УДК 577.325

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРЁХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ НОХ-ГИДРОГЕНАЗ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *THIOCAPSA ROSEOPERSICINA* BBS

А. В. Абдуллатыпов

ФГБУН "Институт фундаментальных проблем биологии РАН" Поступила в редакцию 27.04.2018 г.

Аннотация. В работе было проведено моделирование атомной структуры гидрогеназных фрагментов двух цитоплазматических Нох-комплексов (субъединиц Hox1H, Hox1Y, Hox2H, Hox2Y) пурпурной серной бактерии Thiocapsa roseopersicina. В качестве шаблонов для моделирования по гомологии были использованы две цитоплазматических гидрогеназы, структура которых была получена ранее другими исследователями (гидрогеназы Methanothermococcus thermolithotrophicus и Hydrogenophilus thermoluteolus). На базе дискретно-оптимизированной энергии (DOPE) и её z-оценки определена достоверность полученных моделей. Показано, что выбранная схема оптимизации способствовала улучшению качества построения моделей (были достигнуты z-оценки DOPE менее -1). Полученные модели больших субъединиц содержат активный центр из атома никеля и атома железа с одним СО- и двумя СN-лигандами, а также атом магния; малые субъединицы содержат электрон-переносящий железо-серный кластер. Проведён анализ внутрисубъединичных и межсубъединичных взаимодействий — водородных связей, ионных пар, гидрофобных контактов. По предварительным данным нельзя с уверенностью сказать о том, какие именно взаимодействия стабилизируют гидрогеназы Нох-типа, и каковы будут свойства этих гидрогеназ в отношении температуры. Методом молекулярного докинга показано, что цитоплазматические гидрогеназы могут взаимодействовать с компонентами гидрогеназных электродов, используемых в лабораторной практике — олигомерами нейтрального красного и короненом, который был выбран как модельное соединение, имитирующее графит. Наблюдалась устойчивая тенденция к снижению энергии Гиббса связывания, т. е. усилению аффинности, в ряду мономер-димер-тример нейтрального красного. При этом у обеих гидрогеназ связывание с тримером нейтрального красного было сильнее, чем с короненом, и в полученных комплексах нейтральный красный оказывался ближе к железо-серному кластеру, чем коронен. Это позволяет предположить, что в случае экспериментальной проверки ферментных водородных электродов, изготовленных с применением исследованных гидрогеназ, полимеризованный нейтральный красный будет оптимальным электродным материалом. Высказано предположение, что наличие всего одного железо-серного кластера обеспечит максимально короткое расстояние от активного центра до электрода, что может являться преимуществом Нохгидрогеназ в сравнении с другими гидрогеназами данной бактерии.

Ключевые слова: гидрогеназа, Thiocapsa roseopersicina, молекулярное моделирование, докинг.

Фототрофная бактерия *Thiocapsa* roseopersicina BBS, относящаяся к пурпурным серным бактериям [1], является интересным объектом для изучения с точки зрения использования её ферментов, в первую очередь гидрогеназ, в биотехнологии. Первой гидрогеназой, выделенной из данной бактерии, является гидрогеназа HydSL (выделена более 40 лет назад), которая отличается от большинства других железо-никелевых гидрогеназ высокой термостабильностью (оптимум работы 75-80 градусов, фермент стабилен в течение нескольких часов) [2]. Данный фермент по сей день используется в экспериментах по созданию ферментных электродов и топливных элементов [3-4].

Помимо этой гидрогеназы, пурпурная бактерия *Т. roseopersicina* обладает генами ещё четырёх гидрогеназ, однако одна из них, HupUVгидрогеназа, судя по всему, не экспрессируется [5].

Гидрогеназа HupSL, как и гидрогеназа HydSL, ассоциирована с мембраной. Обе эти гидрогеназы обладают сигналами экспорта из клетки в периплазму, распознаваемыми Tat-транслоконами [6-7].

[©] Абдуллатыпов А. В., 2018

Абдуллатыпов А. В.

В цитоплазме T. roseopersicina присутствуют две гидрогеназы Нох-типа [8-10]. Точнее было бы их назвать Нох-комплексами, поскольку у этих ферментных комплексов есть два различимых компонента, гидрогеназный и диафоразный, а также в одной из гидрогеназ имеется отдельная субъединица, выполняющая роль переносчика электронов между гидрогеназной и диафоразной частью фермента [10]. Известно, что для гидрогеназной активности in vitro достаточно двух субъединиц гидрогеназ Hox-типа, но для активности in vivo необходимо наличие по крайней мере 4 субъединиц (двух субъединиц гидрогеназы и двух диафоразы), а в случае Нох1-гидрогеназы весьма важной является экспрессия субъединицы НохЕ, без которой активность Hox1-комплекса in vivo значительно снижается [8, 11].

Если структурные модели HydSL и HupSL были получены достаточно давно [12, 13], то о структуре Нох-гидрогеназ данной бактерии долгое время не было ничего известно за неимением подходящих гомологов с известной структурой, могущих послужить шаблонами для моделирования по гомологии.

