Успехи биологической химии, т. 54, 2014, с. 349-384

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МУЛЬТИГЕМОВЫХ ЦИТОХРОМОВ С, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ В ПРОЦЕССАХ ДИССИМИЛЯТОРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МЕТАЛЛОРЕДУКЦИИ

©2014 г.

Т. В. ТИХОНОВА, В. О. ПОПОВ

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Основные механизмы экстраклеточного электронного транспорта. III. Экстраклеточный перенос электронов у бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1. IV. Распространенность и универсальность механизма внеклеточного электронного транспорта, показанного для бактерии *S. oneidensis*. V. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

В анаэробных условиях некоторые бактерии используют минеральные (нерастворимые) формы соединений металлов переменной валентности в качестве акцепторов электронов. Впервые способность микроорганизмов к облигатной железоредукции («железному дыханию») в анаэробных условиях была показана Балашовой и Заварзиным в 1979 г [1]. В этих экспериментах бактерия, идентифицированная как *Pseudomonas* sp., восстанавливала гидроксид железа и ферригидрит молекулярным водородом. В конце 80-х годов появились работы Лавли и др., демонстрировавшие использование Fe(III) и Mn(IV) в качестве конечного акцептора электронов при росте микроорганизмов на несбраживаемых органических соединениях

Принятые сокращения: DBMR (Dissimilatory Bacterial Metal Reduction) – диссимиляторная бактериальная металлоредукция; OMC (outer membrane cytochrome *c*) – поверхностные цитохромы *c*; г.т.s.d. (root-mean-square deviation) – средне-квадратичное отклонение; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; Fe-NTA – нитрилотриацетат железа.

Адрес для корреспонденции: ttikhonova@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-40207-Н.

[2, 3] и показавшие широкое распространение таких организмов в природе [4-9]. Бактерии, выделенные в результате этих исследований и отнесённые к родам Geobacter и Shewanella, стали в дальнейшем модельными объектами для изучения биохимических и физиологических аспектов микробной металлоредукции. Само же явление, получившее название диссимиляторной бактериальной металлоредукции (DBMR), играет огромную роль в превращении таких широко распространенных и жизненно важных элементов как железо и марганец [10, 11]. В некоторых морских, пресноводных и почвенных экосистемах диссимиляторное восстановление железа (III) микроорганизмами - основной процесс, обеспечивающий окисление органического вещества [9, 12]. Ещё большую роль микробное восстановление трёхвалентного железа могло играть в древнейшей биосфере, где Fe(III) вероятно являлся первым и некоторое время основным окислителем органического углерода [13]. Выдвинута гипотеза о том, что диссимиляторное восстановление Fe(III) могло быть первым возникшим типом метаболизма [14]. В настоящее время бактериальная металлоредукция рассматривается как процесс, имеющий огромный биотехнологический потенциал [11, 15] для создания микробных топливных элементов [16-19], микробных электрон-проводящих цепей [20], биоремедиации почв от токсичных металлов, в том числе радиоактивных, путем восстановления и перевода их в менее растворимую форму [15] (например, U(VI) в U(IV) [21], Tc(VII) в Tc(V) [22]). Недавно была показана возможность диссимиляторного экстраклеточного бактериального восстановления оксида графена, которая рассматривается как один из способов получения графена [23].

Один из основных вопросов, который возник при изучении DBMR с использованием нерастворимых соединений металлов в качестве терминальных акцепторов электронов – каков механизм переноса электронов от цитоплазматической мембраны, где их источником являются восстановленные хиноны, через периплазму и внешнюю клеточную мембрану к расположенному снаружи нерастворимому субстрату. Отдельно следует отметить, что все бактерии, для которых изучался этот механизм относятся к грам-отрицательным, поэтому имеющиеся в настоящее время механизмы экстраклеточного электронного транспорта учитывают особенности строения клетки и клеточных мембран именно грам-отрицательных организмов. Для грам-положительных бактерий исследование DBMR находится на начальной стадии [24–29].

II. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА

Наиболее исследованными модельными организмами для изучения механизмов экстраклеточного транспорта электронов на нерастворимые и растворимые субстраты стали бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 и *Geobacter sulfurreducens* (наиболее исследованные штаммы DL-1 и KN400 [15]). Результаты, полученные для этих двух организмов и затем проверенные на других грам-отрицательных бактериях [30–35], осуществляющих DBMR, позволили сформулировать несколько основных механизмов экстраклеточного транспорта электронов [4, 11, 14, 15, 36–38], которые в реальных условиях могут реализовываться одновременно, взаимно дополняя друг друга.

Первый механизм связан с участием мультигемовых цитохромов c, функциональные комплексы которых образуют протяженные электрон-транспортные цепи, осуществляющие перенос электронов от восстановленных хинонов в цитоплазматической мембране на редокс-белки, связанные с внешней поверхностью наружной клеточной мембраны, и затем на экстраклеточные растворимые и нерастворимые субстраты, в том числе нерастворимые оксиды металлов, входящие в состав минералов [11, 15, 39-44 и ссылки в них]. Очевидно, что реализация этого механизма возможна только при условии близкого контакта внешней поверхности бактериальной клетки с расположенными на ней терминальными редуктазами с нерастворимым акцептором (менее 15–20 Å). В этом случае возможен прямой перенос электронов между экспонированным в среду гемом экстраклеточного цитохрома с, выполняющего роль терминальной редуктазы, и акцептором [45]. Для реализации этого переноса клетки бактерий, осуществляющих DBMR, снабжены механизмами обнаружения субстрата, таксиса в направлении субстрата и взаимодействия с поверхностью нерастворимого субстрата [46-48]. Последняя стадия зависит от способности клетки синтезировать экстраклеточные поверхностные цитохромы с. Мутанты S. oneidensis, которые не продуцируют поверхностные цитохромы, не способны взаимодействовать с поверхностью нерастворимого субстрата [48].

Второй механизм, дополняющий и расширяющий возможности первого, связан с синтезом растворимых низкомолекулярных редокспереносчиков – флавинов, поставляемых клеткой во внешнюю среду [11, 15, 49–54]. Наиболее исследован этот механизм у бактерии *S. oneidensis* MR-1 [49, 51–56]. Уровень рибофлавина и ФМН, секретируемых бактерией *S. oneidensis* MR-1, зависит от природы акцептора и увеличивается при росте клетки с соединениями железа (III)

[56]. Предполагается, что восстановление переносчиков протекает на тех же, расположенных на внешней стороне наружной клеточной мембраны мультигемовых цитохромах *с* (далее OMC–outer membrane cytochrome *c*), которые в первом механизме осуществляют прямой перенос электронов на нерастворимые акцепторы [54, 55]. Поэтому в отсутствие OMC восстановление нерастворимых субстратов флавинами практически не протекает. Вклад флавинов в общую скорость переноса электронов на нерастворимый оксид железа составляет 75–80 % [52, 53] или, по другим данным, в присутствии микромолярных концентраций флавинов скорость переноса электронов цитохромом MtrC на электрод возрастала в 10 раз [54]. На скорость восстановления растворимых экстраклеточных субстратов присутствие флавинов не влияло [52, 54].

Третий механизм, который активно обсуждается в последние годы, связан с образованием у некоторых бактерий, использующих DBMR, электропроводящих пилей. Наиболее подробно эта концепция рассматривается для бактерии G. sulfureducens [15, 57–59]. Согласно этой концепции, основной вклад в транспорт электронов к нерастворимым акцепторам у G. sulfureducens вносят электропроводящие выросты – пили (длина одной пили около 10-20 мкм), которые образуются при росте бактерии с нерастворимым оксидом Fe(III) [60, 61]. Делеционные мутанты G. sulfureducens, которые не продуцируют пили, неспособны эффективно восстанавливать оксид железа. Согласно данным Д. Лавли [15, 57-59], пили обладают проводимостью металлического типа, которая растет при снижении температуры. Основной вклад в проводимость пилей вносит белок – пилин (PilA) [57-59]. Предполагается, что проводимость металлического типа возможна за счет перекрывания π-орбиталей ароматических остатков и делокализации электронов в PilA [57, 59]. Такой тип проводимости в белках обнаружен впервые. В биопленках, полученных на электродах, пили обеспечивают транспорт электронов на расстояние до 1 см (так называемый Long range electron transfer) [57, 58].

Мультигемовые цитохромы *с* не влияют на перенос электронов вдоль пилей [15, 58], но, по-видимому, важны для переноса электронов с пилей на акцептор [58], т.е. выполняют роль терминальных редуктаз. Основная роль здесь приписывается шестигемовому цитохрому OmcS, который специфически связан с пилями [58, 62, 63]. Не исключена возможность того, что мультигемовые цитохромы участвуют также в переносе электронов от цитоплазматической мембраны на пили [58].

Дополнительно мультигемовые цитохромы *с* могут выполнять функцию накопления и хранения электронов (своего рода аккумуляторы), обеспечивая возможность переноса электронов из внутренней мембраны и формирования протонного градиента в отсутствие акцептора [58, 62, 64].

Даже из такого поверхностного анализа всех трех рассматриваемых механизмов следует, что мультигемовые цитохромы играют ключевую роль в переносе электронов от цитоплазматической мембраны на внешнюю поверхность клеточной стенки, где они используются для разных целей. Целью настоящего обзора является обсуждение имеющихся в настоящее время сведений о составе, строении и функциях мультигемовых цитохромов *с* и их функциональных комплексов, участвующих в экстраклеточном транспорте электронов.

III. ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ У БАКТЕРИИ SHEWANELLA ONEIDENSIS MR-1

Наиболее исследованной в настоящее время является схема экстраклеточного транспорта электронов, предложенная для грам-отрицательной факультативно анаэробной бактерии S. oneidensis MR-1. S. oneidensis MR-1 способна связывать окисление различных органических субстратов с восстановлением широкого круга терминальных акцепторов. Акцепторы могут быть как растворимые, окисление которых протекает в периплазме, такие как: О₂, фумарат, нитрат, нитрит, тиосульфат, сульфит; так и нерастворимые, окисление которых протекает вне клетки и требует транспорта электронов на внешнюю поверхность наружной клеточной мембраны и далее на акцептор. К таким акцепторам относятся прежде всего оксиды Fe(III) и Mn(IV), в том числе в составе минералов. Самыми распространенными формами микробиологически восстанавливаемого железа являются аморфные гидроксиды Fe(III), слабокристаллические оксиды железа, такие как ферригидрит (5Fe₂O×9H₂O), и высококристаллические оксиды железа: гематит (α -Fe₂O₂), магнетит (Fe₂O₄) и гетит (α -FeOOH) [65]. Экстраклеточно происходит и восстановление таких растворимых акцепторов как диметилсульфоксид (DMSO) и цитрат железа, а также соединений хрома (VI), урана (VI) и технеция (VII) [42].

