

РЕДОКС-РЕГУЛИРУЕМАЯ ГЕТЕРОДИМЕРНАЯ NADH:ЦИННАМАТ РЕДУКТАЗА ИЗ *Vibrio ruber*

© 2024 Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Анашкин,
А.А. Байков, А.В. Богачев*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва; электронная почта: bogachev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 24.06.2023

После доработки 09.10.2023

Принята к публикации 10.10.2023

Гены редуктаз несопряженных карбоновых кислот широко распределены среди геномов анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Однако субстратная специфичность экспериментально определена лишь для небольшого количества этих белков. В ходе данной работы мы наработали в клетках *Escherichia coli* гетеродимерный белок факультативно-анаэробной морской бактерии *Vibrio ruber* (GenBank SJN56019 и SJN56021; аннотированные как NADPH азоредуктаза и уроканатредуктаза соответственно) путем его копродукции с флавин трансферазой из *Vibrio cholerae*. Полученный белок (названный Crd) состоит из *sjn56021*-кодируемой субъединицы CrdB (домены NADH:flavin, FAD binding 2 и FMN bind) и из дополнительной субъединицы CrdA (SJN56019, единственный домен NADH:flavin), которые взаимодействуют посредством своих доменов NADH:flavin (предсказание AlphaFold2). Показано, что каждый домен Crd содержит флавиновую простетическую группу (в сумме три FMN и один FAD), одна из FMN-групп присоединяется к CrdB ковалентно за счет активности флавин трансферазы. В анаэробных условиях Crd способен восстанавливать циннамат, *n*-кумарат, кофеат и ферулат, используя NADH или метилвиологен в качестве доноров электронов. Белок также умеренно активен по отношению к акрилату, но практически не способен к восстановлению фумарата и уроканата. Различные (гидрокси)циннаматы индуцируют синтез Crd в клетках *V. ruber* как в анаэробных, так и в аэробных условиях выращивания. При старте Crd-катализируемой реакции добавкой NADH наблюдается временной лаг в несколько минут, что указывает на редокс-регуляцию ферментативной активности. Показано, что окисленная форма Crd неактивна, что, по-видимому, предотвращает продукцию ферментом активных форм кислорода в аэробных условиях. Полученные данные позволяют описать Crd как регулируемую NADH-зависимую циннамат редуктазу, по-видимому, защищающую *V. ruber* от токсического действия (гидрокси)циннаматов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активные формы кислорода, анаэробное дыхание, коричная кислота, кофейная кислота, регуляция ферментативной активности, ризосфера, *Vibrio*.

DOI: 10.31857/S0320972524020053 EDN: XNCWTX

ВВЕДЕНИЕ

NADH:2-еноат редуктазы (EC 1.3.1.31), способные восстанавливать α,β -ненасыщенные карбоновые кислоты (например, фумаровую, коричную или акриловую кислоты), широко распространены среди анаэробных или факультативно-анаэробных

микроорганизмов [1–4]. Все известные на сегодняшний день 2-еноат редуктазы состоят из одного полипептида и могут быть разделены на две негомологичные группы на основании их доменной архитектуры. Трехдоменные редуктазы всегда содержат в своем составе домен FAD binding 2 (Pfam ID: PF00890), осуществляющий связывание

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; aCrd – нефлавилированный белок Crd, содержащий только нековалентно связанные флавины; DCPiP – 2,6-дихлорфенолиндифенол; fCrd – флавилированный белок Crd; *FMN – ковалентно связанный остаток FMN; MS – масс-спектрометрия; MV – метилвиологен, *m/z* – отношение массы к заряду.

* Адресат для корреспонденции.

и восстановление карбоновой кислоты и содержащий нековалентно связанный FAD в качестве простетической группы. Окисление NADH производится в *OYE-like* (PF00724) или в *FAD binding 6* (PF00970) домене, несущем в своем составе нековалентно связанный FMN или FAD соответственно [2, 3]. Третий домен (чаще всего – домен *FMN bind*; PF04205) осуществляет перенос электронов между описанными выше доменами посредством FMN, ковалентно связанного с белком фосфоэфирной связью [4–6].

Многие бактерии класса *Clostridia* содержат двухдоменную 2-еноат редуктазу [1, 7], построенную из доменов *OYE-like* и *Pyr redox 2* (PF07992). Редуктазы этой группы содержат кластер [4Fe-4S] и нековалентно связанные FAD и FMN в соотношении 1/1/1 в качестве кофакторов [8, 9]. В сахаролитических клостридиях двухдоменные 2-еноат редуктазы восстанавливают широкий спектр несопряженных карбоновых кислот, тогда как эти ферменты из протеолитических клостридий высоко специфичны по отношению к коричной кислоте и ее производным [10, 11]. Для всех известных 2-еноат редуктаз не описано возможности регуляции их ферментативной активности.

Геном морской факультативно-анаэробной бактерии *Vibrio ruber* [12] кодирует полипептид, состоящий из 806 а.о., аннотированный как урканатредуктаза в GenBank (SJN56021) и в UniProt (A0A1R4LHN9). Этот полипептид, названный нами на основании его субстратной специфичности (смотри далее) как CrdB, содержит описанные выше домены *FAD binding 2* и *FMN bind* (рис. 1, а). Пять аминокислотных остатков домена *FAD binding 2* в CrdB, предположительно, отвечающих за связывание карбоновой кислоты, идентичны или сходны с таковыми акрилатредуктазы из *Vibrio harveyi* [4, 13, 14] (рис. 1, б). Исходя из этого, можно предположить, что CrdB также является акрилатредуктазой. Домен *FMN bind* CrdB, так же как и сходные домены в других 2-еноат редуктазах, содержит в своем составе мотив DALSGAS₂₅₇, используемый флавин трансферазой для ковалентного присоединения FMN к остатку серина [15]. Интересно отметить, что в непосредственной близости от *crdB* на хромосоме *V. ruber* расположен ген *apbE* (рис. 1, в) для флавин трансферазы (GenBank ID: SJN56016), катализирующей присоединение FMN к белкам посредством фосфоэфирной связи.

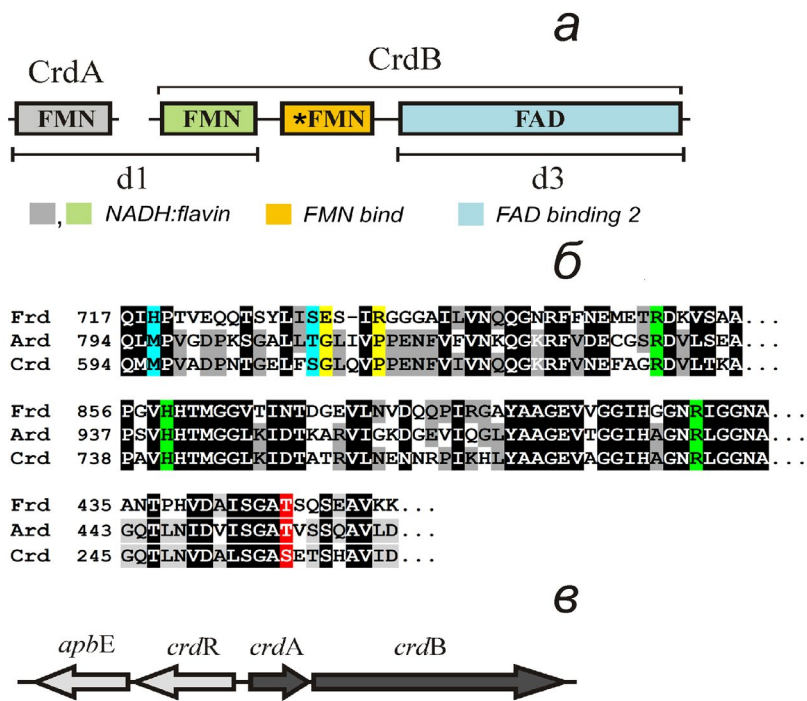


Рис. 1. Биоинформатическое описание Crd из *Vibrio ruber*. **а** – Доменная архитектура полипептидов CrdA и CrdB. Домены *NADH:flavin*, *FMN bind* и *FAD binding 2* (остатки CrdB 1–180, 190–275 и 280–800 соответственно) показаны различными цветами. Названия доменов приведены в соответствии с базой данных Pfam. Предполагаемые редокс-активные простетические группы указаны внутри боксов. Полученные в ходе работы укороченные фрагменты белка Crd обозначены как d1 и d3. **б** – Выравнивание аминокислотных последовательностей фумаратредуктазы из *Klebsiella pneumoniae* (Frd, UniProt: B5XRB0), акрилатредуктазы из *Vibrio harveyi* (Ard, P0DW92) и белка CrdB из *V. ruber* (SJN56021) с помощью программы Clustal Omega [42]. Три приведенные части выравнивания содержат позиции аминокислотных остатков, вовлеченных в связывание C1- и C4-карбоксилатов фумарата в Frd (выделены синим и зеленым цветом соответственно), в формирование протон-переноса к фумарату в Frd (выделены желтым) и в ковалентное связывание FMN во всех показанных белках (выделены красным). **в** – Расположение *crd*-ассоциированных генов на хромосоме *V. ruber*. *apbE* – ген предполагаемой FAD:белок FMN трансферазы; *crdR* – ген предполагаемого регулятора транскрипции

Перечисленные характеристики CrdB позволяют классифицировать этот белок как трехдоменную 2-еноат редуктазу, по-видимому, вовлеченную в восстановление акриловой кислоты.

Однако CrdB, в отличие от других известных трехдоменных NADH:2-еноат редуктаз, вместо NADH-окисляющего домена *OYE-like* или *FAD binding 6* содержит альтернативный домен *NADH:flavin* (PF03358) (рис. 1, а). Также в *crd*-опероне *V. ruber* перед геном *crdB* находится ген *crdA* (рис. 1, в), кодирующий белок (SjN56019), гомологичный *N*-концевой части CrdB (51% идентичности, 65% схожести первичных структур) и состоящий только из домена *NADH:flavin*. Так как домены *NADH:flavin* способны к димеризации [16], существует интересная возможность функционирования Crd в качестве CrdA/CrdB гетеродимера.

Из-за невозможности однозначного теоретического предсказания ферментативной активности и субстратной специфичности NADH:2-еноат редуктаз в ходе данной работы мы продуцировали белок Crd из *V. ruber* в клетках *Escherichia coli* и охарактеризовали выделенный фермент. Полученные данные позволяют описать его в качестве регулируемой NADH-зависимой редуктазы коричневой кислоты и ее различных производных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия выращивания. Культура *V. ruber* DSM 16370 была получена из коллекции микроорганизмов и клеточных культур института Лейбница (DSMZ). Клетки выращивали аэробно или анаэробно при 28 °C в среде, содержащей (в расчете на литр) 20 г NaCl, 0,75 г KCl, 1,2 г MgSO₄ × 7(H₂O), 0,5 г NH₄Cl, 0,5 ммоль Na₂HPO₄, 2 г сахарозы, 0,5 г дрожжевого экстракта и 50 ммоль Tris-HCl (pH 8,0). При необходимости в среду роста добавляли 2–10 мМ акрилата, циннамата, *n*-кумарата, кофеата или ферулата. Для измерения MV:циннамат редуктазной активности осветленный клеточный лизат получали, как описано ранее [17]. Клетки *E. coli* растили при 37 °C в среде LB. Где указано, в среду LB добавляли хлорамфеникол (20 мкг/мл) и/или ампициллин (100 мкг/мл).

