

## АКРИЛАТРЕДУКТАЗА АНАЭРОБНОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *Shewanella woodyi*

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

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

Поступила в редакцию 22.02.2024

После доработки 19.03.2024

Принята к публикации 20.03.2024

В отсутствие кислорода многие микроорганизмы способны к анаэробному дыханию с использованием различных органических соединений в качестве терминальных акцепторов для электрон-транспортной цепи. В представленной работе произведена идентификация белка, ответственного за восстановление акрилата в анаэробной дыхательной цепи морской бактерии *Shewanella woodyi*. Показано, что полученные при разделении периплазматических белков *S. woodyi* фракции, обладающие акрилатредуктазной активностью, содержат белок ArdA (Swoo\_0275) в качестве основного компонента. Гетерологичная экспрессия генов *ardA/ardB* (*swoo\_0275/swoo\_0276*), но не одиночного гена *ardA* (*swoo\_0275*) в клетках *Shewanella oneidensis* MR-1 приводит к появлению в их периплазме несвойственной для этой бактерии акрилатредуктазной активности. Эти данные позволяют заключить, что флавоцитохром с ArdAB (Swoo\_0275/Swoo\_0276) ответственен за восстановление акрилата в клетках *S. woodyi*. ArdAB обладает высокой субстратной специфичностью и, кроме акрилата среди других 2-еноатов, способен восстанавливать только метакрилат, хотя и с 22-кратно меньшей скоростью по сравнению с восстановлением акрилата. Экспрессия гена *ardA* индуцируется присутствием акрилата или метакрилата в среде при анаэробном выращивании *S. woodyi*, что сопровождается появлением акрилатредуктазной активности в периплазме этой бактерии. Восстановление акрилата с помощью ArdAB позволяет осуществлять диметилсульфониопропионатзависимое анаэробное дыхание *S. woodyi* и, по-видимому, многих других морских бактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** анаэробное дыхание, акриловая кислота, флавоцитохром, DMSP-лиаза, DddY, *Shewanella*.

DOI: 10.31857/S0320972524040099 EDN: ZFFRMP

### ВВЕДЕНИЕ

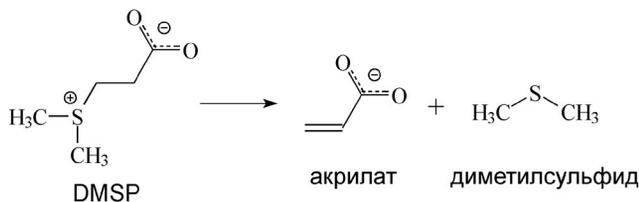
В отсутствие кислорода многие микроорганизмы способны к анаэробному «дыханию» с использованием различных неорганических или органических соединений в качестве терминальных акцепторов электронов для дыхательной электрон-транспортной цепи. Среди органических соединений наиболее типичным терминальным акцептором является fumarat. Однако вариabельность аминокислотных остатков, формирующих каталитический центр гомологов fumarатредуктазы во многих бактериях, предполагает существова-

ние и других 2-еноатредуктазных активностей [1]. Действительно, среди гомологов fumarатредуктазы были идентифицированы ферменты с иной субстратной специфичностью, например, цитохром с:метакрилат-оксидоредуктазы, цитохром с:уроканат-оксидоредуктазы, NADH:(гидроксид)циннамат-оксидоредуктазы и NADH:акрилат-оксидоредуктазы [1–6].

Изучение регуляции экспрессии гена NADH:акрилат-оксидоредуктазы из морской бактерии *Vibrio harveyi* показало, что этот фермент индуцируется акрилатом вне зависимости от концентрации кислорода в среде роста [1]. Из-за этого вполне веро-

Принятые сокращения: ДСН – додецилсульфат натрия; Ard – акрилатредуктаза; DMSO – диметилсульфоксид; DMSP – диметилсульфониопропионат; MS – масс-спектрометрия; MV – метилвиологен.

\* Адресат для корреспонденции.

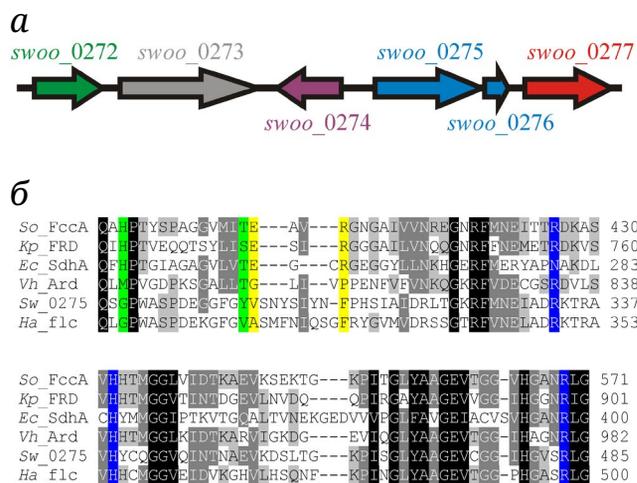


**Рис. 1.** Катализируемая DMSP-лиазой DddY реакция разложения диметилсульфиопропионата

ятно, что основной функцией NADH:акрилат-оксидоредуктазы является детоксификация акрилата в цитоплазме *V. harveyi*, а не собственно анаэробное дыхание на этой ненасыщенной карбоновой кислоте. В связи с этим интересно идентифицировать белки, прямо участвующие в работе анаэробной дыхательной цепи, использующей акрилат в качестве терминального акцептора электронов. Способность использовать акрилат в качестве терминального акцептора была ранее обнаружена с помощью микробиологических подходов у бактерии *Halodesulfovibrio aestuarii* (ранее известной как *Desulfovibrio acrylicus*), однако участвующие в этом процессе белки не были идентифицированы [7].

Основным природным источником свободной акриловой кислоты является диметилсульфиопропионат (DMSP) [8]. Это соединение, используемое многими морскими водорослями и растениями в качестве осмолита, накапливается в цитоплазме клеток этих организмов в больших (вплоть до сотен мМ) концентрациях. Как следствие, в земной биосфере образуется порядка  $10^9$  тонн DMSP в год, и он составляет существенный источник углерода, восстановленной серы и энергии для многих морских бактерий. Разложение DMSP бактериальными DMSP-лиазами DddL, DddP, DddQ, DddW и DddY сопровождается образованием акрилата (рис. 1) [8], что делает присутствие акриловой кислоты довольно характерным для разных морских экологических ниш.

