

УДК 577.15

## РЕКОНСТРУКЦИЯ HYDSL ГИДРОГЕНАЗЫ *Thiocapsa roseopersicina* BBS ПОСЛЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИАНИДОМ

© 2021 г. Н. А. Зорин<sup>1</sup>, А. Н. Хуснутдинова<sup>1</sup>, А. С. Стародубов<sup>1</sup>,  
И. И. Проскураков<sup>1</sup>, А. А. Цыганков<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук — обособленное подразделение, Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: [tit@issp.serpukhov.su](mailto:tit@issp.serpukhov.su)

Поступила в редакцию 06.10.2020 г.

После доработки 27.11.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

В работе показано, что после длительной обработки цианидом каталитический центр HydSL гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* остается активным. Обнаружено, что при инкубации гидрогеназы, обработанной цианидом, в присутствии бета-меркаптоэтанола, трехвалентного железа и сульфида натрия активность гидрогеназы в реакции окисления водорода в присутствии метилвиологена восстанавливалась. Процесс реконструкции активности зависел от времени и достигал максимального значения (~60%) в течение 30 мин при комнатной температуре. При этом в спектре поглощения гидрогеназы появлялась полоса поглощения при 420 нм, присутствующая в нативной гидрогеназе и исчезающая после обработки цианидом, что свидетельствовало о реконструкции железосерных кластеров. Таким образом, вместо выращивания бактерий в присутствии изотопа железа можно замещать <sup>56</sup>Fe на <sup>57</sup>Fe в выделенном ферменте, что позволит использовать значительно меньшие количества <sup>57</sup>Fe.

**Ключевые слова:** гидрогеназа, водород, реакция изотопного обмена, NiFe-активный центр, FeS-кластеры, реконструкция ферментов

DOI: 10.31857/S0555109921030168

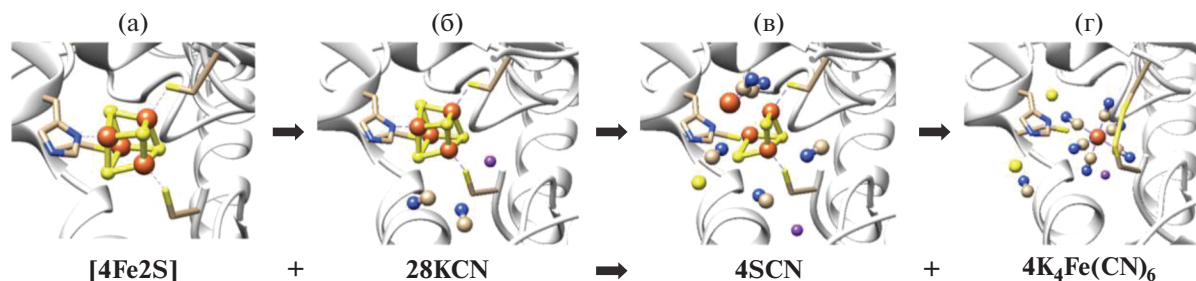
Гидрогеназами называют большую группу металлоферментов, катализирующих обратимую реакцию восстановления протонов до молекулярного водорода.

Различают три группы гидрогеназ по содержанию металлов в активном центре: NiFe-гидрогеназы, содержащие биметаллический железо-никелевый активный центр, FeFe-гидрогеназы, содержащие двухатомный кластер железа в активном центре и Fe-гидрогеназы, не содержащие металлов в белковой глобуле, но включающие Fe-содержащий кофактор [1–3]. Для изученных NiFe-гидрогеназ показано, что биметаллический кластер активного центра ковалентно связан с белком четырьмя остатками цистеина, два из которых образуют связывающий мостик между ионами Ni и Fe, а два других координируют ион Ni. Атом железа в составе активного центра связан с тремя небелковыми двухатомными лигандами (одним СО-лигандом и двумя CN<sup>-</sup>-лигандами) [1].