Конструирование экспрессионных векторов. Экспрессионный вектор для полноразмерного белка CrdAB с C-концевым 6×His-тагом у CrdB был получен за счет амплификации оперона *crd* с геномной ДНК *V. ruber* при использовании высокоточной полимеразы Tersus («Евроген», Россия) и праймеров V_ruber_DIR/V_ruber_REV (последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении). Полученный фрагмент (3276 п.н.) клонировали в вектор pBAD-TOPO («Invitrogen», США) с получением

ем плазмиды pTB_CRD4. Эту плазмиду трансформировали в клетки *E. coli*/pΔhis3 [18] или BL21.

Экспрессионный вектор для фрагмента d1 (полноразмерный CrdA и а.о. 1–184 CrdB) получали за счет ПЦР-амплификации соответствующего фрагмента ДНК *crd*-оперона с помощью полимеразы Tersus и праймеров V_ruber_DIR/VR_P1R (последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении), используя геномную ДНК *V. ruber* в качестве матрицы. Полученный фрагмент (1401 п.н.) клонировали в вектор pBAD-TOPO с получением плазмиды pTB_d1CRD17. Для получения экспрессионного вектора для продукции фрагмента d3 (281–806 а.о. CrdB) соответствующий фрагмент *crdB* (1688 п.н.) амплифицировали с помощью ПЦР, используя пару праймеров VR_3P2_NdeD/Xho_rhod_rev (последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении) и плазмиду pTB_CRD4 в качестве матрицы. Амплифицированный фрагмент клонировали в вектор pSCodon («Delphi Genetics», Бельгия) с использованием сайтов NdeI/XhoI и получением плазмиды pSC_d3CRD2. Плазмиды pTB_d1CRD17 и pSC_d3CRD2 вводили в клетки *E. coli* BL21 с помощью трансформации.

Получение белка Crd. Разные формы 6×His-меченного белка Crd, содержащего или не содержащего ковалентно связанный FMN (fCrd и aCrd соответственно), а также d1- и d3-фрагменты Crd нарабатывали в клетках *E. coli* BL21 или *E. coli*/pΔhis3 и выделяли с помощью металл-аффинной хроматографии, как описано ранее [5]. Определенные с помощью обработки додецилсульфатом натрия (ДСН) [4] коэффициенты экстинкции $\epsilon_{450\text{nm}}$ для fCrd, aCrd, d1- и d3-фрагментов составляли 42, 31, 22 и 11 мМ⁻¹·см⁻¹ соответственно.

Анализ флавиновых простетических групп. Нековалентно связанные флавины экстрагировали из Crd с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ) и разделяли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [5]. Полиакриламидный гель-электрофорез в присутствии ДСН (ДСН-ПААГЭ) проводили, используя 12,5%-ный (w/v) полиакриламидный гель [19]. Гели окрашивали с помощью раствора PageBlue™ («Fermentas», Литва). Присутствие ковалентно связанного флавина (*FMN) определяли, сканируя неокрашенные гели с помощью лазерного сканера Typhoon™ FLA 9500 («GE Healthcare», США) при возбуждении светом с длиной волны 473 нм и детекции эмиссии, согласно протоколу SYBR Green II, в соответствии с рекомендациями производителя.

Для масс-спектроскопических измерений использовали вырезанные полоски геля (~2 мм³). Эти полоски вырезали из белковых полос окрашенного геля, дважды инкубировали по 20 мин в 100 мкл 40% (v/v) ацетонитрила, содержащего 20 мМ NH₄HCO₃ (pH 7,5), обезвоживали в 200 мкл

100%-ного ацетонитрила и регидратировали в 5 мкл раствора, содержащего 15 мкг/мл трипсина («Promega», США) в 20 mM NH_4HCO_3 (pH 7,5). Трипсинолиз проводили при 37 °C в течение 1 ч. Полученные пептиды экстрагировали 5 мкл 30%-ного ацетонитрила, содержащего 0,5% ТФУ. Аликвоты полученного экстракта (1 мкл) смешивали с 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (40 мг/мл) в 30%-ном ацетонитриле, содержащем 0,5% ТФУ. Масс-спектрометрию (MS) проводили на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF-TOF («Bruker Daltonik», Германия). Спектры фрагментации получали в LIFT-моду, точность определения дочерних ионов составляла менее 1 Да. Масс-спектры обрабатывали с использованием программы FlexAnalysis 3.2 («Bruker Daltonik»). Идентификацию белков проводили MS + MS/MS-поиском с использованием программы Mascot версии 2.3.02 («Matrix Science», США) в базе данных NCBI с возможностью однократного пропуска разрезания трипсином, окисления метионина, пропионирования цистеина и флавинилирования треонина или серина.

Ферментативные активности. NADH- и метилвиологен (MV)-зависимые ферментативные активности препаратов Crd определяли при 25 °C спектрофотометрически по окислению NADH или MV при 340 или 606 нм соответственно, используя спектрофотометр Hitachi-557 («Hitachi», Япония) [3]. Среда измерения содержала 1 mM MV, 0,03–1 mM акцептора электронов и 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) или 120 мкМ NADH, 0,05–1 mM акцептора электронов, 10 mM глюкозу, 5 ед./мл глюкозооксидазы, 5 ед./мл каталазы и 100 mM Mes-KOH (pH 6,5) в полностью заполненной и герметически закрытой кювете объемом 3,2 мл. Перед проведением измерений MV восстанавливали дитионитом до достижения поглощения ~1,5 при 606 нм, что соответствует концентрации восстановленного MV, равной ~100 мкМ. Если не указано иначе, Crd инкубировали с NADH или MV в течение 5 мин до старта реакции добавкой акцептора электронов. NADH-зависимые реакции также измеряли в аэробных условиях при отсутствии глюкозооксидазы и каталазы. Активности Crd рассчитывали, используя экспериментально подтвержденные соотношения NADH:акцептор и MV:акцептор, равные 1/1 и 2/1 соответственно.

При измерении FMN H_2 :циннамат редуктазной активности среда измерения содержала 100 мкМ FMN, 1 mM циннамата и 100 mM Tris-HCl (pH 8,0). Перед запуском реакции FMN восстанавливали дитионитом до уменьшения поглощения при 450 нм до ~0,3, что соответствовало концентрации восстановленного FMN, равной ~70 мкМ. Окисление FMN H_2 определяли спектрофотометрически по поглощению света при 450 нм.

Фенилпропионатдегидрогеназную активность определяли, измеряя восстановление 2,6-дихлорфенолиндифенола (DCPIP, $\epsilon_{600} = 22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) при 600 нм [20]. Среда измерения содержала 2 mM Tris-фенилпропионата, 2 mM феназинметасульфата, 25 мкМ DCPIP и 100 mM Mes-KOH (pH 6,5).

Параметры уравнения Михаэлиса–Ментен для MV-зависимого восстановления акрилата определяли по начальным скоростям окисления MV при 0,03–10 mM концентрациях акрилата в присутствии 40 нМ Crd. Для других акцепторов электронов скорости определяли из интегральной кинетики их восстановления при 606 нм до полного исчерпания акцептора. Скорости рассчитывали для 100 временных точек интегральной кинетики при ее дифференцировании ($-d[\text{MV}]/dt$) с использованием пакета MATLAB («The MathWorks, Inc.», США). Концентрацию акцептора электрона в каждый момент времени рассчитывали из A_{606} , используя соотношение MV:акцептор, равное 2/1, и предполагая, что конечное значение A_{606} соответствует 100%-ному восстановлению акцептора электронов. Фитирование уравнения Михаэлиса–Ментен проводили с помощью нелинейной регрессии.

Определение продукта реакции восстановления циннамата. Восстановление циннамата проводили в 3,2 мл среды, содержащей 100 мкМ циннамата, 10 mM дитионита натрия, 50 мкМ MV и 100 mM Tris-HCl (pH 8,0). Реакцию запускали добавкой 0,5 мкМ Crd и останавливали через 30 мин добавкой 5% (v/v) HClO_4 . В контрольном эксперименте добавляли HClO_4 до внесения Crd. После остановки реакции преципитат белка удаляли центрифугированием, а субстрат и продукт реакции экстрагировали диэтиловым эфиром (2 × 1,5 мл). Эфир из полученного экстракта удаляли выпариванием под потоком воздуха, а остаток растворяли в 1 мл 25 mM фосфата калия (pH 6,5) (среда А). Полученные пробы разделяли ВЭЖХ на колонке ProntoSil-120-5-C18 AQ («Econova», Россия), используя хроматограф Milichrom A-02 («Econova»). Колонку преуравновешивали средой А и промывали линейным градиентом метанола (0–10%) в среде А при скорости потока 0,2 мл/мин. Выход субстрата и продукта детектировали по УФ-поглощению при 210 и 258 нм.

Количественная полимеразная цепная реакция (рвПЦР). Экстракцию РНК из клеток *V. ruber* и синтез кДНК проводили, как описано ранее [17]. РвПЦР проводили с использованием набора qPCRMix-HS SYBR («Евроген»), полученной кДНК в качестве матрицы и праймеров VR_69U19/VR_273L20 для *crdB*. Для нормализации использовали 16S рРНК (пара праймеров 16s FW/16s RV). Для калибровки рвПЦР применяли серию разведений геномной ДНК из *V. ruber*, содержащей гены

для CrdB и 16S rRNA в соотношении 1/8. Последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении. В работе использовали праймеры производства «Синтол», Россия.

Биоинформатика. Трехмерная структура апоформы Crd была предсказана по аминокислотным последовательностям CrdA и CrdB с помощью программы AlphaFold2 (версия 2.2.0) [21] посредством интерфейса ColabFold [22]. В полученной структуре 96,7% аминокислотных остатков имели благоприятные двугранные углы, согласно диаграмме Рамачандрана.

Размещение лигандов (флавинов, NADH и циннамата) в полученной структуре Crd проводили с помощью программы AutoDock Vina [23] в следующей последовательности: *FMN, FAD, FMN_B, FMN_A, NADH, циннамат. Для докинга выделяли участки структуры от 12 × 12 × 12 до 30 × 30 × 30 Å³ на основе известных трехмерных структур гомологичных белков. Полученная 3D-структура Crd, содержащая одну молекулу FAD и три молекулы FMN, была уравновешена с использованием молекулярной динамики (МД) в течение 150 нс с помощью программного пакета AMBER 22 [24] (<http://ambermd.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и характеристика белка Crd из *V. ruber*. Оперон CrdAB был амплифицирован с геномной ДНК *V. ruber* и клонирован в экспрессионный вектор, добавляющий 6×His-таг к C-концу белка CrdB. Домен *FMN bind* CrdB содержит последовательность DALSGAS₂₅₇, сходную с мотивом флавилирования Dxx(s/t)gA(T/S), узнаваемым флавин трансферазой для ковалентного присоединения FMN к выделенному остатку треонина или серина [15]. Для проверки возможности флавилирования продуктов *crd*-оперона экспрессию этих генов проводили в клетках *E. coli* как в присутствии, так и при отсутствии дополнительной плазмиды pHis3 [18], кодирующей флавин трансферазу ArpE, способную осуществлять флавилирование различных *FMN bind*-содержащих белков [15]. Рекомбинантные белки fCrd и aCrd, наработанные в присутствии и при отсутствии ArpE соответственно, были выделены с помощью металл-аффинной хроматографии. Полученные препараты обладали интенсивным желтым цветом, а их оптические спектры (рис. 2, а) указывали на то, что они содержат флавины в качестве простетических групп.