DMSP-лиаза DddY занимает особое место среди этих ферментов. Она проявляет высокую удельную активность и имеет необычную для DMSP-лиаз периплазматическую локализацию в бактериальной клетке [9]. Последний факт указывает на то, что образующийся из DMSP акрилат может не транспортироваться внутрь клетки, а использоваться в периплазматическом пространстве, и это хорошо согласуется с гипотетической ролью акрилата в качестве терминального акцептора электронов для анаэробной электрон-транспортной цепи. Действительно, контекстный анализ *dddY*-содержащих бактериальных геномов (работы Curson et al. и Arkhipova et al. [8–10], рис. S1 Приложения) показал, что у многих морских бактерий (например, из родов *Shewanella*, *Ferrimonas* и *Arcobacter*) в непосредственной близости от гена *dddY* на хромосоме



**Рис. 2.** *dddY*-Ассоциированные гены морской бактерии *Shewanella woodyi*. **а** – Расположение *dddY*-ассоциированных генов на хромосоме *S. woodyi*: *swoo\_0272* – ген NADPH:акрилоил-CoA-оксидоредуктазы; *swoo\_0273* – гипотетического белка с неизвестными функциями; *swoo\_0274* – регулятора транскрипции; *swoo\_0275* – флавиноидсодержащей субъединицы флавоцитохрома *c*; *swoo\_0276* – тетрагеомового цитохрома *c*; *swoo\_0277* – DMSP-лиазы DddY ([https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_organism?org=T00676](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism?org=T00676)). **б** – Выравнивание аминокислотных последовательностей цитохром *c*: фумарат-оксидоредуктазы из *S. oneidensis* MR-1 (So\_FccA, GenBank: AAN54044), NADH:фумарат-оксидоредуктазы из *Klebsiella pneumoniae* (Kp\_FRD, B5XR0), субъединицы SdhA сукцинатдегидрогеназы из *Escherichia coli* (Ec\_SdhA, HD3930178), NADH:акрилат-оксидоредуктазы из *V. harveyi* (Vh\_Ard, P0DW92), белка Swoo\_0275 *S. woodyi* (Sw\_0275, ACA84576) и флавоцитохрома *c* из *H. aestuarii* (Ha\_flg, SHJ73509). Два приведённых фрагмента выравнивания содержат аминокислотные остатки (выделены синим и зелёным цветом), вовлечённые в связывание соответственно C4- и C1-карбоксилатов фумарата в фумаратредуктазах, а также остатки (выделены жёлтым), участвующие в переносе протона к фумарату

расположены гены, кодирующие одну или две копии флавиноидсодержащих и гем С-содержащих субъединиц гипотетического флавоцитохрома *c* (*swoo\_0275* и *swoo\_0276* на рис. 2, **а** соответственно), сходного с цитохром *c*:фумарат-оксидоредуктазами этих бактерий. Продукты этих генов содержат сигнальные пептиды Tat- и Sec-типа для флавиноид- и гемсодержащих субъединиц соответственно, что указывает на периплазматическую локализацию зрелых белков. Биоинформатический анализ позиций аминокислотных остатков, участвующих в связывании восстанавливаемого субстрата [1, 4], показывает, что продукты *dddY*-ассоциированных генов флавиноидсодержащих субъединиц флавоцитохрома *c* содержат в своём составе аминокислотные остатки, ответственные за связывание карбоксильной группы, соответствующей C4-карбоксильной группе фумарата. Однако вместо консервативных остатков His и Thr(Ser) фумаратредуктаз, прини-

мающих участие в связывании C1-карбоксильной группы fumarата, в первичной структуре представленных на рис. S1 Приложения DddY-ассоциированных редуктаз находятся остатки Gly и Tur соответственно (рис. 2, б). Таким образом, можно заключить, что DddY-ассоциированные флавоцитохромы с участвуют в восстановлении какой-то другой, отличной от fumarата  $\alpha,\beta$ -ненасыщенной карбоновой кислоты.

Обращает на себя внимание присутствие в большинстве *dddY*-ассоциированных генных кластеров гена, кодирующего NADPH:акрилоил-CoA-оксидоредуктазу *AcuI* (*swoo\_0272* на рис. 2, а), ответственную во многих бактериях за детоксификацию цитоплазматического акрилата [11]. Эти данные могут указывать на то, что весь генный кластер *swoo\_0272*–*swoo\_0277* кодирует белки, связанные с метаболизмом акрилата. Если это так, то описанный выше флавоцитохром с *Swoo\_0275/Swoo\_0276* *S. woodyi* и гомологичные ферменты из других *dddY*-содержащих бактерий являются хорошими кандидатами на роль акрилатредуктаз анаэробной дыхательной цепи. Экспериментальная проверка этого предположения и была целью данной работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы и условия их выращивания.** Клетки *Shewanella woodyi* выращивали при 25 °C в жидкой среде MR (31,5% морских солей («Marine Life», Россия), 20 mM L-лактат, 0,5%-ный пептон, 0,25%-ный дрожжевой экстракт, 20 mM HEPES/NaOH (pH 7,5)) аэробно или анаэробно в присутствии различных акцепторов электронов или их сочетаний (0,5–20 mM диметилсульфоксид (DMSO), акрилат или метакрилат). Анаэробные выращивания проводили в герметичных стеклянных колбах, полностью заполненных средой. Анаэробные условия достигались за счёт собственной оксидазной активности клеток.

Клетки *Shewanella oneidensis* растили при 28 °C аэробно в жидкой среде LB или анаэробно в жидкой среде, содержащей 0,225 г/л  $K_2HPO_4$ , 0,225 г/л  $KH_2PO_4$ , 0,46 г/л NaCl, 0,225 г/л  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,117 г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 20 mM L-лактат, 0,05%-ный дрожжевой экстракт, 20 mM DMSO, 20 mM HEPES/NaOH (pH 7,2). При необходимости в среды роста *S. oneidensis* добавляли канамицин (50 мкг/мл).

**Конструирование экспрессионных векторов.** Экспрессионный вектор для компонентов флавоцитохрома *ArgDA* был получен за счёт амплификации *ard*-оперона (*swoo\_0275*–*swoo\_0276*) с геномной ДНК *S. woodyi* при использовании высокоточной полимеразы *Tersus* («Евроген», Россия) и праймеров *Sh\_wood\_dir/Sh\_wood\_CR4\_rev* (последователь-

ности праймеров указаны в табл. S1 Приложения). Амплифицированный фрагмент (2571 п.н.) клонировали в вектор pCR4-TOPO («Invitrogen», США) с получением плазмиды pSwoo\_0275&Swoo\_0276.

Экспрессионный вектор для белка *ArgDA* получали с помощью частичного гидролиза плазмиды pSwoo\_0275&Swoo\_0276 эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *NotI*. Укороченный на 350 п.н. продукт затупляли и самолигировали с получением плазмиды pSwoo\_0275. Сконструированные плазмиды проверяли секвенированием и трансформировали в клетки *S. oneidensis* MR-1 с помощью электропорации.

**Получение периплазматической фракции из клеток *Shewanella*.** Клетки *S. woodyi* или *S. oneidensis* осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин) и дважды промывали буфером (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) для *S. woodyi* или 75 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) для *S. oneidensis*). Периплазматическую фракцию получали обработкой полимиксином Б [12, 13]. Для этого клеточный осадок суспендировали в соответствующем буфере промывки ( $6\text{--}9 \times 10^{10}$  клеток/мл), содержащем полимиксин Б (2000 единиц/мл), и инкубировали на льду в течение 20 мин. Обработанные полимиксином клетки удаляли центрифугированием (10 000 g, 10 мин), а полученный супернатант использовали в качестве периплазматической фракции для измерения акрилатредуктазной активности и для выделения *ArgD* (акрилатредуктазы).

