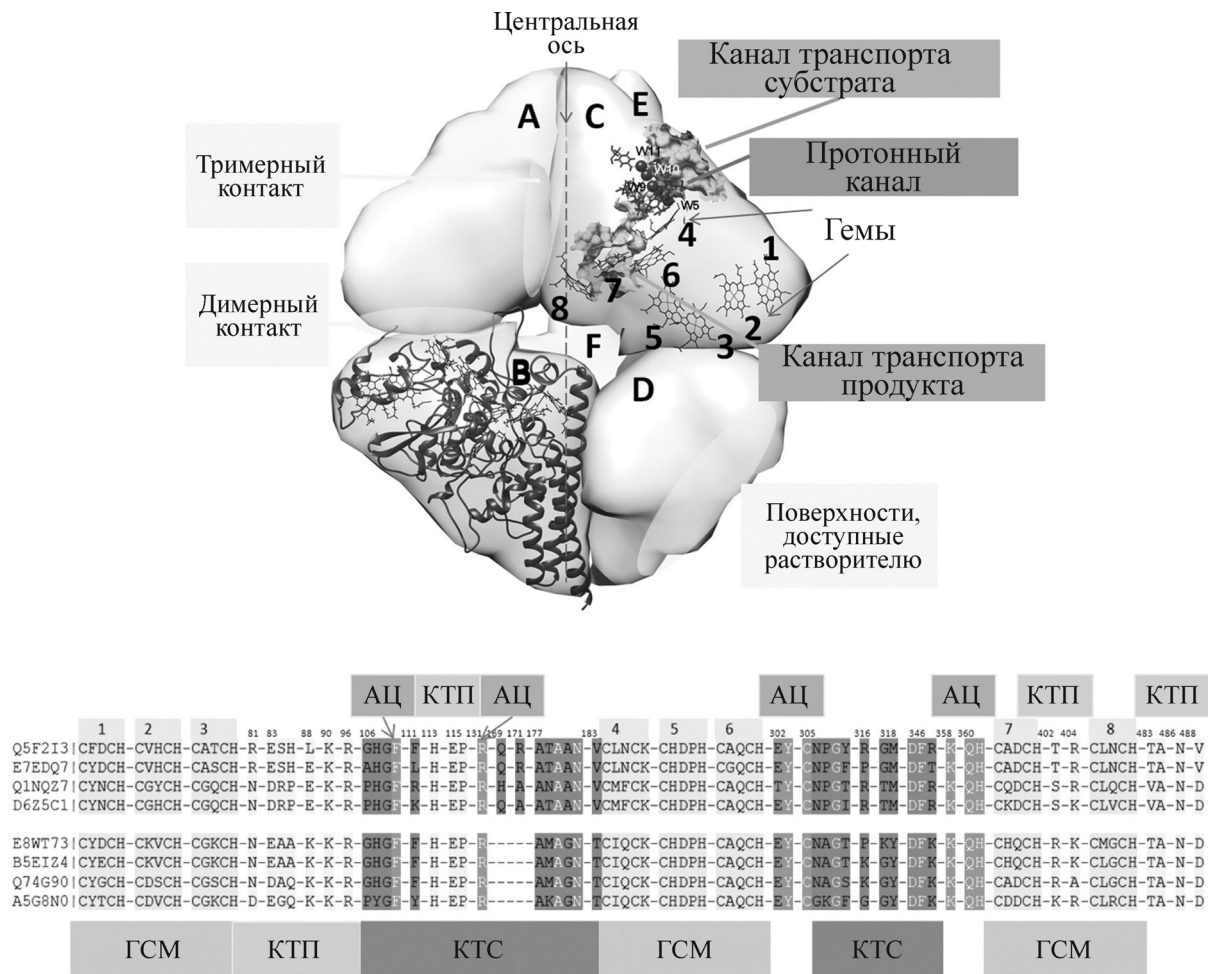


Рис. 1. (а) – Схема строения гексамера ONR (структура (PDB 2OT4 [14])). Межсубъединичные контакты и открытые поверхности белка (поверхности, доступные растворителю) выделены овалом, гемы одной субъединицы пронумерованы. В-субъединица представлена в виде спиралей. Полости активного центра обозначены в виде поверхностей. Молекулы воды в протонном канале пронумерованы (W11, W10, W9, W5). (б) – Множественное выравнивание фрагментов активного центра ONR галоалкалофильных (Q5F2I3, E7EDQ7, Q1NQZ7, D6Z5C1) и нормалофильных (E8WT73, B5EIZ4, Q74G90, A5G8N0) бактерий. GSM – гемсвязывающие мотивы, которые пронумерованы в соответствии с положением в аминокислотной последовательности; АЦ – остатки активного центра; КТС – остатки, формирующие канал транспорта субстрата в активный центр; КТП – остатки, формирующие канал транспорта продукта из активного центра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ структур каналов, ведущих в активный центр ONR. Аминокислотные остатки, образующие каналы, ведущие в активные центры TvNiR и GsNiR, имеют высокую степень идентичности (примерно от 65 до 92%). Тем не менее проведенный анализ выявил существенные различия в строении каналов исследуемых белков.

В устье канала транспорта субстрата TvNiR (рис. 1, 2) расположены положительно заряженные в щелочных условиях аминокислотные остатки (R171, R316, R348), которые способствуют притяжению и направленному транспорту молекул отрицательно заряженного субстрата

(NO₂). В устье субстратного канала GsNiR вместо остатков аргинина расположены остатки G153, K293, K325, которые в условиях щелочных pH не протонированы и не взаимодействуют с субстратом. Боковые группы K293, K325 подвижны, не фиксированы водородными связями. Это указывает на возможную дестабилизацию структуры канала и его частичное перекрытие боковыми группами K293, K325 при транспорте субстрата.

Соответствующие остатки в устье субстратного канала TvNiR образуют дополнительные водородные связи, организованные в сети (S174–R171–T176, A350–R348–G314, G353–R348), что, вероятно, стабилизирует структуру