Термостабильная гидрогеназа HydSL из пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS (КФ: 1.12.99.6) относится к 1 группе, е под-

группе NiFe-гидрогеназ [3] и состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 64 и 34 kDa. NiFe-активный центр находится в большой субъединице (HydL) [1, 5], причем, как и у других NiFe-гидрогеназ содержит двухатомные СО и CN-лиганды [7]. Малая субъединица (HydS) содержит три FeS-кластера, которые образуют транспортную систему для внутримолекулярного переноса электронов между активным центром и поверхностью фермента. На основании анализа консервативных участков гидрогеназ подгруппы 1e был сделан вывод, что эти гидрогеназы содержат два 4Fe4S кластера (проксимальный и дистальный относительно активного центра) и 3Fe4S в качестве медианного кластера [1, 3]. Исследования FeS-кластеров у гидрогеназы *Aquifex aeolicus*, относящейся к 1e подгруппе, также подтвердило наличие именно этих кластеров [6], причем с помощью мессбауэровской спектроскопии обнаружено необычное [4Fe4S]<sup>3+</sup> состояние проксимального кластера.

Для HydSL гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* таких работ не проводилось, хотя это могло бы



**Рис. 1.** Гипотетическая схема разрушения 4Fe4S кластера при действии цианида. (а) – нативный 4Fe4S кластер (на основе кластера из *Ralstonia eutropha*, pdb ID: 5MDJ); (б) – в присутствии цианида; (в) – частичное разрушение FeS кластера с образованием Fe(CN)<sub>2</sub> и SCN. (г) – полное разрушение кластера с образованием феррицианида и дисульфидных связей цистеинов. Рисунок сделан с использованием пакета программ CHIMERA.

дать существенную информацию о редокс состояниях FeS-кластеров при переносе электрона в процессе поглощения водорода. Использование мессбауэровской спектроскопии или ядерно-резонансной колебательной спектроскопии [7] для анализа редокс-состояний требует наличия в кластере изотопа <sup>57</sup>Fe. Для получения гидрогеназы с таким изотопом железа необходимо выращивание большого количества биомассы в присутствии только этого изотопа железа. Представляется перспективным поиск специфического ингибитора, разрушающего FeS-кластеры с последующей их реконструкцией в присутствии <sup>57</sup>Fe. Такой подход, в случае его реализации, является более экономичным с точки зрения использования <sup>57</sup>Fe.

Известны ингибиторы, разрушающие FeS-кластеры. В частности, показано, что продолжительное инкубирование гидрогеназы *T. roseopersicina* с цианидом вызывает потерю активности фермента в реакции поглощения водорода с метилвиологеном в качестве акцептора [8]. Это сопровождается разрушением железо-серных кластеров, и появлением в растворе ферроцианида. В качестве примера можно привести иллюстрацию разрушения 4Fe4S кластера под действием цианида (рис. 1). В то же время после обработки цианидом каталитический железо-никелевый центр по-прежнему содержит CO и CN<sup>-</sup>-лиганды [8]. Однако данные о каталитической активности активного центра после такого воздействия отсутствуют.

Реконструкция FeS-кластеров в различных белках после их разрушения возможна. Например, для ферредоксина показана возможность практически полного восстановления спектральных характеристик, функций и нативной структуры после их обработки соединениями ртути [9].

Цель работы – выявление каталитической активности NiFe-центра и подбор условий для реконструкции FeS-кластеров после длительной обработки гидрогеназы H<sub>2</sub>SL цианидом.

## МЕТОДИКА

В работе использовали тяжелую воду (99.9% D<sub>2</sub>O), цианид калия, метилвиологен и реактивы для электрофореза в ПААГ фирмы “Sigma-Aldrich” (США), фенолсефарозу CL-4В фирмы “Pharmacia” (Швеция), ДЭАЭ-целлюлозу DE<sub>52</sub> фирмы “Whatman” (Англия), и дитионит натрия фирмы “Fluka” (Швейцария). Остальные реактивы – отечественного производства марок х. ч. и ос. ч.

Клетки пурпурной серной бактерии *T. roseopersicina* BBS выращивали в анаэробных фотогетеротрофных условиях на модифицированной среде Пфеннига [10] в присутствии 0.2% ацетата натрия при 28°C и освещении лампами накаливания (~50 Вт м<sup>-2</sup>).

**Получение экстрактов клеток и очистка гидрогеназы.** Для получения бесклеточных экстрактов клетки, отобранные в конце экспоненциальной фазы роста, отделяли от культуральной жидкости на проточной центрифуге. Выделение гидрогеназы проводили как описано ранее [8]. В процедуру выделения входило разрушение клеток, обработка ацетоном, фракционирование сульфатом аммония, жидкостная хроматография на колонках с фенолсефарозой CL-4В и ДЭАЭ-целлюлозой DE<sub>52</sub>, а также препаративный электрофорез.

