

Федеральное государственное унитарное предприятие
Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии им. А.Н. Баха
Российской академии наук

На правах рукописи

Мордкович Надежда Николаевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНАЭРОБНОГО ДЫХАНИЯ
ЭЛЕКТРОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *SHEWANELLA ONEIDENSIS* MR-1 И
СТРУКТУРЫ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ НЕЕ

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Вейко В.П.

Москва 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	6
1. Введение.....	8
2. Обзор литературы.....	15
2. Особенности метаболизма, анаэробного дыхания и перспективы практического применения бактерии <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1.....	15
2.1. Общие сведения о <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	15
2.2. Метаболизм углерода у <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	18
2.2.1. Особенности гликолиза у <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	20
2.2.2. Утилизация N-ацетилглюкозамина.....	22
2.2.3. Утилизация лактата и пирувата у <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	25
2.3. Особенности анаэробного дыхания <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	28
2.3.1. Первичные акцепторы электронов внешней и внутренней стороны ЦМ.....	30
2.3.1.1. Тетрагемовый цитохром CymA.....	30
2.3.2. Периплазматические редуктазы.....	33
2.3.2.1. Фумаратредуктаза FссA.....	33
2.3.2.2. Периплазматическая нитратредуктаза NapAB.....	34
2.3.2.3. Периплазматическая нитритредуктаза NrfA.....	35
2.3.3. Периплазматические переносчики электронов.....	37
2.3.3.1. Тетрагемовый цитохром STC.....	37
2.3.3.2. Десятигемовый периплазматический цитохром MtrA.....	38
2.3.3.3. Десятигемовый периплазматический цитохром DmsE.....	39
2.3.4. Цитохромные комплексы, ассоциированные с внешней клеточной мембраной.....	40
2.3.4.1. MtrBC-OmcA.....	40

2.3.4.2. DmsAB.....	42
2.3.5. СумА-независимые ветви ЭТЦ.....	43
2.3.5.1. Восстановление ТМАО.....	44
2.3.5.2. Восстановление тиосульфата и сульфита.....	45
2.3.6. Механизмы передачи электронов при анаэробном дыхании.....	47
2.3.6.1. Прямая передача электрона.....	48
2.3.6.2. Перенос электронов с участием молекул-переносчиков.....	49
2.5. Использование <i>S. oneidensis</i> MR-1 в МТЭ.....	53
2.6. Применение <i>S. oneidensis</i> MR-1 в качестве штамма-реципиента для гетерологичной и гомологичной экспрессии.....	59
3. Материалы и методы.....	68
3.1. Материалы.....	68
3.2. Методы.....	69
3.3. Базы данных и программы.....	75
4. Результаты и обсуждение.....	77
4.1. Конструирование рекомбинантного штамма <i>S. oneidensis</i> MR-1, характеризующегося повышенной редуцирующей активностью.....	77
4.1.1. Клонирование и исследование гетерологичной экспрессии гена NAD ⁺ -зависимой формиатдегидрогеназы из метилотрофной бактерии <i>Moraxella</i> sp. в клетках <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	82
4.1.2. Исследование изменения интенсивности анаэробного дыхания при гетерологичной экспрессии NAD ⁺ -зависимой формиатдегидрогеназы в клетках <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	87
4.1.3. Культивирование штамма-трансформанта <i>S. oneidensis</i> MR-1/pERFDH в МТЭ.....	89

4.2. Исследование особенностей регуляции экспрессии под контролем промотер-операторной области гена <i>udp</i> <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	92
4.3. Изучение свойств и структурных особенностей уридинфосфорилазы из электрогенной бактерии <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	99
4.3.1. Клонирование гена уридинфосфорилазы из <i>S. oneidensis</i> MR-1, гомологичная и гетерологичная экспрессия гена <i>udp</i>	102
4.3.2. Структурно-функциональная характеристика уридинфосфорилазы из <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	107
4.3.2.1. Выделение и очистка рекомбинантной SUDP.....	108
4.3.2.2. Масс-спектрометрический (MALDI) анализ выделенного белка SUDP.....	110
4.3.2.3. Анализ четвертичной структуры SUDP (гель-фильтрация).....	112
4.3.2.4. Определение температурного оптимума SUDP.....	114
4.3.2.5. Определение рН-оптимума и изоэлектрической точки SUDP.....	116
4.3.2.7.Термическая денатурация уридинфосфорилазы из <i>S. oneidensis</i> MR-119 (SUDP).....	119
4.3.2.8. Исследование структуры SUDP методом PCA.....	120
4.4. Получение и структурно-функциональная характеристика мутантной формы уридинфосфорилазы из <i>S. oneidensis</i> MR-1 (C212S).....	132
4.4.1. Конструирование мутантной формы C212S, выделение и очистка белка. 132	
4.4.2. Масс-спектрометрический (MALDI) анализ выделенного мутантного белка SUDP.....	134
4.4.3. Анализ четвертичной структуры мутантной формы SUDP (гель-фильтрация).....	136
4.4.4. Исследование температурного и рН-оптимумов мутантной формы фермента (C212S) и его изоэлектрической точки.....	136

4.4.5. Сравнительный анализ термической устойчивости SUDP ее мутантной формы (C212S).....	138
4.4.6. Исследование структуры уридинфосфорилаз с помощью кругового дихроизма.....	139
4.4.7. Определение значения K_m по фосфату-иону и уридину для мутантной формы C212S.....	141
4.5. Влияние неорганических ионов на формирование активной формы исходной SUDP и ее мутантной формы (C212S).....	143
4.6. Исследование структуры мутантной формы SUDP (C212S) методом PCA.....	146
5. Выводы.....	153
6. Список литературы.....	154

Список сокращений

Ap	ампициллин
EUDP	уридинфосфорилаза из <i>Escherichia coli</i> MG1655
FAD	флавинадениндинуклеотид
Km	канамицин
LB	среда Лурия-Бертани
NAD ⁺ /NADH	никотинамидадениндинуклеотид, окисленный/восстановленный
ORF	открытая рамка считывания
PEP	фосфоенолпируват
PTS	фосфотрансферазная система
SUDP	уридинфосфорилаза из <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1
StUDP	уридинфосфорилаза из <i>Salmonella typhimurium</i>
TCA	цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)
Tris	трисгидроксиметиламинометан
TSB	триптон соевый бульон (Tryptic Soy Broth)
Q	хиноны
MQ	менахиноны
а.о.	аминокислотный остаток
п.н.	пара нуклеотидных остатков
кДа	килодальтон
АТФ	аденозинтрифосфат
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМСП	диметилсульфониопропионат
КЖ	культуральная жидкость
Km	константа Михаэлиса
МТЭ	микробный топливный элемент
ПААГ	полиакриламидный гель
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РСА	рентгеноструктурный анализ
ТМАО	триметиламиноксид

ТФУ	трифторуксусная кислота
ФДГ	формиатдегидрогеназа
ЦМ	цитоплазматическая мембрана
ПМ	периплазматическая мембрана
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭТЦ	электрон-транспортная цепь

В работе использованы стандартные однобуквенные и трехбуквенные обозначения аминокислот (аминокислотных остатков) и однобуквенные обозначения нуклеотидов.

Написание названий эндонуклеаз рестрикции приводится согласно работе [178]

1. Введение

Актуальность темы исследования

Способность определенных групп бактерий к восстановлению металлов в процессе роста и анаэробного дыхания делает их все более актуальными для использования как в прикладных исследованиях, связанных с получением электричества, очистке сточных вод, так и в качестве объектов для изучения механизма анаэробного дыхания и элементов его регуляции [16, 78]. Одной из наиболее хорошо изученных бактерий данной группы к настоящему времени является *Shewanella oneidensis* MR-1. Данная γ -протеобактерия, выделенная из донных отложений пресноводного озера Онейда (США), способна к восстановлению металлов из оксидов при росте в анаэробных условиях [144]. Помимо оксидов металлов бактерия *S. oneidensis* MR-1 также может использовать широкий спектр конечных акцепторов электронов в процессе анаэробного роста, что позволяет ей существовать в достаточно быстро изменяющихся и не всегда благоприятных условиях окружающей среды [78].

Одним из наиболее важных аспектов, привлекающим исследователей к изучению данной бактерии, является ее способность к использованию в качестве акцептора электронов нерастворимые оксиды металлов. Эта особенность позволяет культивировать *S. oneidensis* MR-1 в микробных топливных элементах (МТЭ) для генерации электричества. Увеличение продуктивности МТЭ за счет модификации микроорганизма представляет одну из актуальных задач настоящего времени. Получение направленных делеционных, спонтанных транспозонных, ненаправленных (химических, полученных под воздействием мутагенов) мутантных штаммов *S. oneidensis* MR-1 может привести к существенному повышению продуктивности МТЭ [10, 45, 48, 95, 109, 213]. Однако, к настоящему времени, остается недостаточно изученной возможность увеличения продуктивности МТЭ в результате изменения экспрессии генов, вовлеченных в процесс анаэробного дыхания.

Как было установлено экспериментально, виды рода *Shewanella* способны к утилизации широкого спектра источников углерода, что открывает возможность для изучения, как путей метаболизма углерода, так и механизмов их регуляции [78, 179, 196]. Одним из достаточно важных отличий вида *S. oneidensis* MR-1 от других представителей данного рода, является полная неспособность к утилизации глюкозы в качестве источника углерода [179]. Однако, в настоящее время независимыми группами исследователей активно предпринимаются попытки по созданию штаммов *S. oneidensis* MR-1, способных к утилизации глюкозы [56, 95].

Установленная в 2002 году [93] полная последовательность генома *S. oneidensis* MR-1 с последующей аннотацией позволяет проводить компьютерный анализ генома данной бактерии и его сравнение с геномами модельных видов, например, *Escherichia coli*. В ходе сравнения геномов бактерий *E. coli* и *S. oneidensis* MR-1 в геноме последней было выявлено значительно большее число генов, кодирующих цитохромы *c* типа. Также было определено наличие большого числа мультигеновых цитохромов на внешней поверхности периплазматической мембраны клеток и в периплазматической фракции *S. oneidensis* MR-1 [145, 152]. Приведенные факты предполагают наличие хорошо развитой системы пост-трансляционной модификации белков, в частности, системы созревания цитохромов: вывод апо-белка в периплазматическое пространство и координации необходимого числа генов. Кроме того, была установлена возможность использования плазмидных векторов, разработанных для *E. coli*, при трансформации клеток *S. oneidensis* MR-1. Все это предопределяет выбор бактерии *S. oneidensis* MR-1 в качестве штамма-реципиента для гетерологичной экспрессии мультигеновых цитохромов. К настоящему времени опубликованы данные [59, 83, 126, 159-161, 199, 200, 203, 214, 220, 239] по успешной гетерологичной экспрессии ряда мультигеновых цитохромов в клетках *S. oneidensis* MR-1. Однако, несмотря на полученные положительные результаты, авторы в своих работах акцентируют внимание на различных особенностях и сложностях, возникающих в ходе гетерологичной, а также гомологичной

экспрессии генов мультигеновых цитохромов в клетках *S. oneidensis* MR-1 [203, 211, 220, 239]. Дальнейшее детальное изучение различных аспектов жизнедеятельности данной бактерии во многом будет способствовать выяснению особенностей функционирования генома этого микроорганизма и расширению биотехнологического потенциала *S. oneidensis* MR-1.

Вторым аспектом исследования, проведенного в данной работе, являлось выяснение строения уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1. Данный фермент находится в центре внимания многих исследователей по двум причинам: первая из них заключается в роли уридинфосфорилазы в функционировании клеток злокачественных новообразований млекопитающих. Уридинфосфорилаза является одним из ключевых ферментов, участвующих в метаболизме противоопухолевых соединений нуклеозидной природы, широко применяемых в практической медицине. В литературе показано, что ингибирование данного фермента позволяет существенно уменьшить терапевтическую дозу противоопухолевых соединений и, тем самым, понизить системную токсическую нагрузку на организм пациента. Вторая причина интереса исследователей к уридинфосфорилазе обусловлена возможностью использования данного фермента в качестве биокатализатора при получении новых соединений нуклеозидной природы, обладающих противораковой, противопаразитарной и противовирусной активностями. В настоящее время широкий спектр таких соединений получают многостадийным химическим синтезом с участием большого количества токсических реагентов, утилизация которых представляет собой отдельную задачу. Использование для этой цели химико-ферментативного подхода к синтезу указанных терапевтических соединений переводит этот процесс в разряд современной биоиндустрии, полностью отвечающей принципам «зеленой химии».

В свою очередь, использование химико-ферментативного подхода к получению новых соединений нуклеозидной природы выдвигает определенные требования к ферменту в части его термостабильности, рН-чувствительности, специфичности по отношению к субстратам различной природы и т.д. Эти данные

могут быть получены только на основе изучения новых типов уридинфосфорилаз, определения их структурно-функциональных особенностей, получения сравнительных характеристик свойств этого фермента из различных источников.

Следует отметить, что данное направление исследования носит не только практический, но и глубоко фундаментальный характер, позволяющий не только прогнозировать изменение свойств данного фермента в зависимости от целенаправленно введенной в его полипептидную цепь мутации, но и, в конечном итоге, построить молекулярно-динамическую модель функционирования этого класса белков (нуклеозидфосфорилаз).

Цели и задачи исследования

Целью данной диссертационной работы было изучение влияния взаимосвязи метаболизма и интенсивности анаэробного дыхания у бактерии *S. oneidensis* MR-1, изучение элементов механизма регуляции гена уридинфосфорилазы (*udp*) из *S. oneidensis* MR-1, изучение физико-химических свойств белка SUDP и структуры его активного центра.

В ходе выполнения работы решались следующие задачи:

- 1) Исследование влияния гетерологичной экспрессии гена NAD^+ -зависимой формиатдегидрогеназы из *Moraxella* sp. в клетках электрогенной бактерии *S. oneidensis* MR-1 на изменение интенсивности анаэробного дыхания у штаммов-трансформантов, в том числе при культивировании в МТЭ. Исследование скорости конверсии конечного акцептора электронов.
- 2) Изучение функциональной активности промотер-операторной области гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 в клетках *E. coli*.
- 3) Клонирование гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, создание рекомбинантного штамма-продуцента этого фермента.
- 4) Определение физико-химических характеристик рекомбинантного белка SUDP.

- 5) Определение аминокислотных остатков, формирующих активный центр уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1.
- 6) Конструирование штамма-продуцента рекомбинантной мутантной формы SUDP (синонимическая замена C212S) и наработка мутантного фермента. Изучение физико-химических свойств полученного белка.
- 7) Сравнительная характеристика структуры исходного и мутантного белков (РСА) в части связывания неорганического фосфата.

Научная новизна

В ходе выполнения данной работы получен штамм-трансформант *S. oneidensis* MR-1, характеризующийся ускоренным анаэробным дыханием и повышенной генерацией плотности тока при культивировании в МТЭ. Показано изменение баланса NAD^+/NADH в клетке бактерии при гетерологичной экспрессии NAD^+ -формиатдегидрогеназы и, как следствие, увеличение интенсивности анаэробного дыхания. Впервые показана функциональная активность промотер-операторной области гена *udp* из *E. coli* при гетерологичной экспрессии в клетках штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1. Впервые клонирован ген уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, проведена его гетерологичная экспрессия в клетках *E. coli*. Установлено, что промотер-операторная область гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 не содержит сайт связывания с белком-репрессором CytR и, как следствие, не подвергается регуляции данным белком-репрессором в клетках *E. coli*. На основе клеток *E. coli* получен рекомбинантный штамм-продуцент белка SUDP (уридинфосфорилаза из *S. oneidensis* MR-1). Фермент выделен и очищен, получены его основные физико-химические характеристики. Получен кристалл данного белка и проведен РСА его пространственной организации. Определены аминокислотные остатки, принимающие участие в формировании активного центра фермента. Сконструирована мутантная форма SUDP (C212S) и получен рекомбинантный штамм-продуцент этого фермента. Мутантная форма белка выделена в гомогенном состоянии и охарактеризована. На основании сравнения полученных

характеристик исходной и мутантной форм белка SUDP высказано предположение о ключевой роли петлевых участков 88 – 93 и 212 – 219 а.о. в формировании и поддержании ферментом сайта связывания иона неорганического фосфата (формирование «открытой» и «закрытой» конформаций белка), а также о механизме стабилизации активной структуры фермента ионами калия. Полученные экспериментальные результаты позволяют детализировать особенности третичной и четвертичной структур белка, ведущие к пониманию фундаментального процесса – особенностей молекулярного механизма функционирования ферментов данного класса (нуклеозидфосфорилаз).

Практическая значимость

Полученные экспериментальные результаты по влиянию изменения баланса NAD^+/NADH на интенсивность анаэробного дыхания позволяют предложить дальнейшие пути по модификации штамма *S. oneidensis* MR-1 для увеличения продуктивности МТЭ. Выявленные особенности регуляции гена *udp* *S. oneidensis* MR-1 создают новые предпосылки для конструирования экспрессионных векторов на основе CytR-независимого промотера. Уточнение структуры уридинфосфорилазы позволит проводить более точное целенаправленное моделирование и последующий химический синтез специфических ингибиторов фермента, используемых в качестве противоопухолевых, противовирусных и противопаразитарных препаратов. Кроме того, на основании уточненных данных по третичной и четвертичной структурах SUDP, возможно получение фермента с целенаправленно измененными (улучшенными) физико-химическими параметрами (термостабильность, pH-оптимум, субстратная специфичность) и создания высокотехнологичных процессов химико-ферментативного синтеза широкого спектра препаратов нуклеозидной природы для практической медицины.

В связи с тем, что в настоящее время свойства бактерии *S. oneidensis* MR-1 интенсивно изучаются и полученные научные данные во многом требуют

дополнительной детализации, Литературный обзор настоящей диссертационной работы в бóльшей степени ограничивается анализу особенностей метаболизма и анаэробного дыхания бактерии *S. oneidensis* MR-1. Кроме того, в нем рассмотрены перспективы ее практического применения в биотехнологических процессах, направленных на получение рекомбинантных белков, в частности, нуждающихся в пост-трансляционных модификациях.

Положения, выносимые на защиту

1. Показано влияние изменения внутриклеточного баланса $NAD^+/NADH$ на интенсивность анаэробного дыхания у бактерии *S. oneidensis* MR-1.
2. Установлено отсутствие репрессии белком CytR промотер-операторной области гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1.
3. На основании физико-химических и кинетических характеристик, а также данных РСА дикой и мутантной формы C212S уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, выявлена роль остатка цистеина 212 в формировании устойчивого связывания неорганического фосфат-иона в активном центре фермента. Высказано предположение о ключевой роли петлевых участков 88 – 93 и 212 – 219 а.о. в функционировании уридинфосфорилаз.

2. Обзор литературы

2. Особенности метаболизма, анаэробного дыхания и перспективы практического применения бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1

2.1. Общие сведения о *S. oneidensis* MR-1

Первым представителем, отнесенным к роду *Shewanella*, была бактерия *Achromobacter putrefaciens*, выделенная в 30-х годах XX века [70] из испорченных молочных продуктов. Этот и многие другие виды из рода *Pseudomonas* были позже переопределены и отнесены к роду *Shewanella* [117, 198]. В 1985 году, на основании сравнения последовательностей 16s РНК различных видов семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*, из семейства *Vibrionaceae* был выделен род *Shewanella*. Свое название этот род получил в честь английского микробиолога Джеймса Шевана (James Shewan) [132].

К настоящему времени род *Shewanella* включает значительное количество видов, выделенных из широкого круга источников: донные отложения рек и озер (Миссисипи, Амазонка, озера Онейда и Мичиган), морская вода разной глубины (от поверхностных слоев Черного, Балтийского, Северного и Средиземного морей до глубины в 11 тысяч метров (Марианская впадина)) [78]. Кроме того, бактерии рода *Shewanella* обнаружены также в термальных океанских источниках, водах Арктики и Антарктики, отложениях в нефтяных трубопроводах, испорченной рыбе и морепродуктах. Большая часть видов рода *Shewanella* входит в группу металл-редуцирующих диссимилирующих бактерий, оказывающих значительное влияние на геохимические процессы за счет восстановления металлов в процессе анаэробного дыхания.

Бактерия *Shewanella oneidensis* MR-1 была впервые обнаружена в 1988 году в донных отложениях озера Онейда (США) и охарактеризована по способности к анаэробному дыханию и сопряженному с этим восстановлению Mn(IV) до Mn(II) [144]. Она относится к группе γ -протеобактерий, порядок *Alteromonadales*, семейство *Shewanellaceae*, однако, более детальное таксономическое положение *S. oneidensis* MR-1 неоднократно пересматривалось. Первоначально она была

выделена как *Alteromonas putrefaciens*, позднее, перенесена в род *Shewanella* и, впоследствии, выделена в новый вид *S. oneidensis* MR-1 [225]. Первым представителем рода *Shewanella*, геном которого был секвенирован в 2002 году, стала *S. oneidensis* MR-1 [93]. Впоследствии были секвенированы геномы еще 29 видов рода *Shewanella*.

Геном *S. oneidensis* MR-1 (GenBank AE014299) содержит кольцевую хромосому и мегаплазмиду размером 4.9 м.п.н. и 161 т.п.н., соответственно.

В результате аннотации генома *S. oneidensis* MR-1 была введена единая номенклатура генов: все аннотированные ORF были обозначены как SO_xxxx с присвоением четырехзначного порядкового номера данного локуса. В случае наличия трехбуквенного обозначения гена-ортолога, данное название указывается дополнительно в описании локуса в базах данных (GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank или KEGG www.genome.jp/kegg).

Первоначально в геноме *S. oneidensis* MR-1 было аннотировано 4758 ORF в хромосоме и 173 в плазмиде. Было показано, что содержание Г+Ц составляет 46% для хромосомы и 43.7% для плазмиды, а средний размер гена в хромосоме и в составе плазмиды – 893 и 742 п.н., соответственно [93]. Мегаплазида, содержащаяся в клетках *S. oneidensis* MR-1 относится к итеронному типу: из 173 ORF, аннотированных в плазмиде, 59 предположительно кодируют транспозазы, часть из которых, содержит «фреймшифт» мутации. Из всех аннотированных ORF для 63% определена функциональная категория, около 23% ORF на плазмиде уникальны для данного вида, 15.6% ORF кодируют предположительно консервативные среди бактерий белки [93].

В результате последующей реаннотации генома был выявлен 51 новый ген и дополнительно определена функциональная категория для 97 генов [68].

В геноме и плазмиде *S. oneidensis* MR-1 было обнаружено значительное количество мобильных элементов IS (41 тип), а также три новых типа мобильных элемента (короткие инвертированные повторы). Сравнение секвенированных геномов разных видов рода *Shewanella* выявило в геноме *S. oneidensis* MR-1 наличие 209 мутантных генов, содержащих фреймшифт мутации, делеции и

инсерции, а так же значительное число сайтов встраивания мобильных элементов, что может приводить к потере функциональной активности гена и/или соответствующего полипептида. Это может также определять отмеченную в литературе высокую пластичность генома и способность данного микроорганизма к приспособлению в сильно изменяющихся условиях его обитания [181]. Бактерия *S. oneidensis* MR-1 имеет устойчивость к ампициллину, за счет наличия нескольких генов, кодирующих белки семейства металло- β -лактамаз, в основном хромосомной локализации, но также выявлен 1 ген устойчивости к ампициллину плазмидной локализации [93, 169].

S. oneidensis MR-1 является факультативным анаэробом с достаточно широким спектром акцепторов электронов (нитрат, нитрит, Cr(VI), U(IV), Fe(III), Mn(IV), фумарат, триметиламин, диметилсульфоксид, сульфит, тиосульфат) [88, 143, 155]. Способность *S. oneidensis* MR-1 к восстановлению ионов металлов из растворимых форм и перевод их в нерастворимые формы [219], а также перевод нерастворимых оксидов металлов в растворимые формы [144, 212], дает возможность широкого применения этой бактерии для очистки сточных вод и почв от загрязнений. Кроме того, была показана возможность использования *S. oneidensis* MR-1 для очистки почвы от загрязнения органическими соединениями, такими как азокрасители или гексагидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазин (RDX), который входит в состав взрывчатых веществ [164].

Сравнительное видовое изучение рода *Shewanella* выявило некоторые существенные различия между видом *S. oneidensis* MR-1 и другими представителями этого рода. Так, например, исследование свойств полисахаридной капсулы показало значительно более низкий уровень плотности заряда капсулы у *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях, однако высокий уровень адгезии клеток к гематиту при этом сохранялся [106]. Это явление не характерно для других видов рода *Shewanella* [106]. Анализ липополисахаридного (LPS) состава капсулы у *S. oneidensis* MR-1 выявил наличие структурной единицы нового типа, формирующей связь между липидной и полисахаридной частью, следующей структуры: 8-амино-3,8-дидеокси-D-manno-октулозоновая кислота (8-

аминокдо) [226]. Также необычным свойством капсулы LPS *S. oneidensis* MR-1 является полное отсутствие полисахаридов O-цепи, что может влиять на адгезию бактериальных клеток к поверхности минералов. Таким образом, выявленные различия в структуре и физико-химических свойствах полисахаридной капсулы *S. oneidensis* MR-1, по-видимому, могут определять отличия между данной бактерией и другими представителями этого рода [226].

2.2. Метаболизм углерода у *S. oneidensis* MR-1

В процессе роста виды рода *Shewanella* способны утилизировать широкий спектр источников углерода: лактат, ацетат, глюкоза, пируват, N-ацетилглюкозамин, некоторые аминокислоты, азотистые основания [75, 78, 165, 179]. Такой широкий спектр используемых источников углерода объясняется значительным различием не только в типе местообитаний бактерий этого рода, но и, возможно, является механизмом приспособления к изменяющимся условиям самого местообитания.

Изучение особенностей метаболизма *S. oneidensis* MR-1, позволяет выявить различия в ранее описанных путях, как в ферментативных системах и вовлечении новых генов в контроль существующих метаболических путей, так и обнаружить новые метаболические пути.

Сравнение механизмов регуляции метаболических путей модельного вида *E. coli* и *S. oneidensis* MR-1 выявило такие значительные различия, как использование негомологичных белков-регуляторов или же, наоборот, регуляцию гомологичным белком другого пути [78]. Примером таких выявленных различий могут быть белки-регуляторы FurR и HexR. В клетках *E. coli* белок FurR осуществляет не только регуляцию пути утилизации фруктозы, но и является глобальным регулятором всего центрального метаболизма, тогда как в геноме *S. oneidensis* MR-1 ортологичный ген не обнаружен [78]. В свою очередь, белок HexR, осуществляющий регуляцию только одного гена (*zwf*) у *E. coli*, присутствует в виде ортолога у *S. oneidensis* MR-1 и играет роль глобального регулятора всего центрального метаболизма клетки [78, 120].

Кроме того, следует отметить, что в условиях анаэробного роста в клеточном лизате бактерии *S. oneidensis* MR-1 было обнаружено значительное снижение ферментативной активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы, что приводит к разрыву цикла Кребса (ТСА). При этом в аэробных условиях уровень активности ферментов, входящих в цикл Кребса, был достаточно высокий [194]. Выявленная разомкнутость цикла Кребса у *S. oneidensis* MR-1 полностью согласуется с данными, полученными для других бактерий, например, при культивировании клеток *E. coli* в анаэробных условиях [232]. Дополнительное изучение центрального метаболизма у *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях с использованием изотопа ^{13}C подтвердило разомкнутость цикла Кребса в анаэробных условиях в присутствии фумарата в качестве акцептора электронов. Однако, авторами [217] также были получены данные, свидетельствующие о полноценном функционировании цикла Кребса в анаэробных условиях, но в присутствии ТМАО в качестве акцептора электронов [217]. Такое значительное различие, обусловленное типом акцептора электрона в условиях анаэробного дыхания, по мнению авторов, по-видимому, может определяться использованием убихинонов (вместо менахинонов) в качестве переносчиков электронов при дыхании в присутствии ТМАО. Использование другого типа хинонов при анаэробном дыхании в присутствии ТМАО, возможно, приводит к изменению регуляции ТСА с анаэробного типа на аэробный [217]. Следует также отметить наличие у *S. oneidensis* MR-1 нетипичной фумаратредуктазы, осуществляющей восстановление фумарата в сукцинат в периплазматическом пространстве при анаэробном культивировании клеток. Любопытной особенностью, присущей *S. oneidensis* MR-1, является также тот факт, что сукцинат, получающийся в ходе восстановления фумарата, секретировается в окружающую среду [217], тогда как у других металл-редуцирующих бактерий, таких как *Geobacter*, происходит обратное включение сукцината в цикл Кребса [52].

Обнаруженные различия в структуре метаболических путей и механизмах их регуляции у *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli* во многом определяют интерес

исследователей к детальному изучению особенностей метаболизма у *S. oneidensis* MR-1 в различных условиях культивирования.

2.2.1. Особенности гликолиза у *S. oneidensis* MR-1

Одним из важных составляющих центрального метаболизма бактерий является гликолиз – путь утилизации глюкозы. На рисунке 1 представлена общая схема центрального метаболизма *S. oneidensis* MR-1. Сравнение аннотированных геномов видов рода *Shewanella* выявило у всех проанализированных видов отсутствие гена *pfk*, кодирующего фосфофруктокиназу, что подтвердило обнаруженное ранее отсутствие активности фосфофруктокиназы в клеточном лизате *S. oneidensis* MR-1 [194, 196]. Отсутствие этого фермента приводит к блокированию прохождения дальнейших реакций гликолитического окисления глюкозы и, вследствие этого, недостаточному уровню накопления фосфоенолпирувата (PEP). Недостаток PEP, в свою очередь, приводит к блокированию PEP-зависимого транспорта в клетку через PTS систему, тогда как значительная часть активного транспорта сахаров у протеобактерий осуществляется именно через эту систему [206].

Ранее у мутантных по гену *pfkA* штаммов *E. coli* также было обнаружено значительное снижение скорости роста на глюкозе в качестве источника углерода именно за счет прекращения транспорта глюкозы в клетку через PTS систему [129, 180]. Наряду с этим, анализ генома *S. oneidensis* MR-1 показал значительное снижение как количества (дозы) генов PTS системы транспорта глюкозы, так и полное отсутствие генов транспорта некоторых сахаров, по сравнению с *E. coli* [196]. Этот факт объясняет преимущественное использование триоз по сравнению с гексозами видами рода *Shewanella*. Наличие у видов *Shewanella* блока в гликолизе приводит к замене основного пути утилизации глюкозы и важную роль начинает играть путь Энтнера-Дудорова: транспорт глюкозы в клетку осуществляется только через PEP-независимые транспортеры, такие как GalP [179].

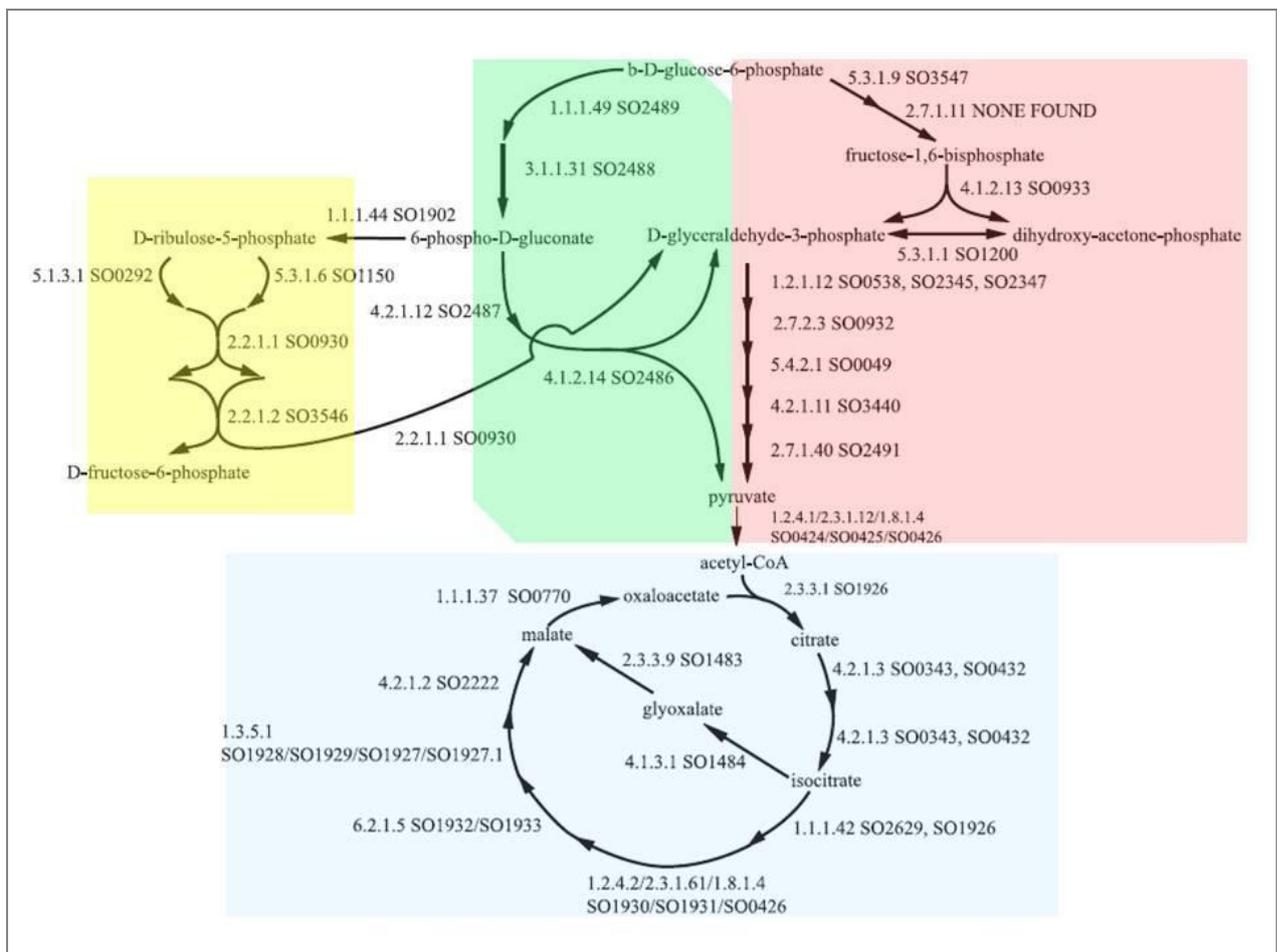


Рисунок 1. Схема центрального метаболизма *S. oneidensis* MR-1. Цветом выделены последовательности ферментативных реакций, относящиеся к одному метаболическому блоку. Желтым цветом обозначен пентозофосфатный путь, зеленым – путь Энтнера-Дудорова, красным – гликолиз, синим – цикл Кребса. Номера ферментов, осуществляющих реакции, приведены в соответствии с международной номенклатурой (EC). Номера локусов *S. oneidensis* MR-1, кодирующих соответствующие ферменты, приведены по стандартной номенклатуре SO_; в случае субъединичного состава фермента, локусы указаны через дробь, изоимзы указаны через запятую. Иллюстрация из работы [196].

Культивирование ряда видов рода *Shewanella* на глюкозе в качестве единственного источника углерода выявило два вида не способных к утилизации глюкозы: *S. oneidensis* MR-1 и *S. frigidimarina* штаммы CN32 и W3181 [179]. В результате дальнейшего анализа генома *S. oneidensis* MR-1 был обнаружен сдвиг рамки считывания в локусе, контролирующем соответствующий транспортер

GlcP [179]. Таким образом, сочетание двух факторов: мутации, ведущей к отсутствию пассивного транспорта (GlcP), и заблокированным PTS транспортом, вследствие недостаточного уровня PEP, что приводит к полному прекращению транспорта глюкозы в клетку. Отсутствие транспорта глюкозы, в свою очередь, приводит к невозможности использования глюкозы в качестве источника углерода. Однако, несмотря на это явление, ферментативная система окисления глюкозы у *S. oneidensis* MR-1 сохраняется без изменений. Для бактерии *S. oneidensis* MR-1 была также установлена способность к использованию в качестве источника углерода N-ацетилглюкозамина [179].

2.2.2. Утилизация N-ацетилглюкозамина

Особенности местообитания видов *Shewanella* (морские и пресноводные донные отложения) определяют ее способность к утилизации N-ацетилглюкозамина – продукта расщепления хитина. Способность к утилизации хитина, входящего в состав клеточной стенки грибов, оболочек членистоногих и других морских и пресноводных беспозвоночных, хорошо описана для ряда морских бактерий порядков *Vibrionales* и *Alteromonadales*. Процесс катаболизма хитина у этих бактерий происходит в несколько стадий, которые наиболее хорошо изучены у *Vibrio cholerae* [123, 139]. На рисунке 2 приведена сравнительная схема утилизации N-ацетилглюкозамина у ряда γ -протеобактерий: *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* и *V. cholerae* [237].

На первой стадии происходит гидролиз хитина до более коротких фрагментов цепи $(\text{GlcNAc})_n$, где $n > 1$, хитиназой, секретируемой этой и другими хитинолитическими бактериями в окружающую среду. На второй стадии, с помощью специальных белков – хитопоринов – и ABC-транспортеров, осуществляется транспорт полученных олигомеров N-ацетилглюкозамина в периплазматическое пространство клеток, где и происходит дальнейший гидролиз олигомеров $(\text{GlcNAc})_n$ до $(\text{GlcNAc})_2$ двумя периплазматическими ферментами – хитодехтриназой и β -N-ацетилглюкозаминидазой. На следующем этапе, образующийся димер $(\text{GlcNAc})_2$, как было показано в работе авторов Li и

Roseman [123], связывается с периплазматическим белком СВР (Chitin oligosaccharide binding protein), что, в свою очередь, приводит к освобождению периплазматического домена сенсорной гистидин-киназы ChiS. Разблокирование периплазматического домена ChiS приводит к активации экспрессии генов «хитинолитического» регулона, что было подтверждено данными, полученными с использованием делеционного мутанта по этому гену [123]. Как было установлено в результате анализа генома *V. cholerae*, в состав этого регулона входит 41 ген, кодирующий весь комплекс ферментов, осуществляющих лизис хитина до димера (GlcNAc)₂: хитопорины, внеклеточные хитиназы, ABC-транспортеры олигомеров (GlcNAc)_n, периплазматические хитодехтриназа и β-N-ацетилглюкозаминидаза, киназы, гены, контролирующие образование пилей IV типа [123]. Следует отметить, что активация домена белка ChiS происходит только при связывании СВР с димером или олигомером N-ацетилглюкозамина, тогда как мономерная форма GlcNAc не связывается с СВР, что обеспечивает сохранение неактивной формы ChiS [123]. Такая избирательность связывания СВР и молекулы-активатора, по-видимому, может объясняться тем фактом, что значительную часть продуктов хитинолиза, в результате действия большинства секретируемых хитиназ, составляет именно олигомеры (GlcNAc)_n, где n составляет от 2-6 звеньев [123, 139]. Также было установлено, что большое значение, в процессе утилизации хитина, имеют пили IV типа, осуществляющие прикрепление и колонизацию бактерий *V. cholerae* на субстрате [139]. Мономер хитина – N-ацетилглюкозамин – в дальнейшем подвергается конверсии за счет 3-х последовательных реакций: фосфорилирования, деацетилирования и деаминирования до фруктозо-6-фосфата. Этот процесс осуществляется ферментами, кодируемыми генами *nag* оперона [237]. Регуляция экспрессии этого оперона у *E. coli* и *V. cholerae* осуществляется белком-регулятором NagC [237].

В результате проведения компьютерного анализа в геноме *S. oneidensis* MR-1, также как и у других, хитин-утилизирующих видов, обнаружен оперон *nagKBAXP*, окруженный дополнительными генами SO_3514-3503, участвующими в метаболизме хитина.

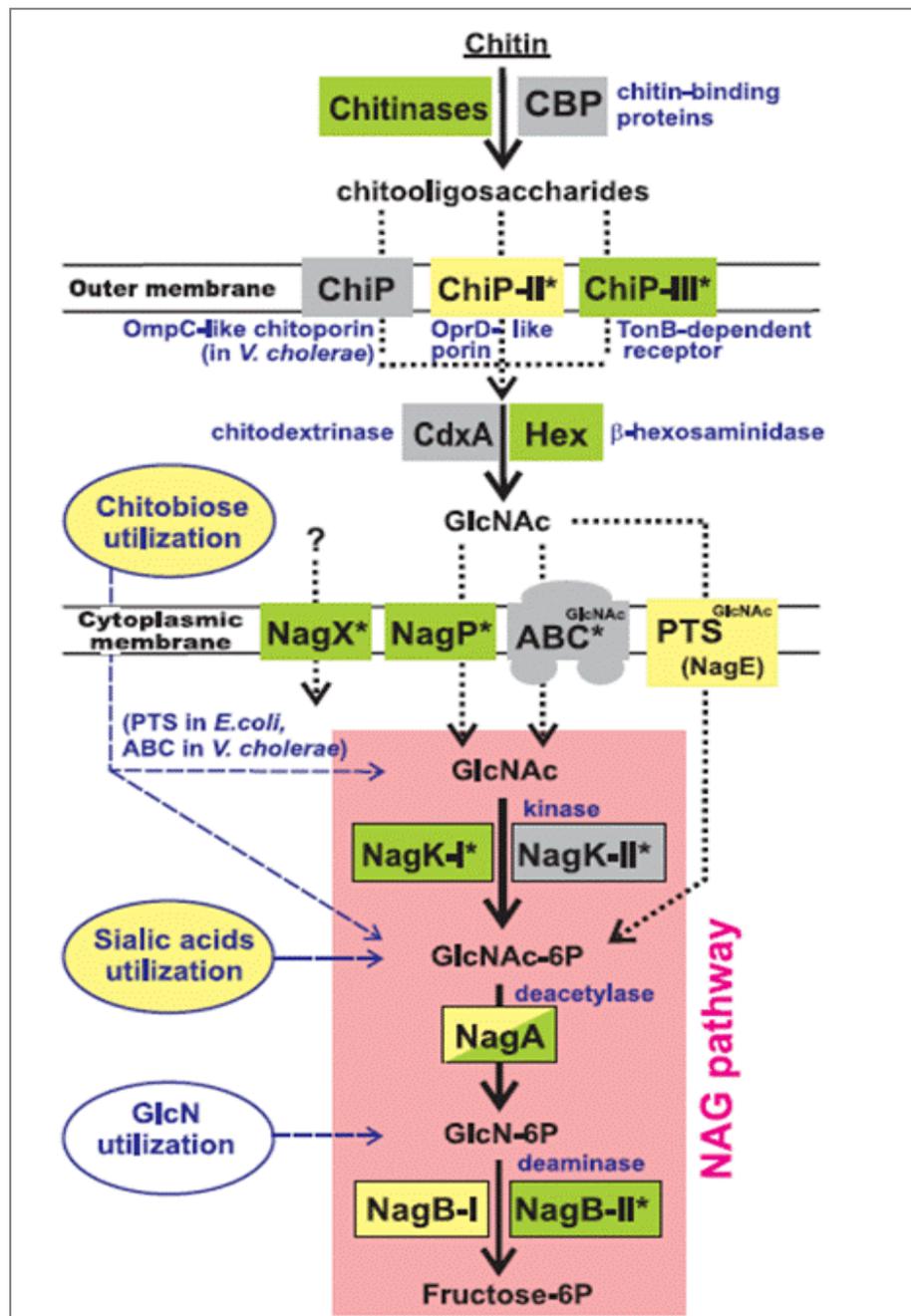


Рисунок 2. Схема путей утилизации хитина у разных γ -протеобактерий. Цветами выделены белки, участвующие в утилизации хитина: зеленым отмечены белки, обнаруженные у *S. oneidensis* MR-1, желтым – *E. coli*, серым – других протеобактерий, таких как *V. cholerae*, но не обнаруженные, ни у *S. oneidensis* MR-1, ни у *E. coli*. Розовым цветом выделен блок реакций модификации N-ацетилглюкозамина до фруктозо-6-фосфата. Сплошными стрелками обозначены ферментативные реакции, пунктирными стрелками обозначен транспорт соединений внутрь и непосредственно в клетке по [237].

В состав этого оперона входят гены, кодирующие ферменты конверсии N-ацетилглюкозамина до фруктозо-6 фосфата, однако не имеющие гомологов у других хитин-утилизирующих видов протеобактерий, за исключением гена *nagA* [75, 237]. Регуляция экспрессии *nag* оперона у 9 проанализированных видов рода *Shewanella* также осуществляется другим белком NagR, принадлежащим к семейству LacI, не гомологичным NagC [237]. Как было установлено [237], в клетках *S. oneidensis* MR-1 транспорт N-ацетилглюкозамина в цитоплазму осуществляется нехарактерным белком – пермеазой NagP, тогда как у *E. coli* и *V. cholerae* он осуществляется либо PTS или ABC системами транспорта. При росте на N-ацетилглюкозамине был обнаружен высокий уровень экспрессии не только генов *nag* оперона, но также гена SO_3514, TonB-зависимого транспортера, осуществляющего, по-видимому, транспорт N-ацетилглюкозамина через внешнюю мембрану в периплазму

Сравнение оперонов видов бактерий, способных утилизировать хитин (*S. oneidensis* MR-1 и *V. cholerae*), выявило отсутствие у *S. oneidensis* MR-1 в составе оперона генов, контролирующих адгезию и прикрепление к хитину и его производным. В тоже время при утилизации хитина у *S. oneidensis* MR-1 было обнаружено увеличение уровня экспрессии кластера генов SO_0850-0854, контролирующих образование пилей IV типа, что может быть объяснено участием пилей этого типа в адгезии к хитину и его производным [75].

Таким образом, несмотря на сходный механизм утилизации N-ацетилглюкозамина, генетический контроль этого метаболического пути у *S. oneidensis* MR-1 имеет значительные различия по сравнению с охарактеризованными ранее хитин-утилизирующими видами бактерий и остается до конца не уточненным [237].

2.2.3. Утилизация лактата и пирувата у *S. oneidensis* MR-1

Отсутствие активного транспорта глюкозы и других гексоз и пентоз в клетку, блокирование гликолиза из-за отсутствия фосфофруктокиназы, по-видимому, определяют преимущественное использование триоз в качестве

источника углерода при росте клеток *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных и аэробных условиях. По данным ряда авторов наибольшая плотность при культивировании *S. oneidensis* MR-1 в аэробных и анаэробных условиях достигается на D- и L-лактате [75, 165]. Одним из важных отличий рода *Shewanella* является отсутствие генов-ортологов лактатдегидрогеназы, характерной для большинства γ -протеобактерий [196]. В геноме *S. oneidensis* MR-1 аннотирован ген *ldhA*, предположительно кодирующий лактатдегидрогеназу [165]. Однако экспериментально было показано, что делеционный штамм $\Delta ldhA$ не теряет способность к окислению лактата [165]. Этот факт позволяет предположить наличие у *S. oneidensis* MR-1 других генов, кодирующих нетипичные для γ -протеобактерий лактатдегидрогеназы.

Анализ генома *S. oneidensis* MR-1 выявил кластер генов SO_1522-1518, содержащих гены лактатпермеазы и гены, предположительно кодирующие D- и L-лактатдегидрогеназы [165]. При этом наибольшая гомология (23% идентичных аминокислотных остатков) полипептида SO_1521 (*dld-II*) обнаруживается с дрожжевой лактатдегидрогеназой D-LDH [127]. Оба фермента содержат в своем составе FAD-связывающий домен, однако, белок SO_1521 дополнительно содержит С-концевой связывающий 4Fe-4S домен [165]. Как было установлено исследованием делеционных мутантов, *S. oneidensis* MR-1, L-лактатдегидрогеназа кодируется 3-мя генами (*lldEGF* SO_1520-1518), аннотированными ранее с неизвестной функцией [165]. Субъединицы DldE и DldF, кодируемые генами SO_1518-1519, также содержат 4Fe-4S связывающие домены, что, по-видимому, может указывать на возможное участие этих субъединиц в процессе передачи электрона на начальные акцепторы ЭТЦ в процессе окисления лактата. Общая схема утилизации пирувата представлена на рисунке 3. Ранее предполагалось, что пируват в клетках *S. oneidensis* MR-1 может метаболизироваться в лактат за счет NADH-зависимой лактатдегидрогеназы *LdhA*. Однако, лактатадегидрогеназы этого типа характеризуются наличием обратной активности, по отношению к обозначенной для них прямой реакции, и в результате осуществляют конверсию пирувата в лактат за счет окисления NADH эквивалента [165]. Как и было

установлено экспериментально для *S. oneidensis* MR-1, утилизация лактата происходит без участия данного фермента [162]. Конверсия пирувата также может осуществляться комплексом пируватдегидрогеназы (PDH), кодируемой генами *aceEFG* оперона, с образованием ацетил Ко-энзимаА и CO₂, или пируватформатлиазой, кодируемой геном *pflB* с образованием формиата [167].

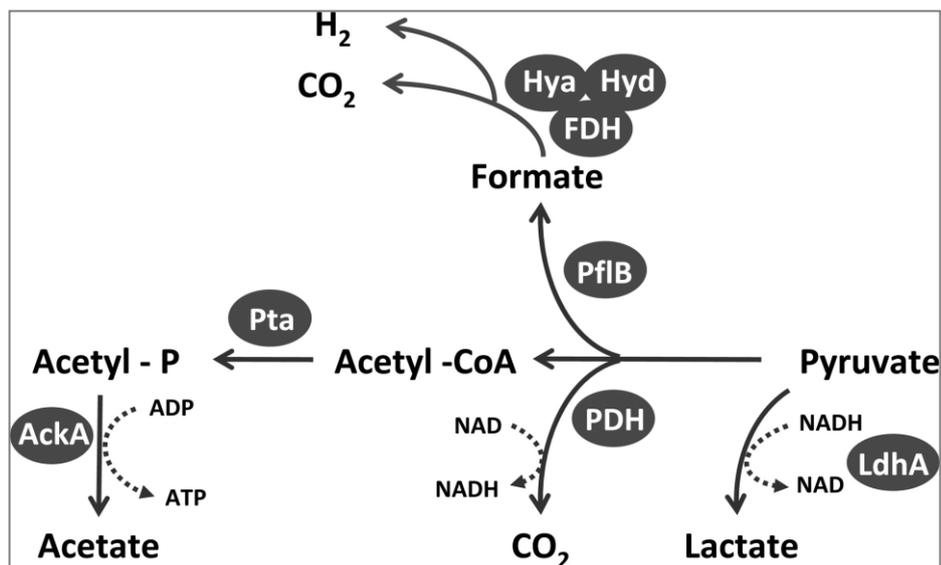


Рисунок 3. Схема утилизации лактата и пирувата у *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях. Названия ферментов, осуществляющих соответствующие реакции, приведены в черных овалах. LdhA – NADH-зависимая лактатдегидрогеназа, PDH – комплекс пируватдегидрогеназы, PflB – пируватформатлиаза, FDH – комплекс NAD-независимой формиатдегидрогеназы, Hya, Hyd – [Fe-Ni] и [Fe-Fe] дегидрогеназы, соответственно. Pta – фосфотрансацетилаза, AskA – ацетаткиназа. Иллюстрация из работы [167].

