

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.151.3

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ МОДЕЛЬ АНАЭРОБНОЙ МЕТАКРИЛАТРЕДУКТАЗНОЙ СИСТЕМЫ*

О.В. Архипова¹, О.Ю. Трошина¹, Г.В. Микулинская²

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пущино

Компьютерное моделирование пространственной структуры метакрилатредуктазы (Mrd) и цитохрома *c* (Mcc) метакрилатной редокс системы *Geobacter sulfurreducens* AM-1 выявило высокое структурное сходство с растворимыми фумаратредуктазами *Shewanella*. Mrd и по последовательности, и структурно повторяет два С-концевых каталитических домена этих фумаратредуктаз – FAD-связывающий и домен-«зажим». Mcc сходен с малым N-концевым гемсодержащим доменом периплазматических фумаратредуктаз *Shewanella*. Высказывается предположение о пространственном взаимодействии консервативных аминокислот Mrd, участвующих в катализе и связывании субстрата.

Ключевые слова: метакрилатредуктаза (Mrd), цитохром *c* (Mcc), флавоцитохромы *c*, периплазматические фумаратредуктазы, *Geobacter sulfurreducens* AM-1, *Shewanella*.

Введение. Многие анаэробные бактерии используют ненасыщенные органические соединения в качестве терминальных акцепторов восстановительных эквивалентов (Архипова, Акименко, 2005). Детально изучены такие разновидности анаэробного дыхания, как кофеатное и фумаратное (Hägerhäll, 1997; Kröger et al., 2002; Hess et al., 2013; Iverson, 2013). Заключительные стадии этих типов дыхания - восстановление кофеата в гидрокофеат и фумарата в сукцинат – происходят в цитоплазме и/или периплазме. Восстановление осуществляется 1) мономерными редуктазы, 2) редуктазами из 3-4 субъединиц, 3) ферментными системами из нескольких белков с разными каталитическими активностями.

Терминальная стадия кофеатного дыхания *Acetobacterium woodii* - восстановление производных фенилпропеновой кислоты -

* Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 17-04-01068 «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метакрилат»).

осуществляется в цитозоле клеток с помощью ферментов, кодируемых опероном *carABCDE* (Hess et al., 2013). К ним относятся гидрокофеил-СоА:кофеат-СоА трансфераза (*CarA*), АТР-зависимая ацил-СоА синтетаза (*CarB*) и трёхсубъединичный ферментный комплекс из кофеил-СоА редуктазы и электрон-транспортного флавопротеина (*CarCDE*).

В случае фумаратного дыхания клетки бактерий восстанавливают фумарат в цитозоле (например, *Wolinella succinogenes* и *Escherichia coli*) или в периплазме (бактерии рода *Shewanella*). Ферментный комплекс, восстанавливающий фумарат в цитозоле, располагается с внутренней стороны цитоплазматической мембраны и состоит из 3-4 белковых субъединиц (Hägerhäll, 1997; Kröger et al., 2002; Iverson, 2013). Периплазматические фумаратредуктазы бактерий рода *Shewanella* являются растворимыми мономерами и относятся к семейству флавоцитохромов *c* (Gordon et al., 1998; Dobbin et al., 1999; Maier et al., 2003).

Анаэробная бактерия *Geobacter sulfurreducens* AM-1 использует соединение антропогенной природы – метакрилат – в качестве конечного акцептора редуктазной цепи (Mikoulińskaia et al., 1999). Интерес к представителям рода *Geobacter* (δ -*Proteobacteria*) вообще обусловлен высоким разнообразием у них дыхательных цепей: электрон-транспортных компонентов, цитохромов (Methé et al., 2003). Такая особенность микроорганизмов позволяет им быть как электротрофами (Lovley, 2010), принимающими электроны для восстановления терминальных акцепторов электронов напрямую от электрода, так и экзоэлектрогенами (Logan, 2009), переносящими электроны на твёрдые электроды. Бактерии рода *Geobacter* вовлечены в процессы электробиоремедиации радиоактивных металлов и органических загрязнений (Lovley, 2010). Они играют значительную роль в глобальных круговоротах металлов и углерода: восстанавливают Fe(III) в Fe(II), U(VI) в U(IV), окисляют ацетат и многоуглеродные органические субстраты, участвуют в разложении гумуса. Кроме того, бактерии рода *Geobacter* способны к фумаратному дыханию (Caccavo et al., 1994; Methé et al., 2003).

Трансформацию метакрилата в изобутират у *G. sulfurreducens* AM-1 катализирует периплазматическая метакрилатная редокс система (Mikoulińskaia et al., 1999). Она состоит из двух хромопротеидов: флавинодержущей метакрилатредуктазы (*Mrd*; 50 кДа) и её физиологического донора электронов – цитохрома *c* (*Msc*; 30 кДа) (Mikoulińskaia et al., 1999). Недавно нами был секвенирован полный геном *G. sulfurreducens* AM-1 (Arkhipova et al., 2015). Гены, кодирующие компоненты метакрилатной редокс системы, оказались организованными в оперон. Обнаружение генов *mrd* и *mcc* в геноме

привело к расшифровке аминокислотных последовательностей обоих компонентов.

подавляющее большинство белковых последовательностей, проявляющих выраженное сходство с Mrd и Mcc, не были получены в чистом виде и охарактеризованы биохимически (Arkhipova et al., 2015). Например, наиболее близкие гомологи Mrd и Mcc – гипотетические белки, данные о которых получены на основании анализа последовательностей геномов четырёх представителей класса *δ-Proteobacteria* и одного представителя класса *Deferribacteres* (Arkhipova et al., 2015). Гомологи Mrd и Mcc из *Anaeromyxobacter sp. K*, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C, *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01 и *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809, по всей видимости, являются компонентами единой редокс системы, поскольку их гены также организованы в одну транскрипционную единицу.

К настоящему моменту были исследованы экспериментально следующие флавопротеины-гомологи Mrd: FccA (WP_011138088) бактерии *Wolinella succinogenes* (Gross et al., 2001), предполагаемая уроканатредуктаза SO_4620 (WP_011074216) (Bogachev et al., 2012) и периплазматические фумаратредуктазы Fcc3 (WP_041413240; далее Fcc3-f) (Gordon et al., 1998), Ifc3 (WP_011638036) (Dobbin et al., 1999) и Fcc3 (WP_011071245; далее Fcc3-o) (Maier et al., 2003) бактерий рода *Shewanella*. Растворимые фумаратредуктазы шеванелл (Fcc3-f) (WP_041413240), Ifc3 (WP_011638036), Fcc3-o (WP_011071245) являются к тому же гомологами Mcc метакрилатной редокс системы (Arkhipova et al., 2015). Эти фумаратредуктазы бактерий рода *Shewanella* – единственные из гомологов Mrd и Mcc, для которых известны кристаллические структуры (Vamford et al., 1999; Leys et al., 1999; Taylor et al., 1999; Doherty et al., 2000).