**Определение гидрогеназной активности.** Активность гидрогеназы определяли по реакции восстановления окисленного метилвиологена водородом в кювете Тунберга спектрофотометрическим методом [8]. Реакционная смесь (общий объем 2 мл) содержала: 50 мМ Трис-НСl буфер, рН 9.0, 4 мМ метилвиологен и 1–10 мкг гидрогеназы. Кювету заполняли водородом, иногда для иницирования реакции добавляли следовые количества (5–10 мкл) 20 мМ раствора дитионита натрия, приготовленного в анаэробных условиях. Все измерения активности фермента проводили при температуре 30°C. Для расчета активности использовали коэффициент экстинкции восстановленного метилвиологена  $\epsilon_{600} = 13.00 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Ферментативную активность выражали в мкмоль  $H_2$ /мин на 1 мг белка.

Активность гидрогеназы в реакции изотопного обмена водорода в системе  $H_2/D_2O$  регистрировали на изотопном масс-спектрометре Delta V Advantage (“Thermo Fisher”, Германия) по образованию HD. Реакцию проводили в сосуде объемом 14 мл, содержащем 1 мл жидкой фазы – 0.8 мл 50 мМ К-фосфатного буфера, pH 7.0, 0.2 мл  $D_2O$  и 10 мкл 20 мМ раствора дитионита натрия. Газовая фаза содержала 2%  $H_2$  в гелии. Сосуд был соединен с масс-спектрометром отрезком вакуумного шланга с двумя стопорами. Отрезок шланга между стопорами служил пробоотборником. Реакцию проводили при комнатной температуре (22°C), начинали введением в сосуд 2 мкг гидрогеназы. Каждые 3 мин отбирали пробу (300 мкл) газовой фазы и вводили в масс-спектрометр, измеряя сигнал HD. В качестве контроля служил такой же сосуд с  $D_2O$  и всеми компонентами реакционной смеси и газовой фазы за исключением гидрогеназы.

**Ингибирование гидрогеназы цианидом и реконструкция FeS-кластеров.** Для обработки гидрогеназы ингибитором использовали свежеприготовленный раствор 1.0 М KCN, который добавляли до концентрации 50 мМ. Инкубацию фермента с ингибитором проводили, при комнатной температуре до достижения ~95% падения активности, аналогично описанному ранее [8]. Фермент отмывали от цианида трехкратно 20 мМ К-фосфатным буфером, pH 7.0, с использованием микроконцентраторов Amicon “Microcon-10” (“Merk”, международная группа компаний, зарегистрирована и в России <https://www.merckgroup.com/ru-ru>). Далее измеряли остаточную активность гидрогеназы и проводили реконструкцию FeS-кластеров согласно методу, аналогичному описанному ранее [11] со следующими особенностями. К раствору фермента в анаэробных условиях добавляли бета-меркаптоэтанол до концентрации 0.5%. Через 10 мин добавляли раствор 30 мМ  $FeCl_3$  в воде до концентрации 0.15 мМ. Через 5 мин после добавления  $FeCl_3$  добавляли 30 мМ раствор  $Na_2S$  в воде до концентрации 0.15 мМ. Смесь фермента с добавками инкубировали при комнатной температуре и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты раствора (5 мкл) для определения гидрогеназной активности.

**Регистрация спектров поглощения препаратов гидрогеназы.** Для контроля разрушения и восстановления FeS-кластеров регистрировали спектры поглощения до и после обработки препаратов гидрогеназы цианидом, а также после инкубации в растворе для реконструкции. Спектры поглощения образцов гидрогеназы в области 350–600 нм измеряли на спектрофотометре “Shimadzu 1600” (Япония) при комнатной температуре.

