

АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫХ ЖИВЫХ СИСТЕМ

УДК: 577.2; 51-76

Моделирование пространственной структуры гидрогеназы HydSL пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS

А. В. Абдуллатыпов^а, А. А. Цыганков

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 2 E-mail: ^a azatik888@yandex.ru

> Получено 6 марта 2013 г., после доработки 1 июля 2013 г.

В данной работе представлены модели железоникелевой гидрогеназы HydSL пурпурной серной бактерии Thiocapsa гоseopersicina BBS. Показано, что полученные модели обладают более высоким уровнем доверия по сравнению с опубликованными ранее; впервые получена полноразмерная модель HydSL-гидрогеназы. Показана свободная ориентация С-концевого фрагмента малой субъединицы относительно основной белковой глобулы. Показано, что у термостабильной гидрогеназы HydSL *Allochromatium vinosum* и у полученной нами модели примерно одинаковое количество межсубъединичных ионных пар и их больше, чем у термолабильной гидрогеназы HydAB *Desulfovibrio vulgaris*.

Ключевые слова: моделирование по гомологии, гидрогеназы, Thiocapsa roseopersicina

Homology modeling of the spatial structure of HydSL hydrogenase from purple sulphur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS

A. V. Abdullatypov^a, A. A. Tsygankov

Institute of basic biological problems RAS, 2 Institutskaya str., Pushchino, Moscow oblast, 142290, Russia

Abstract. — The results of homology modeling of HydSL, a NiFe-hydrogenase from purple sulphur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS are presented in this work. It is shown that the models have larger confidence level than earlier published ones; a full-size model of HydSL hydrogenase is presented for the first time. The C-end fragment of the enzyme is shown to have random orientation in relation to the main protein globule. The obtain models have a large number of ion pairs, as well as thermostable HydSL hydrogenase from *Allochromatium vinosum*, in contrast to thermolabile HydAB hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*.

Keywords: homology modeling, hydrogenases, Thiocapsa roseopersicina

Citation: Computer Research and Modeling, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 737-747 (Russian).

Работа поддержана Программой РАН «Фундаментальные основы технологий наноструктур и наноматериалов».

Введение

Гидрогеназы — это ферменты, катализирующие активацию молекулярного водорода. В зависимости от структуры гидрогеназы, синтезируемой микроорганизмом, а также природного донора/акцептора электрона, она может участвовать в поглощении или выделении водорода микроорганизмами. Эти ферменты рассматриваются как перспективные катализаторы для создания биосенсоров, получения водорода в искусственных системах, а также для окисления водорода в топливных элементах.

Существует три основных класса гидрогеназ [Vignais, Billoud, 2007]:

1) Hmd или Fe-гидрогеназы (ранее называвшиеся metal-free), не содержащие металлов внутри белковой глобулы, но включающие Fe-содержащий кофактор; данные гидрогеназы участвуют в метаногенезе, осуществляя восстановление метенилтетрагидрометаноптерина до метилентетрагидрометаноптерина, окисляя водород [Thauer, 1998];

2) FeFe-гидрогеназы — чаще всего односубъединичные ферменты, активный центр которых расположен внутри белковой глобулы, состоит из двух атомов железа и добавочных лигандов: дитиометиламинной группы, трех СО- и двух СN-лигандов. Встречаются двух-, трехи даже четырехсубъединичные FeFe-гидрогеназы, которые дополнительно содержат от одного до трех железосерных кластеров. Односубъединичные FeFe-гидрогеназы отличаются самой высокой активностью в реакции выделения водорода и крайней чувствительностью к воздействию кислорода [Nicolet et al., 2002];

3) NiFe-гидрогеназы (железоникелевые) — гетеродимеры (могут иметь также добавочные субъединицы для взаимодействия с редокс-партнером водорода). Это наиболее изученный и гетерогенный класс, разделенный на 4 группы. Большая субъединица этих гидрогеназ содержит железоникелевый активный центр, состоящий из атома никеля и атома железа, заякоренных на остатках цистеина, а также двух CN-лигандов и одного CO-лиганда, присоединенных к атомам железа; в окисленном состоянии атомы никеля и железа соединены остатками цистеина и атомом кислорода, а в востановленном — только остатками цистеина. У некоторых ферментов один из остатков цистеина заменен на селеноцистеин (такие ферменты называют NiFeSe-гидрогеназами). Большая субъединица содержит атом магния, координирующий необходимые для транспорта протона остатки гистидина и аспартата. Малая субъединица содержит три железосерных кластера: проксимальный и дистальный 4Fe4S-кластеры и медиальный 3Fe4S-кластер. В некоторых случаях проксимальный кластер представлен 4Fe3S-кластером. Активность железоникелевых гидрогеназ значительно ниже, чем железных, но они более устойчивы к воздействию кислорода и монооксида углерода [Nicolet et al., 2002].