Целью работы было проанализировать потенциальную пространственную организацию компонентов метакрилатной редокс системы, включая выявление консервативных аминокислот Mrd, участвующих в катализе и связывании субстрата.

Методика. Объектом исследований служила анаэробная бактерия *G. sulfurreducens* AM-1 из коллекции культур лаборатории адаптации микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН (г. Пущино).

Предметом исследований были установленные ранее (Arkhipova et al., 2015). аминокислотные последовательности компонентов метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens* AM-1.

Для анализа аминокислотных последовательностей и расчета молекулярных масс использовали программу GENERUNR (<http://www.generunner.net>). Количество генов *c* у гомологичных белков

определяли по числу гемсвязывающих участков CXXCH (где С – цистеин, Н – гистидин, Х – любая аминокислота) (Li et al., 2011).

Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы BLAST с сервера National Center of Biotechnology Information, National Library of Medicine, USA (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение предполагаемых пространственных структур выполняли с помощью программы Cn3D Viewer, доступной на сервере NCBI, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d/shtml>). При этом аминокислотные последовательности компонентов метакрилатной редокс системы накладывали на известную пространственную структуру фумаратредуктазы Ifc₃ (WP_011638036; 1Q08) бактерии *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400 (Bamford et al., 1999). Флавоцитохром Ifc₃ (WP_011638036) был выбран по принципу наибольшего сходства с Mrd, но результаты аналогичны при выборе флавоцитохромов с Fcc₃-f (WP_041413240) и Fcc₃-o (WP_011071245).

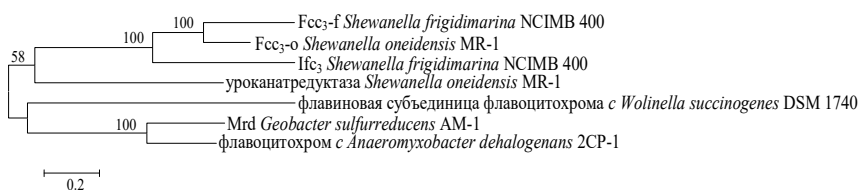
Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей Mrd, Mcc и гомологичных им белков, а также генов, кодирующих 16S рРНК, был осуществлён с помощью программного пакета MEGA версия 6.0 (Tamura et al., 2013). Дендрограммы аминокислотных последовательностей были построены с использованием метода Maximum Likelihood и модели WAG+G+I. Дендрограмма родства генов 16S рРНК построена с использованием метода Maximum Likelihood и модели Tamura-Nei. Достоверность ветвления оценивали с помощью «bootstrap» анализа 1000 альтернативных деревьев.

Все использованные в работе аминокислотные последовательности белков и нуклеотидные последовательности генов ферментов и 16S рРНК, доступны в базах данных GenBank, Gene, Genome, Nucleotide, Protein с сервера National Center of Biotechnology Information, National Library of Medicine, USA (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

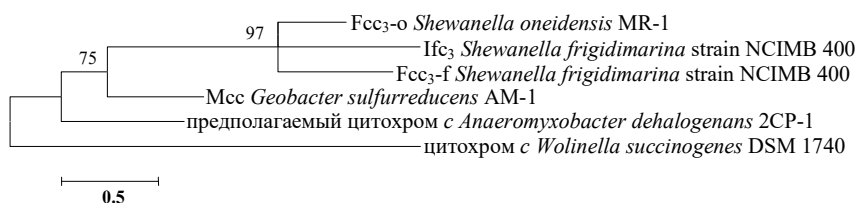
Результаты

Гомологи компонентов метакрилатной редокс системы. Ранее было показано, что самые близкие гомологи метакрилатной редокс *G. sulfurreducens* AM-1 системы – гипотетические белки, обнаруженные при аннотации полных геномов бактерий (Arkhipova et al., 2015). Однако, как уже упоминалось во ВВЕДЕНИИ, среди гомологов метакрилатной редокс системы есть и биохимически охарактеризованные. Для представления степени родства хромопротеидов метакрилатной редокс системы и обсуждаемых в статье гомологов были построены филогенетические деревья (рис. 1 и 2). Для этих деревьев были использованы аминокислотные

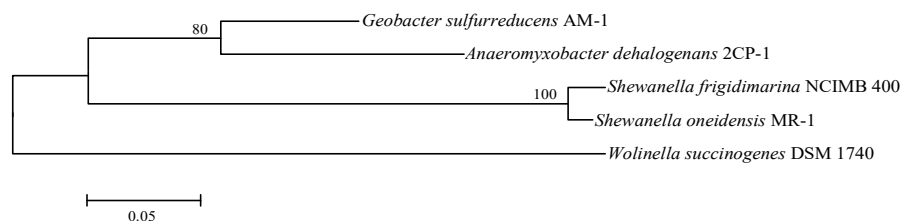
последовательности Mrd (рис. 1) и Mcc (рис. 2) и аминокислотные последовательности как всех биохимически охарактеризованных гомологов из *Wolinella succinogenes* (Gross et al., 2001), *Shewanella oneidensis* MR-1 (Maier et al., 2003; Bogachev et al., 2012) и *S. frigidimarina* NCIMB 400 (Gordon et al., 1998; Dobbin et al., 1999), так и гипотетических, но проявляющих наибольшее сходство (Arkhipova et al., 2015), гомологов из *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1. Родство самих бактерий представлено на дендрограмме, построенной на основании данных о генах 16S рРНК этих бактерий (рис. 3).



Р и с . 1 . Дендрограмма родства Mrd *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (AJY71931) и гомологичных белков: гипотетического флавоцитохрома *c* (WP_012633122) из *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 и исследованных экспериментально флавиновой субъединицы флавоцитохрома *c* (WP_011138088) из *Wolinella succinogenes* DSM 1740, предполагаемой уроканатредуктазы (WP_011074216) из *Shewanella oneidensis* MR-1, флавоцитохрома *c*₃-фумаратредуктазы Ifc₃ (WP_011638036) *S. frigidimarina* NCIMB 400, флавоцитохрома *c*₃-фумаратредуктазы Fcc₃-f (WP_041413240) *S. frigidimarina* NCIMB 400 и флавоцитохрома *c*₃-фумаратредуктазы Fcc₃-o (WP_011071245) *S. oneidensis* MR-1.



Р и с . 2 . Дендрограмма родства цитохромных доменов Mcc *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (AJY71932, C-концевая область) и соответствующих доменов (N-концевые области гомологичных белков: предполагаемого белка A2cp1_1860 (WP_012633121) из *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 и исследованных экспериментально гемовой субъединицы флавоцитохрома *c* (WP_011138087) из *Wolinella succinogenes* DSM 1740, флавоцитохрома *c*₃-фумаратредуктазы Ifc₃ (WP_011638036) *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400, флавоцитохрома *c*₃-фумаратредуктазы Fcc₃-f (WP_041413240) *S. frigidimarina* NCIMB 400 и флавоцитохрома *c*₃-фумаратредуктазы Fcc₃-o (WP_011071245) *S. oneidensis* MR-1.



