

УДК 577.15

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНОЙ HydSL ГИДРОГЕНАЗЫ *Thiocapsa bogorovii* И ЕЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ С УСЕЧЕННЫМ HydS БЕЛКОМ

© 2023 г. А. С. Стародубов¹ *, М. Х. Хасимов¹,
А. Н. Хустнутдинова¹, Н. А. Зорин¹, А. А. Цыганков¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Пушкинский
научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: alexkex3@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 30.09.2022 г.

Принята к публикации 07.10.2022 г.

Показано, что природная HydSL и модифицированная Δ54 HydSL гидрогеназы, выделенные из *Thiocapsa bogorovii*, сходны по удельной активности, зависимости активности от температуры и термостабильности. Полученные данные свидетельствуют о том, что С-концевой домен не принимает участия в стабилизации белковой структуры гидрогеназы при тепловом воздействии. Ионы серебра быстро и необратимо ингибировали активность HydSL и Δ54HydSL. В присутствии Ag⁺ наблюдалось снижение пика поглощения в области 410 нм, что указывало на разрушение железосерных кластеров. Кроме того, наблюдалось разрушение белковой глобулы. Длительное воздействие Ag⁺ вызывало изменения ИК-Фурье спектров гидрогеназы, что свидетельствовало о разрушении NiFe-активного центра. Предполагается, что первой мишенью ионов серебра является дистальный железосерный кластер, причем расположенный вблизи него С-конец HydS способен взаимодействовать с ионами серебра, снижая таким образом локальную концентрацию ионов.

Ключевые слова: HydSL гидрогеназа, *Thiocapsa bogorovii*, С-концевой фрагмент HydS, модифицированная гидрогеназа HydSL, термостабильность, водород, нитрат серебра

DOI: 10.31857/S0555109923040141, **EDN:** QZNSAD

Гидрогеназы микроорганизмов участвуют в метаболизме водорода, катализируя обратимую реакцию восстановления протонов до молекулярного водорода. По содержанию металлов в активном центре различают три основные группы ферментов: NiFe-гидрогеназы, содержащие биметаллический железоникелевый активный центр, FeFe-гидрогеназы, содержащие двухатомный кластер железа в активном центре и Fe-гидрогеназы, не содержащие металлов в белковой глобуле, но использующие Fe-содержащий кофактор [1, 2]. Термостабильная HydSL-гидрогеназа (КФ: 1.12.99.6) из пурпурной серной бактерии *Thiocapsa bogorovii* BBS (прежнее название штамма: *Thiocapsa roseopersicina* BBS [3]) относится к первой подгруппе NiFe-гидрогеназ [2]. Она была выделена как фермент, состоящий из двух субъединиц: малой HydS и большой HydL [4]. В большой субъединице (HydL) находится NiFe-активный центр, а малая субъединица (HydS) содержит три FeS-кластера, которые образуют транспортную систему для внутримолекулярного переноса электронов между

активным центром и поверхностью фермента [1]. Ранее для этой гидрогеназы показано, что С-концевой участок HydS принимает участие в закреплении гидрогеназы на мембране, по-видимому, путем связывания с трансмембранным Isp1 белком, который на основании структуры hyd-оперона считается входящим в тетрамерный мембранный комплекс HydS-Isp1-Isp-2-HydL [5, 6]. Этот С-концевой участок находится вблизи дистального FeS кластера, и его роль в стабилизации конформации молекулы гидрогеназы неизвестна. Удаление этого участка и присоединение гистидиновой метки может помочь в ориентированной иммобилизации гидрогеназы на поверхности с уменьшенным расстоянием от электрода до дистального FeS кластера. HydSL гидрогеназа *T. bogorovii* BBS с удаленными 54 аминокислотными остатками с С-конца HydS, Δ54HydSL и введением гистидиновой метки описана ранее [5].

Цель работы — сравнение активности, температурной зависимости, термостабильности и устойчивости к токсическому действию ионов серебра

природной HydSL модифицированной $\Delta 54$ HydSL гидрогеназы.