NiFe-гидрогеназа HydSL пурпурной серной бактерии Thiocapsa roseopersicina BBS относится к первой группе водородпоглощающих гидрогеназ [Vignais, Billoud, 2007]. Единственной известной ее функцией в клетках является участие в реакции образования сероводорода из элементарной серы и водорода [Laurinavichene et al., 2007]. Она обладает высокой для NiFe-гидрогеназ активностью и отличается высокой термостабильностью (температурный оптимум 80 °C) и устойчивостью к воздействию кислорода и монооксида углерода [Зорин, Гоготов, 1982; Зорин, 1986]. Показано, что этот фермент способен к электрокаталитическому поглощению водорода в иммобилизованном на электроде состоянии [Цыганков и др., 2007]. Это делает ее перспективным кандидатом для применения в водородных топливных элементах и водородных биосенсорах. Несмотря на то что HydSL гидрогеназа была выделена в гомогенном состоянии более 35 лет назад [Gogotov et al., 1978], до сих пор неизвестна ее трехмерная структура, что затрудняет ее дальнейшие исследования и возможные практические применения. Знание трехмерной структуры данной гидрогеназы может способствовать выявлению универсальных детерминант термостабильности железоникелевых гидрогеназ и их устойчивости к кислороду, что позволит создавать стабильные ферменты на базе нестабильных методом направленного мутагенеза. Поскольку эксперименты по электронной микроскопии не позволили получить трехмерную модель HydSL с хорошим разрешением [Sherman et al., 1991], построение модели

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ___

гидрогеназы по гомологии с уже определенными трехмерными структурами является крайне актуальной задачей.

Первая модель гидрогеназы HydSL *Thiocapsa roseopersicina* была построена Szilagyi et al. [Szilagyi et al., 2002] В этой работе в качестве шаблона использовалась трехмерная модель гидрогеназы *Desulfovibrio gigas* (код в базе данных PDB 2FRV). При моделировании в модели были недостаточно представлены простетические группы (железо-никелевый активный центр был представлен лишь двумя атомами — атомом никеля и атомом железа без дополнительных лигандов). Также в модель не были включены 55 С-концевых аминокислотных остатков малой субъединицы.

В этой работе было высказано предположение о том, что одной из причин высокой термостабильности гидрогеназы HydSL *Thiocapsa roseopersicina* является большое количество стабилизирующих электростатических взаимодействий (ионных пар). Альтернативой данной версии служит предположение о стабилизации гидрогеназ в результате олигомеризации [Задворный, Зорин, неопубликованные данные].

С момента создания первой гомологичной модели и до настоящего времени было успешно закристаллизовано и получены трехмерные структуры для значительного количества других железоникелевых гидрогеназ. Это позволило выбрать более подходящую структуру для моделирования по гомологии. Кроме того, появились более мощные программы моделирования, позволяющие надежно предсказывать структуру белков.

Целью данной работы было моделирование структуры гидрогеназы HydSL *Thiocapsa* roseopersicina BBS с включением лигандов и всех синтезируемых аминокислотных остатков, оценка точности построенных моделей, сравнение их с шаблонной структурой, а также выявление взаимодействий, коррелирующих с термостабильностью гидрогеназы HydSL *T. Roseopersicina*.

Методы исследования

Моделирование гидрогеназы HydSL Thiocapsa roseopersicina

Для нахождения наилучшего шаблона для моделирования был проведен поиск гомологов в онлайн-программе BLAST по базе Protein Data Bank [Altschul et al., 1990].

Наилучшим шаблоном (с самой высокой степенью идентичности — 84 % для больших субъединиц и 87 % для малых) оказалась трехмерная структура гидрогеназы HydSL *Allochromatium vinosum* (3MYR в базе Protein Data Bank). Это термостабильная [Klibanov et al., 1980] гидрогеназа, представленная в кристалле в виде гетерооктамера, состоящего из четырех больших и четырех малых субъединиц [Ogata et al., 2010]. При этом данный фермент выделен также из пурпурной серной бактерии. Исходный координатный файл 3MYR.pdb из базы данных Protein Data Bank был подготовлен для моделирования в программе YASARA Model [Krieger et al., 2012] (аналогичные манипуляции могут быть проведены во многих 3D-визуализаторах): поскольку данный координатный файл содержит помимо структуры гидрогеназы также молекулы имидазола и ионы хлора, отсутствующие во всех других файлах трехмерных структур железоникелевых гидрогеназ, эти молекулы и ионы были удалены как артефакты кристаллизации [Ogata et al., 2010] (кристаллизация включала в себя этап обработки 100 мМ имидазолом и трис-гидрохлоридом). Затем каждая субъединица гидрогеназы сохранялась в виде отдельного PDB-файла. Итого, для моделирования каждой субъединицы были использованы четыре соответствующих субъединицы из файла 3MYR.pdb.