Для проявления респираторной гибкости *S. oneidensis* MR-1 имеет многокомпонентную и разветвленную ЭТЦ. Эта цепь включает в качестве основных компонентов цитохромы *с*, которые представлены в геноме бактерии 42 генами [66], около 33 из них содержат два и более гемов *с*. Инактивация целевых генов и последующий филоге-

нетический анализ мутантов по способности восстанавливать растворимые и нерастворимые соединения железа позволили идентифицировать 4 мультигемовых цитохрома c СуmA, MtrA, MtrC, ОтсА и трансмембранный белок MtrB как минимальный набор белков, необходимых для экстраклеточного транспорта электронов на нерастворимые акцепторы (mtr: <u>metal reducing</u>, omc: <u>outer m</u>embrane <u>cytochrome</u>) [32, 67–70].

Гены четырех белков *mtr*C, *mtrB*, *mtrA* и *omc*A организованы в геноме S. oneidensis MR-1 в один генный кластер *mtr*CAB–*omc*A–*mtr*DEF, который включает также набор генов *mtrDEF*, паралогичных генам *mtrCAB* (гены перечислены в порядке расположения их в кластере) [43]. Регулируется экспрессия генов *omc*A, *mtr*CAB и *mtr*DEF разными промоторами, что позволяет предположить, что кодируемые ими белки выполняют неодинаковые функции в клетке. Предполагается, что комплекс MtrCBA синтезируется в отдельно живущих клетках, а комплекс MtrDEF – при росте клеток в биопленках [41]. Кроме того, было показано, что MtrCBA и OmcA имели повышенный уровень экспрессии при анаэробном росте, a MtrDEF – при аэробном [44].

Вместе эти белки образуют цепь, которая обеспечивает перенос электронов 1) от пула восстановленных хинонов в цитоплазматической мембране в периплазму; 2) через периплазму на внешнюю поверхность наружной мембраны; 3) с наружной мембраны на поверхность нерастворимого акцептора (на рис. 1 – оксид железа).

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ ИЗ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ В ПЕРИПЛАЗМУ

Первым белком в цепи экстраклеточного электронного транспорта является СутА – четырехгемовый цитохром *c*, принадлежащий к семейству NapC/NirT QH₂-хинолдегидрогеназ [42, 71]. Методом магнитного кругового дихроизма было показано, что 3 гема *c* СутА координированы в проксимальном и дистальном положениях остатками гистидина, а четвертый, высокоспиновый, гем координирован в дистальном положении молекулой воды. Присутствие в молекуле СутА высокоспинового гема было подтверждено методом ЯМР [72]. Спектропотенциометрическое титрование показало, что редокс потенциалы низкоспиновых His/His-гемов равны –110, –190 и –265 мВ, а потенциал высокоспинового His/H₂O гема равен –240 мВ [73]. Данные спектропотенциометрического титрования были подтверждены циклической вольтамперометрией СутА на золотом и графитовом электродах [74].



Рис. 1. Схема электронного транспорта у бактерии *S. oneidensis* MR-1: от пула восстановленных хинонов в цитоплазматической мембране к экстраклеточным акцепторам электронов (оксид железа (III)).

Красными точками обозначены гемы в молекулах цитохромов с. В качестве донора электронов изображен формиат, Fdh – формиатдегидрогеназа. В переносе электронов от CymA к MtrA могут участвовать растворимые периплазматические цитохромы FccA, STC, NrfA, а также растворимая фракция MtrA.

Пространственная структура СутА неизвестна. На основании известной структуры гомологичной СутА четырехгемовой хинолдегидрогеназы NrfH из бактерии *Desulfovibrio vulgaris* была построена модель СутА, согласно которой он состоит из одной трансмембранной α-спирали, связывающей его с цитоплазматической мембраной, и глобулярного периплазматического домена, содержащего 4 гема *с* (рис. 2) [42, 71, 75]. По аналогии с *D. vulgaris* NrfH [76] было сделано

Т.В.Тихонова, В.О.Попов



Рис. 2. Модель СутА [75], построенная с использованием пространственной структуры четырехгемовой хинолдегидрогеназы NrfH из бактерии *D. vulgaris* (PDB ID: 2VR0) [76], гомологичной СутА. Модель была построена с использованием программы Swiss Modeler.

Показано наложение гемов СутА (обозначены черным цветом) и гемов *D. vulgaris* NrfH (обозначены серым цветом). Гемы пронумерованы в соответствии с положением гем-координирующих мотивов СххСН в аминокислотной последовательности. Гем 1 – возможный сайт связывания кофактора/субстрата MQ-7. Оранжевым цветом показано положение редокс неактивного аналога субстрата – 2-гептил-4-гидроксихинолин-N-оксида в структуре *D. vulgaris* NrfH [76]. Указан остаток Lys91, предположительно вовлеченный в связывание и окисление субстрата [75].

предположение, что высокоспиновый гем 1, расположенный на границе периплазмы и цитоплазматической мембраны, входит в состав хинол-окисляющего центра [42] и является точкой входа электронов в электрон-транспортную цепь СутА. Донором электронов для СутА служит менахинол-7 (MQ-7, Е_т около –80 мВ), который является основным хиноном цитоплазматичекой мембраны при росте организма в анаэробных условиях [74]. Однако, на основании данных, полученных методом вольтамперометрии в белковых пленках (PFV),

сделано предположение, что MQ-7 является не только субстратом, но и дополнительным кофактором для СуmA, без которого протекание редокс-процесса невозможно. Авторы [74] предполагают, что СуmA имеет два сайта связывания хинонов: один из них, с высокой аффинностью к MQ-7, связывает его как кофактор, а второй, с низкой аффинностью, связывает восстановленные хиноны, в том числе и отличные от MQ-7, как субстраты – доноры электронов. Консервативный в семействе NapC/NirT QH₂-хинолдегидрогеназ остаток Lys91, расположенный рядом с гемом 1, участвует в связывании и окислении менахинола [75].

Сопоставление редокс потенциалов гемов СутА и прежде всего высокоспинового гема 1 – предполагаемого акцептора электронов (-240 мВ) и менахинона MQ-7 (-80 мВ) показывает, что наблюдаемый in vivo процесс переноса электронов от восстановленного MQ-7 на СутА термодинамически затруднен, что подтверждается экспериментами in vitro, где происходит обратный процесс переноса электронов от восстановленного CymA на MQ-7 [74]. Возможно, что в клетке направление процесса задается потенциалом пары NAD/NADH (-320 мВ), окисление которой в качестве кофактора формиатдегидрогеназы сопровождается образованием восстановленных хинонов. Проведение in vitro peakции между CymA и MQ-7 в присутствии NADH также приводило к восстановлению CymA [74]. Высказывалось также предположение, что связывание MQ-7 в качестве кофактора может влиять на потенциал гемов с СутА [77]. Так при использовании не очищенного, а находящегося в составе мембранной фракции клеток Shewanella sp. ANA-3 CymA, он восстанавливался редокс активным аналогом менахинола 2,3-диметокси-1,4-нафтохинолом (Е_=-75 мВ) на 25 % от степени восстановления, достигаемой с дитионитом $(E_m = -660 \text{ MB})$ [75].

^С Образование трансмембранного протонного градиента на цитоплазматической мембране, связанное с синтезом АТФ, по-видимому происходит на стадии входа электронов в пул хинонов [41, 71]. Дальнейший перенос электронов на СутА и затем на другие акцепторы электронов не связан с накоплением энергии в клетке.

Уникальная роль СутА в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в периплазме, связана со способностью переносить электроны на широкий спектр акцепторов, активируя таким образом ферментные редокс-системы, использующие разные терминальные акцепторы. Предполагается, что помимо восстановления растворимых и нерастворимых соединений металлов, СутА участвует в восстановлении О₂, DMSO, фумарата, нитрита и нитрата у

Т.В.Тихонова, В.	О.Попов
------------------	---------

бактерии S. oneidensis MR-1 [49, 67, 78–81], а также в восстановлении арсената бактериями Shewanella sp. ANA-3 [75] и S. putrefaciens [82]. Акцепторами электронов от Сута в этих процессах являются десятигемовый цитохром с MtrA и его паралог MtrF, участвующие в металлоредукции, десятигемовый цитохром с DmsE, участвующий в экстраклеточном восстановлении DMSO, фумаратредуктаза FccA [83], нитритредуктаза NrfA [42, 84].

ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ ЧЕРЕЗ ПЕРИПЛАЗМУ

В процессах экстраклеточной металлоредукции акцептором электронов от Сута является десятигемовый периплазматический белок MtrA. Клетки S. oneidensis MR-1 с делецией гена MtrA не восстанавливали цитрат железа (III), но восстанавливали другие акцепторы, такие как нитрат, нитрит и др. [85]. Рекомбинантный MtrA был получен в бактериях S. oneidensis и E. coli, выделен, очищен и охарактеризован [70]. MtrA имеет молекулярную массу 32 кДа, содержит 10 низкоспиновых бис-гистидин-координированных гемов c с редокс потенциалами в интервале $-100 \div -400$ мВ [70]. In vitro восстановленный Сута способен полностью восстанавливать MtrA, который затем окисляется растворимыми комплексами Fe(III) [86].