ДСН-ПААГЭ обоих препаратов Crd выявлял присутствие одной мажорной и трех-четырех минорных белковых полос (рис. 2, б; левая панель). Полосы 1 и 3 были идентифицированы с помощью

MALDI-MS-анализа как CrdB (79% покрытие аминокислотной последовательности) и CrdA (95% покрытие аминокислотной последовательности) из *V. ruber* соответственно. Полоса 2 представляла собой пептидил-пролил *цис-транс* изомеразу SlyD из *E. coli*, обладающую собственной аффинностью к Ni-агарозе и являющуюся часто обнаруживаемой примесью при выделении 6×His-меченных белков из *E. coli* [25]. Полоса 1 fCrd обладала выраженной флуоресценцией при иллюминации светом с длиной волны 473 нм (рис. 2, б; правая панель), что указывает на присутствие в ней ковалентно связанного флавина. В то же время при использовании этого метода в aCrd ковалентно связанных флавинов не обнаруживалось. Таким образом, полученные данные указывают на ArpE-зависимое флавилирование CrdB.

Место ковалентного прикрепления флавина к CrdB было определено с помощью MALDI-MS- и MS/MS-анализа триптических пептидов. Пептид I₂₄₂IEGQTLNVDALSGASETSHAVIDGVAK₂₆₉, содержащий мотив флавилирования (мотив указан подчеркиванием, а модифицируемый остаток – жирным шрифтом), должен демонстрировать моноизотопную MH⁺ массу 2795,3 в немодифицированной форме или 3233,5 – в флавилированной форме. Оба эти предсказанные сигнала наблюдались на масс-спектре триптических пептидов fCrdB. Присутствие немодифицированной формы можно объяснить либо неполной модификацией Crd в клетках *E. coli*, либо частичной утратой ковалентно связанного флавина в ходе ДСН-ПААГЭ и последующего протеолиза. С помощью Mascot-поиска других кандидатов на роль флавилированных пептидов в полученном масс-спектре не обнаруживалось.

MS/MS-анализ пептида с отношением массы к заряду (*m/z*), равным 3233,5 (рис. S1 в Приложении), показал, что основные сигналы в спектре фрагментации (*m/z* = 2794 и *m/z* = 2776) соответствуют процессу отщепления FMN в полной или в дегидратированной форме соответственно, в зависимости от разрыва одной из ковалентных связей (C–O или O–P), соединяющих остаток FMN с остатком серина. Большая интенсивность сигнала с *m/z* = 2776 указывает на то, что разрыв по связи C–O происходил с большей вероятностью, что должно было приводить к дегидратации остатка серина [26]. В полученном масс-спектре также наблюдались менее интенсивные, но достоверные пики фрагментации, стартующие с фрагмента с *m/z* = 2776, что соответствует серии у-ионов, полученных с помощью двойных разрывов (рис. S1 в Приложении; красные буквы). В этой серии разница масс в позиции Ser257 (69 Да) соответствовала дегидратированному серину. Эти данные позволяют заключить, что fCrdB, полученный в ArpE-содержащих

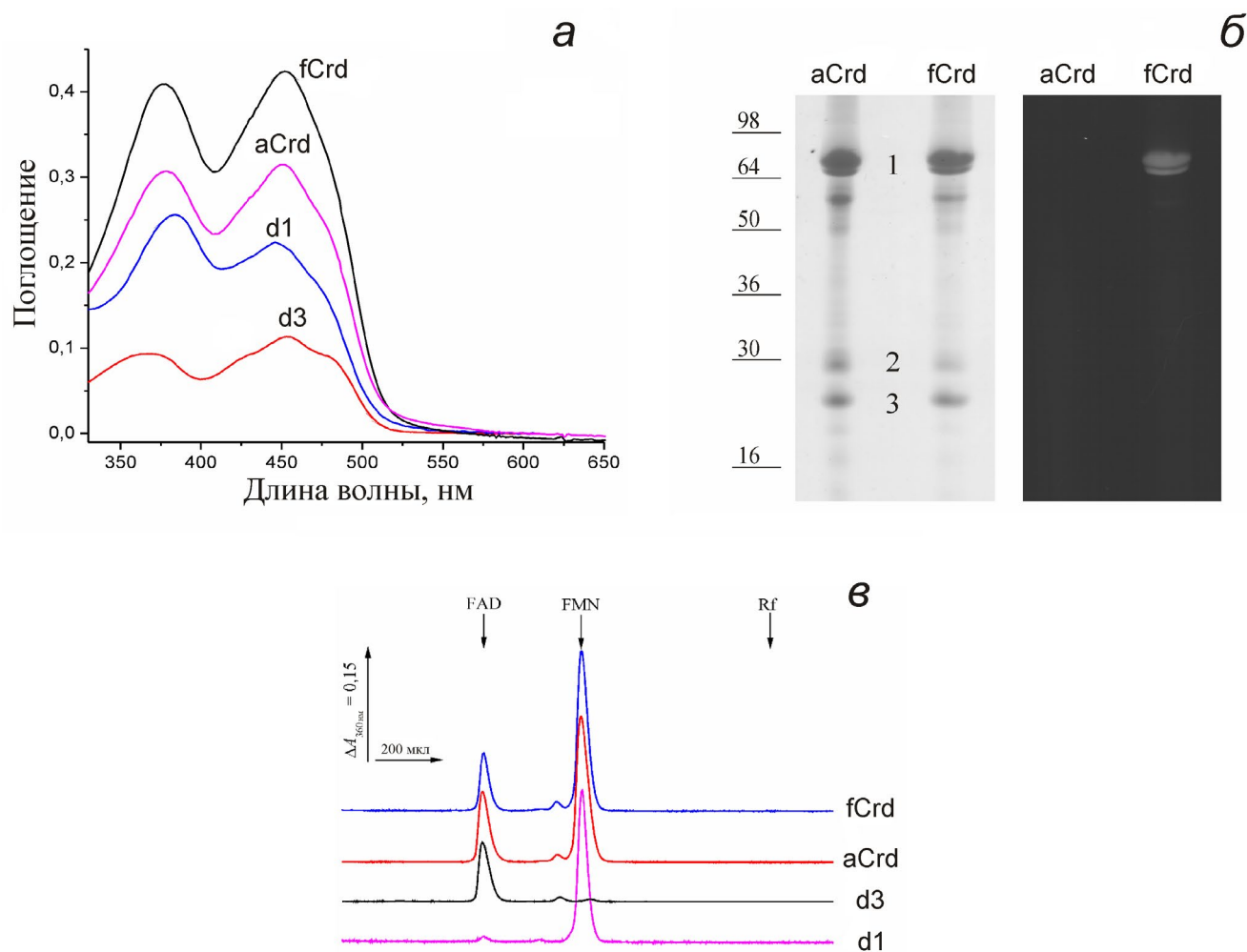


Рис. 2. Характеризация препаратов Crd. *а* – Оптические спектры препаратов полноразмерной и обрезанных (d1 и d3) форм Crd при концентрации этих белков, равной 10 мкМ. Препараты полноразмерного Crd были получены в клетках *E. coli*, содержащих или не содержащих флавин трансферазу ArpE (fCrd и aCrd соответственно). *б* – ДСН-ПААГЭ fCrd и aCrd. Гель окрашивали с помощью красителя Кумасси (левая часть панели *б*) или сканировали при иллюминации светом с $\lambda = 473$ нм до окрашивания (правая часть панели *б*). На каждую дорожку наносили по 5 мкг белка. Полосы с числами указывают положение белковых маркеров молекулярных весов. Белковые полосы, идентифицированные с помощью MALDI-MS, указаны цифрами 1–3. *в* – Разделение нековалентно связанных флавиновых простетических групп различных препаратов Crd с помощью ВЭЖХ. Стрелками указаны объемы удержания для стандартов FAD, FMN и рибофлавина (Rf)

клетках, несет остаток FMN, ковалентно связанный с остатком Ser257 в предсказанном мотиве флавилирования домена *FMN bind*.

Для определения нековалентно связанных флавинов в составе Crd эти простетические группы были экстрагированы и разделены с помощью ВЭЖХ (рис. 2, *в*). Было показано, что оба препарата Crd (fCrd и aCrd) содержат нековалентно связанные FAD и FMN в соотношении 1/2.

Для определения локализации этих нековалентно связанных флавинов были получены генетические конструкции, кодирующие либо два домена *NADH:flavin* субъединиц CrdA и CrdB (d1 на рис. 1, *а*), либо домен *FAD binding 2* субъединицы CrdB (d3 на рис. 1, *а*). Выделенные соответствующие белки обладали оптическими спектра-

ми, характерными для флавопротеинов (рис. 2, *а*). Присутствующие в этих белках флавины были также идентифицированы с помощью ВЭЖХ (рис. 2, *в*). Было показано, что нековалентно связанный FMN обнаруживается исключительно только во фрагменте d1 (домены *NADH:flavin*), тогда как FAD обнаруживается только во фрагменте d3 (домен *FAD binding 2*). Таким образом, можно заключить, что CrdAB содержит две молекулы нековалентно связанного FMN в доменах *NADH:flavin*, одну молекулу нековалентно связанного FAD в домене *FAD binding 2* и одну молекулу ковалентно связанного остатка FMN в домене *FMN bind*.

Специфичность Crd по отношению к различным α,β -ненасыщенным карбоновым кислотам. Исходя из сходства аминокислотных остатков,

Таблица 1. Редуктазные активности fCrd по отношению к различным α,β -ненасыщенным карбоновым кислотам, измеренные в анаэробных условиях с использованием 100 мкМ восстановленного MV в качестве донора электронов

Субстрат (кислота)	Структура	k_{cat} (с ⁻¹)	K_m (мкМ)
Кофейная		47 ± 2	$2,2 \pm 0,4$
<i>n</i> -Кумаровая		45 ± 3	$2,4 \pm 0,5$
Феруловая		26 ± 2	$2,8 \pm 0,5$
Коричная		$22,0 \pm 1,5$	$7,1 \pm 0,6$
Акриловая		$1,3 \pm 0,2$	770 ± 50
Фумаровая		$0,20 \pm 0,03^a$	
Кротоновая		$0,06 \pm 0,02^a$	
Урокановая		$0,04 \pm 0,01^a$	
Метакриловая		$0,03 \pm 0,01^a$	

Приложение. ^a Значения активностей, измеренных в присутствии субстрата в концентрации 1 мМ.

предположительно, вовлеченных в связывание субстрата в доменах *FAD binding* 2 Crd и акрилат-редуктазы Ard из *V. harveyi* (рис. 1, б), можно было предположить, что природным субстратом Crd также является акрилат. В соответствии с этим предсказанием, препарат Crd, полученный с помощью *crdAB-apbE* коэкспрессии (fCrd), оказался способен восстанавливать акрилат, используя MV в качестве донора электронов. Однако акрилат-редуктазная активность Crd ($1,3 \text{ с}^{-1}$) была значительно ниже таковой для специфической акрилат-редуктазы Ard (19 с^{-1} [4]). Более того, значение K_m для акрилата в случае fCrd оказалось существенно выше такового для Ard (770 и 16 мкМ соответственно), что делает каталитическую эффективность k_{cat}/K_m Crd ($0,0019 \text{ мкМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$) в ~640 раз более низкой по сравнению с Ard ($1,2 \text{ мкМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ [4]). Также было показано, что fCrd способен восстанавливать фумарат с низкой, но измеряемой активностью. В то же время этот белок был практически неактивен при использовании метакрилата, кротоната и уроканата (табл. 1).