В работе [167] было показано, что в анаэробных условиях значительную роль в метаболизме пирувата играет пируватформатлиаза. Делеционный по гену *pflB* штамм *S. oneidensis* MR-1 теряет способность к анаэробному росту и утилизации пирувата и лактата, тогда как в аэробных условиях такая способность сохраняется [166]. Дальнейшая трансформация ацетил-КоА в ацетат сопряжена с образованием АТФ за счет субстратного фосфорилирования, катализируемого ацетилтрансферазой Pta и ацетаткиназой AskA1 [218]. Как было установлено с

использованием делеционных мутантов по генам *ackA* и *pta*, субстратное фосфорилирование в анаэробных условиях является у *S. oneidensis* MR-1 основным способом получения и сохранения энергии [96]. Дальнейшее окисление формиата с образованием CO₂ и водорода осуществляется в периплазме мультисубъединичным комплексом NAD-независимой формиатдегидрогеназы, закрепленной на внешней стороне ЦМ и [Ni-Fe] гидрогеназным комплексом [140]. Экспрессия оперона *fdh* и генов *hyaAB* у *S. oneidensis* MR-1 осуществляется только в анаэробных условиях, что может определять путь конверсии пирувата в зависимости от условий роста бактерии.

2.3. Особенности анаэробного дыхания *S. oneidensis* MR-1

В ходе анализа генома *S. oneidensis* MR-1 было выявлено увеличенное по сравнению с *E. coli* (7) количество генов (42), кодирующих цитохромы С-типа [93]. Способность *S. oneidensis* MR-1 к использованию широкого спектра акцепторов электронов, помимо кислорода, позволяет исследовать ее в качестве модельного объекта для изучения механизма и регуляции процессов анаэробного дыхания у металл-редуцирующих бактерий. Белки, входящие в состав ЭТЦ можно условно разделить на три ключевых блока. На рисунке 4 представлена общая схема электрон-транспортной цепи при анаэробном дыхании *S. oneidensis* MR-1. К первому блоку относятся дегидрогеназы (такие, как рассмотренные выше D- и L-лактат дегидрогеназы LldEGF или Dld-II), локализованные на внутренней стороне ЦМ и осуществляющие окисление донора электрона с переносом протона и электрона на пул мембранных переносчиков, таких как хиноны (Q) и менахиноны (MQ). К этой группе также относятся закрепленные на внешней стороне ЦМ цитохромы (CymA), акцепторы электронов, осуществляющие передачу электрона через ЦМ мембрану от менахинонов на периплазматические переносчики электронов. Вторую группу составляют периплазматические переносчики электронов на цитохромные комплексы внешней ПМ (MtrA, Stc, DmsE) и белки, осуществляющие перенос электрона на конечный акцептор в периплазме (FccA, NrfA, NapB, NapA).

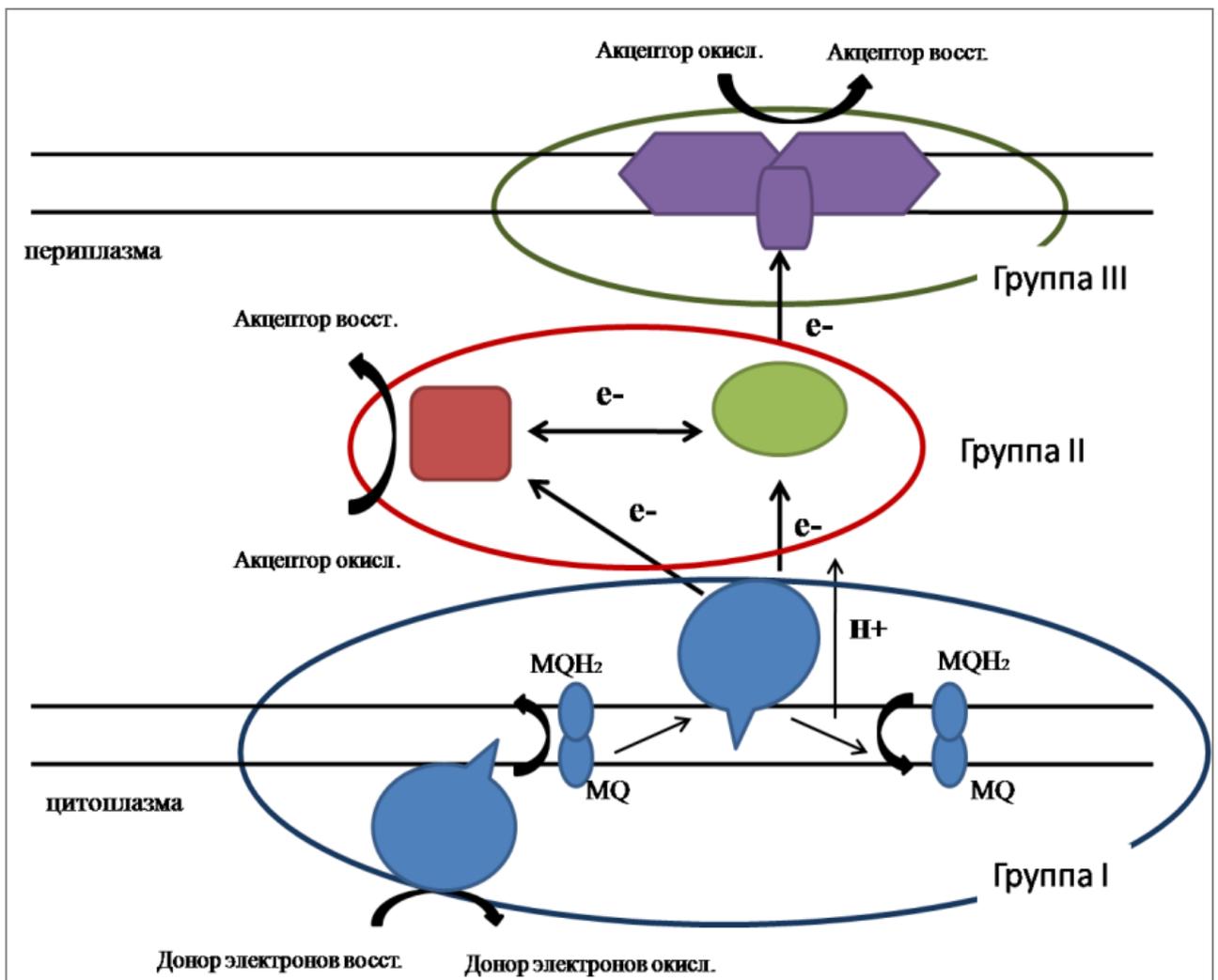


Рисунок 4. Общая схема организации ЭТЦ при анаэробном дыхании у *S. oneidensis* MR-1. Цветом выделены белки, составляющие три блока ЭТЦ. Синим цветом, обозначены белки, относящиеся к первому блоку: дегидрогеназы внутренней стороны ЦМ и первичный акцептор – цитохром, расположенный на внешней стороне ЦМ. Белки, составляющие вторую группу, обведены линией красного цвета. В состав второй группы входят два типа белков, обозначенные двумя цветами: зеленым цветом обозначены периплазматические переносчики электронов и красным – периплазматические редуктазы. К третьей группе (выделены фиолетовым цветом) относятся белки, формирующие комплексы для передачи электрона внеклеточные акцепторы.

К третьей группе относятся белки, составляющие комплексы, локализованные на внешней стороне ПМ, такие как OmcA, MtrC, DmsA, DmsB, и

осуществляющие перенос электрона на нерастворимые внеклеточные акцепторы электронов. Следует отметить, что ключевая роль в передаче электрона от внутренней цитоплазматической мембраны (ЦМ) на конечный акцептор принадлежит мультигемовым цитохромам С-типа [145, 201].

2.3.1. Первичные акцепторы электронов внешней и внутренней стороны ЦМ

Процесс передачи электрона в процессе анаэробного дыхания от первичного донора, например лактата или пирувата, на цитохром, локализованный на внешней стороне ЦМ, осуществляется мембрано-ассоциированной лактатдегидрогеназой или другими дегидрогеназами. В процессе передачи электрона от первичного донора происходит его окисление с сопряженным переносом протона и электрона на хиноны или менахиноны [58]. Дополнительно к введенному делению на блоки, ветви ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 также можно разделить на СумА-зависимые и СумА-независимые. Большая часть ветвей ЭТЦ относится к СумА-зависимым, тогда как СумА-независимые ветви формируются только при использовании следующих конечных акцепторов электронов (сульфит, тиосульфат, ТМАО) [136, 149, 205]. Поскольку значительный интерес представляет изучение механизмов анаэробного дыхания с использованием металлов в качестве конечного акцептора, основные усилия исследователей сфокусированы на белковых комплексах именно этой формы ЭТЦ [201]. Варианты СумА-независимых цепей также будут рассмотрены ниже, но без дополнительного разделения составляющих их белков на три блока. К настоящему времени одним из наиболее изученных первичных цитохромных акцепторов электронов, закрепленных на внешней стороне ЦМ, у *S. oneidensis* MR-1 является тетрагемовый цитохром СумА.

2.3.1.1. Тетрагемовый цитохром СумА

Впервые важная роль белка СумА в передаче электрона от пула хинонов-менахинонов при анаэробном дыхании в присутствии фумарата, нитрита или

Fe(III) была установлена в 1997 году [149]. Как было показано, делеционные по гену *sumA* мутанты *S. oneidensis* MR-1 теряют способность к росту в анаэробных условиях в присутствии большей части акцепторов электронов, однако, способность к росту в присутствии ТМАО сохранялась. Гомологичная экспрессия гена *sumA* в делеционном штамме-реципиенте $\Delta sumA$ *S. oneidensis* MR-1 приводила к восстановлению способности клеток к росту в анаэробных условиях в присутствии разных акцепторов электронов [80, 149, 150, 193]. Впоследствии была показана ключевая роль белка SumA в ЭТЦ при анаэробном дыхании в присутствии солей ванадия V(V) в форме $NaVO_3$ [153].

Тетрагемовый цитохром SumA имеет размер 21 кДа и состоит из периплазматической глобулярной части и N-концевого лидерного пептида, который, после транслокации апо-цитохрома в периплазму, осуществляет закрепление белка на внешней стороне ЦМ [149]. На основании анализа третичной структуры белка и сравнения первичной структуры с цитохромами, локализованными на внешней стороне цитоплазматической мембраны, SumA был отнесен к семейству NapC/NirT/NrfH [149, 240]. Белки этого семейства характеризуются способностью к передаче электронов от хинонового пула к периплазматическим оксидоредуктазам, содержат гидрофобный N-концевой домен и 4 или 5 ковалентно присоединенных гемов с в гидрофильном C-доме [170]. Позднее экспериментально было показано появление Fe-редуктазной активности у делеционного мутанта $\Delta napC$ *E. coli* при гетерологичной экспрессии гена *sumA* из *S. oneidensis* MR-1 [83]. Ген *sumA* в геноме бактерии *S. oneidensis* MR-1 является одиночным [149], в отличие от гомологичных генов *napC*, *nrfBCD*, входящих у *E. coli* в состав оперонов *napFDAGHBC* и *nrfABCDEFGF*.

Способность к использованию широкого спектра акцепторов электронов *S. oneidensis* MR-1 определяется, прежде всего, наличием разных вариантов цитохромных комплексов, осуществляющих передачу электрона на конечный акцептор. Ключевая роль именно цитохрома SumA в передаче электронов на периплазматические переносчики установлена в результате исследования делеционных мутантов *S. oneidensis* MR-1 по различным генам, кодирующим

цитохромы, входящие в состав ветвей ЭТЦ на конечных этапах. Было показано, что мутанты по индивидуальным генам цитохромов теряют способность к росту в присутствии конкретного акцептора, тогда как мутант $\Delta\text{сумА}$ *S. oneidensis* MR-1 полностью теряет способность к анаэробному росту, исключая акцептор ТМАО [83, 149].

Следует отметить, что высокая пластичность генома *S. oneidensis* MR-1 (см. выше) может приводить к возникновению перестроек в геноме, приводящих к частичному восстановлению функциональной активности ЭТЦ.

В работе [62] дается описание получения межгенной супрессорной мутации на фоне делеционного штамма $\Delta\text{сумА}$, приводящей к восстановлению способности к анаэробному дыханию в присутствии фумарата, цитрата Fe и ДМСО, но не иона нитрата. Анализ супрессорного мутанта, проведенный в цитируемой работе, показал, что произошло встраивание мобильного элемента ISSod1 в область промотера кластера *sirCD* с образованием нового гибридного конститутивного промотера.

Ранее гены кластера *sirCD* были аннотированы как хинондегидрогеназа и редуктаза, связанные с восстановлением сульфита [93]. В результате проведенного исследования было экспериментально показано, что белки SirDSirC могут функционально заменить СумА и также осуществлять перенос электронов от хинонового пула на переносчики или конечные редуктазы (MtrA, FccA), как и СумА. Этот факт еще раз свидетельствует о высокой пластичности генома и повышенном адаптивном потенциале *S. oneidensis* MR-1, в частности в формировании новых элементов ЭТЦ для передачи электронов на конечный акцептор без участия СумА [62].

В процессе функционирования ЭТЦ, как следует из рисунка 4, электрон передается с тетрагемового цитохрома СумА либо на периплазматические переносчики электронов MtrA и Stc, либо на редуктазы, осуществляющие перенос электрона на конечный акцептор.

2.3.2. Периплазматические редуктазы

2.3.2.1. Фумаратредуктаза FссА

К настоящему времени достаточно хорошо изучена периплазматическая фумаратредуктаза, FссА *S. oneidensis* MR-1, осуществляющая сопряженный перенос электрона и протона при восстановлении фумарата в сукцинат. Белок FссА *S. oneidensis* MR-1 является мономерным тетрагемовым флавоцитохромом, размером 63.8 кДа, содержащим в качестве кофактора флавинадениндинуклеотид (ФАД) [121, 222]. Ген фумаратредуктазы *fссА* *S. oneidensis* MR-1 был клонирован в 1992 году, и показано, что он не входит в состав оперона. Установлено, что про-белок содержит лидерный пептид, длиной 25 а.о. осуществляющий транслокацию FссА в периплазму [162]. Свободная локализация этого фермента в периплазме (после транслокации и отщепления лидерного пептида) не характерна для фумаратредуктаз большинства протеобактерий [145]. У бактерии *E. coli*, фумаратредуктаза является мембрано-ассоциированным комплексом, состоящим из нескольких субъединиц, ковалентно присоединенного ФАД и 4Fe-4S кластера [60]. Субъединицы комплекса кодируются генами, составляющими оперон *frd* [60]. Ферментативная специфичность FссА была установлена при определении свойств выделенного белка. Так, было показано, что FссА не способна к восстановлению нитрата или нитрита [142]. Полученные по гену *fссА* мутанты, с отсутствующим в периплазме белком FссА, теряли способность к использованию фумарата в качестве акцептора электронов, тогда как способность к восстановлению Fe(III), Mn(IV) и нитрата сохранялась [134, 147]. Возможность прямой передачи электрона между цитохромами CymA и FссА была также установлена экспериментально [192].

К настоящему времени получен кристалл FссА из *S. oneidensis* MR-1, проведен РСА, описан детальный механизм передачи электрона между гемами и сопряженный перенос протона с ФАД на фумарат с образованием сукцината [121].

2.3.2.2. Периплазматическая нитратредуктаза NapAB

В анаэробных условиях *S. oneidensis* MR-1 в качестве одного из акцепторов электронов может использовать ион нитрата [144]. Процесс восстановления нитрата до нитрита у протеобактерий может осуществляться двумя системами: NAP белками в периплазме или цитоплазматическими NAR белками, ассоциированными с ЦМ мембраной [176]. Восстановление нитрата до нитрита является первым этапом процесса либо аммонификации с последующим образованием иона аммония, либо денитрификации с образованием азота N₂ [177].

В геноме *S. oneidensis* MR-1 обнаружен оперон *napDAGHB* и полностью отсутствуют гены оперона *narGHJ*, кодирующие субъединицы мембран-связанной нитратредуктазы, характерной для большинства γ -протеобактерий [93]. Анализ геномов 19 видов рода *Shewanella* выявил наличие одновременно двух типов *nap* оперонов NAP- α (NapEDABC) и NAP- β (NapDAGHB) у большинства видов рода *Shewanella*, что является необычным свойством данного рода. Однако, в геноме *S. oneidensis* MR-1 был обнаружен только один оперон NAP- β типа [208]. Белок NapD является шапероном для NapA, белки NapGH содержат 4Fe-4S кластер и также способны участвовать в транспорте электронов на NapA, но с более низкой эффективностью, чем SumA [80]. Восстановление нитрата до нитрита в клетках *S. oneidensis* MR-1 происходит в периплазме при участии комплекса нитратредуктазы NapAB [64]. Субъединица нитрат редуктазы NapA, размером 90 кДа, содержит в качестве кофактора Mo-*bis*-молибдоптерин-гуаниндинуклеотид и один 4Fe-4S кластер. Перенос электрона на нитрат ион с образованием нитрит иона катализируется NapA субъединицей, тогда как NapB, небольшой дигемовый цитохром, служит, как предполагалось ранее, для передачи электрона с SumA на NapA [64]. Однако, более поздние исследования показали, что субъединица NapB не является необходимой для осуществления реакции восстановления нитрата: делеционный мутант $\Delta napB$ *S. oneidensis* MR-1 не утрачивает способности к росту в анаэробных условиях в присутствии нитрата [80], тогда как мутант $\Delta napA$ полностью теряет такую способность [64]. Таким

образом, экспериментально было показано, что возможен прямой перенос электрона между CymA и нитратредуктазой NapA [80]. На рисунке 5 представлена схема ЭТЦ с использованием в качестве конечного акцептора электронов нитрата и нитрита.

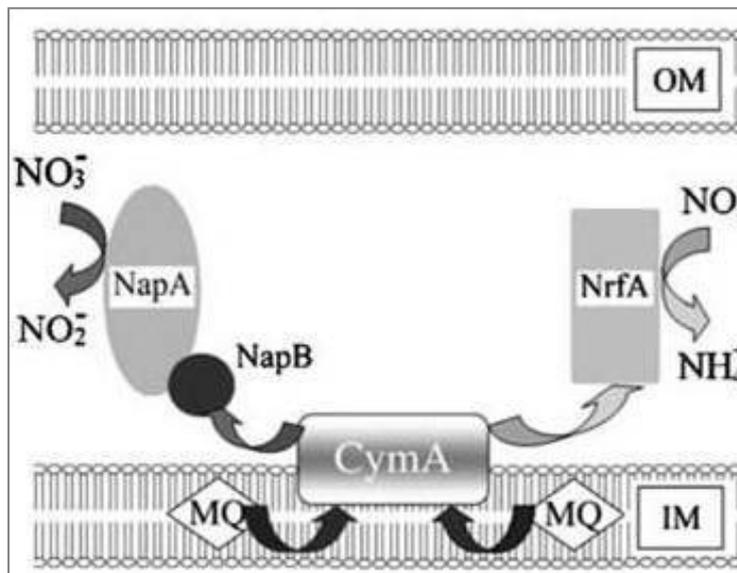


Рисунок 5. Схема организации ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях в присутствии нитрата и нитрита. OM – внешняя мембрана, IM – цитоплазматическая мембрана, MQ – менахиноны, стрелками показан поток электронов в ЭТЦ. Рисунок из работы [80].

По-видимому, физиологическая роль NapB может заключаться в регуляции направленной передачи электрона от CymA на NapA для более эффективного использования нитрата, как акцептора электронов. При значительном уменьшении концентрации нитрата, происходит «переключение» в передаче электронов с CymA на NrfA (нитритредуктаза), что приводит к восстановлению нитрита до аммония. В отсутствие белка NapB электроны с цитохрома CymA в равной степени передаются как на NapA, так и на NrfA [80].

2.3.2.3. Периплазматическая нитритредуктаза NrfA

Как было установлено экспериментально, бактерия *S. oneidensis* MR-1 способна использовать в качестве акцептора электронов также ион нитрита [144].

Процесс восстановления нитрита в клетках протеобактерий может осуществляться двумя путями: последовательными реакциями с образованием аммония или азота, соответственно. В процессе аммонификации происходит серия реакций восстановления нитрита за счет присоединения протонов, а в случае образования азота (денитрификация), происходит последовательное образование оксидов азота NO и N₂O с конечным образованием N₂ [207, 243].

У бактерий-аммонификаторов выявлено два типа оперонов, кодирующих нитритредуктазные системы *nrfAH* и *nrfABCD*, характерные для δ-, ε-протеобактерий и γ-протеобактерий, соответственно. Белок NrfA является нитритредуктазой, тогда как NrfH и комплекс NrfBCD являются мембраносвязанными хинооксидазами, осуществляющими перенос электрона от пула хинонов на нитритредуктазу. В геноме *S. oneidensis* MR-1 обнаружен только один ген *nrfA*, кодирующий периплазматическую нитритредуктазу из оперона *nrfABCD* [207]. У *S. oneidensis* MR-1 перенос электронов от пула хинонов выполняет вышеописанный тетрагемовый цитохром CymA [193]. Отсутствие в геноме *S. oneidensis* MR-1 генов *nirK* и *nirS*, кодирующих ферменты, восстанавливающие нитрит до NO и N₂O, блокируют возможность восстановления нитрита до азота по типу денитрификации [93].

Нитритредуктаза NrfA *S. oneidensis* MR-1 является димером, каждая субъединица которого содержит 5 гемов [239]. На рисунке 6 представлена схема передачи электронов между гемами в реакции восстановления нитрита до аммония [239].

Однако, в отличие от NrfA *E. coli* и других γ-протеобактерий, один из гемов имеет нехарактерный сайт связывания гема (СХХСК), тогда как обычный сайт связывания содержит последовательность (СХХСН). Это требует наличия дополнительного фермента – цитохром *c* гемлиазы, для присоединения гема к данному сайту [92]. В работе [80] показано, что делеционный штамм Δ*nrfA* полностью теряет способность к использованию нитрита в качестве акцептора электронов.

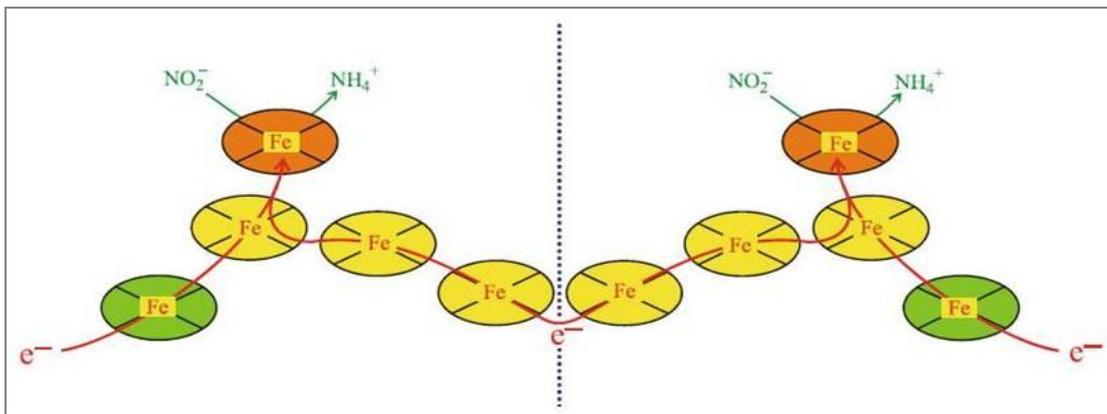


Рисунок 6. Схема передачи электронов между гемами в димере нитритредуктазы *S. oneidensis* MR-1. Желтым цветом обозначены гемы, осуществляющие только транспорт электронов, зеленым обозначены гемы, акцептирующие электрон от внешнего носителя, красным цветом обозначены гемы, входящий в состав активного центра. Красной стрелкой обозначен поток электронов, между гемами. Пунктирной линией обозначена условная граница субъединиц фермента. Иллюстрация из работы [239].

Это свидетельствует о ключевой роли нитритредуктазы NrfA в восстановлении нитрита в условиях анаэробного дыхания.

2.3.3. Периплазматические переносчики электронов

Как было описано выше, SumA может направлять электрон на промежуточные белки – периплазматические транспортеры, для дальнейшей его передачи на конечные цитохромные комплексы, относимые к группам II и III (рис. 4) [149].

2.3.3.1. Тетрагемовый цитохром STC

Одним из таких периплазматических цитохромов-переносчиков электронов является STC (Small Tetrahem Cytochrome). Белок STC – самый небольшой тетрагемовый цитохром, охарактеризованный на данный момент. Он имеет в своем составе лидерный пептид размером 25 а.о. для транслокации про-белка в периплазму, зрелый белок является растворимым периплазматическим

тетрагемовым цитохромом с массой 12 кДа [221]. Ген, кодирующий STC, клонирован в 2001 году, и является одиночным, т.к. не входит в состав ни одного оперона [222]. По данным РСА наибольшая гомология STC установлена с гемсодержащим доменом фумаратредуктазы FссА [122], однако, делеционный штамм по гену *stc* не утрачивает способность к восстановлению фумарата, что подтверждает наличие отдельной фумаратредуктазы у *S. oneidensis* MR-1 [86]. Возможность свободной передачи электронов между всеми гемами в молекуле белка, определяет, по-видимому, физиологическую роль STC, заключающуюся в «сборе» и перераспределении электронов между разными составляющими ветвей ЭТЦ [122].

2.3.3.2. Десятигемовый периплазматический цитохром MtrA

Другим периплазматическим транспортером электронов является цитохром MtrA. Белок MtrA имеет размер 32 кДа, функционирует в виде мономера и содержит 10 гемов, [168; 190, 204]. По данным Ross и соавторов, часть молекул MtrA ассоциировано с комплексом MtrBC-OmcA входящим в состав наружной мембраны [183]. На рисунке 7 представлена схема ветви ЭТЦ, функционирующей при анаэробном дыхании клеток *S. oneidensis* MR-1 в присутствии Fe (III). Ген *mtrA* входит в состав кластера *mtrDEF-omcA-mtrCAB* [93] белок MtrD имеет гомологию 99% с белком MtrA и также является периплазматическим десятигемовым цитохромом, что может свидетельствовать о дупликациях и перестройках в геноме *S. oneidensis* MR-1 [168]. Однако, физиологическая роль MtrD полностью не выяснена, т.к. делеция генов *mtrDEF* не приводит к заметному снижению способности восстановления Fe(III) [151]. Мутанты по гену *mtrA* имеют значительно пониженную редуктазную активность Fe(III) в растворимой и нерастворимой формах и Mn(IV), тогда как способность к восстановлению фумарата, нитрата, нитрита и других акцепторов электронов сохраняется [41]. Этот факт свидетельствует о ключевой роли MtrA в ЭТЦ при передаче электрона с CymA на мембранный комплекс MtrB-MtrC-OmcA в процессе восстановления металлов.

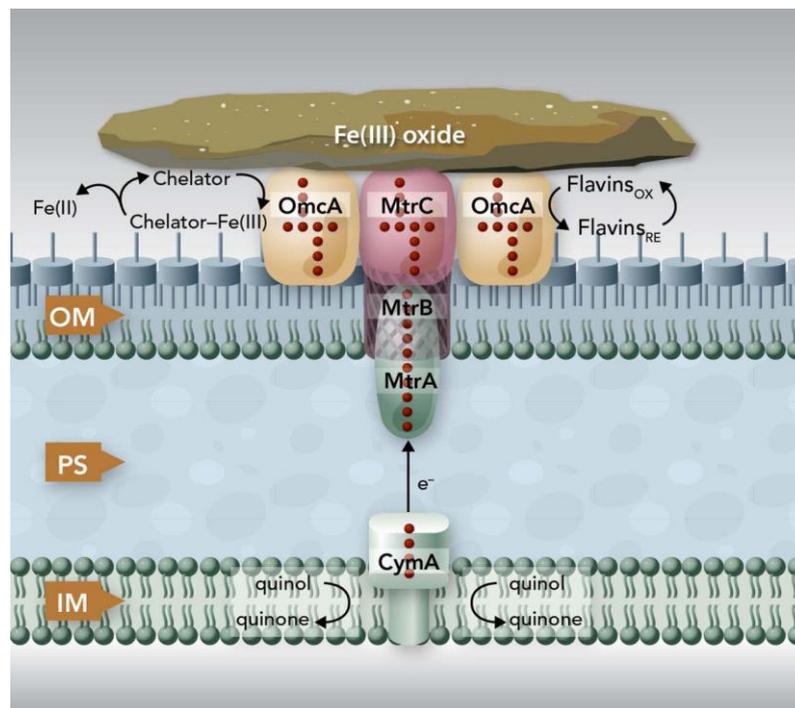


Рисунок 7. Схема организации ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях в присутствии Fe(III). IM – цитоплазматическая мембрана, OM – периплазматическая мембрана, PS – периплазма. Стрелкой обозначен поток электронов в ЭТЦ, красными точками обозначены гемы в соответствующих белках. Иллюстрация из работы [204].

Скорость передачи электрона между CymA и MtrA возрастает в 1.4 раза на фоне делеционного мутанта $\Delta fccA$, при этом *in vitro* была показана возможность передачи электрона с MtrA на фумаратредуктазу FccA и обратно, что свидетельствует о высокой пластичности ветвей ЭТЦ и многообразие возможностей взаимодействия между цитохромами [190].

2.3.3.3. Десятигемовый периплазматический цитохром DmsE

Помимо MtrA, периплазматическим переносчиком электронов служит белок DmsE. Так же, как и MtrA, это десятигемовый цитохром, с молекулярной массой 35 кДа, паралог MtrA с высокой степенью гомологии (83.6%), передает электроны на комплекс DmsABF, локализующийся на внешней мембране [88, 44]. Сравнение электрохимических характеристик белков MtrA и DmsE выявили их высокое

сходство. Ген *dmsE* входит в состав оперона *dmsEFABGH*. Белки, кодируемые генами этого оперона, формируют ЭТЦ с конечным акцептором – ДМСО [88]. Высокая степень гомологии между белками MtrA и DmsE позволяет предположить возможность частичной взаимозаменяемости этих белков в функционировании аналогичных ветвей ЭТЦ. Однако, как было показано в работе авторов Coursolle и Gralnick [63], DmsE частично восстанавливает способность Fe(III) редуктазной активности, тогда как MtrA не восстанавливает способность к восстановлению ДМСО. Такое сходство и одновременно различие белков, приводящее к односторонней их заменяемости, может быть, по-видимому, следствием дубликации исходного гена-предшественника с последующим его изменением для повышения специфичности нового белка.

2.3.4. Цитохромные комплексы, ассоциированные с внешней клеточной мембраной

Третьим блоком белков, входящих в состав ЭТЦ, являются комплексы, локализованные на внешней мембране, и осуществляющие передачу электрона на внеклеточный акцептор.

2.3.4.1. MtrBC-OmcA

Участие в восстановлении металлов цитохромных комплексов, локализованных на внешней стороне ПМ, было показано в 1992 году [145]. Идентификация белков, входящих в состав комплекса, участвующего в восстановлении Fe(III) и Mn(IV) выявила два десятигетовых цитохрома: OmcA, MtrC (OmcB) и трансмембранный белок MtrB [41].

Физиологическая роль белка MtrB заключается в правильном формировании трансмембранного комплекса белков OmcA и MtrC при встраивании в наружную мембрану клетки. У делеционного мутанта $\Delta mtrB$ было показано снижение содержания белков OmcA и MtrC во внешней мембране до 36% от уровня штамма дикого типа [151]. Делеционные по генам *mtrC* и *omcA* мутанты *S. oneidensis* MR-1 характеризуются значительным снижением Fe(III)-

или Mn(IV)-редуктазной активности, тогда как способность к использованию других акцепторов электронов не изменяется [41]. Как было показано в работах [152, 154], белки OmcA и MtrC являются липопротеинами и экспонированы во внешнюю среду, а стехиометрическое соотношение их в комплексе MtrC:OmcA составляет 1:2. Образование комплекса MtrC-OmcA приводит к увеличению Fe(III)-редуктазной активности, превышающей суммарную активность этих белков, что свидетельствует о необходимости образования комплекса для наиболее эффективного восстановления Fe(III) [200]. Дополнительным свидетельством взаимодействия белков MtrC-OmcA являются данные, подтверждающие сопряженное выделение белка OmcA при очистке MtrC [200]. Кроме того, формирование комплекса MtrC-OmcA было также подтверждено *in vivo* методами иммунопреципитации в сочетании с методом химической сшивки белков [183, 241].

Комплекс, формируемый белками MtrDEF, имеет высокую степень гомологии с белками MtrABC и способен к формированию гибридных форм между субъединицами [63]. Обнаруженная ранее низкая Fe(III)-редуктазная активность у делеционных мутантов *S. oneidensis* MR-1 по генам *mtrB*, *mtrC*, *omcA*, по-видимому, является результатом изменения уровня экспрессии генов оперона *mtrDEF*. Установлено также, что максимальный уровень экспрессии этого оперона наблюдается при росте и формировании биопленки [138].

Как было указано выше, высокая пластичность генома *S. oneidensis* MR-1, позволяющая бактерии быстро приспосабливаться к неблагоприятным изменяющимся условиям, определяется значительным количеством мобильных элементов. Дополнительным примером такой пластичности являются данные, опубликованные в работе по получению супрессорных мутантов на фоне $\Delta mtrB$ [189]. Авторами были получены супрессорные мутанты, на фоне делеции по гену *\Delta mtrB*, характеризующиеся частичной комплементацией по способности к восстановлению Fe(III). Анализ этих мутантов выявил усиление экспрессии генов оперона SO4362-4357 в результате встраивания мобильного элемента в области промотера [189].

2.3.4.2. DmsAB

Другим крупным цитохромным комплексом, локализованным на внешней мембране, и осуществляющим восстановление ДМСО является комплекс DmsAB. В геноме *S. oneidensis* MR-1 обнаружен оперон *dmsEFABGH*, в котором гены *dmsA* и *dmsB*, гомологичны генам *E. coli*, однако в составе оперона отсутствует гомолог гена *dmsC* [93, 88]. Экспрессия *dms* оперона индуцируется только в анаэробных условиях. Белки, формирующие комплекс DmsAB, являются десятигемовыми цитохромами, содержат в качестве кофактора молибден и 4Fe-4S кластер, экспонированы на внешней стороне ПМ так же, как и вышеописанный комплекс MtrBC-OmcA [88]. Схема организации ЭТЦ в присутствии ДМСО представлена на рисунке 8.

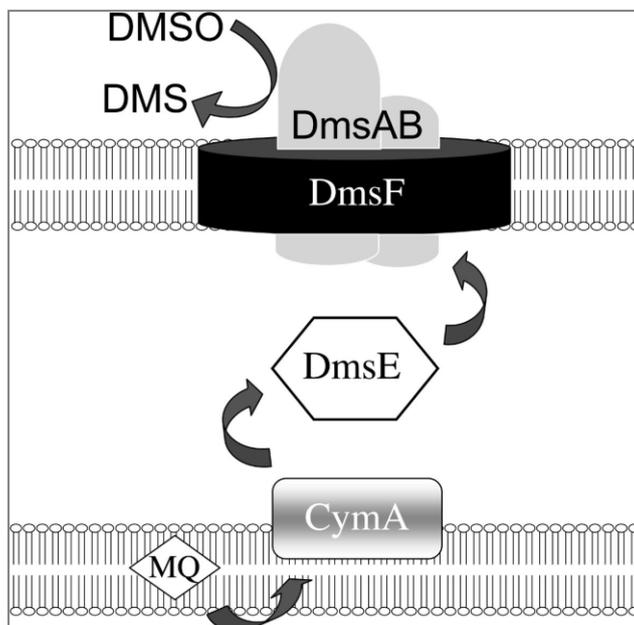


Рисунок 8. Схема организации ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях в присутствии ДМСО [88].

Функционирование ветвей ЭТЦ, включающих цитохромные комплексы внешней поверхности ПМ, зависит от транслокации комплексов через ПМ с участием системы транспорта T2SS (Type II Secretion System) [71]. Как было показано, у делеционных по ключевым генам T2SS *gspD*, *gspE*, *gspG* мутантов *S. oneidensis* MR-1 происходит значительное снижение Fe(III)- или Mn(IV)-

редуктазной активности, что также сопряжено со значительным снижением содержания цитохромных комплексов на внешней мембране [202]. Рассмотренные выше белки и их комплексы формируют СумА-зависимые ветви ЭТЦ. Ключевая роль СумА в ЭТЦ, с одной стороны, может быть следствием потери генов, кодирующих гомологи СумА в оперонах *nar* и *nrf* в результате перестройки в геноме *S. oneidensis* MR-1. С другой стороны, это может быть следствием перестройки генома в результате попытки приспособления клеток микроорганизма, для восстановления поврежденных в результате утраты генов ветвей ЭТЦ.

Кроме того, вышеописанные перестройки генома необходимы в поддержании высокой пластичности метаболизма микроорганизма при использовании широкого набора конечных акцепторов электронов в быстро изменяющихся условиях обитания.

2.3.5. СумА-независимые ветви ЭТЦ

Несмотря на функциональное замещение у *S. oneidensis* MR-1 оксидоредуктаз из разных оперонов цитохромом СумА и формирование СумА-зависимых ветвей ЭТЦ, в данном микроорганизме обнаружен ряд СумА-независимых ветвей. Наличие этих двух типов цепей ЭТЦ, которые, по-видимому, могут служить для использования широкого спектра акцепторов электронов в условиях не только высокой изменчивости условий обитания, но и перестройки самого генома.

Белки ветвей этого типа ЭТЦ также можно подразделить на вышеописанные три группы (см. раздел 2.3, рис. 4). Однако, следует отметить, что все реакции восстановления, в случае ЭТЦ СумА-независимых ветвей, осуществляются в периплазме, т.е в состав ЭТЦ входят белки только первой и второй групп.

Для *S. oneidensis* MR-1 охарактеризованы СумА-независимые ветви ЭТЦ, связанные с восстановлением ТМАО, сульфита и тиосульфата.

2.3.5.1. Восстановление ТМАО

В геноме *S. oneidensis* MR-1 обнаружен оперон *torECAD*, содержащий гены, кодирующие ТМАО-редуктазу TorA и мембранный пентагемовый цитохром TorC [136]. На рисунке 9 представлена схема организации ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 в присутствии ТМАО. Передача электронов от исходного донора происходит за счет пула хинонов, которые передают электрон на цитохром TorC, который, в свою очередь, передает электроны на TorA. Белок TorC как и CymA относится к семейству NapC/NirT/NrfH, однако, имеет в своем составе 5, а не 4 гема, как у CymA. В качестве доноров электронов TorC использует убихиноны, тогда как CymA – менахины [146]. ТМАО-редуктаза TorA содержит в своем составе кофактор – молибден, как и субъединица ДМСО-редуктазы DmsA [136]. Регуляция экспрессии генов оперона осуществляется генами *torS/torR* [45]. Структура *tor* оперона и механизм регуляции экспрессии генов *tor* *S. oneidensis* MR-1 имеют значительную гомологию с *tor* опероном *E. coli*. Позже в геноме *S. oneidensis* MR-1 был выявлен еще ген – *torF*, также, по-видимому, участвующий в восстановлении ТМАО [46]. Было установлено, что экспрессия гена *torF* индуцируется ТМАО, так же как и *tor* оперона [46].

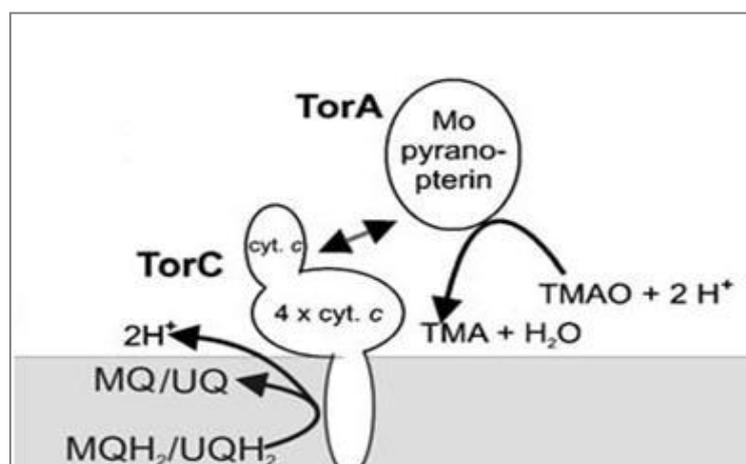


Рисунок 9. Схема организации ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 при анаэробном культивировании клеток в присутствии ТМАО. TorC – тетрагемовый цитохром, локализованный на внешней стороне цитоплазматической мембраны. MQ/MQH₂, UQ/UQH₂ – пул восстановленных/окисленных менахинонов-убихинонов. Иллюстрация из работы [136].

В результате поиска гомологичных генов было обнаружено несколько генов с неопределенной функцией в геномах протеобактерий из разных групп, тогда как в наиболее близких геномах *E. coli* и *V. cholerae* гомологи данного гена отсутствуют [46].

2.3.5.2. Восстановление тиосульфата и сульфита

При анаэробном культивировании в качестве акцептора электронов бактерия *S. oneidensis* MR-1 способна использовать серу и ее производные, в частности, сульфит и тиосульфат [143]. Однако, несмотря на интенсивное изучение анаэробного дыхания *S. oneidensis* MR-1, детальный механизм восстановления соединений серы остается к настоящему времени недостаточно изученным. В геноме *S. oneidensis* MR-1 был обнаружен кластер генов *psrABC*, характеризующийся высокой степенью гомологии (60-80%) с кластерами *psrABC*, кодирующими полисульфидредуктазный комплекс у *Salmonella typhimurium* LT2 и *Wolinella succinogenes*, соответственно [51]. Анализ первичной структуры белка PsrA *S. oneidensis* MR-1 и его функциональных доменов выявил наличие кластера 4Fe-4S, а также сайт связывания с молибдоптерин гуанин-динуклеотидом, необходимые для проявления полисульфидредуктазной активности. Как было показано экспериментально, делеция гена *psrA* приводит к неспособности *S. oneidensis* MR-1 использовать тиосульфат в качестве акцептора электронов при анаэробном культивировании [51].

Функциональная роль белков PsrB PsC аналогична белкам CymA, TorC, NapB, и заключается, по-видимому, в акцептировании электронов от хинонового пула и передаче их на периплазматическую редуктазу PsrA. На рисунке 10 приведена объединенная схема организации ветвей ЭТЦ при использовании в качестве акцептора электронов соединений серы. Помимо выявленной системы восстановления тиосульфата в процессе анаэробного культивирования у *S. oneidensis* MR-1 также была выявлена система восстановления сульфита. Первоначально часть оперона *sirABIGCDJKLM*, кодирующего ферменты

диссимиляции сульфита, была аннотирована как оперон *nrfGCD* кодирующий ферменты, осуществляющие восстановление нитрита [205].

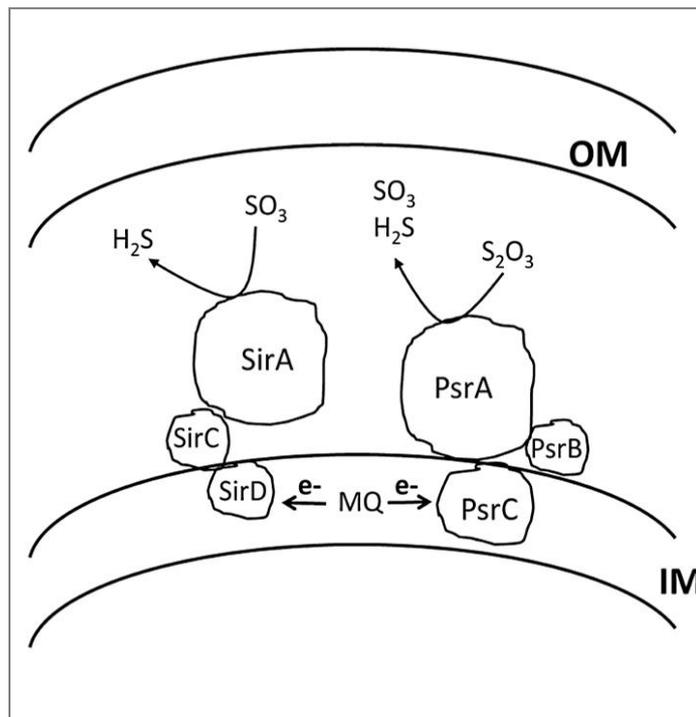


Рисунок 10. Общая схема организации ветвей ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 при анаэробном культивировании в присутствии тиосульфата и сульфита. OM – внешняя мембрана, IM – внутренняя мембрана клетки. MQ – пул менахинонов. Иллюстрация из работы [205].

В работе Shirodkar и соавторы [205] проведено детальное изучение генов, входящих в состав *sirABIGCDJKLM* оперона, для выявления генов, контролирующих восстановление сульфита у *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях. Авторами было установлено, что не все гены, входящие в данный оперон, участвуют в восстановлении сульфита. На основании компьютерного анализа первичных структур белков, кодируемых генами *sir* оперона, и данными, полученными на делеционных мутантах *S. oneidensis* MR-1 по выбранным генам, в восстановлении сульфита участвуют восьмигемовый цитохром SirA и комплекс SirCSirD [205]. Белок SirA, предположительно, является сульфитредуктазой, содержащей нехарактерный гем-связывающий домен NKGCH, также требующий

для присоединения гема участия дополнительного фермента – гемлиазы, как и в случае нитритредуктазы NrfA (см. 2.3.2.3.).

Комплекс белков SirCSirD выполняет аналогичную функцию тетрагемового цитохрома CymA, что впоследствии было подтверждено в работе по частичному функциональному замещению в ЭТЦ CymA комплексом белков SirCSirD [62]. Гены *sirEFG* обнаруживают высокую гомологию с генами *nrfEFG*, кодирующими субъединицы гемлиазы, необходимой для присоединения гема к нетипичному сайту CXXCK. Гены *sirJKLM* также обнаруживают высокую гомологию с генами *nosDFY*, *nosL*, кодирующими АТФ-связывающий домен медьсодержащего ABC-транспортера и шаперона, осуществляющего координацию кластера Cu-S в молекуле редуктазы N₂O (оксида азота (I)) у *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas stutzeri* [94, 236]. Однако, как было установлено экспериментально, *S. oneidensis* MR-1 не способна восстанавливать N₂O и, соответственно, не является бактерией-денитрификатором. Таким образом, роль белков, кодируемых генами *sirJKLM*, в настоящее время остается, невыясненной [64, 205]. Интересно отметить, схожесть белков NrfA и SirA *S. oneidensis* MR-1, содержащих нетипичные сайты для присоединения гема, и осуществляющих реакции восстановления за счет переноса 6-ти электронов. Этот факт мог бы быть объяснен наличием двойной активности (как нитритредуктазной, так и сульфитредуктазной) у нитритредуктазы ряда протеобактерий [131, 209]. Однако, сравнение SirA *S. oneidensis* MR-1 с потенциальными белками-гомологами не выявило гомологии ни с NrfA, ни сульфитредуктазами других протеобактерий, что, по-видимому, предполагает принадлежность SirA к новому классу сульфитредуктаз [205].

2.3.6. Механизмы передачи электронов при анаэробном дыхании

Многообразие акцепторов электронов, используемых при анаэробном дыхании *S. oneidensis* MR-1, предполагает несколько механизмов передачи электрона от конечного комплекса ЭТЦ на акцептор: прямой или с использованием молекул-переносчиков. Локализация (внеклеточная или

периплазматическая) и агрегатное состояние акцептора (растворимый или нет) также во многом определяют тип передачи электрона.

2.3.6.1. Прямая передача электрона

При прямой передаче электрона, в случае периплазматической локализации, с конечного звена ЭТЦ на акцептор, последний может быть только растворимым (нитрат, нитрит, фумарат, ТМАО), тогда как при внеклеточной прямой передаче электрона используются как нерастворимые (Fe(III), Mn(IV), электрод), так и растворимые соединения (например, ДМСО) [88, 136].

Следует отметить, что у *S. oneidensis* MR-1 восстановление ДМСО происходит по механизму, характерному для внеклеточного типа восстановления конечного акцептора, тогда как у *E. coli* и *Rhodobacter* ДМСО-редуктаза локализована в периплазме [137]. Диметилсульфоксид (ДМСО) обнаруживается в значительных концентрациях в водных экосистемах и появляется как в результате фотохимического окисления диметилсульфида, так и, в значительной мере, за счет жизнедеятельности микропланктона. Кроме того, он может быть результатом ферментативного расщепления диметилсульфониопропионата (ДМСП) [88]. ДМСП синтезируется микропланктоном и используется в качестве осморегулятора, криопротектора. Цикл окисления – восстановления ДМСО в морских экосистемах настоящее время остается недостаточно изученным. Особый интерес представляет исследование механизма восстановления ДМСО при анаэробном дыхании бактерий [88]. Указанное выше отличие в локализации конечного ДМСО-редуктазного комплекса у *S. oneidensis* MR-1, возможно, определяется особенностью местообитания данной бактерии.

Экспериментально было показано, что бактерия *S. oneidensis* MR-1 способна к аэробному и анаэробному росту при низких температурах [38, 88]. Авторы предполагают, что понижение температуры воды в озере Онейда в результате полного замерзания в зимние месяцы может приводить к затруднению транспорта ДМСО в клетки, либо за счет понижения скорости диффузии в клетку, либо в результате частичной сорбции ДМСО на частичках силикатов или кальцитов [88].

По-видимому, изменение локализации конечного ДМСО-редуктазного комплекса дает возможность *S. oneidensis* MR-1 использовать в качестве конечного акцептора ДМСО, что расширяет общий спектр акцепторов электронов, используемых при анаэробном дыхании в неблагоприятных условиях [88].

