

Структура и свойства тиоцианатдегидрогеназ из различных источников

Шипков Н.С.*, Тихонова Т.В., Дергоусова Н.И., Попов В.О.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,

Москва, Россия

* shipkov1995@yandex.ru

Ключевые слова: тиоцианат; тиоцианатдегидрогеназа; сероокисляющие бактерии; цианатный путь; медь-содержащие ферменты

Мотивация и цель: Тиоцианат является токсичным соединением, образующимся в как в природных, так и в промышленных процессах. Химическая стабильность и токсичность данного соединения обуславливают необходимость поиска способов очистки промышленных сточных вод от тиоцианата. Перспективным направлением представляется биоремедиация сточных вод с помощью тиоцианат-утилизирующих организмов.

Тиоцианатдегидрогеназа – медь-содержащий фермент, катализирующий окисление тиоцианата с образованием цианата, серы и с переносом двух электронов на внешний акцептор. Первая тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) была выделена из галоалкалофильной сероокисляющей бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*. Активный центр TcDH из *Tv. paradoxus* (tpTcDH) содержит набор из 10 консервативных аминокислотных остатков, обеспечивающих поддержание структуры трехъядерного медного кластера и каталитические свойства tpTcDH [1]. Было высказано предположение, что характерный шаблон из 10 каталитически важных аминокислот является маркером принадлежности белка к семейству тиоцианатдегидрогеназ [2]. Целью данной работы было исследование свойств и структуры гомологов tpTcDH с различной степенью гомологии из разных организмов.

Методы и алгоритмы: В работе использовались методы молекулярной биологии для получения рекомбинантных белков, а также различные биохимические методы для характеристики свойств белков.

Результаты Гомологи tpTcDH были обнаружены у более чем 50 микроорганизмов. На основании степени гомологии и присутствия замен в аминокислотном шаблоне гомологи tpTcDH были разделены на три группы. Первая группа – гомологи tpTcDH с идентичностью по аминокислотной последовательности >50 % и без замен в аминокислотном шаблоне, вторая группа – гомологи с идентичностью 49–35 %, но с заменой одной аминокислоты в шаблоне, третья группа – наиболее удаленные гомологи tpTcDH (идентичность <33 %), но без замен в аминокислотном шаблоне. Целью работы являлись получение и характеристика гомологов tpTcDH из каждой группы, проверка важности аминокислотного шаблона для причисления гомологов tpTcDH к семейству тиоцианатдегидрогеназ. Для этого были выбраны TcDH из бактерий *Pelomicrobium methylotrophicum* (pmTcDH) и *Hydrogenobacter thermophilus* (htTcDH) (первая группа), *Tautonia sociabilis* (tsTcDH) (вторая группа) и

Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1(ttTcDH) (третья группа). Для всех трех групп бактерий проанализированы генные кластеры, содержащие гены гомологов TcDH. Показано, что бактерия *P. methylotrophicum* способна к росту на тиоцианате как источнике азота, при этом регистрируется экспрессия pmTcDH и фермента цианазы, который разлагает образующийся под действием TcDH цианат на CO₂ и аммоний, использующийся в процессах биосинтеза.

Гомологи tpTcDH из первой группы (pmTcDH и htTcDH) были получены с помощью гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*. Оба белка являются медь-зависимыми ферментами, катализирующими окисление тиоцианата по той же схеме, что и tpTcDH, т. е. являются тиоцианатдегидрогеназами. Охарактеризованы биохимические свойства обоих белков.

Вторая группа гомологов tpTcDH содержит одну замену в аминокислотном шаблоне, остаток H482, который в tpTcDH отвечает за координацию иона Cu³⁺, заменен на глутамин. Полученная методом гетерологичной экспрессии tsTcDH из *T. sociabilis*, относящаяся ко второй группе, не обладала тиоцианатдегидрогеназной активностью. Способность к росту на тиоцианате была проверена также для бактерии *Methylocapsa acidiphila* B2, содержащей в геноме ген гомолога TcDH из второй группы. Бактерия *M. acidiphila* B2 оказалась не способна к росту на тиоцианате. Таким образом, замены в аминокислотном шаблоне критичны, и белки, содержащие такую замену, не являются тиоцианатдегидрогеназами.

Для исследования третьей группы гомологов tpTcDH была выбрана бактерия *T. thiocyanaticus*, для которой ранее была показана способность расти на тиоцианате как единственном источнике энергии и азота. Фермент ttTcDH (идентичность по аминокислотной последовательности с tpTcDH 32 %), выделенный из периплазматической фракции *T. thiocyanaticus*, выращенной на минеральной среде в присутствии тиоцианата, представлял собой смесь свободного фермента и прочного комплекса ttTcDH с тиоредоксин-подобным белком (TLP), ген которого предшествует гену ttTcDH. Препарат содержал до 2.9 иона меди в пересчете на TcDH. Тиоцианатдегидрогеназной активностью обладал только комплекс ttTcDH-TLP, свободный ttTcDH не проявлял каталитических свойств.