**Выделение и характеристика *ArgD*.** Для выделения *ArgD* клетки растили анаэробно в шести литрах среды MR, содержащей 20 mM DMSO и 1,5 mM акрилат (выход биомассы составлял ~170 мг клеточного белка). Полученную из этих клеток периплазматическую фракцию концентрировали с помощью 30-кДа центрифужного фильтра, разбавляли средой (10 mM Tris-HCl (pH 8,0)) до 80 mM концентрации NaCl и наносили на колонку с DEAE-сефарозой CL-6B (16 × 30 мм), уравновешенную буфером 1 (10 mM Tris-HCl (pH 8,0)), содержащим 80 mM NaCl. Колонку промывали тремя объёмами буфера 1, содержащего 100 mM NaCl, после чего смывали *ArgD* с помощью линейного градиента NaCl от 100 до 340 mM в буфере 1. Остаточный белок смывали с колонки 2 M NaCl в буфере 1. Наиболее активные фракции *ArgD* (~0,6 мг белка) объединяли, концентрировали на центрифужном фильтре и хранили при –70 °C. Концентрацию белка определяли бицинхониновым методом [14], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Связанные с *ArgD* флавины экстрагировали трифторуксусной кислотой и разделяли с помощью ВЭЖХ, как описано ранее [13]. Электрофорез в ДСН-ПААГ (ДСН-ПААГЭ, ДСН – додецилсульфат натрия) проводили с использованием 12,5%-ных полиак-

риламидных гелей [15]. Гели окрашивали на белок с помощью раствора PageBlue™ («Fermentas», Литва), либо на гем С 3,3',5,5'-тетраметилбензидином и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [16]. MALDI-TOF MS-анализ (MS – масс-спектрометрия) проводили на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF-TOF («Bruker Daltonik», Германия), как описано ранее [5].

#### Определение ферментативных активностей.

Акрилатредуктазную активность определяли на спектрофотометре Hitachi-557 («Hitachi», Япония) при 606 нм по окислению восстановленного метилвиологена (MV,  $\epsilon_{606} = 13,7 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Измерение проводили при 25 °С в герметичной кювете объёмом 3,2 мл, полностью заполненной средой. Среда измерения содержала 100 мМ HEPES/Tris (pH 7,5), 0,05–1 мМ акцептора электронов и 1 мМ MV. Создание анаэробных условий и восстановление MV осуществлялось за счёт дробных добавок дитионита. При этом MV восстанавливали до значений оптической плотности ~1,5–2,0 при 606 нм, что соответствовало ~110–150 мкМ восстановленной и ~850–890 мкМ окисленной формы MV. Одну единицу ферментативной активности определяли как количество фермента, катализирующего окисление 2 мкмоль MV за 1 мин.

Параметры уравнения Михаэлиса–Ментен для акрилат- и метакрилатредуктазных активностей Ard при 0–50 мкМ концентрации (мет)акрилата определяли по интегральной кинетике восстановления этих акцепторов электронов при 606 нм до полного исчерпания акцептора. Все измерения проводили при насыщающих концентрациях восстановленного MV (значение кажущейся  $K_m$  Ard для MV  $\leq 2$  мкМ). Скорости рассчитывали для 20 временных точек интегральной кинетики при её дифференцировании ( $-d[MV]/dt$ ) 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. Скорости восстановления (мет)акрилата в 0,05–1 мМ диапазоне их концентраций определяли по начальной скорости реакции, как описано выше. Фиттирование данных уравнением Михаэлиса–Ментен проводили с помощью нелинейной регрессии.

Пропионатдегидрогеназную активность измеряли при 600 нм в присутствии феназинметасульфата и 2,6-дихлорфенолиндофенола в качестве акцепторов электронов. Среда измерения содержала 100 мМ HEPES/Tris (pH 7,5), 2 мМ пропионат, 2 мМ феназинметасульфат и 25 мкМ 2,6-дихлорфенолиндофенол.

**Индукция акрилатредуктазной активности и экспрессии генов *ardA* и *dddY* в клетках *S. woodyi*.** Клетки *S. woodyi* растили аэробно или

анаэробно в среде MR, содержащей 20 мМ DMSO и соответствующий индуктор, в течение 4 ч для определения экспрессии генов методом количественной полимеразной цепной реакции (рвПЦР) или в течение 14 ч для измерения акрилатредуктазной активности.

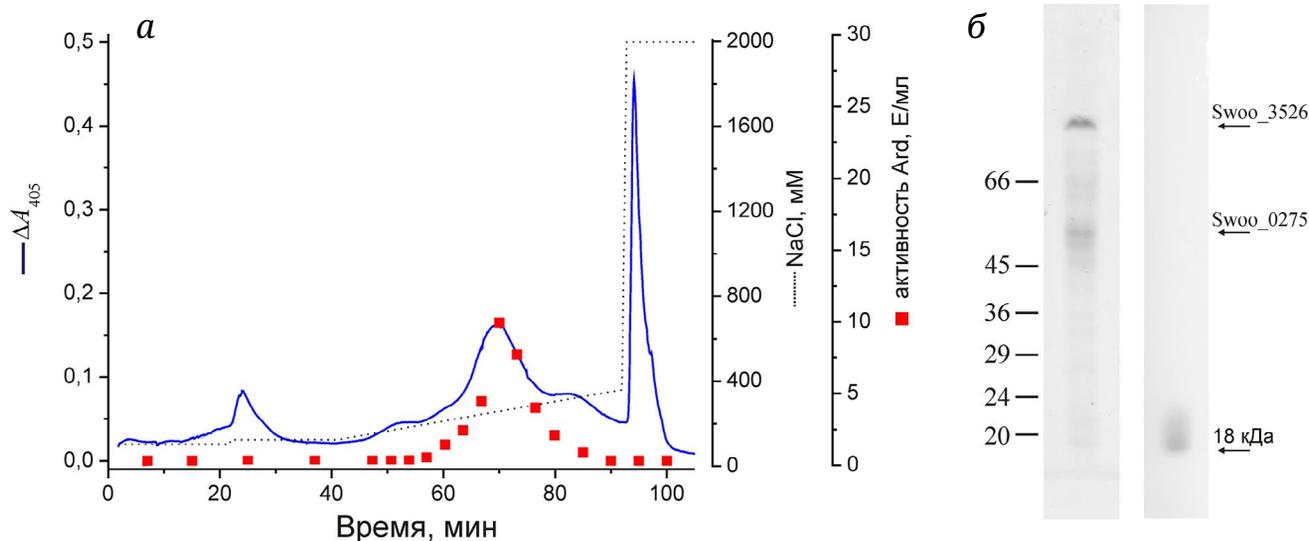
Экстракцию РНК из клеток *S. woodyi* проводили с помощью кита RNA Solo («Евроген»). Полученный препарат дополнительно обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазой I («Thermo Fisher Scientific», США) при 37 °С в течение 1 ч. кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT («Евроген») со случайными декануклеотидными праймерами. Для каждой реакции ставили контрольную пробу, не содержащую обратной транскриптазы. рвПЦР проводили с помощью набора qPCRMix-HS SYBR («Евроген»), используя полученные препараты кДНК в качестве матрицы и пар праймеров A1/A2 или D3/D4 (табл. S1 Приложения) для определения экспрессии *ardA* и *dddY* соответственно. Для нормализации использовали 16S рРНК (праймеры 16s\_FWS/16s\_RV). Для калибровки использовали последовательные разведения геномной ДНК *S. woodyi*, содержащей гены для DddY, ArdA и 16S рРНК в соотношении 1 : 1 : 10.