2.3.6.2. Перенос электронов с участием молекул-переносчиков

Другой механизм передачи электрона на конечный акцептор включает обязательное участие экзогенных и эндогенных молекул-переносчиков электронов [72, 156]. К ним могут быть отнесены флавины, AQDS (антрахинон-2,6-дисульфат) или витамин К₂ (аналог менахинонов). Участие AQDS в переносе электрона на конечный нерастворимый акцептор было установлено по компенсации способности, на фоне делеционных мутантов по гену *gspD*, к восстановлению Fe(III) за счет взаимодействия AQDS с MtrB и последующим переносом электрона на внеклеточный нерастворимый акцептор [71, 72]. Таким образом, переносчики электронов могут частично функционально замещать утраченный компонент в пути передачи электронов, связанный с нарушением транслокации белков через T2SS систему.

2.4. Регуляция анаэробного дыхания

Несмотря на обнаруженное ранее частичное сходство организации генов и механизмов регуляции экспрессии генов у *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli*, исследователями были выявлены некоторые ключевые различия в регуляции анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1.

Для хорошо изученного модельного объекта *E. coli* охарактеризовано, по крайней мере, несколько генов, кодирующих транскрипционные факторы, осуществляющие регуляцию экспрессии генов в условиях анаэробного дыхания. Переключение анаэробного и аэробного метаболизмов преимущественно регулируется несколькими путями: белком FNR (Fumarat Nitrat Regulator),

двухкомпонентной регуляторной системой Arc (Aerobic respiration control), а также глобальным белком-регулятором CRP [99, 197].

В геноме *S. oneidensis* MR-1 также были обнаружены гены-гомологи *arc*, *crp* и *fnr* (*etrA*) [93, 185]. Ген *etrA* был клонирован, выявлена его значительная гомология с геном *fnr E. coli* (73.6% идентичных аминокислот). Показана также возможность комплементации геном *etrA S. oneidensis* MR-1 делеционного мутанта $\Delta fnr E. coli$ [185]. В составе белка EtrA, также как и в составе белка Fnr, обнаружено 4 остатка цистеина, участвующие, по-видимому, в формировании кластера $[4Fe-4S]^{2+}$ [185].

Для выявления роли гена *etrA* в регуляции анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1 было получено несколько независимых мутантов по данному гену: делеционный (как было выявлено позднее, псевдоделеционный) два инсерционных и один делеционный мутант [65, 81, 133, 185]. Однако, полученные мутанты характеризовались противоречивыми фенотипическими характеристиками по способности к использованию разных акцепторов электронов при росте в анаэробных условиях. На основании данных, опубликованных в работах [81, 133], роль данного гена в регуляции анаэробного дыхания была определена как весьма незначительная. В результате проведения компьютерного анализа генома *S. oneidensis* MR-1, предположительные сайты связывания с EtrA были обнаружены в промотерных областях 160 генов [81]. Однако, ранее опубликованные данные по влиянию гена *etrA* на анаэробное дыхание, полученные на псевдоделеционном мутанте в работе Saffarini 1993 года [185], получили подтверждение в работе Cruz-García, опубликованной в 2011 году [65]. В данной работе приводятся данные по получению и характеристике инсерционного мутанта по гену *etrA S. oneidensis* MR-1 [65]. Этот мутант *S. oneidensis* MR-1 по гену *etrA* характеризуется значительным снижением скорости роста клеток в анаэробных условиях в присутствии нитрата, фумарата, ТМАО, тиосульфата, но не в присутствии оксидов Fe(III) или Mn(IV) [65]. Анализ транскриптомов при культивировании в анаэробных условиях мутанта по гену *etrA* и штамма дикого типа *S. oneidensis* MR-1, выявил как понижение, так и

повышение уровня экспрессии генов, регулируемых белком EtrA. В промотер-операторных областях у части этих генов или оперонов были обнаружены сайты связывания с белком EtrA [65]. По данным Cruz-García и соавторов [65] роль EtrA в регуляции генов не только анаэробного дыхания и сопряженного с этим метаболизма, но также генов транспозаз у *S. oneidensis* MR-1, значительно выше, чем предполагалось ранее [81, 133, 185].

Другой важной регуляторной системой, осуществляющей переключение метаболических путей и ЭТЦ в клетке при изменении условий культивирования, является Arc система [98]. Для бактерии *S. oneidensis* MR-1 описана ArcA система, имеющая некоторые отличия от Arc системы, охарактеризованной для *E. coli*. В геноме *S. oneidensis* MR-1 обнаружен полноразмерный ген *arcA*, а сравнение первичной структуры ArcA выявило высокую степень гомологии с ArcA белками из других γ -протеобактерий (80% идентичных аминокислот) [79]. Однако, полноразмерный второй ген *arcB*, входящий в состав Arc системы, в геноме не обнаружен. Предположительно, его функцию по фосфорилированию ArcA может выполнять белок HptA, обнаруживающий гомологию с Hpt доменом ArcB *E. coli*, что и было подтверждено экспериментально [87]. Функцию же сенсорного домена ArcB в этом случае выполняет новый белок ArcS.

Таким образом, у *S. oneidensis* MR-1 обнаружено два белка ArcS и Hpt, тогда как у *E. coli* соответствующие активности имеет один белок ArcB [115]. Делеционный по гену *arcA* мутант *S. oneidensis* MR-1 характеризуется нарушением способности к росту в аэробных условиях, а также к росту в анаэробных условиях в присутствии ДМСО [81]. Экспериментально было показано, что, в отличие от Arc системы *E. coli*, у *S. oneidensis* MR-1 Arc-белки не участвуют в регуляции цикла Кребса [79].

Для выявления роли белка CRP в регуляции анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1 методом транспозонного мутагенеза были получены мутанты по гену *crp* [186]. Анализ свойств полученных мутантов показал, что встраивание транспозона в ген *crp* у *S. oneidensis* MR-1 приводит к значительному снижению способности к анаэробному дыханию клеток в присутствии практически всех

акцепторов электронов: фумарата, ДМСО, нитрита, нитрата, Fe(III), Mn(IV), но не ТМАО [186]. Помимо потери способности к росту в анаэробных условиях, полученные мутанты по гену *crp* характеризовались понижением в 2-3 раза содержания гемов *c* в пересчете на общий белок клетки [81, 186]. Сравнение первичных структур белков CRP *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli* выявило достаточно высокую степень гомологии данных белков (88% идентичных аминокислот). Помимо этого, также обнаружено значительное сходство между CRP *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli* в структуре сайтов связывания цАМФ и ДНК-связывающем домене [186]. Экспериментально была показана комплементация делеционного мутанта по гену *crp* *S. oneidensis* MR-1 геном *crp* из *E. coli*, что также свидетельствует о высокой консервативности данного гена и соответствующего ему белка [186].

Дальнейший анализ мутантов *S. oneidensis* MR-1 по гену *crp* показал, что неспособность к анаэробному росту клеток в присутствии ДМСО и нитрата объясняется отсутствием у них ферментативной активности соответствующих конечных редуктаз, тогда как активность нитритредуктазы остается на уровне штамма дикого типа. Однако, следует отметить наличие низкого уровня активности фумаратредуктазы в клеточном лизате у этих мутантов. По-видимому, в аэробных условиях в клетках *S. oneidensis* MR-1, осуществляется конститутивная экспрессия гена *fccA*, тогда как в анаэробных условиях происходит активация экспрессии данного гена, опосредованная белком-активатором CRP [186]. Возможно, отсутствие активности нитратредуктазы и ДМСО-редуктазы может быть объяснена недостаточным насыщением гемами *c* соответствующих белков или же других цитохромов, входящих в состав ЭТЦ, за счет снижения общего содержания гемов *c* [81].

Добавление в среду цАМФ при аэробном культивировании *S. oneidensis* MR-1, приводит к появлению фумарат-, Fe(III)-редуктазной активности в клеточном лизате. Уровень активности данных ферментов в клеточном лизате сопоставим со значениями, установленными при анаэробном культивировании клеток. Однако, нитрат и ДМСО-редуктазная активность при этом не проявляется [186].

В ходе анализа промотер-операторных областей генов или оперонов, контролирующих различные ветви ЭТЦ, у большинства из них были выявлены потенциальные сайты связывания с белком CRP. По-видимому, у *S. oneidensis* MR-1 значительная роль в активации экспрессии генов, участвующих в процессе анаэробного дыхания, принадлежит белку-активатору CRP [73, 186], тогда как у *E. coli* такую функцию выполняют белок FNR.

Наличие такой разветвленной и сложной системы анаэробного дыхания в сочетании со способностью к восстановлению металлов, делает *S. oneidensis* MR-1 перспективным объектом для разработки новых высокоактивных штаммов для последующего использования в микробных топливных элементах (МТЭ).

2.5. Использование *S. oneidensis* MR-1 в МТЭ

Возможность прямой передачи электронов на анод, как акцептор электронов, при анаэробном культивировании клеток *S. oneidensis* MR-1 была впервые установлена в 1999 году [104]. Это свойство позволило широко использовать *S. oneidensis* MR-1 в микробных топливных элементах для исследования механизмов передачи электронов с внешней мембраны на электрод и генерации электрического тока [16]. При этом центральной и актуальной задачей на пути создания данного вида источника энергии является повышение продуктивности (увеличение плотности генерируемого тока) при культивировании *S. oneidensis* MR-1 в МТЭ. На рисунке 11 представлены типы передачи электрона от клетки электрогенного микроорганизма на анод в процессе культивирования в МТЭ. На основании установленных вариантов может быть разработан ряд подходов, направленных на повышение продуктивности МТЭ. Первый тип подходов включает в себя модификацию микроорганизма, второй – увеличение роли медиаторов при переносе электрона от клетки к аноду, третий – изменение конструкции МТЭ. В связи с тем, что третий подход является сугубо техническим, ниже будут рассмотрены первые два подхода. Одним из подходов к увеличению продуктивности МТЭ является получение мутантов *S. oneidensis* MR-1, с повышенным уровнем генерации плотности тока, при их культивировании в

МТЭ. Однако, недостаточно изученные механизмы и пути передачи электронов на электрод не позволяют заранее однозначно прогнозировать конкретные гены, инактивация (или гиперэкспрессия) которых в результате мутагенеза, может привести к увеличению плотности тока при культивировании соответствующего мутантного штамма в МТЭ.

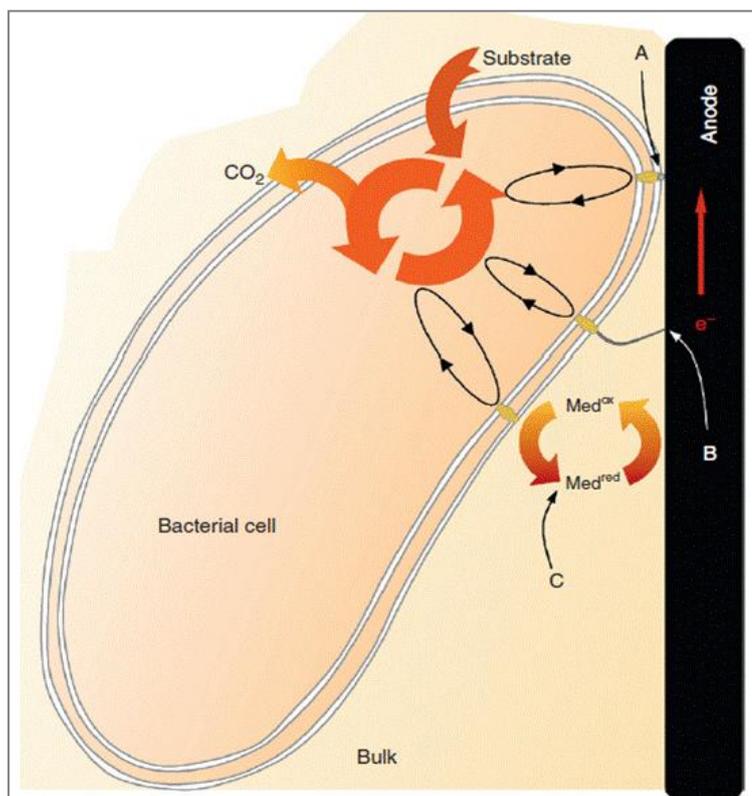


Рисунок 11. Схема путей передачи электрона от клетки электрогенной бактерии на анод в процессе культивирования в МТЭ. Буквами обозначены типы передачи: А – прямая передача электрона с цитохромного комплекса, локализованного на внешней стороне периплазматической мембраны, В – передача электрона с помощью пилей, С – передача электрона за счет медиатора. Иллюстрация из работы [227].

На основании предложенных ранее механизмов анаэробного дыхания с различными акцепторами электронов в работе [48] для получения делеционных мутантов и определения их влияния на уровень плотности генерируемого тока были выбраны гены разных ветвей ЭТЦ (*mtrA,B,C*; *omcA*, *napB*, *dmsC*, *nrfA* и др.), а также гены, контролирующие образование пилей или участвующие в

транспорте белков в системе секреции II типа (*pilD*, *gspD*, *gspG*). Делеция этих генов, участвующих в ЭТЦ при анаэробном дыхании, сопряженном с восстановлением металлов, а также генов системы секреции II типа и образования пилей привела к значительному снижению плотности тока у мутантов. Однако, ряд делеционных мутантов по генам, вовлеченным в восстановление ДМСО (*ΔdmsC*), нитрата (*ΔnarB*) и нитрита (*ΔnrfA*), характеризовались повышением уровня плотности тока в среднем на 20% по сравнению со штаммом дикого типа [48].

В настоящее время литературные данные не дают четкого ответа о причинах такого изменения уровня генерации тока. Обнаруженное увеличение плотности тока, по-видимому, может объясняться несколькими причинами:

- перенаправлением потока электронов с альтернативных цепей передачи электронов (на нитрат, нитрит, ДМСО).
- возможному повышению у мутантов способности к образованию биопленок.
- изменением регуляции транскрипции или трансляции другой группы цитохромов [45].

Таким образом, получение мутантов *S. oneidensis* MR-1 характеризующихся генерацией повышенной плотности тока в МТЭ, за счет целенаправленной инактивации выбранных генов представляет в настоящее время достаточно сложную задачу. Более эффективным методом получения таких мутантов является транспозонный или химический мутагенез, с последующей прямой селекцией мутантов по способности к повышенной генерации плотности тока.

В работе японских авторов [109] описано получение методом транспозонного мутагенеза мутанта *S. oneidensis* MR-1, способного к генерации высокой плотности тока (увеличение до 50% по сравнению со штаммом дикого типа) при культивировании в МТЭ. Идентификация места инсерции транспозона выявила локус SO_3177. Авторами было установлено, что данный ген вовлечен в контроль биосинтеза полисахаридной оболочки и находится в кластере генов, аннотированных как контролирующие биосинтез полисахаридной оболочки.

Данный мутант характеризовался измененной морфологией колоний и более высокой степенью адгезии клеток на углеродном аноде, при культивировании штамма в МТЭ. Однако, следует отметить, что данный ген является уникальным и присущим именно для вида *S. oneidensis* MR-1, поскольку гомологичные гены не были обнаружены в других представителях данного рода [106]. Наличие этого гена, по-видимому, может определять значительные различия в плотности заряда полисахаридной капсулы между *S. oneidensis* MR-1 и остальными представителями данного рода [106]. Таким образом, было предположено, что на процесс генерации электрического тока, в значительной степени, может оказывать влияние структура полисахаридной капсулы клетки [109]. Позже, с использованием данного подхода, было получено еще два мутанта с повышенной электрогенной активностью и увеличенной способностью к адгезии на углеродном электроде [213], как и вышеописанный мутант по локусу SO_3177. Идентификация внесенных мутаций выявила два гена: SO_3350 *pilU*, контролирующий биосинтез пилей, и SO_4704, функция которого, пока не установлена. Вместе с тем, следует отметить, что, наряду с указанными мутантами, были получены и другие, характеризующиеся сниженной электрогенной активностью по сравнению со штаммом дикого типа. Анализ показал, что мутации локализованы в локусах SO_3171 – SO_3174, также входящих в кластер, контролирующий биосинтез полисахаридной оболочки у *S. oneidensis* MR-1 [213]. Этот факт ставит под сомнение ключевую роль уровня адгезии клеток в эффективности продуцирования энергии.

В литературе имеются также данные о получении с использованием химического мутагена (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин) мутантных форм *S. oneidensis* MR-1 с повышенной редуцирующей активностью. При этом в результате мутагенеза были получены мутанты двух типов, отобранные по повышенной устойчивости к антибиотику фосфомицину и характеризующиеся повышенной скоростью утилизации лактата и увеличенной редуцирующей активностью [10]. Культивирование полученных мутантов в МТЭ подтвердило их способность к генерации повышенной плотности тока по сравнению со штаммом

дикого типа [11]. Однако, точная локализация внесенных мутаций в цитируемой работе [10] определена не была.

Помимо получения штаммов с повышенным уровнем генерации плотности тока, перспективным подходом является целенаправленная модификация генома *S. oneidensis* MR-1 методами искусственной регуляции уровня экспрессии отдельных генов. Это, в свою очередь, может приводить как к пониманию роли отдельных генов в формировании электрогенности клеток *S. oneidensis* MR-1, так и к повышению уровня генерируемой плотности тока у модифицированного штамма. Примером успешной модификации такого рода является изменение кластера генов оперона *mtr*, за счет делеции гена *omcA*, замены аутентичной промотерной области на индуцируемый арабинозный промотер, а также введение гена-гомолога *mtrF* вместо гена *mtrC* в опероне *mtrCAB* [85]. В результате проведения описанных модификаций, полученный штамм характеризовался повышением уровня плотности генерируемого тока [85].

Кроме вышеуказанных вариантов изменения бактерии *S. oneidensis* MR-1, для получения штаммов с повышенной генерацией плотности тока была предпринята попытка получения штамма *S. oneidensis* MR-1, способного к утилизации глюкозы [56]. Для этого авторами были получены штаммы-трансформанты *S. oneidensis* MR-1, содержащие рекомбинантные плазмиды с генами *glf* (глюкозный транспортер) и *glk* (глюкокиназа) из *Zyotomonas mobilis*. В ходе эксперимента по определению способности к утилизации глюкозы у штаммов-трансформантов было выявлено, что только наличие плазмиды с двумя генами дает трансформанту способность к утилизации глюкозы. Дальнейшее исследование данного штамма в МТЭ выявило его способность к генерации повышенной плотности тока при культивировании рекомбинантных клеток в присутствии глюкозы, в качестве источника углерода [56]. Эти данные позволяют предположить новое направление в модификации генома *S. oneidensis* MR-1 для получения штамма, характеризующегося способностью к повышенной генерации плотности тока при культивировании на более распространенном и дешевом источнике углерода, как глюкоза. Приведенные в вышеуказанных работах

успешные результаты по целенаправленной модификации генома бактерии *S. oneidensis* MR-1 с целью получения МТЭ, генерирующих высокую плотность тока при анаэробном культивировании в них клеток *S. oneidensis* MR-1, показывают, что это направление поиска является не только результативным, но и достаточно перспективным.

Другим возможным подходом к увеличению продуктивности МТЭ является добавление в среду культивирования *S. oneidensis* MR-1 различных медиаторов, ускоряющих передачу электронов на анод, или приводящих к увеличению способности образования биопленок. Например, было показано, что добавление Fe(III) как в стартовую среду для культивирования, так и после образования биопленки на аноде, приводит к значительному возрастанию электрической мощности МТЭ, увеличению общей биомассы культивируемых клеток, а также увеличению секреции флавинов [235]. Как следует из литературных источников, флавины и, в частности, рибофлавин и флавин-моноклеотид, являются природными медиаторами, секретлируемыми в окружающую среду, и служащими для передачи электронов с внешних цитохромных комплексов на конечные нерастворимые акцепторы [54, 135]. Добавление экзогенных флавинов в среду при культивировании *S. oneidensis* MR-1 в МТЭ приводит к увеличению плотности тока (мощности) МТЭ [224]. В последнее время появились также данные, свидетельствующие, о важной роли флавинов при восстановлении нерастворимых акцепторов электронов. Было показано, что делеционный мутант, не способный к секреции флавинов, при культивировании в МТЭ характеризуется пониженной плотностью тока по сравнению со штаммом дикого типа, тогда как добавление экзогенных флавинов полностью восстанавливало этот параметр [107]. Следует отметить увеличенное число копий генов биосинтеза рибофлавина в геноме *S. oneidensis* MR-1, тогда как в геномах *Bacillus subtilis* и *E. coli* обнаружено только единичные копии генов биосинтеза рибофлавина. Регуляция экспрессии этих генов у *B. subtilis* и *E. coli* осуществляется за счет связывания FNM с сайтом связывания RFN, что приводит к закрытию сайта для посадки рибосом и приводит к снижению синтеза рибофлавина [49]. В промотер-

операторной части рибофлавиновых оперонов *S. oneidensis* MR-1 сайт RNF обнаружен только перед частью оперонов, что приводит к формированию двух экспрессионных вариантов: репрессируемый и практически конститутивный. По-видимому, наличие этих двух независимых вариантов синтеза рибофлавина необходимо *S. oneidensis* MR-1 для разделения синтеза флавинов используемых внутриклеточно и секретируемых в среду [49]. Как было показано [238] позднее, увеличение секреции флавинов, может происходить при увеличении значения pH среды культивирования, что, в свою очередь, увеличивает продуктивность МТЭ.

Экспериментально также показано, что увеличение агрегации бактерий *S. oneidensis* MR-1 и ускорение образование биопленки при культивировании в МТЭ может приводить к увеличению мощности МТЭ. В литературе имеются данные о влиянии ионов Ca^{2+} на способность к агрегации у бактерии *S. oneidensis* MR-1 [138]. Недавно было обнаружено, что добавление ионов Ca^{2+} в среду при культивировании в МТЭ приводит к увеличению мощности элемента только за счет увеличения степени агрегации бактерий [77]. Однако, однозначного подтверждения решающего влияния именно этого фактора на уровень активности МТЭ на основе бактерий *S. oneidensis* MR-1 в литературе до сих пор не приведено.

2.6. Применение *S. oneidensis* MR-1 в качестве штамма-реципиента для гетерологичной и гомологичной экспрессии

Особый интерес к *S. oneidensis* MR-1 как к штамму-реципиенту при создании системы для гомо- и гетерологичной экспрессии определяется, в первую очередь, ее способностью к пост-трансляционной модификации рекомбинантных белков. В частности, одной из таких характеристик бактерии *S. oneidensis* MR-1 является не только ее способность к специфическому присоединению гемов не только к типичным сайтам у белков, но и к нетипичным, требующим дополнительного участия гемлиазы. Кроме того, *S. oneidensis* MR-1 обладает системой для пост-модификации белков, путем присоединения атомов, Fe-Fe или Ni-Fe в активный центр ферментов. Изучение структуры и функции таких белков

из широкого круга микроорганизмов представляет значительный интерес. Однако, получение функционально активных форм данных белков в «классической» системе *E. coli* имеет ряд существенных ограничений. Попытки экспрессии мультигеновых цитохромов в *E. coli* выявили трудности, связанные с необходимостью использования штамма-реципиента с делеционным геном периплазматической протеазы *degP*, для предотвращения деградации апо-цитохромов в периплазме, а также необходимостью проводить ко-экспрессию *Ssm*-оперона, обеспечивающего полноценное созревание цитохромов в периплазме [39, 82, 188]. И, хотя уровень накопления рекомбинантных белков при гетерологичной экспрессии генов в клетках *S. oneidensis* MR-1, как правило, ниже, чем при аналогичной экспрессии в клетках *E. coli*, ферментативная активность полученного рекомбинантного белка значительно выше, за счет гораздо более полной и аутентичной посттрансляционной модификации, осуществленной в клетках *S. oneidensis* MR-1 [211].

В ряде исследований также показана возможность использования плазмидных векторов разработанных для *E. coli*, что, отчасти, облегчает поставленную задачу при работе с *S. oneidensis* MR-1 [148]. Наличие собственной мегаплазмиды не мешает как проведению трансформации клеток *S. oneidensis* MR-1 плазмидами на основе репликонов p15A и pMB1, так и дальнейшему культивированию полученных трансформантов [148]. Однако, несмотря на высокую практическую необходимость такой экспрессионной системы, успешных результатов гетерологичной или гомологичной экспрессии к настоящему моменту описано в литературе не так много, и большая часть из них получена сравнительно недавно [25, 26, 190, 191, 199, 200, 220, 239]. Данные по получению белков в клетках *S. oneidensis* MR-1 представлены в таблице 1.

Особый интерес, связанный непосредственно со способностью *S. oneidensis* MR-1 к эффективному синтезу цитохромов, был обращен исследователями именно к разработке подходов к получению рекомбинантных цитохромов. Сами цитохромы представляют интерес как объекты для теоретических исследований (свойства, структура-функция и т.д.), так и в практических целях (например, как

основа для получения покрытия с особыми электрохимическими свойствами, лекарственные средства) [101, 161, 215].

Таблица 1. Рекомбинантные белки, полученные в результате гомо- и гетерологичной экспрессии соответствующих генов в клетках *S. oneidensis* MR-1.

№	Белок	Организм	Промотор	Штамм-реципиент	Ссылка
1	Цитохром C3	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	P _{lac}	<i>S. oneidensis</i> MR-1 TSP-C	[159]
2	Цитохром C3	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	P _{lac}	<i>S. oneidensis</i> MR-1 TSP-C	[160]
3	Hmc	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	P _{lac}	<i>S. oneidensis</i> MR-1 TSP-C	[160]
4	Мутантные формы с3 14 вариантов	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	P _{lac}	<i>S. oneidensis</i> MR-1 TSP-C	[161], [215]
5	MtrA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[199]
6	DVU3171	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[199]
7	OmcA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[200]
8	MtrC	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[200]
9	Цитохром C	<i>Homo sapience</i>	P _{lac}	<i>S. oneidensis</i> MR-1 TSP-C	[214]
10	HydAI [Fe-Fe]	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	P _{lac}	$\Delta hydA\DeltahyaB$ <i>S. oneidensis</i> MR-1	[211]
11	HyuAHyaB [Ni-Fe]	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{lac}	$\Delta hydA\DeltahyaB$ <i>S. oneidensis</i> MR-1	[203]
12	CcpA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[191]
13	MtrB	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta mtrB$	[190]
14	FccA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[190]
15	ccNir	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{lac}	<i>S. oneidensis</i> MR-1 TSP-C	[239]
16	MtrF	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[59]
17	OmcA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[220]
18	MtoA	<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1	T5	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta mtrA, \Delta mtrB-\Delta mtrD$	[126]
19	CymA	<i>S. oneidensis</i> MR-1	P _{ara}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[83]
20	Fdh	<i>Moraxella sp</i>	P _{udp} (<i>E. coli</i>)	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[26]
21	Udp	<i>Escherichia coli</i> MG1655	P _{udp} (<i>E. coli</i>)	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[25]
22	P4501A	<i>Goldfish (Carassius auratus)</i>	P _{lac}	<i>S. oneidensis</i> MR-1	[55]

Первая работа по гетерологичной экспрессии в *S. oneidensis* MR-1 опубликована в 2000 году. Авторами был получен штамм-продуцент тетрагемового цитохрома *c3* из *Desulfovibrio vulgaris*. Выход рекомбинантного белка при культивировании в аэробных и анаэробных условиях составил 1.9 и 1.0 мг/л культуры, соответственно [159]. Следующим объектом для гетерологичной экспрессии стали тетрагемовый цитохром *c3* и шестигемовый цитохром из *D. vulgaris*. Для повышения эффективности трансформации авторы использовали метод электропорации при введении вектора на основе pUC в клетки *S. oneidensis* MR-1 TSP-C. Эти данные опровергли более ранние наблюдения о невозможности репликации векторов на основе pUC в клетках *S. oneidensis* MR-1 [148]. Выход рекомбинантного тетрагемового цитохрома *c3* составил 8.3 мг/л культуры. Шестигемовый цитохром размером 66.5 кДа также был наработан в клетках *S. oneidensis* MR-1 и выделен, однако выход этого белка составил значительно меньше 0.5 мг/л культуры [160]. Помимо исследования физико-химических параметров природных цитохромов, значительный фундаментальный интерес представляет выяснение роли отдельных аминокислотных остатков в формировании третичной и четвертичной структуры белка, их участия в ковалентном присоединении гема, роли в функционировании белковой молекулы в целом. В настоящее время эти исследования, чаще всего, проводятся с применением рентгеноструктурного анализа кристаллов рекомбинантного белка и его мутантных форм [160, 220]. Так, на основе разработанной системы экспрессии в *S. oneidensis* MR-1 авторами работы [160] с использованием сайт-направленного мутагенеза был получен ряд мутантных форм (14 вариантов) гена цитохрома *c3*. Экспрессия полученных мутантных форм гена в клетках *S. oneidensis* MR-1 позволила получить серию рекомбинантных мутантных цитохромов *c3*, выделение и кристаллизация которых внесла существенный прогресс в изучение особенностей структуры и механизма функционирования этого класса белков [161, 215].

В работе Liang Shi и соавторы впервые описали использование экспрессионной плазмиды pBADT0PO (Invitrogen), разработанной для *E. coli*,

содержащей индуцибельный арабинозный промотер и ген устойчивости к канамицину [199]. В результате проведения с использованием этого вектора гомологичной и гетерологичной экспрессии генов мультигемовых цитохромов MtrA из *S. oneidensis* MR-1 (10 гемов) и DVU3171 (4 гема) из *D. vulgaris* в клетках штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1 были получены соответствующие рекомбинантные цитохромы [199]. С использованием этой же экспрессионной системы в 2006 году была проведена гомологичная экспрессии мультигемовых цитохромов OmcA и MtrC. Рекомбинантные цитохромы накапливались в нерастворимой форме, однако были успешно выделены для дальнейших исследований [200].

Одной из проблем, возникающих при гетерологичной экспрессии, является транслокация рекомбинантного белка в периплазму для дальнейшей посттрансляционной модификации белка. Использование собственного лидерного пептида белка в клетках *S. oneidensis* MR-1 может быть не всегда эффективным. Для решения этой проблемы в 2007 году была предпринята попытка создания универсальной системы для получения зрелых форм белков в *S. oneidensis* MR-1 [214]. Авторы сконструировали универсальный вектор, содержащий фрагмент ДНК, кодирующий лидерный пептид тетрагемового цитохрома STC из *S. oneidensis* MR-1, обнаруженного в значительном количестве в периплазме клеток при их культивировании в анаэробных условиях, для вывода рекомбинантного белка в периплазматическое пространство. Гибридный ген находился в составе плазмиды под контролем Lac-промотора. В качестве штамма-реципиента авторы использовали модифицированный штамм *S. oneidensis* MR-1 TSP-C, имеющий устойчивость к рифампицину. В результате проведения гетерологичной экспрессии гена цитохрома C человека выход рекомбинантного белка составил 12.3 мг/л культуры. Полное отщепление лидерного пептида подтвердил анализ N-концевой части белка, также было подтверждено наличие гемов в белке. Для более полного насыщения рекомбинантного цитохрома гемами авторы рекомендовали проводить культивирование в микроаэробных условиях, с пониженным содержанием кислорода [214].

Изучение ферментов, содержащих в своем составе кластеры металлов, также представляет значительный интерес. Однако, гетерологичная экспрессия таких белков может быть затруднена или ограничена наличием у штамма-реципиента систем модификации апо-белка. В работе [211] описана экспрессия гена гидрогеназы HydAI [Fe-Fe] из *Chlamydomonas reinhardtii* под контролем Lac-промотора в двойном делеционном штамме *S. oneidensis* MR-1 ($\Delta hydA \Delta hyaB$). Использование двойного мутанта в качестве штамма-реципиента было необходимо для исключения альтернативных мишеней для белков, осуществляющих присоединение атомов Fe. Выход рекомбинантного белка составил 0.4-0.5 мг на литр культуры, что меньше уровня достигнутого при экспрессии данного гена в *E. coli* (0.8-1.0 мг на литр культуры). Однако, удельная ферментативная активность рекомбинантной гидрогеназы HydAI [Fe-Fe], полученной в клетках *S. oneidensis* MR-1 ($\Delta hydA \Delta hyaB$), как и ожидалось, была значительно выше – 700 микромоль H_2 в минуту (в случае *E. coli* – 150). Количественный анализ содержания ионов железа показал наличие 6-ти атомов железа на молекулу белка, что свидетельствует об эффективной работе системы пост-трансляционной модификации и созревания белков в *S. oneidensis* MR-1. Следует отметить, что такие данные были получены только при гетерологичной экспрессии в двойном делеционном штамме $\Delta hydA \Delta hyaB$ в анаэробных условиях и при использовании в качестве акцептора электронов тиосульфата, DMSO, ТМАО. Экспрессия в штамме дикого типа в этом случае давала значительное понижение ферментативной активности (135 микромоль H_2 в минуту на миллиграмм) и недостаточное насыщение железом (0.03-0.6 атомов Fe на молекулу белка). Такое снижение содержания железа в молекулах рекомбинантного белка может быть обусловлено переключением белков системы насыщения на собственные гидрогеназы штамма реципиента HydA HyaB. Использование нитрата, фумарата или Fe(III) в качестве акцепторов электронов также давало значительное снижение насыщения белка железом, что объясняется активацией экспрессии генов оперона *hydEFG* (гены, кодирующие белки системы присоединения атомов железа) в соответствующих условиях [211].

С использованием описанного выше подхода также была проведена гомологичная экспрессия гена [Ni-Fe]-гидрогеназы из *S. oneidensis* MR-1 в двойном делеционном штамме $\Delta hydA\Delta hyaB$ под контролем арабинозного промотера в анаэробных условиях с использованием ДМСО в качестве акцептора электронов. Данные по уровню накопления рекомбинантного белка в работе не приведены, но авторами утверждается, что полученная рекомбинантная [Ni-Fe] гидрогеназа была получена в активной форме [203].

Эффективность секреции рекомбинантного белка в периплазму при экспрессии в клетках *S. oneidensis* MR-1 может в значительной степени зависеть от структуры лидерного пептида. В работах Schütz описана замена лидерного пептида цитохром с пероксидазы (CspA) и белка MtrB на лидерный пептид белка OmpA из *E. coli* при гомологичной экспрессии этих белков в *S. oneidensis* MR-1 [190, 191]. Температура, при которой осуществлялось культивирование штамма-продуцента белка CspA, была понижена до 14⁰С после индукции культуры 10 мМ арабинозой. Полученный рекомбинантный белок CspA был выделен и кристаллизован [191]. Увеличение уровня накопления рекомбинантного белка при замене аутентичного лидерного пептида показано также в работе по гомологичной экспрессии в клетках *S. oneidensis* MR-1 гена цитохром с нитритредуктазы ccNir. Описанная в работе замена собственного лидерного пептида, в сочетании с оптимизацией кодонов при химическом синтезе гена привела к существенному увеличению уровня накопления рекомбинантного белка: с 0.5-1.0 мг/л до 20.0 мг/л культуры [239].

Помимо наличия лидерного пептида, важную роль в эффективной гетерологичной экспрессии генов цитохромов может играть замена первой аминокислоты в гибридном белке после лидерного пептида. В работе [55] приводятся данные, свидетельствующие о значительном возрастании эффективности экспрессии гена эукариотического цитохрома P4501A при введении замены стартового метионина в цитохроме P4501A на лизин. Гетерологичная экспрессия эукариотического цитохрома P4501A в клетках *S.*

oneidensis MR-1 осуществлялась на основе ранее опубликованной экспрессионной системы [214].

Как указывалось выше, в последнее время становится все более актуальным получение рекомбинантных цитохромов, особенно мультигемовых, как для определения основных физико-химических свойств этих белков, так и для выяснения с использованием рентгеноструктурного анализа (РСА) особенностей их строения и механизма действия. Так, опубликованы данные об успешной гомологичной экспрессии в *S. oneidensis* MR-1 10-ти гемового цитохрома MtrF с последующей кристаллизацией и определением физико-химических параметров белка [59].

Пост-трансляционная модификация белка при гетерологичной экспрессии имеет большое значение для дальнейшего использования рекомбинантного белка. В работе по получению рекомбинантного цитохрома OmcA из *S. oneidensis* MR-1 для последующего получения кристалла и проведения рентгеноструктурного анализа описано введение делеции N-концевого остатка цистеина для исключения присоединения липидного остатка [220]. Исключение образования липопротеина позволило успешно провести кристаллизацию рекомбинантного белка OmcA с последующим проведением РСА. Гомологичная экспрессия осуществлялась в вышеописанной системе [199]. В целом, следует отметить, что получению рекомбинантных белков методами гомо- и гетерологичной экспрессии с использованием клеток *S. oneidensis* MR-1 в настоящее время уделяется достаточно большое внимание (Таблица 1).

Одним из интересных аспектов использования системы для гетерологичной экспрессии на основе *S. oneidensis* MR-1 является возможность идентификации и подтверждения функций для белков-ортологов цитохромов из других металл-редуцирующих бактерий.

Хорошо отработанная система получения делеционных мутантов штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1, позволяющая исключать влияние собственного белка-гомолога, делают этот подход удобным для широкого применения в лабораторной практике. Одним из таких примеров является гетерологичная

экспрессия гена-ортолога *mtrA* *S. oneidensis* MR-1 *mtoA* из *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 под контролем промотера T5 в клетках *S. oneidensis* MR-1. В качестве штамма-реципиента использовали делеционный штамм $\Delta mtrA$, $\Delta mtrB$ - $\Delta mtrD$ бактерии *S. oneidensis* MR-1. И, хотя выход рекомбинантного белка в статье не приводится, однако указывается, что при экспрессии данного гена в штамме дикого типа уровень накопления рекомбинантного белка ниже в 2-3 раза. [126].

Таким образом, приведенные выше литературные данные позволяют заключить, что в настоящее время *S. oneidensis* MR-1 стала объектом особо пристального внимания исследователей. Причиной этому является, прежде всего, фундаментальный интерес к особенностям метаболизма этого микроорганизма.

Таким образом, дальнейшая разработка эффективных экспрессионных систем на основе штамма *S. oneidensis* MR-1 для получения рекомбинантных цитохромов, металлосодержащих ферментов (гидрогеназ) представляет собой в настоящее время актуальную задачу. Помимо этого, также важным является всестороннее изучение различных аспектов, как регуляции, так и самого механизма анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1. Это позволит получить не только фундаментальные знания об особенностях функционирования генома бактерии, но и откроет возможности для целенаправленной его модификации при использовании данного микроорганизма в качестве штамма-реципиента для гомо- и гетерологичной экспрессии целевых генов, а также при создании нового поколения высокоэффективных МТЭ.

3. Материалы и методы

3.1. Материалы

Реактивы. В работе использовали: агарозу (Type I, Low EEO), SDS, EDTA, бромистый этидий, персульфат аммония, акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид фирмы «Serva» (Германия), TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин) – «Fluka» (Швейцария), Трис-основание (Tris-OH), Трис-гидрохлорид (Tris-HCl), борная кислота, ЭДТА – «Sigma» (США), агар «Bacto», триптон «Bacto», дрожжевой экстракт «Bacto» – «Difco» (США), TSB (Tryptone Soy Broth) – «Sigma»(США), ампициллин «AppliChem» (Германия), канамицин «ОАО Синтез» (Россия), NAD-окисленный «AppliChem» (Германия), лактат натрия, фумарат натрия, формиат натрия – «Sigma» (США), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты «МБИ Fermentas» (Литва). Также в работе применяли неорганические соли фирм «Merck» (Германия), «Sigma» (США) и реактивы квалификации х.ч. и о.с.ч. отечественного производства. Использовали ДНК-маркеры молекулярной массы серии «GeneRuler» и белковые маркеры молекулярной массы «Unstained Protein Molecular Weight Marker» фирмы «МБИ Fermentas» (Литва).

Ферменты. В работе использовали рестрицирующие эндонуклеазы BamHI, BglII, Sall, HindIII, SacI, XhoI, *Taq*-полимеразу и ДНК-лигазу фага T4 производства «МБИ Fermentas» (Литва). Ферменты использовали в соответствии с рекомендациями фирм-производителей.

Бактериальные штаммы и плазмиды. Штаммы *E. coli* K-12 MG1655, JM110, C600 Δ udpRecA⁻ (*thi thrB leuB lacY supE tonA recA Tn10*), а также плазмиды pUC19 и pACYC177 получены из ВКПМ ФГУП ГосНИИгенетика. Штамм *S. oneidensis* MR-1 получен из коллекции микроорганизмов Института Пастера (№ СIP106686, Франция). Плазмиды pUU18 [4] и pUC18Rudp [5] сконструированы ранее в лаборатории молекулярной биологии ФГУП ГосНИИгенетика. Плазмида pFDH, содержащая клонированную последовательность гена NAD⁺-зависимой

формиадегидрогеназы из *Moraxella* sp, любезно предоставлена Тишковым В.И. (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва).

Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе приведены в таблице 2.

Таблица 2. Структура олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе.

Название	Последовательность 5'-3'	Сайт рестрикции
Shud1	TATAG <u>AGCTCT</u> GGCGTACTCCTTGTCGTC	SacI
Shud2	TATAG <u>TCGACTT</u> ACGCGAGTAATTTCTTAGCT	SalI
Shud3	TATAG <u>GATCCC</u> GTGAAAACCCCTTTCATTTTGAT	BamHI
NKm	CTACAAAAGCTTTTGTTTATTTTTC	HindIII
CKm	CTTGGTCAAGCTTTTAGAAAAACTCATC	HindIII
C212SR	TCACACCCGCCACTGAGGCAGCA	Нет
C212SF	TGCTGCCTCAGTGGCGGGTGTGA	Нет
FDB	ATAT <u>AGATCT</u> ATGGCCAAGGTTGTTTGCGTT	BglII
FDX	ATAT <u>CTCGAGTC</u> AGGCGTCGAGCTTTTCGT	XhoI

Примечание: подчеркнут введенный в нуклеотидную последовательность сайт рестрикции.

3.2. Методы

Выделение плазмид проводили с использованием набора «GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit» производства «MBI Fermentas», (Литва). Клетки *E. coli*, содержащие плазмиду, культивировали в течение 16-18 часов в стеклянных пробирках со средой LB и соответствующим антибиотиком (ампициллин – 150 мкг/мл, канамицин – 50 мкг/мл) при 37⁰С и 250 об/мин. в шейкере-инкубаторе «Excella E25» («New Brunswick Scientific», США).

Препаративное и аналитическое электрофоретическое разделение ДНК проводили в агарозном геле с использованием буфера TBE при напряженности

электрического поля 5 В/см согласно [187]. Бромистый этидий добавляли до конечной концентрации 5 мг/л непосредственно в расплавленную агарозу перед заливкой геля.

Для **препаративного выделения ДНК** из геля использовали набор «DNA Extraction Kit», «МВІ Fermentas», (Литва). Выделенную ДНК осаждали этанолом согласно [183] и растворяли в бидистиллированной воде.

Гидролиз ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции фирмы «МВІ Fermentas» (Литва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя для конкретного фермента. Реакции проводили в объеме 10-20 мкл.

Лигирование ДНК проводили с использованием ДНК-лигазы фага Т4 «МВІ Fermentas», (Литва) в объеме 25 мкл в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя фермента. Молярное отношение фрагмент/плазида составляло 5/1 при лигировании фрагмента ДНК с линейаризованной плазмидой

Первичную структуру ДНК определяли в Центре коллективного пользования ФГУП ГосНИИГенетика с использованием автоматического секвенатора «Beckman Coulter» (США).

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли на автоматическом синтезаторе ASM-800 («БИОССЕТ», Россия) и очищали согласно [2].

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «Eppendorf Mastercycler gradient» («Eppendorf», Германия) в общем объеме 20 – 25 мкл в условиях: 2 – 3 мМ MgCl₂, 0.125 – 0.2 мМ каждого из dNTP, 67 мМ Tris-HCl (pH8.3), 16.5 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.5 ед. Taq-полимеразы, 1 – 10 нг ДНК, 5 пмоль каждого праймера. Режим амплификации (°С/сек): 95/120 – 1 цикл; 95/10, 60/10, 72/20 – 25-30 циклов; 72/180 – 1 цикл.

Трансформацию клеток *E. coli* плазмидами проводили согласно [187]. Трансформацию *S. oneidensis* MR-1 плазмидной ДНК проводили по методу [148].

Разрушение клеток осуществляли с помощью ультразвукового дезинтегратора «Ultrasonic Processor» («Cole Parmer», США).

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [47] с использованием реагента «Bio-Rad Protein Assay» («Bio-Rad», США) по протоколу «High concentration assay» от производителя. В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина («Sigma», США).

Электрофоретическое разделение белков проводили по Леммли [112].

Изоэлектрофокусирование проводили с использованием Servalyte 3/10 (Serva Electrophoresis) на установке Mini IEF Cell («Bio-Rad», США). В каждую ячейку наносили по 4 мкл образца (общая концентрация белка 4.0 – 5.0 мкг/лунка). Режим изофокусирования применяли согласно инструкции производителя. В качестве стандарта использовали смеси белков IEF kit low range («Amersham», США) в диапазоне pI 2.5 – 6.5.

Определение активности NAD^+ -зависимой формиатдегидрогеназы осуществляли согласно [76]. Оценку активности проводили по трем независимым экспериментам.

Активность уридинфосфорилазы измеряли по методу [119]. Оценку активности проводили по трем независимым экспериментам.

Активность цитидиндеаминазы определяли, как описано в работе [89]. Оценку активности проводили по трем независимым экспериментам.

Определение константы Михаэлиса по уридину проводили, изменяя его концентрацию в реакционной смеси от 0.05 до 5 мМ при постоянной концентрации фосфата (40 мМ, pH 7.4, при 37⁰C), K_m по фосфату определяли, изменяя его концентрацию от 2.5 до 20 мМ (pH 7.4), при постоянной концентрации уридина 5 мМ. Численное значение константы Михаэлиса K_m определяли методом нелинейной регрессии в координатах Михаэлиса-Ментен и Лайнуивера-Берка.

Очистка рекомбинантной уридинфосфорилазы. Биомассу из 300 мл ночной культуры осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора «Ultrasonic Processor» («Cole Parmer», США) и центрифугировали 30 мин при 15000 об/мин. Супернатант наносили на хроматографическую колонку (25x1см),

содержащую Fractogel TSK DEAE-650M («Merck», Германия). Элюцию проводили 200 мл 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0) в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 1М при скорости потока буфера 1 мл/мин. Собранные фракции анализировали с помощью денатурирующего электрофореза по Леммли [112]. Фракцию, содержащую UDP, переводили методом ультрафильтрации с использованием фильтра Amicon YM10 («Millipore», США) в 5 мл 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0) и наносили на ту же колонку. Элюцию проводили 250 мл 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0) с линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 0.5 М. Фракцию, содержащую UDP, переводили с помощью ультрафильтрации в 2.5 мМ Tris-HCl pH 8.0. После определения проведения количественного анализа (см. выше), раствор выделенного белка переносили в пробирки, лиофилизировали и хранили при -20°C .

Гель-фильтрацию проводили на колонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200 на приборе ÄKTA FPLC (GE Healthcare, Великобритания) в 10 мМ Na^+ -фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 150 мМ NaCl, регистрация осуществлялась при длине волны 280 нм. Объем образца составлял 100 мкл, скорость элюции 1 мл/мин.

Измерение КД спектров белков проводили на дихрографе «Chirascan» («Applied Photophysics», Великобритания) в ЦКП ИНБИ РАН. Эксперименты проводили в воде, а также 10 мМ Na^+ -фосфатном или K^+ -фосфатном буфере, pH 7.4, при 20°C . Концентрация белка в пробе составляла 0.1 мг/мл.

Плавление белка осуществляли в диапазоне температур $10\text{-}95^{\circ}\text{C}$, с шагом в $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, кривую плавления регистрировали при длине волны 220 нм с использованием дихрографа «Chirascan» («Applied Photophysics», Великобритания) в ЦКП ИНБИ РАН. Образцы белков EUDP, SUDP, C212S подвергали плавлению в 10 мМ Na^+ и K^+ -фосфатном буфере pH 7.4, концентрация белка в пробе составляла 0.1 мг/мл.

MALDI. Для дополнительного подтверждения первичной структуры выделенных рекомбинантных белков был проведен их масс-спектрометрический анализ в ЦКП ИНБИ РАН. Для проведения триптического гидролиза к раствору

белка добавляли 5 мкл раствора модифицированного трипсина («Promega», США) в 0.05 М NH_4HCO_3 с концентрацией 10 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 12 часов при 37⁰С. Затем к раствору добавляли 5 мкл 0.5% ТФУ в 10% растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Полученный раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров фрагментированного (ферментативно гидролизованного) рекомбинантного белка. Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили следующим образом: на мишени смешивали по 0.5 мкл раствора образца и раствора 2.5-дигидроксибензойной кислоты («Aldrich», США, 10 мг/мл в 20% ацетонитриле в воде с 0.5% ТФУ), и полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры получали на MALDI – времяпролетном масс-спектрометре «Ultraflex II BRUKER» («Bruker», Германия), оснащенном УФ лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов. Масс-спектр целых белков получен в линейном режиме, погрешность измерения средней массы не превышает 0.05% от измеренной массы. Масс-спектр триптического гидролизата белков получен с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляет 0.01%. Масс-спектры фрагментации пептидов получены в тандемном режиме работы масс-спектрометра, погрешность определения масс дочерних ионов не превосходила 1 Да.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели поиск в домашней базе данных, куда предварительно записали искомые последовательности, с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха. Также были получены спектры фрагментации отдельных пептидов. С использованием программного обеспечения Biotools 3.3 («Bruker Daltonics», Германия) проведен поиск по объединенным MS+MS/MS результатам.