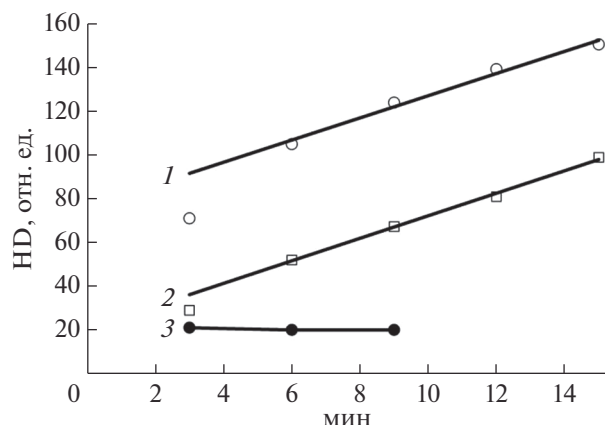
Статистический и регрессионный анализ проводили с помощью SigmaPlot 12.0. Данные по H/D изотопному обмену усредняли по 150 точкам (скользящий временной интервал 15 с), остальные эксперименты проводили 3–8 раз.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Использование различных ингибиторов широко применяется в энзимологии для изучения механизма действия и структуры ферментов. Цианид является одним из специфичных ингибиторов металлферментов, включая гидрогеназу. Действие цианида на гидрогеназы имеет сложный характер. Ранее было показано, что цианид ингибирует очищенную гидрогеназу из *Azotobacter vinelandii* [12]. При этом ингибирование наблюдалось лишь когда фермент был в окисленном состоянии. В восстановленном состоянии гидрогеназа не ингибировалась цианидом. Позднее было обнаружено, что цианид быстро реагирует с гидрогеназами Hyd1 и Hyd2 из *Escherichia coli* [13], если они находятся в окисленном состоянии. Согласно предложенному механизму ингибирования цианид действует как сильный промотор формирования неактивного состояния Ni-B активного центра ферментов. При этом ингибирование снималось восстановлением гидрогеназ.

Недавно было обнаружено, что при длительном (часы) воздействии этого соединения на HydSL гидрогеназу *T. roseopersicina* происходит специфичное разрушение FeS-кластеров [8]. После 20 ч инкубации с цианидом остаточная активность гидрогеназы в реакции поглощения водорода с метилвиологеном в качестве акцептора электронов не проявлялась. При этом, согласно результатам ИК-Фурье спектроскопии, CO и CN лиганды в активном центре гидрогеназы сохранялись. Процесс переноса электронов по цепи внутримолекулярных кластеров необходим в случае взаимодействия фермента с акцептором электронов в реакции поглощения водорода или с донором электронов в реакции выделения водорода. Для активации молекулы водорода гидрогеназой перенос электронов через FeS кластеры не требуется [4], причем такая активация может быть обнаружена по реакции обмена в системе  $H_2/D_2O$  или  $D_2/H_2O$ . Ранее было показано, что HydSL гидрогеназа *T. roseopersicina* может катализировать реакции изотопного обмена в системе  $H_2/D_2O$  или  $D_2/H_2O$  [14]. Таким образом, можно предполагать, что гидрогеназа после ингибирования цианидом может осуществлять дейтериевый обмен.

Для проверки этого предположения нативную гидрогеназу и гидрогеназу после ее обработки цианидом инкубировали в растворе  $D_2O$  в присутствии  $H_2$ , как описано в Методах исследования с



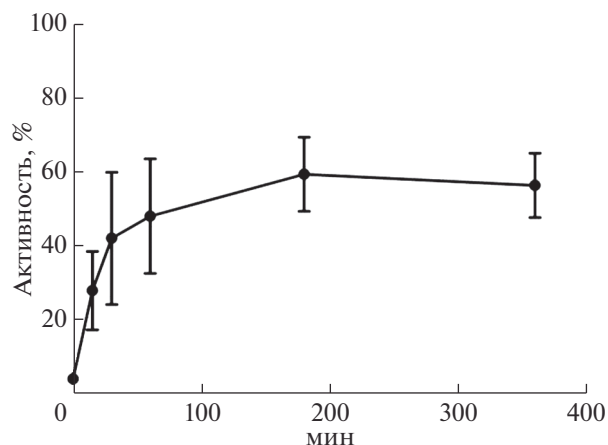
**Рис. 2.** Изменение содержания HD в газовой фазе в присутствии нативной гидрогеназы (1), гидрогеназы после инкубации с 50 мМ цианидом калия в течение 24 ч (2), а также в отсутствие фермента (3).