Моделирование проводилось в программе MODELLER [Sali, Blundell, 1993] с включением простетических групп. Для уточнения моделей применялась минимизация энергии методом сопряженных градиентов (VTFM-optimization, 300 шагов) и методом молекулярной динамики в вакууме (опция md_refine = very_slow).

Для каждой субъединицы было построено 1000 моделей, для которых проводилась оценка следующих параметров [Sali, Blundell, 1993; Shen, Sali, 2006]:

- molpdf (objective function, объективная функция) исторически первая из энергетических функций для оценки моделей; статистический потенциал, основанный на функциях плотности вероятности межатомных расстояний, углов между связями и двугранных углов вращения. Эта функция всегда положительна, причем меньшее значение отражает большую стабильность белковой молекулы.
- DOPE дискретно оптимизированная энергия белка, статистический потенциал, основанный на функции плотности вероятности межатомных расстояний [Shen, Sali, 2006]; отрицательная величина, меньшее значение которой отражает большую стабильность белковой молекулы.
- Z-оценка дискретно оптимизированной энергии белка оценка, позволяющая ввести формулу для вычисления уровня доверия модели (Р) как доли возможных конформаций, обладающих большим, чем модель, значением DOPE:

$$P = (1 - normsdist(Z)) * 100 \%,$$

где **Z** — Z-оценка DOPE, **normsdist** — функция нормального распределения с $\mu = 0$ и $\sigma^2 = 1$

Для сравнения полученных моделей было получено значение дискретно оптимизированной энергии уже существующих моделей, опубликованных в базе данных ModBase и в приложении к статье [Szilagyi et al., 2002], а также шаблонных структур.

После моделирования и выбора четырех наилучших моделей из 1000 было определено среднеквадратичное отклонение координат атомов главной цепи (RMSD) моделей между собой и с шаблонами, а также шаблонов между собой, в программе YASARA Model (www.yasara.org). Затем малые и большие субъединицы были объединены в программе Yasara Model методом наложения на шаблонную структуру, после чего были исследованы межсубъединичные электростатические взаимодействия и водородные связи. Для сравнения аналогичные расчеты проводились с шаблонной структурой (PDB-код 3MYR) и со структурой гидрогеназы *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (PDB-код 1H2A) [Higuchi et al., 1997], которая была выбрана как термолабильная — период полуинактивации при 65 °C около 5 минут [Yagi et al., 1976]. Для того чтобы убедиться в корректности сравнения моделей и рентгеноструктурных данных, было проведено моделирование гидрогеназ *C. vinosum* и *D. vulgaris* с уточнением моделей с помощью минимизации энергии и молекулярной динамики в вакууме аналогично гидрогеназе *Th. roseopersicina*, с использованием рентгеноструктурных данных в качестве шаблонов. В полученных моделях были также исследованы водородные связи, гидрофобные и электростатические взаимодействия (см. ниже).

Валидация моделей проводилась на сервере MolProbity [Chen et al., 2010]; для минимизации параметра clashscore (далее — индекс перекрывания, т. е. число перекрываний атомов более чем на 0.4 Å в пересчете на 1000 атомов) была проведена минимизация энергии на сервере YASARA energy minimization server, что позволило добиться хороших значений индекса перекрывания, сравнимых с кристаллографическими данными.

Моделирование С-концевого фрагмента малой субъединицы и полноразмерного фермента

С-концевой фрагмент малой субъединицы, не включенный в модель, был подвергнут моделированию *ab initio* с помощью Web-сервиса QUARK¹ [Xu, Zhang, 2012]. Данный сервис был выбран вследствие наивысшего рейтинга в сравнении с другими, выполняющими аналогичные вычисления, такими как i-TASSER, RaptorX, Phyre2, по итогам конкурса CASP9 в номинации FM (моделирование без использования шаблона-гомолога). Полученные модели С-концевого фрагмента использовались совместно с ранее полученной нами моделью малой субъединицы для множественного моделирования с помощью программы MODELLER, далее определялись

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ __

¹ http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/

значения дискретно оптимизированной энергии и ее Z-оценки для каждой полученной модели полноразмерной малой субъединицы.