Для дальнейших исследований были получены рекомбинантные препараты ttTcDH и TLP. Поскольку рекомбинантный ttTcDH был нестабилен и склонен к агрегации, были проведены широкий скрининг и оптимизация методов получения и стабилизации целевого белка, позволившие увеличить выход ttTcDH и избавиться от высокомолекулярных агрегатов. Свободный рекомбинантный ttTcDH, как и нативный, не обладал тиоцианатдегидрогеназной активностью после насыщения ионами меди. Каталитическая активность ttTcDH появляется только при насыщении ионами меди в присутствии TLP. При этом образуется комплекс ttTcDH-TLP, который наблюдается на гель-фильтрации. Обнаружена способность TLP связывать ионы меди. Возможно, TLP участвует во встраивании ионов меди в активный центр ttTcDH, это подтверждается тем, что насыщение ионами меди ttTcDH в отсутствие TLP приводит к встраиванию только одного из трех ионов меди.

Анализ ближайшего окружения гена TcDH у микроорганизмов разных классов показал, что у тех бактерий, где гомологи TcDH имеют консервативный шаблон из 10 аминокислотных остатков (первая и третья группы гомологов), рядом с геном TcDH расположены гены медь-связывающих белков, ответственных за

перенос и встраивание ионов меди в активный центр с образованием каталитически компетентной формы фермента. В случае организмов второй группы, где у предполагаемой TcDH присутствует замена одного из остатков аминокислотного шаблона, гены белков – переносчиков ионов меди – в ближайшем окружении гена TcDH отсутствуют. Поскольку из наших данных следует, что такая форма TcDH неактивна, то клетке нет необходимости создавать систему транспорта ионов меди к заведомо дефектному белку.

Выводы:

1. Получены и охарактеризованы гомологи tpTcDH из четырех организмов.
2. Подтверждено, что шаблон из 10 аминокислотных остатков, формирующих активный центр tpTcDH, отвечает за принадлежность гомологов tpTcDH к тиоцианатдегидрогеназам.
3. Все изученные тиоцианатдегидрогеназы требуют присутствия трех ионов меди в активном центре для каталитической активности.
4. Нативный ttTcDH находится в двух формах: свободной и в прочном комплексе с тиоредоксин-подобным белком (TLP). Только комплекс ttTcDH-TLP обладает ферментативной активностью. Свободная ttTcDH неактивна и нестабильна.
5. Оптимизирован способ получения и стабилизации рекомбинантной ttTcDH, позволивший получить гомогенный и монодисперсный препарат белка.
6. Насыщение ttTcDH ионами меди приводит к встраиванию только одного из трех ионов, и фермент оказывается неактивен. Насыщение ttTcDH ионами меди в присутствии TLP приводит образованию каталитически активной формы фермента.

Structure and properties of thiocyanate dehydrogenase from various sources

Shipkov N.S.*, Tikhonova T.V., Dergousova N.I., Popov V.O.

Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Moscow, Russia

* shipkov1995@yandex.ru

Key words: thiocyanate; thiocyanate dehydrogenase; sulfur-oxidizing bacteria; cyanate pathway; copper-containing enzymes

Motivation and Aim: Thiocyanate is a toxic compound formed in both natural and industrial processes. The chemical stability and toxicity of thiocyanate necessitate the search for ways to purify industrial wastewater from thiocyanate. Bioremediation of wastewater using thiocyanate-recycling organisms seems to be a promising direction. Thiocyanate dehydrogenase is a copper-containing enzyme that catalyzes the oxidation of thiocyanate to form cyanate, sulfur and transfer two electrons to an external acceptor. The first thiocyanate dehydrogenase (TcDH) was isolated from the haloalkalophilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus*. The active center of TcDH from *Tv. paradoxus* (tpTcDH) contains a set of 10 conserved amino acid residues that maintain the structure of a three-core copper cluster and the catalytic properties of tpTcDH [1]. It has been suggested that the characteristic pattern of 10 catalytically important amino acids is a marker of a protein belonging to the thiocyanate

dehydrogenase family [2]. The purpose of this work was to study tpTcDH homologues from different organisms.

Methods and Algorithms: The work used methods of molecular biology to obtain recombinant proteins, and various biochemical methods to determine the properties of proteins.

Results: tpTcDH homologues have been found in more than 50 microorganisms. Based on the degree of homology and the presence of substitutions in the amino acid template, tpTcDH homologues were divided into 3 groups. The first group contains tpTcDH homologues with homology >50 % with no substitutions in the amino acid template, the second group includes homologues with 49–35 % homology with one amino acid substitution in the amino acid template, and the third group involves the most distant tpTcDH homologues (homology <33 %), but without substitutions in the amino acid template. The aim of the work was to obtain and characterize tpTcDH homologues from each group, to verify the importance of the amino acid template for classifying tpTcDH homologues to the thiocyanate dehydrogenase family. For this purpose TcDH homologues from bacteria *Pelomicrobium methylotrophicum* (pmTcDH) and *Hydrogenobacter thermophilus* (htTcDH) (first group), *Tautonia sociabilis* (tsTcDH) (second group) and *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1(ttTcDH) (third group) were selected. Gene clusters containing genes of the TcDH homologue were analyzed for all three groups of bacteria.