периодическим анализом содержания HD в газовой фазе (рис. 2).

Обнаружено, что в сосудах с нативной (рис. 2, 1) и обработанной цианидом гидрогеназой (рис. 2, 2) содержание HD в газовой фазе возрастало. В то же время в сосуде без гидрогеназы содержание HD в газовой фазе не увеличивалось (рис. 2, 3). Аппроксимацию накопления HD проводили в соответствии с уравнением  $HD = HD_0 + Vt$ , где  $HD_0$  – концентрация HD в нулевой момент времени,  $V$  – скорость накопления HD в газовой фазе,  $t$  – время. При этом учитывали 4 точки, поскольку первая точка имела заниженное значение вследствие лаг-периода, обусловленного активацией гидрогеназ и диффузионными процессами перехода HD из жидкости в газ. Согласно полученным данным (табл. 1) скорости изменения содержания HD в газовой фазе для нативной и обработанной цианидом гидрогеназ совпадали при высоких коэффициентах корреляции экспериментальных данных и результатов аппроксимации. Таким образом, после обработки цианидом активный центр гидрогеназы не только не терял

**Таблица 1.** Результаты аппроксимации накопления HD в присутствии нативной и обработанной цианидом гидрогеназ (рис. 2)

Параметр уравнения	Нативная гидрогеназа	Гидрогеназа после обработки цианидом
Коэффициент корреляции, R	0.9937	0.9985
$HD_0$ , отн. ед	$76.49 \pm 4.47$	$20.68 \pm 2.19$
$V$	$5.07 \pm 0.406$	$5.15 \pm 0.199$



**Рис. 3.** Процесс восстановления активности гидрогеназы, инaktivированной цианидом, в реакции поглощения водорода в присутствии восстановленного метилвиологена, 0.5% бета-меркаптоэтанола, 0.15 мМ  $FeCl_3$  и 0.15 мМ  $Na_2S$  при комнатной температуре.

СО и CN лигандов, но и полностью сохранял свою активность.

В литературе описаны попытки восстановления нативной структуры белков после разрушения FeS-кластеров. В одной из первых публикаций описана реконструкция кластридиального ферредоксина из его апобелка, которая приводила к восстановлению 78% исходной активности [9]. В работах по восстановлению структуры кластера  $F_B$  фотосистемы I, разрушенного при действии соединений ртути, использовали разные комбинации бета-меркаптоэтанола,  $FeCl_3$  и сульфида в анаэробных условиях. Авторами показано практически полное восстановление  $F_B$  кластера [11, 15, 16].

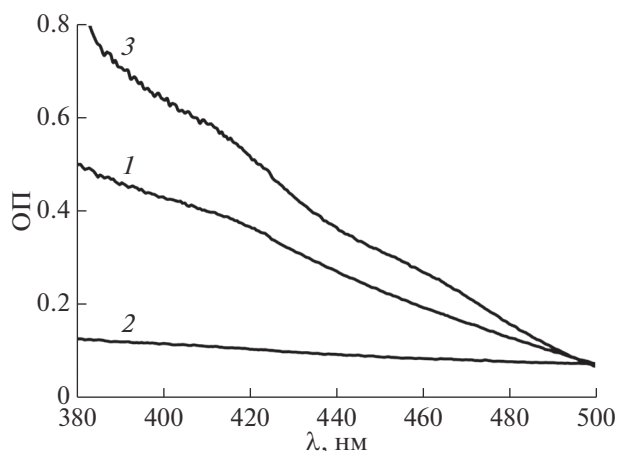
Для восстановления структуры мы также использовали добавление бета-меркаптоэтанола, в качестве восстановителя SH-групп цистеина,  $FeCl_3$  и  $Na_2S$  в качестве структурных элементов FeS-кластеров, однако добавляли их последовательно с промежуточной инкубацией перед каждой следующей добавкой, как описано в Методах исследования. Их совместное действие приводило к восстановлению 60% активности гидрогеназы в реакции поглощения водорода в присутствии восстановленного метилвиологена уже через 30 мин после добавления последнего компонента (рис. 3).