Электростатические взаимодействия

Электростатические взаимодействия оценивались на сервере Protein Interaction Calculator (http://pic.mbu.iisc.ernet.in/) [Tina et al., 2007] по тому же критерию, что и в работе [Szilagyi et al., 2002]: в качестве критического расстояния для электростатического взаимодействия было выбрано значение 6 Å.

Водородные связи

Водородные связи рассчитывались в программе YASARA Model, в качестве минимального значения энергии связи была выбрана величина 6.25 кДж/моль. Стоит отметить, что характерная энергия тепловых колебаний (E = 3RT/2) составляет 3.4–4.65 кДж/моль в диапазоне температур от 0 до 100 °C, следовательно, рассчитанные водородные связи будут достаточно стабильными при повышенных температурах.

Гидрофобные контакты

Гидрофобные контакты были рассчитаны на сервере Protein Interaction Calculator (http://pic.mbu.iisc.ernet.in/); в качестве критического расстояния для гидрофобного взаимодействия было выбрано значение 5 Å.

Результаты

Выбор оптимального шаблона

Как отмечалось в разделе Методы, оптимальной шаблонной структурой для гомологичного моделирования является трехмерная структура гидрогеназы HydSL *Allochromatium vinosum* (PDB-код 3MYR).

Эта структура является наилучшей для моделирования по следующим причинам:

- 1) Очень высокая степень идентичности с гидрогеназой HydSL Thiocapsa roseopersicina (87 % для малых субъединиц, 84 % для больших).
- 2) Полное отсутствие разрывов в попарных выравниваниях аминокислотных последовательностей как малых, так и больших субъединиц.
- Наибольшая степень покрытия (query coverage отношение количества выровненных остатков к общему количеству остатков в последовательности моделируемого белка) аминокислотных последовательностей, что позволило смоделировать всю последовательность большой субъединицы и значительную часть малой.
- 4) Сходство данных ферментов по термостабильности.
- 5) Олигомерное состояние данной гидрогеназы в кристалле (4 димера), позволяющее оценить качество моделей по среднеквадратичному отклонению координат атомов в сравнении со среднеквадратичным отклонением нескольких одинаковых субъединиц шаблонной структуры.

Общий обзор моделей

Результаты моделирования показали, что построенные модели малых субъединиц обладают значительно меньшим значением Z-оценки дискретно оптимизированной энергии белка по сравнению с моделями из базы данных ModBase и из работы [Szilagyi et al., 2002], что вкупе с большей степенью покрытия и наличием лигандов делает их более точными по сравнению с опубликованными моделями (см. таблицу 1 и [Szilagyi et al., 2002]).

В модели не включается достаточно длинный С-концевой фрагмент малой субъединицы (48 аминокислотных остатков), а также 5 остатков с N-конца, однако даже при этом данные модели охватывают большую часть белка по сравнению с моделями из базы данных ModBase.

Моделирование большой субъединицы показало лучшие результаты по сравнению с моделью из ModBase и из работы [Szilagyi et al., 2002] по значению дискретно оптимизированной энергии и ее Z-оценки (см. таблицу 1), при этом в данные модели были полностью включены простетические группы (ион магния и железоникелевый активный центр).

Суперпозиция моделей и шаблона позволила показать высокую степень сходства трехмерных структур двух ферментов: среднее значение среднеквадратичного отклонения атомных координат составило 0.9 Å для малых субъединиц и 0.62 Å для больших субъединиц. Среднеквадратичное отклонение моделей между собой составило 0.85 Å для малых и 0.61 Å для больших субъединиц; среднеквадратичное отклонение субъединиц шаблона — 0.72 Å для малых субъединиц и 0.51 Å для больших.

Общий вид модели гидрогеназы HydSL представлен на рисунке 1а.

Активный центр и электрон-переносящие кофакторы

Поскольку все лиганды в программе MODELLER рассматриваются как абсолютно твердые тела, активный центр полученной модели совпадает по своей структуре с активным центром шаблона и находится в состоянии Ni-A (окисленное, неготовое состояние). В состав активного центра входят атомы никеля и железа, заякоренные остатками цистеина большой субъединицы (Cys61, Cys64, Cys555, Cys558 по последовательности из Uniprot (ID: O51823)) и связанные между собой атомом кислорода; атом железа связывает два CN-лиганда и один CO-лиганд.