В противоположность этому fCrd оказался способным к восстановлению циннамата и его гидроксигированных производных с высокими скоростями (k_{cat} 22–47 с^{-1}) и низкими значениями K_m (2,2–7,1 мкМ) (табл. 1). Эти наблюдения позволяют описать Crd в качестве циннамат редуктазы, активной также по отношению к другим природным α,β -ненасыщенным производным коричной кислоты.

Для определения продукта реакции восстановления циннамата под действием fCrd мы провели его идентификацию с помощью ВЭЖХ. Было обнаружено, что в ходе Crd-катализируемой реакции происходит полное превращение циннамата в фенилпропионат (рис. 3, а и б). Идентификация карбоновых кислот подтверждалась не только

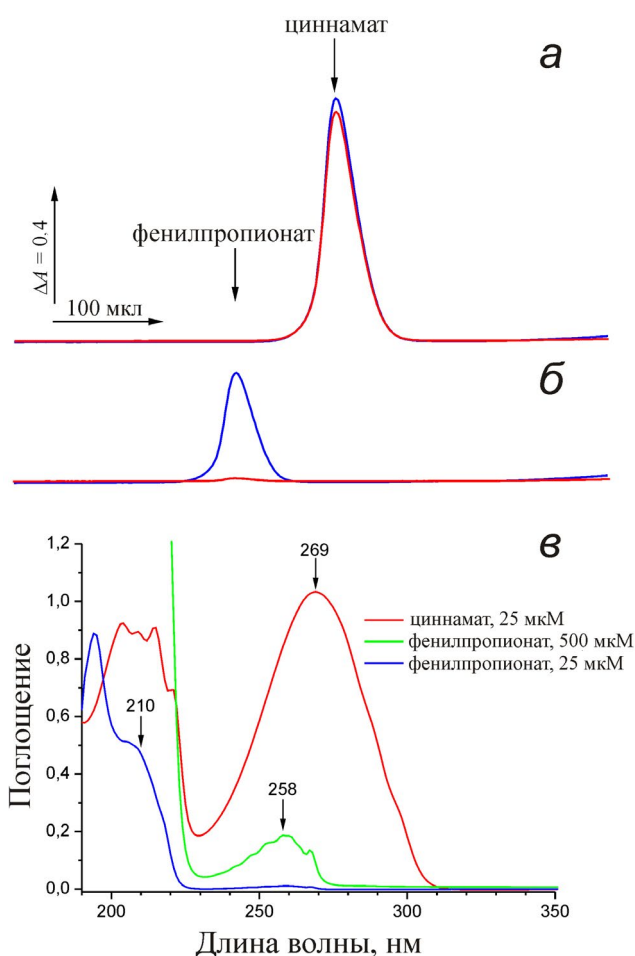


Рис. 3. Определение продукта восстановления коричной кислоты белком Crd с помощью ВЭЖХ. Циннамат (0,1 мМ) инкубировали в присутствии 10 мМ дитионита натрия, 50 мкМ MV и 0,5 мкМ fCrd. а – Реакционная среда до добавки fCrd. б – То же самое после 30-мин инкубации с fCrd. Профиль элюции отслеживали при 210 (синяя кривая) и 258 нм (красная кривая). Объемы удержания для стандартов циннамата и фенилпропионата указаны стрелками. в – УФ-спектры циннамата и фенилпропионата в 10 мМ фосфате калия (рН 6,5)

временем их удержания в ходе ВЭЖХ, но и тем, что амплитуды пиков при 210 и 258 нм были приблизительно одинаковы в случае циннамата и различались приблизительно в 40 раз в случае фенилпропионата, что находится в хорошем согласии с УФ-спектрами этих соединений (рис. 3, в). Полученные данные указывают на то, что ферментативная активность Crd заключается в восстановлении α,β-двойной связи в (гидрокси)коричных кислотах с образованием соответствующих насыщенных соединений.

Была также проведена проверка способности Crd осуществлять катализируемую реакцию в обратном направлении. Было установлено, что этот белок катализирует окисление фенилпропионата при использовании феназинметасульфата и DCPIP в качестве акцепторов электронов, хотя и с очень низкой скоростью 0,1 с⁻¹.

Индукция синтеза Crd в клетках *V. ruber* под действием ненасыщенных карбоновых кислот. Для определения способности различных субстратов Crd вызывать индукцию синтеза этого белка в клетках *V. ruber* проводили выращивание этой бактерии как в аэробных, так и в анаэробных условиях при отсутствии или в присутствии различных 2-еноатов. Далее, из выращенных клеток получали осветленный клеточный лизат и измеряли его удельную MV:циннамат редуктазную активность.

Как показано в табл. 2, добавление 10 мМ циннамата (максимальная концентрация этого соединения, еще не вызывающая значительного подавления роста *V. ruber*) приводило к существенной индукции синтеза Crd. Этот эффект наблюдался как в аэробных, так и в анаэробных условиях, хотя максимальная активность обнаруживалась при отсутствии кислорода в среде выращивания. Параллельные измерения показали более чем 10-кратное увеличение уровня транскрипции гена *crdB* в присутствии циннамата, это указывает на то, что в клетках *V. ruber* MV:циннамат редуктазная активность осуществляется за счет функционирования Crd.

Другие способные восстанавливаться под действием Crd карбоновые кислоты, за исключе-

нием акрилата, также оказались способны индуцировать синтез этого белка в анаэробных условиях (рис. 4). Эти соединения добавляли в среду роста в концентрации 2 мМ, так как это была максимальная концентрация в случае акрилата и кофеата, при которой еще наблюдался рост *V. ruber* в анаэробных условиях.

Активация выделенного Crd в присутствии NADH. CrdAB содержит в своем составе домены *NADH:flavin* (рис. 1, а), поэтому можно было предположить, что NADH является природным донором восстановительных эквивалентов для этого фермента. Так как ферулат, кофеат и *п*-кумарат обладают существенным поглощением света при 340 нм, NADH-окисляющую активность Crd определяли при использовании не поглощающих при 340 нм циннамата или акрилата в качестве акцепторов электронов. Как показано на рис. 5, а (красная кривая), при проведении реакции в анаэробных условиях и ее запуске добавкой циннамата наблюдалось линейное во времени окисление NADH с относительно высокой удельной активностью 15 с⁻¹. Однако изменение порядка добавок приводило к существенному изменению хода катализируемой реакции. В ходе реакции, запущенной добавкой fCrd, наблюдался огромный временной лаг (синяя кривая на рис. 5, а). Хотя начальная скорость реакции в этом случае была очень малой, конечная скорость оказывалась сопоставимой с той, которая показана красной кривой и, по-видимому, соответствует полностью активированному Crd. Такой же временной лаг наблюдался и при запуске реакции добавкой NADH.

Эти данные означают, что выделенный fCrd неактивен и требует для активации преинкубации с NADH. Так как продолжительность временного лага в циннамат редуктазной активности не зависела от концентрации fCrd (данные не представлены), то можно заключить, что активация этого фермента не связана с изменением его олигомерной структуры. Также активация при отсутствии циннамата происходила значительно быстрее, чем в его присутствии (рис. 5, а), так как время преинкубации Crd с NADH для красной кривой этого рисунка составляло приблизительно 5 мин

Таблица 2. Корреляция между величиной MV:циннамат редуктазной активности и уровнем транскрипции гена *crdB* в клетках *V. ruber*, выращенных в различных условиях

Условия выращивания	Активность Crd (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹)	<i>crdB</i> мПНК/пПНК × 10 ⁻⁶
Без циннамата, без O ₂	1,2 ± 0,4	2,1 ± 0,2
Без циннамата, +O ₂	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1
10 мМ циннамат, без O ₂	86 ± 11	31 ± 4
10 мМ циннамат, +O ₂	19 ± 3	25 ± 2

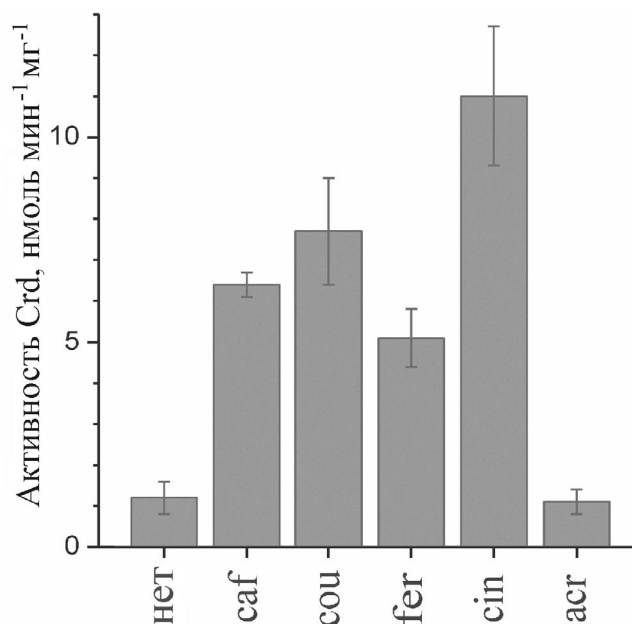


Рис. 4. MV:циннаमत редуктазная активность в клетках *V. ruber*, выращенных анаэробно в присутствии 2 мМ кофеата (caf), *p*-кумарата (cou), ферулата (fer), циннамата (cin) или акрилата (acr). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение для двух биологических повторов

и было достаточным для полной активации при отсутствии акцептора электронов. Преинкубация фермента с 5 мМ дитионитом в течение 5 мин до старта реакции добавкой fCrd активировала фермент до того же самого уровня, что и преинкубация с NADH (данные не представлены). Таким образом, можно предположить, что для перехода Crd в активную форму необходимо не связывание NADH, а восстановление какой-то простетической группы этого белка.

Для последующего анализа проводили дифференцирование полученных кривых активации (рис. 5, а; синяя кривая) с получением кривых зависимости активности фермента от времени инкубации (рис. 5, б). Сигмоидальный характер этих кривых показывал, что активация Crd не является одностадийным процессом. Эти кривые не могли быть адекватно описаны и двухстадийным процессом (красная линия), но могли быть фитированы модельным процессом, состоящим из трех последовательных стадий (зеленая кривая). При фитировании мы предполагали, что константы скорости протекания всех стадий одинаковы, так как при этом достигается максимально продолжительный временной лаг в образовании конечного продукта. Для трехстадийного процесса определенное таким способом значение констант скоростей отдельных стадий составляло $0,060 \pm 0,003 \text{ с}^{-1}$. Таким образом, процесс активации Crd в присутствии NADH состоит из не менее чем трех стадий.

Похожую, но более быструю активацию Crd в ходе катализируемой реакции наблюдали и при анаэробном восстановлении акрилата, запущенном добавкой фермента (рис. 5, в). Максимальная ферментативная активность при использовании этого субстрата ($3,5 \text{ с}^{-1}$) составляла 23% от таковой при использовании циннамата, хотя при использовании MV в качестве донора электронов эта активность составляла лишь 6% от соответствующей активности с использованием циннамата (табл. 1). Кинетический анализ показал, что активация Crd в присутствии NADH и акрилата может быть описана двухстадийным процессом (рис. S2 в Приложении) со значением обеих констант скоростей, равном $0,27 \pm 0,02 \text{ с}^{-1}$. Также было показано, что активация Crd в присутствии NADH и при отсутствии акцепторов электронов (рис. S2 в Приложении; квадраты на левой панели) была быстрее, чем при их присутствии (рис. S2 в Приложении; кружки на левой панели; рис. 5, б; кружки). Кинетический анализ показал, что активация Crd в этом случае также может быть описана двумя последовательными стадиями с усредненной константой скорости $0,75 \pm 0,15 \text{ с}^{-1}$.

