

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Варфоломеева Лариса Александровна

СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХЪЯДЕРНОГО МЕДНОГО ЦЕНТРА
ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Специальность 1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Бойко Константин Михайлович

Москва 2025

| | |
|---|----|
| ОГЛАВЛЕНИЕ | |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ | 7 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 12 |
| 1.1 Спектральные и структурные методы исследования макромолекул | 12 |
| 1.1.1 Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса металлоферментов | 12 |
| 1.1.2 Структурные исследования макромолекул методом рентгеноструктурного анализа ... | 13 |
| 1.1.3 Двойникование кристаллов макромолекул..... | 14 |
| 1.1.4 Способы улучшения качества кристаллов макромолекул | 16 |
| 1.2. Свойства иона меди в степенях окисления Cu⁺¹ и Cu⁺² | 17 |
| 1.3. Ион меди в катализе биологических окислительно-восстановительных реакций | 20 |
| 1.4. Классификация медных центров ферментов | 21 |
| 1.4.1. Голубой медный T1-центр..... | 21 |
| 1.4.2. T2-центр..... | 25 |
| 1.4.3. T3-центр..... | 28 |
| 1.4.4. TNC-центр мультимедных оксидаз..... | 30 |
| 1.4.5. CuA-центр..... | 32 |
| 1.4.6. CuB-центр..... | 34 |
| 1.4.7. CuZ-центр N ₂ O-редуктазы | 35 |
| 1.4.8. Медный центр с мотивом «гистидиновой скрепки»..... | 38 |
| 1.4.9. Бис-цистеиновые медные центры..... | 40 |
| 1.5. Тиоцианатдегидрогеназа из <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i> | 43 |
| 1.5.1. Биохимические свойства <i>trTcDH</i> | 44 |
| 1.5.2. Спектральные свойства <i>trTcDH</i> | 45 |
| 1.5.3. Идеальное двойникование кристаллов <i>trTcDH</i> | 47 |
| 1.5.4. Общая структура <i>trTcDH</i> | 47 |
| 1.5.5. Уникальный трехъядерный медный центр <i>trTcDH</i> | 48 |
| 1.5.6. Механизм реакции, катализируемой <i>trTcDH</i> | 51 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 53 |
| 2.1. Материалы и реактивы | 53 |
| 2.2. Получение рекомбинантных препаратов <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> | 54 |
| 2.2.1. Получение генно-инженерных конструкций <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> «дикого типа» и с точечными заменами..... | 54 |
| 2.2.2. Экспрессия <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> в клетках <i>E. coli</i> | 55 |
| 2.2.3. Выделение и очистка <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> | 55 |
| 2.3. Аналитические методы характеристики <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> | 56 |
| 2.3.1. Определение концентрации белка | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ | 56 |
| 2.3.3. Определение содержания меди в образцах | 57 |
| 2.4. Активация <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> ионами меди | 57 |
| 2.4.1. Активация <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> для спектроскопии ЭПР | 57 |
| 2.4.2. Активация препаратов <i>trTcDH</i> и <i>rtTcDH</i> для кристаллизации | 57 |
| 2.5. Определение ферментативной активности | 57 |
| 2.6. Спектроскопия ЭПР в X-диапазоне | 58 |
| 2.6.1. Параметры съемки спектров ЭПР | 58 |
| 2.6.2. Определение количества ионов меди по интегральной интенсивности | 58 |
| 2.6.3. Расчет теоретических спектров ЭПР и параметров медных центров в образцах | 59 |
| 2.7. Кристаллизация методом диффузии паров | 59 |
| 2.7.1. Автоматизированный поиск условий кристаллизации с помощью кристаллизационного робота | 59 |
| 2.7.2. Оптимизация условий кристаллизации | 59 |
| 2.7.3. Настаивание кристаллов свободной формы <i>rtTcDH</i> с ингибиторами | 60 |
| 2.8. Рентгеноструктурный анализ | 60 |
| 2.8.1. Сбор и обработка дифракционных данных | 60 |
| 2.8.2. Решение и уточнение структур | 60 |
| 2.8.3. Анализ пространственных структур | 61 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 66 |
| 3.1. Изменение дифракционных свойств кристаллов <i>trTcDH</i> методом точечного мутагенеза | 66 |
| 3.1.1. Анализ кристаллических контактов в кристаллах <i>trTcDH</i> | 66 |
| 3.1.2. Получение рекомбинантных форм <i>trTcDH</i> с точечными заменами поверхностных остатков | 68 |
| 3.1.3. Структура рекомбинантной формы <i>trTcDH</i> с заменой T169A | 69 |
| 3.1.4. Структура рекомбинантной формы <i>trTcDH</i> с заменой K281A | 71 |
| 3.2. Структура свободной холоформы <i>rtTcDH</i> | 71 |
| 3.2.1. Аминокислотная последовательность <i>rtTcDH</i> | 72 |
| 3.2.2. Общая структура <i>rtTcDH</i> | 73 |
| 3.2.3. Общая структура <i>rtTcDH</i> | 73 |
| 3.2.4. Закрытая и открытая конформации <i>rtTcDH</i> | 75 |
| 3.2.5. Субстратный канал <i>rtTcDH</i> | 77 |
| 3.2.6. Общая структура активного центра <i>rtTcDH</i> | 78 |
| 3.2.7. Архитектура трехъядерного медного центра <i>rtTcDH</i> в закрытой конформации | 79 |
| 3.2.8. Архитектура трехъядерного медного центра <i>rtTcDH</i> в открытой конформации | 83 |
| 3.2.9. Спектр ЭПР <i>rtTcDH</i> | 85 |
| 3.3. Пространственная структура комплекса <i>rtTcDH</i> с ингибитором тиомочевинной | 87 |

| | |
|--|------------|
| 3.4. Связывание аналога субстрата селеноцианата в активном <i>ртТсDH</i> | 91 |
| 3.4.1. Структура комплекса <i>ртТсDH</i> с аналогом субстрата селеноцианатом | 91 |
| 3.4.2. Спектр ЭПР <i>ртТсDH</i> при связывании ингибитора – селеноцианата | 96 |
| 3.5. Влияние ионов меди в активном центре на упаковку и конформацию молекул <i>ртТсDH</i> в кристалле | 98 |
| 3.5.1. Структура апоформы <i>ртТсDH</i> | 98 |
| 3.5.2. Встраивание ионов меди в активный центр апоформы в кристалле | 101 |
| 3.6. Точечные замены аминокислотных остатков в активном центре <i>ТсDH</i> | 102 |
| 3.6.1. Структура рекомбинантной формы <i>трТсDH</i> с заменой F436Q | 103 |
| 3.6.2. Структура <i>ртТсDH</i> с заменой H447Q | 105 |
| 3.7. Перестройки активного центра в ходе первых этапов каталитического процесса | 109 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 114 |
| ВЫВОДЫ..... | 116 |
| СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ | 117 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 120 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- МИ – микроволновое излучение
- МТО – метантиолоксидаза
- β -МЭ – β -меркаптоэтанол
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РСА – рентгеноструктурный анализ
- СОД – супероксиддисмутаза
- СТВ – сверхтонкие взаимодействия
- УФ-видимая спектроскопия – спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
- ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса
- BCP – blue copper proteins – голубые медные белки
- BNC – binuclear center – биядерный центр
- CBC – coupled binuclear copper protein – медные белки со спин-спин взаимодействующими ионами меди в биядерном центре
- COX – cytochrome c oxidase – цитохром с оксидаза
- DMSO – dimethyl sulfoxide – диметилсульфоксид
- FGE – formylglycine-generating enzyme – формилглицин образующий фермент
- HBM – histidine brace motif – мотив «гистидиновой скрепки»
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- ICP-MS – inductively coupled plasma mass spectrometry – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
- IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
- LPMO – lytic polysaccharide monoxygenase – литическая полисахаридмонооксигеназа
- MCO – multi-copper oxidases – мультимедные оксидазы
- MOPS – 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid – 3-(N-морфолино)-пропансульфоновая кислота
- PDB – protein data bank – банк структур белков
- PES – polyethersulfone – полиэфирсульфон
- pMMO – particulate methane monoxygenase – мембран-связанная метанмонооксигеназа

PHM – peptidylglycine α -hydroxylating monoxygenase – пептидилглицин- α -гидроксилирующая монооксигеназа

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride – фенилметилсульфонилфторид

pmTcDH – тиоцианатдегидрогеназа из *Pelomicrobium methylotrophicum*

SDS – sodium dodecyl sulfate – додецилсульфат натрия

TcDH – thiocyanate dehydrogenase – тиоцианатдегидрогеназа

TEMED – N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine – N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин

TMPD – N, N, N, N-tetramethyl-p-phenylenediamine – N, N, N, N-тетраметил-*para*-фенилендиамин

TNC – trinuclear copper center – трехъядерный медный центр

TcDH – thiocyanate dehydrogenase – тиоцианатдегидрогеназа

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethane – трис(гидроксиметил)аминометан

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Медь является важным микроэлементом, необходимым для жизнедеятельности всех живых организмов. Основная роль меди в биологических системах заключается в транспорте молекулярного кислорода и электронов, а также в катализе окислительно-восстановительных реакций. Медные ферменты катализируют окисление или восстановление широкого спектра низко- и высокомолекулярных субстратов, начиная от молекул газов и заканчивая биополимерами, и вовлечены в процессы аэробного и анаэробного нитратного дыхания, окисления серосодержащих неорганических соединений, деградации лигнина и полисахаридов, формирования посттрансляционных модификаций, синтеза пигментов, медиаторов и антибиотиков, гомеостаза железа, меди и селена. Многообразие выполняемых биологических функций меди как кофактора переносчиков и ферментов обусловлено тонкой настройкой электронного строения и окислительно-восстановительных свойств иона меди, что обеспечивается определенной геометрией координационной сферы и белкового окружения. Расширение данных о спектральных свойствах, строении и функционировании медных центров ферментов способствует установлению взаимосвязи между их архитектурой и каталитическими свойствами. Такие данные могут послужить отправной точкой в создании методами искусственного интеллекта и синтетической химии новых медных органических комплексов или активных центров ферментов, являющихся эффективными биокатализаторами реакций, не встречающихся в природе.

Данные об участии медных ферментов в метаболизме серосодержащих неорганических соединений появились не так давно. В частности, таким медным ферментом является тиоцианатдегидрогеназа (EC 1.8.2.7) из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (*tpTcDH*), которая катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементной серы и содержит уникальный трехъядерный медный центр. На основании установленной кристаллической структуры и квантово-механических расчетов ранее был сформулирован гипотетический механизм каталитической реакции *tpTcDH*. Однако, экспериментально верифицировать предложенный механизм на основании имеющихся структурных данных не представлялось возможным в связи со сложностью интерпретации в последних деталях тонкой структуры активного центра и отсутствием структур комплекса фермента с потенциальными ингибиторами. Предметом настоящей диссертационной работы является структурно-функциональная характеристика тиоцианатдегидрогеназ из бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 и *Pelomicrobium methylotrophicum* (*pmTcDH*) с целью детализации механизма каталитической реакции.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является структурно-функциональная характеристика тиоцианатдегидрогеназ из бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (*tpTcDH*) и *Pelomicrobium methylotrophicum* (*pmTcDH*) и уточнение механизма каталитической реакции. Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Улучшить дифракционное качество кристаллов *tpTcDH* путем точечного мутагенеза поверхностных аминокислотных остатков;
2. Получить и проанализировать пространственную структуру высокого разрешения *pmTcDH*;
3. Получить и проанализировать пространственные структуры комплексов *pmTcDH* с ингибиторами и аналогом субстрата;
4. Получить и проанализировать пространственную структуру апоформы *pmTcDH*;
5. Получить и проанализировать пространственные структуры рекомбинантных форм *TcDH* с точечными заменами по активному центру;
6. Уточнить механизм каталитической реакции *TcDH*.

Научная новизна. Впервые была установлена пространственная структура с атомным разрешением (1.05 Å) тиоцианатдегидрогеназы *pmTcDH* из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum*. Архитектура медного центра *pmTcDH* детально охарактеризована в двух конформациях. Впервые получены структуры комплексов *pmTcDH* с ингибиторами и аналогом субстрата, и подтверждена ориентация субстрата в активном центре фермента. Установлено влияние ионов меди активного центра фермента на упаковку и конформацию *pmTcDH* в кристалле. Методом точечного мутагенеза подтверждена значимая роль консервативных аминокислотных остатков фенилаланина и гистидина активного центра фермента для катализа. Охарактеризовано окислительно-восстановительное состояние медного центра *pmTcDH* методом спектроскопии ЭПР, и показано восстановление медного центра фермента при связывании селеноцианата. Все вышеперечисленные структурные данные способствовали детализации механизма функционирования тиоцианатдегидрогеназы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Высокое качество структурных данных позволило подробно описать архитектуру медного центра тиоцианатдегидрогеназы в двух конформациях. Впервые полученные структуры комплексов фермента с ингибитором тиомочевинной и аналогом субстрата селеноцианатом подтверждают ранее предложенную модель связывания субстрата. В представленной

работе продемонстрирована возможность получения полного трехъядерного медного центра настаиванием кристаллов апоформы *pmTcDH* солями меди Cu^{+2} и Cu^{+1} . Показано влияние ионов меди в активном центре на упаковку молекул и конформацию субъединиц димера *pmTcDH* в кристалле. В работе продемонстрирована важность консервативного у ряда тиоцианатдегидрогеназ аминокислотного остатка фенилаланина для осуществления конформационных переходов в процессе катализа. Результаты работы внесли значительный вклад в расширение знания об устройстве уникального трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназ, а также о функционировании фермента и механизме каталитической реакции, что дополняет общее понимание роли иона меди как кофактора в биологических окислительно-восстановительных процессах.

Методология и методы исследования

В рамках представленной работы были использованы следующие современные методы: генетической инженерии, молекулярной биологии, хроматографии, УФ- и видимой спектроскопии, спектроскопии ЭПР в X-диапазоне, кристаллизации макромолекул, рентгеноструктурного анализа, анализа пространственных структур.