В данной работе решались следующие задачи:

1) получить структурные модели гидрогеназных компонентов Нох-комплексов Hox1 и Hox2 *T. roseopersicina*;

2) Оценить достоверность полученных моделей;

3) Определить количество внутри- и межсубъединичных взаимодействий в данных гидрогеназах и сравнить их по этому параметру с шаблонами для моделирования;

4) Определить доступность электрон-переносящего железо-серного кластера для модельных соединений - компонентов гидрогеназных электродов (коронена и олигомеров нейтрального красного).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Последовательности гидрогеназ были получены из базы данных NCBI Protein [14]. Их принадлежность к конкретным группам определялась с помощью сервера HydDB [15]. Множественное выравнивание проводили с помощью сервера MUSCLE [16].

Перед моделированием последовательности субъединиц подготавливались следующим образом: на С-конце больших субъединиц удалялась область после мотива СххН, который является местом действия специфических к гидрогеназам протеаз [17]. Малые субъединицы использовались в моделировании без изменений.

Для моделирования использовалась программа MODELLER [18]. Выравнивания субъединиц получали с помощью веб-сервера BLAST (алгоритм BLASTp) [19], после этого они объединялись вручную в файлы, в которых последовательности малой и большой субъединиц шли одна за другой, причём после конца каждой аминокислотной последовательности были прописаны лиганды (4Fe4S-кластер для малой субъединицы, атом никеля, атом железа с CO- и CN-лигандами и атом магния для большой субъединицы). Для того, чтобы можно было использовать шаблон для моделирования, координатный файл шаблона меняли: координаты небелковых лигандов (гетероатомов) для малой субъединицы переносили из конца файла в позицию сразу после координат белковых атомов малой субъединицы, не меняя значения атомных координат. Это позволило программе нормально распознавать выравнивания. Небелковые кофакторы (активный центр, железо-серный кластер, ион магния) переносились в модель как твёрдые тела: их собственная геометрия не менялась во время моделирования, и они не вносили вклад в общую энергию моделируемого белка.

Для оптимизации геометрии и энергии полученных моделей была проведена минимизация энергии методом сопряжённых градиентов (VTFMоптимизация) и молекулярной динамики в вакууме.

Модели ранжировались на основании дискретно-оптимизированной энергии [20], подобный подход уже применялся ранее [13]. Значения z-оценок дискретно-оптимизированных энергий оценивали для двух субъединиц вместе и для каждой субъединицы в отдельности и сравнивали с соответствующими субъединицами шаблона. По результатам отбора, для каждой пары гидрогеназа-шаблон отбирались пять лучших моделей по значениям z-оценок для двух субъединиц, далее к ним добавлялись модели, в которых по одной из субъединиц результаты z-оценок были лучше, нежели для отобранных пяти моделей. Итоговые выборки включали в себя от 5 до 8 моделей.

Отобранные модели были подвергнуты процедуре минимизации энергии на сервере Yasara energy minimization server [21].

В полученных моделях в программе Protinter и на сервере Protein Interaction Calculator было определено количество следующих типов взаимодействий: 1) водородных связей (порог расстояния); 2) гидрофобных контактов (порог расстояния 5 ангстрем); 3) ионных пар (порог расстояния 6 ангстрем). Все эти взаимодействия считались отдельно для каждой субъединицы, а также отдельно считались межсубъединичные взаимодействия [22].

Молекулярный докинг проводился с использованием программ Autodock Vina [23] и Smina [24]. В качестве модельных соединений для имитации поверхности электродов использовали коронен модель графена, достаточно широко используемая в вычислительной химии [25, 26], а также олигомеры (мономер, димер и тример) нейтрального красного - компонента электродных поверхностей, применимых при конструировании электродов на основе HydSL-гидрогеназы [27]. Структура олигомеров реконструировалась в соответствии с работой [28]. Модели исследованных соединений были построены в программе YASARA Structure [21], их геометрия была оптимизирована с помощью встроенного пакета МОРАС методом собственных векторов [29]. Ячейка для докинга представляла собой куб с центром в середине железо-серного кластера и длиной ребра 40 ангстрем, таким образом, оценивалась возможность связывания исследованных соединений в пределах 20 ангстрем от центра железо-серного кластера. Аналогичный расчёт был проведён и со структурой гидрогеназ, которые были использованы в качестве шаблонов для моделирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидрогеназы *Т. roseopersicina* были классифицированы по группам на основе классификации HydDB [15]. Их классификация, а также данные из литературы по их локазизации в клетке и взаимодействию с переносчиками электронов (редокс-партнёрами), представлены в таблице 1.

Обе гидрогеназы Нох-типа относятся к группе 3d железоникелевых гидрогеназ; к этой группе принадлежат цитоплазматические гидрогеназы

цианобактерий (Anabaena, Cyanothece, Spirulina и др.), пурпурных серных бактерий (Nitrosococcus, Chromathium, Thiocapsa и др.), а также зелёных серных бактерий, актинобактерий, ряда гетеротрофных протеобактерий, наиболее изученная из которых – Ralstonia eutropha, и двух архей рода Halorhabdus [15, Supplementary material]. Данная группа гидрогеназ аннотирована как устойчивая к кислороду, однако найти достоверного подтверждения этому упоминанию в литературе не удалось. Тем не менее, была показана некоторая степень гомологии гидрогеназы Synechocystis sp. PCC 6803 с сенсорной гидрогеназой Rhodobacter capsulatus (группа 2b), в частности, в области остатков большой субъединицы, формирующих газовый канал [30]. Однако гомология остатков газового канала неполна. Это же касается и Нох-гидрогеназ T.roseopersicina, что показывает и множественное выравнивание последовательностей больших субъединиц гидрогеназ, приведённое ниже на рис. 1.