Культивирование штаммов *E. coli* проводили при 37⁰С в жидкой либо на агаризованной среде Луриа-Бертани (LB) [187]. Для обеспечения селективного роста клеток *E. coli*, содержащих плазмиду, использовали ампициллин или канамицин в концентрации 150 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно. Культивирование штамма *S. oneidensis* MR-1 проводили при 30⁰С в жидкой или на агаризованной (1.5%) среде TSB (pH 7.3): 40г среды на 1л дистиллированной воды. Для обеспечения селективного роста клеток-трансформантов использовали канамицин в концентрации 50 мкг/мл. Анаэробное культивирование *S. oneidensis* MR-1 проводили в стерильных пластиковых пробирках Falcon («Ахуген», США) объемом 15 мл в среде TSB или минимальной среде (ММ) [217] с добавлением лактата натрия в качестве источника углерода в концентрации 2.0 г/л и фумарата натрия в качестве акцептора электронов в концентрации 2.4 г/л. При анаэробном культивировании клетки трансформантов предварительно выращивали аэробно, для накопления биомассы в течение 18 часов, затем центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 минут, осадок биомассы собирали, суспендировали в свежей среде, и культивировали анаэробно. Концентрацию формиата натрия при культивировании клеток варьировали в пределах 0 – 10 г/л. Культивирование в МТЭ осуществляли на среде ММ с добавлением лактата натрия в концентрации 4 г/л и канамицином.

Подготовка штаммов *S. oneidensis* MR-1 для МТЭ. Биомассу трансформантов, содержащих плазмиды pERFDH и pER(K-) *S. oneidensis* MR-1 далее (*S. oneidensis* MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER), выращивали аэробно в колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды TSB с канамицином в концентрации 50 мкг/мл, на шейкере-инкубаторе «Excella E25» («New Brunswick Scientific», США) при 250 об/мин в течение 18 часов при 30⁰С. Затем культуру центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 минут, осадок биомассы собирали, промывали физиологическим раствором и вторично центрифугировали в тех же условиях. Полученную биомассу переносили в синтетическую среду ММ с лактатом и канамицином, уравнивали по оптической плотности и стерильно переносили в МТЭ. Титр живых клеток определяли, рассеивая в соответствующих

разведениях полученную рабочую суспензию на чашки Петри с агаризованной средой TSB.

Определение содержания органических кислот в культуральной жидкости. Для определения содержания органических кислот (фумарат, лактат, формиат, сукцинат) при анаэробном культивировании клеток пробы клеточной суспензии отбирали в интервалы времени, определяемые задачами эксперимента. Аликвоты (по 1 мл) центрифугировали 10 минут при 14000 об/мин, и определяли содержание органических кислот в надосадочном растворе. Разделение проводили с использованием прибора для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) Waters, модель Allyans («Waters», США). Хроматографическая колонка C18, 250×4.6 мм, 5 мкм. Элюент: фосфорная кислота (0.1%), ацетонитрил (0.5%), метанол (0.5%). Скорость потока составляла 1 мл/мин. Регистрацию осуществляли при длине волны 210 нм. Анализ проводили в Центре коллективного пользования ФГУП ГосНИИгенетика.

Характеристика МТЭ. В работе использовали микробный топливный элемент МТЭ1, представляющий двухкамерную ячейку с катион-обменной мембраной МК-40 ОАО «Щекиноазот», (Россия). Объем каждой ячейки составляет 295 см³, размер углеродных электродов: анод 64.0 см², катод 15.5 см². Анод и катод соединены электрической цепью с резистивной нагрузкой 150 кОм. Регистрация параметров проводилась в течение всего эксперимента с использованием программы LabView (США). Стабильность работы ячеек и воспроизводимость показателей МТЭ1 описана в работе [17].

3.3. Базы данных и программы

- 1) Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей, подбор олигодезоксирибонуклеотидов.
- 2) LabView (National Instruments, США). Регистрация параметров МТЭ в ходе культивирования трансформантов.

- 3) Origin Pro 6.0 (OriginLab Corporation, США) Математическая обработка данных.
- 4) StatPlus2007 <http://analystsoft.com>, Статистическая обработка серии измерений.
- 5) Mascot <http://www.matrixscience.com> , Идентификация белков при обработке масс-спектров MALDI.
- 6) Киотская база данных KEGG www.genome.jp/kegg использовалась для анализа метаболических путей бактерии *S. oneidensis* MR-1. Источник нуклеотидной последовательности генома *S. oneidensis* MR-1, содержащего промотер-операторную и кодирующую части гена SO_4133, аннотированного как *udp*.
- 7) Protein <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>, поиск первичных структур уридинфосфорилаз γ -протеобактерий для проведения сравнения.
- 8) BLAST <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, выравнивание первичных структур уридинфосфорилаз.
- 9) GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, депонирование фрагмента ДНК, содержащего аннотированный ген *udp* *S. oneidensis* MR-1, после подтверждения экспериментальными данными соответствия аннотированной структуры.
- 10) Международная база данных белковых структур (Protein Data Bank, PDB) <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, депонирование структур уридинфосфорилазы SUDP.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Конструирование рекомбинантного штамма *S. oneidensis* MR-1, характеризующегося повышенной редуцирующей активностью

Активное развитие такого направления биотехнологии, как метаболическая инженерия, позволяет целенаправленно создавать перспективные штаммы-продуценты различных веществ, а также штаммы, способные к утилизации широкого набора субстратов [42, 210]. Разработка новых, методов и подходов, направленных на адресованную модификацию геномов микроорганизмов, уточнение сети их метаболических путей, накопление информации в базах данных по структуре, механизмам регуляции экспрессии отдельных генов в клетках микроорганизмов при их культивировании в различных физиологических условиях значительно расширяют возможности для заранее прогнозируемых изменений свойств микроорганизмов [118, 174]. Однако, кроме наиболее распространенного варианта использования метаболической инженерии по модификации генома микроорганизма для увеличения продукции различных метаболитов, значительный интерес со стороны исследователей фокусируется на применении подходов метаболической инженерии для конструирования штаммов-биокатализаторов, в частности, штаммов микроорганизмов, которые могут быть использованы при создании искусственных элементов питания – источников тока, что подробно изложено в обзоре [182].

Развитие этого направления представляет особый интерес, поскольку разработка альтернативных источников энергии является одной из наиболее актуальных задач настоящего времени, и она сформулирована как отдельное направление в научно-практических исследованиях, названное «биоэнергетикой» [1]. Развитие этого направления идет по нескольким основным путям. Так, например, активно ведется создание штаммов-продуцентов биотоплива (бутанол, этанол) или синтез-газа, что подробно рассмотрено в обзорных статьях [42, 67]. При этом в качестве субстратов для утилизации микроорганизмами для получения различных химических соединений и биотоплива все шире используются такие возобновляемые источники, как белковые и растительные

отходы различных производств [56, 113]. С другой стороны, в последнее десятилетие достаточно интенсивно ведется разработка и усовершенствование микробных топливных элементов [16, 128]. Для успешного развития последнего, одним из наиболее важных этапов является создание штаммов электрогенных бактерий, способных к интенсивной и продолжительной генерации повышенного уровня плотности тока при культивировании в МТЭ. Из ряда наиболее часто используемых в работах электрогенных бактерий можно выделить *S. oneidensis* MR-1, и к настоящему времени данная бактерия охарактеризована наиболее полно [78]. Как было рассмотрено выше в литературном обзоре настоящей диссертации (глава 2), геном этого микроорганизма полностью секвенирован, охарактеризованы основные пути метаболизма, разработаны методы по модификации генома, показана возможность гетерологичной экспрессии генов под контролем промоторов из *E. coli* [93]. Все эти факторы в совокупности делают *S. oneidensis* MR-1 удобным и привлекательным объектом и создают необходимые предпосылки для конструирования штаммов и эффективного их культивирования в МТЭ [48].

Отдельно стоит отметить, что одним из значительных недостатков такого подхода является сложность в подборе однозначных селективных условий для эффективного отбора целевых мутантов. С другой стороны, использование направленной модификации генома *S. oneidensis* MR-1 может быть достаточно эффективно при создании штаммов *S. oneidensis* MR-1 с заданными характеристиками, однако, этот подход также имеет ряд серьезных ограничений. Так, например, содержание в геноме *S. oneidensis* MR-1 значительного числа мобильных элементов определяет значительную пластичность самого генома [181], что ведет к активной перестройке генома и проявлению множественных эффектов, нивелирующих направленную модификацию. Кроме того, направленное введение дополнительных генов в состав генома, не учитывает возможность влияния дозы вводимого гена на свойства модифицированного микроорганизма.

Для оценки эффективности вносимого изменения в геном микроорганизма может служить плазмидная система экспрессии генов, являющаяся удобным, быстрым и во многом «тестирующим» методом, по сравнению с геномной инженерией. Как было рассмотрено в литературном обзоре (глава 2, раздел 2.5), в настоящее время основные усилия исследователей по увеличению электрогенной продуктивности *S. oneidensis* MR-1 сосредоточены именно на получении мутантов по генам, контролирующим конечные ферментативные комплексы различных ветвей анаэробного дыхания [48].

Поскольку процесс анаэробного дыхания основан на окислении субстрата, с последующей передачей электрона на конечный акцептор, увеличение количества внутри клетки или внесение дополнительного фермента, осуществляющего транспорт электрона, или окисление субстрата может повлиять на скорость анаэробного дыхания. Таким образом, изменение интенсивности анаэробного дыхания у бактерии *S. oneidensis* MR-1, возможно, могло бы привести к увеличению плотности тока при культивировании в МТЭ. В связи с этим достаточно перспективным подходом для достижения поставленной задачи по увеличению электрогенной продуктивности может быть гетерологичная экспрессия генов в клетках *S. oneidensis* MR-1, прямо или косвенно участвующих в процессах анаэробного дыхания. Выбор кандидатного гена для проведения гетерологичной экспрессии в клетках *S. oneidensis* MR-1 и решения поставленной задачи определялся, прежде всего, участием продукта данного гена в метаболизме, связанным с анаэробным дыханием.

Молекула NAD^+ является кофактором значительного числа окислительно-восстановительных реакций в процессах катаболизма у микроорганизмов, например, окисления источника углерода, с образованием восстановленного NADH . Поддержание в клетке баланса NAD^+/NADH является ключевым моментом в процессе роста клетки. В клетках *E. coli* регенерация NADH в NAD^+ при культивировании в аэробных условиях происходит при передаче электронов на кислород, выступающий в качестве акцептора электронов, тогда как при анаэробном культивировании, в отсутствие альтернативных акцепторов

электронов, происходит переход к ферментации, т.е. сдвигу метаболизма в сторону накопления этанола. К настоящему времени получены убедительные данные, подтверждающие, что при увеличении содержания внутриклеточного NADH за счет гетерологичной экспрессии NAD⁺-зависимой ФДГ в клетках *E. coli* [43], происходит сдвиг уровня продукции метаболитов в сторону более восстановленных продуктов.

NAD⁺-зависимые формиатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2, ФДГ) катализируют окисление формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD⁺ в NADH. Как наиболее полно отражено авторами в обзоре [29] эти ферменты обнаружены в различных бактериях (*Moraxella* sp C-1, *Pseudomonas* sp 101, *Sinorhizobium meliloti*, *Mycobacterium vaccae* N10 и т.д.), дрожжах (*Candida boidinii*, *Pichia pastoris*) и растениях *Arabidopsis thaliana*, соя культурная *Glycine max*. К настоящему времени опубликовано множество данных по успешному клонированию генов ФДГ из разных организмов и созданию штаммов-продуцентов этих рекомбинантных ферментов [29–31].

Процесс окисления-восстановления NAD⁺/NADH является центральным моментом и в функционировании ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1. Как ранее было рассмотрено в литературном обзоре настоящей диссертационной работы (глава 2.3), в процессе анаэробного роста клеток *S. oneidensis* MR-1, при утилизации лактата, происходит образование формиата, окисляемого в дальнейшем собственной NAD⁺-независимой формиатдегидрогеназой, локализованной на внешней стороне цитоплазматической мембраны [167].

Таким образом, внесение в клетку в результате гетерологичной экспрессии гена NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы, позволит сдвинуть равновесие NAD⁺/NADH в сторону восстановленной формы, с окислением формиата и образованием NADH в цитоплазме. Графически предполагаемая схема ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 с учетом метаболических изменений при внесении в клетку рекомбинантной NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы представлена на рисунке 12.

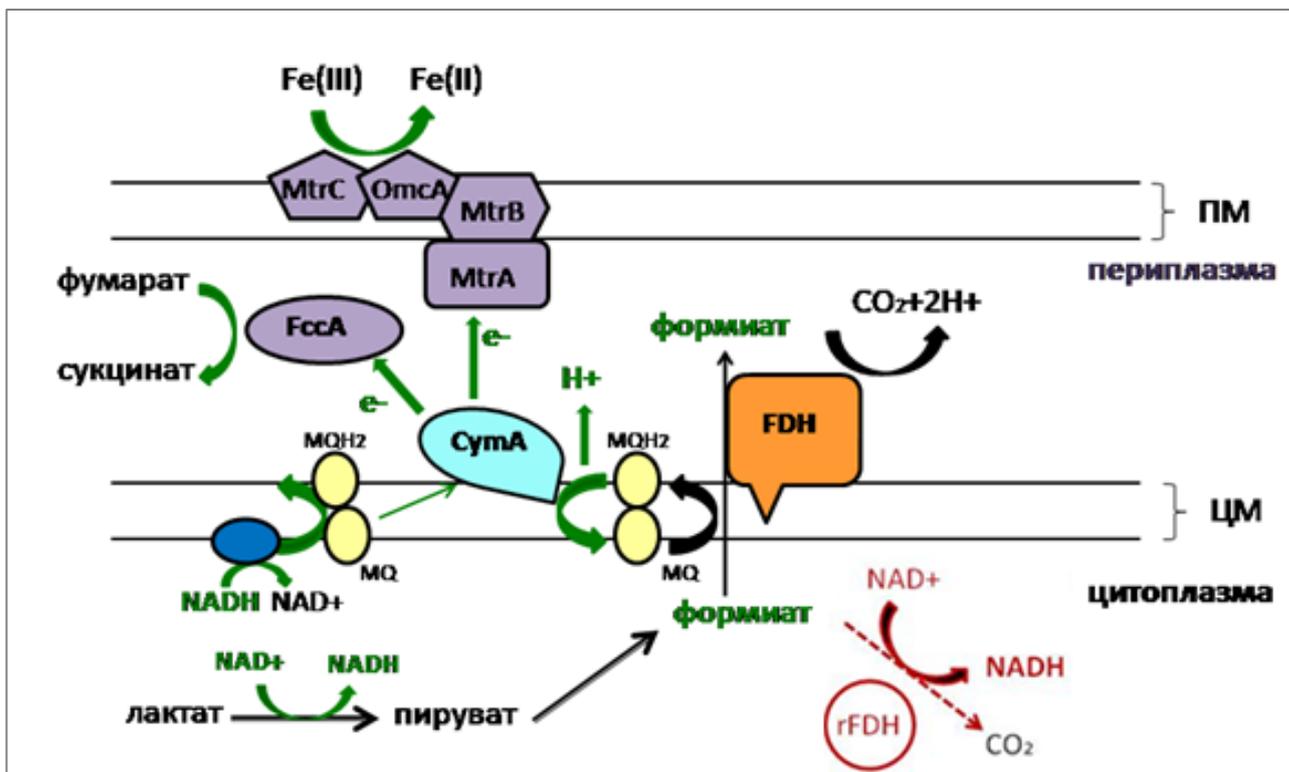


Рисунок 12. Схема ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 с учетом изменений при внесении рекомбинантной NAD^+ -зависимой формиатдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp. Красной пунктирной стрелкой обозначено предполагаемое изменение в пути окисления эндогенного формиата с образованием дополнительного NADH . Зелеными стрелками показан поток электронов в ЭТЦ. ЦМ и ПМ – цитоплазматическая и периплазматическая мембраны, соответственно. FDH – NAD -независимая формиатдегидрогеназа *S. oneidensis* MR-1, rFDH – рекомбинантная NAD^+ -зависимая формиатдегидрогеназа из *Moraxella* sp. CymA – тетрагемовый цитохром, осуществляющий передачу электрона от пула менахинонов на конечные акцепторы, как FccA – формиатредуктазу, или на цитоплазматический переносчик электронов, как например MtrA.

Целенаправленное искусственное изменение баланса NAD^+/NADH , по высказанному предположению и опубликованным литературным данным для *E. coli* [43], должно будет привести к интенсификации процесса анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1.

4.1.1. Клонирование и исследование гетерологичной экспрессии гена NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp. в клетках *S. oneidensis* MR-1

В настоящей работе был использован ген NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp, также относящейся к порядку γ -протеобактерий, как и штамм-реципиент *S. oneidensis* MR-1. На основании данных по успешному использованию промотеров генов *E. coli*, суммированных в литературном обзоре (табл. 1), для проведения гетерологичной экспрессии генов в клетках *S. oneidensis* MR-1 была выбрана промотер-операторная область гена уридинфосфорилазы *E. coli* (*Pudp*). В работе использовалась плазмида pUC18Rudp, содержащая промотер *Pudp*, сконструированная, на основе плазмиды pUC18 [5]. Ранее в нашей лаборатории был успешно экспрессирован ряд гомо- и гетерологичных генов под контролем вышеуказанного промотера [3-9, 13-15, 20, 21, 29, 32, 35-37].

Анализ генома *S. oneidensis* MR-1 выявил наличие гена устойчивости к ампициллину, что делало невозможным отбор трансформантов при использовании векторов, разработанных для *E. coli*, содержащих в качестве селективного маркера ген устойчивости к ампициллину [169]. Для решения данной проблемы в состав векторов pUC19, и pUC18Rudp был дополнительно клонирован ген устойчивости к антибиотику канамицину. Фрагмент ДНК, содержащий ген устойчивости к канамицину был амплифицирован с использованием пары олигонуклеотидных праймеров NKm и SKm (табл.2) и плазмиды pACYC177 в качестве матрицы. Полученный фрагмент ДНК, размером 900 п.н. был очищен, обработан эндонуклеазой рестрикции HindIII и лигирован с векторами pUC19 и pUC18Rudp, предварительно расщепленными по сайту HindIII. Отбор плазмид, содержащих клонированный ген, проводили методом прямой селекции, высевая трансформированные клетки на чашки, содержащие селективную среду LB с канамицином. Отобранные модифицированные векторы получили названия pUC19Km и pER, соответственно (рис.13 и 14).

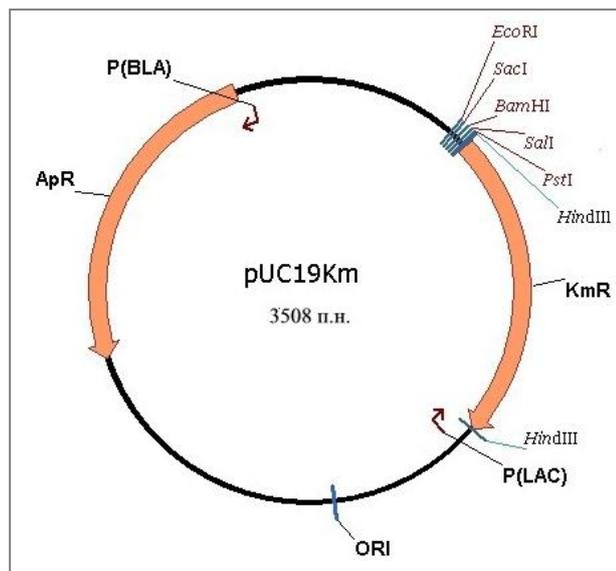


Рисунок 13. Схема плазмиды pUC19Km. Оранжевыми стрелками обозначены гены устойчивости к ампициллину (ApR) и канамицину (KmR). ORI – точка начала репликации. P(LAC), P(BLA) – промотерные области генов *lacI* и *bla*, соответственно.

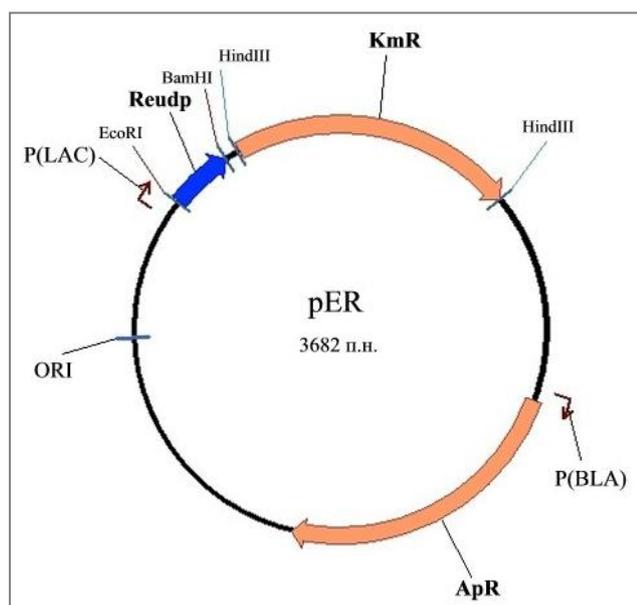


Рисунок 14. Схема модифицированной плазмиды pER. Синей стрелкой обозначена промотер-операторная область гена *uidP* *E. coli* (Reudp), оранжевым цветом обозначены гены устойчивости к ампициллину (ApR) и канамицину (KmR). ORI – точка начала репликации. P(LAC), P(BLA) – промотерные области генов *lacI* и *bla*, соответственно.

На следующем этапе клонирования был амплифицирован фрагмент ДНК, содержащий структурную часть гена *fdh* NAD⁺-зависимой ФДГ из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp. с исходной плазмидной ДНК pFDH с использованием пары олигонуклеотидных праймеров FDB-FDX (табл.2). Амплифицированный фрагмент ДНК, размером 1229 п.н. был очищен, расщеплен эндонуклеазами рестрикции BglII/XhoI и лигирован с вектором pER обработанным ферментами BamHI/SalI. Для отбора рекомбинантной плазмиды, содержащей ген *fdh* под контролем промотера гена *udp* из *E. coli* была проведена трансформация продуктами лигирования штамма *E. coli* JM110.

Трансформированные клетки высевали на чашки, содержащую агаризованную селективную среду LB с канамицином. Отбор клонов, содержащих рекомбинантную плазмиду, проводили с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров FDB-FDX. Из отобранных клонов была выделена плазида и проведено определение первичной структуры для подтверждения соответствия клонированного фрагмента запланированному. Полученная рекомбинантная плазида обозначена pERFDH, а ее схема представлена на рисунке 15. Плазмидами pERFDH (целевая) и pER (К-) была проведена трансформация клеток штамма-реципиента *S. onidensis* MR-1. Проверка стабильности полученных штаммов-трансформантов *S. onidensis* MR-1/pER, *S. onidensis* MR-1/pERFDH не выявила случаи потери целевой плазмиды в серии последовательных пересевов трансформантов на чашках и в процессе хранения штаммов-трансформантов под маслом.

Культивирование клеток трансформантов *S. onidensis* MR-1/pER, *S. onidensis* MR-1/pERFDH проводили в аэробных и анаэробных условиях в жидкой среде TSB в присутствии канамицина (50мг/л) при концентрации формиата натрия 0 – 3% в анаэробных и от 0 – 0.5% в аэробных условиях, соответственно, на качалке при скорости 250 об/мин. Температура при культивировании составляла 30⁰С, а продолжительность – 18 и 24 часа в аэробных и анаэробных условиях, соответственно. Выбор концентрации формиата для культивирования определялся экспериментально, учитывая выживаемость клеток трансформантов

S. oneidensis MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER в присутствии различных концентраций формиата.

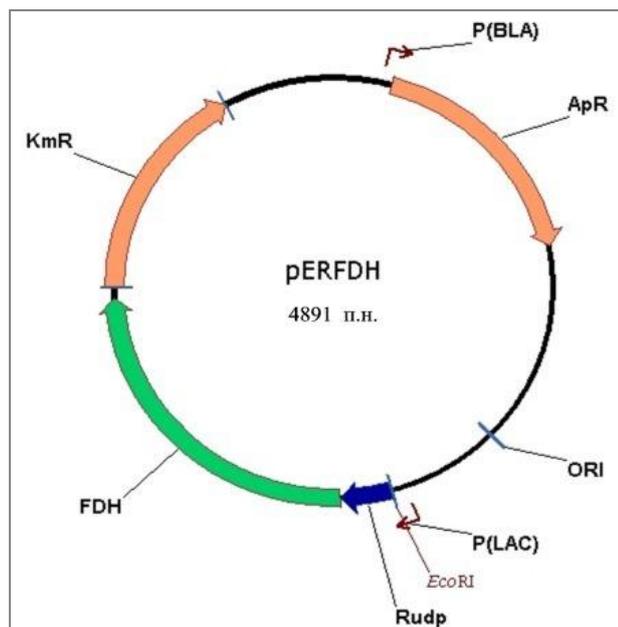


Рисунок 15. Схема экспрессионной рекомбинантной плазмиды pERFDH. Зеленой стрелкой обозначен ген *fdh* NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из мезофильной бактерии *Moraxella* sp. Синей стрелкой обозначена промотер-операторная область гена *uidp* из *E. coli*. Гены устойчивости к ампициллину (ApR) и канамицину (KmR) обозначены оранжевыми стрелками. ORI – точка начала репликации. P(LAC), P(BLA) – промотерные области генов *lacI* и *bla*, соответственно.

При концентрации формиата в среде культивирования (0.2% аэробно и 3% анаэробно) жизнеспособных клеток обнаружено не было. Для дальнейшей оценки способности к окислению экзогенного формиата концентрация формиата в среде была снижена до 0.05% при аэробном культивировании и до 1% – при анаэробном.

Подтверждение наличия гетерологичной экспрессии гена *fdh* в клетках *S. oneidensis* MR-1 проводили путем измерения активности ФДГ в растворимой фракции клеточных лизатов, полученных после разрушения клеток-трансформантов ультразвуком. Данные по активности ФДГ в растворимых

фракциях трансформантов *S. oneidensis* MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER приведены в таблице 3. Как следует из представленных результатов, активность ФДГ обнаружена только в клетках трансформанта *S. oneidensis* MR-1/pERFDH при всех условиях культивирования.

Таблица 3. Активность рекомбинантной ФДГ в клеточном лизате трансформантов *S. oneidensis* MR-1 при культивировании в аэробных и анаэробных условиях при разной концентрации формиата.

Концентрация формиата г/л	Активность ФДГ, ед/мг общего белка			
	<i>S. oneidensis</i> MR-1/pERFDH		<i>S. oneidensis</i> MR-1/pER	
	Аэробно	Анаэробно	Аэробно	Анаэробно
0	0.11±0.01	0.48±0.03	*	
0.5	0.09±0.02	-	*	-
5	-	0.51±0.02	-	*
10	-	0.46±0.03	-	

Условные обозначения: *S. oneidensis* MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER – рекомбинантные штаммы, содержащие плазмиды pERFDH и pER (контрольный штамм), соответственно.

*- активность не обнаружена (меньше 0.01 ед/мг).

- культивирование в данных условиях не проводилось.

Полученные данные свидетельствуют о функциональной активности промотер-операторной области *udp* из *E. coli* в клетках *S. oneidensis* MR-1 в разных условиях, и успешной гетерологичной экспрессии гибридного гена *fdh* из *Moraxella* sp. Определенные значения уровня активности ФДГ в общем лизате сопоставимы по уровню активности с литературными данными при гетерологичной экспрессии гена *fdh* из *C. boidinii* в клетках *E. coli* [43]. Культивирование трансформанта *S. oneidensis*MR-1/pERFDH аэробно и анаэробно при субпредельных концентрациях формиата (0.1% аэробные условия и 2%

анаэробные) не выявило увеличения устойчивости к экзогенному формиату, по сравнению с трансформантом *S. oneidensis* MR-1/pER. Это может свидетельствовать об отсутствии направленного транспорта формиата из периплазмы в цитоплазму и, как следствие этого, – недоступность его для дальнейшего окисления рекомбинантной ФДГ. Устойчивость клеток к более высоким концентрациям формиата в анаэробных условиях может объясняться наличием собственной NAD-независимой ФДГ, окисляющей экзогенный формиат в периплазме. Экспрессия генов оперона *fdh* *S. oneidensis* MR-1, кодирующих субъединицы NAD-независимой ФДГ, была обнаружена только в анаэробных условиях [167, 217]. Таким образом, экспериментально было показано, что рекомбинантная NAD⁺-зависимая ФДГ эффективно нарабатывается в рекомбинантных клетках в функционально активной форме и может окислять только эндогенный формиат, образующийся в цитоплазме при утилизации лактата в анаэробных условиях, с образованием дополнительного NADH.

4.1.2. Исследование изменения интенсивности анаэробного дыхания при гетерологичной экспрессии NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы в клетках *S. oneidensis* MR-1

Достаточно удобной системой определения интенсивности анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1 может служить определение скорости конверсии экзогенного фумарата, используемого в качестве акцептора электронов, в сукцинат. Наличие у *S. oneidensis* MR-1 периплазматической фумарат-редуктазы [134], а также активного транспорта образуемого сукцината в культуральную жидкость [217], позволяют достаточно точно (методом HPLC) оценить изменения в концентрациях фумарата и сукцината при анаэробном культивировании.

Основываясь на полученной нами ранее успешной гетерологичной экспрессии гена *fdh* в клетках *S. oneidensis* MR-1, было проведено измерение концентраций фумарата и сукцината в КЖ трансформантов *S. oneidensis* MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER, при анаэробном культивировании клеток на лактате в присутствии фумарата в течение 3, 6 и 24 часов. Из этих данных

(таблица 4) следует, что при культивировании штамма *S. oneidensis* MR-1/pERFDH конверсия фумарата в сукцинат происходит значительно быстрее, чем у *S. oneidensis* MR-1/pER: существенная разница наблюдается уже на 6 часу культивирования. Этот факт можно объяснить увеличением уровня внутриклеточного NADH, необходимого для восстановления фумарата в сукцинат. Следует отметить, что сукцинат, образующийся в процессе восстановления фумарата, обнаружен в КЖ. Эти данные совпадают с ранее опубликованными в работе [217] результатами, где авторами было показано, что при анаэробном культивировании происходит транспорт избыточного сукцината – продукта разомкнутого цикла Кребса – в КЖ. Именно эта особенность во многом объясняет разницу в полученных значениях концентраций фумарата и сукцината (табл.4) в КЖ трансформантов. Стоит отметить, что к 24 часам весь фумарат в среде, даже в контрольном штамме, был конвертирован в сукцинат. По-видимому, при длительном анаэробном культивировании (более 24 часов) необходимо исходное увеличение концентрации акцептора электронов или же дробное его введение в процессе роста клеток.

Таблица 4. Изменение концентрации фумарата и сукцината в культуральной жидкости при культивировании в анаэробных условиях клеток штаммов-трансформантов *S. oneidensis* MR-1.

Трансформант	Фумарат, мМ				Сукцинат, мМ			
	Время культивирования, час.				Время культивирования, час.			
	0	3	6	24	0	3	6	24
<i>S. oneidensis</i> MR-1/pERFDH	18.4± 1.1	14.6± 0.9	6.5± 0.6	0	0	21.0± 1.1	37.8± 1.4	44.0 ±1.7
<i>S. oneidensis</i> MR-1/pER	18.4± 0.8	14.8± 0.6	11.2 ±0.7	0	0	18.4± 0.9	30.8± 1.6	44.0 ±1.5

Обнаруженное явление ускоренного восстановления фумарата в сукцинат клетками, содержащими рекомбинантную NAD^+ -зависимую ФДГ, давало основание для исследования электрогенных свойств трансформантов в МТЭ.

4.1.3. Культивирование штамма-трансформанта

S. oneidensis MR-1/pERFDH в МТЭ

При культивировании клеток штаммов электрогенных микроорганизмов в МТЭ в анаэробных условиях конечным акцептором электронов служит электрод (см. рис.11), что дает возможность длительно и напрямую измерять плотность тока в процессе анаэробного дыхания. Для исследования электрогенных свойств полученных в данной работе клеток штаммов-трансформантов было проведено их культивирование на среде ММ с добавлением лактата и канамицина в ячейках МТЭ1, конструкция которых описана в [17]. Эксперименты с использованием МТЭ проводили в лаборатории 0-132 ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Культивирование клеток проводили до половинного уменьшения от максимального значения плотности тока. На рисунке 16 представлены электрогенные характеристики штаммов-трансформантов в координатах зависимости величины плотности тока от времени культивирования. Как следует из рисунка, максимальное значение плотности тока, достигаемое трансформантом *S. oneidensis* MR-1/pERFDH выше, чем у контрольного штамма. Максимальное значение плотности тока достигается на 2-3 сутки культивирования, а у контрольного варианта – на 6-7. Культивирование продолжали в течение 27 суток. Определение остаточного содержания лактата в среде после культивирования показало полное его отсутствие в среде у трансформанта *S. oneidensis*MR-1/pERFDH и 0.25 г/л в случае контрольного штамма.

Наряду с тем, что эффективность работы МТЭ с трансформантом *S. oneidensis* MR-1/pERFDH выше, чем у контрольного штамма, следует отметить резкое падение плотности тока при культивировании клеток штамма-трансформанта на 22-23 сутки. Это явление может быть объяснено полной

утилизацией источника углерода (лактата) в среде культивирования у штамма-трансформанта *S. oneidensis* MR-1/pERFDH, в отличие от контрольного штамма, где лактат не был до конца утилизирован.

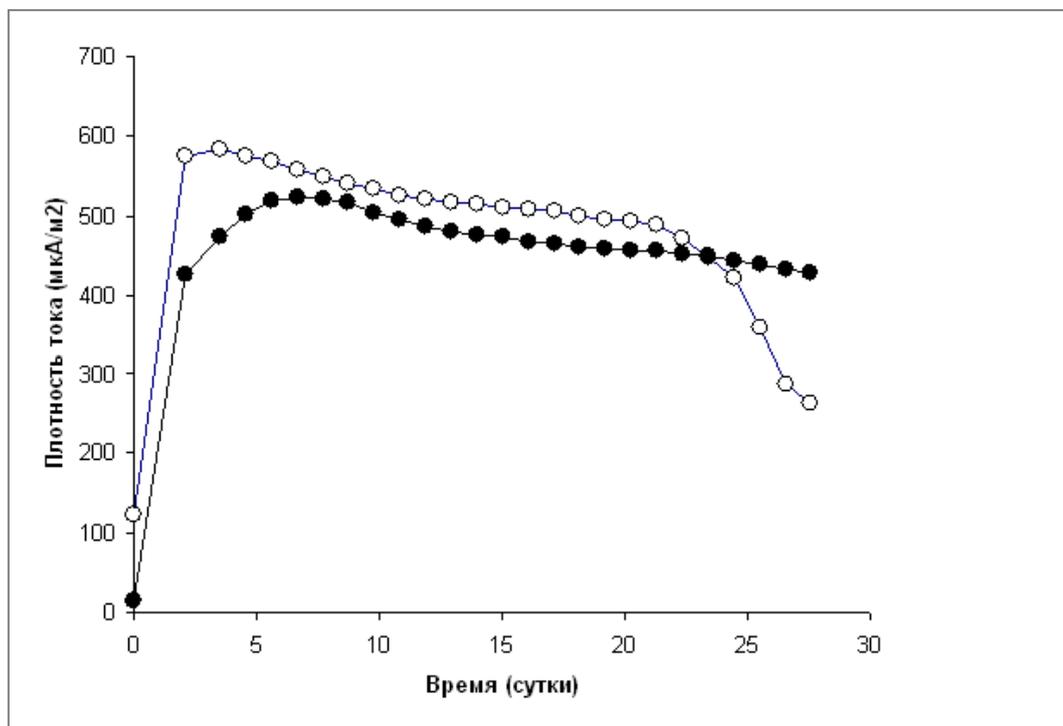


Рисунок 16. Зависимость величины плотности тока от времени культивирования клеток трансформантов *S. oneidensis* MR-1/pERFDH (○), и *S. oneidensis* MR-1/pER (●) в МТЭ.

Как было показано в схеме предполагаемого искусственного изменения метаболизма клеток *S. oneidensis* MR-1, приведенного выше на рисунке 12, лактат является основным субстратом для окисления, поэтому именно полная его утилизация приводит к остановке протекания окислительных реакций и, как следствие, остановке анаэробного дыхания. Полученные данные также свидетельствуют об увеличении уровня внутриклеточного NADH при гетерологичной экспрессии рекомбинантной NAD⁺-зависимой ФДГ, что приводит к интенсификации анаэробного дыхания и, как следствие, увеличению плотности тока при культивировании штамма в МТЭ. Обнаруженная тенденция по увеличению плотности тока, и данные по скорости конверсии фумарата для штамма-трансформанта с ФДГ дают основания для дальнейшего исследования и

поиска подходов интенсификации работы МТЭ. Оптимизация условий культивирования штамма-трансформанта может привести к повышению эффективности функционирования МТЭ, его стабильности и существенному увеличению плотности вырабатываемого тока. В результате проведенных исследований по увеличению редуцирующей активности электрогенной бактерии *S. oneidensis* MR-1 показано увеличение интенсификации процесса анаэробного дыхания за счет сдвига баланса NAD^+/NADH . Этот факт достаточно явно установлен и подтвержден в ходе анализа скорости конверсии фумарата в сукцинат, а также при культивировании штаммов в МТЭ.

Полученные результаты инициировали в ИМБП РАН дополнительные работы по усовершенствованию конструкции ячейки МТЭ, направленные, прежде всего, на создание возможности дробной подачи дополнительного количества лактата, а также отбора проб КЖ в процессе культивирования клеток для контроля концентрации субстрата. Дополнительный анализ содержания широкого спектра метаболитов в КЖ на разных стадиях культивирования штаммов-трансформантов позволит более полно проанализировать динамику изменения и сдвигов в метаболических путях исследуемых штаммов, что, в свою очередь, позволит не только скорректировать условия культивирования для повышения эффективности работы МТЭ, но и предложить дополнительные варианты модификации метаболизма *S. oneidensis* MR-1.

Другим, не менее важным, результатом описанных выше исследований является экспериментально установленная функциональная активность промотер-операторной области гена *udp* *E. coli* в клетках *S. oneidensis* MR-1 при их культивировании в аэробных и анаэробных условиях. Полученные результаты подтверждают литературные данные о принципиальной возможности использования промотеров *E. coli* при гетерологичной экспрессии генов в клетках *S. oneidensis* MR-1, суммированные в разделе 2.6 литературного обзора данной диссертационной работы. При этом представляет достаточный большой теоретический и практический интерес более глубокое изучение и сравнение элементов механизма регуляции экспрессии генов с участием промотер-

операторных областей означенных генов-ортологов *udp* из *E. coli* и *S. oneidensis* MR-1.

4.2. Исследование особенностей регуляции экспрессии под контролем промотер-операторной области гена *udp* *S. oneidensis* MR-1

К настоящему времени промотер-операторная область гена уридинфосфорилазы детально изучена у модельного микроорганизма *E. coli* [22, 90, 163]. В составе промотера гена *udp* *E. coli* исследователями обнаружены и подтверждены сайты связывания с белками-активаторами CRP и сайт связывания с белком-репрессором CytR [22, 90]. Комплекс сAMP-CRP-CytR выполняет важную функцию при регуляции экспрессии генов катаболизма нуклеозидов [91], в том числе и уридинфосфорилазы [163].

Анализ промотеров генов-ортологов *udp* других γ -протеобактерий из двух порядков *Enterobacteriales* и *Vibrionales* (*V. cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *S. typhimurium*) выявил наличие сайтов связывания с белками-активаторами CRP и репрессором CytR [242]. Однако, как представлено в работе [242], сайты связывания с репрессором CytR могут значительно отличаться у разных видов протеобактерий. Кроме того, экспериментально была показана способность к репрессии гена *udp* белком-репрессором CytR *E. coli* промотер-операторных областей у вышеуказанных видов γ -протеобактерий [242]. По данным авторов [242] эффективность связывания белка CytR из *E. coli* и уровень репрессии значительно отличаются для промотеров из разных бактерий, что, по-видимому, может быть следствием различия в организации как сайта связывания CytR, так и структуры самого белка-репрессора. При этом наименьшая способность к связыванию была обнаружена для промотера гена *udp* из *V. cholerae*, несмотря на достаточно высокий уровень гомологии (65% идентичных аминокислот) первичной структуры белков CytR *V. cholerae* и *E. coli* [242].

Таким образом, учитывая принадлежность *S. oneidensis* MR-1 к другому порядку γ -протеобактерий, представляет значительный интерес сравнительный

анализ структуры и функциональной активности промотер-операторных областей генов *udp* из *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli*.

Сравнение нуклеотидных последовательностей промотер-операторной области гена *udp* *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli* выявило как их сходство, так и различия (рис.17). Как следует из рисунка 17, нуклеотидные последовательности рассматриваемых участков ДНК в положении -10 (TAAAGT) практически полностью совпадают. Основные регуляторные элементы промотера *udp*, такие как CRP1 и CRP2 также практически совпадают (выявлены замены 3-х и 4-х нуклеотидов. Анализ последовательности проводили с использованием программы (http://www.ccg.unam.mx/Computational_Genomics/tractorDB/)).

Однако, в последовательности промотера *S. oneidensis* MR-1 обнаружены вставки от 4-х до 6-ти нуклеотидов между ними. Кроме того, следует отметить отсутствие в промотере гена *udp* у *S. oneidensis* MR-1 «канонического» сайта связывания для белка-репрессора CytR, обнаруженного у всех изученных ранее видов γ -протеобактерий [22, 90, 91, 242]. Подробный дополнительный компьютерный анализ выявил отсутствие в аннотированном геноме *S. oneidensis* MR-1 (GenBank AE014299.1) гена *cytR*, а поиск по первичной структуре белка-ортолога CytR *E. coli* с использованием программы BLAST в *S. oneidensis* MR-1 также не выявил соответствующего белка-ортолога. Вместе с тем, промотер-операторная область *udp* из *S. oneidensis* MR-1, по литературным данным [81], содержит участок ДНК (AAACGTGATCTGGATCAATATT), трактуемый авторами как потенциальный сайт связывания CRP. Любопытно, что в состав непосредственно этого же участка включен сайт связывания (GTGATCTGGATCAA) регуляторного белка EtrA, принимающего участие у *S. oneidensis* MR-1 в регуляции генов, относящихся к аэробному и анаэробному клеточному дыханию (ортолог белка FNR в *E. coli*) [81].

Однако, оставалось экспериментально не подтвержденным наличие или отсутствие репрессии гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1. По литературным данным, кроме гена *udp*, у *E. coli* к CytR-регулону, в частности, относится также ген цитидиндеаминазы *cdd* [91].

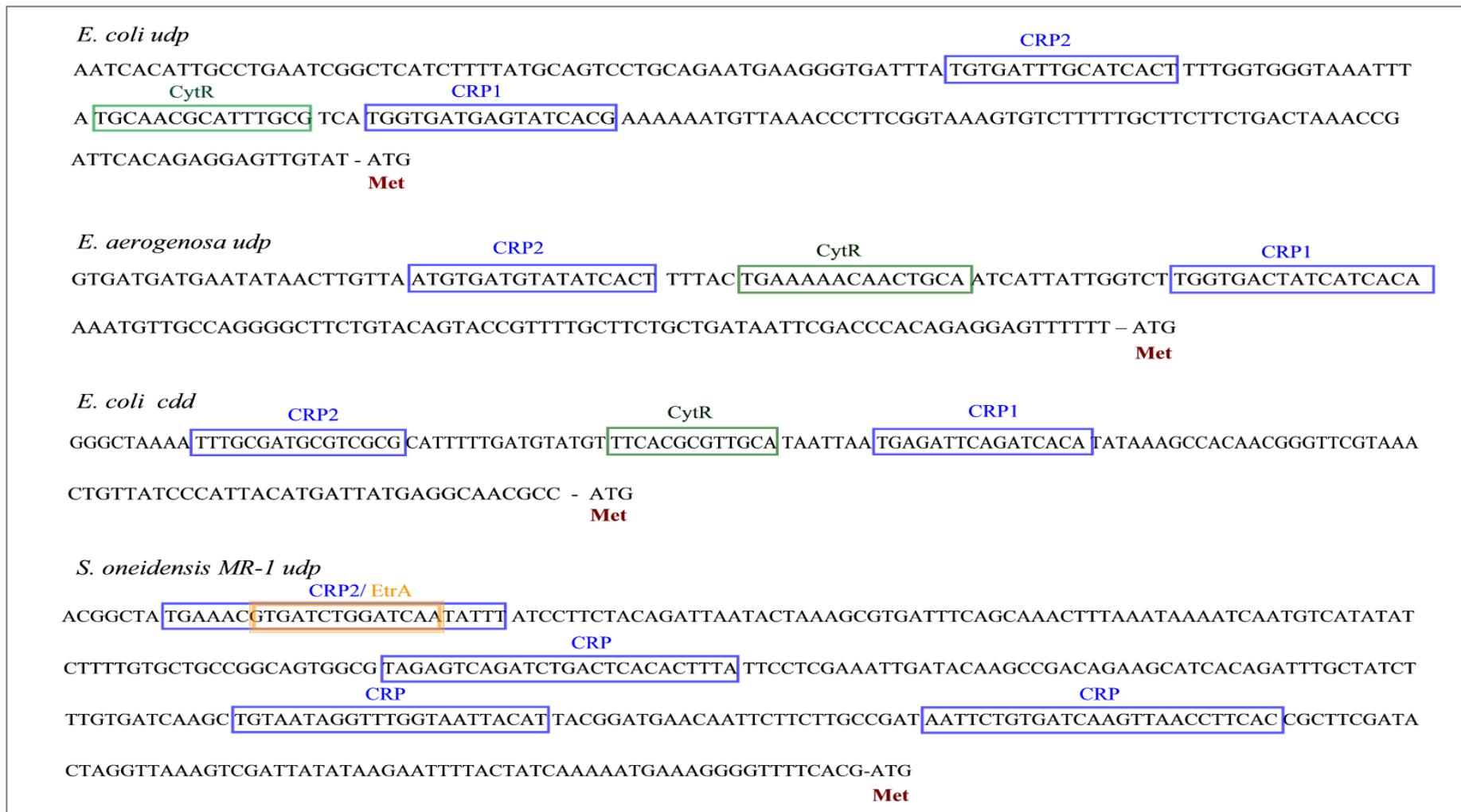


Рисунок 17. Нуклеотидные последовательности промоторов генов *udp* из различных γ -протеобактерий и гена *cdd* из *E. coli*. Синими прямоугольниками выделены участки связывания белка-регулятора CRP, зелеными – CytR. В промоторе гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 синим цветом обозначены предполагаемые участки связывания белков-регуляторов, определенные на основе компьютерного анализа. Оранжевым цветом выделен предполагаемый сайт связывания с белком-регулятором EtrA. [81]

Достаточно удобной моделью для определения возможности связывания белка-репрессора CytR с промотер-операторной областью гена *udp* из разных организмов может служить система «реципиентный штамм *E. coli* MG1655 – трансформирующая плазмида», содержащая участок ДНК, потенциально связывающий белок-репрессор. Внесение на мультিকопийной плазмиде промотер-операторной области, содержащей сайт связывания для белка репрессора CytR, позволяет «оттитровать» (связать) его, что должно привести к дерепрессии гена *cdd* хромосомной локализации. Согласно данным, приведенным в работе [91], число молекул CytR в клетке составляет около 250, в сочетании с данными по средней копийности в клетке плазмиды на основе pUC 200-250 копий на клетку [187], можно предположить достаточно полное связывание репрессора CytR с вводимым на плазмиде сайтом. По повышению уровня активности цитидиндеаминазы в растворимой фракции клеточного лизата клеток-трансформантов можно судить о степени дерепрессии репортерного гена. В литературе опубликованы данные по успешному использованию этой модели для исследования возможности связывания белка-репрессора CytR с промотер-операторными областями гена *udp* ряда γ -протеобактерий [242]. Для выяснения потенциальной принадлежности гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 к CytR-регулону была сконструирована плазмида, содержащая промотер-операторную область *udp* из *S. oneidensis* MR-1, но лишенная участка ДНК (структурной части), кодирующей сам белок UDP.

Для конструирования вышеописанной плазмиды была проведена амплификация соответствующего участка хромосомной ДНК *S. oneidensis* MR-1, кодирующего промотер-операторную область *udp* с использованием праймеров Shud1-Shud3 (табл. 2). Полученный фрагмент ДНК размером 422 п.н. был выделен, очищен, обработан эндонуклеазами рестрикции SacI/VamHI и лигирован с вектором pUC19Km, предварительно расщепленным ферментами SacI/VamHI. Для отбора рекомбинантной плазмиды, была проведена трансформация штамма *E. coli* JM110 лигазной смесью. После PCR-скрининга клонов с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров (Shud1-Shud3) были отобраны

целевые трансформанты. Из биомассы клеток были выделены рекомбинантные плазмиды, и соответствие структуры клонированных фрагментов ДНК запланированным было подтверждено определением их первичной структуры. Полученная плазида обозначена как pSR (рис.18). Аналогичная плазида, содержащая промотер-операторную область *udp* из *E. coli* была сконструирована в нашей лаборатории ранее [5] и модифицирована в настоящей работе (рис.14) для использования в клетках *S. oneidensis* MR-1, как описано в главе 4.1.1.

Данными плазидами pSR и pER трансформировали штамм *E. coli* MG1655. Клетки отобранных трансформантов культивировали в жидкой среде LB в присутствии канамицина (50 мкг/мл) при 37⁰С в лабораторном шейкере-инкубаторе течение 16 часов в аэробных условиях. Для определения активности цитидиндеаминазы, получали растворимую фракцию клеточного лизата трансформантов обработкой биомассы ультразвуком. Данные по уровню активности цитидиндеаминазы в супернатанте разрушенных клеток приведены в таблице 5.

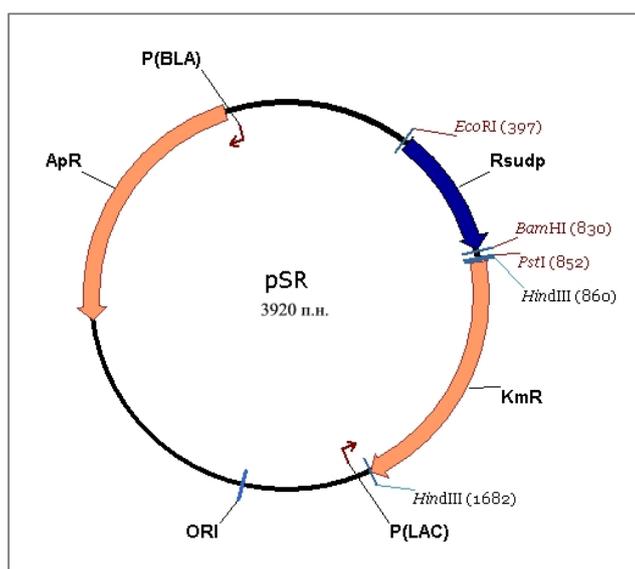


Рисунок 18. Схема рекомбинантной плазмиды pSR. Синей стрелкой обозначена промотер-операторная область гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 (Rsudp). Оранжевыми стрелками обозначены ген устойчивости к ампициллину (ApR) и канамицину (KmR). ORI – точка начала репликации. P(LAC), P(BLA) – промотерные области генов *lacI* и *bla*, соответственно.