Положения, выносимые на защиту

1. Точечные замены поверхностных аминокислотных остатков не привели к улучшению дифракционных свойств кристаллов *tpTcDH*.
2. TcDH может существовать в двух конформациях. Открытая конформация TcDH соответствует свободной форме фермента, закрытая конформация – форме со связанным субстратом. Закрытие субстратного канала TcDH сопровождается перестроением трехъядерного медного центра и смещением ионов меди (Cu_2 и Cu_3).
3. Структуры комплексов *pmTcDH* с ингибиторами и аналогом субстрата подтвердили ориентацию субстрата в активном центре и ранее предложенную модель переходного состояния.
4. Ионы меди влияют на упаковку и конформацию молекул *pmTcDH* в кристалле.
5. Аминокислотный остаток F436 у *tpTcDH* важен для протекания конформационного перехода при закрытии/открытии субстратного канала.
6. Детализирован механизм каталитической реакции TcDH.

Личный вклад соискателя

Автор принимал непосредственное участие в постановке задач, планировании и проведении экспериментов, анализе и визуализации полученных результатов исследования, подготовке научных публикаций. Вклад автора на каждом этапе

исследования был определяющим. Автор благодарит за бесценный опыт и помощь в обработке, уточнении и интерпретации дифракционных данных к.ф.-м.н. К.М. Полякова (ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН), за помощь при проведении генно-инженерных экспериментов к.х.н. Т.В. Ракитину (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), А.С. Комолова (НИЦ «Курчатовский институт»), к.х.н. Н.И. Дергоусову (ФИЦ Биотехнологии РАН) и Н.С. Шипкова (ФИЦ Биотехнологии РАН), за кристаллизацию А.Ю. Николаеву (НИЦ «Курчатовский институт»), за сбор дифракционных данных к.ф.-м.н. П.В. Дороватовского (НИЦ «Курчатовский институт») и к.х.н. М.Е. Миняева (ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН), за проведение ЭПР-экспериментов в X-диапазоне и обработку спектров к.х.н. Н.Н. Ефимова (ИОНХ РАН им. Н.С. Курнакова), к.х.н. А.В. Ротова (ИОНХ РАН им. Н.С. Курнакова) и к.ф.-м.н. Е.А. Уголкову (ИОНХ РАН им. Н.С. Курнакова).

Степень достоверности полученных результатов обеспечена применением современных методов исследования и использованием высококачественных реактивов и оборудования. При проведении экспериментов были поставлены необходимые контроли. Одиннадцать установленных пространственных структур соответствовали требованиям качества, предъявляемым к кристаллическим структурам макромолекул банком данных PDB (www.rcsb.org), и были депонированы в международный банк данных PDB (www.rcsb.org) с кодами 8BPN, 8P3L, 8P3M, 8Q9X, 8Q9Y, 8YOU, 8YU5, 8YU6, 8Z75, 8Z76, 8Z77.

Финансовая поддержка

Представленная работа была поддержана грантами Российского Научного Фонда (РНФ) № 20-14-00314 и № 23-74-30004.

Публикации и апробация работы

По теме научной работы было опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конференциях: 12-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» в г. Санкт-Петербург в 2019 году; II Межвузовская студенческая конференция «Студенческий биохимический форум – 2020» в МГУ в 2020 году; XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в ИБХ РАН в 2021 году; XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в ИБХ РАН в 2022 году; VII Съезд биохимиков России в Сочи – Дагомыс в 2022 году; Сателлитная конференция для молодых ученых «Современная структурная биология» в ФИЦ Биотехнологии РАН в 2022 году; 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные

исследования и применения» в г. Суздаль в 2023 году; V Международная школа по структурной биологии в ИБХ РАН в 2024 году; 14 Международная мультikonференция Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология в г. Новосибирск в 2024 году; Биомембраны 24 в МФТИ в 2024 году; XI Российский симпозиум «Белки и пептиды» в ПСБ «Патриот», Московская область в 2024 году; Конференция Физико-химическая биология в МГУ в 2025 году; XV Конференция молодых ученых по общей и неорганической химии в ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН в 2025 году.

Структура и объем работы

Работа состоит из следующих разделов: «Список сокращений», Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Список цитируемой литературы включает 210 ссылок. Работа изложена на 138 страницах и включает 39 рисунков и 13 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Спектральные и структурные методы исследования макромолекул

1.1.1 Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса металлоферментов

Метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) основан на резонансном поглощении парамагнитным центром микроволнового излучения (МИ) под воздействием внешнего магнитного поля. Взаимодействие парамагнитного центра и внешнего магнитного поля называется электронным зеемановским взаимодействием и характеризуется безразмерным параметром – g -фактором. Самый простой пример парамагнитного центра – это один неспаренный электрон, демонстрирующий одну линию в спектре с рассчитанным параметром $g = 2.00232$ для вакуума [1]. В действительности, структура и свойства парамагнитных центров намного сложнее (несколько неспаренных электронов и распределение их на валентных орбиталях, наличие спина у самого ядра или ядер окружающих лигандов, геометрия координационной сферы), что отражается в одной или нескольких линиях в спектре ЭПР с соответствующими g -факторами. Таким образом, с помощью метода спектроскопии ЭПР можно описывать структуру парамагнитного центра.

Медь, как переходный металл с незаполненным 3d-подуровнем, в одной из степеней окисления содержит на валентных орбиталях один неспаренный электрон, поэтому обладает парамагнитными свойствами и характерным спектром ЭПР. Изменение окружения неспаренного электрона меди, например, как перестроение координационной сферы в комплексном соединении, будет сопровождаться изменением спектра ЭПР. Вследствие чего, у каждого типа медного центра металлоферментов наблюдается уникальный спектр ЭПР, который чувствителен к изменениям структуры центра, например, в ходе каталитического акта.

Интерпретация спектров ЭПР медьсодержащих белков является нетривиальной задачей ввиду их сложности и конформационной лабильности макромолекул. Металлоферменты могут содержать несколько медных центров различного состава, ионы меди которых взаимодействуют диполь-дипольно или могут также иметь общие неспаренные электроны, что усложняет расшифровку спектров. Например, моноядерный медный центр литической полисахаридмонооксигеназы (lytic polysaccharide monooxygenase, ЛРМО) существуют в двух формах с отличающимися спектрами ЭПР [2, 3], структуру которых удалось соотнести со спектрами только с помощью квантово-механических расчетов [4]. В случае N_2O -редуктазы до получения структуры предполагали

на основании данных ЭПР, что CuZ-центр образован двумя ионами меди с одним общим неспаренным электроном, а не четырьмя [5]. Биядерный медный центр тирозиназ и мультимедных оксидаз (multi-copper oxidases, MCO) в окисленном состоянии не проявляет парамагнитных свойств вовсе [6, 7]. Таким образом, для надежной интерпретации спектров ЭПР медных центров металлоферментов требуется применение особенных подходов и других методов, как генетическая инженерия, рентгеноструктурный анализ (РСА) и молекулярное моделирование. Многочастотный подход с использованием нескольких диапазонов МИ упрощает расшифровку спектров и позволяет однозначно характеризовать и различать по спектрам два медных центра фермента [8]. Активно для изучения металлоферментов с двумя и более медными центрами применяются генно-инженерные методы, когда посредством точечного мутагенеза координирующих остатков исключается один из медных центров [9, 10]. Также дополнительную структурную информацию о парамагнитном центре несут импульсные методы ЭПР [11]. С помощью этих методов можно установить состав координационной сферы иона меди [12, 13], определить расстояния между парамагнитными центрами в олигомерном комплексе [14], исследовать белок-белковые взаимодействия в процессе образования электрон-транспортного комплекса [15] и использовать искусственный медный центр как спиновую метку для изучения конформационных переходов [16, 17]. Подводя итог, метод спектроскопии ЭПР – мощный метод исследования структуры и функционирования медных металлоферментов.

1.1.2 Структурные исследования макромолекул методом рентгеноструктурного анализа

Структурные исследования макромолекул не представляются возможными без использования РСА, классического метода структурной биологии. Благодаря развитию этого метода были установлены первые пространственные структуры макромолекул и заложены основы структурной биологии и многих других дисциплин. На сегодняшний день новые экспериментальные и предсказательные методы, как криоэлектронная микроскопия и моделирование с помощью AlphaFold [18, 19], завоёвывают всю большую популярность, однако, существует ряд задач, решение которых возможно только с применением РСА.

Прежде всего, РСА является основным методом для установления структур комплексов ферментов с кофакторами, ингибиторами, аллостерическими регуляторами или субстратами, рецепторов с лигандами, антител с антигенами или макромолекулярных комплексов [20, 21]. Полученная в ходе эксперимента информация позволяет сформулировать механизмы функционирования исследуемых макромолекул и может использоваться для дальнейшего компьютерного дизайна лекарственных средств [22, 23].

Во-вторых, рентгеновское излучение обладает свойством генерировать свободные электроны в образце, что приводит к восстановлению образца и радиационному повреждению [24], но может быть использовано для изучения механизма ферментативных реакций металлоферментов методом серийной кристаллографии [24, 25, 26, 27]. В-третьих, появление и усовершенствование современных источников рентгеновского излучения, как синхротроны и лазер на свободных электронах, сделали возможным использование в кристаллографии время-разрешенного подхода в фемптосекундном диапазоне для изучения перестроения реакционных центров [28, 29]. Все вышеперечисленные задачи затрагивают исследование тонких деталей структуры макромолекул и требуют высокой точности и качества от дифракционных данных.

1.1.3 Двойникование кристаллов макромолекул

В ходе проведения рентгеноструктурного эксперимента на первом этапе фиксируют на детекторе рефлексы рассеянного кристаллом излучения. Расположение рефлексов относительно направления исходного пучка продиктовано симметрией кристалла, а интенсивность рефлекса несет всю информацию об устройстве макромолекулы в элементарной ячейке кристалла. Верное индексирование рефлексов и корректное измерение их интенсивностей необходимы для решения структуры и получения достоверной финальной модели макромолекулы.

Однако, кристаллы макромолекул часто обладают рядом дефектов, заметно снижающих качество дифракционных данных, которые приводят к смещению положения, искажению интенсивностей, уширению, пересечению и появлению новых рефлексов, не соответствующих пространственной группе кристалла. К числу таких дефектов относятся нарушение трансляционной симметрии, мозаичность, образование сростков, некристаллографическая псевдосимметрия и двойникование [30, 31]. Если первые четыре дефекта кристаллов можно однозначно выявить на стадии сбора дифракционных данных, анализируя визуально картины рассеяния, и отказаться работы с этим кристаллом, то наличие двойникования может оставаться неочевидным до стадии уточнения.

При двойниковании два или более кристаллических домена образуют один кристалл. При этом кристаллические домены расположены таким образом, что дифракционные картины разных доменов совпадают друг с другом хотя бы по одному из направлений. Немероздрическое двойникование предполагает совпадения положения части рефлексов, а мероздрическое – всех рефлексов. Мероздрическое двойникование возможно наблюдать в тетрагональных, тригональных и кубических группах с полярными осями симметрии высшего порядка. Существует еще псевдомероздрическое двойникование в моноклинных

и ромбических группах, когда параметры элементарной ячейки близки по значению параметрам для более высоко симметричных групп [30, 31]. Интенсивность наблюдаемых рефлексов от двойникованных кристаллов представляют сумму рефлексов от каждого кристаллического домена с учетом доли каждого домена, поэтому распределение интенсивностей рефлексов от кристалла-двойника отличается от стандартного распределения Вилсона для монокристаллов [32, 33]. Анализ интенсивностей рефлексов с помощью статистических тестов позволяет обнаружить двойникование кристалла по дифракционным данным [34, 35].

Двойникование кристаллов макромолекул очень распространенное явление. Так по оценкам, на момент публикации до 30% структур, депонированных в базу данных Protein Data Bank (PDB), могли оказаться псевдомероздрическими двойниками [36]. Двойникование кристаллов затрудняет процесс решения структуры методом РСА на всех этапах эксперимента, начиная от сбора дифракционных данных и заканчивая уточнением модели. В случае же идеального двойникования, когда доли каждого кристаллического домена равны, разрешение данных снижается в 1.26 раза, по сравнению с монокристаллами [37]. На сегодняшний день существуют специальные методики и программы, позволяющие учитывать двойникование при обработке данных и при уточнении, что позволяет улучшить достоверность финальной модели. При небольшой доле одного из кристаллических доменов (менее 0.5) программа DETWIN может оценить вклады в интенсивность рефлекса от каждого кристаллического домена [35]. Хотя в этом случае точность измерения интенсивностей рефлексов снижается, но такая процедура заметно повышает качество рассчитанной карты электронной плотности [38]. Двойникование можно учитывать и на финальной стадии уточнения модели. В программе уточнения REFMAC5 [39] есть специальный алгоритм, определяющий возможный оператор двойникования для пространственной группы и оценивающий долю каждого домена [36]. Кристаллографическое уточнение с использованием данного алгоритма заметно улучшает качество модели (**Рис. 1а, б**) [37].