Во всех опубликованных структурах железоникелевых гидрогеназ обнаружен атом магния [Ogata et al., 2009]. Несмотря на то что прямых экспериментальных данных о роли Mg нет, считается, что он может участвовать в отводе протонов от активного центра — по крайней мере, замена заряженных остатков вблизи иона магния на незаряженные приводила к падению активности гидрогеназ [Ogata et al., 2009]. На основании этого мы также ввели в нашу модель атом Mg. Наиболее вероятно, что он взаимодействует с остатком глутамата Glu42 и CO-группой аланина Ala506, возможно также его участие в образовании цепи переноса протонов из заряженных аминокислотных остатков благодаря дальним электростатическим взаимодействиям по аналогии с другими изученными гидрогеназами.

Активный центр представлен на рисунке 1б.

Электронпереносящие кофакторы представлены тремя железосерными кластерами, координированными остатками цистеина (проксимальный и медиальный кластеры) либо цистеина и гистидина (дистальный кластер). Дистальный и проксимальный кластеры принадлежат к 4Fe4S-типу, а медиальный — к 3Fe-4S типу. Возможность наличия 4Fe-3S кластера в проксимальной позиции, характерного для таких устойчивых к кислороду гидрогеназ, как гидрогеназы HoxKG Ralstonia eutropha, HoxKG Hydrogenovibrio marinus, HyaAB Escherichia coli, исключается по причине отсутствия в малой субъединице необходимых для его координации двух дополнительных остатков цистеина (на соответствующих им позициях находятся остатки глицина, G21 и G122).

Железосерные кластеры представлены на рисунке 1в. Возможно, что реальная структура активного центра гидрогеназы HydSL *Thiocapsa roseopersicina* BBS немного отличается от вышеприведенной, поэтому в дальнейшем планируется проведение экспериментов с использованием инфракрасной спектроскопии с последующей корректировкой модели.

Моделирование С-концевого фрагмента малой субъединицы и полноразмерного фермента

Моделирование С-концевого 48-аминокислотного фрагмента малой субъединицы на сервере QUARK показало, что вторичная и третичная структура десяти моделей данного фрагмента

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ _



Рис. 1. а — общий вид модели гидрогеназы HydSL. Большая субъединица выделена желтым, малая — красным. б — активный центр. Атом никеля выделен оранжевым, железо — фиолетовым, углерод — голубым, кислород — красным, азот — синим, магний — желтым. Атомы координирующих остатков показаны в виде палочек: зеленый — сера, голубой — углерод, красный — кислород. в — железосерные кластеры малой субъединицы. Железо выделено фиолетовым, сера — зеленым. Цвета координирующих остатков совпадают с цветами элементов вторичной структуры: голубой — петли, синий — повороты, красный — бета-тяжи, зеленый — альфа-спирали, желтый — нестандартные спирали (спираль 3₁₀)

сходна: он состоит из 3 альфа-спиралей, разделенных участками неупорядоченной структуры. Последующее моделирование полноразмерной малой субъединицы в программе MODELLER показало, что значение Z-оценки дискретно оптимизированной энергии для лучшей модели полноразмерной субъединицы составляет около –1, что говорит о том, что данная структура с высокой вероятностью близка к нативной. На рисунке 2а представлена модель полноразмерной гидрогеназы HydSL, полученная путем совмещения моделей с шаблоном (гидрогеназой HydSL *Allochromatium vinosum*). Среднеквадратичное отклонение атомных координат для малой субъединицы составило 0.92 Å

Роль С-концевого фрагмента малой субъединицы HydSL гидрогеназ не изучена. Есть данные, что он участвует в олигомеризации гидрогеназы [Sherman et al., 1991]. Однако эти данные больше относятся к уже выделенному белку, а не его местоположению и функционированию в клетках. Известно также, что делеция гена isp1 приводила к переводу гидрогеназы в растворимую фракцию [Palagyi-Meszaros et al., 2009], т. е. можно полагать, что гидрогеназа закрепляется на мембране за счет взаимодействия со своим потенциальным редокс-партнером, цитохромподобным белком Isp1. К сожалению, данных о том, каким участком HydSL гидрогеназа взаимодействует с Isp1, в литературе не встречается. Тем не менее, учитывая, что изучаемая нами гидрогеназа отличается от растворимых гидрогеназа Именно наличием С-концевого фрагмента (равно как и связанная с мембраной гидрогеназа Allochromatium vinosum, а также гидрогеназы Hup-типа, связанные с мембраной), можно предположить, что именно этот участок ответственен за связывание гидрогеназы с цитохром-подобным белком. На рисунке 2а видно, что С-концевой фрагмент малой субъединицы находится на удалении от основной белковой глобулы и состоит из трех альфа-спиралей.