МЕТОДИКА

Клетки пурпурной серной бактерии *Thiocapsa bogorovii* и мутанта ($\Delta 54$ HydSL?) выращивали в анаэробных фотогетеротрофных условиях на модифицированной среде Пфеннига [7]. Получение мутанта с модифицированной гидрогеназой описано ранее [5]. При его выращивании в среду добавляли 25 мкг/л канамицина. В работе использовали метилвиологен, HEPES и реактивы для электрофореза в ПААГ фирмы “Sigma” (Германия), фенилсефарозу CL-4B “Pharmacia” (Швеция), ДЭАЭ-целлюлозу DE₅₂ “Whatman” (Англия) и дитионит натрия “Fluka” (Швейцария). Остальные реактивы — отечественного производства марок х. ч. и о. с. ч.

Получение экстрактов клеток и очистка гидрогеназы. Для получения природной и модифицированной гидрогеназ использовали одну и ту же методику. Клетки отделяли от культуральной жидкости в конце экспоненциальной фазы роста на проточной центрифуге. Клеточную пасту ресуспендировали в 20 мМ К-фосфатном буфере (pH 7.0) и разрушали обработкой ацетоном, затем ультразвуком на дезинтеграторе УЗГТ-01/22 (22 кГц, 3 раза по 10 мин, 10°C) как описано ранее [8]. Неразрушенные клетки и их осколки осаждали центрифугированием (10000 g, 30 мин, 4°C) и получали бесклеточный экстракт. Для очистки гидрогеназы использовали фракционирование бесклеточного экстракта сульфатом аммония и последовательную жидкостную хроматографию на колонках с фенилсефарозой CL-4B и ДЭАЭ-целлюлозой DE₅₂. Окончательную стадию очистки препаратов гидрогеназы осуществляли с использованием препаративного электрофореза в 7%-ном ПААГ как описано ранее [9].

Влияние нитрата серебра на активность гидрогеназ. Действие AgNO₃ проверяли при разных концентрациях ингибитора и фермента. Для опытов использовали свежеприготовленный 0.1 М раствор AgNO₃ в 50 мМ HEPES буфере, pH 7.0 в защищенном от света стеклянном сосуде. Константу скорости инактивации первого порядка определяли графическим методом.

Определение гидрогеназной активности. Активность гидрогеназы определяли по реакции восстановления окисленного метилвиологена водородом спектрофотометрическим методом [9]. Реакционная смесь (общий объем 2 мл) содержала 50 мМ Tris-HCl буфер (pH 9.0), 4 мМ метилвиологен и 0.1–10 мкг гидрогеназы. Кювету заполняли водородом и для инициирования реакции добавляли следовые количества (5–10 мкл) 20 мМ раствора дитионита натрия, приготовленного в анаэ-

робных условиях. Стандартные измерения активности фермента проводили в термостатируемой кювете при температуре 30°C. При изучении зависимости активности гидрогеназы от температуры кювету с пробой фермента термостатировали не менее 5 мин и затем измеряли активность при заданной температуре. Термостабильность гидрогеназы оценивали после 10 мин выдерживания пробы фермента в термостате по величине остаточной активности в стандартных условиях. Кинетическую кривую восстановления метилвиологена строили на основании показаний спектрофотометра “Shimadzu 1600” (Япония) при длине волны 600 нм. Для расчета активности использовали коэффициент экстинкции восстановленного метилвиологена $\epsilon_{600} = 13.00 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ферментативную активность гидрогеназы выражали в мкмоль H₂/мин в расчете на 1 мг белка.

Регистрация и обработка спектров. ИК-Фурье спектры препаратов гидрогеназы регистрировали на спектрофотометре Bruker IFS 66v/S (“Bruker”, Германия). Образцы фермента концентрировали до ~50 мг белка/мл с использованием микроконцентраторов “Microcon-10” (“Amicon”, США) и помещали в кювету толщиной 50 мкм со стеклами из фторида кальция. Для получения ИК спектров с Фурье преобразованием первоначально измеряли 256 сканов базовой линии на воздухе с пустым кюветным отделением, затем записывали 256 сканов образцов 50 мМ HEPES-буфера или гидрогеназы в буфере. ИК спектры регистрировали в диапазоне 4000–1000 см⁻¹ с детектором MCT (“Visinic”, Израиль) при комнатной температуре с разрешением 2 см⁻¹ в двух повторностях с последующим усреднением. Из ИК спектра поглощения гидрогеназы вычитали ИК спектр поглощения буфера, нормированный в максимуме полосы поглощения воды при ~2130 нм. Искажения базовой линии в полученном спектре корректировали в ручном режиме в программе Origin.