Таблица 5. Активность цитидиндеаминазы в клеточном лизате трансформантов *E. coli* MG1655 в присутствии промотер-операторных областей гена *udp* из *E. coli* и *S. oneidensis* MR-1.

Штамм <i>E. coli</i>	Активность цитиндеаминазы, ед/мг общего белка
MG1655/pER	2.2±0.08
MG1655/pSR	0.02±0.01
MG1655/pUC19 (контроль)	0.02±0.01
MG1655 wt (контроль)	0.04±0.01

Из таблицы 5 следует, что достоверное повышение активности цитидиндеаминазы хромосомной локализации наблюдается только в случае клеток трансформантов *E. coli* MG1655/p19ER, т.е. при наличии в составе плазмидной ДНК сайта связывания репрессора CytR в составе промотер-операторной области гена *udp* из *E. coli*. В остальных трансформантах уровень активности цитидиндеаминазы практически не изменяется, оставаясь на фоновом уровне. Полученные экспериментальные данные однозначно подтверждают предположение, что ген уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 не подвержен регуляции репрессором CytR.

Обнаруженный факт может быть использован при конструировании экспрессионных плазмид для высокоэффективной конститутивной экспрессии чужеродных генов, находящихся под контролем промотер-операторной области гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 в клетках *E. coli*.

Полученные нами результаты подтверждают недавно опубликованные данные о наличии гена *cytR* в геномах бактерий только двух порядков γ -протеобактерий *Vibrionales* и *Enterobacteriales* [195]. Все опубликованные данные по регуляции генов, принадлежащих CytR-регулону, получены на бактериях только из двух вышеуказанных порядков (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Y. pestis*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*) [242]. По мнению авторов [171], появление гена *cytR* в

группы бактерий. Кроме того, необходимо отметить, отсутствие гена *cytR* у представителей филогенетически более молодых порядках *Aeromonadales* и *Pasteurellales*.

Таким образом, к настоящему времени промотер-операторная область гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 является единственной среди клонированных и исследованных последовательностей этого гена из разных бактерий, в которой экспериментально не обнаружен сайт связывания с белком-репрессором CytR, т.е. он не подвержен CytR-репрессии.

Следует также отметить, что анализ класса γ -протеобактерий на наличие уридинфосфорилазы, выявил ее присутствие только в 6 порядках: *Thiotrichales*, *Alteromonadales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales*, *Pasteurellales*, *Enterobacteriales*. В литературе, как уже было указано выше, имеются данные по характеристике белков UDP только из двух порядков. Этот факт определяет значительный интерес к изучению свойств и получению сравнительной характеристики структуры UDP из *S. oneidensis* MR-1, как представителя другого порядка.

Решение данной задачи предполагает клонирование, конструирование рекомбинантного штамма-продуцента UDP из *S. oneidensis* MR-1, выделение и очистку данного белка и исследование его физико-химических, кинетических и структурных характеристик, что позволит наиболее полно провести сравнение уридинфосфорилаз из различных микроорганизмов.

4.3. Изучение свойств и структурных особенностей уридинфосфорилазы из электрогенной бактерии *S. oneidensis* MR-1

Уридинфосфорилаза (UDP КФ 2.4.2.3) – фермент катаболизма нуклеозидов, осуществляющий обратимый фосфоролиз уридина до урацила и рибозо-1-фосфата (рис. 20) [119]. К настоящему времени выделены и охарактеризованы белки UDP из различных про- и эукариот [3, 8, 24, 34, 37, 53, 61, 74, 111, 124, 157, 173, 216, 231].

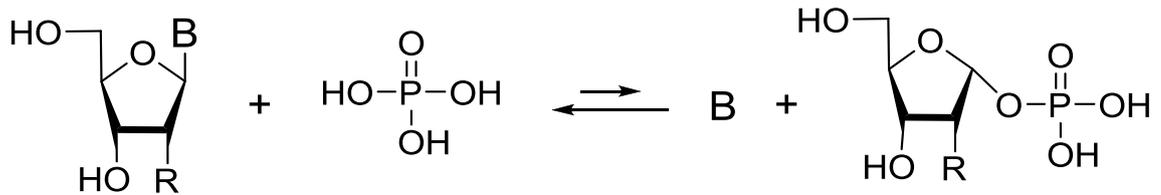


Рисунок 20. Схема реакции обратимого ферментативного фосфорилиза нуклеозидов с образованием соответствующего гетероциклического основания и рибозо-(2'-дезоксидеокси)-1-фосфата, при этом равновесие реакции сдвинуто в сторону нуклеозидов. В – гетероциклическое основание; R = OH, H.

Пристальный интерес исследователей к данному ферменту определяется несколькими аспектами. Одним из наиболее важных из них является обнаруженное увеличение в несколько раз уровня экспрессии и активности уридинфосфорилазы в клетках злокачественных опухолей различной природы [125, 130].

Современная противоопухолевая терапия включает использование антипролиферативных препаратов модифицированных нуклеозидов (например, 5-фторурацил), однако, высокий уровень UDP в клетках злокачественных опухолей приводит к снижению эффективности используемых веществ [40]. Для подавления активности UDP в таких клетках целесообразно совместное применение ингибиторов UDP и противоопухолевых препаратов, приводящих к значительному увеличению эффективности действия препаратов нуклеозидной природы. Так, в работе авторов [97] показано существенное увеличение эффективности 5-фторурацила при его совместном использовании с ингибитором уридинфосфорилазы при терапии онкологических заболеваний. Кроме того, применяя ингибиторы, можно уменьшить дозу вводимого антиметаболита пиримидиновых оснований, и снизить системное токсическое действие 5-фторурацила на здоровые ткани пациента [172]. В настоящее время ведется активная разработка, синтез, а также определение эффективности и селективности ингибиторов UDP для использования их в совместной с терапевтическими агентами противоопухолевой терапии [175]. Изучение структуры данного

фермента, а также детализация механизма протекания ферментативной реакции позволяет упростить разработку высокоэффективных ингибиторов уридинфосфорилазы.

Использование ингибиторов UDP перспективно не только для лечения онкологических заболеваний, но и в качестве противопаразитарных препаратов. Так, в работах [100, 108, 116] было показано, что ингибирование уридинфосфорилазы летально для ряда паразитов, являющихся возбудителями опасных заболеваний человека (например, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*).

В клетках этих паразитов отсутствует активность тимидинфосфорилазы, поэтому фосфорилиз нуклеозидов катализируется исключительно уридинфосфорилазой. Таким образом, поскольку уридинфосфорилаза не является жизненно необходимым ферментом в клетках большинства тканей человека, использование специфических ингибиторов уридинфосфорилазы является достаточно перспективным при лечении данного вида заболеваний.

Другим важным аспектом применения нуклеозидфосфорилаз, в частности уридинфосфорилазы, является использование данной группы ферментов в качестве биокатализаторов при биотехнологическом синтезе модифицированных нуклеозидов (рибавирин, видарабин и др.), используемых в терапии вирусных заболеваний [18, 28]. Методы получения модифицированных нуклеозидов путем химического синтеза хорошо разработаны, однако, этот процесс достаточно сложный, многостадийный и сопряжен с рядом трудностей, особенно при очистке нужного продукта синтеза [234].

В настоящее время активно развивается ферментативный синтез различных производных нуклеозидов, используемых в практической медицине. Достаточно интенсивно и успешно эти работы ведутся под руководством академика Мирошникова А.И. в «Лаборатории Биотехнологии» ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Успехи в этом практическом направлении достаточно полно рассмотрены в обзоре [23]. Условия проведения биотехнологического синтеза модифицированных нуклеозидов достаточно «жесткие» (60⁰С, рН 7.0) для длительного сохранения активности фермента [18].

В связи с этим, одним из важных факторов для успешного развития данного направления является создание термостабильного и обладающего повышенной удельной активностью варианта фермента внесением заранее запланированных замен аминокислотных остатков или поиск природной формы более стабильной нуклеозидфосфорилазы. Несмотря на значительную актуальность создания такого варианта UDP, в литературе к настоящему времени опубликована единственная работа по созданию термостабильной формы уридинфосфорилазы из *E. coli*, полученной с помощью сайт-направленного введения в структуру полипептида ряда аминокислотных замен [228]. Знание молекулярного механизма формирования ферментативной активности этого типа белков (нуклеозидфосфорилаз) позволит также варьировать специфичность узнавания субстратов, придавая ферменту наиболее подходящие свойства для проведения химико-ферментативного синтеза терапевтических препаратов нуклеозидной природы.

Таким образом, суммируя вышеизложенное, можно сказать, что представляет интерес не только изучение промотер-операторной области гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1, но также выделение и характеристика белка новой UDP из *S. oneidensis* MR-1.

4.3.1. Клонирование гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, гомологичная и гетерологичная экспрессия гена *udp*

Геном *S. oneidensis* MR-1 был секвенирован, аннотирован и опубликован в 2002 году [93]. Компьютерный анализ генома *S. oneidensis* MR-1 выявил локус SO_4133, аннотированный как ген, кодирующий уридинфосфорилазу. С целью экспериментального подтверждения факта наличия функционально активного гена *udp* в составе указанного фрагмента ДНК, нами было проведено клонирование соответствующей части генома *S. oneidensis* MR-1. Для решения этой задачи методом ПЦР проведена амплификация фрагмента ДНК с использованием хромосомной ДНК *S. oneidensis* MR-1 в качестве ДНК-матрицы и специфических олигонуклеотидных праймеров (Shud1-Shud2 табл. 2).

Полученный фрагмент размером 1185 п.н. был очищен, обработан эндонуклеазами рестрикции SacI/SalI и лигирован с вектором pUC19Km, обработанным этими же ферментами. После реакции лигирования проводили трансформацию клеток штамма *E. coli* JM110, с последующим рассевом на чашки с селективной средой LB, содержащей канамицин. Скрининг клонов на содержание плазмиды с целевой вставкой проводили с помощью ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров (Shud1-Shud2). Из отобранных клонов были выделены плазмиды, содержащие целевую вставку. Определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК подтвердило искомую структуру полноразмерного гена *udp* и его промотер-операторной части из *S. oneidensis* MR-1. Первичная последовательность гена была депонирована нами в GenBank (GQ 294526). Отобранная рекомбинантная плаزمида обозначена как pSUDP, схема плазмиды представлена на рисунке 21.

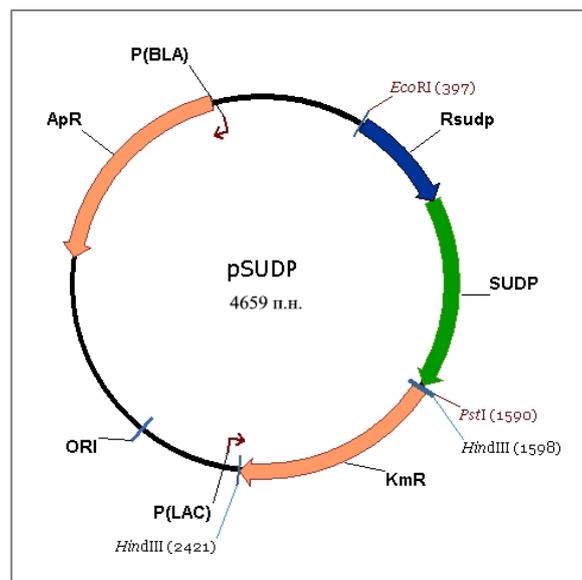


Рисунок 21. Схема рекомбинантной экспрессионной плазмиды pSUDP. Синей стрелкой обозначена промотер-операторная область гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 (Rsudp). Зеленой стрелкой обозначена кодирующая последовательность гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 (SUDP). Оранжевыми стрелками обозначены гены устойчивости к ампициллину (ApR) и канамицину (KmR). ORI – точка начала репликации. P(LAC), P(BLA) – промотерные области генов *lacI* и *bla*, соответственно.

С целью проверки наличия и эффективности гомологичной экспрессии гена *sudp* была проведена трансформация штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1 плазмидой pSUDP. Кроме того, несмотря на полученные нами ранее данные об активности промотер-операторной области *udp* *E. coli* в клетках *S. oneidensis* MR-1 (глава 4.1.1.), были проведено дополнительное исследование активности промотера гена *udp* *E. coli* в клетках *S. oneidensis* MR-1 в аэробных и анаэробных условиях. В качестве альтернативной модели использовали определение наличия гетерологичной экспрессии гена *udp* из *E. coli* под контролем аутентичной промотер-операторной области. Плазмида, содержащая ген *udp* из *E. coli* под контролем собственной промотер-операторной области, была сконструирована в нашей лаборатории ранее [3]. Дополнительно в состав данного вектора был клонирован ген устойчивости к канамицину по методу, описанному в главе (4.1.1.), для селективного отбора трансформантов *S. oneidensis* MR-1. Модифицированная плазмида получила название pEUDP и ею также была проведена трансформация штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1. В качестве отрицательного контроля при измерении активности уридинфосфорилазы использовали два штамма *S. oneidensis* MR-1: исходный штамм-реципиент дикого типа и штамм-трансформант, содержащий плазмиду pUC19Km.

Культивирование отобранных трансформантов (*S. oneidensis* MR-1/pSUDP/pUUDP/pUC19Km) осуществляли в шейкере-инкубаторе (250 об/мин) в среде TSB с канамицином в концентрации 50 мг/мл, при 30⁰С в течение 18 и 24 часов при аэробном и анаэробном культивировании, соответственно. Определение уровня накопления рекомбинантного белка методом разделения в 12.5% ПААГ суммарных белков общего лизата для клеток трансформантов в случае *S. oneidensis* MR-1 оказалось затруднено. Полученные белковые профили были достаточно насыщенными пост-модифицированными белками реципиентного штамма (данные не приведены), поэтому однозначного вывода о накоплении рекомбинантного белка по данным электрофореза сделать не удавалось. Удобным альтернативным методом определения наличия рекомбинантного белка, в случае экспрессии гена, кодирующего фермент, может

быть детекция его ферментативной активности (глава 4.1.1.). Активность UDP определяли в растворимой фракции клеточного лизата, полученного после обработки биомассы на ультразвуковом дезинтеграторе. По данным, приведенным в таблице 6, уровень активности уридинфосфорилаз (EUDP и SUDP) в лизатах клеток сопоставим между собой как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Таблица 6. Измерение активности уридинфосфорилазы в лизатах клеток трансформантов *S. oneidensis* MR-1 при культивировании в аэробных и анаэробных условиях

Штамм	Активность UDP, ед/мг общего белка	
	Аэробные условия	Анаэробные условия
<i>S. oneidensis</i> MR-1 wt	1.1±0.07	1.3±0.06
pUC19Km	1.0±0.05	1.0±0.05
pSUDP	4.3±0.08	6.7±0.07
pUUDP Km	3.1±0.07	6.5±0.07

Условные обозначения: *S. oneidensis* MR-1 wt – исходный штамм-реципиент, pUC19Km – трансформант *S. oneidensis* MR-1 исходной плазмидой pUC19Km, pSUDP – трансформант *S. oneidensis* MR-1 плазмидой pSUDP, pUUDP – трансформант *S. oneidensis* MR-1 плазмидой pUUDP

При этом следует отметить, что активность рекомбинантной уридинфосфорилазы в лизатах клеток, культивируемых в анаэробных условиях даже несколько выше по сравнению с аэробными условиями. Полученные данные по наличию гомологичной экспрессии гена *udp* в клетках *S. oneidensis* MR-1 позволяют предположить функциональную активность данной промотор-операторной области в клетках *E. coli*. Для проверки данного предположения была проведена трансформация штамма-реципиента *E. coli* С600 плазмидами pSUDP и pUC19Km. Отобранные трансформанты культивировали в течение ночи на среде LB с канамицином в концентрации 50мкг/мл.

Уровень накопления рекомбинантного белка оценивали с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (рис. 22).

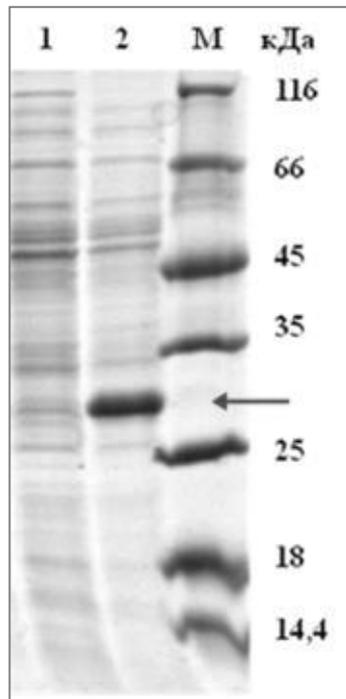


Рисунок 22. Электрофоретическое разделение в денатурирующем 12.5% ПААГ белков растворимой фракции, полученной после разрушения биомассы клеток-трансформантов *E. coli* С600 ультразвуком. Фракции растворимых белков клеток штаммов: 1 – С600/pUC19Km, 2 – С600/pSUDP, М-маркер молекулярной массы белков. Стрелкой обозначена полоса рекомбинантной SUDP.

Из рисунка 22 следует, что целевой полипептид накапливается в значительном количестве в виде мажорной полосы с предполагаемой молекулярной массой 27 кДа.

Полученные данные (рис.22) свидетельствуют о том, что промотер-операторная область гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 способна осуществлять высокоэффективную транскрипцию в клетках *E. coli* С600, т.е. в условиях гетерологичной экспрессии. Этот факт хорошо согласуется с аналогичными результатами по различным вариантам экспрессии гена *udp*, полученными ранее [3, 7] в нашей лаборатории при гомологичной экспрессии гена *udp* из *E. coli*, а

также гетерологичной экспрессии гена *udp* из *S. typhimurium* и *Klebsiella aerogenes* в клетках *E. coli* [8].

Кроме того, в литературе также имеются данные об успешной гетерологичной экспрессии гена *udp* из *S. typhimurium*, *V. cholerae* и *Y. pseudotuberculosis* в клетках *E. coli* [24, 234].

Полученные экспериментальные результаты еще раз подтверждают высказанное нами предположение, что промотер-операторные области уридинфосфорилаз из двух организмов – *E. coli* и *S. oneidensis* MR-1, могут быть эффективно использованы перекрестно в обоих организмах при проведении гомо- и гетерологичной экспрессии целевых генов.

4.3.2. Структурно-функциональная характеристика уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1

Высокий уровень накопления рекомбинантной уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, обнаруженный при гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* (глава 4.3.1, рисунок 22), позволяет выделить и очистить этот белок для проведения более детального сравнительного анализа свойств новой SUDP с уже охарактеризованными уридинфосфорилазами. Анализ аминокислотных последовательностей UDP из разных микроорганизмов выявил их значительную, не менее 75%, а в некоторых случаях и до 90% гомологию [8, 37]. Сравнение первичных структур SUDP и модельного белка EUDP с использованием базы данных BLAST выявило 75% идентичных аминокислотных остатков, итоговое выравнивание EUDP и SUDP приведено на рисунке 23. К настоящему времени наиболее изученным является белок UDP из *E. coli*. Это гомогексамер, каждая субъединица которого состоит из 253 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 27.5 кДа [230]. Методом рентгеноструктурного анализа получена трехмерная структура белка UDP из *E. coli* высокого разрешения и с помощью сайт-направленного мутагенеза выявлена ключевая роль в функционировании фермента ряда аминокислотных остатков [6-7, 32, 35-37, 50,

53, 141, 158]. Кроме того установлена важная роль отдельных фрагментов полипептидной цепи в формировании и поддержании активной формы фермента [32].

	1	10	20	30	40	50
Ec	MSKSDVFHLG	LTKNDLQGAT	LAIVPGDPDR	VEKIAALMDK	PVKLASHREF	
So	M--ADVFHLG	LTKAMLDGAT	LAIVPGDPER	VKRIAELMDN	ATFLASHREY	
		60	70	80	90	100
Ec	TTWRAELD GK	PVIVCSTGIG	GPSTSI AVEE	LAQLGIR TFL	RIGTTGAIQP	
So	TSYLAYADGK	PVVICSTGIG	GPSTSI AVEE	LAQLGVN TFL	RVGTTGAIQP	
		110	120	130	140	150
Ec	HINVGDLVLT	TASVRLDGAS	LHFAPLEFPA	VADFECTTAL	VEAAKSIGAT	
So	HVNVGDVIVT	QASVRLDGAS	LHFAPMEFPA	VANFECTTAM	VAACRDAGVE	
		160	170	180	190	200
Ec	THVGV TASSD	TFYPGQERYD	TYSGRVVRHF	KGSMEEWQAM	GVMNYEMESA	
So	PHIGV TASSD	TFYPGQERYD	TVTGRVTRRF	AGSMKEWQDM	GVLNYEMESA	
		210	220	230	240	250
Ec	TLLTMCASQG	LRAGMVAGVI	VNRTQQEIPN	AETMKQTESH	AVKIVVEAAR	RLL-
So	TLFTMCATQG	WRAACVAGVI	VNRTQQEIPD	EATMKKTEVS	AVSIVVAAAK	KLLA

Рисунок 23. Выравнивание первичных структур уридинфосфорилаз EUPD и SUDP. Обозначения: Ec – *E. coli*, So – *S. oneidensis* MR-1.

Следует отметить, что, кроме ставшего уже модельным белка EUDP, получены кристаллы и проведен PCA для ряда уридинфосфорилаз из других организмов [19, 27, 74, 114, 173]. Однако, до настоящего времени остается окончательно не проясненными и уточненными молекулярные детали как механизма ферментативной реакции, так и роли отдельных аминокислотных остатков в формировании активной формы фермента, связывании субстратов и участии в непосредственном функционировании этого белка.

4.3.2.1. Выделение и очистка рекомбинантной SUDP

Для определения физико-химических свойств SUDP была осуществлена очистка данного рекомбинантного белка от суммарных белков штамма-продуцента. Нарботку биомассы клеток штамма-трансформанта *E. coli* C600, содержащего плазмиду pSUDP, проводили культивированием клеток на среде LB

с канамицином в концентрации 50 мкг/мл в течение ночи при 37⁰С в шейкере-инкубаторе (250 об/мин).

Биомассу из 300 мл ночной культуры осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 8000 об/мин, осадок ресуспендировали в 20 мл 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора «Ultrasonic Processor» («Cole Parmer», США) и выделяли рекомбинантный белок по методу, описанному в разделе материалы и методы (стр. 72). На рисунке 24 представлен результат электрофоретического разделения фракций белков в денатурирующем 12.5% ПААГ.

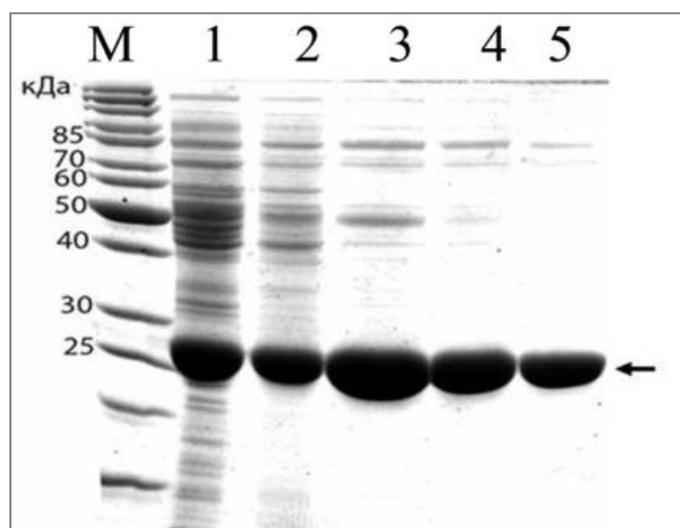


Рисунок 24. Электрофоретическое разделение в денатурирующем 12.5% ПААГ фракций, содержащих рекомбинантную уридинфосфорилазу. М – маркеры молекулярной. 1 – исходная фракция растворимых белков *E. coli* K-12 C600/pSUDP. 2 – фракция, полученная в результате первой хроматографии. 3–5 – фракция, полученная в результате рехроматографии: нанесены 18 мкг (3), 9 мкг (4) и 4 мкг (5) очищенного белка. Целевой белок обозначен стрелкой.

Как следует из приведенного рисунка 24, в результате проведенной хроматографической очистки получен чистый препарат рекомбинантного белка. Удельная активность выделенного белка SUDP составляет 99.1 ед/мг (при измерении в 0.1 М К⁺-фосфатном буфере pH 7.4, как описано в главе 3.2). Всего было выделено 40.7 мг белка.

4.3.2.2. Масс-спектрометрический (MALDI) анализ выделенного белка SUDP

Для дополнительного подтверждения соответствия структур выделенной рекомбинантной SUDP и аннотированной нами в базе данных GenBank (GQ 294526), образец выделенного и лиофилизированного SUDP растворяли в воде для получения MALDI-масс спектров (рисунок 25).

В результате для SUDP были получены масс-спектры триптической фрагментации белка, соответствующие расчетным значениям.

2 - 11	1100.6207	M.ADVFHLGLTK.A
2 - 28	2807.4714	M.ADVFHLGLTKAMLDGATLAIVPGDPER.V
12 - 28	1725.8973	K.AMLDGATLAIVPGDPER.V
12 - 28	1741.8965	K.AMLDGATLAIVPGDPER.V
12 - 30	1953.0520	K.AMLDGATLAIVPGDPERVK.R
12 - 30	1969.0420	K.AMLDGATLAIVPGDPERVK.R
12 - 31	2109.1436	K.AMLDGATLAIVPGDPERVKR.I
31 - 46	1844.9461	K.RIAELMDNATFLASHR.E
31 - 46	1860.9442	K.RIAELMDNATFLASHR.E
32 - 46	1688.8479	R.IAELMDNATFLASHR.E
32 - 46	1704.8379	R.IAELMDNATFLASHR.E
47 - 89	4561.4347	R.EYTSYLAYADGKPVVICSTGIGGPSTSIAVEELAQLGVNTFLR.V
90 - 113	2418.3121	R.VGTTGAIQPHVNVGDVIVTQASVR.L
114 - 143	3312.5508	R.LDGASLHFAPMEFFAVANFECTTAMVAACR.D
114 - 143	3328.5522	R.LDGASLHFAPMEFFAVANFECTTAMVAACR.D
144 - 166	2433.1441	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQER.Y
144 - 173	3225.5101	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQERYDVTGR.V
144 - 176	3581.7489	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQERYDVTGRVTR.R
144 - 177	3737.8565	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQERYDVTGRVTRR.F
167 - 173	811.3949	R.YDVTGR.V
177 - 183	796.4134	R.RFAGSMK.E
177 - 210	4045.8493	R.RFAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
177 - 210	4061.8575	R.RFAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
178 - 210	3889.7523	R.FAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
178 - 210	3905.7639	R.FAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
211 - 221	1072.5894	R.AACVAGVIVNR.T
211 - 221	1143.6398	R.AACVAGVIVNR.T
211 - 233	2515.2757	R.AACVAGVIVNRTQQEIPDEATMK.K
211 - 248	3969.1654	R.AACVAGVIVNRTQQEIPDEATMKKTEVSAVSIVVAAAK.K
211 - 249	4097.2711	R.AACVAGVIVNRTQQEIPDEATMKKTEVSAVSIVVAAAKK.L
222 - 233	1390.6580	R.TQQEIPDEATMK.K
222 - 234	1518.7531	R.TQQEIPDEATMKK.T
222 - 248	2844.5039	R.TQQEIPDEATMKKTEVSAVSIVVAAAK.K
222 - 248	2860.4874	R.TQQEIPDEATMKKTEVSAVSIVVAAAK.K
222 - 249	2972.5979	R.TQQEIPDEATMKKTEVSAVSIVVAAAKK.L
222 - 249	2988.5729	R.TQQEIPDEATMKKTEVSAVSIVVAAAKK.L
234 - 249	1600.9677	K.KTEVSAVSIVVAAAKK.L
235 - 248	1344.7809	K.TEVSAVSIVVAAAK.K
235 - 249	1472.8762	K.TEVSAVSIVVAAAKK.L

Жирным шрифтом выделены фрагменты, максимально полно перекрывающие структуру SUDP. Согласно приведенным данным, масс-спектрометрии первичная структура рекомбинантной SUDP полностью соответствует аннотированной нами ранее структуре (GQ 294526).

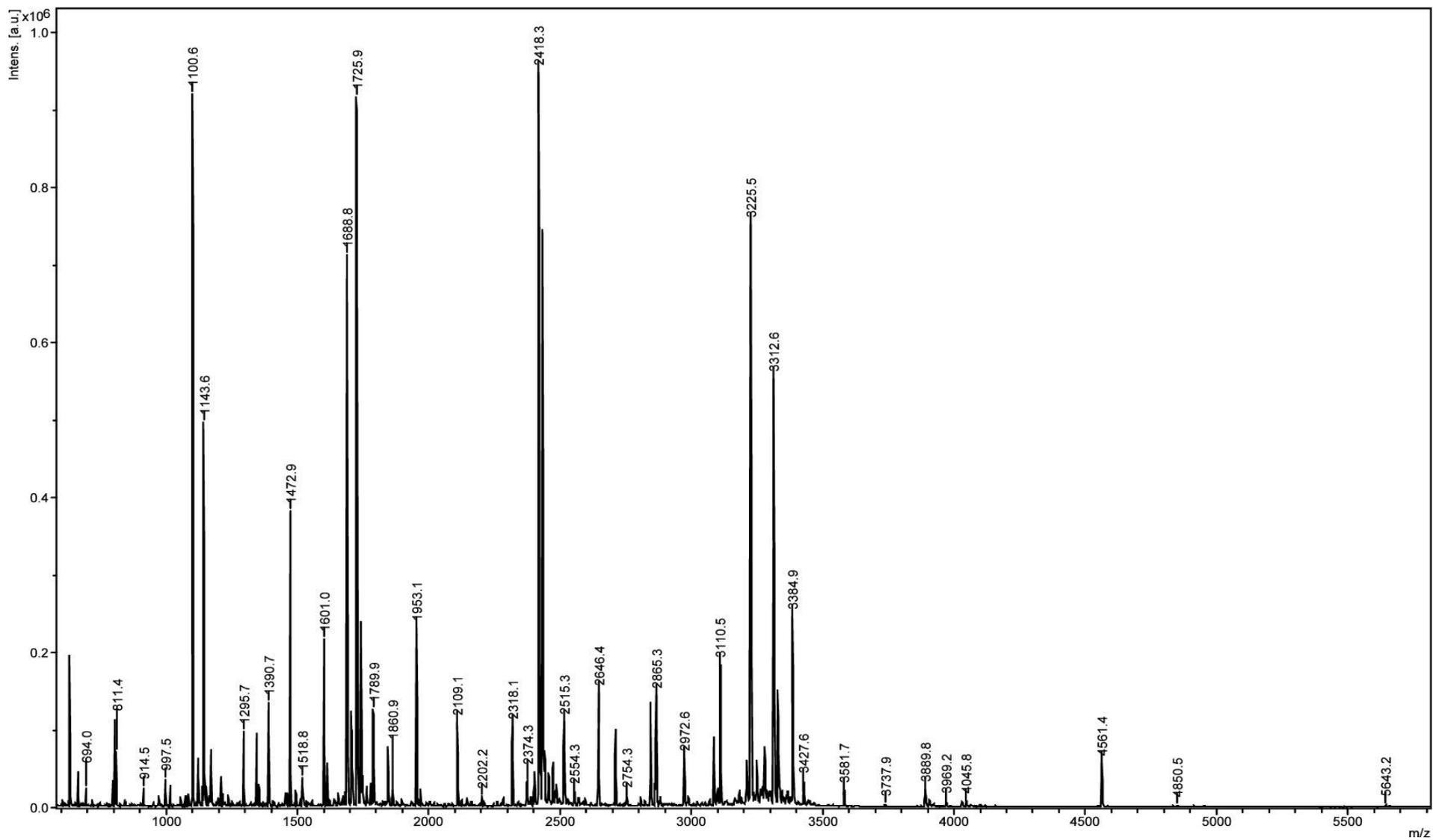


Рисунок 25. Масс-спектр триптического гидролизата очищенного белка SUDP.

4.3.2.3. Анализ четвертичной структуры SUDP (гель-фильтрация)

В литературе опубликованы данные, свидетельствующие о том, что уридинфосфорилазы из разных γ -протеобактерий образуют в растворе гексамерную форму [8, 24, 34, 61]. Однако, опубликована одна работа, в которой авторами получены данные о существовании уридинфосфорилазы из *Enterobacter aerogenes* EAM-Z1 в виде тримера с молекулярной массой мономера 43кДа [184]. Особо следует отметить, что данный штамм, являющийся источником описанного белка, не только не указан в международной коллекции микроорганизмов ATCC (http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Bacteria.aspx) но и не аннотирован в других базах данных, таких как, например, NCBI. В цитируемой выше статье штамм *E. aerogenes* EAM-Z1 охарактеризован, как мутантный, с повышенной общей активностью UDP. Эти неоднозначные факты позволяют на данном этапе исключить описанный белок из рассмотрения четвертичных структур нативных уридинфосфорилаз, т.к. он, по-видимому, не является природной формой фермента, а представляет собой вариант белка, полученный в результате мутагенеза. Кроме того, уридинфосфорилаза из другого штамма *E. aerogenes* имеет гексамерную форму, как было показано экспериментально ранее [8].

Анализ четвертичной структуры SUDP был проведен методом гель-фильтрации на колонке, заполненной носителем Superdex-200. Калибровку колонки проводили набором белков, включая ранее полученную нами рекомбинантную уридинфосфорилазу из *E. coli* (EUDP), для которой уже была установлена гексамерная форма существования белка в растворе [3]. Данные по калибровочным белкам приведены в таблице 7, а профили гель-фильтрационного анализа – на рисунках 26 и 27. Результаты, приведенные на рисунках 26 и 27, подтверждают, что времена выхода уридинфосфорилаз из *S. oneidensis* MR-1 ($V_{\text{вых}}$ 13.97 мл) и из *E. coli* ($V_{\text{вых}}$ 14.22 мл) практически совпадают. Этот факт подтверждает предположение, что уридинфосфорилаза из *S. oneidensis* MR-1 (SUDP), так же, как и уридинфосфорилаза из *E. coli* (EUDP) формирует в растворе гексамерную четвертичную структуру.

Таблица 7. Белки, использованные для проведения калибровки колонки при проведении гель-фильтрации.

Маркерный белок	Молекулярная масса белка, кДа	V _{ВЫХ} , мл
Лизоцим	14.4	22.41
Стрептавидин	18	15.48
Бычий сывороточный альбумин	66.2	15.93
Уридинфосфорилаза из <i>E. coli</i>	163	14.22

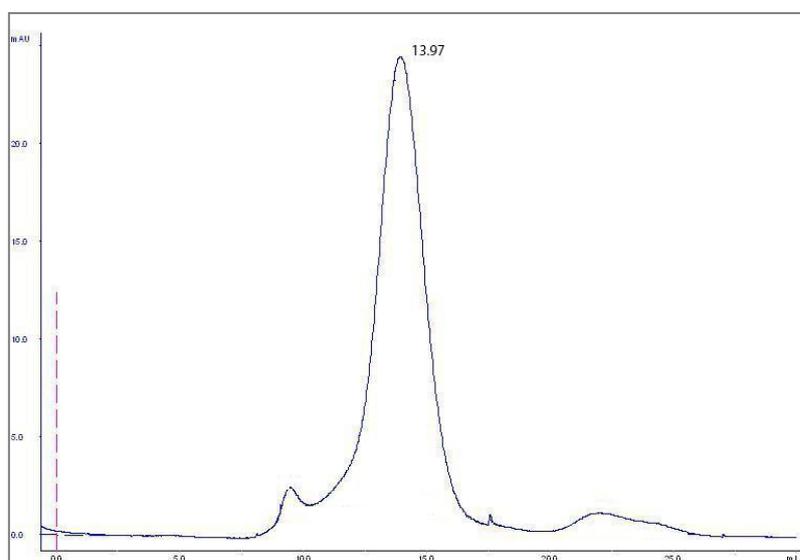


Рисунок 26. Хроматографический профиль гель-фильтрации белка SUDP.

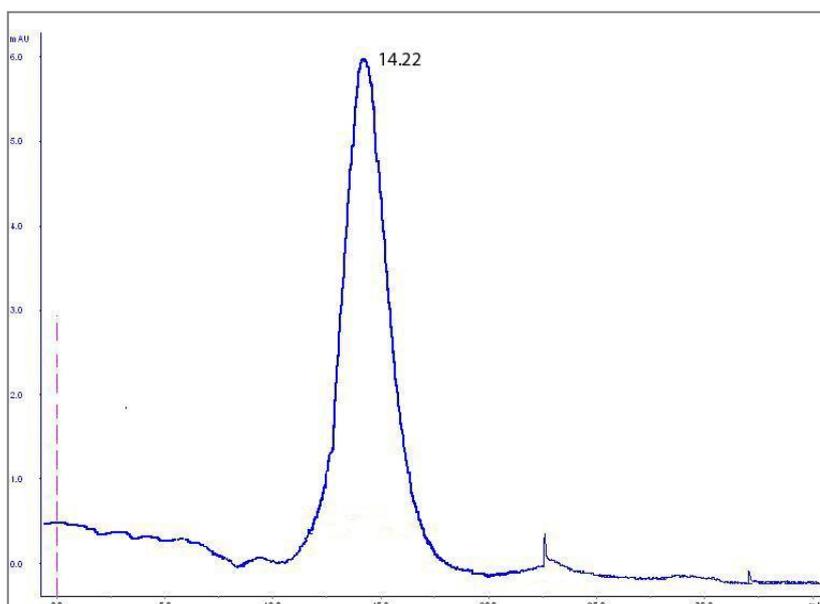


Рисунок 27. Хроматографический профиль гель-фильтрации белка EUDP.

Следует все же отметить, что объем выхода EUDP несколько больше, чем у SUDP. Этот факт может свидетельствовать о том, EUDP образует более «компактную» четвертичную структуру.

4.3.2.4. Определение температурного оптимума SUDP

Определение температурного оптимума SUDP проводили в диапазоне температур 30-60⁰С с шагом 5⁰С в 10 мМ Na⁺-фосфатном и K⁺-фосфатном буфере рН7.4. Реакционная смесь содержала: 10 мкл 0.1 М Na⁺/K⁺-фосфатного буфера рН 7.4, 4 мкл исследуемого образца, 66 мкл воды и 20 мкл 25 мМ уридина. Предварительно прогретые до исследуемой T⁰С растворы уридина и исследуемого образца смешивали, после чего инкубировали при данной температуре в течение 300с. После этого, в реакционную смесь добавляли 900 мкл 0.1 М NaOH. Изменение оптической плотности раствора регистрировали при длине волны 290 нм на спектрофотометре «UV-1800» («SHIMADZU», Япония). Измерение осуществляли относительно аналогичной реакционной смеси, с предварительно заблокированной (перед внесением уридина) реакцией добавлением к раствору 900 мкл 0.1 М NaOH. Активность уридинфосфорилазы рассчитывали согласно [119]. Измерение проводили в двух буферах в связи с тем, что сравнительно недавно в литературе появились данные о влиянии ионов K⁺ на формирование и стабилизацию активной формы фермента UDP. Таким образом, для возможности проведения сравнительного анализа полученных данных и литературных, опубликованных в работе [53], исследования активности при определении температурного оптимума проводились в условиях, аналогичных описанным в вышеуказанной статье. Более детальное исследование влияния ионов щелочных металлов на активность и стабильность белка SUDP описаны в разделе 4.5. На рисунке 28 приведены графики зависимости активности SUDP от температуры при измерении в Na⁺- и K⁺-фосфатных буферах. Как видно из данных, представленных на рисунке 28, температурный оптимум SUDP имеет

разное значение в зависимости от используемого буфера и составляет 47⁰С и 55⁰С для Na⁺- и K⁺-фосфатного буфера, соответственно

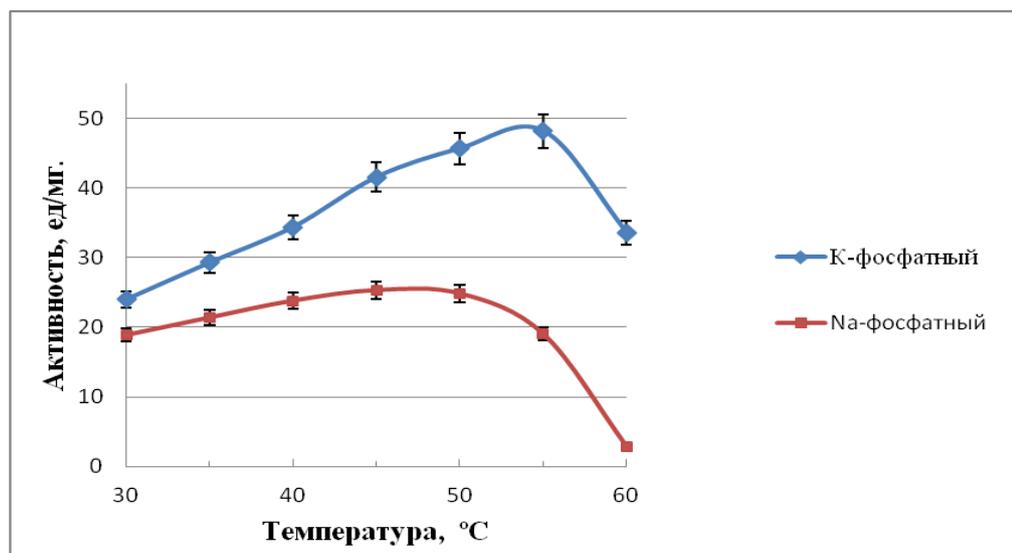


Рисунок 28. Зависимость активности SUDP от температуры при измерении в 10 мМ Na⁺- и K⁺-фосфатном буфере, pH 7.4.

Помимо увеличения значения температурного оптимума в присутствии иона K⁺ наблюдалось сохранение достаточно высокого значения активности при повышении температуры до 60⁰С, тогда как в Na⁺-фосфатном буфере активность SUDP практически утрачивается. Полученные данные по значению температурного оптимума значительно отличаются от данных, опубликованных для EUDP (табл. 8) [119].

Особое внимание обращает на себя не только разница в удельной активности фермента при проведении исследований в присутствии иона K⁺, но и повышение температурного оптимума фермента на 8 градусов. Аналогичные данные по увеличению активности уридинфосфорилазы из *E. coli* в присутствии иона K⁺ приведены в работе [53]. В связи с этим, представляет достаточно большой интерес выяснение роли иона K⁺ как в стабильности самого фермента, так и во влиянии данного иона на его удельную активность (см. главу 4.5). Обнаруженное увеличение значения температурного оптимума в присутствии иона K⁺ предопределило в дальнейшем использование только K⁺-фосфатного буфера для определения значения pH-оптимума SUDP.

4.3.2.5. Определение pH-оптимума и изоэлектрической точки SUDP

Определение pH оптимума SUDP проводили в диапазоне pH 6.0-8.0 с шагом 0.5 ед в 10 mM K⁺-фосфатном буфере при 37⁰C. Реакционная смесь содержала: 10 мкл 0.1 M K⁺-фосфатного буфера с соответствующим значением pH, 4 мкл исследуемого образца, 66 мкл воды и 20 мкл 25 mM уридина. Раствор уридина добавляли в предварительно прогретый до 37⁰C образец, после чего инкубировали при заданной температуре в течение 300с. После этого, в реакционную смесь добавляли 900 мкл 0.1 M NaOH. Изменение оптической плотности исследуемого раствора регистрировали при длине волны 290 нм на спектрофотометре «UV-1800» («SHIMADZU», Япония) относительно аналогичной реакционной смеси, с предварительно блокированной (перед внесением уридина) ферментативной реакцией добавлением к раствору 900 мкл 0.1 M NaOH. Активность уридинфосфорилазы рассчитывали согласно [119]. В результате проведенных исследований был установлен pH-оптимум для данного фермента, составляющий 7.4 (рис. 29).

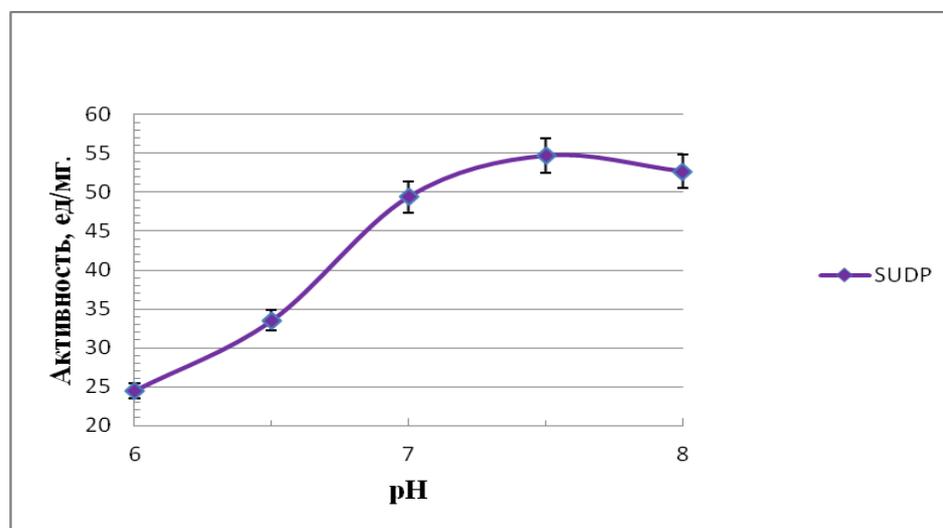


Рисунок 29. Зависимость активности SUDP от величины pH.

Согласно полученным данным, при определении значения pH оптимума для SUDP данный фермент достаточно устойчив и сохраняет высокий уровень активности при значении pH в пределах 7.0 – 8.0. Следует отметить, что, несмотря на обнаруженные различия в значениях температурного оптимума у SUDP и

EUDP, значения рН оптимумов у данных белков совпадают (табл.8). Кроме того, было проведено определение изоэлектрической точки SUDP. Полученное значение рI для SUDP составляет 4.55. Согласно данным, опубликованным в работе [229], величина рI EUDP составляет 5.25.

Как видно из данных, приведенных в таблице 8, значения рН оптимума для уридинфосфорилаз из разных γ -протеобактерий практически совпадают, тогда как значения температурного оптимума отличаются в большей степени.

4.3.2.6. Определение константы Михаэлиса по урину и фосфат-иону для SUDP

Одним из наиболее важных параметров, при определении кинетических характеристик фермента, является константа Михаэлиса. В таблице 8 представлены определенные в данной работе значения K_m SUDP для двух субстратов – уридина и фосфат-иона. Сравнение полученных значений K_m с литературными данными для других уридинфосфорилаз (табл. 8) обнаружило наибольшее сходство с K_m для UDP из *S. typhimurium*. Уменьшение значения K_m по фосфату SUDP относительно значения K_m для EUDP, коррелирует с увеличением удельной активности SUDP по сравнению с EUDP. Особо необходимо отметить разницу, иногда значительную, в значениях для одинаковых характеристик белков UDP из разных микроорганизмов, полученных разными авторами. В связи с этим может быть признано оптимальным проведение данного вида изучения свойств фермента в рамках одного исследования. Полученные характеристики уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 по некоторым параметрам отличаются от опубликованных данных для UDP из других γ -протеобактерий. Интересно отметить достаточно высокий уровень удельной активности SUDP по сравнению с EUDP. Согласно литературным данным, сопоставимый уровень удельной активности был установлен для UDP из *S. typhimurium* и *K. aerogenes* [37]. Значение K_m по двум субстратам для SUDP также наиболее близок к данным, опубликованным для UDP из *S. typhimurium* [37].

Однако, несмотря на одинаковое значение рН оптимума для EUDP и SUDP, наблюдается значительное различие в значении температурного оптимума этих ферментов

Таблица 8. Физико-химические характеристики уридинфосфорилаз из различных γ -протеобактерий.

UDP	Км, мМ		Уд. акт., ед/мг	рI	Т _{опт} , °С	рН _{опт}	Ссылка
	Urd	P _i					
<i>S. oneidensis</i> MR-1	0.23±0.02	5.1±0.5	99.1±2.9	4.55	53±2	7.4±0.2	Данная работа
<i>E. coli</i>	0.12	7.69	55.0	-	-	7.3	[8, 37]
	0.15	7.3	183	-	-	7.3	[119]
<i>E. aerogenes</i> 4140	0.15	7.2	98.7	-	-	7.3	[8, 37]
<i>E. aerogenes</i> AJ11125	0.7	-	97.8	-	65	8.5	[223]
<i>E. aerogenes</i> EAZ1	0.229	-	250.0	4.46	60	7.8	[184]
<i>S.</i> <i>typhimurium</i>	0.21	5.02	129.3	-	-	7.3	[8, 37]
<i>S.</i> <i>typhimurium</i> LT2	0.7	4.3	280.0	-	-	7.2-7.4	[24]

Примечание: - означает отсутствие данных.

Условные обозначения: Urd – уридин, P_i – неорганический фосфат-ион.

Как уже было отмечено (стр.120), температурный оптимум и удельная активность белка SUDP были выше в присутствии иона K⁺. Одной из причин

может быть повышенная стабильность гексамера в присутствии иона K^+ . Это может свидетельствовать о важной роли последнего в поддержании активного центра на уровне стабилизации вторичной, третичной и четвертичной структур.

4.3.2.7. Термическая денатурация уридинфосфоорилазы из *S. oneidensis* MR-1 (SUDP)

Отмеченное выше влияние ионов калия на удельную активность фермента предопределило исследование тепловой денатурации белка в присутствии ионов калия и натрия. Для этого было проведено плавление белка в диапазоне 10^0 - 95^0 С в K^+ - и Na^+ -фосфатном буфере.

На рисунке 30 представлены графики зависимости значения эллиптичности при 220 нм в диапазоне температур 20^0 - 90^0 С при плавлении образцов белка в разных буферах.