Важно отметить, что в аэробных условиях восстановления гидрогеназной активности не происходило. Как показано в таблице 2 добавление всех этих соединений необходимо для достижения максимальной активности HydSL гидрогеназы *T. roseopersicina* после ингибирования цианидом. Замена  $FeCl_3$  на  $FeSO_4$  также приводила к восстановлению гидрогеназной активности, но

**Таблица 2.** Влияние различных добавок на восстановление активности гидрогеназы после ингибирования цианидом

Реакционная система	Активность, %	Доверительный интервал
Гидрогеназа нативная	100	—
Гидрогеназа + KCN	4	2
Гидрогеназа (после ингибирования KCN) + бета-меркаптоэтанол	4	2
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + FeCl <sub>3</sub>	6	2
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + Na <sub>2</sub> S	4	3
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + FeCl <sub>3</sub> + Na <sub>2</sub> S	60	8
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + FeSO <sub>4</sub> + Na <sub>2</sub> S	20	5

до меньшего значения (табл. 2). Замена бета-меркаптоэтанола на дитиотрейтол или восстановленный L-цистеин, а также изменение условий инкубации (порядок добавления и время инкубации между добавками восстановителя, железа и сульфида) не приводили к повышению эффективности восстановления активности гидрогеназы (данные

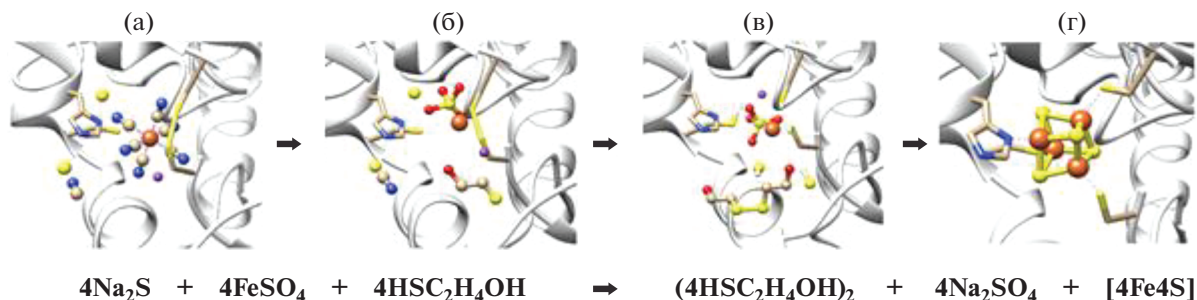
**Рис. 4.** Спектры поглощения нативной гидрогеназы (1), после обработки цианидом и отмывки (2) и после инкубации с бета-меркаптоэтанолом, FeCl<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>S (3).

не приведены). При более длительной инкубации происходило снижение наблюдаемой активности.

Для подтверждения восстановления структуры FeS кластеров проводили запись оптических спектров нативной гидрогеназы, после ее обработки цианидом и после реконструкции в диапазоне 380–500 нм (рис. 4). Известно, что FeS кластеры поглощают в области 415–422 нм. Нативная гидрогеназа также имеет поглощение в этой области спектра (рис. 4, 1). После обработки цианидом это поглощение исчезало (рис. 4, 2), а после реконструкции поглощение в этой области снова проявлялось (рис. 4, 3).

Механизм восстановления FeS кластеров можно наглядно представить на рис. 5 для 4Fe4S кластера.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что активный железоникелевый центр HydSL гидрогеназы не разрушается под действием цианида. Инкубация обработанной цианидом гидрогеназы с бета-меркаптоэтанолом, FeCl<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>S приводила не только к восстановлению 60% активности, но и реконструкции железосерных кластеров. Такая реконструкция может быть полезной при изучении железосерных кластеров гидрогеназ. Например, замена при реконструкции <sup>56</sup>Fe на <sup>57</sup>Fe позволит в дальнейшем определить какие кластеры подвержены разрушению в наи-

**Рис. 5.** Гипотетическая схема реконструкции 4Fe4S кластера после разрушения цианидом. (а) – разрушенный 4Fe4S кластер; (б) – присутствие бета-меркаптоэтанола; (в) – разрыв дисульфидных связей; (г) – реконструкция кластера.

большей степени, а также изучать редокс состояния кластеров при переносе электрона с помощью мессбауэровской спектроскопии или ядерно-резонансной колебательной спектроскопии.