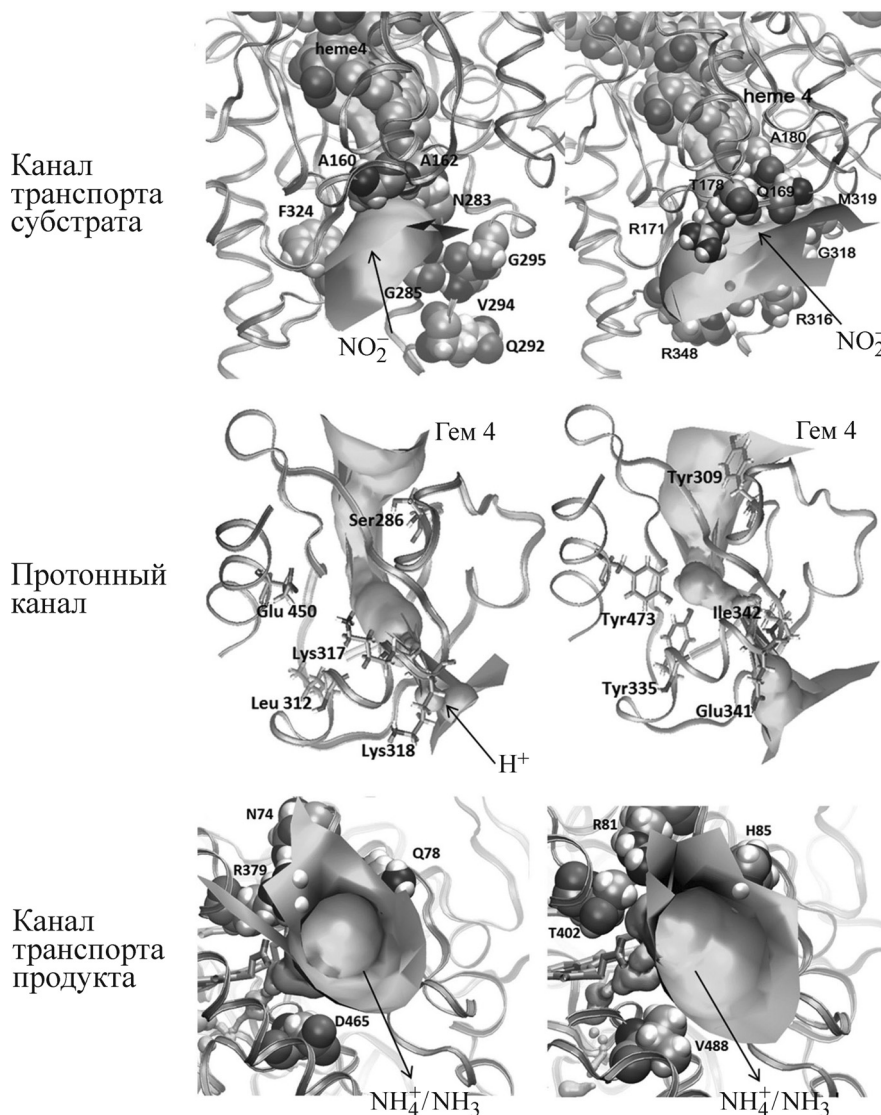


Рис. 2. Визуализация каналов активного центра GsNiR и TvNiR.

канала при транспорте субстрата. Также известно, что катион- π -взаимодействия становятся энергетически более выгодными в условиях низкой активности воды [26]. Обнаруженные в субстратном канале TvNiR катион- π -взаимодействия F111–R171 и Y309–R348–F345 в комплексе с водородными связями стабилизируют канал при транспорте субстрата.

Отличия обнаружены и в строении канала транспорта продукта. В устье канала транспорта продукта GsNiR расположен отрицательно заряженный D465 (рис. 1, 2). За счет электростатических сил D465 притягивает положительно заряженный при нормальных pH продукт реакции (NH_4^+). Канал транспорта продукта TvNiR, напротив, содержит положительно заряженные аминокислотные остатки (H85, R81,

R404, R96) в устье канала. Вероятно, это связано с депротонированием продукта (NH_3) в щелочных pH и снижением роли электростатических взаимодействий в транспорте продукта.

Еще одним отличием структуры канала транспорта продукта у TvNiR является наличие в канале сетей водородных связей (H85–E83–R81–S84, R81–S118, R81–D405–R404–T402, M407–R404, D428–R404, E486–Q485–R96–W482), что свидетельствует о стабилизации канала для эффективного транспорта и удаления продукта.

Анализ пространственной структуры TvNiR показал, что активный центр связан с поверхностью дополнительным каналом, который может выполнять функцию транспорта протонов в активный центр в условиях дефицита прото-