По рисунку 1 можно сделать вывод, что из пары остатков, сужающих газовый канал, у Нохгидрогеназ имеется только один (изолейцин), а второй остаток (лейцин) такой же, как и у чувствительных к кислороду гидрогеназ.

Недавний анализ ряда НАД+/НАДФ+восстанавливающих гидрогеназ показал, что внутри этой группы устойчивость к кислороду достаточно вариабельна. Так, гидрогеназа *Synechocystis sp.* 6803 показала свою чувствительность к кислороду, в то время как цитоплазматическая гидрогеназа из *Ralstonia eutropha* была более устойчивой к ингибированию кислородом воздуха [31]. Поиск гомологов с известной трёхмерной структурой позволил найти в базе данных PDB два фермента, наиболее подходящих для моделирования Нох-гидрогеназ:

1)5ODC, цепиЕ, F-гидрогеназаиз Methanothermococcus thermolithotrophicus, закристаллизованная в комплексе с гетеродисульфидредуктазой [32];

Таблица 1.

Наличие гидрогеназ у бактерии Thiocapsa roseopersicina.								
Наименова- ние	Код большой субъе- диницы (NCBI)	Код малой субъеди- ницы (NCBI)	Группа по HydDB	Локализация	Редокс-партнёр			
Hox1	AAP50523.1	AAP50522.1	NiFe 3d	Цитоплазма	Диафораза, Hox1E, NADH			
Hox2	ADK12981.1	ADK12980.1	NiFe 3d	Цитоплазма	Диафораза, NADH			
HupSL	AAA27410.1	AAA27409.1	NiFe 1d	Мембрана, наружная часть	HupC			
HupUV	AAX40740.1	AAX40739.1	NiFe 2b	Нет экспрессии	-			
HydSL (HynSL)	AAC38282.1	AAC38281.1	NiFe 1e	Мембрана, наружная часть; периплазма	Isp1			