Р и с . 3. Дендрограмма родства по генам 16S рРНК *Geobacter sulfurreducens* AM-1 и бактерий, имеющих гомологи Mrd и Mcc: *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1, *Wolinella succinogenes* DSM 1740, *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400, *S. oneidensis* MR-1.

Как следует из представленных дендрограмм (рис. 1 и 2) фумаратредуктазы Fcc₃-f, Fcc₃-o и Ifc₃ двух видов шеванелл имеют гораздо больше сходства между собой, чем их гомологи из других бактерий. *G. sulfurreducens* AM-1 и *A. dehalogenans* 2CP-1, имеющий гомологи Mrd и Mcc наибольшего сходства, кроме того, и сами являются более близкими родственниками, чем бактерии *W. succinogenes* DSM 1740 или *Shewanella* (рис. 3).

Консервативные участки Mrd и Mcc. Для обоих хромопротеидов метакрилатной редокс системы (и для Mrd, и для Mcc) показано сходство с флавоцитохромами *c* Fcc₃-f (WP_041413240), Ifc₃ (WP_011638036) и Fcc₃-o (WP_011071245) (табл.). Сходство с Mrd обнаружено для С-концевых последовательностей этих флавоцитохромов на участке между 140-ым и 590-ым аминокислотными остатками (рис. 4). Сходство с Mcc из *G. sulfurreducens* AM-1 наблюдается с N-концевыми последовательностями обсуждаемых флавоцитохромов *c* на участке до 125-ого аминокислотного остатка (рис. 5).

У растворимых периплазматических фумаратредуктаз шеванелл и Mrd обнаружены консервативные последовательности (рис. 4), указывающие на принадлежность к FAD-связывающим белкам. У растворимых периплазматических фумаратредуктаз шеванелл и Mcc обнаружены отщепляемые сигнальные пептиды типа Sec (табл.), а также консервативные последовательности CXXCH (рис. 5), указывающие на принадлежность к цитохромам *c*.

На рисунке 4 хорошо видно присутствие консервативного фосфатсвязывающего (или динуклеотидсвязывающего мотива – ДСМ) участка, характерного для всех FAD- и NAD(P)H-зависимых оксидоредуктаз: xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)shxhE(D), где х - любая аминокислота, h – гидрофобная аминокислота (Eschenbrenner et al., 2001). В случае Mrd он представлен 69-98 аминокислотными остатками незрелого белка (Arkhipova et al., 2015). В случае растворимых

периплазматических фумаратредуктаз шеванелл: 146-175 аминокислотными остатками у Ifc₃ и 153-182 аминокислотными остатками у Fcc₃-f из *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400 (рис. 4), 152-181 аминокислотными остатками у Fcc₃-o из *Shewanella oneidensis* MR-1. Центральная часть консенсуса, GxGxxG, представляет собой глицин-богатую часть петли, соединяющей первую β-складку в укладке Россманна (β1α1β2α2β3) с первой α-спиралью, направленной в сторону остатка пирофосфата для компенсации заряда. В целом этот мотив имеет структуру β-складка-поворот-β-складка и формирует гибкий «зажим», окружающий и «заякоривающий» пирофосфат FAD (Hanks, Hunter, 1995).

Т а б л и ц а
Флавоцитохромы с бактерий рода *Shewanella*, гомологичные цитохрому с и метакрилатредуктазе из *Geobacter sulfurreducens* M-1

Организм	Белок № в базе данных	Сходство/идентичность (%/%)	% наложения (область перекрывания в амк), E	Количество амк, Mr (кДа) незрелого белка	Тип сигнального пептида (длина, амк)	Гемсвязывающие участки	Кристаллические структуры белков (№ в базе данных)	Консервативные аминокислоты, участвующие в катализе и связывании субстрата* (ссылка)
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	Флавоцитохром c ₃ -фумаратредуктаза Ifc ₃ WP_011638036	53%/36% с Mrd 51%/39% с Mcc	86% (142-582), 3×10 ⁻⁷⁶ с Mrd 40% (27-114), 1×10 ⁻⁰⁹ с Mcc	588 амк 63 кДа	Sec (22 амк)	4	1Q08	H382, R419, H521, R561 (Bamford et al. 1999)
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	Флавоцитохром c ₃ -фумаратредуктаза Fcc ₃ -f WP_041413240	51%/35% с Mrd 53%/38% с Mcc	84% (164-590), 2×10 ⁻⁶³ с Mrd 48% (13-121), 6×10 ⁻¹¹ с Mcc	596 амк 63 кДа	Sec (25 амк)	4	1QJD	H390, T402, R427, H529, R569 (Taylor et al. 1999; Doherty et al. 2000)
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Флавоцитохром c ₃ -фумаратредуктаза Fcc ₃ -o WP_011071245	54%/38% с Mrd 59%/46% с Mcc	86% (149-590), 2×10 ⁻⁷² с Mrd 35% (40-122), 3×10 ⁻¹⁰ с Mcc	596 амк 62.4 кДа	Sec (25 амк)	4	1D4E	R426, H528, R569 (Leys et al. 1999)

Примечание. * Номера аминокислотных остатков, участвующих в катализе и связывании субстрата, указаны для незрелых белков растворимых фумаратредуктаз *Shewanella*, в которых присутствуют отщепляемые сигнальные пептиды типа Sec.