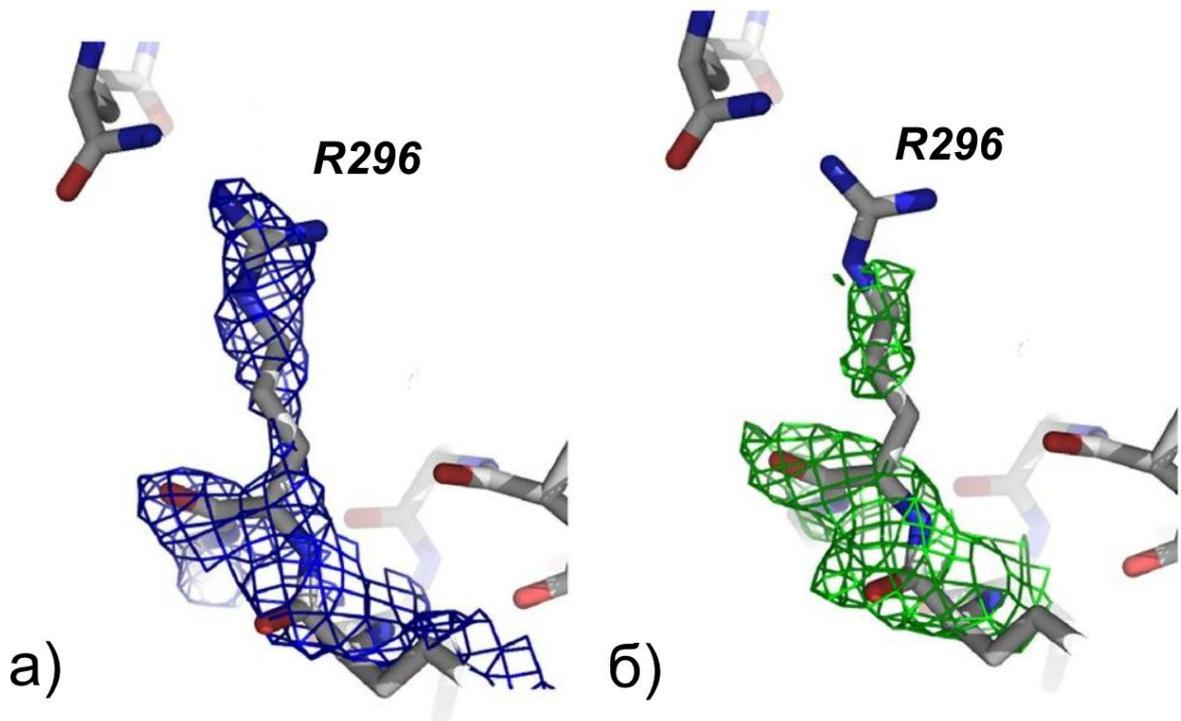


Рис. 1. Сравнение рассчитанных $2Fo - Fc$ карт электронной плотности на одинаковом уровне срезки σ с использованием (а) и без использования (б) опции учета двойникования при уточнении модели в программе REFMAC5. Рисунок адаптирован из [37].

1.1.4 Способы улучшения качества кристаллов макромолекул

Современное программное обеспечение, как отмечалось ранее, позволяет использовать дифракционные данные, собранные с кристаллов-двойников макромолекул. Однако такие данные не подходят для решения структурных задач, как исследование реорганизации активного центра фермента при связывании субстрата или ингибитора, поскольку это требует измерения параметров длин связей и др. с высокой точностью для достоверной интерпретации карты электронной плотности. Более того, в ряде случаев исследуемый объект не удастся закристаллизовать вовсе. В связи с этим, существуют специальные подходы в кристаллизации макромолекул для улучшения качества кристаллов [40].

Первый подход предполагает применение современных методов генной инженерии для модификации исследуемого белка, которая может способствовать улучшению качества его кристаллов [40]. К числу таких модификаций можно отнести варьирование длины N- и C-концов [41], удаление подвижных или неупорядоченных участков полипептидной цепи [42], удаление сайтов гликозилирования, предотвращение образования дисульфидных связей посредством точечных замен [43], получение слитой конструкции или комплекса с хорошо кристаллизующимся белком [44, 45], замена аминокислотных остатков с подвижными боковыми группами на поверхности глобулы для изменения кристаллических

контактов [46]. Необходимые модификации подбираются индивидуально для каждого объекта, поскольку введенные модификации могут приводить и к обратному эффекту. Например, отсутствие стадии отщепления неупорядоченного гистидинового тага от исследуемого белка в ходе процесса очистки привело к исчезновению двойникования кристаллов аквапорина, а не ухудшило их качество [47].

Второй подход – это поиск гомолога исследуемого плохо кристаллизующего объекта у других организмов. Открытые базы данных и доступные биоинформатические системы поиска позволяют найти большое число вариантов гомологов, однако предсказать, какой гомолог из массива окажется перспективным для структурных исследований, на данный момент нельзя. Этот подход очень рискованный, но в некоторых случаях удается успешно выбирать объекты, которые образуют кристаллы очень высокого качества [20, 25, 26].

1.2. Свойства иона меди в степенях окисления Cu^{+1} и Cu^{+2}

Наряду с железом, медь является важным переходным металлом для живых организмов, поскольку участвует во множестве биологических окислительно-восстановительных процессов. Такая популярность меди обусловлена ее окислительно-восстановительными свойствами и широкой доступностью в природе. В низкомолекулярных соединениях ион меди может принимать три степени окисления, Cu^{+1} , Cu^{+2} и Cu^{+3} . В случае белков обнаружено, что ион меди находится только в двух степенях окисления Cu^{+1} или Cu^{+2} , и переход между этими состояниями осуществляется в ходе окислительно-восстановительных реакций. На сегодняшний день не подтверждено, что ион меди может принимать наиболее окисленное состояние Cu^{+3} в составе макромолекул [48, 49], однако в ряде работ отмечают возможность его образования в ходе каталитического цикла [6, 50] и исследования активно продолжаются. В связи с этим, рассмотрим спектральные и структурные свойства иона меди только в степенях окисления Cu^{+1} и Cu^{+2} .

Ион меди в степени окисления Cu^{+1} обладает полностью заполненным подуровнем $3d^{10}$ и является спектрально «молчаливым» состоянием [48, 49], поскольку из-за своего электронного строения оно не детектируется такими широко используемыми методами, как УФ-видимая спектроскопия и спектроскопия ЭПР. Спектральные исследования соединений иона меди Cu^{+1} возможно проводить только с помощью методов рентгеновской спектроскопии, в ходе которых поглощают излучение и осуществляют переход электроны нижних энергетических уровней [48, 49]. Для координационных комплексов иона меди Cu^{+1} характерны линейная геометрия (**Рис. 2а**), треугольная геометрия (**Рис. 2б**), Т-подобная геометрия (**Рис. 2в**) и тетраэдрическая геометрия (**Рис. 2г**) [48, 51].

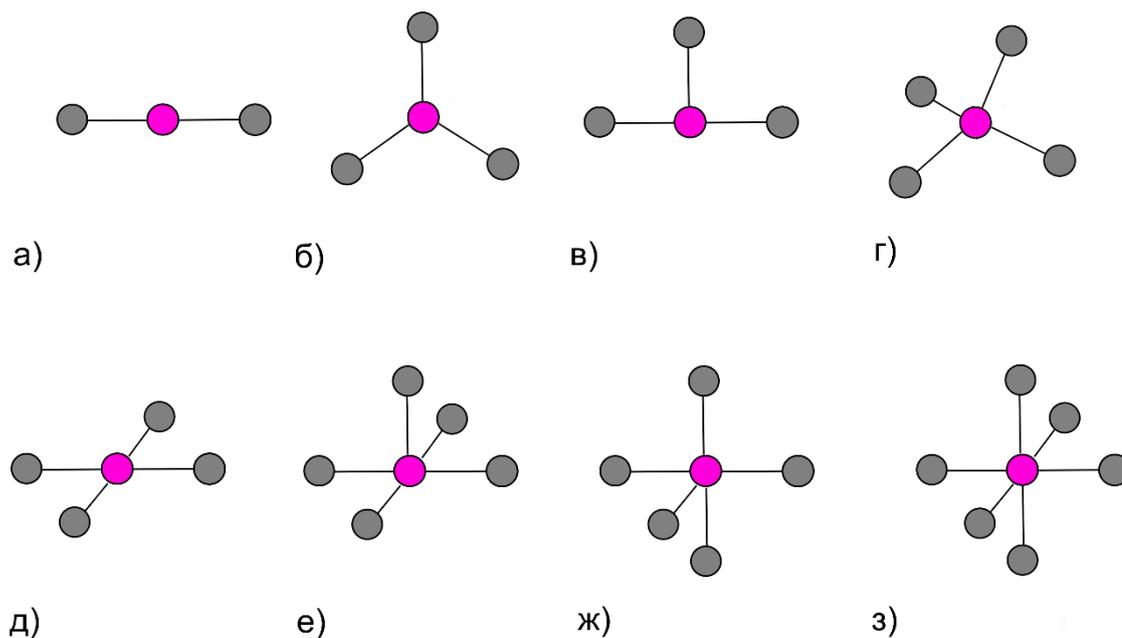


Рис. 2. Геометрия координации комплексов иона меди Cu^{+1} : линейная (а), треугольная (б), Т-подобная (в), тетраэдрическая (г). Геометрия координации комплексов иона меди Cu^{+2} : тетраэдрическая (г), плоская квадратная (д), квадратная пирамидальная (е), тригональная бипирамидальная (ж), октаэдрическая (з).

В отличие от состояния Cu^{+1} , ион меди в степени окисления Cu^{+2} обладает характерными спектральными свойствами в УФ-видимой области и спектроскопии ЭПР, благодаря неполной конфигурации $3d^9$. В УФ-видимом диапазоне соединения меди Cu^{+2} обладают максимумами поглощения с небольшим коэффициентом экстинкции в области 600 нм ($\epsilon \sim 40 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) (**Рис. 3а**), соответствующим электронным d-d переходам атома меди. Максимумы поглощения в более коротковолновой области соответствуют электронным переходам между орбиталями меди и лиганда с переносом заряда от лиганда, и положение и интенсивность этих линий определяется типом лиганда и структурой соединения [52]. Неспаренный электрон на $d_{x^2-y^2}$ орбитали атома меди в соединениях Cu^{+2} демонстрирует характерный спектр ЭПР со спином $S = 1/2$ и параметром $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$ (**Рис. 3б**). Ядро меди обладает спином $3/2$, поэтому в спектре наблюдается результат сверхтонких взаимодействий (СТВ) между электроном и ядром в виде разрешенных четырех линий в области параллельной компоненты. СТВ в параллельной области характеризуется константой A_{\parallel} , которая для меди в состоянии Cu^{+2} с предпочтительной координационной сферой принимает значения в диапазоне $150\text{-}250 \times 10^{-4} \times \text{см}^{-1}$. Соединения меди Cu^{+2} также исследуют с помощью рентгеновской спектроскопии. Стоит отметить, что ионы меди в состояниях Cu^{+1} и Cu^{+2} обладают различающимися спектрами [48, 49]. Вышеописанные свойства характерны для «типичного» комплекса меди Cu^{+2} [53].

Низкомолекулярные комплексы иона меди в состоянии Cu^{+2} обычно обладают тетрагональной геометрией: по типу плоского квадрата (Рис. 2д), по типу квадратной пирамиды (Рис. 2е), по типу тригональной бипирамиды (Рис. 2ж) или по типу октаэдра (Рис. 2з) [48, 51]. Также в комплексах меди Cu^{+2} встречается геометрия координации по типу тетраэдра (Рис. 2г). При этом из-за эффекта Яна-Теллера может наблюдаться «растяжение» комплекса вдоль z-оси: длины координационных связей с аксиальными лигандами больше длин связей с экваториальными лигандами. В случае комплексов меди Cu^{+2} , искажение структуры по сравнению с «типичным» комплексом можно детектировать с помощью УФ-видимой спектроскопии и спектроскопии ЭПР, и далее это рассмотрим на конкретных примерах медных центров в белках [52, 53, 54]. В полиядерных медных центрах белков не только взаимодействия между ионом меди и лигандами, но и взаимодействия между двумя и более ионами меди заметно влияют на спектральные свойства состояния Cu^{+2} [49].

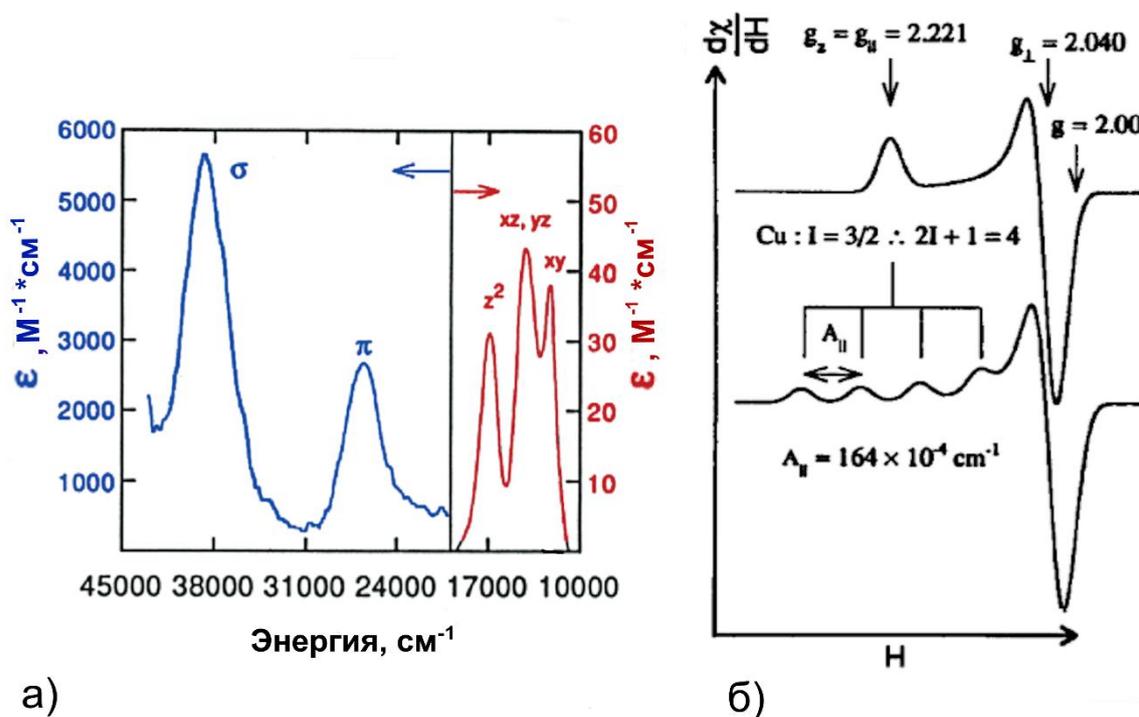


Рис. 3. Спектр поглощения «типичного» комплекса Cu^{+2} в УФ-видимой области (а): синий спектр (слева) соответствует электронным переходам с орбиталей лиганда на орбитали меди с переносом заряда от лиганда, красный спектр (справа) – электронным переходам между d-орбиталями атома меди. Спектр ЭПР «типичного» комплекса Cu^{+2} (б) с разрешенными четырьмя линиями СТВ (б). Рисунок адаптирован из [53].