Пространственная структура MtrA не установлена. Однако, показано, что полипептидная цепь MtrA может быть разделена на два пятигемовых домена, каждый их которых гомологичен пятигемовому цитохрому с NrfB, который выполняет электронтранспортные функции в нитритредуктазном комплексе NrfAB [42]. Известна пространственная структура NrfB из E. coli [87]. Для NrfB характерна традиционная для мультигемовых цитохромов с [88] линейная укладка гемов, состоящая из чередующихся пар параллельно и перпендикулярно расположенных гемов. Расстояния между соседними гемами в молекуле NrfB не превышают 6 Å, что обеспечивает быстрый обмен электронами между гемами, образующими ЭТЦ. Авторы [42] предполагают, что гемы в молекуле MtrA также расположены компактно, обеспечивая эффективный перенос электронов. Этот вывод подтверждается очень низким соотношением числа аминокислотных остатков на один гем c в молекуле MtrA – 34, в среднем в мультигемовых белках это соотношение составляет 60-70 аминокислот на гем [77]. Длина 5-гемовой ЭТЦ в NrfB составляет 40 Å [87], таким образом при линейном расположении доменов длина 10-гемовой цепи у MtrA может составить около 80 Å [89].

В клетке MtrA является частью трехкомпонентного комплекса MtrCAB, который включает также трансмембранный порино-подобный белок MtrB и десятигемовый цитохром с MtrC, расположенный на внешней стороне наружной клеточной мембраны. Тройной комплекс настолько прочен, что может быть выделен и охарактеризован [90]. Предполагается, что MtrA и MtrC с разных сторон входят внутрь поры MtrB таким образом, что создается возможность прямого переноса электрона с экспонированного в растворитель гема одного белка на ближайший гем другого (рис. 1) [89]. Помимо электрон-транспортной функции MtrA участвует в стабилизации MtrB, защищая его от неспецифического протеолиза периплазматическим белком DegP [91]. Механизм защиты неизвестен, но возможно он связан со способностью MtrA образовывать с MtrB прочный двойной комплекс в растворе (периплазме). Существует также версия, что MtrA может выполнять функцию шаперона, связываясь с неструктурированной формой MtrB в периплазме и инициируя фолдинг MtrB в комплексе с MtrA [91]. Эта версия подтверждается тем, что при нарушении экспрессии MtrA MtrB не встраивался в наружную мембрану [40, 91]. MtrC двойного комплекса с MtrB не образует.

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) показано, что молекула MtrA имеет вытянутую форму с размерами 104×20×50 Å [92], что совпадает с предположением о линейной 10-гемовой электрон-транспортной цепи длиной около 80 Å [89]. Степень погружения MtrA в пору MtrB неизвестна. Анализ аминокислотной последовательности MtrB с использованием сервера PRED-ТМВВ позволил предсказать пространственную организацию MtrB [91]. Молекула MtrB имеет 28 β-тяжей, образующих трансмембранный β-баррель. Диаметр поры внутри барреля составляет 30–40 Å. β-Тяжи соединены 14 длинными и 13 короткими петлями, экспонированными в растворитель по обе стороны липидной мембраны. Длинные цепи ориентированы в периплазму и участвуют во взаимодействии MtrB с MtrA [93]. Сопоставляя поперечные размеры MtrA и диаметр поры MtrB можно предположить, что MtrA может достаточно далеко проходить в пору MtrB (рис. 1), этому может способствовать уже упоминавшийся факт, что фолдинг MtrB может происходить в комплексе с MtrA. Необходимость глубокого проникновения MtrA в пору MtrB для контакта с MtrC связана с тем, что MtrC с поперечными размерами 70×30 Å (см ниже) не может проникнуть внутрь поры MtrB, связываясь на расположенной на внешней стороне мембраны поверхности комплекса MtrAB за счет взаимодействия с короткими петлями β-барреля MtrB [93].

Толщина наружной клеточной мембраны у бактерии *S. onedensis* составляет 70–80 Å [42, 94]. Таким образом, длины MtrA (104 Å) хватает, чтобы пересечь мембрану для контакта с MtrC, но этой длины явно недостаточно для одновременного прямого контакта с СуmA – донором электронов для MtrA, поскольку средняя толщина периплазмы составляет по разным данным от 150 [94] до 235 Å [42], а длина ЭТЦ, образованной 4 гемами СуmA, около 40 Å [75]. Растворимые периплазматические белки, которые могли бы участвовать в переносе электронов между Сут и MtrA, точно не установлены. В качестве возможных кандидатов предлагались белки STC (small tetraheme cytochrome *c*) и фумаратредуктаза FccA (flavocytochrome *c*₃). Уровень экспрессии обоих белков увеличивается при росте бактерии *S. oneidensis* с нерастворимым оксидом Fe(III) [86]. Более того, MtrA и FccA – наиболее представленные цитохромы *c* в периплазме *S. oneidensis* при росте ее с Fe(III) оксидом.

Известна структура FccA из Shewanella frigidimarina (PDBID 1QJD) [95] (рис. 3). FccA представляет собой растворимый мономерный белок, состоящий из двух доменов: N-терминального, содержащего 4 гема типа с и выполняющего электрон-транспортные функции, и каталитического C-терминального, содержащего нековалентно связанный ФАД [96, 97]. Эксперименты *in vitro* подтвердили, что FccA может быстро обмениваться электронами как с MtrA [86], так и с CymA [90], и таким образом выступать переносчиком электронов между двумя белками. Показано также, что FccA может служить промежуточным хранилищем электронов в периплазме клеток S. oneidensis [86].

Для STC из S. oneidensis также установлена структура (PDB ID 1М1Р [98]), из которой следует, что укладка гемов и общий фолд гем-связывающего домена FccA и STS похожи [44]. Гемы организованы в линейную электрон-транспортную цепь, состоящую из параллельно расположенных гемов II и III и перпендикулярно ориентированных по отношению к ним гемов I и IV. Взаимная ориентация гемов и расстояния между ними обеспечивают эффективный перенос электронов по ЭТЦ [88]. Однако, получение организмов, нокаутных по генам обоих белков, не привело к снижению скорости металлоредукции и не подтвердило таким образом участия обоих белков в этом процессе [42, 86, 89]. Одно из возможных объяснений – множественность путей переноса электронов и взаимозаменяемость белков на некоторых этапах [43, 89]. Проведенный недавно анализ взаимодействия трех основных компонентов фракции периплазматических цитохромов: FccA, STS и ScyA (одногемовый цитохром c5) с CymA и MtrA методом ЯМР показал [99], что FccA взаимодействует с CymA и MtrA





Рис. 3. Пространственная организация четырех гемов *с*, образующих ЭТЦ в (А) – FccA (PDB ID 1D4C), дополнительно указана молекула ФАД, входящая в состав каталитического центра; (Б) – STC (PDB ID 1M1P).

Стрелками указаны расстояния между ионами железа гемов.

с константами диссоциации 398 и 35 µM, соответственно. STS взаимодействует с теми же белками с константами диссоциации 250 и 572 µМ. Параллельно авторы подтвердили, что и FccA и STC могут принимать электроны от восстановленных форм СутА и MtrA, обеспечивая электронный транспорт в обоих направлениях. Друг с другом FccA и STC не взаимодействуют, несмотря на высокую концентрацию в периплазме и перекрывающиеся области редокспотенциалов (-102 ÷ -238 мВ у FccA и -125 ÷ -215 мВ у STC) [97, 100]. Образование лабильных комплексов обоих белков с СутА согласуется с его широкой субстратной специфичностью. Применение метода ЯМР позволило впервые идентифицировать гемы, ответственные за перенос электронов на молекулу редокс партнера. FccA взаимодействует с CymA и с MtrA через гем 2, STC – через наиболее экспонированный гем 4. В обеих молекулах (FccA и STC) поверхность белковой глобулы в предполагаемом месте контакта с редокс-партнером имеет высокий отрицательный заряд. Таким образом, отсутствие взаимодействия между STC и FccA может объяс-

няться взаимным отталкиванием. Отсутствие пространственных структур СутА и MtrA не позволяет идентифицировать центры взаимодействия с FccA и STC. Нестабильность образующихся комплексов и взаимодействие FccA и STC с донором и акцептором электронов через один и тот же гем свидетельствуют о том, что в процессе экстраклеточного транспорта электронов не образуются стабильные мультикомпонентные электрон-транспортные белковые цепи, пересекающие периплазму [99].

ScyA окисляет CymA, но не взаимодействует с MtrA, возможным акцептором электронов для него является двухгемовая цитохром *с* пероксидаза [99, 101].

В качестве еще одного претендента на роль переносчика электронов между Сута и MtrA рассматривается пятигемовая нитритредуктаза NrfA, которая также экспрессируется в этих условиях [42]. В отличие от хорошо изученных NrfA из других организмов, для которых донорами электронов являются цитохромы NrfB или NrfH, гены которых организованы в единый кластер с геном *nrfA*, в геноме *S. oneidensis* гены этих белков отсутствуют. Было высказано предположение, что донором электронов для NrfA в процессе нитритредукции выступает гомологичный NrfH белок Сута [84]. В свою очередь было показано, что NrfA из *E. coli* может обмениваться электронами с гетерологически экспрессированным в *E. coli* MtrA [70]. Таким образом, NrfA в отсутствие нитрита может переносить электроны от Сута к MtrA.

В качестве растворимого периплазматического цитохрома *c*, переносящего электроны на MtrA, связанный с мембраной посредством образования комплекса с MtrB, может выступать также вторая молекула MtrA. В работе [86] показано, что, вопреки существовавшему ранее мнению, только часть молекул MtrA находится в мембранной фракции, около 46% от общего количества MtrA в клетке находится в периплазме.

ПОВЕРХНОСТНЫЕ МУЛЬТИГЕМОВЫЕ ЦИТОХРОМЫ С. ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ НА ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЙ АКЦЕПТОР

Ключевой стадией в процессе DBMR является стадия переноса электронов на экстраклеточный терминальный акцептор (растворимый или нерастворимый). У бактерии *S. oneidensis* этот процесс осуществляется 10-гемовыми цитохромами *с*, локализованными на внешней стороне наружной клеточной мембраны: OmcA и MtrC, а также MtrF – продуктом гена *mtrF* – паралога *mtrC*. MtrC и MtrF, входящие в состав трансмембранных электрон-транспортных комплексов

MtrCAB или MtrDEF, получают электроны от MtrA (MtrE). Затем MtrC или MtrF могут передавать электроны как непосредственно на внешний акцептор, так и на другой десятигемовый экстраклеточный цитохром OmcA [55, 102, 103]. Ключевая роль MtrC и OmcA в DBMR подтверждена несколькими массивами экспериментальных данных. Во-первых, показано, что мутанты с делецией генов *mtr*C и *omc*A характеризовались значительно сниженной скоростью восстановления нерастворимых соединений железа и марганца [104]. Двойной мутант восстанавливал ферригидрит со скоростью, составлявшей 14% от активности клеток «дикого типа» [105].