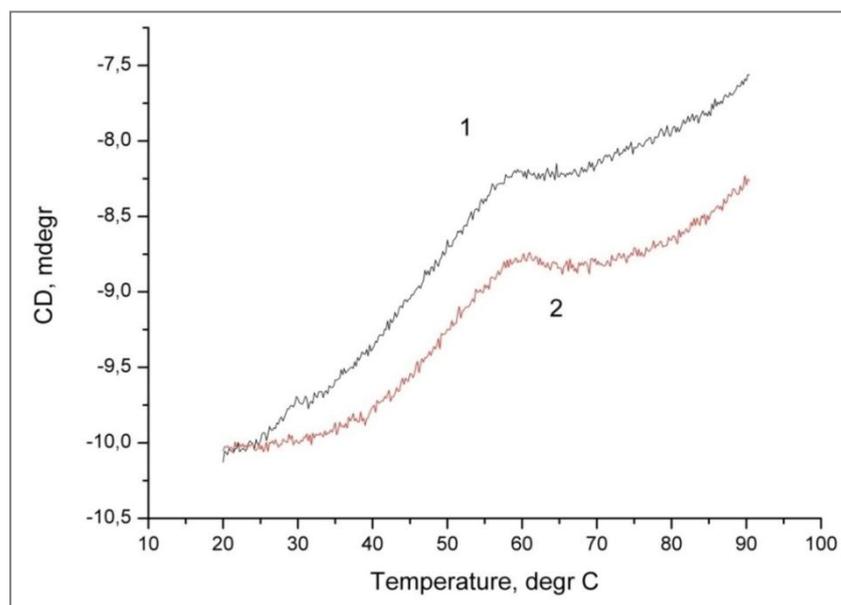


Рисунок 30. Кривые плавления SUDP в 10 мМ K^+ - и Na^+ -фосфатном буфере рН 7.4. Обозначения: 1 – кривая плавления в Na^+ -фосфатном буфере. 2 – кривая плавления в K^+ -фосфатном буфере.

Плавление образцов SUDP проводили в 10 мМ Na^+ -фосфатном и K^+ -фосфатном буфере (рН7.4), концентрация белка составляла 0.1 мг/мл. Как видно

из хода кривых плавления (рис. 30), значения точки перехода белка в частично денатурированное состояние (примерно 60⁰С) являются практически одинаковыми для K⁺- и Na⁺-фосфатного буфера, что может свидетельствовать о малом влиянии данного иона на термолабильность структуры молекулы в целом. Обнаруженное различие в удельной активности ферментов UDP с одной стороны, и достаточно высокий уровень гомологии первичных структур с другой стороны предопределили необходимость получения кристалла SUDP для детального сравнительного анализа организации этого фермента.

Следует отметить, что к настоящему времени получены и расшифрованы кристаллы с использованием РСА с различной степенью разрешения (от 2.6 до 1.17 Å) структуры ферментов наиболее «близких» по гомологии к SUDP белков UDP из *E. coli* [50, 61, 141], *S. typhimurium* [74] и *V. cholerae* [114, 173].

4.3.2.8. Исследование структуры SUDP методом РСА

Выделенный, очищенный и охарактеризованный препарат SUDP был передан в лабораторию «Инженерной энзимологии» ИНБИ им.А.Н. Баха РАН для проведения кристаллизации и дальнейшего РСА.

Для кристаллизации использовался лиофильно высушенный препарат выделенного белка SUDP, растворенный в деионизированной воде с концентрацией 20 мг/мл. Кристаллизация проводилась по методу висячих капель посредством диффузии в парах в пластиковых планшетах Linbro «Hampton research» (США) при комнатной температуре в условиях термостатирования. Кристалл SUDP был получен в условиях: 0.1 М Бис-Трис, рН 5.5; 0.75 М сульфата аммония, 0.75% (вес.) 3350 ПЭГ, 25% глицерина. Процедуру кристаллизации фермента проводили в лабораторных условиях и в условиях микрогравитации на Международной Космической станции. В результате получены кристаллы белка SUDP в свободной форме высокого качества и большого размераю (0.6 x 0.5 x 0.5 мм), что позволило в дальнейшем получить набор дифракционных отражений высокого разрешения и определить трехмерную структуру белка.

На рисунке 31 представлена фотография кристалла, полученного в условиях микрогравитации.

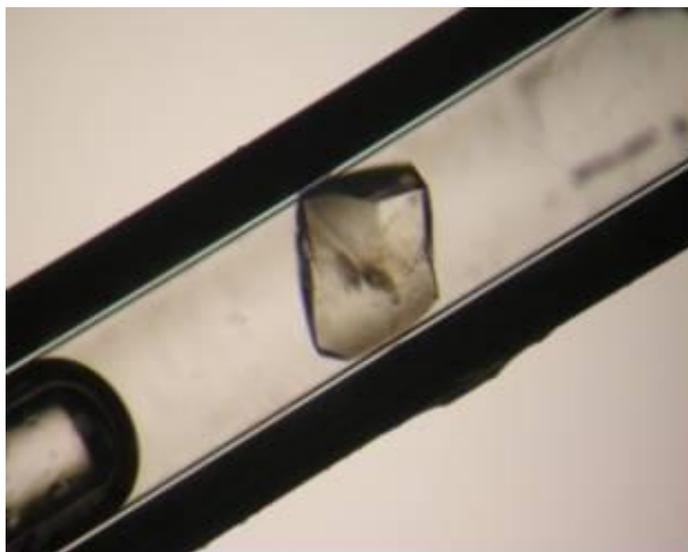


Рисунок 31. Кристалл уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 (в капилляре), полученный в условиях микрогравитации на Международной Космической станции (фотография предоставлена к.х.н. Сафоновой Т.Н).

Рентгеноструктурный анализ кристаллов был проведен на «Станции белковой кристаллографии Белок», НТК КЦСИиНТ. Анализ полученных данных осуществляли к.х.н. Сафонова Т.Н. и к.ф.-м.н. Поляков К.М совместно в лабораториях «Инженерной энзимологии» ИНБИ им.А.Н.Баха РАН и «Конформационной стабильности белков и физических методов анализа» ИМБ им. В. А. Энгельгардта РАН. Структурные данные для SUDP депонированы в Банке данных белковых структур (Protein Data Bank) (4HER, 4HEN).

В ходе анализа данных, полученных в результате проведения РСА, было показано, что SUDP в кристалле, также как и в растворе (см главу 4.3.2.3.), образует гексамерную четвертичную структуру, сформированную из шести гомологичных полипептидных цепей (рисунок 32). Белок представляет собой тороидальную структуру диаметром примерно 100\AA , высота тора составляет примерно 50\AA . Центральный канал всей структуры составляет около 18\AA в диаметре. Активные сайты в гомодимере фермента располагаются на расстоянии примерно 22\AA .

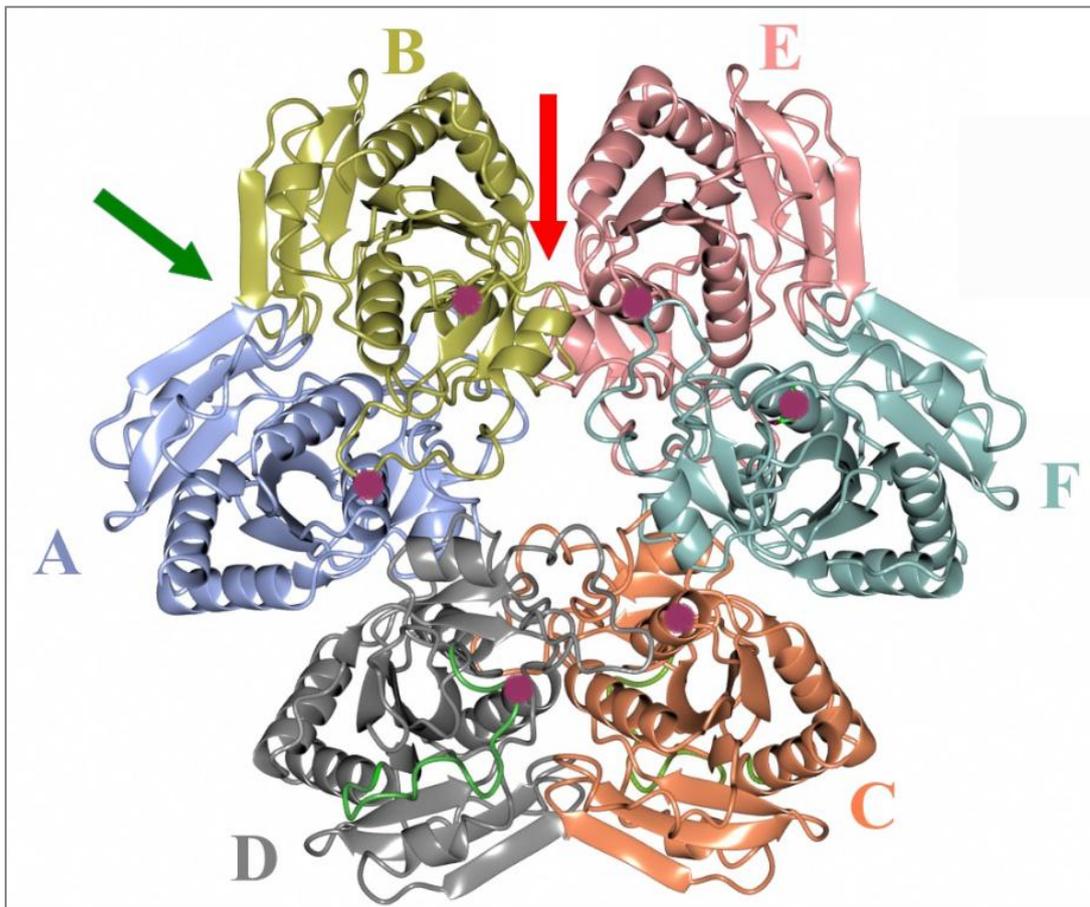


Рисунок 32. Гексамер SUDP, обозначены атомы только основной цепи. Отдельные субъединицы обозначены как А, В, С, D, Е и F. Красной стрелкой обозначен контакт между гомодимерами, а зеленой – контакт между мономерами в гомодимере. Фиолетовыми кружками условно обозначено расположение активных центров фермента. (рисунок предоставлен к.ф.-м.н. К.М. Поляковым).

Гексамер образован тремя гомодимерами, которые являются минимальными единицами (рис. 33) структурирования активного фермента, поскольку обе субъединицы белка предоставляют аминокислотные остатки для формирования активных центров: Gly23, Arg27, Arg88, Thr91, Gln163, Arg165 и Met194 и др. одной субъединицы, а His5 и Arg45 – от другой. Особое внимание привлекают остатки His5 и Arg45, которые входят в состав активного центра и презентуются соседними субъединицами (рис.33). Такое взаимодействие субъединиц белка должно дополнительно способствовать закреплению структуры гомодимера как минимальной единицы активного фермента. Полученные данные

хорошо согласуются не только с результатами гель-фильтрации (глава 4.3.2.3.), но и с литературными данными, опубликованными для кристаллов UDP из *E. coli* [50, 61, 141], *S. typhimurium* [27, 74] и *V. cholerae* [114], подтверждающими гексамерную форму данных ферментов.

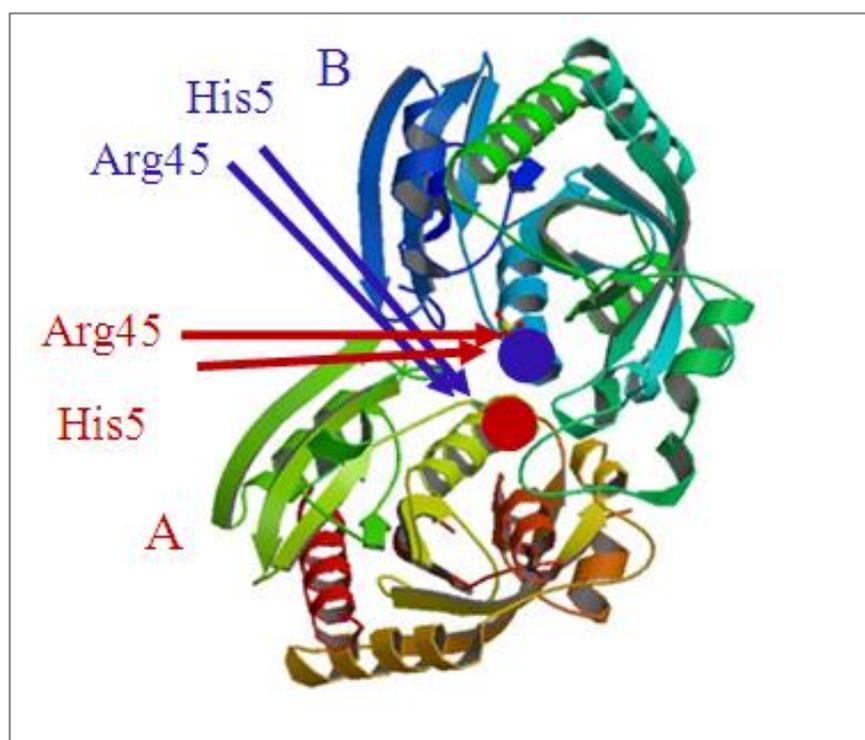


Рисунок 33. Гомодимер SUDP в представлении элементов вторичной структуры. Красным и синим кружками обозначено примерное расположение активных центров, сформированных в гомодимере уридинфосфорилазы. Красными и синими и стрелками обозначены аминокислотные остатки His5 и Arg45, презентруемые в соседними субъединицами а активный центр. (рисунок предоставлен к.ф.-м.н. К.М. Поляковым).

Для удобства рассмотрения элементов структуры на рисунке 34 представлена схема мономера уридинфосфорилазы.

Анализ литературных данных по структуре активных центров уридинфосфорилаз из различных микроорганизмов [19, 27, 53, 74, 105, 114, 173] показывает высококонсервативный репертуар аминокислотных остатков при формировании активного центра [84]. Указанный факт позволяет предположить общность молекулярного механизма действия у такого типа ферментов.

Получение кристалла SUDP в комплексе с субстратом (уридин) и сульфат-ионом (аналог фосфат-иона) позволило определить аминокислотные остатки, участвующие в связывании этих субстратов, и выявить аминокислотные остатки, формирующие активный центр исследуемого белка. Как указывалось выше, в результате исследования были определены аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента: Gly23, Arg27, Arg88, Thr91, Phe159, Gln163, Arg165, Met194, Arg220 одной субъединицы и His5 и Arg45 – другой.

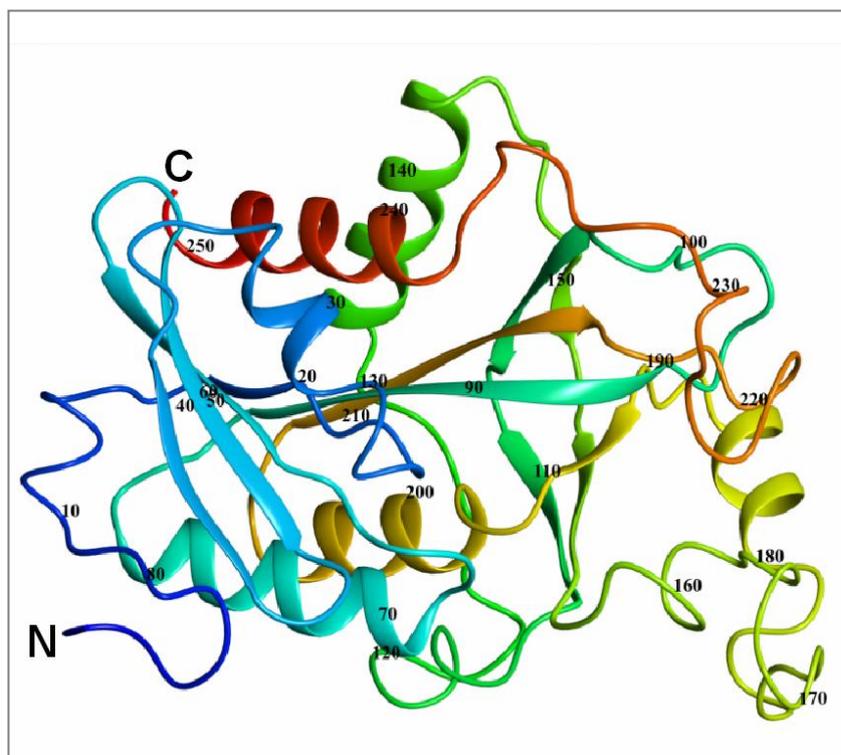


Рисунок 34. Схема мономера SUDP в представлении элементов вторичной структуры. Номера (левый нижний угол числа) соответствуют номеру аминокислотного остатка в первичной структуре полипептида (рисунок предоставлен к. ф-м. н. К.М. Поляковым).

Сайт связывания уридина можно разделить на два подцентра связывания субстрата – с гетероциклическим основанием (урацилом) и остатком рибозы. Анализ данных по PCA кристалла SUDP показал, что урацил-связывающий сайт включает в себя остатки Phe159, Gln163, Arg165 и Arg220 одной субъединицы. Данные остатки играют ключевую роль в узнавании пиримидинового фрагмента

субстрата. Рибозосвязывающий сайт сформирован остатками Arg88, Thr91, Met194 и Glu195 одной субъединицы гомодимера и остатком His5 второй субъединицы. Центр связывания фосфат-иона образован аминокислотными остатками Gly23, Arg27, Arg45 (из другой субъединицы), Arg88, Thr91. На рисунках 35 и 36 схематично отображены аминокислотные остатки, формирующие центры связывания уридина (рис.35) и сульфат-иона (рис.36).

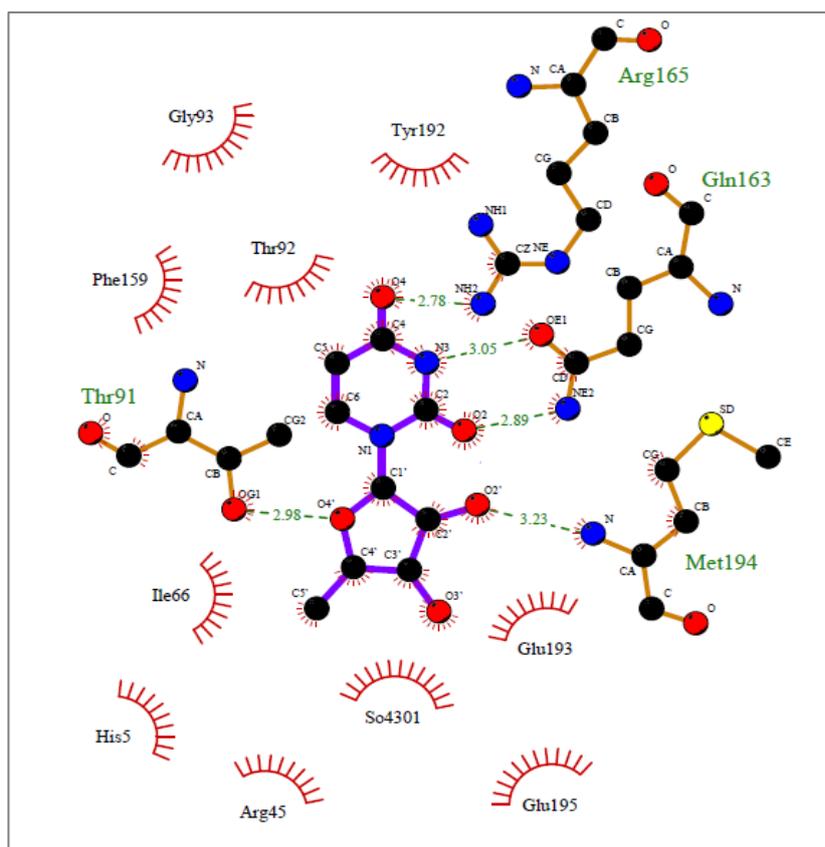


Рисунок 35. Схема контактов между аминокислотными остатками активного центра и молекулой уридина в активном центре SUDP. Красными полукружиями обозначены более отдаленные аминокислотные остатки, участвующие в поддержании структуры активного центра. Зеленым цветом обозначены ключевые аминокислотные остатки в центре связывания уридина. S_o4301-обозначен сульфат ион. (рисунок предоставлен к.ф.-м.н. Поляковым К.М).

Особое положение занимает, как следует из РСА, занимает остаток Thr91, который выполняет функцию связывания одновременно уридина и иона неорганического фосфата в структуре мономера уридинфосфорилазы.

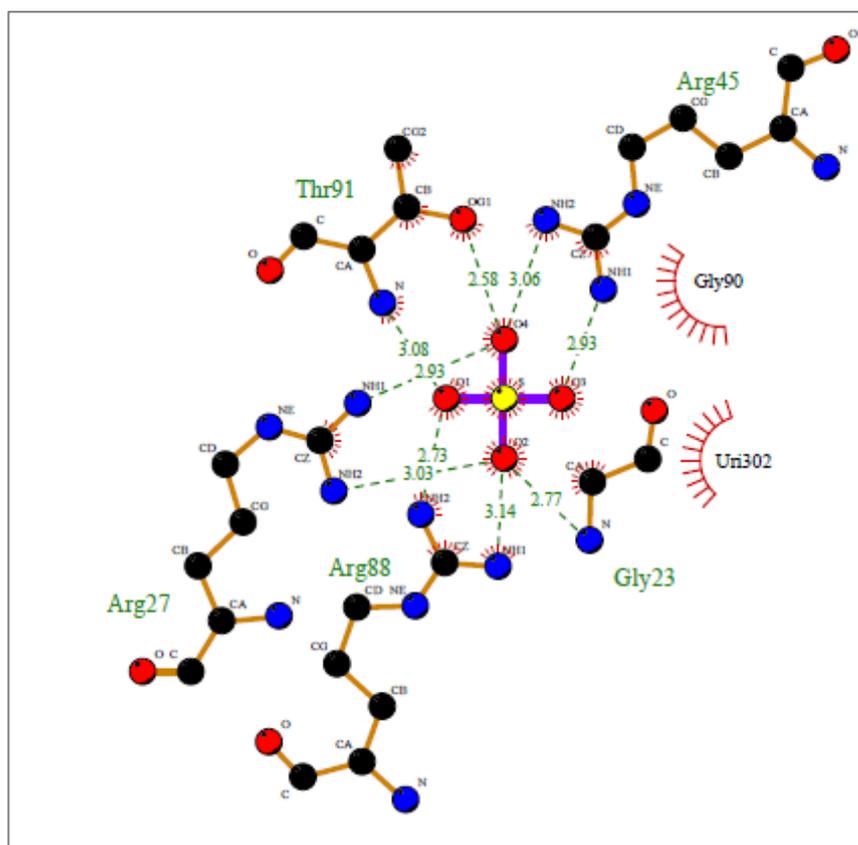


Рисунок 36. Схема контактов между аминокислотными остатками и сульфат-ионом в активном центре SUDP. Красными полукругиями обозначены более отдаленные аминокислотные остатки. Зеленым цветом обозначены ключевые аминокислотные остатки в центре связывания фосфат-иона. Uni302 – молекула уридина (рисунок предоставлен к.ф-м.н. Поляковым К.М).

Для сравнения на рисунке 37 представлена структура активного сайта EUDP [105]. Мономер SUDP содержит также протяженные петлевые структуры. Положение одной из этих петель (L9; остатки 217–227, рис. 34) по данным работы [27, 74] может меняться в зависимости от того, в каком состоянии находится активный центр. Эта петля весьма подвижна и может смещаться в сторону активного центра, образуя «закрытую» или «открытую» конформацию фермента. В состав петли входит своеобразный клапан, который подвержен наибольшим смещениям, в результате чего остаток Glu224 перемещается в сторону специфичной области, где он образует две пары водородных связей, стабилизирующих закрытую конформацию.

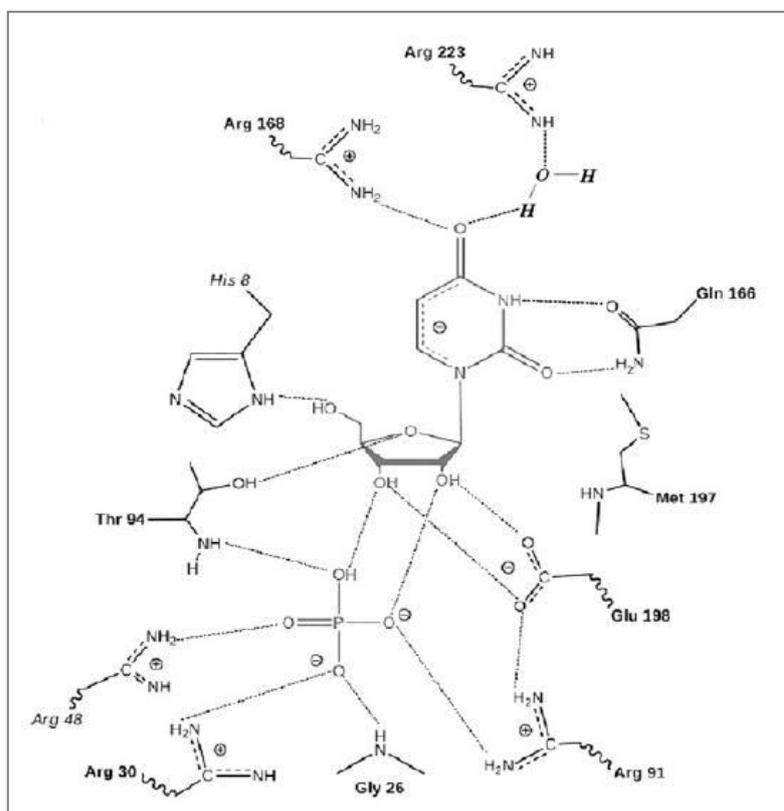


Рисунок 37. Схема активного центра уридинфосфорилазы *E. coli* в комплексе субстратами – уридином и фосфат-ионом, согласно [105].

Так, атом кислорода карбонила основной цепи Glu224 образует две водородные связи с боковой цепью Arg165, а боковая цепь Glu224 образует две водородные связи с атомами азота основной цепи остатков Tyr166 и Asp167. В случае «открытой» конформации эта петля смещается в сторону от активного центра и остаток Glu224 ориентирован в сторону растворителя. К настоящему времени обсуждение роли данного участка полипептидной цепи в функционировании уридинфосфорилазы проводилось в ряде работ [19, 27, 53, 74]. Основной постулат, предлагаемый в вышеозначенных работах, сводится к формированию петель L9 «открытой» или «закрытой» конформации уридинфосфорилаз EUDP и StUDP, определяя уровень активности фермента.

Таким образом, как следует из приведенных литературных данных, а также приведенных в настоящей работе результатов РСА, достаточно важной областью уридинфосфорилазы является С-концевой фрагмент, аминокислотные остатки

которого принимают участие в формировании структуры, важной для поддержания активного центра фермента.

На рисунке 38 приведено сравнение первичных структур С-концевых областей уридинфосфорилаз из разных порядков γ -протеобактерий.

	180	190	200	210	220	230
S.o	VTGRVTRRFA	GSMKEWQDMG	VLNYEMESAT	LFTMCATQGW	RAACVAGVIV	NRTQQEIPDE
E.c	YSGRVVRHFK	GSMEEWQAMG	VMNYEMESAT	LLTMCASQGL	RAGMVAGVIV	NRTQQEIPNA
Y.p	FSGRVVRHFK	GSMEEWQSMG	VMNYEMESAT	LLTMCASQGL	RAGMVAGVIV	NRTQQEIPNE
S.t	YSGRVVRRFK	GSMEEWQAMG	VMNYEMESAT	LLTMCASQGL	RAGMVAGVIV	NRTQQEIPNA
E.a	FSGRVVSRFK	GSMEEWQAMG	VMNYEMESAT	LLTMCASQGL	RAGMVAGVIV	NRTQQEIPNA
H.i	YSGKVYRDYQ	GLLKQWQDLN	VMNYEMESST	LFTMCSALGL	RAGMVAGVIV	NRTQQEIPNE
P.b	YSGKVYRDYQ	GLLKQWQDLN	VMNYEMESAT	LFTMCNALGL	RAGMVAGVIV	NRTQQEIPNE
A.h	VSGRVVSRFQ	GSMKEWQAMG	VLNYEMESAT	LLTMCATSQGL	RAGMVAGVIV	NRTQQEIPNA
O.v	HSARVLRRFQ	GSMKEWQSMG	VLNYEMESAT	LFTMCASQGL	KAGCVAGVIV	NRTQQEMPDD
V.c	FTGRVVRRFQ	GSMKEWQDMG	VLNFEMESAT	LLTMCASSGL	KAGCVAGVII	NRTQKEIPDH
P.p	FSGRVVKRFQ	GSMQEWQDMG	VLNFEMESAT	LLTMCASSGL	RAGCVAGVIV	NRTQKEIPDH
F.i	YSGYIRRHFI	NSLNEWKRLN	VLNFEMESSA	LFTVCATFGL	EASCLCTVLA	KRTTSEYIDK

Рисунок 38. Первичные структуры С-концевого фрагмента уридинфосфорилаз из отдельных видов разных порядков γ -протеобактерий. Голубой рамкой выделен инвариантный остаток цистеина, зеленой рамкой – аминокислотный остаток в положении 212. Сиреневой рамкой выделены последовательности уридинфосфорилаз представителей из порядка *Aeromonadales* и модельная последовательность уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1. Сокращенное название видов: **S.o** - *Shewanella oneidensis* MR-1; **E.c** - *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655; **Y.p** - *Yersinia pestis Antiqua*; **S.t** - *Salmonella typhimurium* strain LT2; **E.a** - *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190; **H.i** - *Haemophilus influenzae* 86-028NP; **P.b** - *Pasteurella bettyae* CCUG 2042; **A.h** - *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966; **O.v** - *Oceanimonas* sp. GK1; **V.c** - *Vibrio cholerae* BX 330286; **P.p** - *Photobacterium profundum* 3TCK; **F.t** - *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4.

Как следует из приведенного выше рисунка 38, в первичной структуре наблюдается значительная гомология С-концевой части уридинфосфорилаз, что предопределяет пристальное внимание к данному фрагменту. Кроме того, как уже

было описано выше, роль данного участка полипептидной цепи, по мнению ряда авторов [19, 27, 114], проявляется, прежде всего, в формировании «открытой» и «закрытой» конформаций фермента при участии петли L9. В литературе описано получение ряда мутантов по EUDP, сосредоточенных авторами в петле L9 [158]. В результате исследования были сконструированы мутантные формы белка, проявляющие повышенную, по сравнению с диким типом фермента, термостабильность. Указанные факты, позволили предположить, что конформационная структура данного участка, действительно, является важной, если не определяющей, в формировании активной формы UDP.

Ранее авторами [7, 32] при изучении роли остатков цистеина в функционировании уридинфосфорилазы была сконструирована мутантная форма EUDP, содержащая замену высококонсервативного остатка цистеина 206 на остаток серина (C206S). Изучение свойств полученного белка показало, что данная мутантная форма уридинфосфорилазы практически не обладает ферментативной активностью (определение активности проводилось в Na^+ -фосфатном буфере) [7, 32]. Более того, авторами, в отсутствие данных РСА уридинфосфорилазы, было высказано предположение об участии остатка C206 в формировании (стабилизации) четвертичной структуры ферментативно активной формы этого белка. В настоящей работе предпринято исследование влияния C-концевого участка полипептида на связывание белком субстратов – фосфат-иона и уридина.

Детальный анализ C-концевых участков первичных структур UDP представителей вышеуказанных порядков позволил разделить все структуры на два типа, содержащие в положении 212 цистеин или метионин (рис. 38), других вариантов замен аминокислотных остатков в данном положении обнаружено не было. К первому типу относятся уридинфосфорилазы видов из порядков *Thiotrichales*, *Alteromonadales*, *Vibrionales*, тогда как ко второму виды из порядков *Aeromonadales*, *Pasteurellales*, *Enterobacteriales*. Однако, был обнаружен 1 вид *Oceanimonas sp.* GK1 в порядке *Aeromonadales*, содержащий в указанном положении цистеин. По данным [66] расположение порядка *Aeromonadales* на

филогенетическом дереве между порядками *Vibrionales* и *Pasteurellales*, *Enterobacteriales* позволяет предположить существование переходной группы, в которой нами были обнаружены виды, как с цистеином, так и с метионином в положении 212 полипептидной цепи уридинфосфорилазы. Однако, наличие единственного отличного вида в порядке *Aeromonadales* может быть следствием отсутствия секвенированных геномов представителей других родов данного порядка или же результатом горизонтального переноса генов. Так, обращает на себя внимание, что в самом филогенетически «древнем» порядке *Thiotrichales* уридинфосфорилаза обнаруживается только у 10 представителей рода *Francisella*, что вероятно является результатом горизонтального переноса генов. Эти факты предопределили интерес к более подробному изучению роли этого аминокислотного остатка, также как и указанного участка полипептидной цепи в функционировании фермента. Немаловажным при определении роли отдельного аминокислотного остатка в функционировании белковой молекулы в целом является предварительная оценка его позиционирования в составе вторичной, третичной и четвертичной структур молекулы. На основе данных, полученных методом РСА для уридинфосфорилазы дикого типа из *S. oneidensis* MR-1 было отмечено, что отдельные петлевые участки полипептида (88 – 93 и 212 – 219 а.о.) имеют ярко выраженную флуктуационную подвижность, занимая в различных субъединицах отличающееся относительно белковой глобулы положение, указанное на (рис.39). Более того, на основании данных РСА было установлено, что остаток Cys212 располагается в непосредственной близости от фосфат-связывающей области фермента и входит в состав флуктуационно-подвижного участка 212 – 219 а.о.

С целью исследования функциональной значимости С-концевого участка UDP в целом и отдельного дополнительного, по отношению к инвариантному остатку цистеина С206, остатка цистеина в положении С212 было предпринято введение синонимической замены. Природа замены была определена следующими соображениями:

- Замена должна быть синонимической, т.е. быть своеобразным «миметиком» исходного аминокислотного остатка.
- Замена не должна повторять имеющиеся в природе варианты аминокислот в данном положении, чтобы эффект от вносимой замены был ярко выражен, по крайней мере, либо в рамках ферментативной активности, либо в локальных структурных изменениях самой полипептидной цепи.

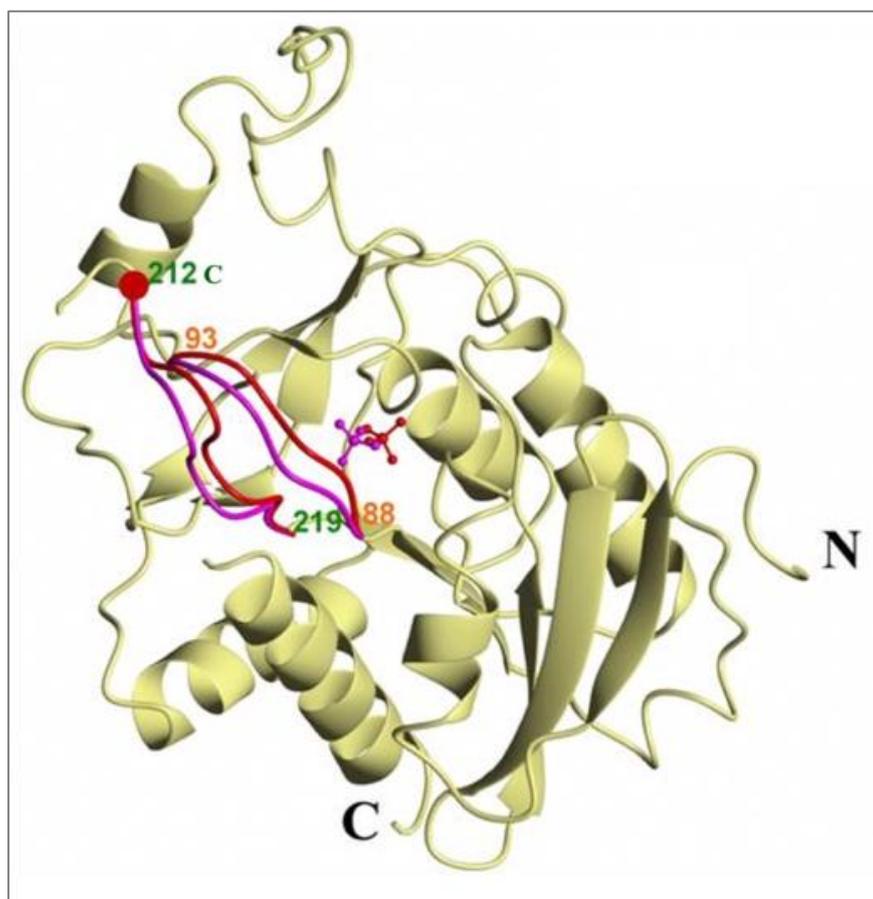


Рисунок 39. Флуктуация петлевых участков 88 – 93 и 212 – 217 а.о. в молекуле уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 в комплексе с ионом сульфата. Петлевые участки обозначены цветом: красный – «закрытое» положение, фиолетовый – «открытое». Красной точкой отмечено положение остатка Cys212 в структуре SUDP. (Рисунок предоставлен к.ф.-м.н. Поляковым К.М.).

Как следует из рисунка 38, в данном положении (212) полипептидной цепи уридинфосфорилаз из различных источников находятся остаток цистеина либо метионина. Однако, согласно таблице природных синонимических замен [69],

эволюционно наиболее часто встречается замена остатка цистеина на серин. Этот факт и предопределил природу вносимой замены.

4.4. Получение и структурно-функциональная характеристика мутантной формы уридинфосфорилазы из *Shewanella oneidensis* MR-1 (C212S)

4.4.1. Конструирование мутантной формы C212S, выделение и очистка белка

Введение состав гена уридинфосфорилазы целевой мутации, приводящей к аминокислотной замене C212S, проводили согласно ранее отработанному нами подходу [36].

Для этого была проведена амплификация фрагментов гена *sudp* с помощью пар олигонуклеотидных праймеров Shud1-C212SR и Shud2-C212SF (табл.2) с использованием плазмиды pSUDP в качестве матрицы. Полученные фрагменты гена, содержащие внесенную замену и взаимокomплементарный участок ДНК, были очищены и использованы в реакции ПЦР для перекрестной достройки. Амплификацию полученного на этом этапе мутантного гена уридинфосфорилазы проводили с использованием олигонуклеотидных праймеров Shud1-Shud2 (табл.2). Синтезированный таким образом фрагмент ДНК был очищен и клонирован в составе плазмиды pUC19Km, как описано выше при конструировании плазмиды pSUDP (глава 4.3.1.). Наличие внесенной замены C212S было подтверждено определением первичной последовательности клонированного фрагмента ДНК. Полученной плазмидой, названной pC212S, была проведена трансформация штамма-реципиента *E. coli* C600 и отобраны целевые трансформанты.

Для определения физико-химических параметров рекомбинантного белка содержащего внесенную замену C212S проведено хроматографическое выделение рекомбинантного белка. Биомассу клеток рекомбинантного штамма-продуцента *E. coli* C600, содержащего плазмиду pC212S, из 300 мл ночной культуры осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 8000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), клетки разрушали с помощью

ультразвукового дезинтегратора «Ultrasonic Processor» («Cole Parmer», США). Рекомбинантный белок выделяли согласно методу, описанному в главе материалы и методы (стр. 72). После определения количества выделенного белка его раствор переносили в пробирки, лиофилизировали и хранили при -20°C .

Выход рекомбинантной мутантной формы C212S составил 27.3 мг. На рисунке 40 приведены результаты электрофоретического разделения выделенного рекомбинантного белка C212S, для сравнения нанесены выделенные белки SUDP и EUDP.

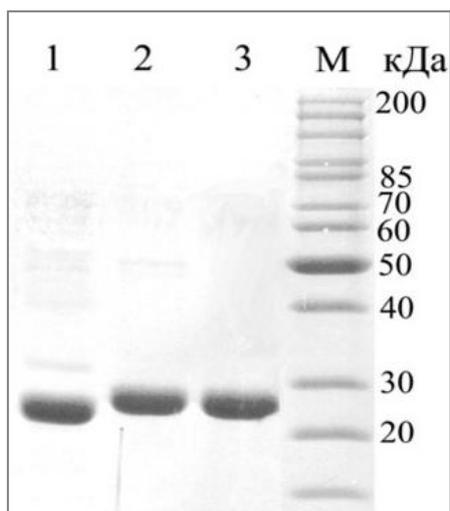


Рисунок 40. Электрофоретическое разделение в денатурирующем 12.5% ПААГ выделенных рекомбинантных уридинфосфорилаз. Треки: 1 – EUDP, 2 – SUDP, 3 – C212S. В каждом треке нанесено по 5 мкг белка.

При определении удельной активности мутантной уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 было отмечено значительное различие активности выделенного фермента: при измерении в K^+ - и Na^+ -фосфатном буфере. В K^+ -фосфатном буфере она составляла 65 ед/мг, тогда как в Na^+ -фосфатном – всего 10 ед/мг.

Аналогичное явление повышения удельной активности наблюдалось и в случае уридинфосфорилазы дикого типа (SUDP, глава 4.3.2.4.), т.е. и в этом случае ионы калия «супрессировали» влияние введенной мутации на активность белка.

4.4.2. Масс-спектрометрический (MALDI) анализ выделенного мутантного белка SUDP

Для подтверждения наличия внесенной синонимической замены остатка цистеина на остаток серина в положении 212 в выделенном препарате рекомбинантного белка и отсутствия незапланированных замен были получены масс-спектры триптического гидролизата (рис.41).

2 - 11	1100.6257	M.ADVFHLGLTK.A
2 - 28	2807.4788	M.ADVFHLGLTKAMLDGATLAIVPGDPER.V
12 - 28	1725.9112	K.AMLDGATLAIVPGDPER.V
12 - 28	1741.8957	K.AMLDGATLAIVPGDPER.V
12 - 30	1953.0606	K.AMLDGATLAIVPGDPERVK.R
12 - 30	1969.0450	K.AMLDGATLAIVPGDPERVK.R
12 - 31	2109.1555	K.AMLDGATLAIVPGDPERVKR.I
31 - 46	1844.9621	K.RIAELMDNATFLASHR.E
31 - 46	1860.9550	K.RIAELMDNATFLASHR.E
32 - 46	1688.8648	R.IAELMDNATFLASHR.E
32 - 46	1704.8474	R.IAELMDNATFLASHR.E
47 - 89	4561.4390	R.EYTSYLAYADGKPVVICSTGIGGPSTSIAVEELAQLGVNTFLR.V
90 - 113	2418.3195	R.VGTTGAIQPHVNVGDVIVTQASVR.L
90 - 143	5727.9918	R.VGTTGAIQPHVNVGDVIVTQASVRLDGASLHFAPMEFFAVANFECTTAMVAACR.D
114 - 143	3312.5387	R.LDGASLHFAPMEFFAVANFECTTAMVAACR.D
114 - 143	3328.5497	R.LDGASLHFAPMEFFAVANFECTTAMVAACR.D
144 - 166	2433.1585	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQER.Y
144 - 173	3225.4969	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQERYDVTGR.V
144 - 176	3581.7422	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQERYDVTGRVTR.R
144 - 177	3737.8588	R.DAGVEPHIGVTASSDTFYPGQERYDVTGRVTRR.F
167 - 173	811.3990	R.YDVTGR.V
177 - 183	796.4171	R.RFAGSMK.E
177 - 210	4045.8819	R.RFAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
177 - 210	4061.8632	R.RFAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
178 - 210	3889.7769	R.FAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
178 - 210	3905.7473	R.FAGSMKEWQDMGVLNYEMESATLFTMCATQGWR.A
211 - 221	1056.6209	R.AASVAGVIVNR.T
211 - 248	3882.1438	R.AASVAGVIVNRTQQEIPDEATMCKTEVSAVSIVVAAAK.K
211 - 249	4010.2727	R.AASVAGVIVNRTQQEIPDEATMCKTEVSAVSIVVAAAKK.L
222 - 233	1390.6562	R.TQQEIPDEATMK.K
22 - 234	1518.7503	R.TQQEIPDEATMCK.T
222 - 248	2844.4931	R.TQQEIPDEATMCKTEVSAVSIVVAAAK.K
222 - 248	2860.4841	R.TQQEIPDEATMCKTEVSAVSIVVAAAK.K
222 - 249	2972.5894	R.TQQEIPDEATMCKTEVSAVSIVVAAAKK.L
222 - 249	2988.5664	R.TQQEIPDEATMCKTEVSAVSIVVAAAKK.L
234 - 249	1600.9545	K.KTEVSAVSIVVAAAKK.L
235 - 248	1344.7672	K.TEVSAVSIVVAAAK.K
235 - 249	1472.8672	K.TEVSAVSIVVAAAKK.L

Первичная структура SUDP мутантной формы подтверждается полностью. Жирным шрифтом выделены пептидные фрагменты, показывающие наличие аминокислотной замены в полученной рекомбинантной мутантной форме уридинфосфорилазы (C212S).

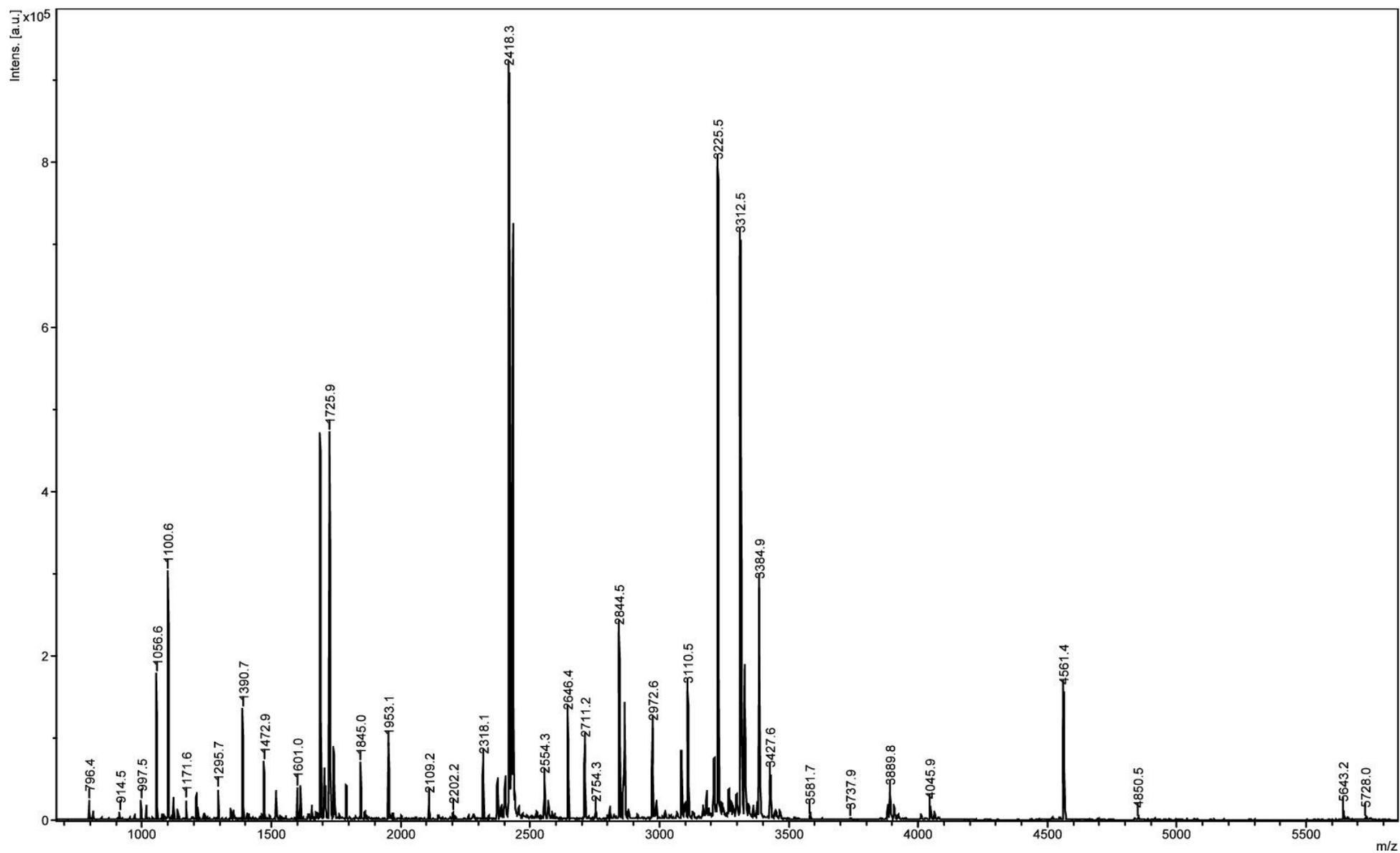


Рисунок 41. Масс-спектры триптического гидролизата очищенной мутантной формы SUDP (C212S).

4.4.3. Анализ четвертичной структуры мутантной формы SUDP (гель-фильтрация)

Для определения сохранения гексамерной структуры у выделенного рекомбинантного белка C212S была проведена гель-фильтрация, как описано в главе 4.3.2.3. В результате был определен $V_{\text{ВЫХ}}$ мутантной формы C212S, составляющий 14.01 мл (рис. 42).

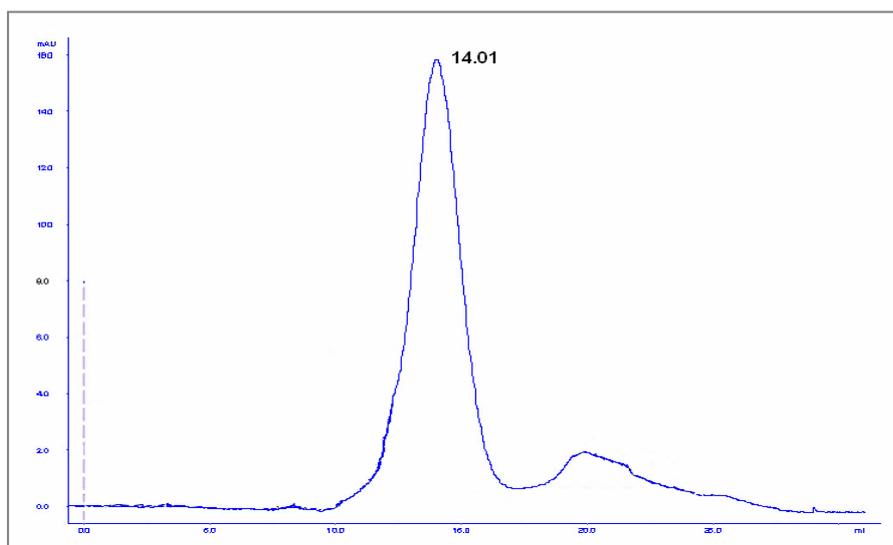


Рисунок 42. Хроматографический профиль гель-фильтрации мутантной формы уридинфосфоорилазы C212S.