The work shows that the bacterium *P. methylotrophicum* is capable of growing on thiocyanate as a nitrogen source, while the expression of pmTcDH and the cyanase enzyme is recorded, which decomposes cyanate formed under the action of TcDH into CO₂ and ammonium used in biosynthesis processes.

tpTcDH homologues from the first group (pmTcDH and htTcDH) were obtained by heterologous expression in *E. coli* cells. Both proteins are copper-dependent enzymes that catalyze the oxidation of thiocyanate according to the same scheme as tpTcDH, that is, they are thiocyanate dehydrogenases. The biochemical properties of both proteins have been studied.

The second group of tpTcDH homologues contains one substitution in the amino acid template, the H482 residue, which in tpTcDH is responsible for coordinating the Cu³ ion, is replaced by glutamine. The tsTcDH from *T. sociabilis* obtained by heterologous expression, belonging to the second group, did not demonstrate thiocyanate dehydrogenase activity. The ability to grow on thiocyanate was also tested for the bacterium *Methylocapsa acidiphila* B2, which contains the gene of TcDH homologue from the second group in the genome. The bacterium *M. acidiphila* B2 was unable to grow on thiocyanate. Thus, substitutions in the amino acid template are critical, and proteins containing such a substitution are not thiocyanate dehydrogenases.

To study the third group of tpTcDH homologues, the bacterium *T. thiocyanaticus* was selected, for which the ability to grow on thiocyanate as the only source of energy and nitrogen was previously shown. The ttTcDH enzyme (amino acid sequence identity with tpTcDH 32 %) isolated from the periplasmic fraction of *T. thiocyanaticus* grown on a mineral medium in the presence of thiocyanate was a mixture of a free enzyme and a strong complex of ttTcDH with a thioredoxin-like protein (TLP), the gene of which precedes the ttTcDH gene. The preparation contained up to 2.9 copper ions in terms of TcDH. Thiocyanate dehydrogenase activity was possessed only by the ttTcDH-TLP complex, free ttTcDH did not exhibit catalytic properties.

Recombinant drugs ttTcDH and TLP were obtained for further studies. Since recombinant ttTcDH was unstable and prone to aggregation, extensive screening and optimization of methods for obtaining and stabilizing the target protein were carried out, which made it possible to increase the yield of ttTcDH and get rid of high-molecular aggregates. Free recombinant ttTcDH, like the native one, did not have thiocyanate dehydrogenase activity after saturation with copper ions. The catalytic activity of ttTcDH appears only when saturated with copper ions in the presence of TLP. In this case, the ttTcDH-TLP complex is formed, which is observed on gel filtration. The ability of TLP to bind copper ions has been discovered. It is possible that TLP is involved in the incorporation of copper ions into the active center of ttTcDH, this is confirmed by the fact that saturation with copper ions of ttTcDH in the absence of TLP leads to the incorporation of only 1 out of 3 copper ions.

Analysis of the immediate environment of the TcDH gene in microorganisms of different classes showed that in those bacteria where TcDH homologues have a conservative template of 10 amino acid residues (the first and third groups of homologues), next to the TcDH gene there are genes of copper-binding proteins responsible for the transfer and incorporation of copper ions into the active center to form a catalytically competent form of the enzyme. In the case of organisms of the second group, where the proposed TcDH has a replacement of one of the residues of the amino acid template, the genes of copper ion carrier proteins in the immediate environment of the TcDH gene are absent. Since our data show that this form of TcDH is inactive, the cell does not need to create a system for transporting copper ions to a known defective protein.

Conclusion:

1. tpTcDH homologues from 4 organisms were obtained and characterized.
2. It has been confirmed that a template of 10 amino acid residues forming the active center of tpTcDH is responsible for the affiliation of tpTcDH homologues to thiocyanate dehydrogenases.
3. All studied thiocyanate dehydrogenases require the presence of 3 copper ions in the active center for catalytic activity.
4. Native ttTcDH is found in two forms: free and in a strong complex with a thioredoxin-like protein (TLP). Only the ttTcDH-TLP complex has enzymatic activity. Free ttTcDH is inactive and unstable.
6. The method of obtaining and stabilizing recombinant ttTcDH has been optimized, which made it possible to obtain a homogeneous and monodisperse protein preparation
7. Saturation of tch with copper ions leads to the incorporation of only one of the three ions, and the enzyme is inactive. Saturation of ttTcDH with copper ions in the presence of TLP leads to the formation of a catalytically active form of the enzyme.

Список литературы/References

1. Tikhonova T.V. et al. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(10):5280-5290
2. Tsallagov S.I. et al. Comparative Genomics of Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1T and Guyparkeria sp. SCN-R1, Halophilic Chemolithoautotrophic Sulfur-Oxidizing Gammaproteobacteria Capable of Using Thiocyanate as Energy Source. *Front Microbiol*. 2019;10:898