Во-вторых, показано, что индивидуальные генно-инженерные препараты MtrC и OmcA восстанавливают растворимые соединения железа со скоростями, сопоставимыми со скоростью восстановления их целыми клетками или мембранной фракцией этих клеток [102]. Помимо восстановления растворимых субстратов, MtrC и OmcA могут переносить электроны на нерастворимый субстрат – графитовый электрод и восстанавливать нерастворимые формы оксида железа, такие так гематит и гетит [82, 102, 105, 106], последние однако со значительно более низкими скоростями, что может объясняться как неоптимальной ориентацией цитохромов на поверхности минералов, так и условиями проведения экспериментов [89].

И наконец, методом атомной силовой микроскопии показано, что рекомбинантные MtrC и OmcA связываются на поверхности гематита [107] с образованием монослоев, связывание зависит от pH и ионной силы [108]. Взаимодействие OmcA с поверхностью гематита было в 2 раза более прочным, чем MtrC [107]. Связывание OmcA с поверхностью гематита было также подтверждено методами динамического светорассеяния и флуоресценции [109]. Эти данные подтверждают способность обоих цитохромов напрямую взаимодействовать с поверхностью минерала. На C-конце аминокислотных последовательностей MtrC и OmcA был обнаружен мотив Ser/Thr–Pro–Ser/Thr, который отвечает за связывание белков с поверхностью гематита (Fe₂O₃) [110], обеспечивая образование водородных связей через гидроксилы серина или треонина.

СВОЙСТВА И СТРУКТУРА МТКС И ОМСА

МtrC и OmcA имеют по 10 низкоспиновых бис-гистидин-координированных гема типа c [82, 106], образующих ЭТЦ. Для MtrC методом потенциометрического титрования в растворе и методом PFV было показано, что белок обратимо титруется между полностью окисленным и полностью восстановленным состояниями в интервале

потенциалов +100 – (-400) мВ [106]. Спектры ЭПР МtrC включают сигналы как изолированных, так и магнитно взаимодействующих гемов *c* [106]. В случае ОтсА гемы редокс-активны в интервале потенциалов –180 – (-400) мВ, кривая потенциометрического титрования описывается значениями E_m , равными –243 и –324 мВ для двух наборов приблизительно изопотенциальных гемов [82]. Широкий интервал редокс переходов гемов *c* в молекулах MtrC и ОтсА (+100 ÷ -400 мВ) подтверждает термодинамическую возможность восстановления ими большинства соединений Fe(III), включая такие низкопотенциальные минералы, как гематит (Fe₂O₃, $E_m = -230$ мВ) [89]. Определить потенциалы отдельных гемов с помощью использованных методов оказалось невозможным вследствие похожего строения гемов и перекрывания редокс потенциалов.

Методом сканирующей электронной микроскопии показано, что МtrC и OmcA различаются по способности переносить электроны, на основании чего был сделан вывод о разных физиологических функциях этих белков [111]. При выделении MtrC и OmcA соочищаются вместе, образуя комплекс состава 1:2, соответственно. Константа диссоциации для комплекса равна $0.5-1 \ \mu$ M в зависимости от ионной силы раствора. Для комплекса MtrC–(OmcA)₂ показана более высокая активность в восстановлении Fe(III)–NTA, чем для каждого из белков по отдельности, что указывает на значимость именно комплекса для электронного транспорта у *S. oneidensis* MR-1 [112].

Для MtrF – белка гомологичного MtrC (30% идентичности по аминокислотной последовательности) и OmcA была установлена пространственная структура методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 3.2 Å [105] и 2.7 Å [113], соответственно. Обе структуры очень похожи. На основании консервативности структуры экстраклеточных мультигемовых цитохромов семейства MtrC/OmcA была построена пространственная модель MtrC [114]. Согласно структурным данным, MtrF представляет собой эллипсоид с размерами 85×70×30 Å, что, как уже упоминалось, исключает возможность глубокого проникновения MtrF или его гомолога MtrC вглубь поры трансмембранного белка MtrD/MtrB.

Молекула MtrF состоит из 4 доменов (рис. 4). Домены I и III имеют структуру расщепленного β-барреля с топологией «греческий ключ» (Greek key split β-barrel), домены II и IV состоят преимущественно из α-спиралей и содержат по 5 гемов с. Домены I и II накладываются на домены III и IV с г.m.s.d. 2,8 Å, что дало основание предположить, что четырехдоменная 10-гемовая структура возникла в результате удвоения пятигемового протомера. Десять гемов в молекуле MtrF





организованы в фигуру, которую авторы [105] назвали «staggered cross», что можно перевести как смещенный или ступенчатый крест (рис. 4). Длинная ступенчатая перекладина креста включает гемы 5, 4, 3, 1, 6, 8, 9, 10 и имеет длину 65 Å. Короткая перекладина включает гемы 2, 1, 6 и 7 и имеет длину 45 Å. Обнаруженная у поверхностных мультигемовых цитохромов с крестообразная укладка гемов не имеет аналогов среди других классов мультигемовых цитохромов и по-видимому связана с уникальной функцией этих белков по транспорту электронов на нерастворимый акцептор. Укладка гемов состоит из трех структурных мотивов [118]: первый – так называемый «стекинг» (stacking), при котором плоскости гемов расположены параллельно друг другу, при этом обеспечивается максимальное перекрывание π-орбиталей гемов и максимальная скорость переноса электронов между ними [118]. Так расположены гемы 5, 4, 3 и 8, 9, 10, у которых расстояние между краями гемов не превышает 4 Å. Второй гемовый мотив, обнаруженный у поверхностных цитохромов с – Т-образный (T-shaped), при котором плоскости гемов перпендикулярны друг другу. Так расположены гемы 3 и 1 (расстояния между краями гемов 4 Å) и гемы 8 и 6 (5 Å). Третий мотив – цепочка гемов, расположенных практически в одной плоскости. Так расположены гемы 2, 1, 6, 7, расстояния между краями гемов не превышают 6 Å, что также предполагает возможность эффективного прямого переноса (туннелирования) электронов с каждого гема на соседний [115]. Прямой перенос электронов возможен также и между гемами 2-3 и 7-8, которые расположены на расстоянии 11 Å [105].

Все гемы экспонированы в растворитель, средняя площадь контакта гема с растворителем составляет 173±90 Å². Наиболее экспонированные (площадь контакта около 300 Å²) терминальные гемы 5 и 10 расположены на противоположных концах длинной перекладины крестообразной структуры и могут служить местом входа и выхода электрона в/из ЭТЦ цитохрома. Подробный анализ структуры MtrF, включавший поиск сайтов, ответственных за белок – белковые взаимодействия и анализ консервативных остатков в области возможных межбелковых интерфейсов, показал, что домены I и IV могут быть вовлечены в белок-белковые контакты, а в области гема 10 на поверхности домене IV находится кластер высококонсервативных остатков, которые могут отвечать за связывание с MtrDE. На основании полученных данных был сделан вывод, что гем 10 может служить местом входа электронов в ЭТЦ MtrF [105]. В этом случае, гем 5 является терминальным гемом, ответственным за передачу электронов на акцептор: ОтсА или соединения металлов переменной

валентности. Высокая степень экспонированности гемов создает на поверхности MtrF отрицательный заряд за счет 20 пропионатов гемовых групп. Для компенсации этого заряда с каждой молекулой MtrF связано около 18 ионов Ca²⁺.

Структура расщепленного β -барреля с топологией «греческий ключ», обнаруженная у доменов I и III, характерна для флавин-связывающих доменов. В связи с чем было сделано предположение, что домены I и III могут отвечать за связывание экстраклеточных флавинов, которые затем восстанавливаются с участием одного или двух соседних гемов. Гемы 2 и 7, расположенные на расстоянии 14 Å от центров доменов 1 и 3, могут осуществлять перенос электронов на связанные с этими доменами флавины [105]. Если это так, то ОтсА и MtrC/MtrF могут выполнять в респираторном процессе две функции – прямой перенос электронов на акцептор и циклическое восстановление низкомолекулярных медиаторов (флавины в случае *S. oneidensis* MR-1), также переносящих электроны на терминальный акцептор [89].

Как уже было замечено, структура ОтсА очень похожа на структуру MtrF. Такая же организация молекулы и структура ЭТЦ была обнаружена у еще одного экстраклеточного цитохрома c – 11-гемового UndA [116], который возможно выполняет функции, аналогичные OmcA, у бактерии *Shewanella* sp. штамм HRCR-6 [117]. Для всех трех структур характерна четырехдоменная организация с уникальной укладкой гемов в форме смещенного креста. Избыточный одиннадцатый гем UndA (гем 7) расположен в короткой перекладине крестообразной структуры, сразу за гемом 8 (гем 7 у OmcA и MtfA) и перпендикулярен ему (рис. 5). Положение и ориентация гемов 5 в трех структурах наименее консервативны, что подтверждает гипотезу о том, что именно они отвечают за взаимодействие рассматриваемых цитохромов c с акцепторами электронов разной природы [113, 116].

Несмотря на похожесть пространственных структур, каждый из экстраклеточных мультигемовых цитохромов имеет ряд особенностей, по-видимому, связанных с разными функциями белков в клетке. Основанное на структуре выравнивание аминокислотных последовательностей MtrF, UndA и OmcA обнаруживает наличие у каждого из белков вставок и делеций, которые в структуре экранируют боковые пропионаты гемов, влияя на электроотрицательность поверхности и в результате на взаимодействие цитохрома *с* с поверхностью субстрата [113]. Изменение ближайшего окружения гемов приводит также к изменению их редокс свойств, что позволяет объяснить различную электропроводность 10-гемовых цитохромов MtrC и





Рис. 5. Расположение гемов в молекуле UndA [116].

Гемы UndA показаны черным цветом, шариками показаны атомы железа. Гемы пронумерованы в порядке расположения гем-связывающих мотивов СххСН в аминокислотной последовательности. Для сравнения показано наложение гемов UndA и гемов MtrF (обозначены серым цветом). Нумерация гемов MtrF приведена в скобках.