ВЕСТНИК ВГУ, СЕРИЯ: ХИМИЯ. БИОЛОГИЯ. ФАРМАЦИЯ, 2018, № 3

Hox2H	M	TKNLE	FARHP	ETLKR	VCIE	EPLT	RVE	GHGK	VTLI	LDE	DDHV	KQAI	RLH!	IVEFR
Hox1H				-MSRT	VTIE	EPVT	RIE	GHAR	ITL	LGD	AGEV	EDAL	KFHJ	LTOFR
HoxH S.sp.				-MSKT	IVII	DPVT	RIE	GHAK	ISI	LND	QGNV	DDVI	RFHY	VEYR
HupV R.cap.			M	SDTPR	LVVC	SPFN	RVE	GDLE	VHL	LVG	-GRV	AAA	RVNS	SPLYR
HydB D.vul.	MSGCRAQNA	PGGIP	VTPKS	SYSGP	IVVI	OPVT	RIE	GHLR	IEVE	EVEN	-GKV	KNA	YSS	STLFR
HupL	MS	VTTAN	GFELD	TAGRR	LVVI	OPVT	RIE	GHLR	CEV	ILDE	NNVI	RNA	VSTO	TMWR
HydL				-MSER	IVVI	OPVT	RIE	GHLR	IEAG	MDG	-ENI	AQA	ISS	STSVR
					: :	*	*:*	*	00000	:	:	•••••		*
Hox2H	GFEKFIQGE	PYWEL	PVLVQ	RLCGI	CPVS	SHHL	AAA	KACD	RLI	SVDR	LTPT	AEK	VRRJ	LMHLG
Hox1H	GFEKFCEGF	PYREM	PALTA	RTCGI	CPVS	SHVL	ASN	KACD	HLLS	SVS-	IPPT	GEK	LRR.	IINLA
HoxH S.sp.	GFEKFCEGF	PMWEM	AGITA	RICGI	CPVS	HLL	CAA	KTGD	KLLA	AVQ-	IPPA	GEKI	LRRJ	LMNLG
HupV R.cap.	GFERMLEGF	APSDAI	LTLTP	RICGI	CSIS	SQSA	AAA	RALG	AAM	GLA-	PTDC	GAW	LAAJ	LIHAV
HydB D.vul.	GLEIILKGF	DPRDA	OHETO	RTCGV	CTY	THAL	AST	RCVD	NAV	SVH-	IPKN	ATY	IRNJ	LVLGA
HupL	GLEVILRGE	DPRDA	VAFTE	RICGV	CTG	THAL	TSV	RAVE	DAL	GIP-	IPEN	ANS	IRN	IMHVT
HydL	GLETILKGF	DPRDAU	WAFAQ	RICGV	CTL	/HGI	ASV	RSVE	DAL	(IE-	LPPN	AOL	IRNJ	LMISS
~~~~~	*:*: **	:	:.	* **:	*.	:	:	•	:	:	•••••	•	:	::
Hox2H	QVLQSHALH	FFHLS	SPDLL					FGID	DAVA	HRN	IVGV	IRD	HPE	IAMEG
Hox1H	OLTOSHALS	FFHLS	SPDLL					LGWD	SDP	/SRN	IFGV	MROI	DPAI	LAKDG
HoxH S.sp.	QITOSHALS	FFHLS	SPDFL					LGWD	SDPA	ATRN	VFGL	IAAI	DPDI	LARAG
HupV R.cap.	ENVSDHLVH	FNLFF	MPDF-				-TR	PCYA	ARP	VYPR	AVAR	FAA	IEG	AGRA
HydB D.vul.	QYLHDHIVH	FYHLHA	ALDFV	DVTAA	LKAI	DPAK	AAK	VASS	ISP-	RKT	TAAD	LKAY	VODI	KLKTF
HupL	LOAHDHLVH	FYHLHA	ALDWV	DVVSA	LGAI	DPKA'	TSA	LAQS	ISD	VPKS	SPGY	FRD	VONI	RLKRF
HydL	QFVHDHVMH	FYHLHA	ALDWV	DVVSA	LSAI	DPKA'	TSD	LAQS	ISSV	VPKS	SPGY	FAD	FOKI	RIKTF
	.* :	* :	*		~~~~		~~~~	~~~~~	~~~~	~~~~	•••••	:		~~~~~

*Puc. 1.* Множественное выравнивание ряда гидрогеназ, в их числе: Hox2H – Hox2H T. roseopersicina; Hox1H – Hox1H T. roseopersicina; HoxH_S.sp. - HoxH Synechocystis sp. 6803; HupV_R.cap. - HupV Rhodobacter capsulatus; HydB_D.vul. - HydB Desulfovibrio vulgaris; HupL – HupL T. roseopersicina; HydL – HydL T. roseopersicina. Остатки, свойственные гидрогеназам, чувствительным к кислороду, отмечены красным; остатки, свойственные устойчивым к кислороду сенсорным гидрогеназам (сужающие газовый канал), отмечены зелёным.

2) 5ХF9, цепи С, D - гидрогеназа из *Hydrogenophilus thermoluteolus*, термостабильный фермент (температурный оптимум реакции восстановления НАД+ равен 80°С), демонстри-

ровавший умеренную устойчивость к кислороду [33].

Общий вид полученных моделей гидрогеназ показан на рисунке 2.



*Рис. 2.* Общий вид полученных моделей гидрогеназ Hox1 и Hox2. А – Hox1-гидрогеназа, Б – Hox2-гидрогеназа. Большая каталитическая субъединица показана серым, малая электрон-переносящая – зелёным. Атомы железа окрашены фиолетовым, серы – жёлтым, никеля – оранжевым, магния – зелёным, углерода – голубым, кислорода – красным, азота – синим.

#### Моделирование трёхмерной структуры НОХ-гидрогеназ

Достоверность полученных моделей, оцененная по z-оценке дискретно-оптимизированной энергии (z-DOPE), до минимизации энергии уступала значениям для шаблона. Однако после минимизации энергии на сервере Yasara energy minimization server эти различия были уже не так существенны. Кроме того, минимизация энергии позволила убрать все артефактные ван-дер-Ваальсовы контакты между атомами. В таблице 2 приведены данные по z-DOPE полученных моделей и шаблонов до и после минимизации энергии.

Таким образом, можно считать, что достоверность полученных моделей достаточно высока для столь малой идентичности последовательностей, при этом наибольший вклад в снижение z-оценок DOPE (т.е. повышение надёжности моделей) внесла минимизация энергии на сервере YASARA energy minimization server.

Внутрисубъединичные и межсубъединичные взаимодействия для гидрогеназ Hox1 и Hox2 приведены в таблице 3. Результаты оценки количества взаимодействий следующие: 1) Для исследованных гидрогеназ не удалось показать однозначного различия в предполагаемой термостабильности; 2) Весьма важным для результатов оценки количества взаимодействий оказался выбор шаблона; 3) Если ориентироваться на анализ структуры шаблонов, то скорее всего, основной вклад в повышенную стабильность гидрогеназ при высоких температурах вносят не ионные пары и водородные связи, а гидрофобные взаимодействия.