Сопоставление значения $V_{\text{ВЫХ}}$ мутантной формы C212S (рис. 42) со значениями $V_{\text{ВЫХ}}$, полученными ранее для SUDP и EUDP (рис.26, 27) свидетельствует о существовании мутантной формы белка в растворе в гексамерной форме.

4.4.4. Исследование температурного, рН-оптимумов мутантной формы фермента (C212S) и его изоэлектрической точки

Определение температурного оптимума проводили, аналогично вышеописанному (глава 4.3.2.4.) в диапазоне 30-60⁰С с шагом 5⁰С в 10 мМ Na-фосфатном и K⁺-фосфатном буфере рН7.4. Реакционная смесь содержала: 10 мкл 0.1 М Na⁺- или K⁺-фосфатного буфера рН 7.4, 4 мкл исследуемого образца, 66 мкл

воды и 20 мкл 25 мМ уридина. Прогретый раствор уридина добавляли в предварительно инкубированный при исследуемой $T^{\circ}\text{C}$ образец, после чего выдерживали при данной температуре в течение 300с. Затем в реакционную смесь добавляли 900 мкл 0.1 М NaOH. Изменение оптической плотности раствора регистрировали при длине волны 290 нм на спектрофотометре «UV-1800» («SHIMADZU», Япония). Измерение осуществляли относительно аналогичной реакционной смеси, с предварительно блокированной перед внесением уридина (добавлением 900 мкл 0.1 М NaOH) ферментативной реакцией. На рисунке 43 представлен график зависимости активности мутантной формы C212S от температуры в Na^+ - и K^+ -фосфатном буфере. Согласно данным, представленным на рисунке 43, температурный оптимум у мутантной формы C212S определяется отчетливо только в K^+ -фосфатном буфере и составляет 45°C , что ниже температурного оптимума для уридинфосфорилазы дикого типа. Как видно из графика, приведенного на рисунке 43, в Na^+ -фосфатном буфере явного температурного максимума у SUDP (C212S) нет. Более того, при повышении температуры до 45°C происходит достаточно резкое падение активности фермента.

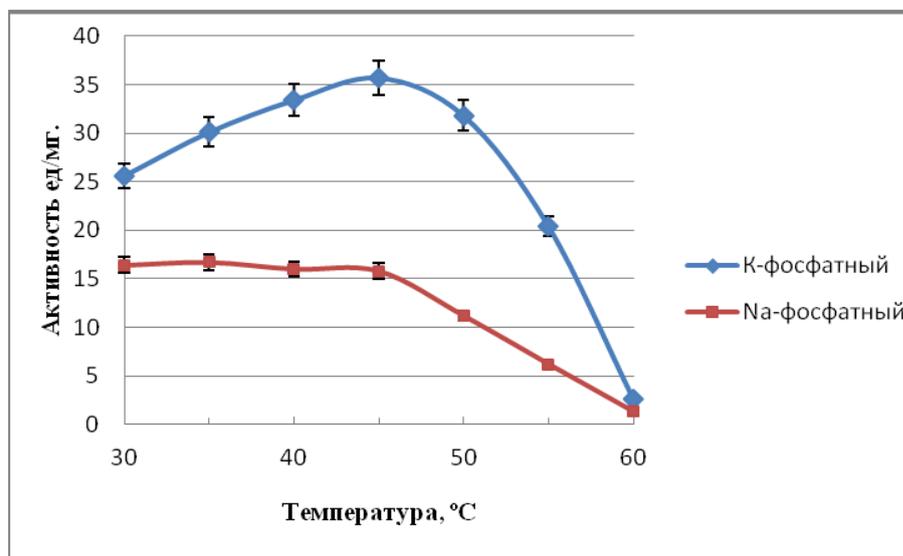


Рисунок 43. График зависимости активности мутантной формы SUDP C212S от температуры.

Определение pH-оптимума проводили, как описано выше в главе 4.3.2.5.

На рисунке 44 представлен график зависимости активности мутантной формы уридинфосфорилазы (C212S) из *S. oneidensis* MR-1 при разных значениях pH.

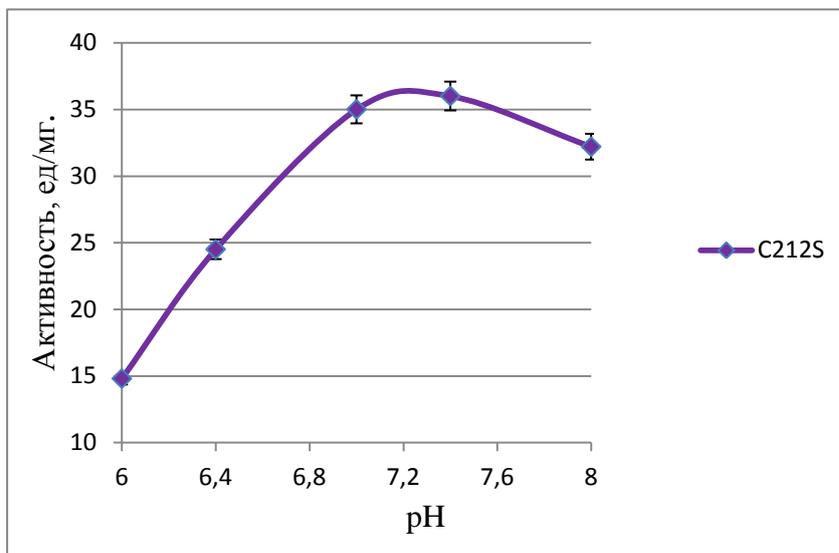


Рисунок 44. График зависимости активности мутантной формы уридинфосфорилазы C212S от значения pH.

Значение pH-оптимума для мутантной формы C212S составляет 7.4 ± 0.2 , что совпадает со значением, установленным для исходной формы SUDP.

Значение изоэлектрической точки для мутантной формы C212S составило 4.55, что также совпадает со значением, определенным для исходной формы SUDP. (Таблицы 8 и 9). Этот факт подтверждает предположение, что внесенная синонимическая замена C212S не привела к существенным изменениям в доступности растворителя к аминокислотным остаткам по сравнению с исходным ферментом дикого типа.

4.4.5. Сравнительный анализ термической устойчивости SUDP ее мутантной формы (C212S)

Для сравнения исходной формы SUDP и мутантной формы C121S было проведено плавление белка в диапазоне $10-95^{\circ}\text{C}$ в 10 мМ K^{+} - и Na^{+} -фосфатном буфере (рис. 45).

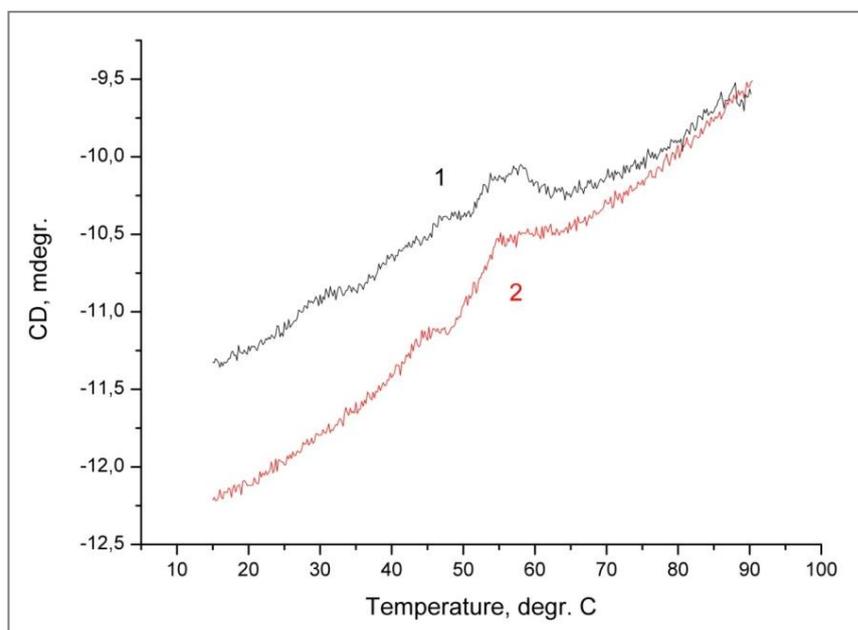


Рисунок 45. Кривые плавления мутантной формы C121S: 1 – в 10 мМ Na⁺-фосфатном буфере. 2 – в K⁺-фосфатном буфере pH 7.4.

Как видно из данных, представленных на рисунке 45, значение точки перехода остается неизменным, по сравнению с плавлением SUDP и также не зависит от присутствия иона K⁺.

4.4.6. Исследование структуры уридинфосфорилаз с помощью кругового дихроизма

Исследование параметров вторичной структуры глобулярных белков достаточно активно ведется методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) [102]. Широкие возможности данного метода по оценке изменения вторичной структуры белков достаточно полно изложены в обзорах [102, 103].

Возможное влияние внесенной синонимической замены на сохранение элементов вторичной структуры белка SUDP определяли сравнением КД-спектров SUDP, ее мутантной формы (C212S) и маркерного белка EUDP. Спектры КД записывали в 0.1 М Na⁺- и K⁺-фосфатном буферах pH 7.4. На рисунках 46 и 47 представлены КД-спектры SUDP, мутантной формы C212S и EUDP в присутствии ионов Na⁺ и K⁺.

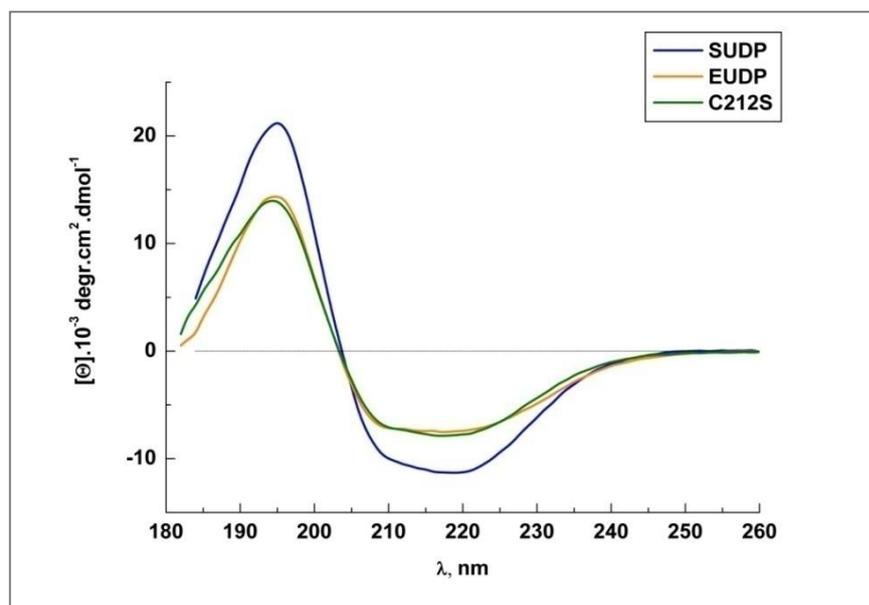


Рисунок 46. КД-спектры SUDP, EUDP, C212S в 10мМ Na⁺-фосфатном буфере pH 7.4.

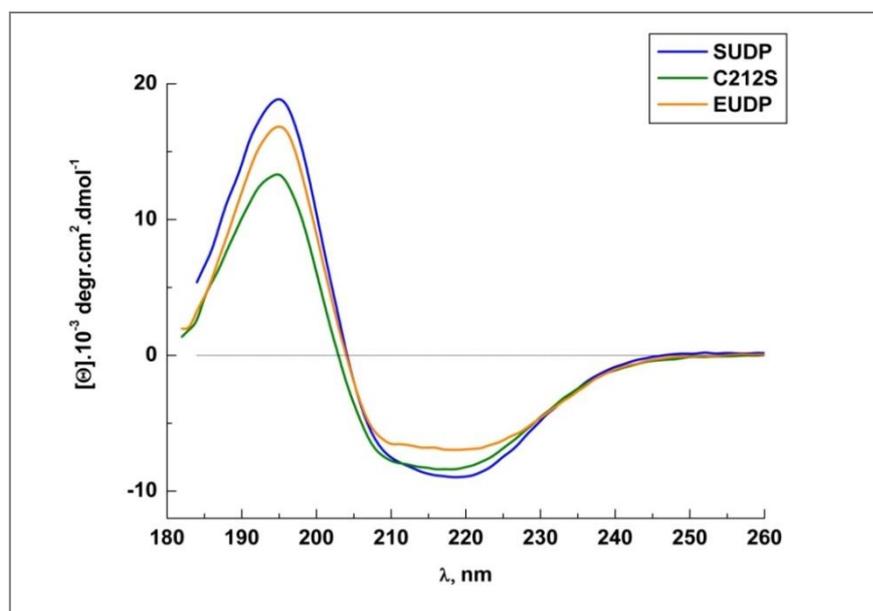


Рисунок 47. КД-спектры SUDP, EUDP, C212S в 10мМ K⁺-фосфатном буфере pH 7.4.

Как видно из рисунков 46 и 47, форма и относительная амплитуда КД-спектров SUDP и мутантной формы C212S практически совпадают, что может свидетельствовать об отсутствии существенных нарушений вторичной структуры белка при внесении синонимической замены C212S. Кроме того, сравнение КД-спектров этих белков, записанных в K⁺ - и Na⁺ -фосфатном буферах, не выявило

значительных различий, что может указывать на сохранение общей структуры белка у мутантной формы C212S, независимо от присутствия или отсутствия в буфере иона K^+ . Следует также отметить значительное сходство полученных КД-спектров двух форм SUDP (дикой и мутантной) со спектрами EUDP, что также свидетельствует о значительном сходстве в структуре этих ферментов.

Таким образом, суммируя полученные данные по значению pI , сохранению гексамерной формы и КД-спектрам, внесенная синонимическая мутация C212S не приводит к критическому нарушению вторичной, третичной или четвертичной структур SUDP в целом. Однако, установленное значительное уменьшение активности мутантной формы фермента указывало на необходимость более детального изучения изменения сродства белка к субстратам.

С этой целью было проведено сравнительное изучение кинетических параметров (K_m) реакции фосфоролиза уридина с участием мутантной и исходной уридинфосфорилаз из *S. oneidensis* MR-1.

4.4.7. Определение значения K_m по фосфату-иону и уридину для мутантной формы C212S

В таблице 9 представлены значения констант Михаэлиса для уридина и фосфат-иона, определенные для мутантной формы C212S. Величина K_m по уридину практически совпадает со значением K_m для SUDP (табл.8), однако, значение K_m по фосфату у мутантной формы C212S существенно отличается от исходного фермента, указывая на значительное понижение афинности белка именно к этому компонента ферментативной реакции.

В таблице 9 приведены физико-химические характеристики мутантной формы C212S уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1.

Уменьшение сродства фермента к субстрату может быть следствием нарушения в формировании сети водородных связей между атомами аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента и атомами субстрата. Однако, согласно приведенным выше данным по РСА исходного

фермента, аминокислотный остаток С212 не входит непосредственно в состав активного центра белка.

Таблица 9. Физико-химические характеристики мутантной формы С212S.

Белок	К _м , мМ		Удельная активность ед/мг	рI	Т _{опт} , °С	рН _{опт}	ссылка
	Urd	P _i					
С212S	0.24±0.02	16.1±0.5	65.0±0.6*	4.55	45.0±1.0	7.4±0.2	Данная работа

Примечание: * – удельную активность фермента определяли в 0.1М К⁺-фосфатном буфере, рН 7.4 по методу [119].

В связи с этим, нами высказано предположение о том, что внесенная мутация (С212S) имеет опосредованное влияние на связывание фосфат-иона ферментом, дестабилизируя (или переводя в нефункциональную конформацию) участок полипептидной цепи, включающий данный остаток.

При этом примененные современные физико-химические методы сравнительного исследования белков не позволили выявить существенных изменений во вторичной, третичной и четвертичной структурах данного фермента. Этот факт свидетельствовал о том, что происходящие структурные изменения носят достаточно тонкий характер, который не может быть обнаружен с помощью примененных физико-химических подходов. Скорее всего, обнаруженный эффект свидетельствует о минимальных флуктуациях в структуре белка, величина которых лежит в пределах ангстремных величин. В связи с этим, нами было решено исследовать влияние неорганических одновалентных ионов на формирование активной молекулы фермента.

4.5. Влияние неорганических ионов на формирование активной формы исходной SUDP и ее мутантной формы (C212S)

Как отмечалось выше, по данным КД-спектров внесенная замена C212S не приводит к существенным изменениям в структуре SUDP. Однако, различия в удельной активности выделенных ферментов SUDP и мутантной формы C212S в присутствии K^+ -фосфатного буфера или Na^+ -фосфатного буфера позволяют утверждать, что ион K^+ приносит существенный вклад в стабилизацию активного центра фермента. Действительно ранее в литературе были опубликованы данные о влиянии иона K^+ на увеличение активности уридинфосфорилазы *E. coli* [53], а также было показано наличие данного иона в составе кристалла молекулы UDP [19, 27, 114]. Более того, по данным работы [74] ион K^+ , взаимодействуя с ферментом, определяет конформационные особенности неструктурированного участка полипептидной цепи, позволяя формировать так называемую «открытую» и «закрытую» формы фермента. Мы предположили, что такого рода стабилизация одной из форм фермента должна зависеть от радиуса соответствующего одновалентного катиона. С этой целью в данной работе проведено исследование зависимости активности уридинфосфорилаз SUDP, ее мутантной формы (C212S) и EUDP от присутствия одновалентных ионов щелочных металлов в ряду: Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ и Cs^+ . Для того, чтобы полученные данные можно было сопоставить с литературными [53], где исследовали влияние ионов калия и натрия на ферментативную активность белка, условия проведения эксперимента были взяты из вышеуказанной работы. Результаты измерения приведены в таблице 10.

Как видно из данных, представленных в таблице 10 и для наглядности на рисунках 48-51, удельная активность каждой уридинфосфорилазы увеличивается в ряду Li^+ , Na^+ , K^+ , а в присутствии иона рубидия (Rb^+) она остается сопоставимой по уровню с активностью при наличии иона K^+ , тогда как при замене на ион цезия (Cs^+) начинает снижаться.

Таблица 10. Активность уридинфосфорилазы в присутствии ионов одновалентных металлов.

Ион одновалентного металла	R иона, нм. [12]	Активность уридинфосфорилазы, ед/мг		
		EUDP	SUDP	C212S
Li ⁺	0.078	38±0.4	21.7±0.2	7.7±0.1
Na ⁺	0.098	37.8±0.3	21.6±0.2	6.8±0.1
K ⁺	0.133	43.8±0.4	28.1±0.3	14.1±0.2
Rb ⁺	0.149	44.3±0.5	28.8±0.3	9.7±0.1
Cs ⁺	0.165	38.5±0.4	24.4±0.3	7.7±0.1
K ⁺ 10мМ		47.1±0.5	41.7±0.4	37.7±0.4
K ⁺ -фосфатный буфер (станд. усл.)*		71.0±0.6	91.1±0.6	65.0±0.5

Примечание: Измерения проводились в 10 мМ Na⁺-фосфатном буфере pH 7.4 с добавлением LiCl, KCl, RbCl, CsCl до конечной концентрации 1 мМ. Кроме того, измерения проводили в 10 мМ K⁺-фосфатном буфере, а также, для сравнения, в стандартных условиях*: 40 мМ K⁺-фосфатный буфер [119].

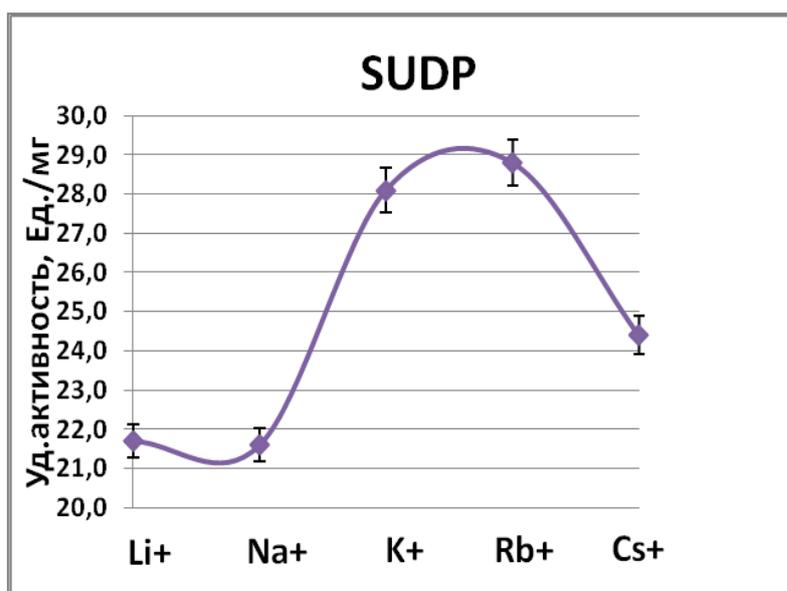


Рисунок 48. График зависимости удельной активности SUDP от радиуса иона щелочного металла.

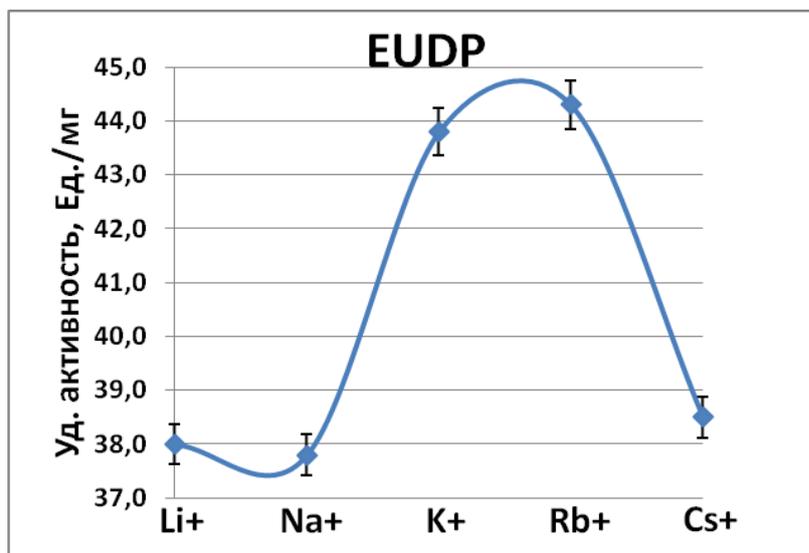


Рисунок 49. График зависимости удельной активности EUDP от радиуса иона щелочного металла.

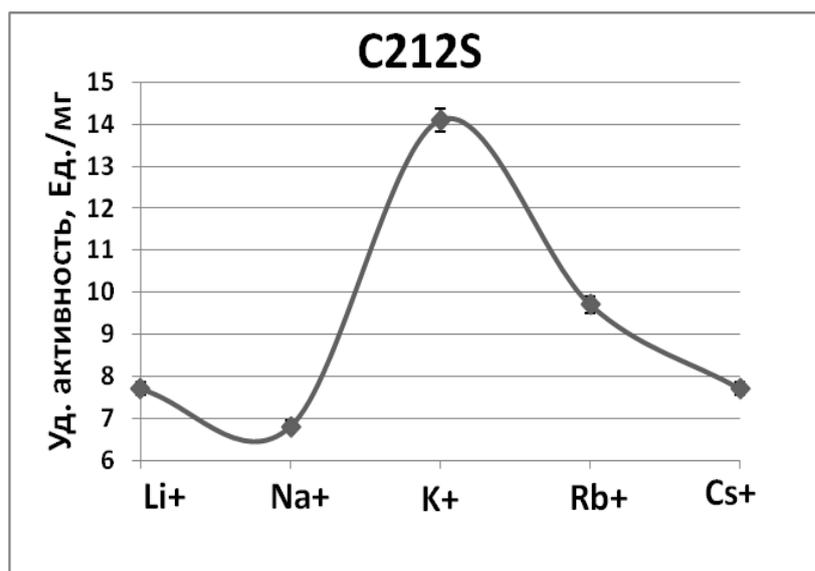


Рисунок 50. График зависимости удельной активности мутантной формы C212S от радиуса иона щелочного металла.

Обнаруженная тенденция по изменению активности в ряду ионов в сочетании с сопоставлением изменения размера самого иона позволяет сделать предположение о достаточно важном пространственном координировании ионом K^+ контакта остатков аминокислот при формировании (поддержании) активного центра в молекуле уридинфосфорилазы.

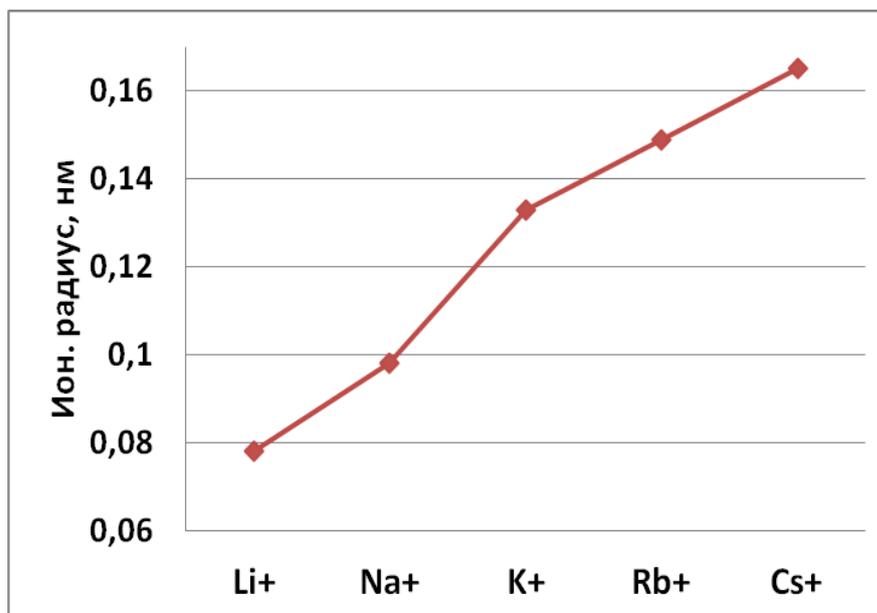


Рисунок 51. Изменение ионного радиуса в ряду щелочных металлов Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ .

Проведенное исследование подтвердило также высказанное нами выше предположение о том, что происходящие в мутантной форме уридинфосфорилазы изменения в структуре полипептидной цепи носят относительно незначительное по абсолютной величине значение, но крайне существенны для проявления ферментативной активности этим белком. Несмотря на полученные данные, роль иона K^+ в формировании активной формы четвертичной структуры уридинфосфорилазы остается до конца невыясненной, хотя к настоящему времени начинают формироваться отдельные модели такого рода стабилизации структуры молекулы уридинфосфорилазы и, соответственно, повышения ее удельной активности [19, 27, 53, 114].

4.6. Исследование структуры мутантной формы SUDP (C212S) методом PCA

Как показано выше, внесенная в первичную структуру уридинфосфорилазы мутация C212S привела к существенному падению активности фермента, но не выражалась в детектируемых обычными физико-химическими методами изменениях во вторичной, третичной и четвертичной структурах фермента.

В связи с этим, было принято решение провести исследование структуры полученной мутантной формы уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 методом РСА. Для этого мутантный белок был наработан и очищен, аналогично исходной, дикой, форме белка и передан в лабораторию «Инженерной энзимологии» ИНБИ РАН им. А.Н. Баха. Кристаллизацию белка проводили в лабораторных условиях, практически идентичных условиям кристаллизации исходного белка (за исключением микрогравитации). В результате были получены кристаллы мутантной формы уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, микрофотография которых приведена на рисунке 52.

Экспериментально было показано, что полученные кристаллы в достаточной степени совершенны для проведения анализа методом РСА с использованием получающихся наборов дифракционных отражений.

В ходе исследования белка методом РСА было подтверждено, что мутантная форма уридинфосфорилазы, действительно, имеет практически идентичную с исходным белком гексамерную структуру (комплекс из трех гомодимеров).

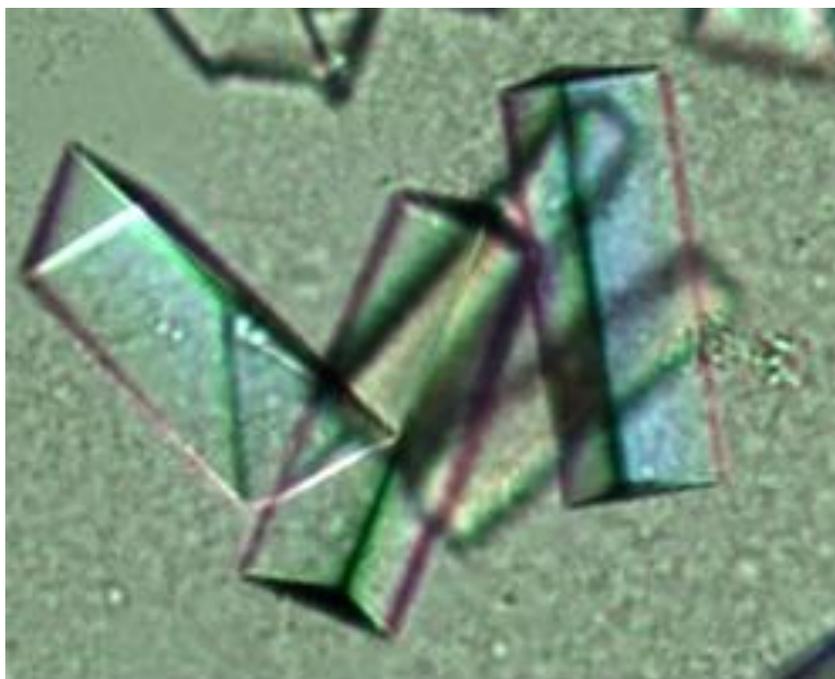


Рисунок 52. Кристаллы мутантной формы SUDP (C212S). (Рисунок предоставлен к.х.н. Сафоновой Т.Н).

Исследование структурных изменений в области введенной мутации показало, что внесенная замена приводит к существенной перестройке в области активного центра фермента (рис.53).

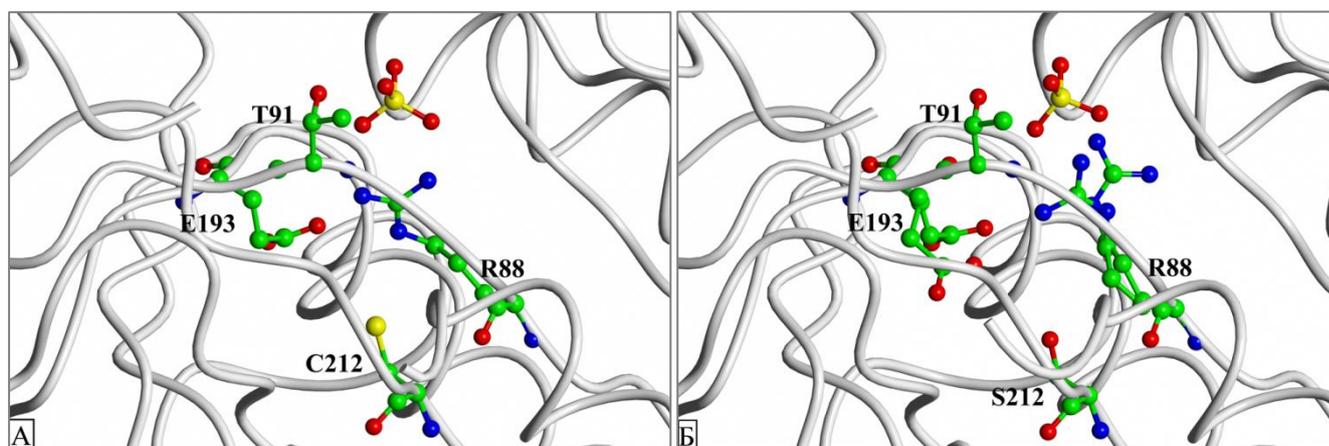


Рисунок 53. Структурные изменения в мутантной форме уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1: А – исходная, «дикая», уридинфосфорилаза; Б – мутантная форма белка (C212S). (Рисунок предоставлен к.ф.-м.н. Поляковым К.М.)

Из рисунка 53 следует, что после внесения мутации произошло существенное разупорядочение остатка Arg88 – одним из аминокислотных остатков, принимающих участие в формировании сайта связывания белка с фосфат-ионом. При этом изменении теряется одна из двух водородных связей с неорганическим фосфатом и остаток Arg88 начинает формировать водородную связь с остатком Ser212. Не менее существенное разупорядочение происходит и с остатком Glu193, принимающим участие в поддержании активного центра фермента (рис.36). Вероятно, именно эти, не детектируемые обычными физико-химическими методами, изменения в активном центре фермента и приводят, в конечном итоге, к потере активности уридинфосфорилазы.

Не менее любопытным является тот факт, что определение K_m мутантной формы C212S показало практически полное отсутствие влияния внесенной замены на связывание ферментом одного из субстратов – уридина, в то время как сродство к неорганическому фосфату драматически снизилось. Этот факт можно

трактовать, в рамках возможных различий в путях несинхронного связывания этих двух субстратов ферментом (различные подцентры начального связывания субстрата).

Полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными ранее фактами изменения активности гибридных форм уридинфосфорилаз из *E. coli* и *S. typhimurium* [36]. В цитируемой работе авторы показали, что замена именно N-концевой части (1 – 72 а.о.) в уридинфосфорилазе из *E. coli* на аналогичный участок уридинфосфорилазы из *S. typhimurium*, обладающей повышенной, по сравнению со своим прототипом из *E. coli*, активностью, приводит к увеличению удельной активности гибридного белка более чем в два раза.

Одним из любопытных фактов сравнительного рентгеноструктурного анализа особенностей строения исходной и мутантной форм уридинфосфорилаз является то, что внесенная замена (C212S) не оказала никакого влияния на петлю L9 (217 – 227 а.о.): ход полипептидной цепи в этом участке у двух форм фермента идентичен. В связи с этим, можно предположить, что внесение мутаций в состав петли L9, описанные в работе [158], не только формирует «закрытую» и «открытую» формы фермента, но и может опосредованно, за счет изменения конформации малоструктурированных петлевых участков 88 – 93 и 212 – 219 а.о. оказывать влияние на стабилизацию общего строения именно фосфат-связывающего подцентра белка, который во многом и определяет удельную активность уридинфосфорилазы.

В работе [3] было показано, что участок полипептидной цепи Pro61 – Pro72 в уридинфосфорилазе из *E. coli* оказывает существенное влияние на активность фермента: изменение (замена) первичной структуры этого участка практически полностью подавляла ее. Более того, исходя из анализа полученных ранее данных, было высказано предположение о том, что именно этот участок полипептидной цепи непосредственно или опосредовано участвует в формировании (стабилизации) активного центра, в частности подцентра связывания неорганического фосфат-иона [35]. При этом, если точечная синонимическая замена C65S не оказывала существенного влияния на ферментативную активность

этого белка [7, 32], то замены Ser66Ala, Ser73Ala, и Asp27Gly, вносящие локальные изменения в структуру N-концевого фрагмента белка и уничтожившие возможность образования исходных водородных связей с субстратом и другими аминокислотными остатками белка, приводили к падению активности уридинфосфорилазы и резкому ухудшению связывания мутантного белка с ионом фосфата [35]. В этом ряду замена Ser73Phe, вносящая кардинальное возмущение в структуру исследуемого фрагмента полипептидной цепи приводила к формированию белка с полным отсутствием ферментативной активности. Наряду с этим, внесенная мутация Arg91Lys, привносящая относительно небольшое возмущение в структуру исследуемого участка белка, также приводила к полной потере активности фермента [35]. Полученные позже другими авторами результаты во многом согласуются с описанными выше [158].

В свете описанных в данной диссертационной работе литературных и собственных результатов, а также полученные результаты PCA мутантной формы уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 еще раз подтверждают, что ион калия, располагающийся по данным работы [19, 27, 53, 114] в области контакта мономеров в гомодимере (рис.54) может играть важную роль именно в формировании более «плотного» контакта этих субъединиц и, как следствие, уменьшению возможности разупорядочения аминокислотных остатков активного центра фермента, что, в свою очередь, повышает (восстанавливает) активность белка.

Однако, совокупность результатов, полученных ранее при изучении свойств гибридных уридинфосфорилаз (см. выше), а также описанные в настоящей работе данные по исследованию функциональной активности уридинфосфорилазы в зависимости от присутствия и вида иона щелочного металла (его ионного радиуса), четко указывают, что координирующее действие ионов этих металлов заключается не только в формировании более «плотного» контакта субъединиц в гомодимере, но и, располагаясь пространственно вблизи сайта связывания иона неорганического фосфата (рис.35, рис.36) он, через попарное комплексообразование с остатками Glu49, Ile69 и Ser73 из двух различных

субъединиц в гомодимере (рис.54), стабилизирует петлевые элементы фермента (88 – 93 и 212 – 219 а.о.), переводя и закрепляя их в наиболее выгодных для связывания иона неорганического фосфата конформациях.

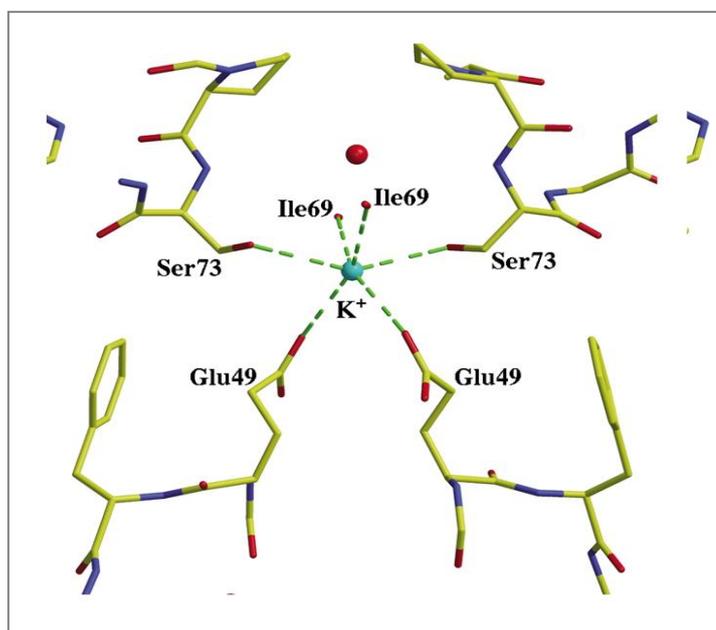


Рисунок 54. Координация иона калия в комплексе с EUDP. Иллюстрация из работы [53].

Следует также отметить, что данная перестройка в структуре уридинфосфорилазы носит, действительно, прецизионный характер, присущий изменениям в конформационном расположении отдельных остатков аминокислот и фрагментов полипептидной цепи при функционировании ферментов [33], и лежит, как показано нами (см. табл. 10), в пределах 0.4 \AA (разница ионных радиусов Na^+ и K^+).

В литературе к настоящему времени нет единогласия по поводу порядка взаимодействия субстратов с уридинфосфорилазой – начальным этапом ферментативной реакции [110, 111, 158].

Рассмотренные данные по изменению активности мутантных форм уридинфосфорилазы и РСА позволяют также сделать первоначальные предположения о порядке взаимодействия субстратов с ферментом: связывание субстратов, по-видимому, происходит независимо друг от друга, но первичное

комплексообразование с уридином переводит подцентр связывания белком фосфат-иона в наиболее конформационно выгодное состояние. Связавшийся с белком ион неорганического фосфата осуществляет фосфороллиз нуклеозида и продукты реакции (урацил и рибозо-1-фосфат) покидают белок. При этом первым покидает фермент именно урацил [110], т.е. более сильная фиксация белком остатка рибозы, по-видимому, является не только решающей в определении субстратной специфичности фермента (рибо- или дезоксирибонуклеозиды), но и формирует наиболее выгодную, отличную от существующей в растворе, конформацию остатка рибозы, способствующую протеканию реакции ферментативного фосфороллиза. В этом процессе, по-видимому, лимитирующим является именно насыщение активного центра ионом фосфата, т.к. вносимые в состав первичной структуры уридинфосфорилазы мутации меньше влияли на сродство белка к урдину, но существенно ухудшали этот показатель по отношению к иону неорганического фосфата [35, данная работа], что и приводило к ухудшению каталитических характеристик данного фермента.

Полученные новые данные по структуре уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 во многом позволяют сузить поиск при конструировании новых, обладающих повышенной активностью и термостабильностью уридинфосфорилаз (и, в общем, нуклеозидфосфорилаз) прежде всего участками полипептидной цепи, определяющим «закрытую» и «открытую» конформации белка (участки 88 – 93 и 212 – 219 а.о. или их структурные аналоги в других нуклеозидфосфорилазах).

В настоящее время проводится дополнительный сравнительный анализ двух полученных пространственных структур дикой и мутантной формы уридинфосфорилазы для начального формирования молекулярно-динамической модели механизма действия данного класса ферментов – нуклеозидфосфорилаз – и определения дальнейших подходов к получению высокоактивной и термостабильной формы уридинфосфорилазы, как биокатализатора, для синтеза биологически активных соединений нуклеозидной природы.

5. Выводы

- 1) Показано, что увеличение уровня внутриклеточного NADH при гетерологичной экспрессии NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы в клетках *S. oneidensis* MR-1 приводит к увеличению интенсивности анаэробного дыхания данной бактерии, и, как следствие, увеличению генерируемой плотности тока при культивировании в МТЭ.
- 2) Экспериментально установлена функциональная активность промотера гена уридинфосфорилазы (*udp*) из *E. coli* при гетерологичной экспрессии в клетках *S. oneidensis* MR-1 в аэробных и анаэробных условиях.
- 3) Впервые показано отсутствие репрессии белком CytR из *E. coli* промотера гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1.
- 4) Впервые клонирован ген уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, и экспериментально показано, что его продукт – белок, проявляющий уридинфосфорилазную активность.
- 5) Сконструированы штаммы-продуценты рекомбинантной уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 и ее мутантной формы (C212S). Исследованы физико-химические и ферментативные свойства полученных белков.
- 6) На основе рентгеноструктурного анализа уридинфосфорилазы *S. oneidensis* MR-1 и ее мутантной (C212S) формы определены аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента. Показана общность структуры активных центров уридинфосфорилаз из разных γ -протеобактерий.
- 7) Установлена и объяснена роль остатка цистеина в положении 212 в формировании устойчивого связывания неорганического фосфата в активном центре уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1. Выявлены функциональные участки полипептидной цепи уридинфосфорилазы (88 – 93 и 212 – 219 а.о.) как потенциальные мишени для проведения дальнейших исследований по повышению активности и термостабильности рекомбинантной уридинфосфорилазы.

6. Список литературы

1. Биоэнергетика: мировой опыт и прогноз развития: научный аналитический обзор / ред. Ананьева В.В., Горячева И.С., Сидорова В.И. – Министерство сельского хозяйства РФ. М.: Росинформагротех. 2007. – 202 с.
2. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. Направленное введение аминокрупп по межнуклеотидной фосфатной группе при твердофазном синтезе олигодезоксирибонуклеотидов. Получение биотинилированных олигонуклеотидных зондов // Биоорг. Химия. – 1991. – Т. 17. – № 5. – С. 685–689.
3. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.А., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г. Изучение структурно-функциональной организации уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* // Доклады Академии Наук. – 1994. – Т. 339. – № 6. – С. 819–821.
4. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г. Клонирование и экспрессия в *Escherichia coli* тимидинфосфорилазы под контролем промотора уридинфосфорилазы // Биотехнология. – 1994. – № 4. – С. 2–4.
5. Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Деревщикова Е.Б., Дебабов В.Г. Химический синтез гена ингибитора протеиназ (эглина С) без использования T4-ДНК-лигазы и его экспрессия в *E. coli* // Биоорг. химия. – 1995. – Т. 21. – № 5. – С. 354–358.
6. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б. Исследование роли остатков гистидина в функционировании уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* K-12 методами белковой инженерии // Биоорг. химия. – 1995. – Т. 21. – № 11. – С. 834–837.
7. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.А. Белковая инженерия уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* K-12. Исследование роли остатков цистеинов в функционировании фермента // Молекулярная биология. – 1996. – Т. 30. – № 1. – С. 170–176.

8. Вейко В.П., Чеботаев Д.В., Овчарова И.В., Гулько Л.Б. Белковая инженерия уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* K-12. I. Клонирование и экспрессия в *E. coli* генов уридинфосфорилаз из *Klebsiella aerogenes* и *Salmonella typhimurium* // Биоорг. химия. – 1998. – Т. 24. – № 5. – С. 381–387.
9. Вейко В.П., Гулько Л.Б., Огорокова Н.А., Дьяков Н.А., Дебабов В.Г. Клонирование гена стрептавидина из *Streptomyces avidinii* и его экспрессия в клетках *E. coli*. Секреция стрептавидина клетками *E. coli* // Биоорг. химия. – 1999. – Т. 25. – № 3. – С. 184–188.
10. Воейкова Т.А., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Мордкович Н.Н., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. Получение мутантов электрогенной бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 с повышенной редуцирующей активностью // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 3. – С. 339–344.
11. Воейкова Т.А., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Шакулов Р.С., Сидорук К.В., Смирнов И.А., Ильин В.К., Солдатов П.Е., Тюрин-Кузьмин А.Ю., Смоленская Т.С., Дебабов В.Г. Интенсификация процесса получения биоэлектричества в микробных топливных элементах при использовании мутантов *Shewanella oneidensis* MR-1 с повышенной редуцирующей активностью // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 4. – С. 402–407.
12. Глинка, Н.А. Общая химия. / Н.А. Глинка; под. ред. Рабиновича В.А. – Ленинград.: Химия. – 1988. – С. 543.
13. Гулько Л.Б., Дьяков Н.А., Огорокова Н.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Конструирование гена слитого белка стрептавидин-щелочная фосфатаза и его экспрессия в *Escherichia coli*. Изучение секреции гибридного белка в периплазматическое пространство клеток *E. coli* // Биотехнология. – 1999. – № 4. – С. 3–8.
14. Гулько Л.Б., Павлова О.В., Дьяков Н.А., Огорокова Н.А., Ратманова К.И., Логунова Н.Н., Бобренева Р.А., Макаров В.А., Юрин В.Л., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Конструирование гена опухлеассоциированного антигена VNTR (MUC1) человека, слитого со стрептавидином, его экспрессия в *Escherichia coli*. Изучение свойств гибридного белка // Биоорг. химия. – 2000. – Т. 26. – № 6. – С. 423–432.

15. Гулько Л.Б., Воюшин К.Е., Флуер Ф.С., Огорокова Н.А., Кривенко М.С., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Создание опухоль-адресованных генно-инженерных препаратов для иммунотерапии рака. II. Клонирование гена проэнтеротоксина H (seh) из *Staphylococcus aureus* и его экспрессия в *Escherichia coli*. Исследование секреции энтеротоксина H клетками *E. coli* // Биотехнология. – № 6. – С. 72–78.
16. Дебабов В.Г. Производство электричества микроорганизмами // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 2. – С. 149–157.
17. Ильин В.К., Смирнов И.А., Солдатов П.Э., Коршунов Д.В., Тюрин-Кузьмин А.Ю., Старкова Л.В., Чумаков П.Е., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Дебабов В.Г., Воейкова Т.А. Микробные топливные элементы как альтернативные источники электрического тока // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2012. – Т. 46. – № 1. – С. 62–67.
18. Константинова И.Д., Леонтьева Н.А., Галегов Г.А., Рыжова О.И., Чувиковский Д.В., Антонов К.В., Есипов Р.С., Таран С.А., Веревкина К.Н., Феофанов С.А., Мирошников А.И. Биотехнологический способ получения рибавирина. Действие рибавирина и некоторых его комбинаций на репродукцию вируса осповакцины (*Vaccinia Virus*) // Биоорг. химия. – 2004. – Т. 30. – № 6. – С. 613–620.
19. Лашков А.А., Жухлистова Н.Е., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Сравнительный анализ пространственной структуры гомодимеров уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* в нелигандированном состоянии и в комплексе с ионом калия // Кристаллография. – 2009. – Т. 54. – № 2. – С. 291–302.
20. Манувера В.А., Мордкович Н.Н., Гулько Л.Б., Огорокова Н.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Разработка опухоль-адресованных генно-инженерных препаратов для иммунотерапии рака IV. Клонирование гена про-энтеротоксина В (entB) из *Staphylococcus aureus*, исследование его экспрессии и секреции в *Escherichia coli*. Метод очистки рекомбинантного белка // Биотехнология. – 2008. – № 3. – С. 27–33.

21. Манувера В.А., Мордкович Н.Н., Гулько Л.Б., Окорокова Н.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Исследование роли сигнальных пептидов в транслокации рекомбинантных белков в периплазматическое пространство клеток *Escherichia coli* на модели энтеротоксинов *Staphylococcus aureus* // Биотехнология. – 2008. – № 6. – С. 3–14.
22. Миронов А.С., Нечаева Г.Д., Суходолец В.В. Взаимодействие элементов негативной (CytR) и позитивной (сAMP-CRP) регуляции в промоторной области уридинфосфорилазного (udp) гена *Escherichia coli* K-12 // Генетика. – 1989. – Т. 25. – № 3. – С. 438–447.
23. Михайлопуло И.А., Мирошников А.И. Современные тенденции в биотехнологии нуклеозидов // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2. – № 2. – С. 38–61.
24. Молчан О.К., Дмитриева Н.А., Романова Д.В., Эррайс Лопес Л., Дебабов В.Г., Миронов А.С. Выделение и первичная характеристика уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – № 2. – С. 235-239.
25. Мордкович Н.Н., Манувера В.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Уридинфосфорилаза из *Shewanella oneidensis* MR-1: гетерологичная экспрессия, регуляция, транскрипция, свойства // Биотехнология. – 2012. - № 1. – С. 21-30.
26. Мордкович Н.Н., Воейкова Т.А., Новикова Л.М., Смирнов И.А., Ильин В.К., Солдатов П.Е., Тюрин-Кузьмин А.Ю., Смоленская Т.С., Вейко В.П., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. Влияние NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы на анаэробное дыхание *Shewanella oneidensis* MR-1 // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 4. – С. 395-401.
27. Павлюк Б.Ф. Структурная основа механизма ферментативной активности нуклеозидфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 01.04.18 / Павлюк Богдан Филипович. – М., 2007. – 21с.
28. Таран С.А. Трансгликозилирование природных и модифицированных нуклеозидов термостабильными нуклеозидфосфорилазами *Geobacillus stearothermophilus*: автореф. дис. ... канд. хим. наук : 03.01.06 / Таран Сергей Анатольевич. – М., 2011. – 24с.