Подводя итог, спектральные и структурные методы являются удобным инструментом для исследования реорганизации активных центров и функционирования медьсодержащих белков в ходе окислительно-восстановительных процессов, в связи с различными свойствами иона меди в состояниях Cu^{+1} и Cu^{+2} .

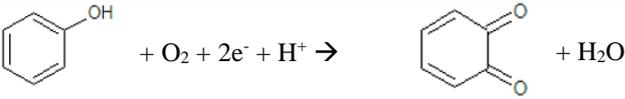
1.3. Ион меди в катализе биологических окислительно-восстановительных реакций

Ион меди играет роль кофактора у переносчиков электронов и у оксидоредуктаз. Медные белки участвуют во множестве метаболических процессов: синтез и деградация лигнина и целлюлозы, синтез пигментов, антибиотиков и нейромедиаторов, окисление сахаров, фотосинтез, аэробное и анаэробное дыхание, предотвращение окислительного стресса, посттрансляционные модификации белков, поддержание допустимой концентрации свободных ионов меди и железа, окисление метана [49]. Выполнение таких разнообразных функций обусловлено тонкой настройкой свойств связанного иона меди под действием белковой глобулы за счет формирования определенной координационной сферы.

Во всех биологических окислительно-восстановительных процессах один ион меди может служить донором или акцептором только одного электрона и соответственно переходить между степенями окисления Cu^{+1} и Cu^{+2} [49]. Возможность формирования состояния Cu^{+3} в кислородных комплексах в ходе каталитического процесса активно изучается [6, 50]. Значение электродного потенциала пары Cu^{+1} и Cu^{+2} варьирует у медных белков в широких пределах [55].

Медьсодержащие ферменты катализируют окисление широкого спектра высоко- и низкомолекулярных субстратов, и для большинства ферментов кислород или его производные являются вторым субстратом [49]. В медных центрах белков происходит либо двух-электронная активация кислорода с последующим окислением или гидроксигированием субстрата и образованием пероксида водорода или воды, либо четырех-электронное восстановление кислорода до воды. Медные ферменты участвуют в контроле уровня активных форм кислорода (АФК), нейтрализуя супероксиданионрадикал в реакции дисмутации. Характеристика свойств и реактивности кислородсодержащих комплексов иона меди активно исследуется с использованием модельных низкомолекулярных комплексов [56, 57, 58, 59], поскольку их окислительная активность может быть использована в химическом синтезе полезных органических соединений [59, 60]. Для нитритредуктазы, N_2O -редуктазы и тиоцианатдегидрогеназы предполагается, что кислород и АФК не участвуют в каталитическом процессе [49, 61]. Реакции, катализируемые медными ферментами, суммированы в **таблице 1**.

Таблица 1. Реакции, катализируемые медными ферментами.

| Реакция | Представители |
|---|---|
| $\begin{array}{l} \text{H} \\ \\ \text{R} - \text{OH} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{R} = \text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \\ - \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{NH}_4^+ \\ - \text{SH} \quad \quad \quad \quad \text{H}_2\text{S} \end{array}$ | <ul style="list-style-type: none"> - Аминоксидаза - Галактозоксидаза - Формилглицин-генерирующий фермент - Метантиолоксидаза |
| $\text{R} - \text{H} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{R} - \text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ | <ul style="list-style-type: none"> - Литическая полисахаридмонооксигеназа - Пептидилглицин-α-гидроксилирующая монооксигеназа - Метанмонооксигеназа |
|  | <ul style="list-style-type: none"> - Тирозиназа |
| $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ | <ul style="list-style-type: none"> - Супероксиддисмутаза |
| $\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ | <ul style="list-style-type: none"> - Цитохром с оксидаза - Лакказа |
| $\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$ | <ul style="list-style-type: none"> - Нитритредуктаза |
| $\text{N}_2\text{O} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$ | <ul style="list-style-type: none"> - N₂O-редуктаза |
| $\text{NCS}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NCO}^- + [\text{S}^0] + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ | <ul style="list-style-type: none"> - Тиоцианатдегидрогеназа |

1.4. Классификация медных центров ферментов

На сегодняшний день медные центры ферментов классифицируют на основе их структурной организации, спектральных свойств и выполняемой функции [49, 62, 63]. Ввиду роста числа литературных данных, предложенную классификацию можно расширить и выделить трехъядерный центр (trinuclear copper center, TNC) у MCO и медный центр с мотивом «гистидиновой скрепки» (histidine brace motif, HBM) в отдельные группы. Недавно было показано, что медные центры с двумя серными лигандами формилглицин-образующего фермента (formylglycine-generating enzyme, FGE) и CopG [20, 54, 64], напоминающие по устройству медные центры металлошаперонов [62], участвуют в катализе окислительно-восстановительных реакций. Таким образом, можно выделить еще одну группу медных центров.

1.4.1. Голубой медный T1-центр

Моноядерный медный T1-центр в окисленном состоянии характеризуется интенсивным поглощением в области ~ 590-600 нм ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) и, в связи с этим, яркой голубой окраской [49], что и определило название этого медного центра как голубой медный центр. Голубой медный центр обнаружен у небольших растворимых переносчиков электронов, голубых медных белков (blue copper proteins, BCP), и у мультидоменных

ферментов, как лакказы, аскорбат- и билирубиноксидазы, церулоплазмин, CueO и нитритредуктаза [65]. Укладка полипептидной цепи, образующей T1-центр, получила название купредоксина. Основной функцией T1-центра является либо внутримолекулярный транспорт одного электрона на каталитический центр мультидоменного фермента, либо межмолекулярный транспорт на редокс-центр следующего участника электрон-транспортной цепи. У MCO купредоксиновый домен с T1-центром участвует в одноэлектронном окислении различных высоко- и низкомолекулярных субстратов и поставляет электроны для восстановления молекулярного кислорода в TNC [66]. BCP и мультидоменные ферменты с купредоксиновым доменом участвуют в широком спектре метаболических путей, как световая фаза фотосинтеза, анаэробное дыхание, окисление лигнина и др.

Купредоксиновый домен в целом и T1-центр сконструированы таким образом, чтобы обеспечить наиболее эффективное выполнение своей функции – транспорта электронов. Общими чертами в организации медного T1-центра всех представителей является то, что в координации иона меди обязательно участвуют атомы N ϵ двух остатков гистидина и атом S γ остатка цистеина (**Рис. 4а-е**) [49, 55, 65]. Координационная связь между ионом меди и атомом серы в данном центре по своим свойствам близка к ковалентной связи, что и определяет интенсивную полосу поглощению с переносом заряда в красной области видимого спектра (**Рис. 5а**) [49]. Лиганды в аксиальных положениях у разных представителей различаются [49, 55, 65]. Наиболее часто в роли четвертого аксиального лиганда иона меди в T1-центре выступает атом S δ метионина (**Рис. 4а**), и такая координационная сфера обнаружена в структуре пластоцианина, рустицианина, галоцианина, амицианина, нитритредуктазы, некоторых лакказы и CueO [25, 67, 68, 69, 70, 71]. В структуре азурина (**Рис. 4б**) ион меди пятикоординирован: помимо остатка метионина в координации также участвует карбонильный кислород пептидной связи [72]. Вместо остатка метионина атом O ϵ амидной группы глутамина и атом O ϵ карбоксильной группы глутамата входят в состав координационной сферы иона меди у стеллацианина и нитрозоцианина (**Рис. 4в-г**), соответственно [73, 74]. У некоторых лакказ аксиальный лиганд в T1-центре отсутствует (**Рис. 4д**), и на его месте располагается гидрофобный остаток [26]. Стоит отметить, что длина координационной связи между ионом меди и аксиальным лигандом в T1-центре уменьшается в ряду от мягкого лиганда атома серы метионина к жесткому лиганду атому кислорода аспартата. При двойной замене в медном центре азурина (Cys \rightarrow Asp, Met \rightarrow Leu/Ile) был получен искусственный медный центр (**Рис. 4е**), близкий по своим свойствам к T1-центру, чем к T2 (см. ниже), и поэтому получивший название T0-центра [75].

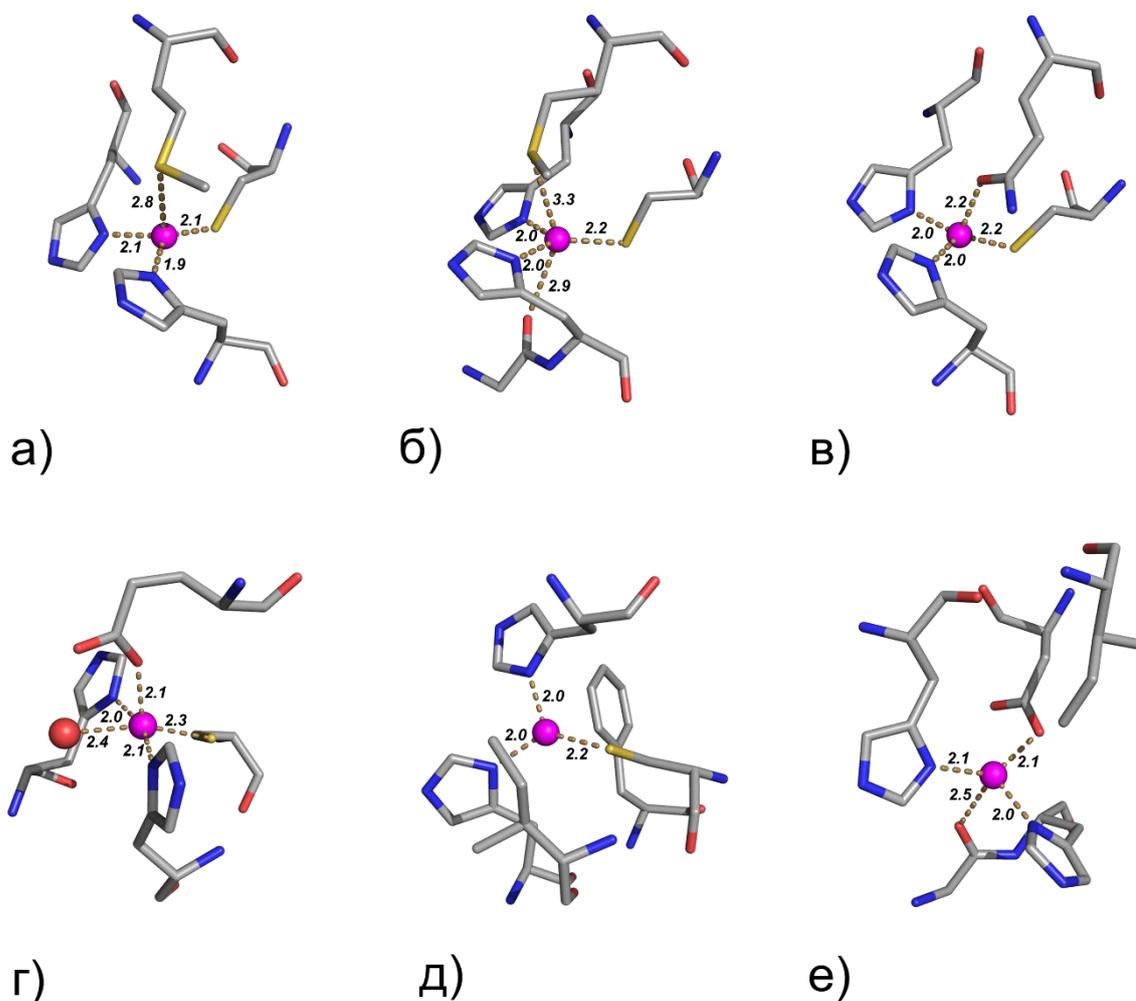


Рис. 4. Структура T1-центра пластоцианина (а, PDB ID: 1PLC), азурина (б, PDB ID: 2CCW), стеллацианина (в, PDB ID: 1JER), нитрозоцианина (г, PDB ID: 1IBY), лакказы (д, PDB ID: 5E9N) и T0-центра (е, PDB ID: 3FQ1).

Геометрия координации иона меди в T1-центре соответствует тетраэдрической для большинства представителей с аксиальным лигандом метионином (**Рис. 4а, в**) или даже плоской треугольной с отсутствующими аксиальными лигандами (**Рис. 4д**), что нетипично для комплексов меди в состоянии Cu^{+2} . Вследствие чего, в спектрах ЭПР белков с T1-центром константа СТВ A_{\parallel} принимает небольшое значение ($\sim 63 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$) (**Рис. 5б**) [49, 52]. Ион меди T1 также может быть координирован по типу тригональной бипирамиды (**Рис. 4б**) или квадратной пирамиды (**Рис. 4г**). Важно отметить, что восстановление иона меди в T1-центре не сопровождается реорганизацией структуры центра [55].