**Биоинформатика.** Геномный контекстный анализ генов *dddY* проводили с использованием программы webFlags [17]. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы Clustal Omega [18]. Клеточную локализацию бактериальных белков предсказывали, используя программу SignalP 6.0 [19]. Предсказание оперонной структуры проводили с помощью сервиса Operon-mapper [20], наличие терминаторов транскрипции определяли программой iTermPseKNC [21]. Идентификацию белков масс-спектрометрией проводили поиском MS- и MS/MS-ионов в базе данных NCBI, используя программный пакет Mascot 2.3.02 («Matrix Science», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение Ard из периплазматической фракции *S. woodyi*.** Для поиска Ard анаэробной дыхательной цепи в качестве модельного организма нами была выбрана морская светящаяся бактерия *S. woodyi* [22], так как её геном содержит описанный выше *dddY*-ассоциированный генный кластер (рис. 2, а и рис. S1 Приложения), она способна расщеплять DMSP и демонстрирует высокую акрилатредуктазную активность при анаэробном выращивании в присутствии акрилата (см. последний раздел Результаты).

Из выращенных в присутствии акрилата клеток *S. woodyi* выделяли периплазматическую фракцию и разделяли её ионообменной хроматографией



**Рис. 3.** Выделение Ard из клеток *S. woodyi*. *a* – Разделение периплазматической фракции клеток *S. woodyi*, выращенных анаэробно в присутствии акрилата, с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе. Поглощение света при 405 нм показано синей кривой, концентрация NaCl показана пунктиром. Красными квадратами обозначена акрилатредуктазная активность в полученных фракциях. *б* – ДСН-ПААГЭ полученного препарата Ard. На каждую дорожку наносили по 2 мкг белка. Гель окрашивали либо на белок с помощью Кумасси (левая панель), либо на гем С с помощью тетраметилбензидина/ $H_2O_2$  (правая панель). Полосы с числами с левой стороны указывают положение белковых маркеров молекулярных весов. Белковые полосы, идентифицированные с помощью MALDI-MS, указаны с правой стороны

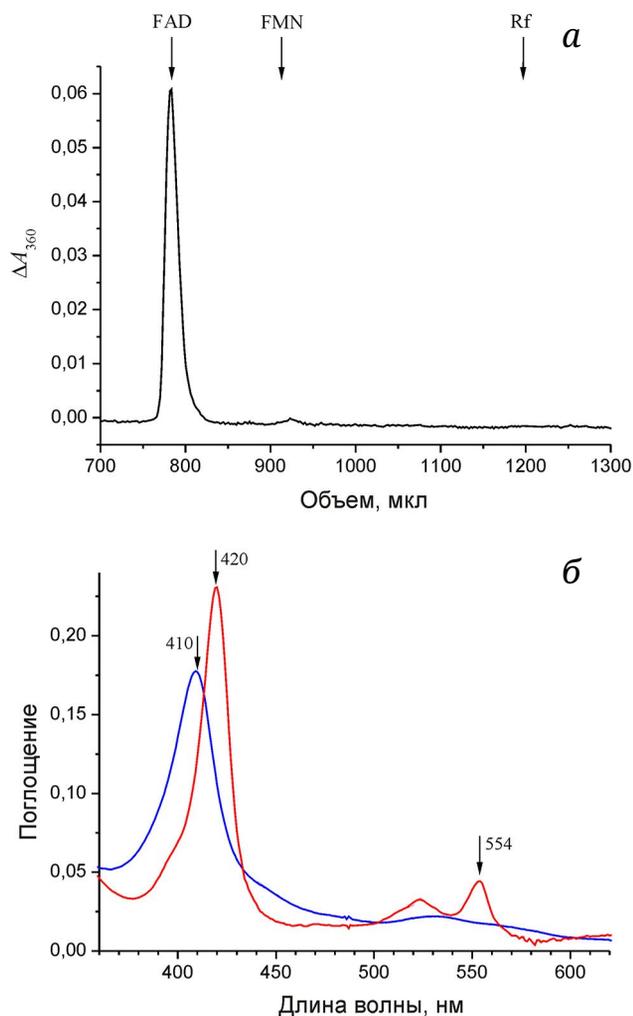
на DEAE-сефарозе с детекцией акрилатредуктазной активности. При хроматографии наблюдался единственный пик этой активности (рис. 3, *a*), который хорошо совпадал с одним из пиков цитохромов, детектируемых по поглощению света с длиной волны 405 нм.

Разделение полученного препарата с помощью ДСН-ПААГЭ выявило в нём два основных белка с массой  $\approx 80$  и 52 кДа (рис. 3, *б*, левая панель). MS- и MS/MS-анализ этих полос показал, что верхняя полоса представляет собой редуктазу триметиламин-N-оксида TorA (Swo\_3526, покрытие последовательности – 50%), тогда как полоса с массой  $\approx 52$  кДа идентифицировалась как флавинодержащая субъединица флавоцитохрома *c* (Swo\_0275, покрытие последовательности – 65%), то есть именно тот белок, который был биоинформатически предсказан в качестве субъединицы гипотетического Ard.

Определение флавинов в полученном препарате (рис. 4, *a*) показало, что в нём детектируется только FAD ( $5 \text{ нмоль мг}^{-1}$ ). Это также находится в хорошем согласии с идентификацией Ard *S. woodyi*, так как все известные на сегодняшний день флавоцитохром *c* содержат FAD в качестве простетической группы [2–4, 23, 24]. Спектральный анализ полученного препарата показал, что он также содержит цитохром типа *c* (рис. 4, *б*). Важно отметить, что примесный периплазматический белок TorA не содержит в своём составе ни флавинов, ни гемов С [25]. Окраска электрофоре-

граммы выделенного препарата на гем С (рис. 3, *б*, правая панель) выявляет гемсодержащую полосу с массой  $\approx 18$  кДа. Однако MS- и MS/MS-анализы этой полосы не позволили идентифицировать соответствующий белок. По-видимому, это связано с тем, что предполагаемая цитохромная субъединица Ard (Swo\_0276) содержит в своей первичной структуре четыре последовательности SxxCH и, по-видимому, присоединяет четыре гема восьмью ковалентными связями. Таким образом, этот белок потенциально способен образовывать лишь один немодифицированный триптический пептид (на N-конце зрелого белка), аминокислотную последовательность которого также нельзя однозначно предсказать из-за альтернативных возможностей отрезания лидерного пептида.