29. Тишков В.И. Попов В.О. Механизм действия формиатдегидрогеназы и ее практическое применение // Биохимия. – 2004. – Т. 69.- № 11. – С. 1537 – 1554.
30. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е., Войнова Н.С., Алексеева А.А., Петров А.С., Тишков В.И. NAD⁺-зависимые формиатдегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* и сои: экспрессия в клетках *E. coli* и кинетические свойства рекомбинантных ферментов // Вестник Московского Университета. – Серия 2. – Химия. – 2006. Т. 47. – № 1. – С.31–34.
31. Садыхов Э.Г. Получение, термостабильность, и структурные исследования формиатдегидрогеназ из различных источников: автореф. дис. ...канд. хим. наук: 03.00.03 / Садыхов Эльчин Гусейнгулу оглы. – М., 2007. – 24с.
32. Сипрашвили З.З. Сайт-направленная реконструкция ДНК. Изучение структурно-функциональных отношений в уридинфосфорилазе из *Escherichia coli* : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.03 / Сипрашвили Зураб Зурабович. – М., 1994 – 139с.
33. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков: учебник для биол. спец. вузов / В.М. Степанов; под. ред. Спирина А.С.– М.: Высшая школа. – 1996. – с. 335.
34. Цупрун В.Л., Тагунова И.В., Линькова Е.В., Миронов А.С. Четвертичная структура уридинфосфорилазы из *E. coli* К-12 // Биохимия. – 1991. – Т. 56. – № 5. – С. 930–934.
35. Чеботаев Д.В., Гулько Л.Б., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Белковая инженерия уридинфосфорилазы из *E. coli* К-12. Локализация функционально важных аминокислотных остатков, входящих в состав фосфат-связывающей области активного центра фермента // Биотехнология. – 1999. – № 6. – С. 3–10.
36. Чеботаев Д.В., Гулько Л.Б., Вейко В.П. Белковая инженерия уридинфосфорилазы *Escherichia coli* К-12 II. Сравнительное изучение свойств гибридных и мутантных форм уридинфосфорилаз // Биоорг. химия. – 2001. – Т. 27. – № 3. – С. 184–190.

37. Чеботаев Д.В. Изучение организации фосфат-связывающей области бактериальных уридинфосфорилаз : дис. канд. биол. наук : 03.00.03 / Чеботаев Дмитрий Владимирович. – М., 2000 – 149.
38. Abboud R., Popa R., Souza-Egipsy V., Giometti C.S., Tollaksen S., Mosher J.J., Findlay R.H., Neilson K.H. Low-temperature growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – No. 2. – P. 811–816.
39. Arslan E., Schulz H., Zufferey R., Künzler P., Thöny-Meyer L. Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-Type Cytochrome Subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli* // *Biochem. Biophys. Res. Com.* – 1998. – V. 251. – P. 744–747.
40. Ashour O.M., Naguib F.N.M., Khalifa M.M.A., Abdel-Raheem M.H., Panzica R.P., el Kouni M.H. Enhancement of 5-fluoro-2'-deoxyuridine antitumor efficacy by the uridine phosphorylase inhibitor 5-(benzyloxybenzyl)barbituric acid acyclonucleoside // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – P. 1092–1098.
41. Beliaev A.S., Saffarini D.A., McLaughlin J.L., Hunnicutt D. MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1 // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – P. 722–730.
42. Bengelsdorf F.R., Straub M., Dürre P. Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation // *Environmental Technology.* – 2013. – V. 34. – No. 13–14. – P. 1639–1651.
43. Berrios-Rivera S.J., Bennett G.N., San Ka-Yui. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase // *Metabolic Engineering.* – 2002. – V. 4. – P. 217–229.
44. Bewley K.D., Firer-Sherwood M.A., Mock J.-Y., Ando N., Drennan C.L., Elliott S.J. Mind the gap: diversity and reactivity relationships among multiheme cytochromes of the MtrA/DmsE family // *Biochem. Soc. Trans.* – 2012. – V. 40. – No. 6. – P. 1268–1273.
45. Bordi C., Iobbi-Nivol C., Me'jean V., Patte J.-C. Effects of ISSo2 insertions in structural and regulatory genes of the trimethylamine oxide reductase of *Shewanella oneidensis* // *J. Bacteriol.* – 2003. – V. 185. – No. 6. – P. 2042–2045.

46. Bordi C., Ansaldi M., Gon S., Jourlin-Castelli C., Iobbi-Nivol C., Me'jean V. Genes regulated by TorR, the trimethylamine oxide response regulator of *Shewanella oneidensis* // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186. – No. 14. – P. 4502–4509.
47. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 2. – P. 246–254.
48. Bretschger O., Obraztsova A., Sturm C.A., Chang I.S., Gorby Y.A., Reed S.B., Culley D.E., Reardon C.L., Barua S., Romine M.F., Zhou J., Beliaev A.S., Bouhenni R., Saffarini D., Mansfeld F., Kim B.-H., Fredrickson J.K., Nealson K.H. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants // Appl. Envir. Microbiol. – 2007. – V. 73. – No. 21. – P. 7003–7012.
49. Brutinel E.D., Gralnick J.A. Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 93. – P. 41–48.
50. Burling F.T., Kniewel R., Buglino J.A., Chadha T., Beckwith A., Lima C.D. Structure of *Escherichia coli* uridine phosphorylase at 2.0 // Acta Cryst. – 2003. – V. 59. – P. 73–76.
51. Burns J.L., DiChristina T.J. Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires psrA, a homolog of the phsA gene of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 // Appl. Envir. Microbiol. – 2009. – V. 75. – No. 16. – P. 5209–5217.
52. Butler J.E., Glaven R.H., Esteve-Nunez A., Nunez C., Shelobolina E.S., Bond D.R., Lovley D.R. Genetic characterization of a single bifunctional enzyme for fumarate reduction and succinate oxidation in *Geobacter sulfurreducens* and engineering of fumarate reduction in *Geobacter metallireducens* // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188. – P. 450–455.
53. Carados-Davies T.T., Cutfield S.M., Lamont L.L.I., Cutfield J.F. Crystal structures of *Escherichia coli* uridine phosphorylase in two native and three complexed forms reveal basis of substrate specificity, induced conformational changes and influence of potassium // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 337. – P. 337–354.

54. Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., Lloyd J.R. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer // *Appl. Envir. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – No. 3. – P. 615–623.
55. Chang Z., Lu M., Shon K.-J., Park J.-Su. Functional expression of *Carassius auratus* cytochrome P4501A in a novel *Shewanella oneidensis* expression system and application for the degradation of benzo[a]pyrene // *Journal of Biotechnology.* – 2014. – V. 179. – P. 1–7.
56. Choi D., Lee B.S., Kim S., Min B., Choi I.-G., Chang I.S. Metabolically engineered glucose-utilizing *Shewanella strains* under anaerobic conditions // *Bioresource technology.* – 2014. – V. 154. – P. 59-66.
57. Choi K.-Y., Wernick D.G., Tat C.A., Liao J.C. Consolidated conversion of protein waste into biofuels and ammonia using *Bacillus subtilis* // *Metabolic Engineering.* – 2014. – V. 23. – P. 53–61.
58. Clarke T.A., Holley T., Hartshorne R.S., Fredrickson J.K., Zachara J.M., Shi L., Richardson D.J. The role of multiheme cytochromes in the respiration of nitrite in *Escherichia coli* and Fe(III) in *Shewanella oneidensis* // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – V. 36. – P. 1005–1010.
59. Clarke T.A., Edwards M.J., Gates A.J., Hall A., White G.F., Bradley J., Reardon C.L., Shi L., Beliaev A.S., Marshall M.J., Wang Z., Watmough N.J., Fredrickson J.K., Zachara J.M., Butt J.N., Richardson D.J. Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit // *PNAS.* – 2011. – V. 108. – No. 23. – P. 9384–9389.
60. Cole S.T., Condon C., Lemire B.D., Weiner J.H. Molecular biology, biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase, a complex membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme of *Escherichia coli* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 811. – P. 381–403.
61. Cook W. J., Koszalka G. W., Hall W.W., Narayana S.V.L., Ealick S.E. Crystallization and preliminary X-ray investigation of uridine phosphorylase from *E. coli* // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – No. 6. – P. 2852–2853.

62. Cordova C.D., Schicklberger M.F.R., Yu Y., Spormann A.M. Partial functional replacement of CymA by SirCD in *Shewanella oneidensis* MR-1 // J. Bacteriol. – 2011. – V. 193. – No. 9. – P. 2312–2321.
63. Coursolle D., Gralnick J.A. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1 // Mol. Microbiol. – 2010. – V. 77. – No. 4. – P. 995–1008.
64. Cruz-García C., Murray A.E., Klappenbach J.A., Stewart V., Tiedje J.M. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1 // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – No. 2. – P. 656–662.
65. Cruz-García C., Murray A.E., Rodrigues J.L.M., Gralnick J.A., McCue L.A., Romine M.F., Löffler F.E., Tiedje J.M. Fnr (EtrA) acts as a fine-tuning regulator of anaerobic metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1 // BMC Microbiol. – 2011. – V. – 11. – P. 64–78.
66. Cutiño-Jiménez A.M., Martins-Pinheiro M., Lima W.C., Martín-Torner A., Morales O.G., Menck C.F.M. Evolutionary placement of *Xantomonadales* based on conserved protein signature sequences // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2010. – V. 54. – P. 524–534.
67. Daniell J., Köpke M., Simpson S.D. Commercial biomass syngas fermentation // Energies. – 2012. – V. 5. – P. 5372–5417.
68. Daraselia N., Dernovoy D., Tian Y., Borodovsky M., Tatusov R., Tatusova T. Reannotation of *Shewanella oneidensis* genome // OMICS. – 2003. – V. 7. – P. 171–175.
69. Dayhoff, M.O. Atlas of protein sequence and structure: National Biomedical Research Foundation. / M.O. Dayhoff. – MD., Silver Spring. – 1972.
70. Derby H.A., Hammer B.W. Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies on surface taint butter // Iowa Agric. Exp. Stn. Res. Bull. – 1931. – V. 145. – P. 389–416.
71. DiChristina T.J., Moore C.M., Haller C.A. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction by *Shewanella putrefaciens* requires ferE, a homolog of the pulE (gspE) type II protein secretion gene // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184. – No. 1. – P. 142–151.

72. DiChristina T.J. Past and present water column anoxia: Nato Sciences: IV: Earth and environmental sciences / DiChristina T.J., Bates D.J., Burns J.L., Dale J.R., Payne A.N., Ed. Neretin L.N. – Netherlands: Springer., 2006. – V. 64. – P. 443-441.
73. Dong Y., Wang J., Fu H., Zhou G., Shi M., Gao H. A Crp-dependent two-component system regulates nitrate and nitrite respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1 // PLoS One. – 2012. – V. 7. – No. 2. – e51643.
74. Dontsova M.V., Savochkina Yu. A., Gabdoulkhakov A.G., Baidakov S.N., Lyashenko A.V., Zolotukhina M., Errais Lopes L., Garber M.B., Morgunova E.Yu., Nikonov S.V, Mironov A.S., Ealickd S.E., Mikhailov A.M. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of uridine phosphorylase from *Salmonella typhimurium* // Acta Cryst. – 2004. – D. 60. – P. 709–711.
75. Driscoll M.E., Romine M.F., Juhn F.S., Serres M.H., Mccue L.A., Beliaev A.S., Fredrickson J.K., Gardner T.S. Identification of diverse carbon utilization pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 via expression profiling // Genome Inform. – 2008. – V. 18. – P. 287–298.
76. Egorov A.M., Avilova T.V., Dikov M.M., Popov V.O., Rodionov Yu.V., Berezin I.V. NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium, strain 1 // Eur. J. Biochem. – 1979. – V. 99. – P. 569–576.
77. Fitzgerald L.A., Petersen E.R., Gross B.J., Soto C.M., Ringeisen B.R., El-Naggar M.Y., Biffinger J.C. Aggrandizing power output from *Shewanella oneidensis* MR-1 microbial fuel cells using calcium chloride // Biosensors and Bioelectronics. – 2012. – V. 31. – P. 492–498.
78. Fredrickson J.K., Romine M.F., Beliaev A.S., Auchtung J.M., Driscoll M.E., Gardner T.S., Nealson K.H., Osterman A.L., Pinchuk G., Reed J.L., Rodionov D.A., Rodrigues J.L.M., Saffarini D.A., Serres M.H., Spormann A.M., Zhulin I.B., Tiedje J.M. Towards environmental systems biology of *Shewanella* // Nature. – 2008. – V.6. – P. 592–603.
79. Gao H, Wang X, Yang Z, Palzkill T, Zhou J. Probing regulon of ArcA in *Shewanella oneidensis* MR-1 by integrated genomic analyses // BMC Genomics. – 2008. – V. 9. – P. 42–59.

80. Gao H., Yang Z.K., Barua S., Reed S.B., Romine M.F., Nealson K.H., Fredrickson J.K., Tiedje J.M., Zhou J. Reduction of nitrate in *Shewanella oneidensis* depends on atypical NAP and NRF systems with NapB as a preferred electron transport protein from CymA to NapA // The ISME Journal. – 2009. – V. 3. – P. 966–976.
81. Gao H., Wang X., Yang Z.K., Chen J., Liang Y., Chen H., Palzkill T., Zhou J. Physiological roles of ArcA, Crp, and EtrA and their interactive control on aerobic and anaerobic respiration in *Shewanella oneidensis* // PLoS One. – 2010. – V. 5. – No. 12. – e15295.
82. Gao T., O'Brian T.R. Control of DegP-dependent degradation of c-type cytochromes by heme and the cytochrome c maturation system in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 2007. – V.189. – No. 17. – P. 6253–6259.
83. Gescher J.S., Cordova C.D., Spormann A.M. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases // Mol. Microbiol. – 2008. – V. 68. – No. 3. – P. 706–719.
84. Giuseppe P.O., Martins N.H., Meza A.N., Santos C.R., Pereira H.D'M., Murakami M.T. Insights into phosphate cooperativity and influence of substrate modifications on binding and catalysis of hexameric purine nucleoside phosphorylases // PLoS One. – 2012. – V. 7. – No. 9. – e44282.
85. Golitsch F., Bücking C., Gescher J. Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – V. 47. – P. 285–291.
86. Gordon E.H.J., Pike A.D., Hill A., Cuthbertson P.M., Chapman S.K., Reid G.A. Identification and characterization of a novel cytochrome c3 from *Shewanella frigidimarina* that is involved in Fe(III) respiration // Biochem. J. – 2000. – V. 349. – P. 153–158.
87. Gralnick J.A, Brown C.T, Newman D.K. Anaerobic regulation by an atypical Arc system in *Shewanella oneidensis* // Mol. Microbiol. – 2005. – V. 56. – No. 5. – P. 1347–1357.

88. Gralnick J.A., Vali H., Lies D.P., Newman D.K. Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 // PNAS. – 2006. – V. 103. – No. 12. – P. 4669–4674.
89. Hammer-Jespersen K., Munch-Petersen A., Nygaard P., Schwartz M. Induction of enzymes involved in the catabolism of deoxyribonucleosides and ribonucleosides in *Escherichia coli* K 12 // Eur. J. Biochem. – 1971. – V. 19. – P. 533–538.
90. Hammer-Jespersen K., Munch-Petersen A. Multiple regulation of nucleoside catabolizing enzymes: regulation of the deo operon by the cytR and deoR gene products // Mol Gen Genet. – 1975. – V. 137. – No. 4. – P. 327–335.
91. Hammer-Jespersen K. // Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms / ed. Munch-Petersen A. London, New York, San Francisco: Acad. Press – 1983. – P. 203–258.
92. Hartshorne S., Richardson D., Simon, J. Multiple haem lyase genes indicate substrate specificity in cytochrome c biogenesis // Biochem Soc Trans. – 2006. – V. 34. – P. 146–149.
93. Heidelberg J.F., Paulsen I.T., Nelson K.E., Gaidos E.J., Nelson W.C., Read T.D., Eisen J.A., Seshadri R., Ward N., Methe B., Clayton R.A., Meyer T., Tsapin A., Scott J., Beanan M., Brinkac L., Daugherty S., DeBoy R.T., Dodson R.J., Durkin A.S., Haft D.H., Kolonay J.F., Madupu R., Peterson J.D., Umayam L.A., White O., Wolf A.M., Vamathevan J., Weidman J., Impraim M., Lee K., Berry K., Lee C., Mueller J., Khouri H., Gill J., Utterback T.R., McDonald L.A., Feldblyum T.V., Smith H.O., Venter J.C., Nealson K.H., Fraser C.M. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* // Nat. Biotechnol. – 2002. – V. 20. – P. 1118–1123.
94. Honisch U., Zumft W. Operon structure and regulation of the nos gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185. – P. 1895–1902.
95. Howard E.C., Hamdan L.J., Lizewski S.E., Ringeisen B.R. High frequency of glucose-utilizing mutants in *Shewanella oneidensis* MR-1 // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – V. 327. – P. 9–14.

96. Hunt K.A., Flynn J.M., Naranjo B., Shikhare I.D., Gralnick J.A. Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* strain MR-1 // J. Bacteriol. – 2010. – V. 192. – No. 13. – P. 3345–3351.
97. Iigo M., Nishikata K., Nakajima Y., Szinai I., Veres Z., Szabolcs A., De Clercq E. Differential effects of 2,2'-anhydro-5-ethyluridine, a uridine phosphorylase inhibitor, on the antitumor activity of 5-fluorouridine and 5-fluoro-2'-deoxyuridine // Biochem. Pharmacol. – 1990. – V. 39. – P. 1247–1253.
98. Iuchi S., Lin E.C.C. ArcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways // PNAS. – 1988. – V. 85. – No. 6. – P. 1888–1892.
99. Iuchi S., Cameron D.C., Lin E. C. C. A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1989. – V. 171. – P. 868–873.
100. Jimenez B.M., Kranz P., Lee C.S., Gero A.M., O'Sullivan W.J. Inhibition of uridine phosphorylase from *Giardia lamblia* by pyrimidine analogs // Biochem. Pharmacol. – 1989. – V. 38. – P. 3785–3789.
101. Kellner D.G., Maves S.A., Sligar S.G. Engineering cytochrome P450s for bioremediation // Curr. Opin. Biotechnol. – 1997. – V. 8. – No. 3. – P.274–278.
102. Kelly S.M., Price N.C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function // Current Protein and peptide Science. – 2000. – V. 1. – P. 349-384.
103. Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. How to study protein by circular dichroism // Biochimica et Biophysica Acta. – 2005. – V. 1751. – P. 119-139.
104. Kim B-H., Kim H-J., Hyun M-S., Park D-H. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* // J. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V.9. – No. 2. – P. 127–131.
105. Konrad A. Piškur J., Liberles D.A. The evolution of catalytic residues and enzyme mechanism within the bacterial nucleoside phosphorylase superfamily 1 // Gene. – 2012. – V. 510. – P. 154-161.

106. Korenevsky A., Beveridge T.J. The surface physicochemistry and adhesiveness of *Shewanella* are affected by their surface polysaccharides // *Microbiology*. – 2007. – V.153. – P. 1872–1883.
107. Kotloski N.J., Gralnick J.A. *Shewanella oneidensis* extracellular electron transfer by flavin electron shuttles dominate // *mBio*. – 2013. – V. 4. – No. 1. – e.00553-12.
108. el Kouni M.H., Naguib F.N., Niedzwicki J.G., Iltzsch M.H., Cha S. Uridine phosphorylase from *Schistosoma mansoni* // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V. 263. – P. 6081–6086.
109. Kouzuma A., Meng X.-Y., Kimura N., Hashimoto K., Watanabe K. Disruption of the putative cell surface polysaccharide biosynthesis gene SO3177 in *Shewanella oneidensis* MR-1 enhances adhesion to electrodes and current generation in microbial fuel cells // *Appl. Envir. Microbiol.* – 2010. – V. 76. – No. 13. – P. 4151–4157.
110. Kraut A., Yamada E.W. Cytoplasmic uridine phosphorylase of rat liver. Characterization and kinetics // *J. Biol.Chem.* – 1971. – V. 246. – P. 2021–2030.
111. Krenitsky T.A. Uridine phosphorylase from *Escherichia coli*: Kinetic properties and mechanism // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1976. – V. 429. – P. 352-358.
112. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
113. Lan E.I., Liao J.C. Microbial synthesis of n-butanol, isobutanol, and other higher alcohols from diverse resources // *Bioresour Technol.* – 2013. – V. 135. – P. 339–349.
114. Lashkov A.A., Gabdulkhakov A.G., Prokofev I.I., Seregina T.A., Sotnichenko S.E., Lyashenko A.V., Shtil A.A., Mironov A.S., Betzeld C., Mikhailov A.M. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray structure analysis of *Vibrio cholerae* uridine phosphorylase in complex with thymidine // *Acta Cryst.* – 2012. – F 68. – P. 1394–1397.
115. Lassak J, Henche A, Binnenkade L, Thormann K.M. ArcS the cognate sensor kinase in an atypical arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 76. –No. 10. – P. 3263–3274.

116. Lee C.S., Jimenez B.M., O'Sullivan W.J. Purification and characterization of uridine (thymidine) phosphorylase from *Giardia lamblia* // Mol. Biochem. Parasitol. – 1988. – V. 3. – P. 271–7.
117. Lee J.V., Gibson D.M. Shewan, J.M. A numerical taxonomic study of some pseudomonas-like marine bacteria // J. Gen. Microbiol. – 1977. – V. 98. – P. 439–451.
118. Lee J.W., Na D., Park J.M., Lee J., Choi S., Lee S.Y. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals // Nature chemical biology. – 2012. – V. 8. – P. 536–546.
119. Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M. Uridine phosphorylase from *Escherichia coli*. Physical and chemical characterization // Eur. J. Biochem. – 1977. – V. 75. – No. 1. – P. 217-24.
120. Leyn S.A., Li X., Zheng Q., Novichkov P.S., Reed S., Romine M.F., Fredrickson J.K., Yang C., Osterman A.L., Rodionov D.A. Control of proteobacterial central carbon metabolism by the HexR transcriptional regulator. A case study in *Shewanella oneidensis* // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286. – No. 41. – P. 35782–35794.
121. Leys D., Tsapin A.S., Nealson K.H., Meyer T.E., Cusanovich M.A., Van Beeumen J.J. Structure and mechanism of the flavocytochrome c fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR-1 // Nat. Struct. Biol. – 1999. – V. 6. – No. 12. – P. 1113–1117.
122. Leys D., Meyer T.E., Tsapin A.S., Nealson K.H., Cusanovich M.A., Van Beeumen J.J. Crystal structures at atomic resolution reveal the novel concept of “Electron harvesting” as a role for the small tetraheme cytochrome c // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – No. 38. – P. 35703–35711.
123. Li X., Roseman S. The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and two-component chitin catabolic sensor/kinase // PNAS. – 2004. – V. 101. – No. 2. – P. 627–631.
124. Ling F., Inoue Y., Kimura A. Induction, purification and utilization of purine nucleoside and uridine phosphorylase from *Klebsiella* sp // Process Biochemistry. – 1994. – V. 29. – P. 355–361.

125. Liu M-P., Cao D-L., Russell R. L., Handschumacher R. E., Pizzorno G. Expression, characterization, and detection of human uridine phosphorylase and identification of variant uridine phosphorolytic activity in selected human tumors // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58. – P. 5418–5424.
126. Liu J., Wang Z., Belchik S.M., Edwards M.J., Liu C., Kennedy D.W., Merkley E.D., Lipton M.S., Butt J.N., Richardson D.J, Zachara J.M., Fredrickson J.K., Rosso K.M., Shi L. Identification and characterization of MtoA : a decaheme c-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 // *Fronti. Microbiol.* – 2012. – V. 3. – No. 37. – P. 2–11.
127. Lodi T, Alberti A, Guiard B, Ferrero I. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DLD1 gene encoding the mitochondrial protein D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase by HAP1 and HAP2/3/4/5 // *Mol. Gen. Genet.* – 1999. – V. 262. – P. 623–632.
128. Logan B.E., Rabaey K. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies // *Science.* – 2012. – V. 337. – P. 686–690.
129. Lovingshimer M.R., Siegele D., Reinhart G.D. Construction of an inducible, *pfkA* and *pfkB* deficient strain of *Escherichia coli* for the expression and purification of phosphofructokinase from bacterial sources // *Protein Expression and Purification.* – 2006. – V. 46. – P. 475–482.
130. Luccioni C., Beaumatin J., Bardot V., Lefrançois D. Pyrimidine nucleotide metabolism in human colon carcinomas: Comparison of normal tissues, primary tumors and xenografts // *Int. J. Cancer.* – 1994. – V. 58. – P. 517–522.
131. Lukat P., Rudolf M., Stach P., Messerschmidt A., Kroneck P., Simon J., Einsle O. Binding and reduction of sulfite by cytochrome c nitrite reductase // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47. – P. 2080–2086.
132. MacDonell M.T., Colwell R.R. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella* // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1985. – V. 6. – P. 171–182.

133. Maier T.M., Myers C.R. Isolation and characterization of a *Shewanella putrefaciens* MR-1 electron transport regulator *etrA* mutant: Reassessment of the role of *EtrA* // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. – No. 16. – P. 4918–4926.
134. Maier T.M., Myers J.M., Myers C.R. Identification of the gene encoding the sole physiological fumarate reductase in *Shewanella oneidensis* MR-1 // J. Basic Microbiol. – 2003. – V. 43. – No. 4. – P. 312–327.
135. Marsili E., Baron D.B., Shikhare I.D., Coursolle D., Gralnick J.A., Bond D.R. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer // PNAS. – 2008. – V. 105. – No. 10. – P. 3968–3973.
136. McCrindle S.L., Kappler U., McEwan A.G. Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration // Adv. Microb. Physiol. – 2005. – V. 50. – P. 147–198.
137. McEwan A.G., Ridge J.P., McDevitt C.A., Hugenholtz P. The DMSO reductase family of microbial molybdenum enzymes; molecular properties and role in the dissimilatory reduction of toxic elements // Geomicrobiol. J. – 2002. – V. 19. – P. 3–21.
138. McLean J.S., Pinchuk G.E., Geydebekht O.V., Bilskis C.L., Zakrajsek B.A., Hill E.A., Saffarini D.A., Romine M.F., Gorby Y.A., Fredrickson J.K., Beliaev A.S. Oxygen-dependent autoaggregation in *Shewanella oneidensis* MR-1 // Environmental Microbiol. – 2008. – V. 10. – No. 7. – P. 1861–1876.
139. Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Roseman S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program // PNAS. – 2004. – V. 101. – No. 8. – P. 2524–2529.
140. Meshulam-Simon G., Behrens S., Choo A.D., Spormann A.M. Hydrogen metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1 // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73. – P. 1153–1165.
141. Morgunova E.Yu., Mikhailov A.M., Popov A.N., Blagova E.V., Smirnova E.A., Vainshtein B.K., Mao Ch., Armstrong Sh.R., Ealick S.E., Komissarov A.A., Burlakova A.A., Mironov A.S., Debabov V.G. Atomic structure at 2.5 Å resolution of uridine phosphorylase from *E. coli* as refined in the monoclinic crystal lattice // Febs Lett. – 1995. – V. 367. – P. 183–187.

142. Morris C.J., Black A.C., Pealing S.L., Manson F.D.C., Chapman S.K., Reid G.A., Gibson D.M., Ward F.B. Purification and properties of a novel cytochrome: flavocytochrome c from *Shewanella putrefaciens* // *Biochem. J.* – 1994. – V. 302. – P. 587–593.
143. Moser D.P., Nealson K. H. Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 62. – P. 2100–2105.
144. Myers C.R., Nealson K.H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor // *Science.* – 1988. – V. 240. – P. 1319–1321.
145. Myers C.R., Myers J.M. Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1 // *J. Bacteriol.* – 1992. – V. 174. P. 33429–3438.
146. Myers C.R., Myers J.M. Role of menaquinone in the reduction of fumarate, nitrate, iron(III) and manganese(IV) by *Shewanella putrefaciens* MR-1 // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1993. – V. 114. – P. 215–222.
147. Myers C.R., Myers J.M. Isolation and characterization of a transposon mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 deficient in fumarate reductase // *Appl. Microbiol.* – 1997. – V. 24. – No. 3. – P. 162–168.
148. Myers C.R., Myers J.M. Replication of plasmids with the p15A origin in *Shewanella putrefaciens* MR-1 // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1997. – V. 24. – No. 3. – P. 221–225.
149. Myers C.R., Myers J.M. Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetrahemecytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1 // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179. – No. 4. – P. 1143–1152.
150. Myers J.M., Myers C.R., Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182. – No. 1. – P. 67–75.

151. Myers C.R., Myers J.M. MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1 // Appl. Envir. Microbiol. – 2002. – V. 68. – No. 11. – P. 5585–5594.
152. Myers C.R., Myers J.M. Cell surface exposure of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 // Lett. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 37. – P. 254–258.
153. Myers J.M., Antholine W.E., Myers C.R. Vanadium (V) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires menaquinone and cytochromes from the cytoplasmic and outer membranes // Appl. Envir. Microbiol. – 2004. – V. 70. – No. 3. – P. 1405–1412.
154. (D) Myers C.R., Myers J.M. The outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 are lipoproteins // Lett. Appl. Microbiol. – 2004. – V. 39. – P. 466–470.
155. Nealson K.H., Saffarini D. Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology, and regulation // Annu. Rev. Microbiol. – 1994. – V. 48. – P. 311–343.
156. Newman D.K., Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer // Nature. – 2000. – V. 405. – P. 94–97.
157. Okuyama K., Hamamoto T., Noguchi T., Midoricawa Y. Molecular cloning and expression of pyrimidine nucleoside phosphorylase gene from *Bacillus stearothermophilus* TH-6 // Biosci. Biotech. Biochem. – 1996. – V. 60. – P. 1655-1659.
158. Oliva I., Zuffi G., Barile D., Orsini G., Tonon G., De Giola L., Ghisotti D. Characterization of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by single-site mutagenesis // J. Biochem. – 2004. – V. 135. – P. 495-499.
159. Ozawa K., Tsapin A., Nealson K.H., Cusanovich M.A., Akutsu H. Expression of a tetraheme protein, *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F cytochrome c3, in *Shewanella oneidensis* MR-1 // Appl. Envir. Microbiol. – 2000. – V. 66. – No. 9. – P. 4168–4171.
160. Ozawa K., Yasukawa F., Fujiwara Y., Akutsu H. A simple, rapid, and highly efficient gene expression system for multiheme cytochromes c // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2001. – V. 65. – P. 185–189.

161. Ozawa K., Takayama Y., Yasukawa F., Ohmura T., Cusanovich M.A., Tomimoto Y., Ogata H., Higuchi Y., Akutsu H. Role of the aromatic ring of Tyr43 in tetraheme cytochrome c3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F // *Biophysical Journal*. – 2003. – V. 85. – P. 3367–3374.
162. Pealing S.L., Black A.C., Manson F.D.C., Ward F.B., Chapman S.K., Reid G.A. Sequence of the gene encoding flavocytochrome c from *Shewanella putrefaciens*: a tetraheme flavoenzyme that is a soluble fumarate reductase related to the membrane-bound enzymes from other bacteria // *Biochemistry*. – 1992. – V. 31. – P. 12132–12140.
163. Perini L.T., Doherty E.A., Werner E., Senear D.F. Multiple specific CytR binding sites at the *Escherichia coli deoP2* promoter mediate both cooperative and competitive interactions between CytR and cAMP receptor protein // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – No. 52. – P. 33242–33255.
164. Perreault N.N., Crocker F.H., Indest K.J., Hawari J. Involvement of cytochrome c CymA in the anaerobic metabolism of RDX by *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Can. J. Microbiol.* – 2012. – V. 58. – P. 124–131.
165. Pinchuk G.E., Rodionov D.A., Yang C., Lib X., Osterman A.L., Dervyn E., Geydebekht O.V., Reed S.B., Romine M.F., Collart F.R., Scott J.H., Fredrickson J.K., Beliaev A.S. Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization // *PNAS*. – 2009. – V. 106. – No. 8. – P. 2874–2879.
166. Pinchuk G.E., Hill A., Geydebekht O.V., De Ingeniis J., Zhang X., Osterman A., Scott J.H., Reed S.B., Romine M.F., Konopka A.E., Beliaev A.S., Fredrickson J.K., Reed J.L. Constraint-based model of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism: a tool for data analysis and hypothesis generation // *PLoS Comput. Biol.* – 2010. – V. 6. – No. 6. – e1000822.
167. Pinchuk G.E., Geydebekht O.V., Hill E.A., Reed J.L., Konopka A.E., Beliaev A.S., Fredrickson J.K. Pyruvate and lactate metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under fermentation, oxygen limitation, and fumarate respiration conditions // *Appl. Envir. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – No. 23. – P. 8234–8240.

168. Pitts K.E., Dobbin P.S., Reyes-Ramirez F., Thomson A.J., Richardson D.J., Seward H.E. Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 27758–27765.
169. Poirel L. Héritier C., Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – V. 48. – No. 1. – P. 348–351.
170. Potter L., Angove H., Richardson D., Cole J. Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria // Adv. Microb. Physiol. – 2001. – V. 45. – P. 51–112.
171. Price M.N., Dehal P.S., Arklin A.P. Orthologous transcription factors in bacteria have different functions and regulate different genes // PLoS One. – 2007. – V. 3. – No. 9. – e175. – P. 1739–1750.
172. Pritchard M.D., Watson A.J.M., Potten C.S., Jackman A.L., Hickman J.A. Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation // PNAS. – 1997. – V. 94. – P. 1795–99.
173. Prokofev I.I., Lashkov, A.A., Gabdoulkhakov A.G., Dontsova, M.V., Seregina T.A., Mironov, A.S., Betzel, C., Mikhailov, A.M. Crystallization and preliminary X-ray study of *Vibrio cholerae* uridine phosphorylase in complex with 6-methyluracil // Acta Crystallog. Sect. F. – 2014 –V. 70. – P. 60–63.
174. Quin M.B., Schmidt-Dannert Q. Designer microbes for biosynthesis // Current Opinion in Biotechnology. – 2014. – V. 29. – P. 55–61.
175. Renck D., Machado P., Souto A.A., Rosado L.A., Erig T., Campos M.M., Farias C.B., Roesler R., Timmers L.F., de Souza O.N., Santos D.S., Basso L.A. Design of novel potent inhibitors of human uridine phosphorylase-1: synthesis, inhibition studies, thermodynamics, and in vitro influence on 5-fluorouracil cytotoxicity // J. Med. Chem. – 2013. – V. 56. – No. 21. – P. 8892–8902.
176. Richardson D.J. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment // Microbiology. – 2000. – V. 146. – P. 551–571.

177. Richardson D.J, Berks B.C, Russell D.A, Spiro S, Taylor C.J. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases // *Cell Mol. Life Sci.* – 2001. – V. 58. – P. 165–178.
178. Roberts R.J, Belfort M, Bestor T., Bhagwat A.S., Bickle T.A., Bitinaite J., Blumenthal R.M., Degtyarev S.Kh., Dryden D.T., Dybvig K., Firman K., Gromova E.S., Gumport R.I., Halford S.E., Hattman S., Heitman J., Hornby D.P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T.R., Kobayashi I., Kong H., Krüger D.H., Lacks S., Marinus M.G., Miyahara M., Morgan R.D., Murray N.E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D.N., Reich N., Repin V.E., Selker E.U., Shaw P.C., Stein D.C., Stoddard B.L., Szybalski W., Trautner T.A., Van Etten J.L., Vitor J.M., Wilson G.G., Xu S.Y. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31 – No. 7 – P. 1805–1812.
179. Rodionov D.A., Yang C., Li X., Rodionova I.A., Wang Y., Obraztsova A.Y., Zagnitko O.P., Overbeek R., Romine M.F., Reed S., Fredrickson J.K., Nealson K.H., Osterman A.L. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus // *BMC Genomics.* – 2010. – V. 11. – P. 494–513.
180. Roehl R.A., Vinopal R.T. Lack of glucose phosphotransferase function in phosphofructokinase mutants of *Escherichia coli* // *J. Bacteriology.* – 1976. – V. 126. – No. 2. – P. 852–860.
181. Romine M.F., Carlson T.S., Norbeck A.D., McCue L.A., Lipton M.S. Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome // *Appl. Envir. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – No. 10. – P. 3257–3265.
182. Rosenbaum M.A., Henrich A.W. Engineering microbial electrocatalysis for chemical and fuel production // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2014. – V. 29. – P. 93–98.
183. Ross D.E., Ruebush S.S., Brantley S.L., Hartshorne R.S., Clarke T.A., Richardson D.J., Tien M. Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Appl. Envir. Microbiol.* – 2007. – V. 73. – No. 18. – P. 5797–5808.

184. Ruan Q, Zhou C, Xu X, Wu W. Purification and characterization of a uridine phosphorylase from *Enterobacter aerogenes* EAM-Z1 // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2003. – V. 43. – No. 3. – P. 354–60.
185. Saffarini D.A, Nealsen K.H. Sequence and genetic characterization of *etrA*, an *fnr* analog that regulates anaerobic respiration in *Shewanella putrefaciens* MR-1 // J. Bacteriol. – 1993. – V. 175. – No. 24. – P. 7938–7944.
186. Saffarini D.A., Schultz R., Beliaev A. Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* MR-1 // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185. – No. 12. – P. 3668–3671.
187. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. – N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
188. Sanders C., Lill H. Expression of prokaryotic and eukaryotic cytochromes c in *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1459. – No. 1. – P. 131–138.
189. Schicklberger M., Sturm G., Gescher J. Genomic plasticity enables a secondary electron transport pathway in *Shewanella oneidensis* MR-1 // Appl. Envir. Microbiol. – 2013. – V. 79. – No. 4. – P. 1150–1159.
190. Schuetz B., Schicklberger M., Kuermann J., Spormann A.M., Gescher J. Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1 // Appl. Envir. Microbiol. – 2009. – V. 75. – No. 24. – P. 7789–7796.
191. Schütz B., Seidel J., Sturm O., Einsle O., Gescher j. Investigation of the electron transport chain to and the catalytic activity of the diheme cytochrome c peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis* MR-1 // Appl. Envir. Microbiol. – 2011. – V. 77. – No. 17. – P. 6172–6180.
192. Schwalb C., Chapman S.K., Reid G.A. The membrane-bound tetrahaem c-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella* // Biochemical Society transactions. – 2002. – V. 30. – No. 4. – P. 658–662.
193. Schwalb C., Chapman S.K., Reid G.A. The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis* // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – P. 9491–9497.

194. Scott J.H., Nealson K. H. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens* // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176. – P. 3408–3411.
195. Sernova N.V., Gelfand M.S. Comparative genomics of CytR, an unusual member of the LacI family of transcription factors // PLoS One. – 2012. – V. 7. – No. 9. – e44194.
196. Serres M.H., Riley M. Genomic analysis of carbon source metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: predictions versus experiments // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188. – No. 13. – P. 4601–4609.
197. Shalel-Levanon S, San K.Y, Bennett G.N: Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions // Metab. Eng. – 2005. – V. 7. – P. 445–456.
198. Shewan J.M., Hobbs G., Hodgkiss W. A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria with special reference to *Pseudomonadaceae* // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – V. 23. – P. 379–390.
199. Shi L., Lin J.-T., Markillie L.M., Squier T.C., Hooker B.S. Overexpression of multi-heme C-type cytochromes // BioTechniques. – 2005. – V. 38. – No. 2. – P. 297–299.
200. Shi L., Chen B., Wang Z., Elias D.A., Mayer M.U., Gorby Y.A., Ni S., Lower B.H., Kennedy D.W., Wunschel D.S., Mottaz H.M., Marshall M.J., Hill E.A., Beliaev A.S., Zachara J.M., Fredrickson J.K., Squier T.C. Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: two outer membrane decaheme c-Type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188. – No. 13. – P. 4705–4714.
201. Shi L., Squier T.C., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme c-type cytochromes // Mol. Microbiol. – 2007. – V. 65. – No. 1. – P. 12–20.
202. Shi L., Deng S., Marshall M.J., Wang Z., Kennedy D.W., Dohnalkova A.C., Mottaz H.M., Hill E.A., Gorby Yu.A., Beliaev A.S., Richardson D.J., Zachara J.M.,

- Fredrickson J.K. Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA // *J. Bacteriol.* – 2008. – V. 190. – No. 15. – P. 5512–5516.
203. Shi L., Belchik S.M., Plymale A.E., Heald S., Dohnalkova A.C., Sybirna K., Bottin H., Squier T.C., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Purification and characterization of the [NiFe]-hydrogenase of *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Appl. Envir. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – No. 16. – P. 5584–5590.
204. Shi L., Rosso K.M., Clarke T.A., Richardson D.J., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Molecular underpinnings of Fe(III) oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Frontiers in Microbiology. – Microbiological Chemistry.* – 2012. – V. 3. Art. 50.
205. Shirodkar S., Reed S., Romine M., Saffarini D. The octahaem SirA catalyses dissimilatory sulfite reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Envir. Microbiol.* – 2011. – V. 13. – No. 1. – P. 108–115.
206. Siebold C., Flükiger K., Beutler R., Erni B. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) // *FEBS Letters.* – 2001. – V. 504. – P. 104–111.
207. Simon J. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2002. – V. 26. – P. 285–309.
208. Simpson P.J.L., Richardson D.J., Codd R. The periplasmic nitrate reductase in *Shewanella*: the resolution, distribution and functional implications of two NAP isoforms, NapEDABC and NapDAGHB // *Microbiology.* – 2010. – V. 156. – P. 302–312.
209. Stach P., Einsle O., Schumacher W., Kurun E., Kroneck P. Bacterial cytochrome c nitrite reductase: new structural and functional aspects // *J. Inorg. Biochem.* – 2000. – V. 79. – P. 381–385.
210. Strohl W.R. Biochemical engineering of natural product biosynthesis pathways // *Metabolic Engineering.* – 2001. – V. 3. – P. 4–14.
211. Sybirna K., Antoine T., Lindberg P., Fourmond V., Rousset M., Méjean V., Bottin H. *Shewanella oneidensis*: a new and efficient system for expression and

- maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii* // BMC Biotechnology. – 2008. – V. 8. – P. 73–81.
212. Taillefert M., Beckler J.S., Carey E., Burns J.L., Fennessey C.M., DiChristina T.J. *Shewanella putrefaciens* produces an Fe(III)-solubilizing organic ligand during anaerobic respiration on insoluble Fe(III) oxides // J. Inorg. Biochem. – 2007. – V. 101. – P. 1760–1767.
213. Tajima N., Kouzuma A., Hashimoto K., Watanabe K. Selection of *Shewanella oneidensis* MR-1 gene-knockout mutants that adapt to an electrode-respiring condition // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2011. – V. 11. – No. 75. – P. 1–5.
214. Takayama Y., Akutsu H. Expression in periplasmic space of *Shewanella oneidensis* // Protein Expression and Purification. – 2007. – V. 56. – P. 80–84.
215. Takayama Y., Werbeck N.D., Komori H., Morita K., Ozawa K., Higuchi Y., Akutsu H. Strategic roles of axial histidines in structure formation and redox regulation of tetraheme cytochrome c3 // Biochemistry. – 2008. – V. 47. – P. 9405–9415.
216. Takehara M., Ling F., Izawa S., Inoue Y., Kimura A. Molecular cloning and nucleotide sequence of purine nucleoside phosphorylase and uridine phosphorylase genes from *Klebsiella sp* // Biosci. Biotech. Biochem. – 1995. – V. 59. – P. 1987–1990.
217. Tang Y.J., Meadows A.L., Kirby J., Keasling J.D. Anaerobic central metabolic pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 reinterpreted in the light of isotopic metabolite labeling // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – No. 3. – P. 894–901.
218. Thauer R.K., Jungermann K., Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria // Bacteriol. Rev. – 1977. – V. 41. – P.100–180.
219. Tiedje J.M. *Shewanella* – the environmentally versatile genome // Nat. Biotechnol. – 2002. – V. 20. – P. 1093–1094.
220. Tomanicek S.J., Johs A., Sawhney M.S., Shib L. Liang L. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the outer membrane cytochrome OmcA from *Shewanella oneidensis* MR-1 // Acta Cryst. – F. – 2012. – V. 68. – P. 53–55.
221. Tsapin A.I., Nealson K.H., Meyer T.E., Cusanovich M.A., Van Beeumen J.J., Crosby L.D., Feinberg B.A., Zhang C. Purification and properties of a low-redox-

- potential tetraheme cytochrome c3 from *Shewanella putrefaciens* // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 6386–6388.
222. Tsapin A.I., Vandenberghe I., Nealson K.H., Scott J.H., Meyer T.E., Cusanovich M.A., Harada E., Kaizu T., Akutsu H., Leys D., Van Beeumen J.J. Identification of a small tetraheme cytochrome c and a flavocytochrome c as two of the principal soluble cytochromes c in *Shewanella oneidensis* strain MR1 // Appl. Envir. Microbiol. – 2001. – V. 67. – No. 7. – P. 3236–3244.
223. Utagawa T., Morisawa H., Yamanaka S., Yamazaki A., Yoshinaga F., Hirose Y. Properties of nucleoside phosphorylase from *Enterobacter aerogenes* // Agric. Biol. Chem. – 1985. – V. 49. – No.11. – P. 3239-3246.
224. Velasquez-Orta S.B., Head I.M., Curtis T.P., Scott K., Lloyd J.R., von Canstein H. The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 85. – P. 1373–1381.
225. Venkateswaran K., Moser D. P., Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Ringelberg D.B., White D.C., Nishijirna M., Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E., Nealson K.H. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 49. – P. 705–724.
226. Vinogradov E., Korenevsky A., Beveridge T.J. The structure of the rough-type lipopolysaccharide from *Shewanella oneidensis* MR-1, containing 8-amino-8-deoxy-Kdo and an open-chain form of 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose // Carbohydr. Res. – 2003. – V. 338. – P. 1991–1997.
227. Viridis B. Treatise on water science: Microbial fuel cell / Viridis B., Freguia S, Rozendal R.A., Rabaey K., Yuan Z., Keller J. – Oxford: Academic Press, 2011. – V. 4. – P. 641–665.
228. Visser D.F., Hennessy F., Rashamuse J., Pletschke B., Brady D. Stabilization of *Escherichia coli* uridine phosphorylas by evolution and immobilization // J. Mol. Catalysis B: Enzymatic. – 2011. – V. 68. – P. 279–285.

229. Vita A., Amici A., Cacciamani T., Lanciotti M., Magni G. Uridine phosphorylase from *Escherichia coli* B. Enzymatic and molecular properties // Int. J. Biochem. – 1986. – V. 18. – No. 5. – P. 431-436.
230. Walton L., Richards C.A., Elwell L.P. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* uridine phosphorylase (udp) gene // Nucleic Acids Res. – 1989. – V. 17. – P. 6741.
231. Watanabe S., Hino A., Wada K., Eliason J.F., Uchida T. Purification cloning, and expression of murine uridine phosphorylase // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270. – P. 12191–12196.
232. White, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes / D. White. – New York., NY: Oxford University Press. – 1995.
233. Williams K.P. Gillespie J.J., Sobral B.W.S., Nordberg E.K., Snyder E.E., Shallom J.M., Dickerman A.W. Phylogeny of gammaproteobacteria // J. Bacteriol. – 2010. – V.192. – No. 9. – P. 2305–2314.
234. Witkowski J.T., Robins R.K., Sidwell R.W., Simon L.N. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides // J. Med. Chem. – 1972. – V. 15. – No. 11. – P. 1150–1154.
235. Wu D., Xing D., Lu L., Wei M., Liu B., Ren N. Ferric iron enhances electricity generation by *Shewanella oneidensis* MR-1 in MFCs // Bioresource Technology. – 2013. – V. 135. – P. 630–634.
236. Wunsch P., Herb M., Wieland H., Schiek U., Zumft W. Requirements for CuA and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the nondenitrifier *Pseudomonas putida* // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185. – P. 887–896.
237. Yang C., Rodionov D.A., Li X., Laikova O.N., Gelfand M.S., Zagnitko O.P., Romine M.F., Obraztsova A.Y., Nealson K.H., Osterman A.L. Comparative genomics and experimental characterization of N-Acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis* // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281. – No. 40. –P. 29872–29885.
238. Yong Y.-C., Cai Z., Yu Y.-Y., Chen P., Jiang R., Cao B., Sun J.-Z., Wang J.-Y., Song H. Increase of riboflavin biosynthesis underlies enhancement of extracellular

electron transfer of *Shewanella* in alkaline microbial fuel cells // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 130. – P. 763–768.

239. Youngblut M., Judd E.T., Srajer V., Sayyed B., Goelzer T., Elliott S.J., Schmidt M., Pacheco A.A. Laue crystal structure of *Shewanella oneidensis* cytochrome c nitrite reductase from a high-yield expression system // *J Biol Inorg Chem*. – 2012. – V.17. – No. 4. – P. 647–62.

240. Zargar K. Saltikov C.W. Lysine-91 of the tetraheme c-type cytochrome CymA is essential for quinone interaction and arsenate respiration in *Shewanella* sp. // *Arch. Microb.* – 2009. – V. 191. – P. 797–806.

241. Zhang H., Tang X., Munske G.R., Zakharova N., Yang L., Zheng C., Wolff M.A., Tolic N., Anderson G.A., Shi L., Marshall M.J., Fredrickson J.K., Bruce J.E. In Vivo identification of the outer membrane protein OmcA–MtrC interaction network in *Shewanella oneidensis* MR-1 cells using novel hydrophobic chemical cross-linkers // *J. Proteome Res.* – 2008. – V. 7. – No. 4. – P. 1712–1720.

242. Zolotuchina M., Ovcharova I., Eremina S., Errais Lopes L., Mironov A.S. Comparison of the structure and regulation of the *udp* gene of *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* // *Research in Microbiology*. – 2003. – V. 154. – P. 510–520.

243. Zumft W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – V. 61. – P. 533–616.