Спектры поглощения образцов гидрогеназы в области 250–600 нм регистрировали на спектрофотометре “Shimadzu 1600” (Япония). Концентрацию препаратов фермента определяли по поглощению при 400 нм с использованием для расчета коэффициента экстинкции: $\epsilon_{400} = 42 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение природной HydSL и мутантной $\Delta 54$ HydSL гидрогеназ проводили на основе сравнения удельной активности выделенных ферментов, зависимости их активности от температуры и стабильности при прогревании в течение 10 мин.

Свежевыделенные электрофоретически гомогенные препараты гидрогеназ имели удельную активность при 30°C 130 ± 25 и 110 ± 22 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹ белка для нативной и модифицированной гидро-

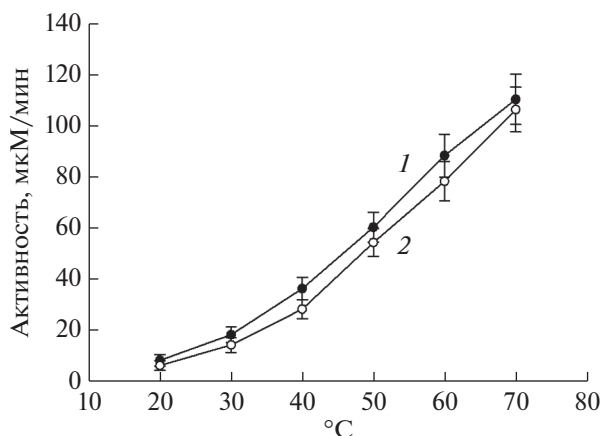


Рис. 1. Зависимость активности нативной HydSL (1) и модифицированной $\Delta 54$ HydSL (2) гидрогеназ *T. bogovorii* от температуры. Концентрация гидрогеназ ~ 0.1 мг/мл.

геназ соответственно, разница их активностей была в пределах доверительных интервалов. Это указывает на неизменность структуры активного центра, а также на то, что мишенью ингибитора является не белковая глобула, а дистальный железосерный кластер системы трех FeS кластеров и их функциональной связи при удалении С-концевого остатка. Зависимость активности гидрогеназы из исходного штамма и мутанта от температуры практически не отличалась: полное совпадение кривых (рис. 1).

Подсчитанные энергии активации для диапазона 20–40 °C составляли 54 ± 7 и 56 ± 6 соответственно, то есть различия также были в пределах доверительных интервалов. Прогревание гидрогеназ в течение 10 мин при температурах вплоть

до 80 °C не снижало удельной активности обеих гидрогеназ и не приводило к разрушению фермента (рис. 2). Прогревание при 90 °C приводило к потере примерно половины, а при 100 °C около 75% активности обоих ферментов. Полученные данные свидетельствуют о том, что С-концевой домен не принимал участия в стабилизации белковой структуры гидрогеназы.

В качестве дополнительного критерия для сравнения структуры и стабильности двух гидрогеназ была выбрана чувствительность к ионам серебра. Известно, что ионы серебра способны взаимодействовать с аминокислотами, находящимися как в свободном состоянии [10], так и в составе белков, что может приводить к разрушению белков [11]. Более того, показано, что серебро способно замещать железо в FeS кластерах [12].

Нитрат серебра (0.1 mM–5 mM) быстро и необратимо ингибировал HydSL-гидрогеназу *T. bogovorii*. В присутствии 5 mM AgNO_3 степень ингибирования составляла более 90% в течение 20 мин. Снижение концентрации ингибитора приводило к замедлению кинетики инактивации (рис. 3а). При концентрации 0.5–1.0 mM ингибирование было частичным, хотя процесс инактивации гидрогеназы не выходил на плато и через 3 ч инкубации. Константа скорости инактивации первого порядка, составляла $57.3 \pm 3.5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ при 20 °C.