Главное биотехнологически значимое преимущество Нох-гидрогеназ в сравнении с HydSL- и HupSL-гидрогеназами заключается в наличии у них лишь одного электрон-переносящего железо-серного кластера вместо трёх. Это приводит к тому, что в случае иммобилизации на электрод преодолеваемый электроном путь от активного центра до поверхности электрода будет значительно короче, чем в случае HydSL-гидрогеназы. Для оценки применимости Нох-гидрогеназ на стандартных электродных

Таблица 2.

z-оценки DOPE для каждой из субъединиц модели и шаблона, а также для двухсубъединичных комплексов. В первом столбце для каждой пары модель-шаблон приведены идентичности последовательностей большой и малой субъединицы, соответственно (в скобках).

Модель	Z-DOPE малой субъединицы	Z-DOPE большой субъединицы	Z-DOPE двух субъединиц
U1 50DC (410//420/)	-0.6530.661	-1.3481.359	-1.3391.348
H0X1-5ODC (41%/42%)	(-1.0421.107)	(-1.6751.840)	(-1.7621.860)
Hox1-5XF9	-0.5540.605	-1.4021.408	-1.3761.393
(46%/39%)	(-1.0291.222)	(-1.8401.884)	(-1.8751.927)
Hox2-5ODC	-0.8000.830	-0.8970.902	-1.0931.098
(42%/40%)	(-1.0871.415)	(-1.3711.506)	(-1.5851.886)
Hox2-5XF9	-0.8550.870	-1.0961.113	-1.2841.299
(57%/61%)	(-1.1541.293)	(-1.5201.573)	(-1.7391.791)
5000	-1.032	-1.966	-1.953
JODC	(-1.092)	(-1.986)	(-2.002)
<b>5</b> 3/F0	-1.239	-1.646	-1.834
3AF9	(-1.414)	(-1.755)	(-1.980)

Таблица 3.

Результаты расчёта взаимодействий в построенных моделях гидрогеназ и в файлах шаблонов после минимизации энергии. Приведены данные по количеству гидрофобных взаимодействий (ГВ), ионных пар (ИП), водородных связей (BC). Hox1-5ODC – модели гидрогеназы Hox1 по шаблону 5ODC; Hox1-5XF9 - модели гидрогеназы Hox1 по шаблону 5XF9; Hox2-5ODC – модели гидрогеназы Hox2 по шаблону 5ODC; Hox2-5XF9 - модели гидрогеназы Hox2 по шаблону 5XF9; 5ODC, 5XF9 – файлы шаблонов для моделирования.

Тип взаимодействий	Hox1-5ODC	Hox1-5XF9	Hox2-5ODC	Hox2-5XF9	50DC	5XF9
ГВ, малая	133.5±7.772	132±9.562	137.25±9.607	$139.4 \pm 5.404$	135	165
ГВ, большая	360±9.879	374.75±12.41	$330.88 \pm 43.68$	339.2±21.97	341	401
ГВ, между субъединицами	33.5±3.742	35.38±3.991	33.63±3.991	41.2±3.577	44	48
ИП, малая	$15.67 \pm 3.502$	16.88±3.284	19.13±3.919	21.8±0.894	20	18
ИП, большая	$57.0 \pm 6.928$	62.63±3.012	75.75±12.906	84.8±7.668	86	61
ИП, между субъединицами	16.5±4.336	14.5±3.854	$18.63 \pm 4.528$	22.6±3.033	23	20
ВС, малая	396.2±15.67	395.38±12.87	390.88±9.036	394.6±8.075	391	285
ВС, большая	1081.5±12.4	1085.25±13.8	1088.3±16.45	1100.2±13.3	1093	993
ВС, между субъединицами	69.33±12.94	65.75±15.847	68.75±12.224	80±13.266	122	89

ВЕСТНИК ВГУ, СЕРИЯ: ХИМИЯ. БИОЛОГИЯ. ФАРМАЦИЯ, 2018, № 3

#### Абдуллатыпов А. В.

материалах (полимеризованном нейтральном красном и графите) был проведён молекулярный докинг олигомеров нейтрального красного и коронена как модельного соединения, имитирующего графен. Результаты докинга приведены в таблице 4.

По результатам докинга можно сказать, что сродство гидрогеназ к олигомерам нейтрального красного стабильно возрастает при увеличении длины цепи, и более того, сродство всех исследованных гидрогеназ к тримеру нейтрального красного выше, чем к коронену. Это даёт основания полагать, что электроды на основе электрополимеризованного нейтрального красного будут оптимальными для электрохимических исследований Нох-гидрогеназ.

Надо сказать, что результаты докинга коронена следует с большой осторожностью экстраполиро-

вать на другие углеродные материалы, такие, как графен, графит и углеродные нанотрубки. Для того, чтобы докинг коронена отражал сродство фермента к поверхности графитового электрода, нужно, чтобы ориентация коронена в данном комплексе была такой, чтобы можно было продолжить плоскость коронена, не пересекая молекулу фермента, т.е., чтобы плоскость коронена проходила по касательной к глобуле. Помимо этого, при докинге коронена сайты его связывания находились на большем расстоянии от железо-серного кластера, чем при докинге нейтрального красного (более 17 ангстрем).

На рисунке 3 показаны комплексы гидрогеназ Нох-типа с короненом и с тримером нейтрального красного, полученные в результате докинга. Следует обратить внимание на то, что расстояние