ОтсА, отмеченную ранее [111]. Кроме того, для ОтсА показано, что он находится в кристалле в виде димера (рис. 6). Несмотря на то, что площадь интерфейса между мономерами в димере ОтсА невелика (около 500 Å²) и образующийся димер непрочен, образование димера может играть существенную роль в формировании ЭТЦ. Образование димера ОтсА приводит к возникновению контакта между терминальными гемами 5 из разных мономеров, в результате возникает 20 гемовая цепь длиной 113 Å. Возможность существования такого димера на поверхности клетки подтверждается выделением из клеток *S. oneidensis* комплекса состава MtrC-(OmcA), [112].

368



Рис. 6. Расположение гемов в димере ОтсА.

Расстояние между гемами 5 из разных мономеров – 9 Å, длина возможной электрон-транспортной цепи – 113 Å (расстояние между атомами железа гемов 10) [113].

При образовании димера ОтсА только гемы 10 остаются свободными и могут контактировать как с MtrC, принимая электроны, так и с поверхностью акцептора электронов (например, гематита). Упоминавшийся ранее мотив Thr-Pro-Ser, отвечающий за связывание с поверхностью гематита, расположен в структуре OmcA как раз между 9 и 10 гемами [113], обеспечивая близкий контакт гема 10 и ионов Fe(III) акцептора.

Следует отметить, что UndA, предположительно выполняющий в клетке те же функции, что и OmcA, существует в кристалле в виде мономера [116]. Для UndA были получены структуры комплексов с растворимыми субстратами – цитратом железа (III) и Fe–NTA методом вымачивания кристаллов свободной формы UndA в растворе лиганда [116]. В обоих случаях молекулы акцепторов связывались около экспонированного в растворитель гема 7. Расстояние между порфириновым кольцом гема 7 и ионами Fe(III) в образовавшихся комплексах не превышало 8.5 Å, что предполагает возможность прямого переноса электрона с гема на акцептор. Учитывая доступность гема из растворителя (площаль экспонированной в растворитель поверхности гема составляет 123 Å²), можно предположить, что взаимодействие является неспецифическим [116].

Попытки получения кристаллов бинарных комплексов UndA и MtrF с растворимыми переносчиками электронов, такими как

ФМН и рибофлавин, методами вымачивания и сокристаллизации не привели к получению комплексов [105, 116]. При этом UndA, MtrF и MtrC восстанавливают флавины со скоростями, сопоставимыми или превышающими скорости восстановления растворимых соединений Fe(III) [102, 105, 116], а насыщение MtrF ФМН достигалось уже при 10 µM концентрации последнего [105].

ЭНЕРГЕТИКА ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В МОЛЕКУЛЕ MTRF

Для описания переноса электронов по гем-содержащей электронтранспортной цепи ОМС методами молекулярной динамики были рассчитаны редокс потенциалы отдельных гемов MtrF (рис. 4Б) [118–120]. Интервал расчетных редокс потенциалов гемов MtrF составляет 350 мВ (70 ÷ -280 мВ), что коррелирует с данными потенциометрического титрования MtrF в растворе $(0 \div -260 \text{ MB})$ [105]. Разность потенциалов гемов 10 и 5 (сайты входа и выхода электрона) не превышает 50 мВ, что указывает на возможность электронного транспорта в обоих направлениях. Самыми низкопотенциальными оказались гемы 4 и 9, потенциалы которых равны -270 мВ и -280 мВ [120]. Существенный вклад в снижение потенциала этих гемов вносят нескомпенсированные отрицательные заряды расположенных рядом пропионатов соседних гемов 3 и 8 [118]. Для понимания роли низкопотенциальных гемов и оценки влияния их на общую скорость электронного транспорта был построен энергетический профиль переноса электрона по 10-тигемовой электрон-транспортной цепи MtrF [118–120]. Характерной особенностью энергетического профиля основной ЭТЦ $(10 \rightarrow 9 \rightarrow 8 \rightarrow 6 \rightarrow 1 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5)$ является наличие двух симметрично расположенных максимумов - термодинамических барьеров высотой около 0,2 eB, локализованных на низкопотенциальных гемах 4 и 9. Перенос электронов в этом случае включает две стадии, сопровождающиеся повышением свободной энергии системы (uphill steps $10 \rightarrow 9$ и $3 \rightarrow 4$), что должно приводить к существенному снижению скорости электронного транспорта. Проведенный в работе [118] анализ скоростей переноса электронов между соседними гемами показал, что низкопотенциальные гемы 4 и 9 расположены в стекинг-укладках, обеспечивающих максимальную скорость переноса электронов. Присутствие низкопотенциальных гемов в этих укладках приводит к снижению скорости электронного транспорта, в результате которого она приближается к скорости переноса электронов по другим элементам ЭТЦ. В результате максимальная скорость переноса электронов по основной электрон-транспорт-

ной цепи $10 \rightarrow 9 \rightarrow 8 \rightarrow 6 \rightarrow 1 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5$ приближается к $10^4 - 10^5 \text{ c}^{-1}$, что превышает максимальную измеренную скорость переноса электронов комплексом MtrCBA на нерастворимый акцептор – 8500 с⁻¹ [93]. Таким образом, скорость-лимитирующей стадией является последняя стадия экстраклеточного электронного транспорта – перенос электронов на акцептор, снижение скорости переноса электронов за счет uphill стадий не влияет общую скорость процесса.

С другой стороны, присутствие в основной ЭТЦ МtrF гемов 4 и 9 с потенциалами –270–280 мВ создает возможность восстановления на этих центрах низкопотенциальных акцепторов, например, флавинов (E_m около –200 мВ) [19]. Возможность такого процесса подверждается высокой доступностью гемов 4 и 9 из растворителя (226 Å² для гема 4 и 231 Å² для гема 9 [116]).

Расположенные рядом с потенциальными флавин-связывающими доменами I и III гемы 2 (E = -60 мВ) и особенно 7 (E = 70 мВ) [120], оказались слишком высокопотенциальными для участия в восстановлении флавинов, как это предполагалось в [105]. Однако, в работе [121] было показано, что связывание ФМН с MtrC приводит к положительному сдвигу на 100 мВ потенциала одноэлектронного восстановления ФМН до семихинона, делая восстановление ФМН на гемах 2 и 7 термодинамически более вероятным.

Таким образом, разветвленная электрон-транспортная цепь, присутствие в ней низкопотенциальных гемов является структурным базисом полифункциональности белков семейства MtrC/OmcA, которая ранее была показана в биохимических экспериментах.

Установление пространственных структур ОМС позволило также оценить возможную протяженность экстраклеточной части электронтранспортной цепи, включающей белок MtrC (65 Å) и связанный с ним через гемы 10 димер OmcA (113 Å). Длина такой электрон-транспортной цепи может составить до 200 Å.

IV. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ МЕХАНИЗМА ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА, ПОКАЗАННОГО ДЛЯ БАКТЕРИИ S. ONEIDENSIS

Анализ полных геномов 19 видов бактерий рода Shewanella дал возможность проанализировать генные кластеры, отвечающие за металлоредукцию у бактерий этого рода [117, 122]. Было показано, что: 1) кластер генов mtrCAB—omcA присутствует во всех опубликованных геномах рода Shewanella; 2) у некоторых видов, таких как S. putrefaciens и S. baltica, ген omcA заменен на undA в составе кластера mtrCAB—undA; 3) генный кластер mtrCAB—omcA—mtrDEFприсутствует только у близкородственных штаммов S. oneidensis; 4) у некоторых бактерий (S. halifaxensis) кластер включает гены 9 белков: mtrD—mtrF—mtrE— omcA—undA—omcA—mtrC—mtrB—mtrA.

Помимо бактерий рода Shewanella, mtrCAB гомологи были обнаружены в геномах Fe(III)-окисляющих бактерий Aeromonas hydrophila, Ferrimonas balearica и Rhodoferax ferrireducens [122]. Как и в случае бактерий Shewanella, гены mtrCAB в этих организмах объединены в общий кластер, в котором расположены в той же последовательности mtrC-mtrA-mtrB. У бактерии A. hydrophila кластер включает только гены mtrCAB, гены omcA или undA и их гомологов отсутствуют, что указывает на то, что белки, кодируемые этими генами необязательны для DBMR. У бактерий F. balearica и R. ferrireducens в один генный кластер с mtrCAB входят две копии гена cymA – первичного акцептора электронов от пула восстановленных хинонов. У S. oneidensis cymA не входит в mtr-кластер.

Кластер *mtrCAB* был обнаружен также у 6 морских бактерий рода *Vibrio*, для которых ранее не была показана металлоредукция. Авторы [122] предполагают, что присутствие *mtrCAB* указывает на то, что эти бактерии могут использовать Fe(III) в дыхательном процессе в отсутствие других акцепторов.

Гены *mtrCAB* были также идентифицированы в геномах Fe(II)окисляющих бактерий *Rhodopseudomonas palustris* и *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1, которые используют FeCO₃ или FeS в качестве доноров электронов, что указывает на обратимость электронного транспорта, проводимого комплексом MtrCAB [89, 122].

Несмотря на то, что для бактерий рода *Geobacter* обсуждается отличный от *Shewanella* механизм экстраклеточного электронного транспорта [15, 16], гомологи кластера генов *mtrAB* обнаружены в геномах *Geobacter* [40, 123]. Однако в работе [122] отмечается, что у бактерии *Geobacter* sp. M21, которая содержит гены, гомологич-

ные mtrAB, в этом в кластере отсутствует ген mtrC, что не позволяет однозначно связать белки – продукты этого кластера с металлоредукцией.

Таким образом, генный кластер *mtrCAB* широко распространен у бактерий, осуществляющих респираторную металлоредукцию, отвечая за обратимый обмен электронами между бактериальной клеткой и экстраклеточным акцептором/донором электронов. Однако, этот путь по-видимому не является универсальным, и возможны другие механизмы экстраклеточного электронного транспорта.

Часть этого кластера, а именно гены, гомологичные *mtrAB*, имеют еще более широкое распространение в геномах грам-отрицательных микроорганизмов. Кодируемый ими комплекс белков MtrAB, представляющий собой трансмембранный белок – порин MtrB с вставленным в него растворимым периплазматическим электрон-проводящим белком MtrA, рассматривается как прототип универсального белкового модуля для переноса электронов через бактериальную клеточную мембрану [40, 89]. Этот перенос может быть не связан напрямую с металлоредукцией, электроны с внешней стороны наружной клеточной мембраны могут переноситься при участии специфических редуктаз на другие экстраклеточные акцепторы. Так было показано, что экстраклеточное восстановление DMSO у бактерий *Shewanella* обеспечивается электрон-транспортным модулем DmsEF, гомологичным MtrAB [124].