Для установления типа ингибирования (обратимый или необратимый) используют разбавление реакционной среды с ингибитором [13]. Только при обратимом ингибировании происходит значительное восстановление активности фермента. Снижение концентрации ингибитора при разбавлении в 1000 раз не приводило к восстановлению активности HydSL гидрогеназы, степень ингибирования не изменялась (данные не приведены). Практически полное удаление Ag^+ при трехкратной промывке гидрогеназы на микроконцентра-

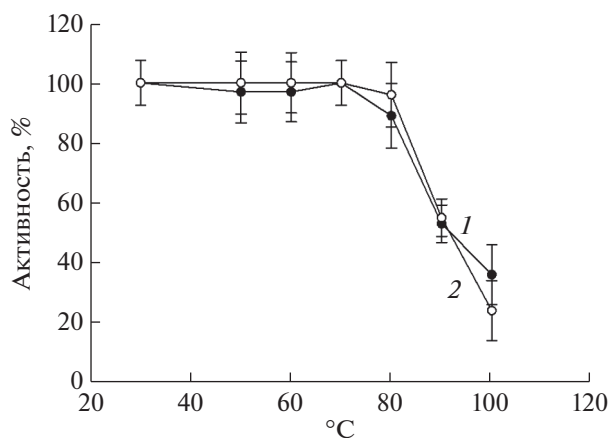


Рис. 2. Инактивация гидрогеназы HydSL (1) и $\Delta 54$ HydSL (2) после прогревания при заданной температуре в течение 10 мин: 100% активности соответствует 130 ± 25 и 110 ± 10 мкмоль $\text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка для HydSL и $\Delta 54$ HydSL гидрогеназ соответственно. Концентрация гидрогеназ ~ 0.1 мг/мл.

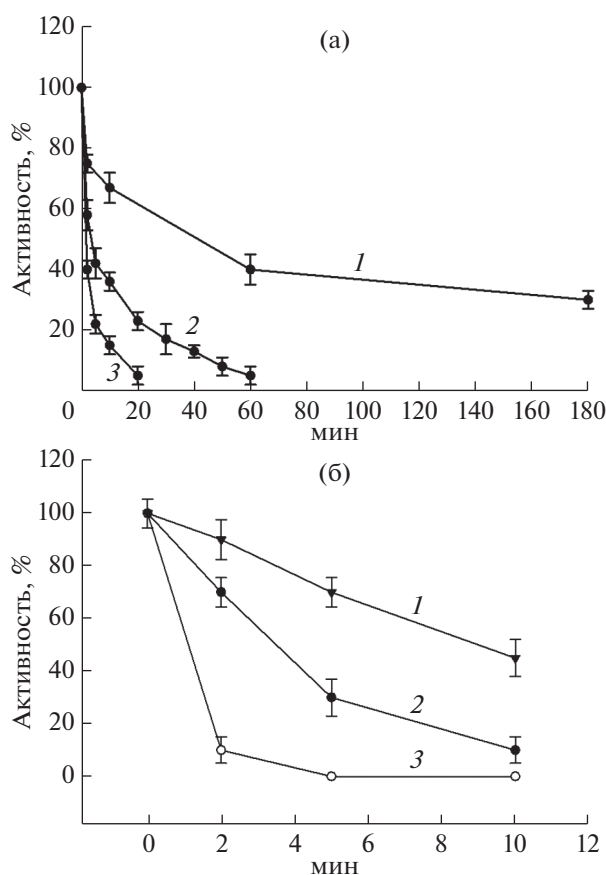


Рис. 3. Кинетика инактивации HydSL-гидрогеназы в присутствии 1 (1), 2 (2) и 5 mM (3) (а) и Δ54HydSL в присутствии 0.5 (1) и 1 mM (2) AgNO₃ при 20°C (б). (50 mM HEPES буфер, pH 7.0, концентрация гидрогеназ ~0.1 мг/мл.)

торах “Microcon10” (удаление соединений с массой <10 kDa) также не приводило к восстановлению активности фермента, что указывает на необратимый характер ингибирования.

Действие ионов серебра на Δ54-6his HydSL-гидрогеназу было более значительным по сравнению с гидрогеназой из родительского штамма. Ингибиторный эффект проявлялся уже при концентрации 0.5 mM (рис. 3б), причем ингибирование также было необратимым. Константа скорости инактивации первого порядка составляла $746 \pm 15 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ при 20°C.