нов при щелочных pH [14] (рис. 1, 2). Расположенная на поверхности белка молекула воды W11 образует водородные связи с OH-группой остатка Y473, O-атомом остатка F344 и молекулой воды W10, расположенной глубже в протонном канале. Молекула W10 образует водородные связи с OD1-атомом остатка D346, OH-группой остатка Y335 и молекулой W9. Молекула W9 образует координационную связь с ионом кальция и водородные связи с OE2-атомом остатка E302, OD1-атомом остатка B346, OD1-атомом остатка Q304 и молекулой воды W8. Молекула W8 также взаимодействует с ионом кальция и находится на расстоянии водородной связи от NE2- и OE1-атомов остатка N360, OD1-атома остатка Q306, OD2-атома остатка D346 и молекулы воды W9. Молекула воды W7 образует водородную связь с молекулой W8 и W5, расположенной у входа в активный центр, и связана с NE2- и OD1-атомами остатков канала N360 и Q306 соответственно. Молекула воды W5 передает протон гидроксильной группе каталитического остатка Y303. Таким образом, протоны с поверхности белка по цепочке водородных связей могут передаваться к гидроксильной группе остатка Y303 TvNiR. Отрицательно заряженный E341 в устье протонного канала TvNiR может способствовать привлечению редких протонов внутрь канала. Ширина предполагаемого протонного канала (от 4 до 0,13 Å) исключает возможность продвижения по нему ионов субстрата и продукта.