Mrd	65	-----D-----	ETFDVVVIGSGFAGLAAAEAAAGKGA	SVVILEKMP	100
lfc ₃	128	-----D--QDKI--Q-KAIAAGPSET	TQVLVVGAGSAGFNA	SLAAKKAGANVILVDKAP	176
Fcc ₃ -f	128	-PtIaELAKDKSErQ-AALASAPHDT	VDVVVVGSGGAGFSA	AISATDSGAKVILIEKEP	184
Fcc ₃ -o	130	vP-V-D-A-DKAA-QdKAIAAGVKET	TDVVVIIGSGGAGLAA	AVSARDAGAKVILIEKEP	183
		*	*****	*****	*
Mrd	101	IYGGNS-IINGGEYNA-WTDGQ[4]	TLKLG-DDSAE-WH-KnD	TLKGGDFLGYPELVEV	155
lfc ₃	177	FSGGNS-MI SAGGMNAVGT	KQQT	TAH-GVEDKVE-WFiE-DAMKGG	RQONDIKLVTTI
Fcc ₃ -f	185	VJGGNAKL-AAGGMNAAWTDQ	Q m	KAK-KI TD SPELMF-E-D	TMKGGONINDPALVKV
Fcc ₃ -o	184	IFGGN TKL-AAGGMNAET	KPQ	-AKLGI EDKKQIMI-D-D	TMKGGRNINDPELVKV
		*****	*****	*****	*****
Mrd	156	LAEGAPKALDWMvEE-GG-L-KLRPI[4]	GGHSKYRTH--T--cvEAS	GRGYVEAL-R	206
lfc ₃	229	LAEQSADGVQWL-ESLGANLDDLKRS	GGARVDRTHRPHGG--KSS	GPEIIDTL-R	279
Fcc ₃ -f	237	LSSHKSQSVLWM-TAMGADLTDVGM	GGASVNR	AHRPTGG--AGVGAHV	VQVLYD
Fcc ₃ -o	236	LANNSSDSIDLW-TSMGADMTDVGRM	GGASVNR	SHRPTGG---AGVGAHVAQ	VLWD
		*****	*****	*****	*****
Mrd	207	RIVDKRgAkVRLR-N-EVTWIWRKd	Ld-GPILGVEVN---TGRRKVN	IAvRkGLVLAGS	259
lfc ₃	280	KAAKEQG--IDTRLNSRVV	KLVVND-DH-SVVGAVVHGKH	TGYMIG-A-K-SVVLATG	231
Fcc ₃ -f	289	N-AVKRN--IDLRMNTRGIEV	LK-D-DKGTVKGLV	KGMKGYVVK-A-D-AVILATG	339
Fcc ₃ -o	288	N-AVKRG--TDIRLNSRVVR	LLE-D-ASGKVTGVLV	KGEYTGYYVIK-A-D-AVVIATG	338
		*****	*****	*****	*****
Mrd	260	GFSRDvaMRRiYVPYLD	ET---FNCS--NQKATGEM-	IRYAKAIGAETIHMSYIQ	LYP
lfc ₃	232	GYGMN--KEM--IAYRPTMK--	DMTs sNNITATGDvL-	MAKEIGASMTDIDWVQ	AHP
Fcc ₃ -f	340	GFAKN--NER--VAKLDP	SLKGFIST--NQCAVGDG-	LDVAENAGALKDMQYIQ	AHP
Fcc ₃ -o	339	GFAKN--NER--VSKYDP	KLKGFKAT--NHPCATGDG-	LDVALQAGAAATRDLEYIQ	AHP
		*****	*****	*****	*****
Mrd	313	-FAdPE-TGTLdV-EAlfp	FRGPGvGIVyVTEKGRF	VNE LERRD VISNAEMKTGG	KKT
lfc ₃	384	TV--GKdSRIL-ISET---	VRGVG-AVM-VNKDGNRE	ISELTTRDKASDA	ILKQPGQFA
Fcc ₃ -f	392	TLs-VK-GGVM-VTEA---	VRNG-AIL-VNREGKRF	VNEITTRDKASAA	ILLAQTGKSA
Fcc ₃ -o	391	TYS-PA-GGVM-ITEA---	VRNG-AIV-VNREGNRF	MNEITTRDKASAA	ILQKGEESA
		*****	*****	*****	*****
Mrd	369	YSIFNHEmVVMngsKE-EEVEK--	GLarGrFV-KADSI	AELAgK--IGID---ADvLVA	418
lfc ₃	435	WLIIFDNQ-LYK---KA-KMVR	GYDHL--E-MLYKGD	TVEQLA-K-STGM--KvAD-LAK	480
Fcc ₃ -f	443	YLIFFDSS-V-R---KSLSKID	KYIGL--G-VAPTAD	SLVKLG-KmE-GIDGK-A--L	488
Fcc ₃ -o	442	YLVFFDSS-I-R---KSLKAIE	GYVHL--N-IVKEG	KTIEELA-K-QIDVPA--AE-LAK	487
		*****	*****	*****	*****
Mrd	419	TI-KQhNAYIKNKD	PDYQK-NITdRmV	TLEQGPFYAVaQ-WPAV	HHTMGGLRINTNAQ
lfc ₃	481	TV-SDYNGYVASGKD	TAFGRADMP---LNMT	QSPYAV-KVAPGI	HHTMGGVAINTAS
Fcc ₃ -f	489	TV-ARYNSLVSSGKD	TDFERP	NLP-RALN--EGNYAI-EV	TPGVHHTMGGVMTDKAE
Fcc ₃ -o	488	TVtA-YNGFVKS	GKDAQFERP	DLP-RELV--VAPFYAL-EI	APAVHHTMGGLVMTDKAE
		*****	*****	*****	*****
Mrd	475	VLDI-WGKI-I	PRLYAAGEVTTGGVHGS	NRLGANAI PDATV-FGR	IAGTNAAS-GR-V
lfc ₃	535	VLDLQS-KP-IDGL	FAAGEVTTGGVHGN	RLGNAIADTVV-FGR	IAGDNAAKHALDK
Fcc ₃ -f	543	VMLAK--KQvI	PGLYAGEVTTGGVHGS	NRLGNAI SD-IIT	FGRIAGEEAAKYSKKN
Fcc ₃ -o	542	VKSEKTKP-I	TGLYAAGEVTTGGVHGS	NRLGNAI SD-IVTY	GRIAGASAAKFAKDN
		*****	*****	*****	*****

Рис. 4. Множественное выравнивание Mrd *Geobacter sulfurreducens* AM-1 и периплазматических фумаратредуктаз шеванелл: lfc₃ (WP_011638036) *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400, Fcc₃-f - Fcc₃ (WP_041413240) *S. frigidimarina* NCIMB 400 и Fcc₃-o - Fcc₃ (WP_011071245) *S. oneidensis* MR-1. Серым цветом отмечены консервативные аминокислотные последовательности и аминокислоты, участвующие в катализе и связывании субстрата (Vamford et al., 1999; Leys et al., 1999; Taylor et al., 1999; Doherty et al., 2000).

Другой консервативный участок связывания FAD - 11-аминокислотный сегмент T(S)xxxxxF(Y)hhGD(E) (Eggink et al., 1990) - присутствует в аминокислотных последовательностях Mrd (Arkhipova et al., 2015) и флавоцитохромов с шеванелл в усечённом виде (рис. 4): без первого остатка треонина обсуждаемого участка. Данному участку соответствуют 487-491 аминокислотные остатки Mrd, 547-551

аминокислотные остатки Ifc₃, 555-559 аминокислотные остатки Fcc₃-f, 555-559 аминокислотные остатки Fcc₃-o.