При использовании MV в качестве донора электронов (табл. 1) не наблюдалось какой-либо активации фермента во время его работы вне зависимости от порядка внесения fCrd и его субстратов. Эти результаты указывают на то, что активация/деактивация fCrd связана с функционированием его NADH-связывающих доменов NADH:flavin. Этот вывод подтверждался наблюдением активации фермента при катализе анаэробной NADH:FMN редуктазной реакции при ее старте добавкой fCrd (рис. 5, з). В этом случае кинетика активации была более сложной и адекватно не описывалась даже трехстадийным процессом (рис. S2 в Приложении; правая панель).

Crd, активированный инкубацией с NADH, оставался полностью активным до полного окисления NADH в ходе ферментативной реакции. Однако фермент медленно деактивировался после истощения донора электронов. В эксперименте, показанном на рис. 6, а, реакция, запущенная добавкой акрилата к преактивированному fCrd, протекала линейно до полного окисления NADH. Вторая порция добавленного NADH восстанавливала активность Crd до уровня, зависящего от временного интервала t до повторной добавки этого донора электронов (рис. 6, б). При больших значениях t реакция протекала нелинейно с временным лагом, как на рис. 5, в (синяя кривая), и активировалась до конечных значений, сходных с таковыми для красной кривой на рис. 5, в и левой кривой на рис. 6, а. Эти данные показывают, что активированный fCrd подвержен процессу постепенной деактивации при отсутствии NADH, но может быть снова

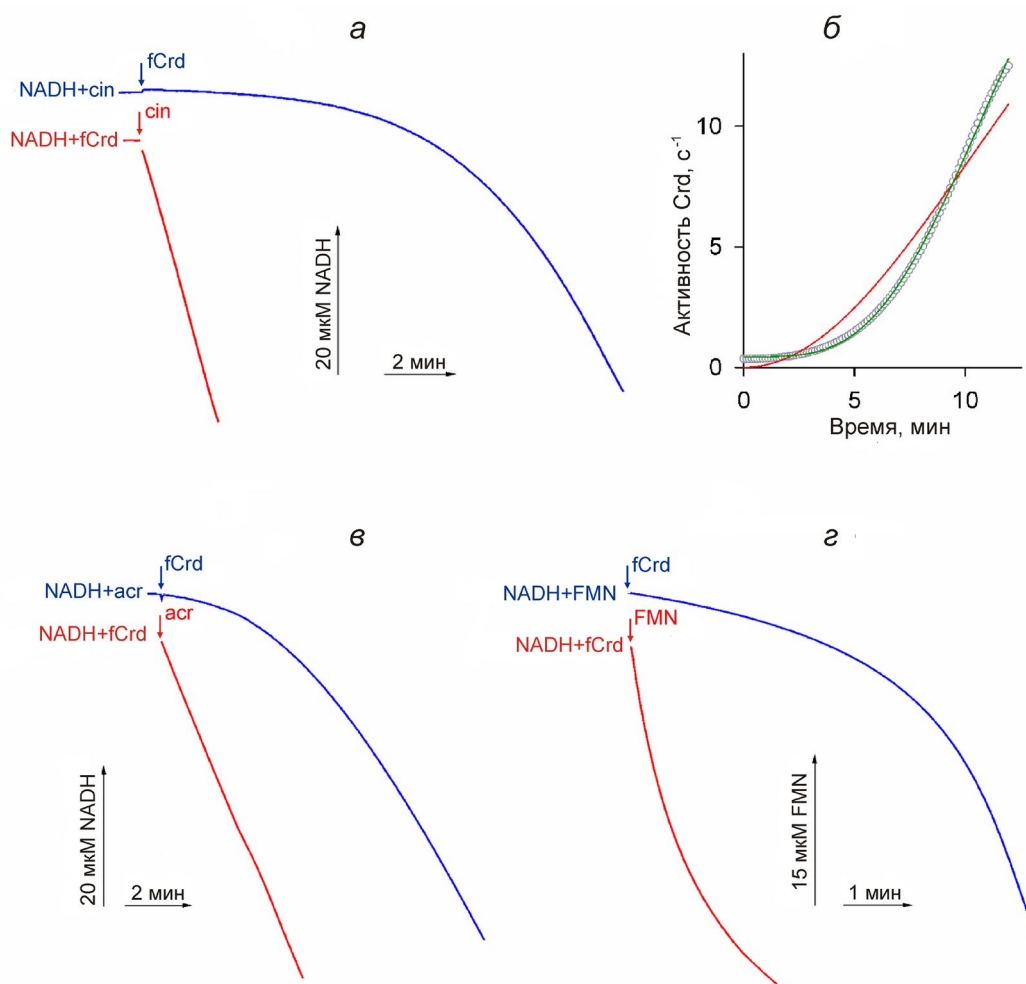


Рис. 5. Типичный ход катализируемых fCrd NADH-зависимых реакций в анаэробных условиях. а – Циннамат-зависимое окисление NADH. Конечная среда измерения содержала 120 мкМ NADH, 50 мкМ циннамата и 30 нМ fCrd. Реакцию запускали либо добавкой циннамата (cin, красная кривая), либо добавкой fCrd (синяя кривая). б – Зависимость активности Crd от времени протекания NADH:циннамат редуктазной реакции, запущенной добавкой Crd. Маленькими кружками показаны значения активности Crd в каждый момент времени, полученные дифференцированием $(-d[\text{NADH}]/dt)$ исходной кривой протекания реакции (синяя кривая на панели а) с использованием программного пакета Matlab. Красная и зеленая кривые показывают результаты фитирования с использованием двух- или трехстадийных кинетических моделей соответственно. в – Акрилат-зависимое окисление NADH. Конечная реакционная среда содержала 120 мкМ NADH, 1 мМ акрилата и 150 нМ fCrd. Реакцию запускали добавкой акрилата (acr, красная кривая) или fCrd (синяя кривая). г – NADH-зависимое восстановление FMN. Конечная среда измерения содержала 120 мкМ NADH и 50 мкМ FMN. Концентрация fCrd составляла 15 нМ (красная кривая, реакцию запускали добавкой FMN) или 60 нМ (синяя кривая, реакцию запускали добавкой fCrd)

медленно переведен в активное состояние после инкубации с восстановителем. Деактивация fCrd могла быть описана одностадийным процессом с полувремением 4,7 мин (рис. 6, б).

В аэробных условиях NADH-окисляющая активность Crd была очень низкой и не изменялась с течением времени (рис. 7, черная (1) кривая). Это значительно отличается от данных, полученных для других NADH:2-еноат и NADH:флавин редуктаз, которые способны окислять NADH с высокой скоростью при использовании O_2 в качестве акцептора электронов [3, 4, 27], и означает, что молекулярный кислород препятствует активации Crd.

Для определения действия O_2 на активную форму Crd, фермент преинкубировали с NADH в анаэробных условиях и запускали реакцию добавкой избытка циннамата (рис. 7, красная (2) кривая). После этого в среду измерения вносили кислород в форме H_2O_2 . В этих экспериментах использовали пониженные концентрации глюкозооксидазы и повышенную концентрацию каталазы. Как показано на рис. 7, пульс кислорода вызывал медленную инактивацию Crd, сопровождаемую после исчерпания O_2 реактивацией фермента до его исходной активности. Продолжительность переходной стадии деактивации уменьшалась при повышении

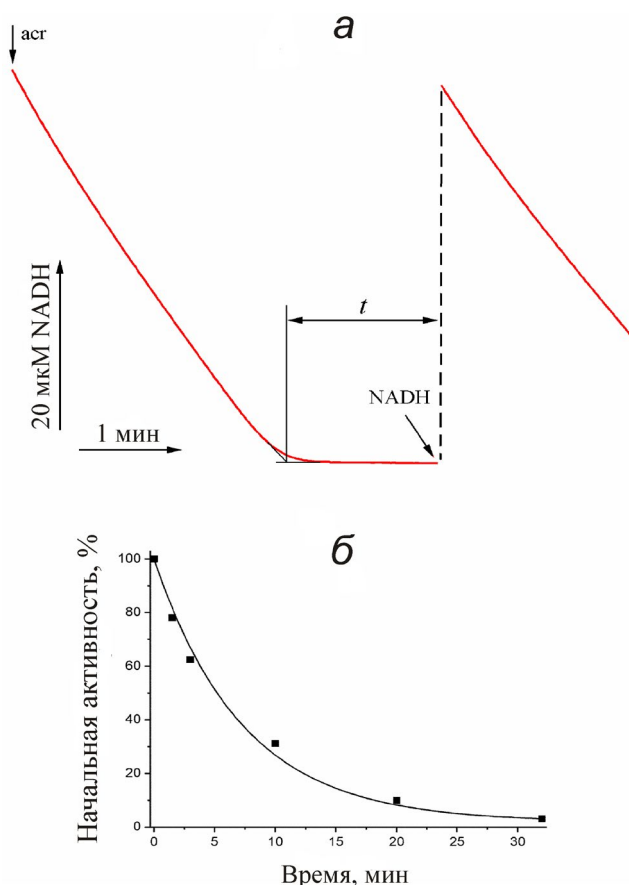


Рис. 6. Деактивация Crd. *а* – Анаэробное окисление NADH в присутствии fCrd и 1 мМ акрилата (acr). По завершении реакции при исчерпании NADH его концентрацию восстанавливали повторной добавкой до исходного уровня (~50 мкМ) после паузы в 90 с. Условия эксперимента такие же, как в случае рис. 5, *б* – Значения начальных скоростей окисления NADH, измеренные для второй порции добавленного NADH как функция от временного интервала *t* до его повторного внесения. 100% соответствует исходной активности фермента, измеренной для левой кривой на панели (*а*). Теоретическая кривая представляет собой моноэкспоненту с полувременем 4,7 мин

концентрации глюкозооксидазы в среде измерения (данные не представлены). Эти данные показывают, что деактивация фермента в присутствии кислорода обратима, что, по-видимому, позволяет регулировать активность Crd концентрацией O_2 .

Для проверки способности fCrd окислять NADPH этот белок активировали в присутствии 30 мкМ NADH, и сразу после его исчерпания в присутствии избытка акрилата в реакционную среду добавляли 120 мкМ NADPH. Было показано, что скорость окисления NADPH при этой концентрации приблизительно в 35 раз ниже по сравнению со скоростью окисления NADH. Таким образом, именно NADH, по-видимому, является природным донором восстановительных эквивалентов для Crd.