При изучении действия ионов серебра было отмечено, что при 5 mM концентрации AgNO₃ и инкубации в течение 2 ч происходило помутнение раствора, что свидетельствует о денатурации белка. Для подтверждения этого явления проводили ДДС-электрофорез HydSL-гидрогеназы до и после инкубации с 5 mM AgNO₃. Обнаружено, что происходит частичное разрушение большой и малой субъединиц гидрогеназы, причем появляются новые полосы с меньшим молекулярным весом, что указывало на разрушение нативной структуры гидрогеназы (данные не приведены). Таким

образом, через 2 ч инкубации при 5 mM AgNO₃ наблюдалось неполное разрушение белковой глобулы.

Известно, что при взаимодействии ферредоксина с ионами серебра при определенных редокс-состояниях возможно замещение одного атома железа в FeS кластере на серебро, что не влияет на пик поглощения при 410 нм [12]. После инкубации HydSL-гидрогеназы с 5 mM Ag⁺ в течение 20 мин происходила инактивация фермента на 90% (рис. 3а). При этом площадь пика поглощения при 410 нм снижалась на 58% и составила 19 условных единиц, а после инкубации с 1.0 и 3.0 mM Ag⁺ — 40 и 25 соответственно (рис. 4б). Можно предположить, что ион серебра замещает один атом железа в железосерном кластере гидрогеназы, как и в случае ферредоксина *Pyrococcus furiosus* [12], что приводит к образованию гибридного AgFe₃S₄ кластера, который не активен при переносе электронов. Гибридный кластер также имеет характерное поглощение в области 410 нм.

Для изучения влияния ионов серебра на активный центр фермента был использован метод ИК-Фурье-спектроскопии. Этот метод является

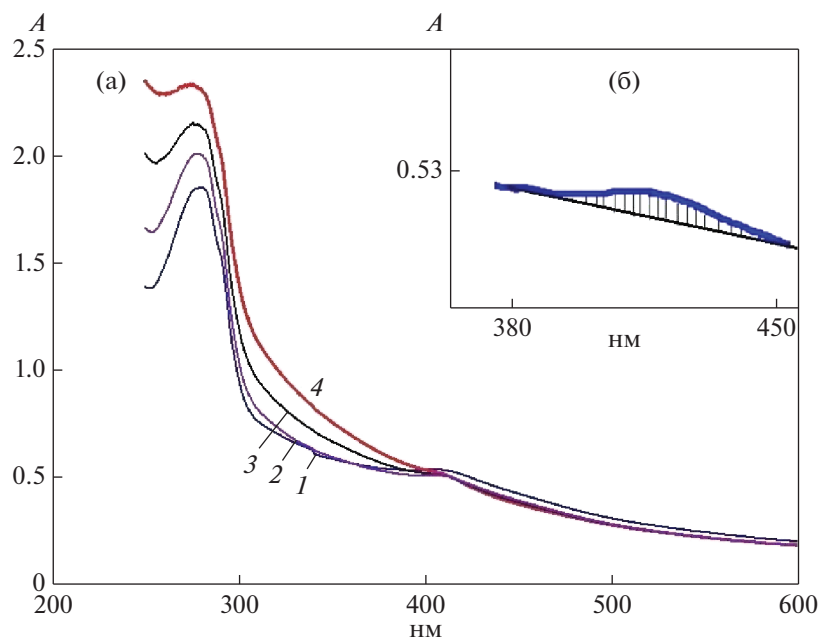


Рис. 4. Спектры поглощения HydSL гидрогеназы (а) без добавления (1) и после инкубации в присутствии 1 (2), 3(3) и 5 мМ AgNO_3 (4) в течение 30 мин при 20°C. На врезке (б) — иллюстрация измерения площади пика в области поглощения 410 нм. Концентрация гидрогеназы ~4.2 мг/мл.