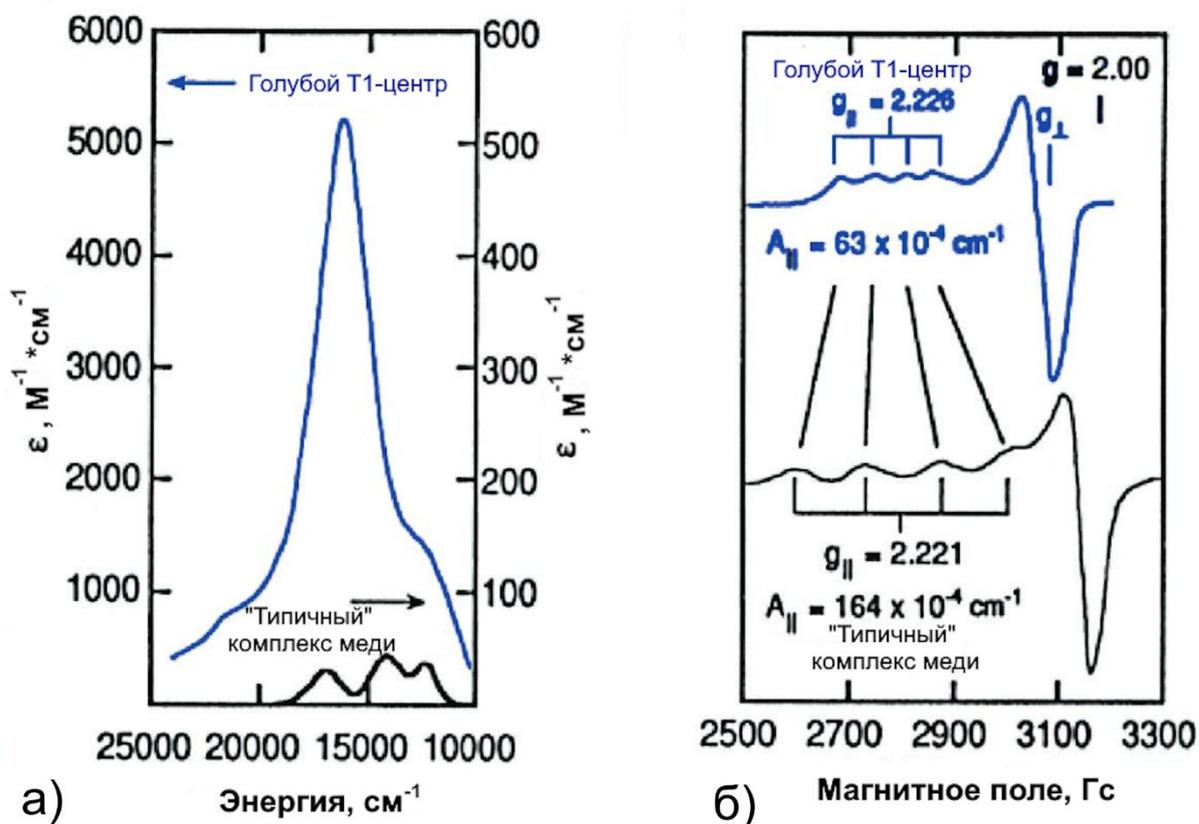


Рис. 5. Спектр поглощения в УФ-видимой области (а) и спектр ЭПР в X-диапазоне (б) голубого медного Т1-центра (синий) и «типичного» комплекса меди в состоянии Cu^{+2} (черный). Рисунок адаптирован из [53].

Спектральные исследования Т1-центра выявили взаимосвязь между структурой центра и положением максимума поглощения в видимой области [52]. Смещение интенсивного максимума поглощения с ~ 600 нм (голубая окраска) в коротковолновую область ~ 450 нм (зеленая окраска) отражает изменение в длине и свойствах связи Cu-S_γ у разных представителей и переходу к тетрагональной геометрии всего центра, более свойственной для иона меди в состоянии Cu^{+2} . Также обнаружена корреляция между длиной координационной связи иона меди с аксиальным лигандом метионином и спектральными свойствами центра [76].

Купредоксиновый домен играет роль «каркаса» вокруг Т1-центра белка и формирует непредпочтительную координационную сферу для ион меди в состоянии Cu^{+2} [77]. Описанные структурные свойства Т1-центра у ВСП и мультидоменных ферментов способствуют увеличению электродного потенциала $\text{Cu}^{+2} + e^- \rightarrow \text{Cu}^{+1}$ по сравнению с водным комплексом меди (150 мВ) [78] и уменьшают энергию реорганизации центра в ходе окисления и восстановления, что позволяет данному центру эффективно осуществлять транспорт электронов [52, 55, 65]. При этом, электродный потенциал Т1-центра варьирует в широких пределах [55] (от 220 до 1000 мВ [79, 80]), что превращает его в универсального переносчика электронов и позволяет осуществлять транспорт между различными белками-

партнерами. В ходе многочисленных исследований были установлены факторы, влияющие на величину электродного потенциала T1-центра: природа аксиального лиганда [81, 82], гидрофобность вторичной координационной сферы, образование водородных связей с атомом S γ координирующего цистеина [83, 84, 85], дипольные взаимодействия [86] и другие, подробно рассмотренные в [87].

1.4.2. T2-центр

Моноядерный медный T2-центр является кофактором ферментов, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции в большинстве случаев с участием молекулярного кислорода как одного из субстратов. Молекулярный кислород в процессе катализа восстанавливается до пероксида водорода или воды, и также участвует в реакции монооксигенирования второго субстрата. На основании структуры и катализируемой реакции ферменты с T2-центром можно разделить на четыре группы: амино- и алкоголь-оксидазы, монооксигеназы, супероксиддисмутаза и нитритредуктаза [88].

К общим чертам организации T2-центра у всех четырех групп можно отнести следующее: минимум два остатка гистидина входят в координационную сферу иона меди; субстрат (молекулярный кислород, супероксид-анион радикал или нитрит) образует координационную связь с ионом меди; координационная сфера иона меди изменяется в ходе каталитического процесса [88]. Координационную сферу иона меди в T2-центре также дополняют остатки метионина, глутамата, глутамина, тирозина или молекулы воды. T2-центр в белках близок по своим спектральным свойствам к «типичному» комплексу меди Cu⁺² [53] и характеризуется маленьким коэффициентом экстинкции в красной области спектра видимого диапазона и большим значением константы СТВ A \parallel в спектрах ЭПР [88]. Рассмотрим подробнее каждую группу ферментов.

Группа оксидаз объединяет амино- и алкоголь-оксидазы. Аминооксидазы окисляют с помощью молекулярного кислорода моноамины или диамины до альдегидов [89, 90, 91], а алкоголь-оксидазы – многоатомные и алифатические спирты [92, 93, 94, 95]. В обоих случаях кислород в ходе реакции восстанавливается до пероксида водорода. В отсутствие субстрата геометрия координации иона меди соответствует тетраэдрической при участии трех остатков гистидина и остатка тирозина или двух остатков гистидина и двух остатков тирозина у аминооксидаз и алкоголь-оксидаз, соответственно (**Рис. 6а, б**) [94, 96]. Характерной структурной особенностью ферментов этой группы является посттрансляционная модификация остатка тирозина, формирующего активный центр. У аминооксидаз остаток тирозина гидроксيليруется и окисляется до 2,4,5-

тригидроксифенил-аланин-хинона (**Рис. 6а**) [96] или лизил-тирозил-хинона [90] и участвует в образовании основания Шиффа с субстратом [97]. В структуре галактозооксидазы остаток цистеина образует тиоэфирную связь с ароматическим кольцом тирозина (**Рис. 6б**) [94, 98], которая необходима для стабилизации радикала, возникающего в ходе каталитического процесса [92].

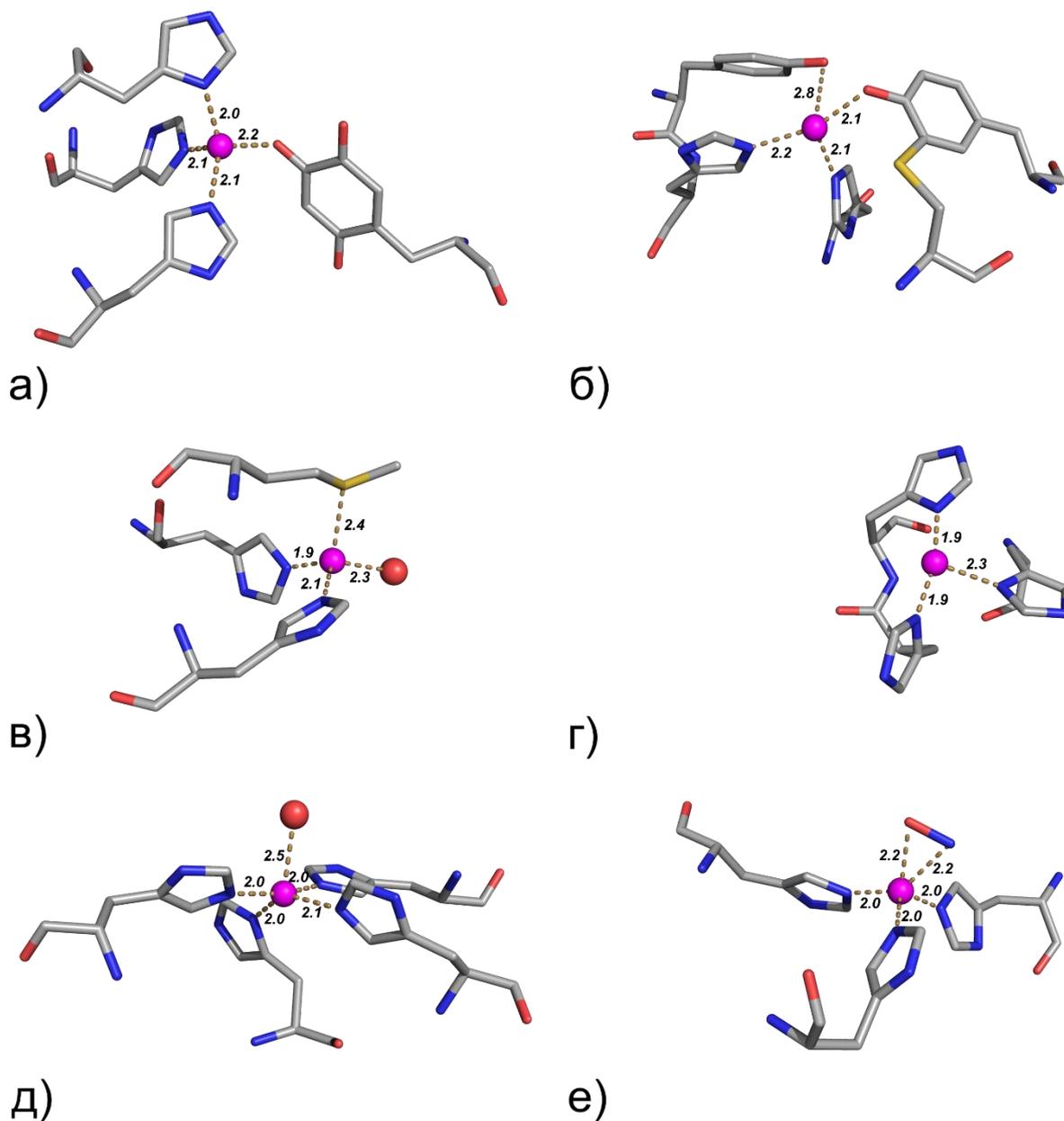


Рис. 6. Структура T2-центра центра диаминоксидазы (а, PDB ID: 3HI7), галактозооксидазы (б, PDB ID: 5C92), CuM (в) и CuH (г) центров пептидилглицин- α -гидроксилирующей монооксигеназы (PDB ID: 1PHM), Cu/Zn-супероксиддисмутазы (д, PDB ID: 2SOD), нитритредуктазы (е, PDB ID: 2BW5).

К монооксигеназам относятся пептидилглицин- α -гидроксилирующая монооксигеназа (peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase, PHM) и дофамин- β -монооксигеназа, которые гидроксилируют свои субстраты и восстанавливают

молекулярный кислород до воды в присутствии аскорбата [88]. Оба фермента состоят из двух доменов и содержат два медных T2-центра, CuH и CuM (**Рис. бв, г**), которые удалены друг от друга на расстояние порядка $\sim 11 \text{ \AA}$ и, в связи с этим, не могут осуществлять обменного взаимодействия [99], что подтверждается спектроскопией ЭПР. Медный центр CuM в состоянии Cu^{+2} координирован по типу тетраэдра двумя остатками гистидина, остатком метионина и молекулой воды (**Рис. бв**), которая замещается молекулой субстрата в ходе реакции. Медный центр CuH координирован по типу плоского треугольника тремя остатками гистидина (**Рис. бг**), что нехарактерно для иона меди в состоянии Cu^{+2} . Интересно, что при различной геометрии координации центры CuH и CuM обладают близкими значениями константы СТВ ($A_{\parallel 1} = 160 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ и $A_{\parallel 2} = 165 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$) в спектрах ЭПР [100]. Точечные замены координирующих остатков гистидина привели к невозможности связывания иона меди в центре CuM, однако не позволили однозначно соотнести каждый центр с его спектром ЭПР, поскольку параметры второго центра изменились у мутантной формы фермента [9]. Вероятно, это связано с тем, что отсутствие иона меди в одном из центров препятствует правильной организации второго центра [101]. На сегодняшний день предполагается, что CuM является каталитическим и активирует молекулу кислорода, а CuH осуществляет транспорт электронов на CuM [88, 102, 103].

Cu/Zn-супероксиддисмутаза (СОД) катализирует реакцию дисмутации супероксид-анион радикала, продукта одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода в процессах клеточного дыхания и фотосинтеза, с образованием молекулярного кислорода и пероксида водорода [88]. Ион меди в T2-центре СОД координирован по типу квадратной пирамиды четырьмя остатками гистидина и молекулой воды (**Рис. бд**) [104, 105] и демонстрирует спектр ЭПР, характерный для тетрагонального комплекса меди в состоянии Cu^{+2} [106, 107] с большим значением константы СТВ $A_{\parallel} = 144 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$. Для поддержания структуры активного центра СОД требуется ион цинка. Остаток гистидина у некоторых СОД выступает в качестве мостикового лиганда между ионами цинка и меди [104]. Интересно отметить, кинетические и спектральные исследования показали, что СОД в присутствии супероксид анион-радикала радикала кислорода может использовать гидросульфид-анион HS^- в качестве субстрата и окислять его до S_8 или полисульфида [108].

Медьсодержащая нитритредуктаза – один из небольшого числа медных ферментов, для которого молекулярный кислород не является субстратом. Фермент катализирует восстановление нитрита до монооксида азота в процессе анаэробного дыхания [88]. Нитритредуктаза содержит T1-центр для внутримолекулярного транспорта электронов и каталитический T2-центр [71, 109], которые удалены друг от друга на расстояние около $\sim 12 \text{ \AA}$. В свободной форме фермента ион меди в T2-центре координирован по типу

тригональной бипирамиды тремя остатков гистидина и двумя молекулами воды, которые замещаются молекулой субстрата (**Рис. 6е**). В отличие от двух центров РНМ, спектры ЭПР от T1- и T2-центров нитритредуктазы однозначно определяются в суммарном спектре по разнице в расщеплении линий СТВ [110, 111, 112]. Вследствие этого, нитритредуктаза оказалась удобным объектом для исследований методом спектроскопии ЭПР: был изучен процесс внутримолекулярного переноса электронов между T1- и T2-центрами в нитритредуктазе из *Alcaligenes xylosoxidans* при восстановлении образца γ -излучением [113] и измерены расстояния между парамагнитными центрами в гомотримере нитритредуктазы *Achromobacter xylosoxidans* методом импульсного ЭПР [14]. Структуры свободной формы нитритредуктазы из *Achromobacter cycloclastes* и комплекса с субстратом и продуктом с атомным разрешением позволили сформулировать механизм каталитической реакции [71].