Суперпозиция четырех наилучших моделей малых субъединиц (рис. 2б) позволила предположить, что С-концевой фрагмент, имеющий достаточно строгую третичную структуру, т. е. идентичную топологию расположения альфа-спиралей относительно друг друга, ориентирован свободно относительно основной глобулы фермента. Возможно, что подобное «качание» С-концевого фрагмента прекращается при взаимодействии с редокс-партнером или заякоривании на мембране.

В таблице 1 представлены данные по z-оценкам DOPE и уровням доверия для моделей и шаблонов.



Рис. 2. Полноразмерная модель гидрогеназы HydSL. а — общий вид полноразмерного фермента;С-концевой фрагмент выделен красным б — суперпозиция четырех наилучших моделей полноразмерного фермента. Цепи отдельных моделей выделены желтым, зеленым, голубым и фиолетовым

Таблица 1. Z-оценки дискретно-оптимизированной энергии (DOPE) и уровни доверия моделей (в скоб-
ках). Показано, что по уровням доверия модели без С-концевого фрагмента, полученные в данной рабо-
те, значительно превосходят опубликованные и сравнимы с шаблоном. Ранг модели (колонки 1-4) —
место модели в списке, отсортированном по возрастанию z-оценки DOPE

Ранг модели	1	2	3	4
HydL (полученные в данной работе)	-1.925 (97.29 %)	-1.893 (97.08 %)	-1.892 (97.07 %)	-1.885 (97.03 %)
HydL (опубликованные)	-1.019 (84.59 %)	-0.931 (82.41 %)	—	—
3MYR (большие)	-2.008 (97.77 %)	-2.001 (97.73 %)	-1.970 (97.56 %)	-1.954 (97.46 %)
HydS (полноразмерные, полученные в данной работе)	-1.033 (84.92 %)	-1.022 (84.66 %)	-1.022 (84.66 %)	-0.991 (83.91 %)
HydSdelta48 (без С-концевого фрагмента, полученные в данной работе)	-1.406 (92.01 %)	-1.403 (91.94 %)	-1.400 (91.92 %)	-1.398 (91.89 %)
HydSdelta55 (опубликованные)	-0.831 (79.7 %)	-0.771 (77.96 %)	_	_
3MYR (малые)	-1.430 (92.36 %)	-1.396 (91.86 %)	-1.373 (91.51 %)	-1.304 (90.39 %)

Оценка моделей на сервере MolProbity

В таблице 2 приведены значения четырех параметров — индекса перекрывания (количество перекрываний более чем на 0.4 Å на 1000 атомов), индекса MolProbity (MolProbity Score интегральный параметр, учитывающий Clashscore, долю энергетически невыгодных ротамеров, долю остатков, расположенных внутри и вне предпочтительных областей на картах Рамачандрана), процента напряженных связей и напряженных углов для лучшей модели и для шаблона (3MYR, цепи A, B).

Из таблицы 2 видно, что модели сравнимы по своему качеству с шаблоном; высокие значения индекса перекрывания в двусубъединичных моделях говорят о дефектах совмещения субъединиц, однако минимизация энергии (данные в скобках) помогла решить эту проблему, т. е. снизить индекс перекрывания.

Таблица 2. Clashscore и MolProbity score представлены в абсолютных значениях и в процентилях по
группе структур с разрешением 2.1±0.15 Å (т. е. в процентах структур с таким разрешением, обладающих
большим значением данного параметра). В скобках приведены значения параметров после минимизации
энергии

Параметр Модель	Индекс перекрывания	Индекс MolProbity	Напряженные связи	Напряженные углы
HydL	13.41 /72 %	1.67/94 %	0.00 %	0.71 %
3MYRb	7.31/95 %	1.94/84 %	0.00 %	0.00 %
HydS (полноразмерная)	13.31/72 %	1.74/93 %	0.00 %	1.26 %
HydSdelta48 (без С-конца)	10.05/85 %	1.52/97 %	0.00 %	1.12 %
3MYRa	5.51/97 %	2.12/72 %	0.37 %	1.49 %
HydSL	27.64/19 % (5.20/98 %)	1.99/81 % (1.71/99 %)	0.00 %	0.91 % (0.68 %)
HydSLdelta48	25.74/25 % (5.03/99 %)	1.91/85 % (1.62/100 %)	0.00 %	0.84 % (0.36 %)
3MYRab	6.98/97 %	2.03/78 %	0.12 %	0.48 %

Анализ внутрисубъединичных и межсубъединичных взаимодействий

Поскольку модели без С-концевого фрагмента обладают существенно большим уровнем доверия, а также учитывая, что С-концевой фрагмент практически не взаимодействует с большой субъединицей, все взаимодействия рассчитывались для моделей без С-концевого фрагмента.