Гомологи комплекса MtrAB обнаружены в геномах бактерий *Geobacter* [123], где они возможно участвуют в переносе электронов на пили.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстраклеточный электронный транспорт является ключевой стадией в процессе диссимиляторной бактериальной металлоредукции. Наиболее исследован этот процесс для бактерии *S. oneidensis* MR-1. Решающую роль в этом процессе у *S. oneidensis* играют мультигемовые цитохромы *c*. Можно выделить три основных этапа экстраклеточного электронного транспорта: 1) окисление восстановленных хинонов в цитоплазматической мембране и перенос электронов в периплазму; 2) перенос электронов из периплазмы через внешнюю клеточную мембрану на поверхностные цитохромы c; 3) перенос электронов с поверхности бактериальной клетки на экстраклеточный акцептор. Первый этап осуществляется при участии универсальной хинолдегидрогеназы СутА и ряда неспецифических периплазма-

тических цитохромов с. Второй этап осуществляется при участии трансмембранного комплекса MtrCAB, включающего периплазматический десятигемовый цитохром с MtrA, вставленный в пориноподобный трансмембранный белок MtrB с образованием модуля MtrAB, который осуществляет перенос электронов через клеточную мембрану на поверхностный цитохром с MtrC. Структура комплекса MtrAB и входящих в него белков не установлена. Распространенность белков, гомологичных MtrA и MtrB, в геномах бактерий, осуществляющих экстраклеточный транспорт электронов на разные экстраклеточные акцепторы, в том числе отличные от оксидов металлов, позволяет рассматривать этот комплекс как прототип универсального модуля для переноса электронов через клеточную мембрану. Поверхностный десятигемовый цитохром с MtrC, принимая электроны от MtrAB, выполняет ключевую роль в переносе электронов на экстраклеточный акцептор. В геноме S. oneidensis присутствует как минимум еще один набор генов, паралогичных mtrCAB, mtrDEF. MtrC/MtrF могут переносить электроны как непосредственно на терминальный акцептор, так и на другой десятигемовый цитохром с -OmcA или его аналог – 11-гемовый цитохром с UndA. Установление структуры трех поверхностных мультигемовых гемовых цитохромов с из бактерий рода Shewanella стало ключевым моментом в понимании механизма экстраклеточного электронного транспорта. MtrF, UndA и OmcA имеют похожую пространственную структуру, состоящую из четырех доменов. Два домена имеют строение, характерное для флавин-связывающих центров, на двух других расположены 10(11) гемов, организованных в уникальную крестообразную укладку, не имеющую аналогов у других мультигемовых цитохромов с. Уникальная структура образованной из гемов разветвленной ЭТЦ обеспечивает возможность одновременного участия S. oneidensis OMC в нескольких процессах, включая перенос электронов от наружной клеточной мембраны на нерастворимый акцептор по основной цепи и восстановление растворимых переносчиков, таких как флавины, с участием гемов дополнительной цепи, расположенных рядом с флавин-связывающими доменами.

Анализ геномов грам-отрицательных бактерий показал, что белки, гомологичные MtrC, MtrA и MtrB, широко представлены как у бактерий рода *Shewanella*, так и у других грам-отрицательных бактерий, осуществляющих DBMR. Это указывает на то, что механизм экстраклеточного электронного транспорта, сформулированный для бактерии *S. oneidensis*, широко распространен. Но возможны и альтернативные механизмы, один из них, по-видимому, реализуется у

бактерий рода *Geobacter*. Расширение круга исследуемых организмов, включение в их число архей и грам-положительных бактерий, использующих диссимиляторную металлоредукцию, позволит получить более глубокие знания о механизмах бактериальной диссимиляторной металлоредукции.

Авторы выражают благодарность сотруднику лаборатории инженерной энзимологии ИНБИ РАН Е.М. Осипову за помощь в оформлении рисунков.

ЛИТЕРАТУРА

- Balashova, V.V., Zavarzin, G.A. (1980) Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria, *Microbiology*, 48, 635–639.
- 2. Lovley, D.R., Phillips, E.J. (1987) Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2636–2641.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1472–1480.
- Gralnick, J.A., Newman, D.K. (2007) Extracellular respiration, *Molecular Microbiology*, 65, 1–11.
- Chiorse, W.C. (1984) Biology of iron-depositing and manganese-depositing bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 38, 515–550.
- 6. Myers, C.R., Nealson, K.H. (1988) Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor, *Science*, **240**,1319–1321.
- Lovley, D.R. (1991) Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction, *Microbiological Reviews*, 55, 259–287.
- Lovley, D.R. (1993) Dissimilatory metalloreduction, *Annual Review of Microbiology*, 47, 263–290.

- Nealson, K.H., Saffarini, D. (1994) Iron and manganese in anaerobic respiration – environmental significance, physiology, and regulation, *Annual Review of Microbiology*, 48, 311–343.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D. (2006) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction, *Nature Reviews Microbiology*, 4, 752–764.
- Richardson, D.J., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M. (2012) Electron transport at the microbe-mineral interface: a synthesis of current research challenges, *Biochemical Society Transactions*, 40, 1163–1166.
- Thamdrup, B., Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2000) Microbial manganese and sulfate reduction in Black Sea shelf sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2888–2897.
- 13. Walker, J.C. (1987) Was the Archaean biosphere upside down? *Nature*, **329**, 710–712.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., Nevin, K.P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction, *Advances in Microbial Physiology*, 49, 219–286.
- Lovley, D.R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N.S., Shrestha, P.M., Flanagan, K.A., Aklujkar, M., Butler, J.E., Giloteaux, L., Rotaru, A.E., Holmes, D.E., Franks, A.E., Orellana, R., Risso, C., Nevin, K.P. (2011)

Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications, *Advances in Microbial Physiology*, **59**, 1–100.

- Lovley, D.R. (2012) Electromicrobiology, Annual Review of Microbiology, 66, 391–409.
- Logan, B.E. (2009) Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells, *Nature Reviews Microbiology*, 7, 375–381.
- Logan, B.E., Regan, J.M. (2006) Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells, *Trends* in *Microbiology*, 14, 512–518.
- Logan, B.E., Regan, J.M. (2006) Microbial fuel cells – challenges and applications, *Environmental Science* and Technology, 40, 5172–5180.
- Malvankar, N.S., Lovley, D.R. (2014) Microbial nanowires for bioenergy applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 88–95.
- Williams, K.H., Bargar, J.R., Lloyd, J.R., Lovley, D.R. (2013) Bioremediation of uranium-contaminated groundwater: a systems approach to subsurface biogeochemistry, *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 489–497.
- Cutting, R.S., Coker, V.S, Telling, N.D., Kimber, R.L., Pearce, C.I., Ellis, B.L., Lawson, R.S., van der Laan, G., Pattrick, R.A., Vaughan, D.J., Arenholz, E., Lloyd, J.R. (2010) Optimizing Cr(VI) and Tc(VII) remediation through nanoscale biomineral engineering, *Environmental Science and Technology*, 44, 2577–2584.
- Jiao, Y., Qian, F., Li, Y., Wang, G., Saltikov, C.W., Gralnick, J.A. (2011) Deciphering the electron transport pathway for graphene oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1, *Journal of Bacteriology*, **193**, 3662–3665.
- 24. Fredrickson, J.K., Kostandarithes, H.M., Li, S.W., Plymale, A.E., Daly,

M.J. (2000) Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2006–2011.

- Слободкин А.И. (2005) Термофильная микробная металлоредукция, Микробиология, 74, 581–595.
- Wrighton, K.C., Agbo, P., Warnecke, F., Weber, K.A., Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Andersen, G.L., Coates, J.D. (2008) A novel ecological role of the Firmicutes identified in thermophilic microbial fuel cells, *The ISME Journal*, 2, 1146–1156.
- 27. Iavarone, A.T., Gorur, A., Yeo, B.S., Tran, R., Melnyk, R.A., Mathies, R.A., Auer, M., Coates, J.D., Carlson, H.K. (2012) Surface multiheme c-type cytochromes from Thermincola potens and implications for respiratory metalreduction by Gram-positive bacteria, *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 1702–1707.
- Ibrahim, A.S., El-Tayeb, M.A., Elbadawi, Y.B., Al-Salamah, A.A., Antranikian, G. (2012) Hexavalent chromate reduction by alkaliphilic Amphibacillus sp. KSUCr3 is mediated by copper-dependent membraneassociated Cr(VI) reductase, *Extremophiles*, 16, 659–668.
- 29. Gavrilov, S.N., Lloyd, J.R., Kostrikina, N.A., Slobodkin A.I. (2012) Fe(III) Oxide Reduction by a Grampositive Thermophile: Physiological Mechanisms for Dissimilatory Reduction of Poorly Crystalline Fe(III) Oxide by a Thermophilic Grampositive Bacterium Carboxydothermus ferrireducens, Geomicrobiology Journal, 29, 804–819.
- Nevin, K.P., Lovley, D.R. (2002) Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatoryFe(III) reduction by *Geothrix*

fermentans, Applied and Environmental Microbiology, **68**, 2294–2299.

- Myers, J.M. Myers, C.R. (2001) Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 260–269.
- Beliaev, A.S., Saffarini, D.A. (1998) Shewanella putrefaciens mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. Journal of Bacteriology, 180, 6292–6297.
- 33. Yang, Y., Chen, J., Qiu, D., Zhou, J.(2013) Roles of UndA and MtrC of Shewanella putrefaciens W3-18-1 in iron reduction, *BMC Microbiology*, **13**, 267. doi: 10.1186/1471-2180-13-267.
- Smith, J.A., Lovley, D.R., Tremblay, P.L. (2013) Outer cell surface components essential for Fe(III) oxide reduction by *Geobacter metallireducens*, *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 901–907.
- 35. Nissen, S., Liu, X., Chourey, K., Hettich, R.L., Wagner, D.D., Pfiffner, S.M., Loffler F.E. (2012) Comparative c-type cytochrome expression analysis in Shewanella oneidensis strain MR-1 and Anaeromyxobacter dehalogenans strain 2CP-C grown with soluble and insoluble oxidized metal electron acceptors, Biochemical Society Transactions, 40, 1204–1210.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M. (2008) Electron transfer at the microbe–mineral interface: a grand challenge in biogeochemistry, *Geobiology*, 6, 245–253.
- Richter, K., Schicklberger, M., Gescher, J. (2012) Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 913–921.