Роль различных доменов Crd в его ферментативных активностях. Crd способен катализиро-

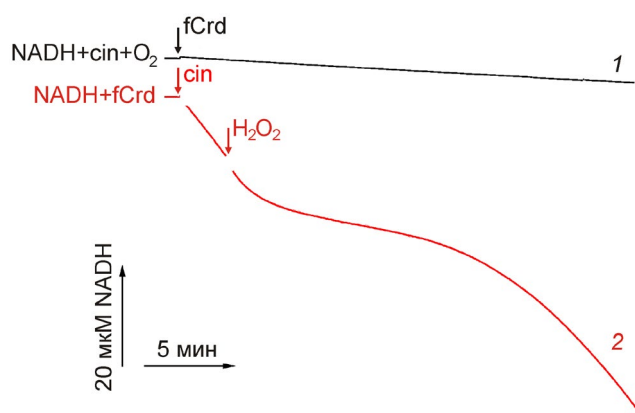


Рис. 7. Обратимая инактивация Crd под действием кислородного пульса в ходе протекания NADH-зависимого восстановления циннамата. Кривая 1 – реакцию запускали добавкой fCrd и проводили в аэробных условиях (при отсутствии глюкозооксидазы и каталазы). Все прочие условия эксперимента такие же, как для красной кривой на рис. 5, *а*. Кривая 2 – реакцию запускали добавкой 500 мкМ циннамата и проводили в анаэробных условиях до указанной добавки 500 мкМ H_2O_2 (создающей 250 мкМ концентрацию молекулярного кислорода). Концентрации глюкозооксидазы и каталазы в данном эксперименте составляли 0,6 и 50 ед./мл соответственно. Конечные среды измерения в обоих экспериментах также содержали 120 мкМ NADH и 30 нМ fCrd

вать окислительно-восстановительные реакции между различными природными и искусственными донорами и акцепторами электронов. Для того чтобы установить, какие домены Crd ответственны за осуществление разных активностей, эти активности были измерены на апо- и флавилированной формах Crd, а также на различных фрагментах этого белка. Было показано, что MV:циннамат редуктазная активность была намного выше у fCrd по сравнению с aCrd (не содержащим *FMN) и с фрагментом d3 (содержащим только домен *FAD binding 2*) (табл. 3). Эти данные показывают, что, так же как и в NADH:фумарат редуктазе *Klebsiella pneumoniae* [3], домен *FAD binding 2* необходим для восстановления природного акцептора электронов и что электрон-переносный путь от MV к этому домену включает в себя *FMN в домене *FMN bind*.

В то же время высокая NADH:FMN редуктазная активность была присуща не только полноразмерной флавилированной форме фермента (fCrd), но также и его апо-форме и фрагменту d1 (содержащему только домены *NADH:flavin*). Таким образом, можно заключить, что эта реакция катализируется доменами *NADH:flavin*. Важно отметить, что все NADH:FMN редуктазные активности, в том числе и осуществляемая фрагментом d1, демонстрировали выраженный временной лаг при старте реакции добавкой фермента, как показано на рис. 5, *з* (синяя кривая).

Таблица 3. Каталитические активности препаратов Crd и его фрагментов^а

Вариант Crd	Простетические группы	Активность, с ⁻¹		
		MV:циннамат	NADH:циннамат	NADH:FMN
fCrd	2 FMN, 1 FAD, 1 *FMN ^б	22 ± 2	15 ± 2	62 ± 15
aCrd	2 FMN, 1 FAD	0,7 ± 0,1	<0,05	58 ± 13
d1	2 FMN	Н.О. ^в	<0,05	48 ± 21
d3	1 FAD	0,7 ± 0,1	<0,05	Н.О.

Приложение. ^а Среда измерения содержала 120 мкМ NADH или 100 мкМ восстановленного MV в качестве донора электронов и 50 мкМ циннамата или FMN в качестве акцептора электронов. Значения активности приведены для реакций, запущенных добавкой акцептора электронов (реакции, запущенные добавкой фермента, сопровождалась значительным временным лагом).

^б Звездочкой отмечен ковалентно связанный флавин.

^в Н.О. – не определяли.

Полная NADH:циннамат редуктазная активность осуществлялась только fCrd, но не aCrd, не *FMN. Эти данные показывают роль *FMN в передаче электронов от NADHдегидрогеназного участка (d1) Crd на его циннамат редуктазный участок (d3).

Отдельный домен *FAD binding 2* (фрагмент d3) был способен катализировать FMNH₂:циннамат редуктазную реакцию (0,60 ± 0,05 с⁻¹, данные не представлены). Из-за этого возникает возможность катализа полной NADH:циннамат редуктазной реакции при смешении в соотношении 1/1 фрагментов d1 и d3 в присутствии избытка свободного FMN. Такая активность действительно была обнаружена. И хотя ее величина (3,2 ± 0,4 с⁻¹, данные не представлены) была меньше, чем у fCrd, она значительно превышала FMNH₂:циннамат редуктазную активность d3. Этот неожиданный результат может тем не менее быть объяснен разными условиями измерения этих двух активностей. Среда измерения FMNH₂:циннамат редуктазной активности, кроме восстановленного FMN, содержала существенные количества окисленной формы этого кофермента, что могло приводить к ингибированию катализа реакции за счет повышения окислительно-восстановительного потенциала пары FMNH₂^{free}/FMN^{free}. В противоположность этому, при стационарных условиях протекания NADH:циннамат редуктазной реакции, катализируемой смесью d1 + d3, практически весь FMN находился в восстановленной форме. Наличие полной NADH:циннамат редуктазной активности у смеси фрагментов d1 и d3 в присутствии свободного FMN сходно со случаем водорастворимой фумаратредуктазы дрожжей [28], где роль фрагментов d1 и d3 выполняют отдельные ферменты, а перенос электронов между ними осуществляется свободными формами цитоплазматических флавинов.

Моделирование трехмерной структуры

Crd. Было проведено предсказание 3D-структуры гетеродимерного белка Crd с помощью программы AlphaFold2 [21]. Полученная структура состояла из двух частей, соединенных гибким линкером (рис. 8). Одна из частей соответствовала фрагменту d1, состоящему из субъединицы CrdA и гомологичного ей N-концевого домена *NADH:flavin* субъединицы CrdB. Эта часть Crd была сходна с трехмерными структурами гомодимерных NADH:флавинов редуктаз [16, 29]. Вторая часть белка состояла из двух других доменов CrdB – *FAD binding 2* и *FMN bind*.

Четыре флавиновые простетические группы (три молекулы FMN и одну молекулу FAD в их окисленном состоянии), а также NADH и циннамат были размещены в полученной модельной структуре с помощью программы AutoDock Vina [23]. Расположение флавиновых групп (рис. 8) было сходным с таковым для экспериментально определенных 3D-структур NAD(P)H:FMN редуктазы (PDB ID: 1X77; [29]), субъединицы NqrC Na⁺-транслоцирующей NADH:хинон оксидоредуктазы (PDB ID: 4XA7; [30]) и уроканатредуктазы (PDB ID: 6T87; [31]), гомологичных доменам *NADH:flavin*, *FMN bind* и *FAD binding 2* Crd соответственно.

d1-Часть Crd содержит два потенциальных псевдосимметричных NADH-связывающих сайта вблизи флавинов FMN_A и FMN_B, сходных с таковыми, обнаруженными в гомодимерной NADH:флавинов редуктазе [16]. Однако, по-видимому, только FMN_B-сайт может связывать NADH из-за того, что вход нуклеотида в сайт в области FMN_A блокирован C-концевым сегментом CrdA (рис. S3 в Приложении). В соответствии с этим предположением, позиции связывания NADH располагались в двух областях в окрестности FMN_A. Наименьшее расстояние между NADH и FMN_A составляло 10 Å, что слишком далеко для переноса гидрид-иона между

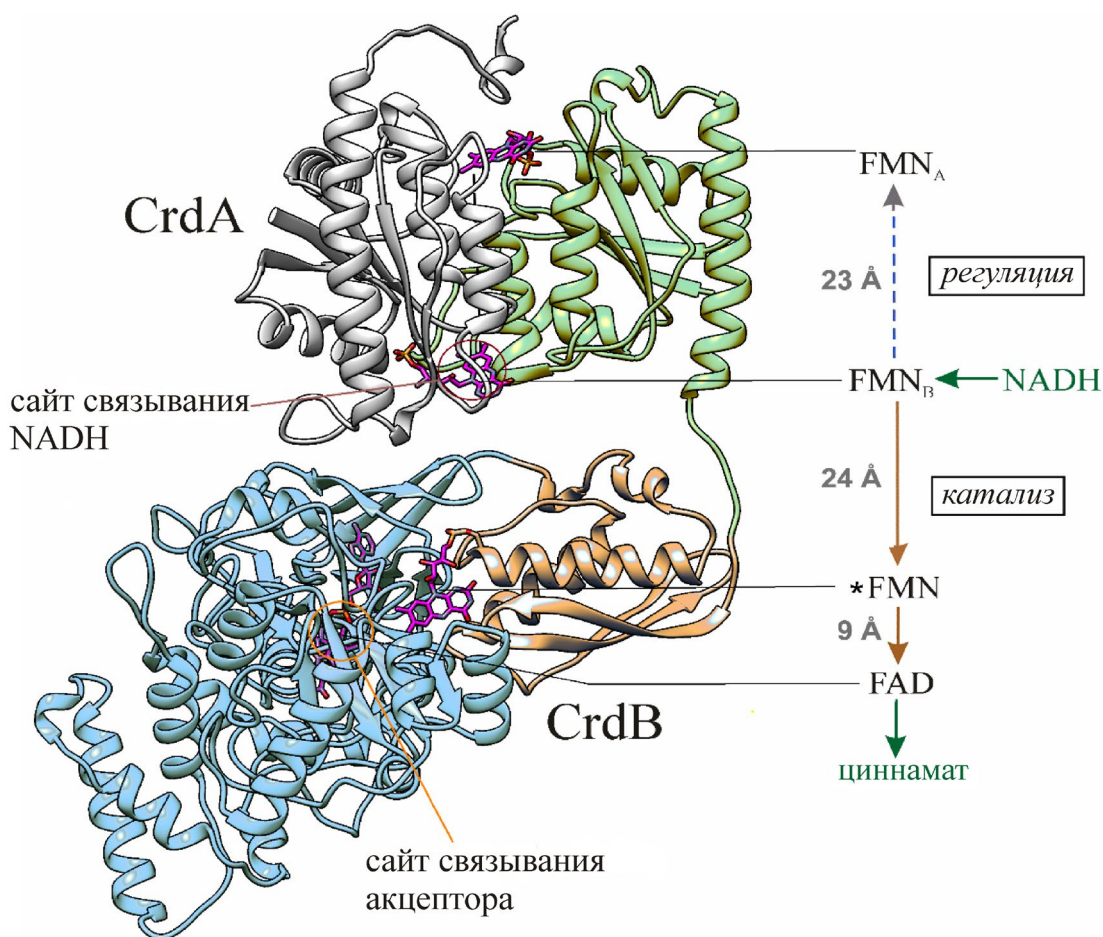


Рис. 8. Предсказанная трехмерная структура Crd со связанными флавиновыми простетическими группами. Домены показаны разными цветами, соответствующими использованным на рис. 1, а. Правая часть рисунка показывает межкраевые расстояния между простетическими группами и предполагаемые пути переноса электрона и гидрид-иона (показаны коричневыми и зелеными стрелками соответственно)

двумя этими группами (для сравнения, расстояние между NADH и FMN_B составляло всего 4 Å). Расчетные эксперименты по докингу не выявляли какого-либо NADH-связывающего участка в домене *FMN bind*. Расположение циннамата в домене *FAD binding 2* CrdB оказалось сходным с таковым для уроканата в уроканатредуктазе [31].

Межкраевое расстояние между FAD и *FMN составляло ~9 Å (рис. 8), что должно приводить к быстрому переносу электронов между двумя этими флавиновыми группами. Это находится в хорошем согласии с наблюдением, что данная стадия не является скоростью-лимитирующей в известных NADH:2-еноат редуктазах [3]. В противоположность этому, FMN_B и *FMN разделены расстоянием в 24 Å (рис. 8), то есть расстоянием, при котором невозможен быстрый перенос электрона. Таким образом, для переноса электрона между FMN_B и *FMN Crd во время катализа должен принимать какую-то альтернативную конформацию, сближающую эти две флавиновые группы. Интересно отметить, что эта же стадия электронного транс-

порта является скоростью-лимитирующей в канонических NADH:2-еноат редуктазах [3], указывая на то, что и в них данное расстояние не является оптимальным.