В таблице 3 приводится количество водородных связей, ионных пар и гидрофобных контактов внутри субъединиц гидрогеназ и между ними.

Из представленных результатов видно, что количество как межсубъединичных, так и внутрисубъединичных водородных связей не коррелирует с термостабильностью ферментов. В то же время количество межсубъединичных ионных пар практически одинаково у модели HydSL *Thiocapsa roseopersicina* и HydSL гидрогеназы *Allochromatium vinosum*, причем у термолабильной гидрогеназы HydAB *Desulfovibrio vulgaris* miyazaki F их значительно меньше. Это свидетельствует в пользу предположения, что детерминантами термостабильности могут являться межсубъединичные ионные пары. В то же время количество гидрофобных контактов коррелирует с термостабильностью лишь для больших субъединиц. Следует отметить, что моделирование движения молекулы методом молекулярной динамики в вакууме приводило к снижению количества межсубъединичных ионных пар в обеих исследованных гидрогеназах, для которых известны рентгеноструктурные данные. Поэтому вполне вероятно, что реальное количество межсубъединичных ионных пар в гидрогеназе HydSL *Thiocapsa roseopersicina* выше.

Таким образом, нами получена достаточно реалистичная модель гидрогеназы HydSL *Thiocapsa roseopersicina* BBS. Полноразмерная модель данной гидрогеназы получена впервые; для нее показана свободная ориентация С-концевого фрагмента. Показано, что количество межсубъединичных ионных пар коррелирует с термостабильностью фермента.

Авторы выражают благодарность Кабанову Артему Валерьевичу, Комарову Владиславу Михайловичу, Кондратьеву Максиму Сергеевичу и Самченко Александру Анатольевичу за ценные советы и помощь в работе.

Таблица 3. Для гидрогеназ *Thiocapsa roseopersicina* и *Allochromatium vinosum* данные приведены как среднее значение по четырем моделям ± стандартное отклонение; для гидрогеназы *Desulfovibrio vulgaris* приведено единственное значение, так как в PDB-файле 1H2A представлена лишь одна большая и одна малая субъединица. В скобках приведены данные как среднее значение ± стандартное отклонение по четырем моделям, построенным в данной работе для гидрогеназ *Allochromatium vinosum* и *Desulfovibrio vulgaris*

Параметры	Модель HydSL <i>Thiocapsa</i> roseopersicina	Гидрогеназа HydSL Allochromatium vinosum	Гидрогеназа HydAB <i>Desulfovibrio vulgaris</i> miyazaki F (1H2A)
Количество межсубъединичных водородных связей	21.75±4.8	45.5±1 (19.5±2.08)	33 (15.5±3.79)
Количество водородных связей в большой субъединице	398±26.14	517±2.94 (365.75±6.55)	390 (320.25±7.6)
Количество водородных связей в малой субъединице	149±6.83	187.25±0.5 (166±1.63)	151 (124.75±2.06)
Количество межсубъединичных ионных пар	11.75±0.5	13.25±0.96 (10±1.4)	8 (7.75±1.71)
Количество ионных пар в большой субъединице	55.75±3.77	58.5±4.2 (59.75±2.22)	60 (63.25±2.2)
Количество ионных пар в малой субъединице	16±1.82	17.5±1 (17.25±0.96)	15 (15.25±1.26)
Количество межсубъединичных гидрофобных контактов	44.25 ±.1.71	43.5±0.58 (38.75±2.5)	45 (44±1.41)
Количество гидрофобных контактов в большой субъединице	484.35±11.6	519±4.32 (500±4.967)	440 (436.75±3.1)
Количество гидрофобных контактов в малой субъединице	211.5±3.87	230.5±1.915 (220±3.464)	213 (205.75±1.5)