*Рис. 3.* Комплексы гидрогеназ Hox1 и Hox2 с лигандами. А – Hox1-гидрогеназа, лиганд – коронен. Красной стрелкой показано направление маловероятного переноса электронов. Б – Hox2-гидрогеназа, лиганд – тример нейтрального красного. Жёлтой стрелкой показано направление вероятного переноса электронов. Большая каталитическая субъединица показана серым, малая электрон-переносящая – зелёным. Атомы железа окрашены фиолетовым, серы – жёлтым, никеля – оранжевым, углерода – голубым, кислорода – красным, азота – синим.

Таблица 4.

Результаты молекулярного докинга нейтрального красного и коронена к гидрогеназам Нох-типа. В таблице приведены данные по энергиям связывания в ккал/моль. В скобках приведены энергии связывания, вычисленные с использованием программы Smina. 5Xf9delta – файл 5XF9 с делецией двух железо-серных кластеров (m.e. часть фермента, гомологичная Hox1 и Hox2).

Фермент	Шаблон	Связывание НК, мономер	Связывание НК, димер	Связывание НК, тример	Связывание коронена
Hox1	50DC	-6.37.1 (-6.47.3)	-8.39.0 (-8.19.0)	-9.110.7 (-9.110.7)	-7.49.2 (-7.49.2)
Hox1	5XF9	-6.17.8 (-6.38.0)	-8.39.9 (-8.59.4)	-8.710.1 (-8.710.3)	-7.18.5 (-7.18.6)
Hox2	50DC	-5.87.5 (-6.17.7)	-8.59.0 (-8.59.0)	-8.511.0 (-8.511.1)	-7.59.2 (-7.59.2)
Hox2	5XF9	-6.07.3 (-6.07.5)	-7.68.4 (-7.58.5)	-8.49.7 (-8.4; -9.8)	-7.88.8 (-7.88.8)
50DC	_	-6.7 (-6.9)	-8.7 (-8.7)	-9.7 (-9.8)	-7.9 (-7.9)
5XF9delta	_	-7.6 (-7.7)	-8.5 (-8.5)	-9.3 (-9.3)	-7.8 (-7.8)

ВЕСТНИК ВГУ, СЕРИЯ: ХИМИЯ. БИОЛОГИЯ. ФАРМАЦИЯ, 2018, № 3

от молекулы нейтрального красного до ближайшего атома железа равно 9.66 ангстрема, т.е. это меньше расстояния от активного центра до железо-серного кластера (10.88 ангстрема), значит, при иммобилизации на электрод с нейтральным красным перенос электрона на электрод может не быть лимитирующей стадией электрокатализа.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе получены модели цитоплазматических гидрогеназ фототрофной бактерии *Thiocapsa roseopersicina*, проведена оценка полученных моделей и показано, что полученные модели могут быть использованы для оценки применимости цитоплазматических гидрогеназ в качестве катализаторов водородных электродов. По данным проведённых вычислений установлено, что цитоплазматические гидрогеназы могут быть иммобилизованы на поверхности водородных электродов с помощью нейтрального красного, что требует экспериментальной проверки.

Возможно, что выделение гидрогеназных компонент Нох-комплексов позволит получить более эффективные водородные электроды за счёт сокращения длины пробега электрона от активного центра до поверхности электрода.

Помимо этого, стоит отметить, что гидрогеназные компоненты Hox-комплексов, будучи устроенными более просто, чем гидрогеназы HydSL и HupSL, могут служить в целом более удобными объектами для всестороннего исследования методами мутагенеза и электрохимии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богоров Л.А. // Микробиология. 1974. Т. 43. С. 326–333.

2. Гоготов И.Н., Зорин Н.А., Кондратьева Е.Н. // Биохимия. 1976. Т. 41. С. 836–842.

3. Karyakin A.A., Morozov S.V., Karyakina E.E., Zorin N.A., Perelygin V.V., Cosnier S. // Biochem Soc Trans. 2005. Vol.33(1), pp.73-75.

4. Shastik E.S., Vokhmyanina D.V., Zorin N.A., Voronin O.G., Karyakin A.A., Tsygankov A.A. // EnzymeMicrobTechnol.2011.Vol.49(5),pp.453-458.

5. Kovács A.T., Rákhely G., Balogh J., Maróti G., CournacL., CarrierP., MészárosL.S., PeltierG., Kovács K.L. // FEBS J. 2005. Vol. 272 (18), pp.4807-4816.

6. Colbeau A., Kovacs K.L., Chabert J., Vignais P.M. // Gene. 1994. Vol. 140, pp. 25-31.

7. Rakhely G., Colbeau A., Garin J., Vignais P.M., Kovacs K.L. // J Bacteriol. 1998. Vol.180 (6), pp. 1460-1465. 8. Rákhely G., Kovács A.T., Maróti G., Fodor B.D., Csanádi G., Latinovics D., Kovács K.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 70, pp. 722–728.

9. Rakhely G., Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1767, pp. 671–676.

10. Maróti J., Farkas A., Nagy I.K., Maróti G., Kondorosi E., Rákhely G., Kovács K.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Vol. 76, pp. 5113–5123.

11. Palágyi-Mészáros L.S., Maróti J., Latinovics D., Balogh T., Klement E., Medzihradszky K.F., Rákhely G., Kovács K.L. // FEBS J. 2009. Vol. 276, pp. 164–174.

12. Szilágyi A., Kovács K.L., Rákhely G., Závodszky P.//JMolModel. 2002. Vol. 8(2), pp. 58-64.