Недавно был охарактеризован фермент – метантиолоксидаза (МТО), катализирующая окисление метантиола до формальдегида [114]. Медь-зависимая метантиолоксидазная активность была также обнаружена у селен-связывающих белков SELENBP1 из *Homo sapiens* и SEMO-1 из *Caenorhabditis elegans* [115, 116]. МТО катализирует сходную реакцию, как аминоксидазы, и окисляет метантиол до формальдегида при участии молекулярного кислорода, и при этом в реакции выделяются сероводород и пероксид водорода. SELENBP1 также проявляет тиолоксидазную активность в отношении других тиолов [117]. Методом точечного мутагенеза SELENBP1 было выявлено, что для метантиолоксидазной активности необходимы четыре остатка гистидина и остатки аспартата и глутамата [117]. Согласно данным спектроскопии ЭПР и рентгеновской спектроскопии, фермент, вероятно, содержит биядерный медный центр, где в координации ионов меди участвуют три азотных лиганда [114]. Однако в отличие от невзаимодействующих центров в РНМ и нитритредуктазе, ионы меди в МТО скорее всего связаны обменными взаимодействиями, как в CuA- или CuZ-центрах (см. далее), поскольку в спектре ЭПР присутствуют запрещенные переходы комплекса со спином $S = 1$ в свободной форме фермента и со связанным субстратом. Дальнейшие структурные исследования требуются, чтобы установить организацию медного центра МТО и классифицировать его.

1.4.3. T3-центр

Биядерный медный T3-центр выступает в роли кофактора у большого семейства медьсодержащих белков [49], обозначаемых как белки со спин-спин взаимодействующими ионами меди в биядерном центре (coupled binuclear copper protein, CBC) [6]. Белки этого

семейства отличаются субстратной специфичностью и выполняют разные физиологические функции, однако их объединяет способность связывать и активировать молекулярный кислород, формируя реакционноспособный комплекс ионов меди с пероксидом. Семейство СВС включает следующие белки: гемоцианин [118], переносчик кислорода в гемолимфе моллюсков и членистоногих; катехолоксидазу [119], окисляющую *орто*-дифенолы в соответствующие дихиноны; тирозиназу [120, 121], катализирующую гидроксирование фенола в *орто*-положении и последующее окисление до хинона; недавно открытую *орто*-аминофенолоксидазу [122], окисляющую аминогруппу *орто*-аминофенола до нитрозильной.

Ионы меди в ТЗ-центре принято обозначать как CuA и CuB [123]. В дезокси-состоянии ТЗ-центра оба иона меди восстановлены [$\text{CuA}^{+1}\text{-CuB}^{+1}$], координированы только тремя атомами Nε гистидинов каждый по типу плоского треугольника (**Рис. 7а**) и удалены друг от друга на расстояние $\sim 4.2 \text{ \AA}$ [6]. При связывании молекулярного кислорода комплекс переходит в окси-состояние [$\text{CuA}^{+2}\text{-CuB}^{+2}\text{:O}_2^-$] (**Рис. 7б**), где пероксид выполняет роль мостикового лиганда. Формирование окси-состояния сопровождается изменением геометрии координации ионов меди на тригональную бипирамидальную и сближением ионов меди на расстояние $\sim 3.5 \text{ \AA}$ [6]. В активном центре некоторых представителей, как катехолоксидаза из батата [119], тирозиназа из *Aspergillus oryzae* [121], гемоцианин моллюсков [118], образуется тиоэфирная связь между цистеином и координирующим ион меди CuA остатком гистидина. Данная связь важна для стабилизации структуры активного центра [124]. Причина исчезновения монооксигеназной активности у гемоцианина связана со стерическими ограничениями активного центра для ароматического субстрата [125], что было подтверждено экспериментально с помощью генно-инженерных подходов [126]. Отсутствие монооксигеназной активности у катехолоксидаз пока не до конца понятно со структурной точки зрения.

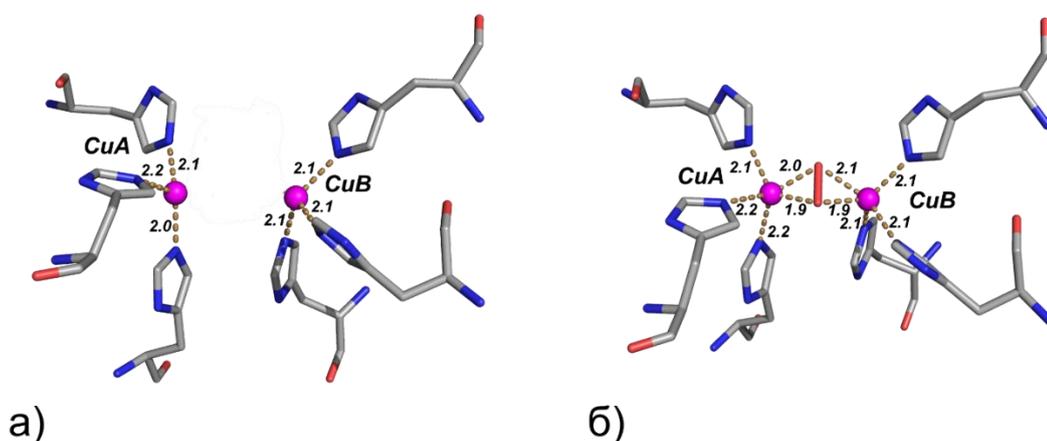


Рис. 7. Структура ТЗ-центра центра тирозиназы в дезокси-состоянии (а, PDB ID: 2AHL) и окси-состоянии (б, PDB ID: 1WX2).

T3-центр в окси-состоянии со связанным пероксид-анионом имеет интенсивный максимум поглощения в области 335-350 нм и слабый максимум поглощения в области 580 нм [127]. Обменные взаимодействия между ионами меди T3-центра в окси-состоянии через мостиковый лиганд приводят к образованию диамагнитного комплекса двух ионов меди и, как следствие, отсутствию спектра ЭПР.

Механизм активации кислорода в T3-центре исследуется очень давно, однако недавние структурные данные тирозиназы из *Aspergillus oryzae* открыли новые детали механизма действия тирозиназ [21]. Авторы получили структуру комплекса мутантной формы фермента с субстратом L-тирозином и структуру неактивного про-фермента с окси-состоянием T3-центра. Заметные структурные перестройки T3-центра по сравнению с окси-состоянием наблюдаются после связывании субстрата: разрывается координационная связь между ионом меди CuA и одним из остатков гистидина, и данный ион смещается в сторону субстрата и образует новую координационную связь с гидроксильной группой [21]. На основании спектральных и структурных данных, а также квантово-механических расчетов был предложен обновленный механизм каталитической реакции тирозиназы [50]. Авторы предполагают, что в ходе каталитического цикла ионы меди T3-центра со связанным кислородным лигандом могут находиться в состоянии Cu^{+3} .

1.4.4. TNC-центр мультимедных оксидаз

Мультимедные оксидазы (MCO) катализируют окисление широкого спектра субстратов, осуществляя при этом четырех-электронное восстановление молекулярного кислорода до молекулы воды [66]. Семейство MCO включает в себя лакказы [128], участвующие в синтезе и деградации лигнина, аскорбатоксидазу [129], билирубиноксидазу [130], феноксазиносинтазу [131], церулоплазмин и Fet3p [80, 132], окисляющие железо Fe^{+2} , и CueO [25], окисляющую медь Cu^{+1} . Ферменты содержат голубой T1-центр и трехъядерный медный центр (TNC), поэтому и получили соответствующее название [66]. Роль T1-центра заключается в одноэлектронном окислении субстрата и последовательной передаче четырех электронов на TNC. В TNC протекает реакция четырех-электронного восстановления молекулярного кислорода без высвобождения из активного центра промежуточных продуктов восстановления, что напоминает реакцию, катализируемую терминальной оксидазой в электронтранспортной цепи дыхания с участием гема a3 и медного центра CuB [133].

Организация и свойства T1-центра у MCO подробно рассмотрены выше [65]. TNC находится в интерфейсе, образованным двумя доменами, и объединяет моноядерный T2-центр и биядерный T3-центр (Рис. 8а, б) [66]. Координация иона меди T2-центра

характерна для медного центра данного типа и изменяется в процессе восстановления. В состоянии Cu^{+1} ион меди координирован линейно с участием только остатков гистидина, в состоянии Cu^{+2} – по типу плоского квадрата двумя остатками гистидина и двумя молекулами воды (Рис. 8а, б) [26]. Центр Т3 структурно идентичен Т3-центру тирозиназ (Рис. 7а, б) и реорганизуется сходным образом в процессе связывания молекулярного кислорода и его восстановления (Рис. 8а, б) [6]. В Т3-центре также формируется оксисостояние с пероксид-анионом в качестве мостикового лиганда между двумя ионами меди.

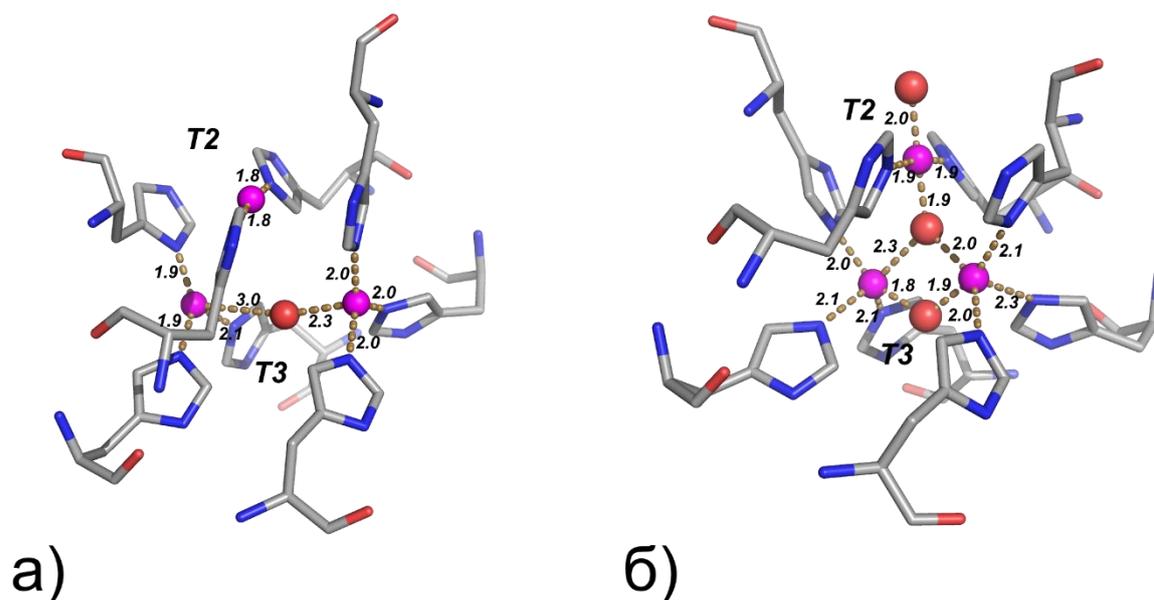


Рис. 8. Структура TNC лакказы в дезокси-состоянии (а, PDB ID: 6RHO) и окси-состоянии (б, PDB ID: 6RGH).

Спектральные свойства медных центров MCO аналогичны свойством каждого из ранее рассмотренных центров в отдельности. Т1- и Т2-центры демонстрируют характерные спектры ЭПР с соответствующими значениями константы СТВ, в то время как пара ионов меди Т3 в обоих состояниях Cu^{+1} и Cu^{+2} диамагнитна [7, 8]. Все представители семейства MCO имеют ярко-голубую окраску благодаря наличию Т1-центра. В УФ-видимой области Т1 центр имеет интенсивный максимум в области ~ 600 нм, а Т3-центр в окси-состоянии – в области ~ 330 нм [7].

Механизм восстановления кислорода в TNC активно исследовали с помощью спектральных и структурных методов и квантово-механических расчетов. В TNC молекулярный кислород восстанавливается электронами, поступающими от субстрата через Т1-центр. В ходе рентгеноструктурного эксперимента источником электронов может служить ионизирующее излучение [24], генерирующее свободные электроны в образце посредством фотоэффекта. Так с использованием этого свойства рентгеновского излучения и применением подхода серийной кристаллографии на одном монокристалле, были

получены наборы дифракционных данных для Cu₂O и лакказы с атомным разрешением и увеличивающейся поглощенной дозой ионизирующего излучения [25, 26, 27], которые буквально позволили наблюдать процесс восстановления молекулярного кислорода в TNC. На основании этих данных был предложен механизм каталитической реакции лакказы с образованием интермедиата, симметричного комплекса с пероксидом и ионами T3-центра [26], что противоречило ранее предложенному механизму и ассиметричному расположению пероксида в TNC [134].

1.4.5. CuA-центр

Пурпурный биядерный медный CuA-центр входит в число кофакторов мультидоменных и мультисубъединичных ферментов, где его основной функцией служит внутримолекулярный перенос электронов [135]. К данным ферментам относятся цитохром с оксидаза (cytochrome c oxidase, COX) или комплекс IV [133, 136], терминальная оксидаза в электрон-транспортной цепи у аэробных организмов, и растворимая N₂O-редуктаза [137, 138, 139], терминальный комплекс в цепи анаэробного дыхания у денитрифицирующих микроорганизмов. У этих ферментов CuA-центр связан в небольшом домене с укладкой по типу купредоксина, как и у белков с T1-центром [65], и осуществляет транспорт электронов к каталитическому центру. COX и N₂O-редуктазы – сложно организованные ферменты, связывающие несколько кофакторов металла, поэтому для изучения свойств конкретного кофактора получают генно-инженерные модельные объекты на основе ВСП, как например, CuA-центр в азурине [140]. В белке PmoD из метаноокисляющей бактерии *Methylocystis sp.* с неустановленной функцией был обнаружен уникально организованный CuA-центр, который располагается в димерном интерфейсе между двумя купредоксиновыми субъединицами [141], в отличие от других представителей.