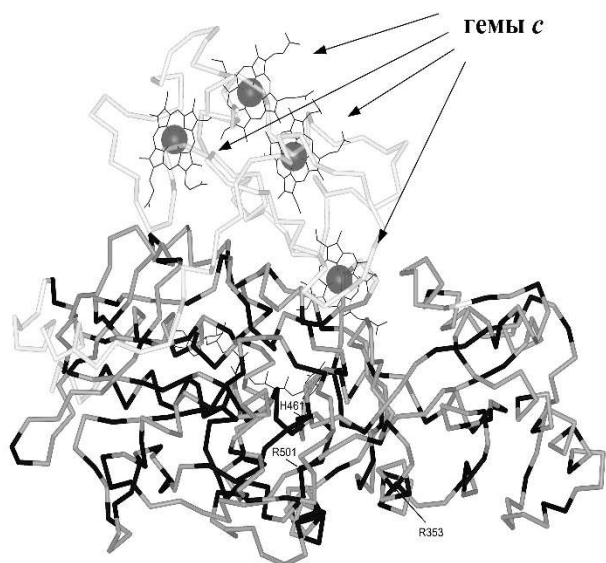
Mcc	1	[112] IGKPADEDELEATTRIMAGMS	GATFMASG ----	HYAQGVPCSGCHGA	154
Ifc₃	1	M---KLKYLVSAMALVVLSS	G TAMAKTPDMGS	FHADMGSCQSCHAK	43
Fcc₃-f	1	-----MKKMNLAVCIATLMG[5]	G TAVAADN-	LAEFHVQNQECDSCHTP	44
Fcc₃-o	1	MFTRKIQKTALAMLISGAMA	G TAYAAPEVLAD	FHGEMGGCDSCHVS	46
		*.....*.....	
Mcc	155	G---FPAIGDT V ENDK C LACHG S YDK L AETTKPKTayEPN P H R SH L -G D I A C T			203
Ifc₃	44	P--IKVTDSE T H E NA Q CK S CH G EY A E L AN--DKL---Q F D P H N SH L -G D I N C T			88
Fcc₃-f	45	D-GELSNDSL T Y E NT Q C V S C H G T L A E V A ETTK H E---H Y NA H ASH F P G E V A C T			94
Fcc₃-o	47	DkGGVTNDNL T H E NG Q C V S C H G DL K E L AAA P KD---K V S P H K SH L I G E I A C T			96
		:***
Mcc	204	ACHYGH Q KSVLY C KD C H Q FT I T-IP F G K -----			231
Ifc₃	89	S C H K G H E E PK F Y C NE C H-S F DI K р M P F SD A K---KKK S WDDG W D Q DK I Q K A I A			137
Fcc₃-f	95	S C H S A H E K S M V Y C D S C H-S F DF N - M P Y AK K W L rdE P T I A E L A K D K S E R Q A A L A			145
Fcc₃-o	96	S C H K G H E K S V A Y C D A C H-S F G F D- M P F G G K W ---ER K F V P V D A D K A A Q D K A I A			144
		*****	*****	*****	

Р и с . 5. Множественное выравнивание Mcc *Geobacter sulfurreducens* AM-1 и периплазматических фумаратредуктаз шеванелл: Ifc₃ (WP_011638036) *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400, Fcc₃-f - Fcc₃ (WP_041413240) *S. frigidimarina* NCIMB 400 и Fcc₃-o - Fcc₃ (WP_011071245) *S. oneidensis* MR-1.

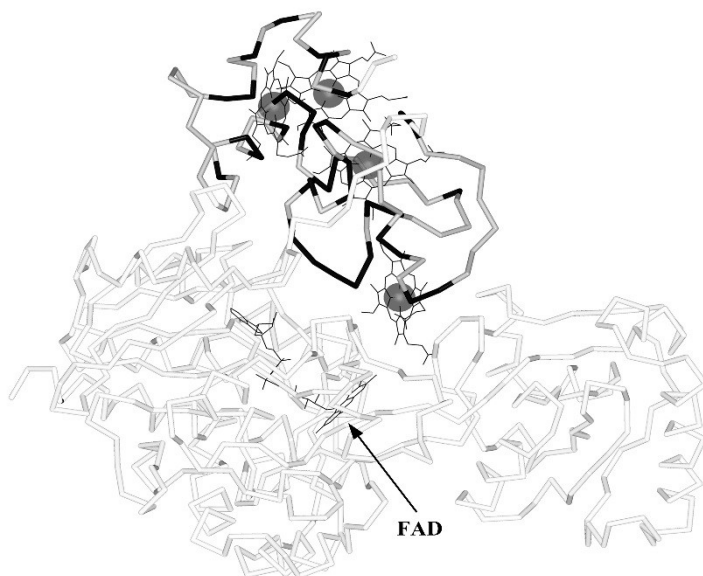
Кроме того, Mrd содержит консервативные для фумаратредуктаз аминокислотные остатки, участвующие в катализе (Bamford et al., 1999; Leys et al., 1999; Taylor et al., 1999; Doherty et al., 2000), а именно – гистидин-461 и аргинины – R501 и R353 (рис. 4) (Arkhipova et al., 2015).

Пространственная структура Mrd и Mcc. Мы осуществили компьютерное моделирование пространственной структуры Mrd и Mcc *G. sulfurreducens* AM-1 (рис. 6 и 7). Оба хромопротеида метакрилатной редокс системы проявляют высокое структурное сходство с флавоцитохромом Ifc₃ (WP_011638036) *S. frigidimarina* NCIMB 400; при этом Mcc сходен с малым N-концевым гемсодержащим доменом белка, а Mrd – с большим C-концевым FAD-связывающим.

Mcc *G. sulfurreducens* AM-1 структурно сходен с N-концевым гемсодержащим доменом фумаратредуктаз бактерий рода *Shewanella*. Но нужно отметить, что с N-конца он удлинен относительно этого домена. За счет этого в его аминокислотной последовательности можно найти не 4, как у этих белков, а 7 гем-связывающих участков, хотя Mcc – тетрагемовый, как было показано экспериментально (Mikoulinskaia et al., 1999).



Р и с . 6 . Результат пространственного наложения первичной структуры Mrd *Geobacter sulfurreducens* AM-1 на известную трехмерную структуру фумаратредуктазы Ifc₃ (WP_011638036) из *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400. Чёрным цветом выделены консервативные аминокислоты; насыщенным серым цветом окрашены участки одинаковой вторичной структуры.



Р и с . 7 . Результат пространственного наложения первичной структуры Msc *Geobacter sulfurreducens* AM-1 на известную трехмерную структуру фумаратредуктазы Ifc₃ (WP_011638036) из *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400. Чёрным цветом выделены консервативные аминокислоты; насыщенным серым цветом окрашены участки одинаковой вторичной структуры.