Качество предсказанной с помощью AlphaFold2 модельной структуры со связанными флавинами было подтверждено МД-симуляцией (рис. S4 в Приложении). В частности, во время проведенных симуляций ни одна из флавиновых групп не была потеряна. Более того, симуляции не приводили к изменению полученной с помощью AlphaFold2 структуры, за исключением движения d1-части, как целого, на 11 Å относительно остальной части белка (рис. S4, а и с в Приложении). Этот результат подтверждает гибкость линкера, соединяющего две части Crd. Тем не менее расстояние между флавиновыми группами существенно не изменялось в смоделированной структуре (рис. S4, b в Приложении), также оно оставалось неизменным в аналогичной структуре, содержащей восстановленные формы флавиновых кофакторов (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Трехдоменные NADH:2-еноат редуктазы широко распространены среди анаэробных и факультативно-анаэробных про- и эукариотических микроорганизмов, что указывает на их важную метаболическую роль. Ферменты с NADH:фумарат редуктазной активностью участвуют в анаэробном дыхании, способствуя реокислению образованного в ходе гликолиза NADH для увеличения продукции АТФ при сбраживании субстратов. Эта роль наиболее полно показана для одноклеточных эукариот класса Kinetoplastida, у которых сукцинат является одним из основных продуктов брожения, а инактивация гликосомальной и митохондриальной NADH:фумарат редуктаз полностью предотвращает фумаратное дыхание [32]. NADH:2-еноат редуктазы с другими субстратными специфичностями могут выполнять и другие функции. Например, NADH:акрилат редуктаза морской бактерии *V. harveyi*, по-видимому, вовлечена в процесс детоксификации акрилата [4], часто присутствующего в разнообразных морских средах обитания, за счет деградации диметилсульфониопропионата, основного осмолита морских водорослей.

Несмотря на то что циннамат редуктаза Crd из *V. ruber* структурно схожа с такими трехдоменными NADH:2-еноат редуктазами, как фумаратредуктаза *K. pneumoniae* и кинетопластид, а также акрилатредуктаза *V. harveyi*, в описанном в ходе данной работы белке наблюдаются и существенные особенности. Во всех этих ферментах восстановление 2-еноата происходит в домене *FAD binding 2* с помощью электронов, перенесенных с ковалентно связанного FMN в домене *FMN bind* [3]. Однако окисление NADH в Crd осуществляется доменом *NADH:flavin*, а не доменом *OYE-like* (как в NADH:фумарат редуктазе *K. pneumoniae* и NADH:акрилат редуктазе *V. harveyi*) или *FAD binding 6* (как в NADH:фумарат редуктазах кинетопластид).

Более того, только Crd содержит в своем составе дополнительную субъединицу (CrdA), представляющую собой одиночный домен *NADH:flavin*, гомологичный такому же домену субъединицы CrdB (51% идентичности, 65% схожести). Ген этой добавочной субъединицы (*crdA*) соседствует с геном *crdB* на одной из хромосом *V. ruber* (рис. 1, в). Это, наряду с наблюдением о совыделении CrdA с 6×His-меченным CrdB на никелевом носителе, указывает на то, что эти два белка образуют прочный комплекс CrdA–CrdB *in vivo*. Определенная стехиометрия для нековалентно связанных с белком FMN и FAD, равная 2/1, также находится в хорошем согласии с гетеродимерным строением Crd, так как NADH:флавин редуктазы прокариот обычно кодируются одним геном, однако функционируют в

виде гомодимера, нековалентно связывающего в качестве простетических групп две молекулы FMN в зоне контакта мономеров [16, 29]. Такое гомодимерное строение NADH:флавин редуктазы, по-видимому, затрудняет прямое слияние этого белка с другими белками с образованием протяженного мультидоменного полипептида.

В аэробных условиях трехдоменные NADH:2-еноат редуктазы катализируют восстановление O_2 с образованием активных форм кислорода (АФК). Например, NADH:фумарат редуктаза *K. pneumoniae* в присутствии кислорода окисляет NADH с формированием H_2O_2 . В этих условиях не наблюдается ускорения окисления NADH в присутствии фумарата, указывая на то, что практически все восстановительные эквиваленты расходуются на образование H_2O_2 [3]. В каких-то случаях образование АФК может быть выгодно для организма. Так, предполагается, что продукция АФК NADH:фумарат редуктазами кинетопластид служит сигналом для завершения цикла развития этих паразитов в организме насекомого-переносчика [33]. Однако интенсивная продукция АФК при переходе в аэробные условия должна быть токсичной для большинства факультативно-анаэробных микроорганизмов. Так, накопление H_2O_2 в среде роста в миллимолярных концентрациях за счет функционирования NADH:флавин редуктазы приводит к гибели клеток молочно-кислой бактерии *Lactobacillus johnsonii* в аэробных условиях [27].

Использование в Crd из *V. ruber* доменов *NADH:flavin* вместо домена *OYE-like* или *FAD binding 6*, присутствующих в других NADH:2-еноат редуктазах, по-видимому, разрешает проблему активной продукции АФК. Домены *NADH:flavin* Crd позволяют использовать уникальный механизм регуляции, обратимо инактивирующий Crd при высоких концентрациях O_2 (рис. 7). Переход между активным и неактивным состояниями в Crd, по-видимому, контролируется редокс-состоянием одной или обеих молекул FMN в доменах *NADH:flavin*. Это заключение подтверждается данными о том, что Crd может быть активирована не только NADH, но и дитионитом, а также тем, что активация/деактивация парциальной ферментативной активности наблюдается на фрагменте d1, но не на фрагменте d3.

Регуляция Crd, по-видимому, связана с гетеродимерной структурой ее NADH-дегидрогеназной части, состоящей из субъединицы CrdA и гомологичного N-концевого домена CrdB (рис. 8). Эта часть Crd сходна с NADH:флавин редуктазами [16, 29], и она также содержит две молекулы нековалентно связанного FMN и два потенциальных сайта окисления NADH. Однако возможность функционирования предполагаемого NADH-связывающего

сайта вблизи FMN_A находится под вопросом из-за стерического эффекта C-концевой петли CrdA, по-видимому, препятствующей связыванию этого кофактора. И если перенос электронов между FMN_B и *FMN может быть осуществлен за счет подвижности *FMN и/или димера доменов *NADH:flavin*, то большое расстояние между FMN_B и FMN_A (рис. 8) не может быть уменьшено подобным образом. Таким образом, перенос электронов между этими флавиновыми группами всегда должен быть медленнее, чем скорость оборота фермента [34]. Эти структурные соображения указывают на то, что FMN_B и FMN_A являются хорошими кандидатами на роль каталитической и регуляторной группы соответственно. Различная роль двух нековалентно связанных FMN в Crd хорошо согласуется со значительными различиями в аминокислотных последовательностях двух доменов *NADH:flavin* в этом белке, в отличие от случая гомодимерных и, следовательно, симметричных *NADH:флавин* редуктаз с двумя идентичными FMN-сайтами [16]. Можно далее предположить, что активация Crd заключается в последовательном восстановлении FMN_B и FMN_A, вызывающем конформационные изменения в белке и формирование функционального пути переноса электронов, связывающего между собой их донор и акцептор.

Замедление активации Crd акцепторами электронов объясняется, по-видимому, их конкуренцией с регуляторной простетической группой (FMN_A) за восстановительные эквиваленты, полученные ферментом при окислении *NADH*. В этом случае скорость активации в присутствии акцепторов электронов должна быть обратно пропорциональна скорости их восстановления. Действительно, такая корреляция наблюдалась – циннамат восстанавливается быстрее (табл. 1) и сильнее замедляет активацию Crd по сравнению с акрилатом (рис. 5). В этом случае отсутствие активации Crd в аэробных условиях может быть объяснено тем, что O₂ способен окислять регуляторную простетическую группу напрямую, без участия длинной цепи переноса электронов, как в случае циннамата или акрилата.

Несмотря на схожесть аминокислотных остатков, вовлеченных в связывание 2-еноата в доменах *FAD binding 2* акрилатредуктазы и Crd (рис. 1, б), последний фермент обладает 1000–6000-кратно меньшей каталитической эффективностью по отношению к акрилату по сравнению с катализом восстановления циннамата и его производных (табл. 1). Более того, (гидрокси)коричные кислоты, но не акрилат, вызывали индукцию синтеза Crd в клетках *V. ruber* (рис. 4). Таким образом, позиции аминокислотных остатков, взаимодействующих с карбоксильными группами акцептора электронов в фумаратредуктазах, не являются

единственными детерминантами субстратной специфичности других *NADH:2-еноат* редуктаз. Восстановление токсичных для клеток [35] циннамата и его производных, по-видимому, является основной физиологической ролью Crd. Это заключение хорошо согласуется с индукцией синтеза белка Crd не только в анаэробных, но и в аэробных условиях (табл. 2). Наряду с этим, возможно, Crd способен поддерживать анаэробное дыхание *V. ruber* с использованием циннамата и его гидроксильных производных, как это описано для кафеил-CoA редуктазы из ацетогенной бактерии *Acetobacterium woodii* [36]. Самые эффективные субстраты Crd (кофеат и ферулат) являются предшественниками при синтезе лигнина и других вторичных фенольных метаболитов в наземных растениях. Поэтому эти соединения широко распространены в разнообразных наземных средах обитания (например, в почве и кишечнике животных), но редко встречаются в морских нишах, где они синтезируются лишь очень немногочисленными водорослями [37, 38]. Интересным исключением из этого правила являются заросли морской травы, накапливающие высокие концентрации кофейной кислоты и других фенольных соединений в своей ризосфере [35], которая, возможно, и является основной средой обитания Crd-содержащих морских бактерий [39].

Схожие с Crd редуктазы довольно редко встречаются среди морских организмов, по-видимому, из-за малой распространенности (гидрокси)коричных кислот в морской среде обитания. Так, поиск с помощью программы Blast выявляет Crd-подобные белки лишь у таких морских бактерий, как *Vibrio rhizosphaerae*, *Vibrio gazogenes*, *Vibrio salinus*, *Vibrio spartinae* и *Vibrio tritonius*. В то же время эти белки довольно широко распространены среди наземных анаэробных микроорганизмов, в том числе среди бактерий, входящих в состав микробиома кишечника человека. Эти белки встречаются у многочисленных представителей родов *Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Paenibacillus*, *Streptococcus* и многих других. В кишечнике млекопитающих наблюдается довольно высокая концентрация фенилпропионата и *n*-гидроксифенилпропионата [40]. Ранее считалось, что образование этих соединений связано с функционированием негомологичной Crd двухдоменной 2-еноат редуктазы [1]. Однако широкое распространение Crd-подобных белков у кишечных бактерий позволяет предположить, что эти белки также вовлечены в образование фенилпропионата и *n*-гидроксифенилпропионата в кишечнике.

Двухдоменные 2-еноат редуктазы имеют значительный потенциал для применения в различных областях биотехнологии для продукции хиральных соединений, лекарств и ароматизи-

рующих добавок [11, 41]. Однако их применение в значительной степени осложняется тем, что эти ферменты крайне чувствительны к кислороду и быстро и необратимо инактивируются в аэробных условиях [1, 11]. Таким образом, менее чувствительные к O₂ Crd-подобные белки являются привлекательной альтернативой для практического применения.