CuA-центр включает два иона меди, в координации которых принимают участие два остатка цистеина (**Рис. 9а**) [136, 138, 141, 142, 143, 144]. Атомы серы двух цистеинов выполняют роль мостиковых лигандов, третьим экваториальным лигандом ионов меди является остаток гистидина. Место четвертого аксиального лиганда в координационной сфере одного из ионов меди занимает атом серы метионина, а у второго – карбонильной кислород пептидной связи [138, 144]. В структуре PmoD роль обоих аксиальных лигандов выполняют метионины [141]. Аксиальные лиганды находятся в *транс*-положении относительно плоскости (**Рис. 9а**), сформированной ромбической структурой ионов меди и мостиковых цистеинов. Длина координационной связи между ионами меди и атомом S_γ тиольной группы цистеина длиннее (2.2-2.4 Å), а длина связи между ионами меди и атомом S_δ тиоэфирной группы метионина короче (2.3-2.6 Å) по сравнению с T1-центром [52, 65].

Геометрия координации каждого из ионов меди соответствует тетраэдрической (**Рис. 9а**). Длина металлической связи между ионами меди варьирует от 2.3 до 2.5 Å [135]. Такое короткое расстояние между двумя ионами меди возможно благодаря наличию двух мостиковых лигандов и формированию жесткой ромбической структуры. Окисленное состояние CuA-центра соответствует смешанному валентному состоянию $[\text{Cu}^{+1.5}\text{-Cu}^{+1.5}]$ [145], в котором один неспаренный электрон равномерно распределен между двумя атомами меди. При одноэлектронном восстановлении CuA-центр оба иона меди переходят в состояние $[\text{Cu}^+\text{-Cu}^+]$. Как и в случае с T1-центром, белковая глобула служит жестким каркасом, фиксирующим одинаковую геометрию центра в окисленном и восстановленном состояниях [77]. Отсутствие структурных перестроек центра при изменении редокс-состояния уменьшает энергию реорганизации и, тем самым, увеличивает скорость транспорта электронов, превращая CuA-центр в высокоэффективный кофактор для переноса электронов [146].

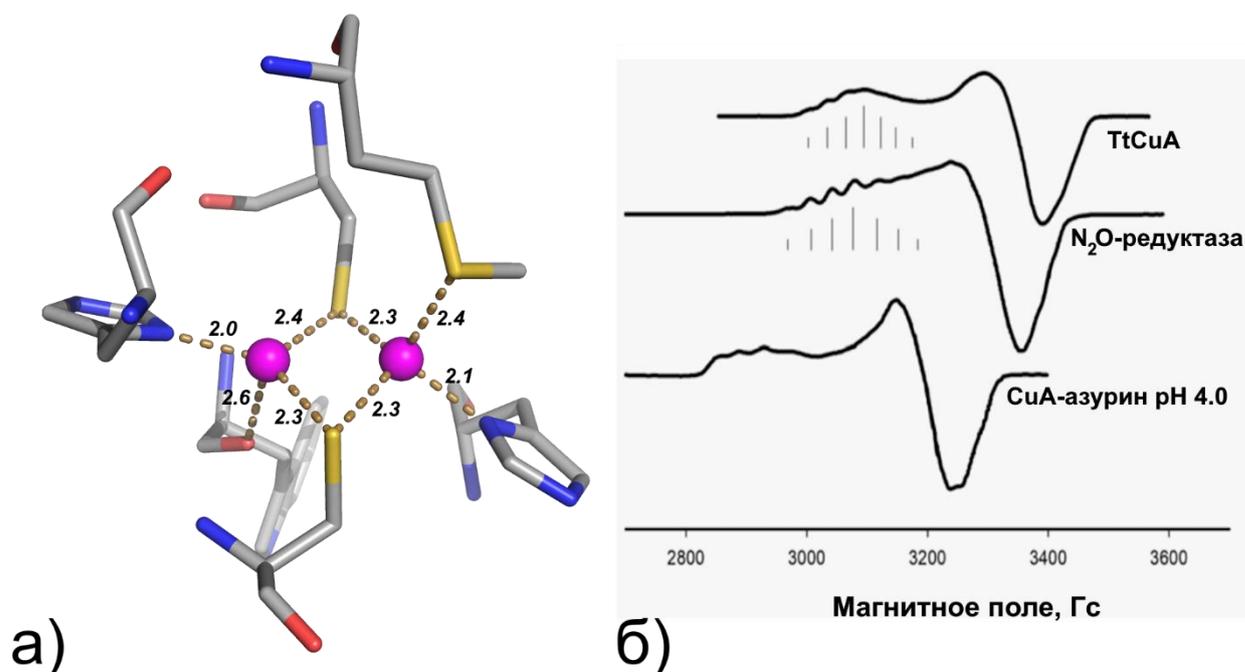


Рис. 9. Структура CuA-центра N_2O -редуктазы (а, PDB ID: 1FWX). Спектры ЭПР (б) CuA-центров разных представителей, рисунок адаптирован из [135].

CuA-центр демонстрирует отличительные спектральные свойства. В восстановленном состоянии центр диамагнитен и не окрашен. В спектре ЭПР окисленного CuA-центра спин системы соответствует $S = 1/2$ с семью линиями СТВ (**Рис. 9б**), а не четырьмя, и небольшим значением константы ($A_{\parallel} = 31 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ [144]), что предполагает делокализацию одного неспаренного электрона между двумя атомами меди и мостиковыми серными лигандами [5, 145, 147, 148]. В окисленном состоянии центр обладает пурпурной окраской, которая обусловлена двумя максимумами поглощения при 480 и 530 нм,

соответствующих линиям поглощения переноса заряда от лиганда $S\gamma$ на атом меди [135]. В дальней красной области CuA-центр имеет максимум поглощения в области 750-800 нм, которая отражает электронные переходы между орбиталями ионов меди и может служить характеристикой металлической связи Cu-Cu [147].

Диапазон электродного потенциала CuA-центра у разных представителей варьирует в диапазоне от 200 до 350 мВ [135], что значительно меньше вариативности диапазона потенциалов T1-центра [55]. Разные диапазоны значений потенциалов можно объяснить разницей функций двух медных центров: CuA-центр осуществляет транспорт электронов к конкретному каталитическому центру с жестко фиксированным значением электродного потенциала, а T1-центр участвует в окислении широкого спектра субстратов.

1.4.6. CuB-центр

Восстановление кислорода в терминальном комплексе IV или COX является заключительным этапом в процессе переноса электронов в электронтранспортную цепь дыхания, и оно происходит в смешанном железомедном активном центре фермента в толще цитоплазматической мембраны. Этот сложно организованный центр, получивший название биядерного центра (binuclear center, BNC) [133], состоит из высоко-спинового пятикоординированного гема а3 и иона меди CuB [136, 144],

В BNC атом железа гема а3 в свободной форме фермента пятикоординирован и находится в восстановленном состоянии Fe^{+2} (**Рис. 10а**). В одном аксиальном положении располагается остаток гистидина, а второе положение вакантно для связывания субстрата – молекулярного кислорода. Ион CuB в свободной форме также находится в восстановленном состоянии Cu^{+1} и координирован тремя остатками гистидина по типу плоского треугольника (**Рис. 10а**), типичной геометрии координации для комплексов иона меди Cu^{+1} [133]. Похожая координация при участии трех остатков гистидина наблюдается в CuH-центре у РНМ и Т3-центре тирозиназ и МСО [66, 99, 123]. Один из координирующих остатков гистидина образует ковалентную связь с соседним остатком тирозина, участвующим в реакции восстановления кислорода. Связывание молекулярного кислорода между ионом меди и ионом железа гема а3 и окисление иона меди до состояния Cu^{+2} приводят к смещению иона меди из плоскости (**Рис. 10б**), образованной тремя остатками гистидина [149]. Расстояние между ионами железа и меди составляет $\sim 5 \text{ \AA}$.

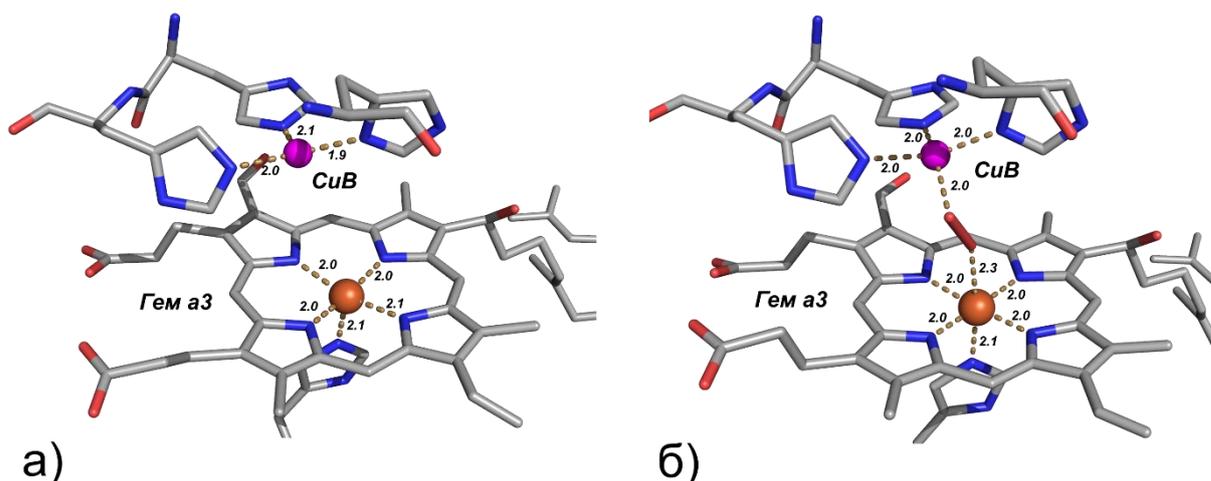


Рис. 10. Структура биядерного центра BNC в свободной форме (а, PDB ID: 5B1B) и со связанным пероксидом водорода (б, PDB ID: 7COH).

Терминальная оксидаза COX является мультисубъединичным и мембранным белком и содержит ряд простетических групп, что осложняет характеристику спектральных свойств отдельных центров. Для решения такого типа задач широко применяются генно-инженерные подходы, в ходе которых один из редокс-активных центров встраивается отдельно в наиболее подходящий по укладке, стабильный и растворимый белковый домен. На основе молекулы миоглобина была получена генно-инженерная модель активного центра COX – Cu-Fe_vMb, содержащая аналоги гема а3 и CuB-центра [150]. В видимом спектре данного комплекса в окисленной форме присутствовали интенсивные линии поглощения гема: линия Core и Q₀-линия при длинах волн 429 и 556 нм, соответственно. При окислении комплекса Cu-Fe_vMb кислородом в спектре ЭПР появлялся сигнал от иона меди со спином $S = 1/2$, хорошо разрешенными линиями СТВ от самого иона и от азотных лигандов в перпендикулярной области. На основании генно-инженерных, кинетических, спектральных и вычислительных подходов авторы обозначили возможные причины использования иона меди как кофактора для активации и восстановления молекулярного кислорода в терминальных оксидазах: медь является редокс-активным металлом с высоким электродным потенциалом и с наибольшим числом электронов в 3d-подгруппе [150].

1.4.7. CuZ-центр N₂O-редуктазы

На сегодняшний момент CuZ-центр обнаружен только у одного фермента, N₂O-редуктазы, катализирующей терминальную стадию окисления оксида N₂O до азота в процессе анаэробного дыхания у денитрифицирующих бактерий. Фермент представляет собой гомодимер и содержит CuA-центр, ответственный за транспорт электронов и рассмотренный выше, и каталитический CuZ-центр [137]. Ранее на основании

спектральных исследований предполагали, что CuZ-центр является биядерным [5]. Первая структура N₂O-редуктазы из *Pseudomonas nautica*, установленная с разрешением 2.4 Å, пролила свет на природу четырехъядерного медного CuZ-центра [137], в котором роль мостикового лиганда выполняет сульфид-анион [142].

Субъединица гомодимера N₂O-редуктазы состоит из N- и C-концевых доменов [137, 138, 139, 142, 143, 151]. N-концевой домен обладает укладкой по типу семи лопастного β-пропеллера и содержит в центральной полости CuZ-центр. C-концевой домен фермента обладает укладкой по типу купредоксина и связывает CuA-центр. Гомодимер фермента сформирован таким образом, что CuA-центр одной субъединицы располагается на расстоянии ~ 10 Å от CuZ-центра второй субъединицы.

Активный центр N₂O-редуктазы сформирован семью остатками гистидина, которые участвуют в координации четырех ионов меди CuI, CuII, CuIII и CuIV (**Рис. 11**). При этом три иона меди CuI, CuII и CuIII координированы двумя остатками гистидина, а ион CuIV – только одним. Ионы меди располагаются друг относительно друга на расстоянии от ~ 2.5-3.1 Å и образуют основание квадратной пирамиды, в вершине которой связывается мостиковый лиганд. Ранее на основании структуры фермента из *P. nautica* с разрешением 2.4 Å роль этого мостикового лиганда отводилась гидроксил-аниону [137]. Уточнение природы лиганда как сульфид-аниона стало возможным благодаря титрованию N₂O-редуктазы сульфидом и получению структуры фермента *Paracoccus denitrificans* с разрешением 1.6 Å [142]. Полученные структурные данные объясняли появление максимума поглощения у восстановленной формы фермента при длине волны 640 нм [5, 148], который отражает наличие особой координационной связи с серным лигандом, как у T1-центра [52, 65]. CuZ-центр в такой форме обозначают как [4Cu:1S]. Геометрия координации ионов CuII, CuIII и CuIV соответствует плоскому треугольнику, а у иона CuI – искаженному тетраэдру (**Рис. 11**). В координации ионов CuI и CuIV принимает участие также молекула воды. В структуре комплекса фермента с ингибитором йодид-анион замещает молекулы воды из координационной сферы и связывается между ионами CuI и CuIV [143]. На основании этих структурных данных и квантово-механических расчетов была предложена модель связывания субстрата в CuZ-центре. Позднее была получена структура комплекса N₂O-редуктазы с субстратом в строго анаэробных условиях, где в CuZ-центре второй сульфид-анион располагался между ионами CuI и CuIV и CuZ-центр принимал форму [4Cu:2S] [151]. Субстрат N₂O в данной структуре связывался между CuZ- и CuA-центрами на расстоянии ~ 3 Å от ионов меди каталитического центра, поэтому предполагают, что такая ориентация субстрата не соответствует правильному связыванию в процессе реакции [139].