Обсуждение

Гомологи Mrd и Msc - растворимые трёхдоменные фумаратредуктазы. Ненасыщенные органические соединения используются анаэробными бактериями в качестве терминальных акцепторов дыхательных цепей анаэробных бактерий (Архипова, Акименко, 2005). Среди всех известных ферментных систем, которые восстанавливают двойные связи (Hägerhäll, 1997; Gordon et al., 1998; Dobbin et al., 1999; Mikoulskaia et al., 1999; Kröger et al., 2002; Maier et al., 2003; Архипова, Акименко, 2005; Hess et al., 2013; Iverson, 2013), фумаратредуктазы *S. frigidimarina* и *S. oneidensis* и метакрилатная редокс система *G. sulfurreducens* AM-1 имеют ряд общих черт: 1) они локализируются в периплазме, 2) в качестве коферментов имеют гемы *c* и нековалентно связанный FAD (Gordon et al., 1998; Dobbin et al., 1999; Mikoulskaia et al., 1999; Maier et al., 2003; Архипова, Акименко, 2005). Метакрилат восстанавливает двухкомпонентная система, включающая флавопротеин Mrd и четырёхгемовый цитохром *c* Msc. Эта система не восстанавливает фумарат (Mikoulskaia et al., 1999). Периплазматические фумаратредуктазы бактерий рода *Shewanella* мономерны (Gordon et al., 1998; Dobbin et al., 1999; Maier et al., 2003).

Наибольшим сходством ($E=3 \cdot 10^{-76}$) с Mrd среди этих фумаратредуктаз обладает периплазматический флавоцитохром *c* Ifc₃ (WP_011638036) из *S. frigidimarina* NCIMB 400 (табл.). Если для двух других флавоцитохромов *c*-фумаратредуктаз Fsc₃-f из *S. frigidimarina* NCIMB 400 (Gordon et al., 1998) и Fsc₃-o из *S. oneidensis* MR-1 (Maier et al., 2003)] главной физиологической функцией является восстановление фумарата, то Ifc₃ проявляет фумаратредуктазную активность только *in vitro* (Dobbin et al., 1999). Флавоцитохром *c* Ifc₃ экспрессируется в анаэробно растущих клетках, когда единственными терминальными акцепторами восстановительных эквивалентов служат цитрат или пирофосфат железа, но не фумарат. Согласно результатам исследований пространственной структуры, флавоцитохром *c* Ifc₃ – асимметричный октагемовый дифлавиновый гомодимер с нативной молекулярной массой 130 кДа (Vamford et al., 1999).

Мономерные фумаратредуктазы шеванелл, для которых известны кристаллические структуры (Vamford et al., 1999; Leys et al., 1999; Taylor et al., 1999; Doherty et al., 2000) – трёхдоменные белки. Например, полипептидная цепь в каждой субъединице димера Ifc₃ содержит 1) N-концевой домен (2-95 аминокислотные остатки), связывающий ковалентно 4 гема *c*, 2) каталитический FAD-связывающий домен (100-359 аминокислотные остатки и 498-565 аминокислотные остатки) и 3) каталитический домен-«зажим» (360-497 аминокислотные остатки) (Vamford et al., 1999). Последний вследствие своей подвижности играет важную роль в

конформационном переходе молекулы фермента из открытой в закрытую конформацию и обратно, обеспечивая таким образом доступ субстрата и выход продукта (Vamford et al., 1999).

Mrd и по последовательности (рис. 4), и структурно (рис. 6) повторяет оба каталитических домена растворимых фумаратредуктаз шеванелл. Mss (рис. 5 и 7) проявляет сходство с N-концевым доменом этих белков. Таким образом, пространственная модель метакрилатной редокс системы, вероятно, аналогична таковой растворимых фумаратредуктаз рода *Shewanella*. Флавоцитохромы *c*-фумаратредуктазы бактерий рода *Shewanella*, очевидно, имеют модулярную структуру: N-концевой модуль выполняет функцию передачи восстановительных эквивалентов, а C-концевой - обладает ферментативной активностью.

Mrd и его гомологи из шеванелл - представители семейства FAD-связывающих белков глутатионредуктаз. Результаты пространственного наложения (рис. 6 и 7) показывают, что структура Mrd имеет черты, характерные для FAD-связывающих белков. Ранее было показано, что моно- и динуклеотидсвязывающие белки имеют сходную трехмерную структуру, содержащую консервативные участки, критичные для связывания кофактора, при значительной общей вариабельности аминокислотной последовательности. Впервые подобная укладка была описана Россманном (Rossmann et al., 1974). В ее основе лежит моноклеотид-связывающий структурный мотив $\beta\alpha\beta$. Согласно классификации, основанной на вторичной структуре (Dym, Eisenberg, 2001), Mrd и его гомологи Ifc₃ (WP_011638036), Fcc₃-f (WP_041413240) и Fcc₃-o (WP_011071245) можно отнести к семейству FAD-связывающих белков GR (глутатионредуктаз). Для строения домена связывания FAD у белков этого семейства характерно наличие укладки Россмана ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$). В целом белки семейства имеют пять центральных параллельных β -складок, окруженных α -спиралями с одной стороны и тремя антипараллельными β -складками – с другой (Dym, Eisenberg, 2001). FAD у белков семейства имеет вытянутую конформацию, в которой остатки аденина и изоаллоксазина расположены дистально друг от друга. Кроме того, у членов семейства консервативно расположение FAD: кольцо аденина направлено внутрь FAD-связывающего домена, кольцо изоаллоксазина – наружу (Dym, Eisenberg, 2001). Для Mrd, таким образом, свойственна подобная структура и подобное расположение FAD.

Роль консервативных аминокислот в катализе. Как уже упоминалось в РЕЗУЛЬТАТАХ, в последовательности Mrd выявлены консервативные аминокислоты: гистидин-461 и аргинины – R501 и R353 (рис. 4). Работы по кристаллическим структурам растворимых фумаратредуктаз *Shewanella* (Vamford et al., 1999; Leys et al., 1999;

Taylor et al., 1999) появились одновременно - в 1999 году. По мнению Bamford et al. (1999), аргинины Ifc₃ *S. frigidimarina*, аналогичные R501 и R353 метакрилатредуктазы, ориентируют субстрат внутри активного центра фермента и способствуют его движению к кофактору FAD и предполагаемому участку восстановления фумарата. Кроме того, H388 у Ifc₃ участвует в связывании субстрата (Bamford et al., 1999). Донором протона при катализе, как предполагалось, является H521 (аналог H461 метакрилатредуктазы) (Bamford et al., 1999). Однако, по мнению исследователей кристаллической структуры Fcc₃-o (Leys et al., 1999), донором протона служит R426 (аналог R353 метакрилатредуктазы). К такому же выводу пришли и исследователи мутантной формы кристаллов Fcc₃-f (Doherty et al., 2000): донор протона для карбаниона - R427 (аналог R353 метакрилатредуктазы).