Список литературы

- Зорин Н. А. Ингибирование гидрогеназы Thiocapsa roseopersicina различными соединениями // Биохимия. 1986. Т. 51, № 5. С. 770–774.
- Зорин Н. А., Гоготов И. Н. Стабильность гидрогеназы из пурпурной серобактерии Thiocapsa roseopersicina // Биохимия. 1982. Т. 47, № 5. С. 827–833.
- Цыганков А. А., Минаков Е. А., Зорин Н. А., Гостева К. С., Воронин О. Г., Карякин А. А. Об измерении pH-зависимости гидрогеназ // Биохимия. — 2007. — Т. 72, № 9. — С. 1189–1195.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215, no. 3. P. 403–410.
- Chen V. B., Bryan Arendall III W., Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S., Richardsom D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. // Acta Crystallographica. — 2010. — Vol. 66, no. 1. — P. 12–21.
- *Gogotov I. N., Zorin N. A., Serebryakova L. T., Kondratieva E. N.* The properties of hydrogenase from Thiocapsa roseopersicina // Biochim. Biophys. Acta. 1978. Vol. 523. P. 335–343.
- *Higuchi Y., Yagi T., Yasuoka N.* Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis // Structure. 1997. Vol. 5, no. 12. P.1671–1680.

- *Klibanov A. M., Kaplan N. O., Karmen M. D.* Thermal stabilities of membrane-bound, solubilized, and artificially immobilized hydrogenase from Chromatium vinosum // Arch. Biochem. Biophys. 1980. Vol. 199, no. 2. P. 545–549.
- *Krieger E., Dunbrack R. L. Jr., Hooft R. W., Krieger B.* Assignment of protonation states in proteins and ligands: combining pKa prediction with hydrogen bonding network optimization // Methods Mol. Biol. 2012. Vol. 819. P. 405–421.
- Laurinavichene T. V., Rákhely G., Kovács K. L., Tsygankov A. A. The effect of sulfur compounds on H2 evolution/consumption reactions, mediated by various hydrogenases, in the purple sulfur bacterium, Thiocapsa roseopersicina // Arch. Microbiol. 2007. Vol. 188, no. 4. P. 403–410.
- Nicolet Y., Cavazza C., Fontecilla-Camps J. C. Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution // J. Inorg. Biochem. 2002. Vol. 91. P. 1–8.
- *Ogata H., Kellers P., Lubitz W.* The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium Allochromatium vinosum: characterization of the oxidized enzyme (Ni-A state) // J. Mol. Biol. — 2010. — Vol. 402, no. 2. — P. 428–444.
- *Ogata H., Lubitz W., Higuchi Y.* [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism // Dalton Transactions. 2009. no. 37. P. 7577–7587.
- Palágyi-Mészáros L. S., Maróti J., Latinovics D., Balogh T., Klement E., Medzihradszky K. F., Rákhely G., Kovács K. L.. Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in Thiocapsa roseopersicina BBS // FEBS J. — 2009. — Vol. 286, no. 1. — P. 164–174.
- Sali A., Blundell T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints // J. Mol. Biol. — 1993. — Vol. 234, no. 3. — P. 779–815.
- Shen M. Y, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures // Protein Sci. 2006. Nov. VOL. 15, no. 11. P. 2507–2524.
- Sherman M. B., Orlova E. V., Smirnova E. A., Hovmöller S., Zorin N. A. Three-dimensional structure of the nickel-containing hydrogenase from Thiocapsa roseopersicina // J. Bacteriol. 1991. VOL. 173, no. 8. P. 2576–2580
- Szilágyi A., Kovács K. L., Rákhely G., Závodszky P. Homology modeling reveals the structural background of the striking difference in thermal stability between two related [NiFe]hydrogenases // J. Mol. Model. — 2002. —Vol. 8, No 2. — P. 58–64.
- *Thauer R. K.* Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture // Microbiology. 1998. Vol. 144. P. 2377.
- *Tina K. G., Bhadra R., Srinivasan N.* PIC: Protein Interactions Calculator // Nucleic Acids Research. 2007. Vol. 35. Web Server issue. P. W473–W476.
- Vignais P. M., Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview // Chem. Rev. 2007. Vol. 107. P. 4206–4272.
- Volbeda A., Garcin E., Piras C., de Lacey A. L., Fernandez V.M., Hatchikian E. C., Frey M., Fontecilla-Camps J. C. Structure of the [NiFe] Hydrogenase Active Site: Evidence for Biologically Uncommon Fe Ligands // J. Am. Chem. Soc. — 1996. — Vol. 118, no. 51. — P. 12989–12996.
- *Xu D., Zhang Y.* Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field // Proteins. 2012. Vol. 80 P. 1715–1735.
- Yagi T., Kimura K., Daidoji H., Sakai F., Tamura S. Properties of purified hydrogenase from the particulate fraction of Desulfovibrio vulgaris, Miyazaki // J. Biochem. 1976. Vol. 79, no. 3. P. 661–671.