**Гетерологичная экспрессия генов *swo\_0275/swo\_0276* из *S. woodyi* в клетках *S. oneidensis* MR-1.** Фракционирование периплазматической фракции клеток *S. woodyi* позволяет предположить, что Ard этой бактерии представляет собой флавоцитохром *c* Swo\_0275/Swo\_0276. Однако наличие в выделенном препарате дополнительного белка (TorA) и невозможность идентификации Swo\_0276 с помощью масс-спектрометрии сделало необходимым использование альтернативных подходов для доказательства правильности идентификации Ard. Для этого мы провели гетерологичную экспрессию гена *swo\_0275* и генов *swo\_0275/swo\_0276* из *S. woodyi* в клетках *S. oneidensis* MR-1.



**Рис. 4.** Идентификация простетических групп Ard. *a* – Разделение нековалентно связанных с Ard флавинов с помощью ВЭЖХ. Объёмы удержания стандартов FAD, FMN и рибофлавина (Rf) показаны стрелками. *б* – Спектры поглощения окисленного воздухом (синяя кривая) и восстановленного дитионитом (красная кривая) препаратов Ard. Спектры измеряли в 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0) буфере, содержащем 0,1 мг/мл Ard. Специфичные для цитохромов с максимумы поглощения  $\gamma$ - и  $\alpha$ -полос показаны стрелками

Было обнаружено, что клетки *S. oneidensis* MR-1, выращенные в присутствии или в отсутствии акрилата как в аэробных, так и в анаэробных условиях, не обладают собственной акрилатредуктазной активностью (табл. 1). Внесение плазмиды, содержащей гены *swoo\_0275/swoo\_0276*, в клетки *S. oneidensis* MR-1 приводило к появлению акрилатредуктазной активности в периплазматической фракции полученного штамма. В то же время экспрессия одиночного гена флавиновой субъединицы (*swoo\_0275*) не сопровождалась появлением акрилатредуктазной активности в клетках *S. oneidensis* (табл. 1).

Таким образом, данные гетерологичной экспрессии подтверждают предположение о том, что

**Таблица 1.** Удельные активности Ard в периплазматических фракциях клеток различных штаммов *S. oneidensis*, выращенных аэробно в отсутствие акрилата

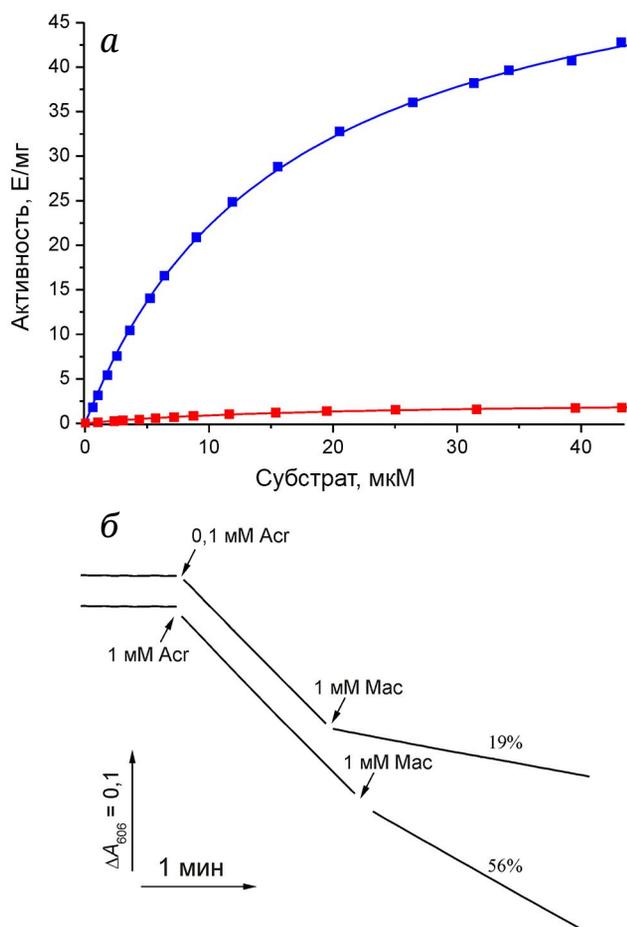
Штамм	Акрилатредуктазная активность <sup>1</sup> (нмоль мин <sup>-1</sup> мг клеточного белка <sup>-1</sup> )
<i>S. oneidensis</i> MR-1	< 0,3
<i>S. oneidensis</i> /pSwo0_0275&Swo0_0276	19 ± 4
<i>S. oneidensis</i> /pSwo0_0275	< 0,3

<sup>1</sup> Среднее для двух независимых измерений.

Ard *S. woodyi* представляет собой флавоцитохром с, состоящий из FAD-содержащей субъединицы Swo0\_0275 (ArdA) и гем С-содержащей субъединицы Swo0\_0276 (ArdB).

**Субстратная специфичность Ard.** Редуктазная активность Ard по отношению к различным природным  $\alpha,\beta$ -ненасыщенным карбоновым кислотам была измерена при их концентрации 1 мМ. Как оказалось, фермент Ard довольно специфичен и способен восстанавливать только акрилат и метакрилат, но не кротоновую, фумаровую, сорбиновую, урокановую, коричную, *n*-кумаровую, кофейную или феруловую кислоты. Также оказалось, что для активности Ard необходимо наличие карбоксильной группы в восстанавливаемом субстрате, и поэтому этот фермент не восстанавливал акриламид. Активность Ard была максимальной при pH ≈ 7,5.

Для акрилата и метакрилата были определены кинетические параметры соответствующих ферментативных редуктазных активностей. В случае акрилата наблюдалась гиперболическая зависимость скорости катализируемой реакции от концентрации этого субстрата с  $K_m$  16 ± 0,4 мкМ и максимальной удельной активностью 58 ± 0,5 мкмоль мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> (рис. 5, *a*). Величина  $K_m$  для метакрилата была практически такой же (19 ± 1,1 мкМ), но значение максимальной удельной активности (2,6 ± 0,1 мкмоль мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup>) было в 22 раза меньше (рис. 5, *a*, рис. S2 Приложения). Такое сходство в значениях  $K_m$  и существенное различие в значениях максимальной удельной активности указывает на то, что метакрилат может выступать в качестве конкурентного ингибитора акрилатредуктазной активности Ard. Действительно, внесение метакрилата в среду для измерения акрилатредуктазной активности приводило к ингибированию редуктазной активности фермента, зависящему от соотношения концентраций метакрилат/акрилат (рис. 5, *б*). Остальные исследованные  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные карбоновые



**Рис. 5.** Каталитические характеристики ArgD из *S. woodyi*. *a* – Зависимость ферментативной активности ArgD от концентрации акрилата (синие квадраты) или метакрилата (красные квадраты). Показаны значения акрилат- и метакрилатредуктазных активностей ArgD, полученные с помощью анализа интегральной кинетики восстановления акцепторов в 0,5–50 мкМ диапазоне концентраций (мет)акрилата. Линиями показаны результаты фиттирования полученных данных уравнением Михаэлиса–Ментен (данные для метакрилата в увеличенном масштабе приведены на рис. S2 Приложения). *б* – Типичные кривые окисления MV в присутствии ArgD. Добавки 1 или 0,1 мМ акрилата (Acr) и 1 мМ метакрилата (Mac) указаны стрелками. Числа над кривыми указывают остаточную ферментативную активность ArgD после добавки метакрилата, где активность до этой добавки принимали за 100%

кислоты (см. выше) не обладали таким эффектом и не ингибировали акрилатредуктазную активность ArgD.