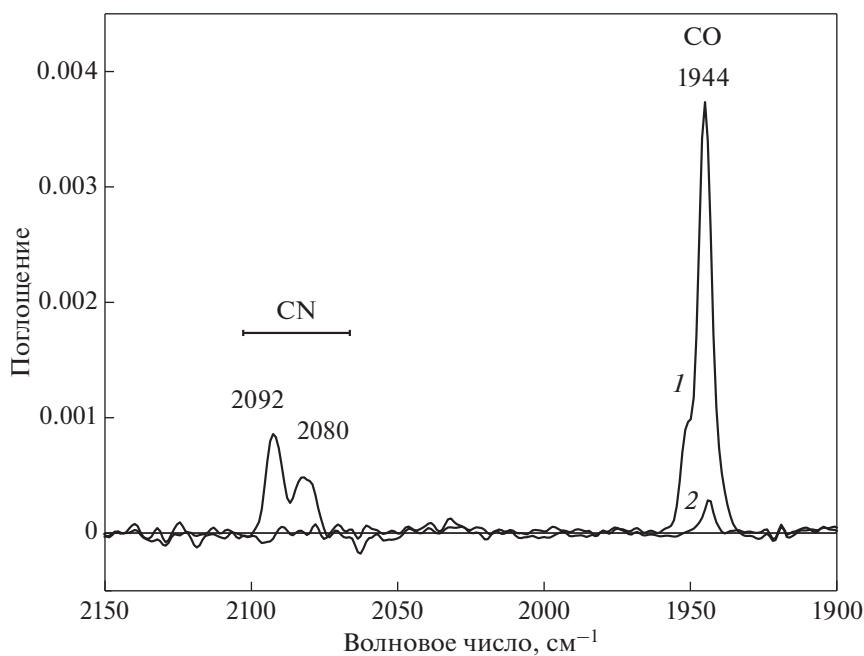


Рис. 5. ИК-Фурье-спектры нативной (1) гидрогеназы и после инкубации с 50 мМ AgNO_3 в течение 20 ч (2) при 20°C в 50 мМ HEPES буфере, pH 7.0. Концентрация гидрогеназы ~50 мг/мл.

наиболее информативным для оценки состояния активного центра гидрогеназы. ИК-Фурье-спектры HydSL-гидрогеназы проявляли характерные полосы для двухатомных лигандов CO и CN [9]. Для проверки действия AgNO_3 на активный центр HydSL гидрогеназы препарат с концентрацией 50 мг/мл выдерживали 20 ч с ингибитором (5 мМ) при 20°C, затем измеряли остаточную активность и регистрировали ИК-Фурье-спектры (рис. 5). Степень ингибирования гидрогеназной активности ионами серебра в этом эксперименте достигала 93%. Амплитуда пиков двухатомных лигандов в ИК спектре гидрогеназы значительно уменьшалась, причем положение полос лигандов не изменялось. Это соответствует степени инактивации фермента ионами серебра в аналогичных условиях (остаточная активность ~7%). Следовательно, при длительном ингибирующем действии Ag^+ имеет место разрушение активного центра (рис. 5).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в присутствии 5 мМ AgNO_3 через 20 мин наблюдается 90% ингибирование, а через 2 ч — частичное разрушение белка нативной гидрогеназы (см. выше), так как разрушение белковой глобулы более медленный процесс по сравнению с инактивацией. Для проверки этого предположения препарат модифицированной гидрогеназы смешивали с эквимольным количеством бычьего сывороточного альбумина и добавляли ингибитор до концентраций 1, 3 или 5 мМ. Рассчитанная константа ингибирования составляла $760 \pm 15 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ при 20°C, что практически не отличалось от константы ингибирования, полученной в отсутствие бычьего сывороточного альбумина. Это говорит о том, что первой мишенью ингибитора является не белковая глобула, а дистальный железосерный кластер.

Таким образом, под действием ионов серебра у HydSL-гидрогеназы, происходит сначала инактивация FeS-кластеров, а затем разрушение железоникелевого активного центра. Для выявления причин более быстрой инактивации $\Delta 54\text{-6his}$ HydSL следует отметить, что С-конец HydS, по современным представлениям, в нативном состоянии располагается в стороне от поверхности, где расположен дистальный FeS-кластер [5]. Однако, учитывая, что этот домен гидрофобен, его расположение в воде и без взаимодействия с Isp1 может быть другим. Так, например, расчеты свидетельствуют о том, что в вакууме С-конец HydSL-гидрогеназы может быть “завернут” сам на себя и располагаться ближе к дистальному кластеру [14], экранируя его. При этом в составе С-конца HydS имеются лизин (позиции 347, 348, 351), гистидин (позиция 356) и аргинин (позиция 357). Это аминокислоты, которые взаимодействуют с ионами серебра при физиологических значениях pH [10, 11]. Можно сделать вывод, что расположенный вблизи дистального кластера С-конец HydS

способен взаимодействовать с ионами серебра, снижая таким образом локальную концентрацию ионов у дистального FeS кластера. У $\Delta 54\text{-6his}$ HydSL гидрогеназы такая возможность отсутствует. Это может объяснять значительно более высокую константу ингибирования $\Delta 54\text{-6his}$ HydSL ионами серебра.