Исследование поддержано грантом РФФИ 19-14-00255.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vignais P., Billoud B. // Chem. Rev. 2007. V. 107. № 6. P. 4206–4272.
2. Lubitz W., Ogata H., Rüdiger O., Reijerse E. // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 8. P. 4081–4148.
3. Greening C., Biswas A., Carere C.R., Jackson C.J., Taylor M.C., Stott M.B., Cook G.M., Morales S.E. // The ISME J. 2016. V. 10. № 3. P. 761–77.
4. Shafaat H.S., Rudiger O., Ogata H., Lubitz W. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1827. № 8–9. P. 986–1002.
5. Гозотов И.Н., Задворный О.А., Зорин Н.А., Серебрякова Л.Т. // Фотосинтезирующие микроорганизмы. / Ред. В.Ф. Гальченко. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, 2010. Т. 15: М.: МАКС Пресс, С. 260–289.
6. Pandelia M.E., Nitschke W., Infossi P., Giudici-Orticoni M.T., Bill E., Lubitz W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 15. P. 6097–102.
7. Lauterbach L., Wang H.X., Horch M., Gee L.B., Yoda Y., Tanaka Y., Zebger I., Lenz O., Cramer S.P. // Chem Sci. 2015. V. 6. № 2. P. 1055–60.
8. Zorin N.A., Zabelin A.A., Shkuropatov A.Ya., Tsygankov A.A. // J. Inorganic Biochemistry. 2017. V. 177. № 1. P. 190–197.
9. Malkin R., Rabinowitz J.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1966. V. 23. № 3. P. 822–827.
10. Зорин Н.А., Стародубов А.С., Цыганков А.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 135–140.
11. Parret K.G., Mehari T., Golbeck J.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1015. № 2. P. 341–352.
12. Seefeldt L.C., Arp D.J. // J. Bacteriol. 1989. V. 171. № 6. P. 3298–3303.
13. Hexter S.V., Chung M.-W., Vincent K.A., Armstrong F.A. // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. № 29. P. 10470–10477.
14. Zorin N.A., Dimon B., Gagnon J., Gaillard J., Carrier P., Vignais P.V. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. № 4. P. 675–681.
15. Jung Y.-S., Yu L., Golbeck H. // Photosynthesis Research. 1995. V. 46. № 1. P. 249–255.
16. Mehari T., Parret K.G., Warren P.V., Golbeck J.H. // Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics. 1991. V. 1056. № 1. P. 139–148.

## Reconstruction of Cyanide Treated HydSL Hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*

N. A. Zorin<sup>a</sup>, A. N. Khusnutdinova<sup>a</sup>, A. S. Starodubov<sup>a</sup>, I. I. Proskuryakov<sup>a</sup>, and A. A. Tsygankov<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

\*e-mail: ttt@issp.serpukhov.su

<sup>57</sup>Fe-Mossbauer spectroscopy plays a pivotal role in FeS clusters redox state analysis. For <sup>57</sup>Fe incorporation it is added to bacterial growth media, which requires quite a lot of the isotope. This work aims at investigation of HydSL hydrogenase NiFe active site functional activity and identification of conditions for FeS cluster reconstruction after long-term cyanide treatment. It is known that prolonged *Thiocapsa roseopersicina* HydSL hydrogenase cyanide treatment destroys FeS clusters. As a result, the catalytic activity of hydrogenase in the reaction of hydrogen uptake in the presence of methylviologen vanishes. However, we demonstrate here that after cyanide treatment the hydrogenase catalytic center remains functionally active. It is found that incubation of cyanide-treated hydrogenase with beta-mercaptoethanol, FeCl<sub>3</sub>, and Na<sub>2</sub>S leads to restoration of hydrogenase activity in the reaction of H<sub>2</sub> uptake with methylviologen. The extent of restoration was time dependent. Maximum hydrogenase activity (60%) was observed after 30 min room temperature incubation. Concurrently, the absorption band at 420 nm present in the native hydrogenase and absent after cyanide treatment, re-appeared, suggesting the reconstruction of the FeS. Thus, instead of growing bacteria in presence of <sup>57</sup>Fe isotope, the substitution can be arranged directly in the purified enzyme, allowing to spend less <sup>57</sup>Fe.

**Keywords:** hydrogenase, hydrogen, HD isotope exchange, NiFe active center, FeS clusters, enzyme reconstruction