Консервативные аминокислоты Mrd (H461, R501 и R353), вероятно, как и в случае фумаратредуктаз шеванелл, стабилизируют переходное состояние во время катализа, обеспечивая делокализацию отрицательного заряда промежуточного карбаниона (Leys et al., 1999). Аргинин, аналогичный R501 Mrd, у фумаратредуктаз взаимодействует двумя боковыми аминогруппами с обоими атомами кислорода первой карбоксильной группы сукцината, ориентируя субстрат параллельно изоаллоксазиновому кольцу (Leys et al., 1999). Один атом кислорода этой карбоксильной группы образует водородную связь с расположенным рядом консервативным глицином (у Mrd это G503). Близкое пространственное расположение двух консервативных аргининов стабилизируется либо карбоксильной группой субстрата, либо (в отсутствие субстрата в активном центре) взаимодействием с консервативным остатком глутаминовой кислоты (у Mrd - E324). Атом азота этого аминокислотного остатка также образует водородную связь со второй карбоксильной группой сукцината (Leys et al., 1999). Можно предположить, что такие же связи образует метакрилат. Двух других консервативных остатков растворимых фумаратредуктаз шеванелл (гистидина и серина/треонина) (Bamford et al., 1999; Leys et al., 1999; Taylor et al., 1999 также взаимодействующих с сукцинатом или фумаратом, у Mrd нет: в положении 311 вместо гистидина находится триптофан, в положении 323 вместо серина или треонина – валин. Поскольку эти аминокислоты также участвуют в связывании субстрата, можно предположить, что их отсутствие связано с субстратной специфичностью Mrd *G. sulfurreducens* AM-1.

На основании структурного наложения Mcc можно предположить, что имидазольные группы двух гемов цитохрома имеют параллельное и двух – перпендикулярное расположение друг относительно друга, аналогично Fcc₃-o (Leys et al., 1999), что

обеспечивает тонкую «настройку» уменьшения потенциала гемов (Taylor et al., 1999).

Пространственное взаимодействие консервативных аминокислот при связывании субстрата. Критичным для молекулярного узнавания FAD является остаток пирофосфата, в то время как кольцо изоаллоксазина участвует в катализе, а кольцо аденина стабилизирует связывание кофактора (Mathews, 1991). Как результат, изоаллоксазин и аденин могут взаимодействовать с различными аминокислотами в разных FAD-связывающих белках, а вот участки связывания пирофосфата гораздо более консервативны (Dym, Eisenberg, 2001).

Можно выделить два консервативных участка: ДСМ (xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)shxhE(D), где x - любая аминокислота, h – гидрофобная аминокислота) и 11-аминокислотный сегмент T(S)xxxxxF(Y)hhGD(E). Оба консервативных участка присутствуют у Mrd (рис. 4, РЕЗУЛЬТАТЫ). Эти участки, широко разнесенные по аминокислотной последовательности, тем не менее расположены в пространственной близости (рис. 6).

ДСМ характерен для всех FAD- и NAD(P)H-зависимых оксидоредуктаз и обычно имеет N-концевое расположение (Eschenbrenner et al., 2001). Как уже говорилось в РЕЗУЛЬТАТАХ, центральная часть ДСМ - GxGxxG - соединяет первую β -складку в укладке Россманна ($\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3$) с первой α -спиралью и образует «зажим» для удержания пирофосфата FAD (Hanks, Hunter, 1995). Роль каждого консервативного остатка глицина хорошо изучена (Wierenga et al., 1986): первый строго консервативный остаток глицина обеспечивает поворот белковой цепи, важный для расположения второго остатка глицина. Второй остаток глицина, благодаря отсутствию боковой цепи, обеспечивает близкий контакт белковой цепи с пирофосфатом, особенно атомами O_{P1} и O_{P2} . Третий остаток глицина расположен в начале альфа-спирали и позволяет близкий контакт α -спирали с β -складкой. Гидрофобные остатки обеспечивают гидрофобные взаимодействия α -спирали с β -складкой. Консервативный отрицательно заряженный остаток глутаминовой или аспарагиновой кислоты (E97 Mrd) образует водородные связи со вторым гидроксилом рибозы остатка аденозина (Wierenga et al., 1986). Последний консервативный остаток глицина и его аминогруппа образует водородную связь с молекулой воды (Bottoms et al., 2002). Молекула воды не только стабилизирует конформацию петли (за счёт образования водородных связей по крайней мере с двумя остатками глицин-богатой петли), но и поддерживает конформацию кофактора (Wierenga et al., 1986).

Другой высококонсервативный участок связывания FAD был впервые идентифицирован у рубредоксинредуктазы (Eggink et al., 1990), и представляет собой 11-аминокислотный сегмент T(S)xxxxxF(Y)hhGD(E). В аминокислотной последовательности Mrd отсутствует первый треонин обсуждаемого участка, остальные же аминокислоты – в наличии (487-491). Консервативные остатки глицина и отрицательно заряженной аминокислоты (в нашем случае – глутаминовой) являются частью петли, связывающей O_{P1} и O_{P2} атомы остатка пирофосфата FAD. Ее расположение видно на рисунке 6.

Заключение. Изложенные в статье результаты получены пространственным наложением аминокислотных последовательностей белков метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens* AM-1 на известные кристаллические структуры растворимых фумаратредуктаз бактерий рода *Shewanella*. Показано, что Mrd и растворимые фумаратредуктазы шеванелл относятся к семейству FAD-связывающих белков GR (глутатионредуктаз). Для Mrd и таких фумаратредуктаз обнаружены наличие укладки Россмана ($\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3$) и консервативных участков связывания пирофосфата: динуклеотидсвязывающий мотив (ДСМ) и усечённый 11-аминокислотный сегмент. Кроме того, полученные сведения указывают на участие в катализе консервативных аминокислот Mrd: H461, R501 и R353. Наиболее вероятным донором протона для карбаниона является аргинин R353.

Белки даже с не очень схожими аминокислотными последовательностями часто обладают большим структурным сходством, обусловленным их функцией (Dym, Eisenberg, 2001). Так, известные трёхмерные структуры 32 разных флавопротеинов и их укладки показывают более высокое сходство, чем можно было бы ожидать, сравнивая их первичные структуры (Dym, Eisenberg, 2001). Выраженное сходство структур фумаратредуктаз *S. frigidimarina* и *S. oneidensis* и метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens* AM-1 свидетельствует об их общих происхождении и физиологической роли (или функциональной нагрузке). Не исключено, что основной функцией этих ферментов может оказаться восстановление природного аналога синтетического метакрилата – акрилата (Arkhipova et al., 2015).

Авторы искренне признательны нс, кбн Института математических проблем биологии РАН, Пуццино, М.С. Романову за помощь в подготовке рисунков.