Была также проверена способность ArgD катализировать обратную акрилатредуктазную реакцию. Оказалось, что этот белок не способен окислять пропионат при использовании феназинметасульфата и дихлорфенолиндофенола в качестве акцепторов электронов. Таким образом, ArgD, так же как и многие другие редуктазы ненасыщенных карбоновых кислот [1, 2, 4, 13, 24], катализирует однона-

правленную реакцию и функционирует в качестве молекулярного диода [26].

**Индукция синтеза ArgD в клетках *S. woodyi*.** Для определения способности различных субстратов ArgD вызывать индукцию его синтеза в клетках *S. woodyi* проводили выращивание этой бактерии в аэробных или анаэробных условиях в отсутствие или в присутствии 1,5 мМ акрилата или метакрилата (выбранная концентрация субстрата равна максимальной концентрации акрилата, при которой ещё наблюдался анаэробный рост), а также в присутствии 5 мМ DMSP. Как видно в табл. 2, акрилатредуктазная активность не детектировалась в клетках *S. woodyi* при аэробном выращивании, в том числе и в присутствии в среде роста использованных потенциальных индукторов. Напротив, при анаэробном выращивании даже в отсутствие индукторов в клетках детектировалась низкая, но измеряемая акрилатредуктазная активность. Эта активность умеренно повышалась в присутствии DMSP и значительно индуцировалась в присутствии акрилата или метакрилата (в ~30 и 80 раз соответственно).

Сходные результаты были получены и при измерении уровня транскрипции *ard*-генов. Биоинформатический анализ показал, что гены *swoo\_0275–swoo\_0276* образуют на хромосоме *S. woodyi* оперон (*ard*), не включающий в свой состав ген *dddY* (*swoo\_0277*). Поэтому регуляцию транскрипции измеряли отдельно для *ard*-оперона и для гена *dddY*. Как видно в табл. 2, в аэробных условиях индукции *ard*-оперона не наблюдалось. Анаэробные условия выращивания приводили к ~13-кратному повышению транскрипции *ard*, присутствие в анаэробной среде роста акрилата или метакрилата сопровождалось дополнительным 4–11-кратным повышением транскрипции этого оперона (табл. 2).

Сходным образом индуцировалась и транскрипция гена *dddY* (*swoo\_0277*). Максимальный уровень транскрипции наблюдался в анаэробных условиях в присутствии акрилата или метакрилата (табл. 2). Однако в случае гена *dddY* максимальное воздействие оказывало присутствие в среде роста несопряжённых карбоновых кислот, а анаэробные условия роста сами по себе были хоть и необходимым, но недостаточным условием для повышения транскрипции этого гена.

Для определения способности *S. woodyi* использовать субстраты ArgD в качестве терминальных акцепторов электронов для анаэробного дыхания клетки этой бактерии выращивали в присутствии акрилата, метакрилата или DMSP, используя классический акцептор электронов DMSO в качестве контроля. Было обнаружено, что акрилат в концентрациях, превышающих 1 мМ, ингибировал анаэробный рост *S. woodyi*, что хорошо

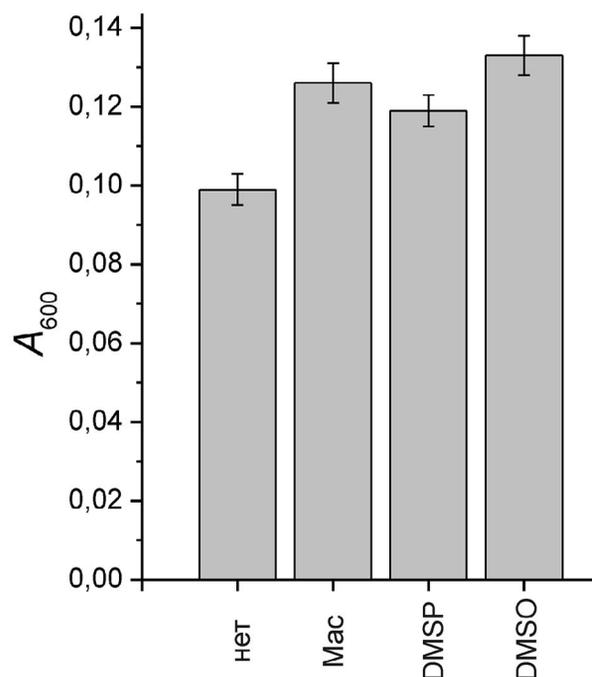
**Таблица 2.** Уровни транскрипции генов *ardA* и *dddY*, а также величины акрилатредуктазной активности в клетках *S. woodyi*, выращенных в различных условиях

Условия выращивания	Акрилатредуктазная активность (нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> )	<i>ardA</i> мРНК/рРНК × 10 <sup>-6</sup>	<i>dddY</i> мРНК/рРНК × 10 <sup>-6</sup>
+ O <sub>2</sub> , без индукторов	< 0,3	1,5 ± 0,2	3,2 ± 0,6
+ O <sub>2</sub> , 5 мМ DMSP	< 0,3	0,9 ± 0,1	2,7 ± 0,4
+ O <sub>2</sub> , 1,5 мМ акрилат	< 0,3	1,6 ± 0,3	3,5 ± 0,2
+ O <sub>2</sub> , 1,5 мМ метакрилат	< 0,3	0,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1
- O <sub>2</sub> , без индукторов	9,0 ± 4,0	20 ± 2,0	2,6 ± 0,2
- O <sub>2</sub> , 5 мМ DMSP	45 ± 15	13 ± 1,0	1,7 ± 0,2
- O <sub>2</sub> , 1,5 мМ акрилат	260 ± 30	87 ± 5,0	21 ± 1,0
- O <sub>2</sub> , 1,5 мМ метакрилат	780 ± 50	220 ± 40	27 ± 2,0

согласуется с известной токсичностью этого соединения [11, 27]. Поскольку концентрации терминального акцептора электронов менее 1 мМ не позволяют обнаружить стимуляцию роста при анаэробном дыхании, дальнейшие эксперименты проводили с использованием 10 мМ метакрилата, который гораздо менее токсичен [28], а также с такой же концентрацией DMSP или DMSO. Метакрилат и DMSP увеличивали выход биомассы на 20–25% (рис. 6). Похожий эффект вызывал и DMSO.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые эксперименты показали, что (i) полученные при разделении периплазматических белков *S. woodyi* фракции, обладающие акрилатредуктазной активностью, содержат белок ArdA (Swoo\_0275) в качестве одного из основных компонентов; (ii) гетерологичная экспрессия генов *ardA/ardB* (*swoo\_0275/swoo\_0276*), но не одиночного гена *ardA* (*swoo\_0275*) в клетках *S. oneidensis* MR-1 приводит к появлению в их периплазме несвойственной для этой бактерии акрилатредуктазной активности; (iii) экспрессия *ard*-оперона индуцируется присутствием акрилата или метакрилата в среде при анаэробном выращивании *S. woodyi*, что сопровождается появлением акрилатредуктазной активности в периплазме этой бактерии. Совокупность этих наблюдений позволяет заключить, что флавоцитохром *c* ArdAB (Swoo\_0275/Swoo\_0276) ответственен за восстановление акрилата в клетках *S. woodyi*. По аналогии со сходными ферментами [28] можно предположить, что природным донором электронов для Ard является низкопотенциальный цитохром *s*.