- Coursolle, D., Gralnick, J.A. (2012) Reconstruction of Extracellular Respiratory Pathways for Iron(III) Reduction in *Shewanella oneidensis* Strain MR-1, *Frontiers in Microbiology*, **3**, 56. doi: 10.3389/ fmicb.2012.00056
- 39. Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K. (2007) Respiration of metal (hydr)oxides by Shewanella and Geobacter: a key role for multihaem c-type cytochromes, *Molecular Microbiology*, 65, 12–20.
- 40. Hartshorne, R.S., Reardon, C.L., Ross, D., Nuester, J., Clarke T.A., Gates, A.J., Mills, P.C., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Shi, L., Beliaev, A,S., Marshall, M.J., Tien, M., Brantley, S., Butt, J.N., Richardson, D.J. (2009) Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment, *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America, **106**, 22169–22174.
- Richardson, D.J, Edwards, M.J., White, G.F., Baiden, N., Hartshorne, R.S., Fredrickson, J., Shi, L., Zachara, J., Gates, A.J., Butt, J.N., Clarke, T.A. (2012) Exploring the biochemistry at the extracellular redox frontier of bacterial mineral Fe(III) respiration, *Biochemical Society Transactions*, 40, 493–500.
- 42. Shi, L.,Rosso, K.M.,Clarke, T.A., Richardson, D.J., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K. (2012) Molecular Underpinnings of Fe(III) Oxide Reduction by Shewanella oneidensis MR-1. *Frontiers in Microbiology*, 3, 50. doi: 10.3389/fmicb.2012.00050.
- Coursolle, D., Gralnick, J.A. (2010) Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1, *Molecular Microbiology*, 77, 995–1008.
- 44. Paquete, C.M., Louro, R. O. (2010) Molecular details of multielectron transfer: the case of multiheme cy-

tochromes from metal respiring organisms, *Dalton Transactions*, **39**, 4259–4266.

- 45. Moser, C.C., Chobot, S.E., Page, C.C., Dutton P.L. (2008) Distance metrics for heme protein electron tunneling, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**, 1032–1037.
- Childers, S.E., Ciufo, S., Lovley. D.R. (2002) Geobacter metallireducens accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis, *Nature*, **416**,767–769.
- Harris, H.W., El-Naggar, M.Y., Bretschger, O., Ward, M.J., Romine, M.F., Obraztsova, A,Y., Nealson, K.H. (2010) Electrokinesis is a microbial behavior that requires extracellular electron transport, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 326–331.
- 48. Harris, H.W., El-Naggar, M.Y., Nealson, K.H. (2012) Shewanella oneidensis MR-1 chemotaxis proteins and electron-transport chain components essential for congregation near insoluble electron acceptors, *Biochemical Society Transactions*, 40, 1167–1177.
- 49. Lies, D.P., Hernandez, M.E., Kappler, A., Mielke, R.E., Gralnick, J.A., Newman, D.K. (2005). Shewanella oneidensisMR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms, Applied and Environmental Microbiology, 71, 4414–4426.
- Newman, D.K., Kolter, R. 2000. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer, *Nature*, 405, 93–97.
- von Canstein, H, Ogawa, J, Shimizu, S, Lloyd, J.R. 2008. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 615–23.

- 52. Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., Bond, D.R. (2008) Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 3968–3973.
- Kotloski, N.J., Gralnick, J.A. (2013) Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis, mBio* 4(1):e00553-12. doi:10.1128/mBio. 00553-12.
- Coursolle, D., Baron, D.B., Bond, D.R., Gralnick, J.A. (2010) The Mtr respiratory pathway is essential for reducing flavins and electrodes in *Shewanella oneidensis, Journal of Bacteriology*, **192**, 467–474.
- 55. Ross, D.E., Brantley, S.L., Tien, M. (2009) Kinetic characterization of OmcA and MtrC, terminal reductases involved in respiratory electron transfer for dissimilatory iron reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1, *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 5218–5226.
- 56. Wu, C., Cheng, Y.Y., Li, B.B., Li, W.W., Li, D.B., Yu, H.Q. (2013) Electron acceptor dependence of electron shuttle secretion and extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1, *Bioresource Technology*, **136**, 711–714.
- 57. Malvankar, N., Vargas, M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Tuominen, M.T., Lovley, D.R. (2011) Tunable metallic-like conductivity in nanostructured biofilms comprised of microbial nanowires, *Nature Nanotechnology*, **6**, 573–579.
- Lovley, D. R. (2012) Long-range electron transport to Fe(III) oxide via pili with metallic-like conductivity, *Biochemical Society Transactions*, 40, 1186 – 1190.

- Malvankar, N.S., Lovley, D.R. (2012) Microbial Nanowires: A New Paradigm for BiologicalElectron Transfer and Bioelectronics, *ChemSusChem*, 5, 1039–1046.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature*, 435, 1098–1101.
- Lovley, D.R. (2008) Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more, *Geobiology*, 6, 225–231.
- Leang, C., Qian, X., Mester, T., Lovley, D.R. (2010) Alignment of the *c*-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4080–4084.
- Lovley, D.R. (2011) Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, *Energy and Environmental Science*, 4, 4896–4906.
- Esteve-Nunez, A., Sosnik, J., Visconti, P., Lovley, D.R. (2008) Fluorescent properties of *c*-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens, Environmental Microbiology*, **10**, 497–505.
- 65. Mitchell, A.C., Peterson, L., Reardon, C.L., Reed, S.B., Culley, D.E., Romine, M.R., Geesey, G.G. (2012) Role of outer membrane c-type cytochromes MtrC and OmcA in *Shewanella oneidensis* MR-1 cell production, accumulation, and detachment during respiration on hematite, *Geobiology*, **10**, 355–370.
- 66. Meyer, T.E., Tsapin, A.I., Vandenberghe, I., de Smet, L., Frishman, D., Nealson, K.H., Cusanovich, M.A., van Beeumen, J.J. (2004) Identification of 42 possible cytochrome *c* genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes, *Omics*, **8**, 57–77

- 67. Myers, C.R., Myers, J.M. (1997) Cloning and sequence of cymA, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* requiredfor reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1, *Journal of Bacteriology*, **179**, 1143–1152.
- Myers, C.R., Myers, J.M. (2002) MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcBinto the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5585–5594.
- Beliaev, A.S., Saffarini, D.A., McLaughlin, J.L., Hunnicutt, D. (2001) MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in Shewanella putrefaciens MR-1, Molecular Microbiology, 39, 722–730.
- 70. Pitts, K.E., Dobbin, P.S., Reyes-Ramirez, F., Thomson, A.J., Richardson, D.J., Seward, H.E. (2003) Characterization of the Shewanella oneidensis MR-1 decaheme cytochrome MtrA: expression in Escherichia coli confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates, Journal of Biological Chemistry, 278, 27758–27765.
- Marritt, S.J., McMillan, D.G.G., Shi, L., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Richardson, D.J., Jeuken, L.J.C., Butt, J.N. (2012) The roles of CymA in support of the respiratory flexibility of Shewanella oneidensisMR-1, Biochemical Society Transactions, 40, 1217–1221.
- 72. Marritt, S.J., Lowe, T.G., Bye, J., McMillan, D.G.G., Shi, L., Fredrickson, J., Zachara, J., Richardson, D.J., Cheesman, M.R., Jeuken, L.J.C., Butt, J.N. (2012) A functional description of CymA, an electrontransfer hub supporting anaerobic respiratory flexibility in *Shewanella*, *Biochemical Journal*, 444, 465–474.
- 73. Louro, R.O., Paquete, C.M. (2012) The quest to achieve the detailed

structural and functional characterization of CymA, *Biochemical Society Transactions*, **40**, 1291–1294.

- McMillan, D.G.G., Marritt, S.J., Butt, J.N., Jeuken, L.J.C. (2012) Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinoldehydrogenase CymA, *Journal of Biological Chemistry*, 287, 14215–14225.
- Zargar, K., Saltikov, C.W. (2009) Lysine-91 of the tetraheme c-type cytochrome CymA is essential for quinone interaction and arsenate respiration in *Shewanella* sp. strain ANA-3, *Archives of Microbiology*, 191, 797–806.
- Rodrigues, M. L., Scott, K. A., Sansom, M. S. P., Pereira, I. A. C., Archer, M. (2008) Quinol Oxidation by c-Type Cytochromes: Structural Characterization of the Menaquinol Binding Site of NrfHA, *Journal of Molecular Biology*, **381**, 341–350.
- Bewley, K.D., Ellis, K.E., Firer-Sherwood, M.A., Elliott, S.J. (2013) Multi-heme proteins: nature's electronic multi-purpose tool, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1827**, 938–948.
- Myers, J.M., Myers, C.R. (2000) Role of the tetraheme cytochromeCymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens*MR-1 with normal levels of menaquinone, *Journal of Bacteriology*, 182, 67–75.
- Schwalb, C., Chapman, S.K. Reid, G.A. (2003) The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*, *Biochemistry*, 42, 9491–9497.
- Gao, H.C., Yang, Z.K., Barua, S., Reed, S.B., Romine, M.F., Nealson, K.H., Fredrickson, J.K., Tiedje, J.M., Zhou, J.Z. (2009) 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*, 3, 966–976.