Вклад авторов. А.В. Богачев – концепция работы; Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Анашкин, А.А. Байков, А.В. Богачев – получение результатов и анализ данных; А.А. Байков и А.В. Богачев – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00133).

Благодарности. MALDI-MS и лазерный сканер были доступны для нас в результате реализации Программы развития Московского государственного университета 5.13. Эта работа посвящена светлой памяти Владимира Петровича Скулачева.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 89, вып. 2, 2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tischer, W., Bader, J., and Simon, H. (1979) Purification and some properties of a hitherto-unknown enzyme reducing the carbon-carbon double bond of α,β -unsaturated carboxylate anions, *Eur. J. Biochem.*, **97**, 103-112, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033>.
2. Besteiro, S., Biran, M., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P., and Bringaud, F. (2002) Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 38001-38012, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201759200>.
3. Bertsova, Y. V., Oleynikov, I. P., and Bogachev, A. V. (2020) A new water-soluble bacterial NADH: fumarate oxidoreductase, *FEMS Microbiol. Lett.*, **367**, fnaa175, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa175>.
4. Bertsova, Y. V., Serebryakova, M. V., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2022) A novel, NADH-dependent acrylate reductase in *Vibrio harveyi*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **88**, e0051922, <https://doi.org/10.1128/aem.00519-22>.
5. Bertsova, Y. V., Kostyrko, V. A., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2014) Localization-controlled specificity of FAD:threonine flavin transferases in *Klebsiella pneumoniae* and its implications for the mechanism of Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1122-1129, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.006>.
6. Serebryakova, M. V., Bertsova, Y. V., Sokolov, S. S., Kolesnikov, A. A., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2018) Catalytically important flavin linked through a phosphoester bond in a eukaryotic fumarate reductase, *Biochimie*, **149**, 34-40, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.03.013>.
7. Rohdich, F., Wiese, A., Feicht, R., Simon, H., and Bacher, A. (2001) Enoate reductases of *Clostridia*. Cloning, sequencing, and expression, *J. Biol. Chem.*, **276**, 5779-5787, <https://doi.org/10.1074/jbc.M008656200>.
8. Kuno, S., Bacher, A., and Simon, H. (1985) Structure of enoate reductase from a *Clostridium tyrobutyricum* (C. spec. La1), *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **366**, 463-472, <https://doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.1.463>.
9. Caldeira, J., Feicht, R., White, H., Teixeira, M., Moura, J. J., Simon, H., and Moura, I. (1996) EPR and Mössbauer spectroscopic studies on enoate reductase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 18743-18748, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18743>.
10. Giesel, H., and Simon, H. (1983) On the occurrence of enoate reductase and 2-oxo-carboxylate reductase in clostridia and some observations on the amino acid fermentation by *Peptostreptococcus anaerobius*, *Arch. Microbiol.*, **135**, 51-57, <https://doi.org/10.1007/BF00419482>.
11. Mordaka, P. M., Hall, S. J., Minton, N., and Stephens, G. (2018) Recombinant expression and characterisation of the oxygen-sensitive 2-enoate reductase from *Clostridium sporogenes*, *Microbiology (Reading)*, **164**, 122-132, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000568>.
12. Shieh, W. Y., Chen, Y. W., Chaw, S. M., and Chiu, H. H. (2003) *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 479-484, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02307-0>.
13. Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Bloch, D. A., and Verkhovsky, M. I. (2012) Urocanate reductase: Identification of a novel anaerobic respiratory pathway in *Shewanella oneidensis* MR-1, *Mol. Microbiol.*, **86**, 1452-1463, <https://doi.org/10.1111/mmi.12067>.
14. Light, S. H., Méheust, R., Ferrell, J. L., Cho, J., Deng, D., Agostoni, M., Iavarone, A. T., Banfield, J. F., D'Orazio, S. E. F., and Portnoy, D. A. (2019) Extracellular electron transfer powers flavinylated extracellular reductases in Gram-positive bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 26892-26899, <https://doi.org/10.1073/pnas.1915678116>.
15. Bogachev, A. V., Baykov, A. A., and Bertsova, Y. V. (2018) Flavin transferase: the maturation factor of flavin-containing oxidoreductases, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1161-1169, <https://doi.org/10.1042/BST20180524>.

16. Koike, H., Sasaki, H., Kobori, T., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M. E., Adman, E. T., and Tanokura, M. (1998) 1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins, *J. Mol. Biol.*, **280**, 259-273, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1871>.
17. Bertsova, Y. V., Kulik, L. V., Mamedov, M. D., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2019) Flavodoxin with an air-stable flavin semiquinone in a green sulfur bacterium, *Photosynth. Res.*, **142**, 127-136, <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00658-1>.
18. Bertsova, Y. V., Fadeeva, M. S., Kostyrko, V. A., Serebryakova, M. V., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2013) Alternative pyrimidine biosynthesis protein ApbE is a flavin transferase catalyzing covalent attachment of FMN to a threonine residue in bacterial flavoproteins, *J. Biol. Chem.*, **288**, 14276-14286, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455402>.
19. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
20. Ells, A. H. (1959) A colorimetric method for the assay of soluble succinic dehydrogenase and pyridinenucleotide-linked dehydrogenases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 561-562, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90527-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90527-2).
21. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
22. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all, *Nat. Meth.*, **19**, 679-682, <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.
23. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
24. Case, D.A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Ben-Shalom, I. Y., Berryman, J. T., Brozell, S. R., et al. (2022) Amber 2022, University of California, San Francisco.
25. Bolanos-Garcia, V. M., and Davies, O. R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1304-1313, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>.
26. Bertsova, Y. V., Serebryakova, M. V., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2021) The flavin transferase ApbE flavinylates the ferredoxin:NAD⁺-oxidoreductase Rnf required for N₂ fixation in *Azotobacter vinelandii*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **368**, fnab130, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab130>.
27. Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., and de Mattos, M. J. (2014) H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2229-2239, <https://doi.org/10.1128/AEM.04272213>.
28. Kim, S., Kim, C. M., Son, Y. J., Choi, J. Y., Siegenthaler, R. K., Lee, Y., Jang, T. H., Song, J., Kang, H., Kaiser, C. A., and Park, H. H. (2018) Molecular basis of maintaining an oxidizing environment under anaerobiosis by soluble fumarate reductase, *Nat. Commun.*, **9**, 4867, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07285-9>.
29. Agarwal, R., Bonanno, J. B., Burley, S. K., and Swaminathan, S. (2006) Structure determination of an FMN reductase from *Pseudomonas aeruginosa* PA01 using sulfur anomalous signal, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 383-391, <https://doi.org/10.1107/S0907444906001600>.
30. Borshchevskiy, V., Round, E., Bertsova, Y., Polovinkin, V., Gushchin, I., Ishchenko, A., Kovalev, K., Mishin, A., Kachalova, G., Popov, A., Bogachev, A., and Gordeliy, V. (2015) Structural and functional investigation of flavin binding center of the NqrC subunit of sodium-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*, *PLoS One*, **10**, e0118548, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118548>.
31. Venskutonytė, R., Koh, A., Stenström, O., Khan, M. T., Lundqvist, A., Akke, M., Bäckhed, F., and Lindkvist-Petersson, K. (2021) Structural characterization of the microbial enzyme urocanate reductase mediating imidazole propionate production, *Nat. Commun.*, **12**, 1347, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21548-y>.
32. Coustou, V., Besteiro, S., Riviére, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J. M., Boshart, M., Baltz, T., and Bringaud, F. (2005) A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16559-16570, <https://doi.org/10.1074/jbc.M500343200>.
33. Wagnies, M., Plazolles, N., Schenk, R., Villafraz, O., Dupuy, J.W., Biran, M., Bachmaier, S., Baudouin, H., Clayton, C., Boshart, M., and Bringaud, F. (2021) Metabolic selection of a homologous recombination-mediated gene loss protects *Trypanosoma brucei* from ROS production by glycosomal fumarate reductase, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100548, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100548>.
34. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction, *Nature*, **402**, 47-52, <https://doi.org/10.1038/46972>.

35. Sogin, E. M., Michellod, D., Gruber-Vodicka, H. R., Bourceau, P., Geier, B., Meier, D. V., Seidel, M., Ahmerkamp, S., Schorn, S., D'Angelo, G., Procaccini, G., Dubilier, N., and Liebeke, M. (2022) Sugars dominate the seagrass rhizosphere, *Nat. Ecol. Evol.*, **6**, 866-877, <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01740-z>.
36. Bertsch, J., Parthasarathy, A., Buckel, W., and Müller, V. (2013) An electron-bifurcating caffeoyl-CoA reductase, *J. Biol. Chem.*, **288**, 11304-11311, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444919>.
37. Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C., and Ralph, J. (2009) Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture, *Curr. Biol.*, **19**, 169-175, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.031>.
38. Fernando, I. P., Kim, M., Son, K. T., Jeong, Y., and Jeon, Y. J. (2016) Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach, *J. Med. Food*, **19**, 615-628, <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3706>.
39. Rameshkumar, N., and Nair, S. (2009) Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **67**, 455-467, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00638.x>.
40. Smith, E. A., and Macfarlane, G. T. (1996) Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism, *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 288-302, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb04331.x>.
41. Knaus, T., Toogood, H. S., and Scrutton, N. S. (2016) *Ene-Reductases and Their Applications*. Green Biocatalysis, John Wiley and Sons, Inc., pp. 473-488.
42. Sievers, F., and Higgins, D. G. (2018) Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences, *Protein Sci.*, **27**, 135-145, <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.

A REDOX-REGULATED, HETERODIMERIC NADH:CINNAMATE REDUCTASE IN *Vibrio ruber*

Y. V. Bertsova, M. V. Serebryakova, V. A. Anashkin, A. A. Baykov, and A. V. Bogachev*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow Russia; e-mail: bogachev@belozersky.msu.ru*

Genes of putative reductases of α,β -unsaturated carboxylic acids are abundant among anaerobic and facultatively anaerobic microorganisms, yet substrate specificity has been experimentally verified for few encoded proteins. Here, we co-produced in *Escherichia coli* a heterodimeric protein of the facultatively anaerobic marine bacterium *Vibrio ruber* (GenBank SJN56019 and SJN56021; annotated as NADPH azoreductase and urocanate reductase, respectively) with *Vibrio cholerae* flavin transferase. The isolated protein (named Crd) consists of the *sjn56021*-encoded subunit CrdB (*NADH:flavin*, *FAD binding 2*, and *FMN bind* domains) and an additional subunit CrdA (SJN56019, a single *NADH:flavin* domain) that interact via their *NADH:flavin* domains (AlphaFold2 prediction). Each domain contains a flavin group (three FMNs and one FAD in total), one of the FMN groups being linked covalently by the flavin transferase. Crd readily reduces cinnamate, *p*-coumarate, caffeate, and ferulate under anaerobic conditions with NADH or methyl viologen as the electron donor, is moderately active against acrylate and practically inactive against urocanate and fumarate. Cinnamates induced Crd synthesis in *V. ruber* cells grown aerobically or anaerobically. The Crd-catalyzed reduction started by NADH demonstrated a time lag of several minutes, suggesting a redox regulation of the enzyme activity. The oxidized enzyme is inactive, which apparently prevents production of reactive oxygen species under aerobic conditions. Our findings identify Crd as a regulated NADH-dependent cinnamate reductase, apparently protecting *V. ruber* from (hydroxy)cinnamate poisoning.

Keywords: anaerobic respiration, cinnamate, caffeate, enzyme regulation, reactive oxygen species, rhizosphere, *Vibrio*