**Рис. 6.** Анаэробный рост *S. woodyi* в присутствии различных акцепторов электронов. Начальная оптическая плотность при посеве культуры составляла 0,005. Клетки выращивали анаэробно при 25 °C в течение 18 ч. Где указано, в среду роста добавляли 10 мМ метакрилат (Mac), DMSP или DMSO (столбец «нет» – без добавления акцепторов). Показаны конечные значения оптической плотности культур при 600 нм, планки погрешностей указывают стандартные отклонения для трёх биологических повторов

Анализ ферментативной активности Ard показал, что этот белок довольно специфичен и восстанавливает только акрилат и метакрилат. По-видимому, в каталитическом центре Ard способны связываться  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные карбоновые кислоты только с небольшими по размеру

заместителями в  $\alpha$ - и  $\beta$ -положениях. При этом белок более чувствителен к размеру заместителя в  $\beta$ -положении, так как Ard не способен восстанавливать кротонат ( $\beta$ -метилакрилат), тогда как метакрилат ( $\alpha$ -метилакрилат) восстанавливается Ard, хотя и с низкой скоростью. В случае метакрилата наличие метильной группы в  $\alpha$ -положении слабо влияет на связывание этого соединения с Ard, однако, по-видимому, приводит к неправильной ориентации субстрата в активном центре, значительно замедляющей перенос гидрид-иона или протона на метакрилат. Это, по-видимому, и объясняет 22-кратное различие метакрилат-редуктазной и акрилатредуктазной активностей Ard (рис. 5).

Исследование индукции синтеза Ard в клетках *S. woodyi* показало, что максимальная активность этого белка наблюдается в анаэробных условиях в присутствии акрилата и особенно метакрилата (табл. 2). Большой индуцирующий эффект метакрилата, по-видимому, не физиологичен и объясняется медленным исчерпанием этого соединения в среде роста из-за низкой активности Ard по отношению к метакрилату. Интересно, что DMSP был лишь слабым индуктором Ard, возможно, из-за большей индукции Ard по сравнению с DddY в анаэробных условиях, вследствие чего стационарная концентрация акрилата при росте в присутствии DMSP должна быть незначительной. Такое соотношение активностей Ard и DddY, по-видимому, позволяет избежать токсического действия акрилата при DMSP-зависимом анаэробном росте этой бактерии.

Акрилатзависимая индукция синтеза Ard в анаэробных условиях и её отсутствие в аэробных условиях выращивания указывают на то, что данный белок нужен клеткам *S. woodyi* для анаэробного дыхания, использующего этот субстрат как терминальный акцептор в электрон-транспортной цепи. Проверка такого предположения осложнялась тем, что эта бактерия неспособна к анаэробному росту в минимальной среде, а использование богатых сред обеспечивает её анаэробный рост даже в отсутствии акцепторов электронов, что значительно снижает наблюдаемый эффект стимуляции ими анаэробного роста. Нам не удалось обнаружить стимуляцию роста *S. woodyi* в анаэробных условиях в присутствии акрилата (данные не представлены). Как уже отмечено выше, это, по-видимому, связано с токсичностью этой ненасыщенной карбоновой кислоты [11, 27], что не позволяет использовать концентрации акрилата более 1 мМ. Однако в присутствии метакрилата и DMSP наблюдалось небольшое, но достоверное увеличение выхода биомассы (на 20–25%), сравнимое с эффектом такого классического терминального акцептора, как DMSO (рис. 6).

Гены Ard-подобных белков широко распространены среди различных морских бактерий и зачастую вместе с геном *dddY* образуют на хромосоме характерный генный кластер (рис. S1 Приложения), по-видимому, позволяющий осуществлять анаэробное дыхание на таком широко распространённом в морских экологических нишах соединении, как DMSP. *H. aestuarii*, единственная описанная ранее бактерия, способная использовать образованный из DMSP акрилат в качестве терминального акцептора электронов [7], также содержит в своём геноме такой кластер, в том числе и ген ArdA-подобного белка (GenBank: SHJ73509). Аминокислотные последовательности белков ArdA из *S. woodyi* и *H. aestuarii* сходны между собой (50% идентичности, 66% сходства), особое сходство наблюдается для аминокислотных остатков каталитического центра (рис. 2, б). Интересно, что геном *S. oneidensis* MR-1 тоже содержит генный кластер *dddY-ardAB* (*so\_3622-so\_3624*), однако он инактивирован транспозоном ISSod3 [29], что, по-видимому, связано с адаптацией этой пресноводной бактерии к жизни в условиях, в которых водоросли и растения не синтезируют DMSP из-за низкой осмолярности среды.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе идентифицирован фермент, ответственный за восстановление акрилата в электрон-транспортной цепи *S. woodyi*. Возможность протекания этой реакции позволяет осуществлять DMSP-зависимое анаэробное дыхание у этой и, по-видимому, у многих других морских бактерий.