- Gao, H., Barua, S., Liang, Y., Wu L., Dong, Y., Reed., S, Chen, J., Culley., D, Kennedy, D., Yang, Y., He, Z., Nealson, K.H., Fredrickson, J.K., Tiedje, J.M., Romine, M., Zhou, J. (2010) Impacts of Shewanella oneidensis c-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration, Microbial Biotechnology, 3, 455–66.
- 82. Field, S.J., Dobbin, P.S., Cheesman, M.R., Watmough, N.J., Thomson, A.J., and Richardson, D.J. (2000) Purification and magneto-optical spectroscopic characterization of cytoplasmic membrane and outer membrane multiheme c-type cytochromes from Shewanella frigidimarina NCIMB400, Journal of Biological Chemistry, 275, 8515–8522.
- Schwalb, C., Chapman, S.K., Reid, G.A. (2002) The membrane-bound tetrahaem c-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*, *Biochemical Society Transactions*, **30**, 658–662.
- 84. Youngblut, M., Judd, E.T., Srajer, V., Sayyed, B., Goelzer, T., Elliott, S.J., Schmidt, M., Pacheco, A.A. (2012) Laue crystal structure of *Shewanella oneidensis* cytochrome c nitrite reductase from a high-yield expression system, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17, 647–662.
- 85. 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. (2007) Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants, *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 7003–7012.
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A.M., Gescher, J. (2009) Periplasmic electron trans-

fer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1, *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 7789–7796.

- Clarke, T.A., Cole, J.A., Richardson, D.J., Hemmings, A.M. (2007). The crystal structure of the pentahaem *c*-type cytochrome NrfB and characterization of its solution-state interaction with the pentahaem nitrite reductase NrfA, *Biochemical Journal*, **406**, 19–30.
- Mowat, C.G., Chapman, S.K. (2005) Multi-heme cytochromes-new structures, new chemistry, *Dalton Transactions*, 21, 3381–3389.
- Richardson, D.J., Butt, J.N, Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Shi, L., Edwards, M.J., White, G., Baiden, N., Gates, A.J., Marritt, S.J., Clarke, T.A. (2012) The 'porin–cytochrome' model for microbe-to-mineral electron transfer, *Molecular Microbiology*, 85, 201–212.
- 90. Ross, D.E., Ruebush, S.S., Brantley, S. L., Hartshorne, R.S., Clarke, T.A., Richardson, D.J., Tien, M. (2007). Characterization of protein– protein interactions involved in iron reduction by Shewanella oneidensis MR-1, Applied and Environmental Microbiology, 73, 5797–5808.
- 91. Schicklberger, M., Bucking, C., Schuetz, B., Heide, H., Gescher, J. (2011) Involvement of the *Shewa-nella oneidensis* Decaheme Cytochrome MtrA in the Periplasmic Stability of the β-Barrel Protein MtrB, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1520–1523.
- Firer-Sherwood, M.A., Ando, N., Drennan, C.L., Elliott, S.J. (2011) Solution-based structural analysis of the decaheme cytochrome, MtrA, by small-angle X-ray scattering and analytical ultracentrifugation, *Journal of Physical Chemistry* B, 115, 1208–1214.
- 93. White, G.F., Shi, Z., Shi, L., Wang, Z., Dohnalkova, A.C., Marshall,

M.J., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Butt, J.N., Richardson, D.J., Clarke, T.A. (2013) Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe(III) minerals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 6346–6351.

- Gralnick, J.A. (2012) On conducting electron traffic across the periplasm, *Biochemical Society Transactions*, 40, 1178–1180.
- 95. Taylor, P., Pealing, S.L., Reid, G.A., Chapman, S.K., Walkinshaw, M.D. (1999) Structural and mechanistic mapping of a unique fumarate reductase, *Nature Structural Biology*, 6, 1108–1112.
- 96. Leys, D., Tsapin, A.S., Nealson, K.H., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., Van Beeumen, J.J. (1999) Structure and mechanism of the flavocytochrome *c* fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR-1, *Nature Structural Biology*, 6, 1113–1117.
- 97. Pessanha, M., Rothery, E.L., Miles, C.S., Reid, G.A., Chapman, S.K., Louro, R.O., Turner, D.L., Salgueiro, C.A., Xavier, A.V. (2009) Tuning of functional heme reduction potentials in *Shewanella* fumarate reductases, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1787**, 113–120.
- 98. Leys, D., Meyer, T.E., Tsapin, A.I., Nealson, K.H., Cusanovich, M.A., Van Beeumen, J.J. (2002) Crystal structures at atomic resolution reveal the novel concept of «electron-harvesting» as a role for the small tetraheme cytochrome c, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 35703–35711.
- 99. Fonseca, B.M., Paquete, C.M., Neto, S.E., Pacheco, I., Soares, C.M., Louro R.O. (2013) Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1, *Biochemical Journal*, 449, 101–108.

- 100. Firer-Sherwood, M., Pulcu, G.S., Elliott, S.J. (2008) Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella* : opening a potential window, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13, 849–854.
- 101. Schutz, B., Seidel, J., Sturm, G., Einsle, O., Gescher, J. (2011) Investigation of the electron transport chain to and the catalytic activity of the diheme cytochrome c peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 6172–6180.
- 102. 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., et al. (2006) Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: Two outer membrane decaheme c-type cytochromes of Shewanella oneidensis MR-1, *Journal of Bacteriology*, **188**, 4705–4714.
- 103. Bücking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S., Gescher, J. (2010) Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors, *FEMS Microbiology Letters*, **306**, 144–151.
- 104. Myers, J.M., Myers, C.R. (2001) Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 260–269.
- 105. 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. (2011) Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit, *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, **108**, 9384–9389.

- 106. Hartshorne, R.S., Jepson, B.N., Clarke, T.A., Field, S.J., Fredrickson, J., Zachara, J., Shi, L., Butt, J.N. Richardson, D.J. (2007) Characterization of *Shewanella oneidensis* MtrC: a cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron transport to extracellular electron acceptors, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **12**, 1083–1094.
- 107. Lower, B.H., Shi, L., Yongsunthon, R., Droubay, T.C., McCready, D.E., Lower, S.K. (2007) Specific bonds between an iron oxide surface and outer membrane cytochromes MtrC and OmcA from Shewanella oneidensis MR-1, *Journal of Bacteriology*, **189**, 4944–4952.
- 108. Eggleston, C.M., Voros, J., Shi, L., Lower, B.H., Droubay, T.C., Colberg, P.J.S. (2008) Binding and direct electrochemistry of OmcA, an outer-membrane cytochrome from an iron reducing bacterium, with oxide electrodes: a candidate biofuel cell system, *Inorganica Chimica Acta*, **361**, 769–777.
- 109. Xiong, Y., Shi, L., Chen, B., Mayer, M.U., Lower, B.H., Londer, Y., Bose, S., Hochella, M.F., Fredrickson, J.K., Squier, T.C. (2006) High-affinity binding and direct electron transfer to solid metals by the Shewanella oneidensis MR-1 outer membrane c-type cytochrome OmcA, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 13978–13979.
- 110. Lower, B.H., Lins, R.D., Oestreicher, Z., Straatsma, T.P., Hochella, M.F., Jr, Shi, L., Lower, S.K. (2008) In vitro evolution of a peptide with a hematite binding motif that may constitute a natural metal-oxide binding archetype, *Environmental Science and Technology*, **42**, 3821–3827.

- Wigginton, N.S., Rosso, K.M., Hochella, M.F. (2007) Mechanisms of electron transfer in two decaheme cytochromes from a metal-reducing bacterium, *Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 12857–12864.
- 112. Shi, L., Chen, B.W., Wang, Z.M., Elias, D.A., Mayer, M.U., Gorby, Y.A., Ni, S., Lower, B.H., Kennedy, D.W., Wunschel, D.S., et al. (2006) Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: two outer membrane decaheme *c*-type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1, *Journal of Bacteriology*, **188**, 4705–4714.
- 113. Edwards, M.J., Baiden, N.A., Johs, A., Tomanicek, S.J., Liang, L., Shi, L., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Gates, A.J., Butt, J.N., Richardson, D.J., Clarke, T.A. (2014) The X-ray crystal structure of *Shewanella oneidensis* OmcA reveals new insight at the microbemineral interface, *FEBS Letters*, **588**, 1886–1890.
- 114. Edwards, M.J., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Richardson, D.J., Clarke, T.A. (2012) Analysis of structural MtrC models based on homology with the crystal structure of MtrF, *Biochemical Society Transactions*, **40**, 1181–1185.
- 115. Moser, C.C., Chobot, S.E., Page, C.C., Dutton, P.L. (2008) Distance metrics for heme protein electron tunneling, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**, 1032–1037.
- 116. Edwards, M.J., Hall, A., Shi, L., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Butt, J.N., Richardson, D.J., Clarke, T.A. (2012) The crystal structure of the extracellular 11heme cytochrome UndA reveals a conserved 10-heme motif and defined binding site for soluble iron chelates, *Structure*, **20**, 1275–1284.
- 117. Yang, Y., Chen, J., Qiu, D., Zhou, J. (2013) Roles of UndA and MtrC

of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1 in iron reduction, *BMC Microbiology*, **13**, 267.

- 118. Breuer, M., Rosso, K. M., Blumberger, J. (2014) Electron flow in multiheme bacterial cytochromes is a balancing act between heme electronic interaction and redox potentials, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 611–616.
- Breuer, M., Zarzycki, P., Blumberger, J., Rosso, K.M. (2012) Thermodynamics of electron flow in the bacterial deca-heme cytochrome MtrF, *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 9868–9871.
- 120. Breuer, M., Zarzycki, P., Shi, L., Clarke, T.A., Edwards, M.J., Butt, J.N., Richardson, D.J., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Blumberger, J., Rosso, K.M. (2012) Molecular structure and free energy landscape for electron transport in the decahaem cytochrome MtrF, *Biochemical Society Transactions*, 40, 1198–1203.
- 121. Okamoto, A., Hashimoto, K., Nealson, K.H., Nakamura, R. (2013) Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 7856–7861.
- 122. Shi, L., Rosso, K.M., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K. (2012) Mtr extracellular electron-transfer pathways in Fe(III)-reducing or Fe(II)oxidizing bacteria: a genomic perspective, *Biochemical Society Transactions*, **40**, 1261–1267.
- 123. Bücking, C., Piepenbrock, A., Kappler, A., Gescher. J. (2012) Outer-membrane cytochrome-independent reduction of extracellular electron acceptors in Shewanella oneidensis, *Microbiology*, **158**, 2144–2157.

124. Bewley, K.D., Firer-Sherwood, M.A., Mock, J.Y., Ando, N., Drennan, C.L., Elliott, S.J. (2012) Mind the gap: diversity and reactivity relationships among multihaem cytochromes of the MtrA/DmsE family, *Biochemical Society Transactions*, **40**, 1268–1273.