13. Абдуллатыпов А. В., Цыганков А. А // Компьютерные исследования и моделирование. 2013. Т. 5. С. 737-747.

14. NCBI Resource Coordinators // Nucleic Acids Res. 2017. Vol.45(1), pp. 12-17.

15. Søndergaard D., Pedersen C.N., Greening C. // Sci Rep. 2016. Vol.27(6), p. 34212.

16. Edgar R.C. // BMC Bioinformatics. 2004. Vol.5(1), p. 113.

17. Devine E., Holmqvist M., Stensjö K., Lindblad P. // BMC Microbiol. 2009. Vol. 9, 53.

18. Sali A., Blundell T.L. // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 234, pp. 779–815.

19. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215, pp. 403–410.

20. Shen M., Sali A. // Protein Sci. 2006. Vol. 15, pp. 2507–2524.

21. Krieger E., Joo K., Lee J., Lee J., Raman S., Thompson J., Tyka M., Baker D., Karplus K. // Proteins. 2009. Vol. 77 (Suppl 9), pp. 114-122.

22. Tina K.G., Bhadra R., Srinivasan N. // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35, pp. W473–W476.

23. Trott O., Olson A.J. // J. Comput. Chem. 2010. Vol. 31, pp. 455–461.

24. Quiroga R., Villarreal M.A. // PLoS One. 2016. Vol. 11(5), p. e0155183.

25. Pykal M., Jurečka P., Karlický F., Otyepka M. // Phys Chem Chem Phys. 2016. Vol. 18(9), pp. 6351-6372.

26. de Mendonça J.P.A, de Lima A.H., Junqueira G.M.A., Quirino W.G., Legnani C., Maciel I.O., Sato F. // Materials Research Express. 2016. Vol. 3(5), p. 055020

27. Воронин О.Г., Конищева Е.В., Зорин Н.А., Федотенков Ф.А., Карякина Е.Е., Карпачева Г.П., Орлов А.В., Киселева С.Г., Карякин А.А. // НаноАбдуллатыпов А. В.

и микросистемная техника. 2013. № 5. С. 15-19.

28. Pauliukaite R., Brett C. // Electroanalysis. 2008. Vol. 20(12), pp. 1275-1285.

29. Stewart J. // Quant. Chem. Prog. Exch. 1990. Vol.10, pp. 86-97.

30. Cano M., Volbeda A., Guedeney G., Aubert-Jousset E., Richaud P., Peltier G., Cournac L. // International Journal of Hydrogen Energy. 2014. Vol. 39(30), pp. 16872–16884.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН Абдуллатыпов А. В., научный сотрудник Тел. +7 (4967) 73-27-91 E-mail: azatik888@yandex.ru 31. Jugder B.E., Lebhar H., Aguey-Zinsou K.F., Marquis C.P. // MethodsX. 2016. Vol. 3, pp. 242-250.

32. Wagner T., Koch J., Ermler U., Shima S. // Science. 2017. Vol. 357, pp.699-703.

33. Preissler J., Wahlefeld S., Lorent C., Teutloff C., Horch M., Lauterbach L., Cramer S.P., Zebger I., Lenz O. // BBA - Bioenergetics. 2018. Vol. 1859(1), pp. 8-18

FSBSI Institute of basic biological problems RAS Abdullatypov A. V., researcher Ph.: +7 (4967) 73-27-91 E-mail:azatik888@yandex.ru

# MODELING 3D-STRUCTURE OF HOX-HYDROGENASES FROM PURPLE SULFUR BACTERIUM *THIOCAPSA ROSEOPERSICINA* BBS

### A. V. Abdullatypov

#### FSBSI Institute of Basic Biological Problems RAS

Abstract. Atomic structure of hydrogenase fragments of two cytoplasmic Hox-complexes (subunits Hox1H, Hox1Y, Hox2H, Hox2Y) from purple sulfur bacterium Thiocapsa roseopersicina was modeled in the work. Two cytoplasmic hydrogenase structures determined earlier by other researchers (hydrogenases from Methanothermococcus thermolithotrophicus and from Hydrogenophilus thermoluteolus) were chosen as templates for homology modeling. Confidence level of the obtained models was calculated on base of discrete optimized protein energy (DOPE) and its z-score. The chosen optimization protocol was shown to provide improved quality of model building (normalized DOPE z-score values below -1 were achieved). The obtained models of large subunits contain nickel atom, iron atom with one CO- and two CN-ligands, and magnesium atom; small subunits contain electron-transferring iron-sulfur cluster. The analysis of intrasubunit and intersubunit interactions (hydrogen bonds, ionic pairs, hydrophobic contacts) was carried out. The preliminary data do not allow making any confident suggestions on types of interactions stabilizing Hox-type hydrogenases and on temperature-related properties of these hydrogenases. Molecular docking analysis showed that cytoplasmic hydrogenases could interact with hydrogenase electrode components used in laboratory practice, such as neutral red oligomers and coronene (the latter was chosen as a model compound simulating graphite surface). Stable tendency of binding Gibbs energy decrease (i.e. affinity enhancement) from monomer to trimer of neutral red was observed. Meanwhile, both hydrogenases bound neutral red trimer stronger than coronene. This allows to suggest that poly-(neutral red) would be an optimal electrode material for experimental examination of enzymatic hydrogen electrodes fabricated on base of the studied hydrogenases. It was supposed that presence of only one iron-sulfur cluster would provide the shortest path from active site to the electrode, which could be the advantage of Hox-hydrogenases over other hydrogenases of this bacterium.