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

**Благодарности.** MALDI-MS был доступен для нас в результате реализации Программы развития Московского государственного университета 5.13.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00043).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer ([www.springer.com/journal/10541](http://www.springer.com/journal/10541)), том 89, вып. 4, 2024.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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>.
2. Mikoulinskaia, O., Akimenko, V., Galouchko, A., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1999) Cytochrome *c*-dependent methacrylate reductase from *Geobacter sulfurreducens* AM-1, *Eur. J. Biochem.*, **263**, 346-352, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00489.x>.
3. Gross, R., Simon, J., and Kröger, A. (2001) Periplasmic methacrylate reductase activity in *Wolinella succinogenes*, *Arch. Microbiol.*, **176**, 310-313, <https://doi.org/10.1007/s002030100323>.
4. 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>.
5. Bertsova, Y. V., Serebryakova, M. V., Anashkin, V. A., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2024) A redox-regulated, heterodimeric NADH:cinnamate reductase in *Vibrio ruber*, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 241-256, <https://doi.org/10.1134/S0006297924020056>.
6. Little, A. S., Younker, I. T., Schechter, M. S., Bernardino, P. N., Méheust, R., Stenczynski, J., Scorza, K., Mallowney, M. W., Sharan, D., Waligurski, E., Smith, R., Ramanswamy, R., Leiter, W., Moran, D., McMillin, M., Odenwald, M. A., Iavarone, A. T., Sidebottom, A. M., Sundararajan, A., Pamer, E. G., Eren, A. M., and Light, S. H. (2024) Dietary- and host-derived metabolites are used by diverse gut bacteria for anaerobic respiration, *Nat. Microbiol.*, **9**, 55-69, <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01560-2>.
7. Van der Maarel, M. J. E. C., van Bergeijk, S., van Werkhoven, A. F., Laverman, A. M., Meijer, W. G., Stam, W. T., and Hansen, T. A. (1996) Cleavage of dimethylsulfonylpropionate and reduction of acrylate by *Desulfovibrio acrylicus* sp. nov., *Arch. Microbiol.*, **166**, 109-115, <https://doi.org/10.1007/s002030050363>.
8. Curson, A. R., Todd, J. D., Sullivan, M. J., and Johnston, A. W. (2011) Catabolism of dimethylsulphonylpropionate: microorganisms, enzymes and genes, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 849-859, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2653>.
9. Curson, A. R., Sullivan, M. J., Todd, J. D., and Johnston, A. W. (2011) DddY, a periplasmic dimethylsulfonylpropionate lyase found in taxonomically diverse species of Proteobacteria, *ISME J.*, **5**, 1191-1200, <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.203>.
10. Arkhipova, O. V., Meer, M. V., Mikoulinskaia, G. V., Zakharova, M. V., Galushko, A. S., Akimenko, V. K., and Kondrashov, F. A. (2015) Recent origin of the methacrylate redox system in *Geobacter sulfurreducens* AM-1 through horizontal gene transfer, *PLoS One*, **10**, e0125888, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125888>.
11. Todd, J. D., Curson, A. R., Sullivan, M. J., Kirkwood, M., and Johnston, A. W. (2012) The *Ruegeria pomeroyi* *acuI* gene has a role in DMSP catabolism and resembles *yhdH* of *E. coli* and other bacteria in conferring resistance to acrylate, *PLoS One*, **7**, e35947, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035947>.
12. Peek, J. A., and Taylor, R. K. (1992) Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6210-6214, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6210>.
13. 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<sup>+</sup>-translocating NADH:quinone oxidoreductase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1122-1129, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.006>.
14. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
15. 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>.
16. Thomas, P. E., Ryan, D., and Levin, W. (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **75**, 168-176, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90067-1).
17. Saha, C. K., Sanches Pires, R., Brolin, H., Delannoy, M., and Atkinson, G. C. (2021) FlaGs and webFlaGs: discovering novel biology through the analysis of gene neighbourhood conservation, *Bioinformatics*, **37**, 1312-1314, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa788>.
18. 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>.
19. Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2022) SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 1023-1025, <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>.

20. Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., and Merino, E. (2018) Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes, *Bioinformatics*, **34**, 4118-4120, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty496>.
21. Feng, C. Q., Zhang, Z. Y., Zhu, X. J., Lin, Y., Chen, W., Tang, H., and Lin, H. (2019) iTerm-PseKNC: a sequence-based tool for predicting bacterial transcriptional terminators, *Bioinformatics*, **35**, 1469-1477, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty827>.
22. Makemson, J. C., Fulayfil, N. R., Landry, W., van Ert, L. M., Wimpee, C. F., Widder, E. A., and Case, J. F. (1997) *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 1034-1039, <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1034>.
23. Dobbin, P. S., Butt, J. N., Powell, A. K., Reid, G. A., and Richardson, D. J. (1999) Characterization of a flavocytochrome that is induced during the anaerobic respiration of Fe<sup>3+</sup> by *Shewanella frigidimarina* NCIMB400, *Biochem. J.*, **342**, 439-448, <https://doi.org/10.1042/bj3420439>.
24. Morris, C. J., Black, A. C., Pealing, S. L., Manson, F. D., Chapman, S. K., Reid, G. A., Gibson, D. M., and Ward, F. B. (1994) Purification and properties of a novel cytochrome: flavocytochrome *c* from *Shewanella putrefaciens*, *Biochem. J.*, **302**, 587-593, <https://doi.org/10.1042/bj3020587>.
25. Czjzek, M., Dos Santos, J. P., Pommier, J., Giordano, G., Méjean, V., and Haser, R. (1998) Crystal structure of oxidized trimethylamine N-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **284**, 435-447, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2156>.
26. Sucheta, A., Ackrell, B. A., Cochran, B., and Armstrong, F. A. (1992) Diode-like behavior of a mitochondrial electron-transport enzyme, *Nature*, **356**, 361-362, <https://doi.org/10.1038/356361a0>.
27. Sieburth, J. M. (1961) Antibiotic properties of acrylic acid, a factor in the gastrointestinal antibiosis of polar marine animals, *J. Bacteriol.*, **82**, 72-79, <https://doi.org/10.1128/jb.82.1.72-79.1961>.
28. Arkhipova, O. V. (2023) Methacrylate redox systems of anaerobic bacteria, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **59**, 766-777, <https://doi.org/10.1134/S0003683823060017>.
29. Romine, M. F., Carlson, T. S., Norbeck, A. D., McCue, L. A., and Lipton, M. S. (2008) Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3257-3265, <https://doi.org/10.1128/AEM.02720-07>.

## ACRYLATE REDUCTASE OF AN ANAEROBIC ELECTRON TRANSPORT CHAIN OF THE MARINE BACTERIUM *Shewanella woodyi*

**Y. V. Bertsova, M. V. Serebryakova, V. A. Bogachev, 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*

Many microorganisms are capable of anaerobic respiration in the absence of oxygen, by using different organic compounds as terminal acceptors in electron transport chain. We identify here an anaerobic respiratory chain protein responsible for acrylate reduction in the marine bacterium *Shewanella woodyi*. When the periplasmic proteins of *S. woodyi* were separated by ion exchange chromatography, acrylate reductase activity copurified with an ArdA protein (Swoo\_0275). Heterologous expression of *S. woodyi ardA* gene (swoo\_0275) in *Shewanella oneidensis* MR-1 cells did not result in the appearance in them of periplasmic acrylate reductase activity, but such activity was detected when the *ardA* gene was co-expressed with an *ardB* gene (swoo\_0276). Together, these genes encode flavocytochrome *c* ArdAB, which is thus responsible for acrylate reduction in *S. woodyi* cells. ArdAB was highly specific for acrylate as substrate and reduced only methacrylate (at a 22-fold lower rate) among a series of other tested 2-enoates. In line with these findings, acrylate and methacrylate induced *ardA* gene expression in *S. woodyi* under anaerobic conditions, which was accompanied by the appearance of periplasmic acrylate reductase activity. ArdAB-linked acrylate reduction supports dimethylsulfoniopropionate-dependent anaerobic respiration in *S. woodyi* and, possibly, other marine bacteria.

**Keywords:** anaerobic respiration, acrylic acid, flavocytochrome, DMSP lyase, DddY, *Shewanella*