Авторы выражают благодарность А.А. Забелину за содействие в регистрации и обработке ИК-Фурье-спектров гидрогеназы и Т.В. Лауринавичене за полезные советы при обсуждении результатов.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 122041200039-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vignais P., Billoud B. // Chem. Rev. 2007. V. 107. P. 4206–4272.
2. Greening C., Biswas A., Carere C.R., Jackson C.J., Taylor M.C., Stott M.B., Cook G.M., Morales S.E. // Isme J. 2016. V. 10. № 3. P. 761–777.
3. Турова Т.П., Кеннен О.И., Ковалева О.Л., Слободова Н.В., Берг И.А., Ивановский Р.Н. // Микробиология 2009. Т. 78. С. 339–349.
4. Гоготов И.Н., Зорин Н.А., Кондратьева Е.Н. // Биохимия 1976. Т. 41. № 5. С. 836–841.
5. Khasimov M.K., Petushkova E.P., Khusnutdinova A.N., Zorin N.A., Batyrova K.A., Yakunin A.F., Tsygankov A.A. // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2021. V. 1862. № 12. P. 148492.
6. Rakhely G., Colbeau A., Garin J., Vignais P.M., Kovacs K.L. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 6. P. 1460–1465.
7. Богоров Л.В. // Микробиология. 1974. Т. 43. № 2. С. 326–330.
8. Зорин Н.А., Стародубов А.С., Цыганков А.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. V. 56. № 2. С. 135–140.
9. Zorin N.A., Zabelin A.A., Shkuropatov A.Y., Tsygankov A.A. // J. Inorganic Biochemistry. 2017. V. 177. P. 190–197.
10. Gruen L.C. // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 386. № 1. P. 270–274.
11. Betts H.D., Whitehead C., Harris H.H. // Metallomics. 2021. V. 13. № 1. P. 1–12.
12. Martic M., Jakab-Simon I.N., Haahr L.T., Hagen W.R., Christensen H.E. // J. Biol. Inorg. Chem. 2013. V. 18. № 2. P. 261–276.
13. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты 2. / Ред. Л.М. Гиноман, М.И. Левянт, В.К. Антонова, А.Е. Браунштейн. М.: Мир, 1998. 530 с.
14. Abdullatypov A.V., Tsygankov A.A. // Photosynthesis Research. 2015. V. 125. № 1–2. P. 341–353.

Comparison of HydS Hydrogenase of *Thiocapsa bogorovii* and its Modification with Truncated C-terminus of HydS

A. S. Starodubov^{a, *}, M. K. Khasimov^a, A. N. Khusnutdinova^a, N. A. Zorin^a, and A. A. Tsygankov^a

^a*Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

^{*}*e-mail: alexkex3@mail.ru*

Native HydSL hydrogenase of *Thiocapsa bogorovii* and its modification with truncated C-terminus of HydS (delta54HydS) were shown to be similar in specific activity, thermostability and temperature dependence of activity. It supports the suggestion that C-terminus of HydS does not participate in stabilization of the enzyme structure. Ag⁺ ions irreversibly inactivated both hydrogenases but delta54HydS was more sensitive to this inhibitor. In the presence of Ag⁺ the absorption peak at 410 nm was bleached indicating the destruction of FeS clusters. Protein globule was also destructed by Ag⁺. Prolonged incubation of hydrogenase with Ag⁺ ions led to disappearance of CO and CN peaks in IR spectra indicating NiFe center impairment. Data suggest that the first target of Ag⁺ ions is distal FeS cluster, and C-terminus of HydS interacts with Ag⁺ decreasing local ion concentration near the distal FeS cluster.

Keywords: HydSL hydrogenase, *Thiocapsa bogorovii*, C-terminal fragment of HydS, modified HydSL hydrogenase, thermal stability, hydrogen, silver nitrate, hydrogenase