В структуре GsNiR протонный канал открыт у поверхности белка (в устье протонного канала) боковыми цепями положительно заряженных остатков K317 и K318, положения которых в структуре TvNiR занимают остатки Q340 и E341 соответственно. Поскольку положительно заряженные аминокислотные остатки K317, K318 образуют зону минимального радиуса (0,028 Å), можно заключить, что перекрытый протонный канал у GsNiR не функционирует (рис. 2).

Очевидно, что функционирование протонного канала является структурной адаптацией TvNiR к дефициту протонов в щелочных условиях. В структуре белка (NrfA) из негалоалкалофильной бактерии *Sulfurospirillum deleyianum* родственного семейства пятигемовых нитритредуктаз (PDB 2e80 [27]) протонный канал также не функционирует. Протонный канал перекрыт у поверхности белка боковой цепью остатка аргинина и глубже – боковыми цепями остатков тирозина и лейцина (или изолейцина), положения которых в структуре TvNiR зани-

мают остатки Y473, A339 и R357 соответственно [15].

ВЫВОДЫ

Результаты исследования свидетельствуют о том, что адаптация активного центра восьмигемовой нитритредуктазы из галоалкалофильной бактерии *Tv. nitratireducens* к работе в экстремальных условиях дефицита протонов характеризуется формированием особой архитектуры каналов, ведущих к активному центру. Канал транспорта субстрата обрамлен дополнительными положительно заряженными аминокислотными остатками (R171, R316, R348), привлекающими отрицательно заряженный субстрат (NO_2^-) и экранирующими активный центр от катионов соли. Канал транспорта продукта TvNiR содержит положительно заряженные аминокислотные остатки (H85, R81, R404, R96) в устье канала. Данные аминокислотные остатки участвуют также в образовании сети взаимодействий, фиксирующих канал. Наличие вероятного протонного канала у TvNiR позволяет эффективно транспортировать протоны к активному центру при дефиците протонов. Таким образом, структура протонного канала является структурной адаптацией TvNiR, позволяющей данному ферменту сохранять активность в щелочных условиях.

Авторы благодарят И.А. Демьяненко и А.Н. Дьяконову за помощь в редактировании статьи.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-60252, разработка протокола моделирования) и Российского научного фонда (грант № 14-24-00172, анализ структур).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. L. Kastiritis, N. C. Papandreou, and S. J. Hamodrakas, *Int. J. Biol. Macromol.* **41** (4), 447 (2007).
2. S. Fujinami and M. Fujisawa, *Environ. Technol.* **31** (8–9), 845 (2010).
3. E. V. Pikuta, R. B. Hoover, and J. Tang, *Crit. Rev. Microbiol.* **33** (3), 183 (2007).
4. E. Ebrahimie, M. Ebrahimi, N. R. Sarvestani, and M. Ebrahimi, *Saline Systems* **7** (1), 1 (2011).
5. D. Y. Sorokin, M. S. Muntyan, A. N. Panteleeva, and G. Muyzer, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62** (8), 1884 (2012).
6. M. Moshfegh, A. R. Shahverdi, G. Zarrini, and M. A. Faramarzi, *Extremophiles* **17** (4), 677 (2013).
7. A. P. Dubnovitsky, E. G. Kapetaniou, and A. C. Papageorgiou, *Protein Sci.* **14**, 97 (2005).