Список литературы

- Архипова О.В., Акименко В.К. 2005. Ненасыщенные органические кислоты – терминальные акцепторы редуктазных цепей анаэробных бактерий // Микробиология. Т. 74. С. 725-737.
- Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. 2015. Recent origin of the methacrylate redox system in *Geobacter sulfurreducens* AM-1 through horizontal gene transfer // PLoS ONE. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
- Bamford V., Dobbin P.S., Richardson D.J., Hemmings A.M. 1999. Open conformation of a flavocytochrome c_3 fumarate reductase // Nat. Struct. Biol. V. 6. P. 1104-1107.
- Bogachev A.V., Bertsova Y.V., Bloch D.A., Verkhovsky M.I. 2012. Urocyanate reductase: identification of a novel anaerobic pathway in *Shewanella oneidensis* MR-1 // Mol. Microbiol. doi:10.1111/mmi.12067
- Bottoms C.A., Smith, P.E., Tanner J.J. 2002. A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains // Protein Sci. Vol. 11. P. 2125-2137.
- Caccavo F.J.R., Lonergan D.J., Lovley D.R., Davis M., Stolz J.F., McInerney M.J. 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism // Appl. Environ. Microbiol. Vol. 60. P. 3752–3759.
- Dobbin P.S., Butt J.N., Powell A.K., Reid G.A., Richardson D.J. 1999. Characterization of a flavocytochrome that is induced during the anaerobic respiration of Fe^{3+} by *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400 // Biochem. J. Vol. 342. P. 439-448.
- Doherty M.K., Pealing S.L., Miles C.S., Moysey R., Taylor P., Walkinshaw M.D., Reid G.A., Chapman S.K. 2000. Identification of the Active Site Acid/Base Catalyst in a Bacterial Fumarate Reductase: A Kinetic and Crystallographic Study // Biochemistry. Vol. 39. P. 10695-10701.
- Dym O., Eisenberg D. 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins // Protein Sci. Vol. 10. P. 1712-1728. Review.
- Eggink G., Engel H., Vriend G., Terpstra P., Witholt B. 1990. Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints // J. Mol. Biol. Vol. 212. P. 135-142.
- Eschenbrenner M., Chlumsky L.J., Khanna P., Strasser F., Jorns M.S. 2001. Organization of the multiple coenzymes and subunits and role of the covalent flavin link in the complex heterotetrameric sarcosine oxidase // Biochemistry. Vol. 40. P. 5352-5367.
- Gordon E.H.J., Pealing S.L., Chapman S.K., Ward F.B., Reid G.A. 1998. Physiological function and regulation of flavocytochrome c_3 , the soluble fumarate reductase from *Shewanella putrefaciens* NCIMB 400 // Microbiology. Vol. 144. P. 937-945.
- Gross R., Simon J., Kröger A. 2001. Periplasmic methacrylate reductase activity in *Wolinella succinogenes* // Arch. Microbiol. Vol. 176. V. 310-313.
- Hanks S.K., Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase

- superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification // FASEB J. Vol. 9. P. 576-596.
- Hess V., González J.M., Parthasarathy A., Buckel W., Müller V. 2013. Caffeate respiration in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*: a coenzyme A loop saves energy for caffeate activation // Appl. Environ. Microbiol. Vol. 79. P. 1942-1947.
- Hägerhäll C. 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1320, P. 107-141.
- Iverson T. 2013. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1827, P. 648-657.
- Kröger A., Biel S., Simon J., Gross R., Uden G., Lancaster C.R.D. 2002. Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1553. P. 23-38.
- Lays D., Tsapin A.S., Nealson K.H., Meyer T.E., Cusanovich M.A., Van Beeumen J.J. 1999. Structure and mechanism of the flavocytochrome *c* fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR-1 // Nat. Struct. Biol. Vol. 6. P. 1113-1117.
- Li T., Bonkovsky H.L., Guo J. 2011. Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction // BMC Struct. Biol. Vol. 11. doi:10.1186/1472-6807-11-13
- Logan B. 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells // Nature Rev. Microbiol. V. 7. P. 375-383. doi:10.1038/nrmicro 2113
- Lovley D.R. 2010. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes // Environ. Microbiol. Rep. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00211.x
- Maier T.M., Myers J.M., Myers C.R. 2003. Identification of the gene encoding the sole physiological fumarate reductase in *Shewanella oneidensis* MR-1 // J. Basic Microbiol. Vol. 43. P. 312-327.
- Mathews F.S. 1991. New flavoenzymes // Curr. Opin. Struct. Biol. V. 1. P. 954-967.
- Methé B.A., Nelson K.E., Eisen J.A., Paulsen I.T., Nelson W. et al. 2003. Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments // Science. Vol. 302. P. 1967-1969.
- Mikoulinskaia (Arkipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. 1999. Cytochrome *c*-dependent methacrylate reductase from *Geobacter sulfurreducens* AM-1 // Eur. J. Biochem. Vol. 263. P. 346-352.
- Rossmann M.G., Moras D., Olsen K.W. 1974. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein // Nature. V. 250. P. 194-199.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. Vol. 30. P. 2725-2729.
- Taylor P., Pealing S.L., Reid G.A., Chapman S.K., Walkinshaw M.D. 1999. Structural and mechanistic mapping of a unique fumarate reductase // Nat. Struct. Biol. Vol. 6. P. 1108-1112.
- Wierenga R.K., Terpstra P., Hol W.G. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint // J. Mol. Biol. Vol. 187. P. 101-107.

SPATIAL MODEL OF ANAEROBIC METHACRYLATE REDUCTASE SYSTEM

O.V. Arkhipova¹, O.Yu. Troshina¹, G.V. Mikoulskaia²

¹Scryabin's Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms
of RAS, Pushchino

²Branch of Shemyakin and Ovchinnikov's Institute of Bioorganic Chemistry,
Pushchino

The high structural similarities of methacrylate reductase (Mrd) and cytochrome *c* (Mcc) (of the methacrylate redox system) from *Geobacter sulfurreducens* AM-1 with the soluble fumarate reductases of *Shewanella* were revealed by the computer modelling. Mrd repeats two C-terminal catalytic domains of these fumarate reductases – FAD-binding and clamp domains – both sequence and structure. Mcc is similar to small N-terminal heme-containing domain of the periplasmic fumarate reductases of *Shewanella*. The assumption of spatial interaction of the conservative amino acids from Mrd, involved in catalysis and substrate binding, is discussed.

Keywords: *methacrylate reductase (Mrd), cytochrome c (Mcc), flavocytochromes c, periplasmic fumarate reductase, Geobacter sulfurreducens AM-1, Shewanella.*

Об авторах:

АРХИПОВА Оксана Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, ФАНО Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИБФМ РАН, 142290, проспект Науки, д.5, г. Пущино Московской области, e-mail: aroksan@gmail.com.

ТРОШИНА Ольга Юрьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории анаэробных микроорганизмов, ФАНО Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИБФМ РАН, 142290, проспект Науки, д.5, г. Пущино Московской области, e-mail: oltro67@yandex.ru.

МИКУЛИНСКАЯ Галина Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник группы молекулярной биотехнологии, ФАНО Федеральное государственное бюджетное учреждение науки РАН, 142290, проспект Науки, д.6, г. Пущино Московской области, e-mail: mikulinskaya@bibch.ru.

Архипова О.В. Пространственная модель анаэробной метакрилатредуктазной системы / О.В. Архипова, О.Ю. Трошина, Г.В. Микюлинская // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2017. № 2. С. 306-323.