Keywords: hydrogenase, Thiocapsa roseopersicina, molecular modeling, molecular docking.

## REFERENCES

1. Bogorov L.A., Mikrobiologiia, 1974, Vol. 43, pp. 326-333.

2. Gogotov I.N., Zorin N.A., Kondratyeva E.N., Biokhimiya (Biochemistry-Moscow), 1976, Vol. 41, pp. 836–842. 3. Karyakin A.A., Morozov S.V., Karyakina E.E., Zorin N.A., Perelygin V.V., Cosnier S., Biochem Soc Trans, 2005, Vol.33(1), pp. 73-75.

4. Shastik E.S., Vokhmyanina D.V., Zorin N.A., Voronin O.G., Karyakin A.A., Tsygankov A.A., Enzyme Microb Technol, 2011, Vol.49(5), pp. 453-458.

5. Kovács A.T., Rákhely G., Balogh J., Maróti G., Cournac L., Carrier P., Mészáros L.S., Peltier G., Kovács K.L., FEBS J, 2005, Vol. 272(18), pp.4807-4816.

6. Colbeau A., Kovacs K.L., Chabert J., Vignais P.M., Gene, 1994, Vol. 140, pp. 25-31.

7. Rakhely G., Colbeau A., Garin J., Vignais P.M., Kovacs K.L., J Bacteriol, 1998, Vol.180(6), pp. 1460-1465.

8. Rákhely G., Kovács A.T., Maróti G., Fodor B.D., Csanádi G., Latinovics D., Kovács K.L., Appl. Environ. Microbiol., 2004, Vol. 70, pp. 722–728.

9. Rakhely G., Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A., Biochim. Biophys. Acta, 2007, Vol. 1767, pp. 671–676.

10. Maróti J., Farkas A., Nagy I.K., Maróti G., Kondorosi E., Rákhely G., Kovács K.L., Appl. Environ. Microbiol, 2010, Vol. 76, pp. 5113–5123.

11. Palágyi-Mészáros L.S., Maróti J., Latinovics D., Balogh T., Klement E., Medzihradszky K.F., Rákhely G., Kovács K.L., FEBS J, 2009, Vol. 276, pp. 164–174.

12. Szilágyi A., Kovács K.L., Rákhely G., Závodszky P., J Mol Model, 2002, Vol. 8(2), pp. 58-64.

13. Abdullatypov A. V., Tsygankov A.A., Komp'yuternye issledovaniya i modelirovanie (Computer research and modeling), 2013, Vol. 5, pp. 737-747.

14. NCBI Resource Coordinators. Nucleic Acids Research, 2017, Vol.45(1), pp.12-17.

15. Søndergaard D., Pedersen C.N., Greening C., Scientific Reports, 2016, Vol.27(6), p. 34212.

16. Edgar R.C. BMC Bioinformatics, 2004, Vol.5(1), p. 113.

17. Devine E., Holmqvist M., Stensjö K., Lindblad P., BMC Microbiology, 2009, Vol. 9, p. 53.

18. Sali A., Blundell T.L., J. Mol. Biol., 1993, Vol. 234, pp. 779–815.

19. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., J. Mol. Biol., 1990, Vol. 215, pp. 403–410.

20. Shen M., Sali A., Protein Sci., 2006, Vol. 15, pp. 2507–2524.

21. Krieger E., Joo K., Lee J., Lee J., Raman

S., Thompson J., Tyka M., Baker D., Karplus K., Proteins, 2009, Vol. 77(Suppl 9), pp. 114-122.

22. Tina K.G., Bhadra R., Srinivasan N., Nucleic Acids Res., 2007, Vol. 35, pp. W473–W476.

23. Trott O., Olson A.J., J. Comput. Chem., 2010, Vol. 31., pp. 455–461.

24. Quiroga R., Villarreal M.A., PLoS One, 2016, Vol. 11(5), p. e0155183.

25. Pykal M., Jurečka P., Karlický F., Otyepka M., Phys Chem Chem Phys, 2016., Vol. 18(9), pp. 6351-6372.

26. de Mendonça J.P.A, de Lima A.H., Junqueira G.M.A., Quirino W.G., Legnani C., Maciel I.O., Sato F., Materials Research Express, 2016, Vol. 3(5), p. 055020

27. Voronin O.G., Konishcheva E.V., Zorin N.A., Fedotenkov F.A., Karyakina E.E., Karpacheva G.P., Orlov A.V., Kiseleva S.G., Karyakin A.A., Nano- i mikrosistemnaya tekhnika (Nano- and microsystems technology), 2013, No. 5, pp. 15-19.

28. Pauliukaite R., Brett C., Electroanalysis, 2008, Vol. 20(12), pp. 1275-1285.

29. Stewart J., Quant. Chem. Prog. Exch., 1990, Vol.10, pp. 86-97.

30. Cano M., Volbeda A., Guedeney G., Aubert-Jousset E., Richaud P., Peltier G., Cournac L., International Journal of Hydrogen Energy, *2014, Vol.* 39(30), pp. 16872–16884.

31. Jugder B.E., Lebhar H., Aguey-Zinsou K.F., Marquis C.P., MethodsX, 2016, Vol. 3, pp. 242-250.

32. Wagner T., Koch J., Ermler U., Shima S., Science, 2017, Vol. 357, pp. 699-703.

33. Preissler J., Wahlefeld S., Lorent C., Teutloff C., Horch M., Lauterbach L., Cramer S.P., Zebger I., Lenz O., BBA – Bioenergetics, *2018*, Vol. 1859(1), pp. 8-18.