8. K. Manikandan, A. Bhardwaj, N. Gupta, et al., *Protein Sci.* **15** (8), 1951 (2006).
9. Y. Zhao, Y. Zhang, Y. Cao, J. Qi, et al., *PLoS One* **6** (1), e14608 (2011).
10. T. Shirai, H. Ishida, J. Noda, et al., *J. Mol. Biol.* **310** (5), 1079 (2001).
11. D. Y. Sorokin, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53** (6), 1779 (2003).
12. T. Tikhonova, A. Tikhonov, A. Trofimov, et al., *FEBS J.* **279** (21), 4052 (2012).
13. A. A. Filimonenkov, R. A. Zvyagilskaya, T. V. Tikhonova, and V. O. Popov, *Biochemistry* **75** (6), 744 (2010).
14. K. M. Polyakov, K. M. Boyko, T. V. Tikhonova, et al., *J. Mol. Biol.* **389** (5), 846 (2009).
15. A. A. Trofimov, K. M. Polyakov, T. V. Tikhonova, et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **68** (2), 144 (2012).
16. M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, et al., *Nucl. Acids Res.* **42** (Web Server issue), W252 (2014).
17. C. Notredame, D. G. Higgins, and J. Heringa, *J. Mol. Biol.* **302** (1), 205 (2000).
18. A. Fiser and A. Sali, *Methods Enzymol.* **374**, 461 (2003).
19. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, et al., *J. Comput. Chem.* **25** (13), 1605 (2004).
20. R. Salomon-Ferrer, A. W. Götz, D. Poole, et al., *J. Chem. Theory Comput.* **9** (9), 3878 (2013).
21. M. L. Hekkelman, T. A. H. Te Beek, S. R. Pettifer, et al., *Nucl. Acids Res.* **38** (Web Server issue), W719 (2010).
22. V. Sadovnichy, A. Tikhonravov, V. Voevodin, and V. Opanasenko, in *Contemporary High Performance Computing: From Petascale toward Exascale* (CRC Press, Boca Raton, USA, 2013), pp. 283–307.
23. T. N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne, and H. Nielsen, *Nat. Methods* **8** (10), 785 (2011).
24. K. G. Tina, R. Bhadra, and N. Srinivasan, *Nucl. Acids Res.* **35** (Web Server issue), 473 (2007).
25. O. S. Smart, J. G. Neduveilil, X. Wang, and B. A. Wallace, *J. Mol. Graph.* **14** (6), 354 (1996).
26. G. Zhang, L. Zhang, D. Yang, et al., *Acta Crystallogr. B. Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **72** (1), 20 (2016).
27. O. Einsle, A. Messerschmidt, R. Huber, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **124** (39), 11737 (2002).

Structural Adaptation of the Active Center Channels in Octaheme Nitrite Reductase from the Haloalkaliphilic Bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens* to Proton Deficit

A.V. Popinako*, T.V. Tikhonova*, M.Yu. Antonov, K.V. Shaitan***, and V.O. Popov***

*Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences,
Leninsky pr. 33/2, Moscow, 119071 Russia

**Ammosov North-Eastern Federal University, ul. Belinskogo 58, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), 677980 Russia

***Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

Knowledge of adaptive proteins mechanisms from extremophiles opens up the possibility of new applications of biocatalysts resistant to extreme proton deficit. In this paper we describe the structural adaptation to high pH values of the active center channels of octaheme nitrite reductase from haloalkaliphilic bacteria *Thioalkalivibrio nitratireducens*. Comparative analysis of octaheme nitrite reductases from organisms adapted to different conditions has revealed unique mechanisms inherent to *Th. nitratireducens*, which are important for the rare protons binding (the proton channel), as well as the substrate and product migration (organization of the hydrogen bond network in channels).

Key words: homology-based modeling of the structure, structural adaptation, haloalkaliphilic and neutrophilic bacteria