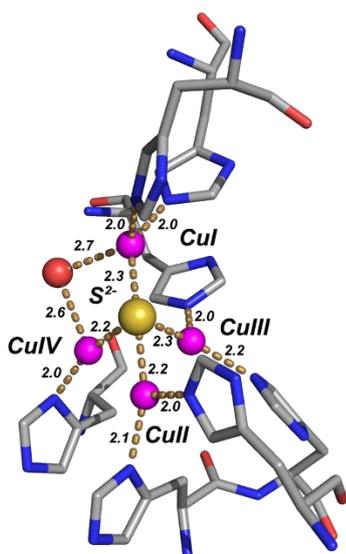


Рис. 11. Структура CuZ-центра N_2O -редуктазы (PDB ID: 1FWX).

Фермент после процесса выделения из клеток в аэробных условиях существуют в двух формах: пурпурной и голубой [148]. Различия в спектральных свойствах двух форм связаны с редокс состоянием CuA-центра: у пурпурной формы CuA окислен, у голубой – восстановлен. Голубая окраска фермента обусловлена поглощением CuZ-центра при длине волны 640 нм, и эта форма характеризуется уширенным спектром ЭПР со спином системы $S = 1/2$ ($g_{\parallel} = 2.16$, $A_{\parallel} = 61 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ для превалирующей формы) и соответствует окисленному состоянию CuZ-центра $[1Cu^{+2}-3Cu^{+1}:S^{-2}]$ [152], которое может переходить в восстановленное состояние $[4Cu^{+1}:S^{-2}]$ под действием дитионита. Вторая форма каталитического центра N_2O -редуктазы с двумя серными лигандами может также находиться в окисленном $[2Cu^{+2}-2Cu^{+1}:2S^{-2}]$ (максимум поглощения при 550 нм, отсутствие спектра ЭПР) и в восстановленном $[1Cu^{+2}-3Cu^{+1}:2S^{-2}]$ (максимум поглощения при 670 нм, спектр ЭПР с $g_{\parallel} = 2.152$ и $A_{\parallel} = 56 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$) состояниях [153]. На сегодняшний момент ведутся дискуссии о каталитически активной форме N_2O -редуктазы и окислительно-восстановительных переходах ионов меди в CuZ-центре в процессе катализа [139]. Спектральные и структурные исследования показывают, что форма CuZ-центра с двумя серными лигандами, вероятно, не является каталитически активной [151, 154]. Ввиду сложности структуры центра, в правильной сборке и встраивании CuZ-центра N_2O -редуктазы в клетке участвует целый ряд белков оперона NOS [155, 156].

1.4.8. Медный центр с мотивом «гистидиновой скрепки»

Название “histidine brace motif” (НВМ) или в дословном переводе мотив «гистидиновой скрепки» происходит из того, что N-концевой остаток гистидина связывает ион меди атомами азота свободной аминогруппы и имидазольного кольца, образуя структуру, напоминающую скрепку. Медный центр такого строения был обнаружен у грибных и бактериальных LPMO [157], окисляющих лигнино-целлюлозную биомассу, мембранной метанмонооксигеназы (particulate methane monooxygenase, pMMO) [12] и медь-транспортных белков [158, 159, 160, 161]. В виду уникальности строения координационной сферы и распространенности НВМ у белков с различными функциями, НВМ можно выделить в отдельную группу, хотя строение координационной сферы иона меди имеет общие черты с группой ферментов с T2-центром.

В формировании медного центра НВМ участвуют два остатка гистидина, один из которых является N-концевым и образует с ионом меди две координационные связи атомами азота аминогруппы и имидазольного кольца, а второй – только одну за счет атома азота имидазольного кольца (**Рис. 12а-в**) [162]. В роли четвертого экваториального лиганда могут выступать молекулы воды (**Рис. 12а**) [162], которые замещаются на субстрат в ходе реакции, остатки гистидина (**Рис. 12б**) [12] или аспартата (**Рис. 12в**) [158, 159, 160, 161]. Иногда координационная сфера дополняется одним или двумя удаленными аксиальными лигандами [157]. В зависимости от числа лигандов геометрия координации иона меди в НВМ может быть плоской квадратной, квадратной пирамидальной, тригональной бипирамидальной или октаэдрической с далеко удаленными аксиальными лигандами. Отличительными чертами медного центра НВМ ферментов от НВМ центров медь-запасяющих и -транспортирующих белков является следующее: два имидазольных кольца гистидинов занимают *транс*-положение в отличие от *цис*-положения белков-транспортеров; молекула воды находится на месте четвертого экваториального лиганда у ферментов вместо остатка аспартата. У мембранной pMMO все четыре экваториальных лиганда в НВМ азотные от трех остатков гистидина [12, 163, 164].

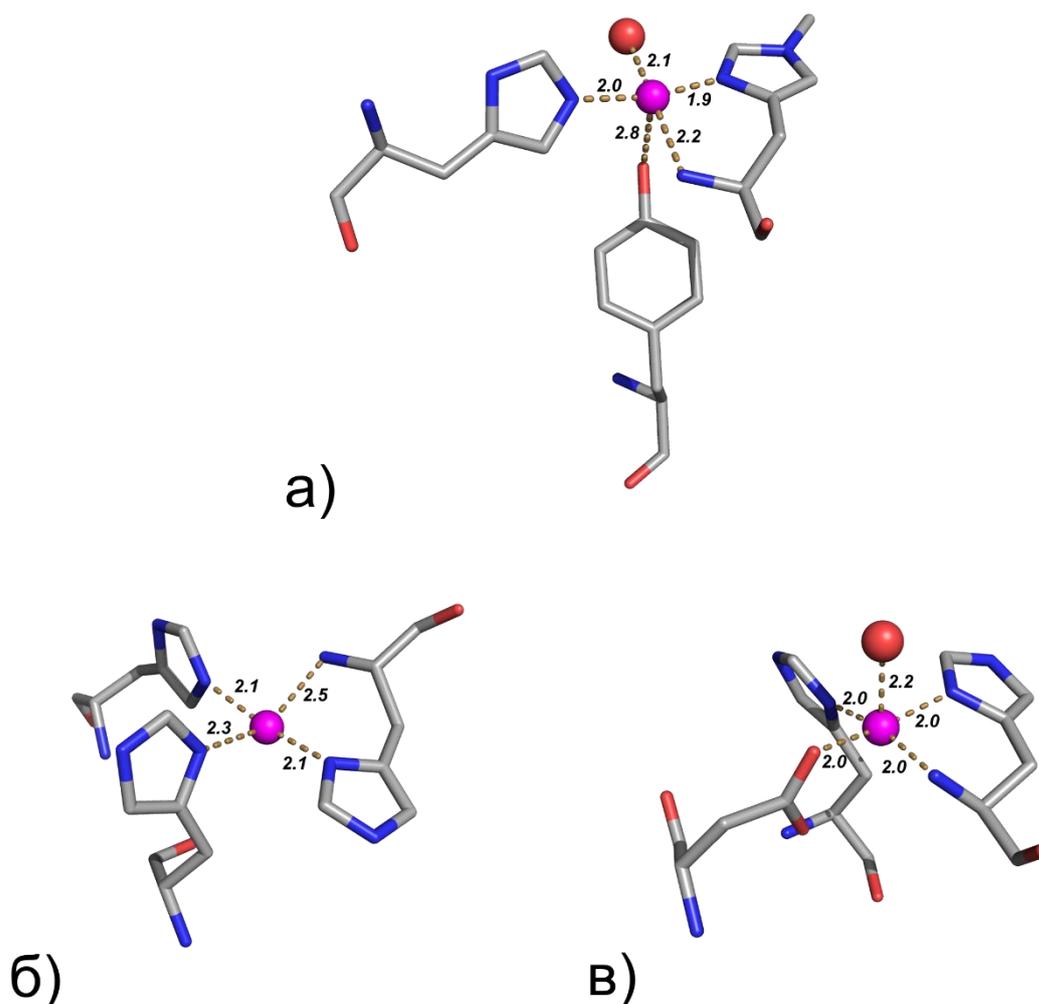


Рис. 12. Структура центра НВМ у LPMO (а, PDB ID: 5ACH), pMMO (б, PDB ID: 7S4H) и *tpCopC* (в, PDB ID: 8YTR).

LPMO – удивительный фермент, который связывается на поверхности кристаллического полисахарида и катализирует его гидролитическое расщепление посредством активации кислорода и окисления C1 или C4 атомов остатка моносахарида [165]. Активный центр фермента располагается на поверхности белковой глобулы и очень чувствителен к изменениям окружающих условий. Так, в спектрах ЭПР были обнаружены две формы центра ($g_{\parallel 1} = 2.260$ и $A_{\parallel 1} = 135 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$, $g_{\parallel 2} = 2.230$ и $A_{\parallel 2} = 190 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$) [2], соотношение которых менялось при смещении pH из слабокислых значений в щелочную область [4]. Квантово-механические расчеты показали, что это связано с изменением координационной сферы иона меди с квадратной пирамиды на плоскую квадратную и депротонированием одного из лигандов. На сегодняшний день есть сомнения, что вторым субстратом реакции является молекулярный кислород. Авторы утверждают, что эту роль выполняет пероксид водорода [165, 166].

Мембранная pMMO является ключевым метаболическим ферментом метанотрофов, катализирует реакцию окисления метана до метанола с участием кислорода, представляет

собой мультисубъединичный мембранный белок и содержит два медных центров [12, 13]. Ввиду сложной организации объекта, возникли трудности с получением кристаллической структуры фермента, и долго не удавалось охарактеризовать структуру медных центров. Согласно последним спектральным данным и данным криоэлектронной микроскопии, два медных центра CuV и CuC у рММО являются моноядерными [12, 13, 163, 164]. Медный центр CuV относится к НВМ-типу и, вероятно, именно там происходит окисление метана. Медный центр CuC представляет собой T2-центр, в котором ион меди координирован двумя остатками гистидина, остатком аспартата и молекулой воды по типу плоского квадрата. На сегодняшний день исследования свойств и роли каждого медного центра рММО активно продолжаются.

1.4.9. Бис-цистеиновые медные центры

Медный центр с участием двух остатков цистеина как лигандов иона меди обычно встречается у металлошаперонов или медь-запасающих белков и описан на сегодняшний день только у одного фермента, хотя по недавним данным белок устойчивости к избытку меди может проявлять ферментативную активность.

Формилглицин-образующий фермент (FGE) катализирует окисление цистеина в формилглицин с участием молекулярного кислорода, при этом в процессе реакции выделяется сульфид [167]. На протяжении почти 18 лет предполагали, что FGE не содержит кофактора и один из двух остатков цистеина в активном центре фермента непосредственно активирует молекулярный кислород [168]. В структурах фермента из *Streptomyces coelicolor* и *Homo sapiens* был обнаружен только ион кальция, участвующий в стабилизации правильной укладки молекулы фермента [168, 169]. Однако позднее был обнаружен активирующий эффект ионов меди в состояниях Cu^{+2} и Cu^{+1} в реакции FGE с моноклональными антителами и модифицированным GFP [170, 171]. Далее показали, что фермент связывает ион меди в состоянии Cu^{+1} при участии двух остатков цистеина [172].

Причиной отсутствия меди в первых установленных структурах фермента [168, 169] было окисление координирующих остатков цистеина и образование дисульфидного мостика [168, 172]. Первые структуры FGE с атомным разрешением и со связанными ионами металлов были получены сокристаллизацией фермента с ионами Ag^{+1} и Cd^{+2} [173], которые служили редокс-стабильными моделями комплексов фермента с ионом меди в состояниях Cu^{+1} и Cu^{+2} , соответственно. В ходе дальнейших структурных исследований холоформы ферментов из *Streptomyces coelicolor* и *Thermonospora curvata* были получены настаиванием кристаллов солью CuCl_2 в присутствии ДТТ и сокристаллизацией с солью CuCl , соответственно [20, 54, 174]. Интересно отметить, что в случае FGE из *Streptomyces*

coelicolor холоформу фермента удалось получить только настаиванием кристаллов ионами меди.

Моноядерный медный центр FGE с двумя координирующими остатками цистеинов напоминает по архитектуре высоко аффинные сайты связывания ионов меди в металлошаперонах [62]. В восстановленном состоянии Cu^{+1} ион меди в активном центре FGE координирован линейно двумя остатками цистеинов в отсутствие субстрата и молекулярного кислорода (**Рис. 13а**) [54, 173]. Цистеин субстрата-пептида образует координационную связь с восстановленным ионом меди при связывании в активном центре фермента [20, 54], и геометрия координации иона изменяется на плоскую треугольную (**Рис. 13б**). Окисленное состояние Cu^{+2} иона меди нестабильно и реакционноспособно. На основании структурных данных комплекса фермента с ионом кадмия предполагали [173], что окисление иона меди молекулярным кислородом приводит к изменению координационной сферы на тетраэдрическую. Новые структурные данные для комплекса холоформы FGE с кислородом поддерживают другую гипотезу: в структуре молекула кислорода связывается в активном центре фермента и не образует с ним координационную связь [174]. Вследствие чего, авторами был предложен новый механизм активации кислорода под действием FGE без непосредственного взаимодействия с ионом меди. Данный механизм кажется удивительным, поскольку для всех ранее описанных ферментов отмечается формирование кислородного комплекса с ионом меди в активном центре. Атом кислорода в образующемся продукте, формилглицине происходит из активированной молекулы кислорода [175].

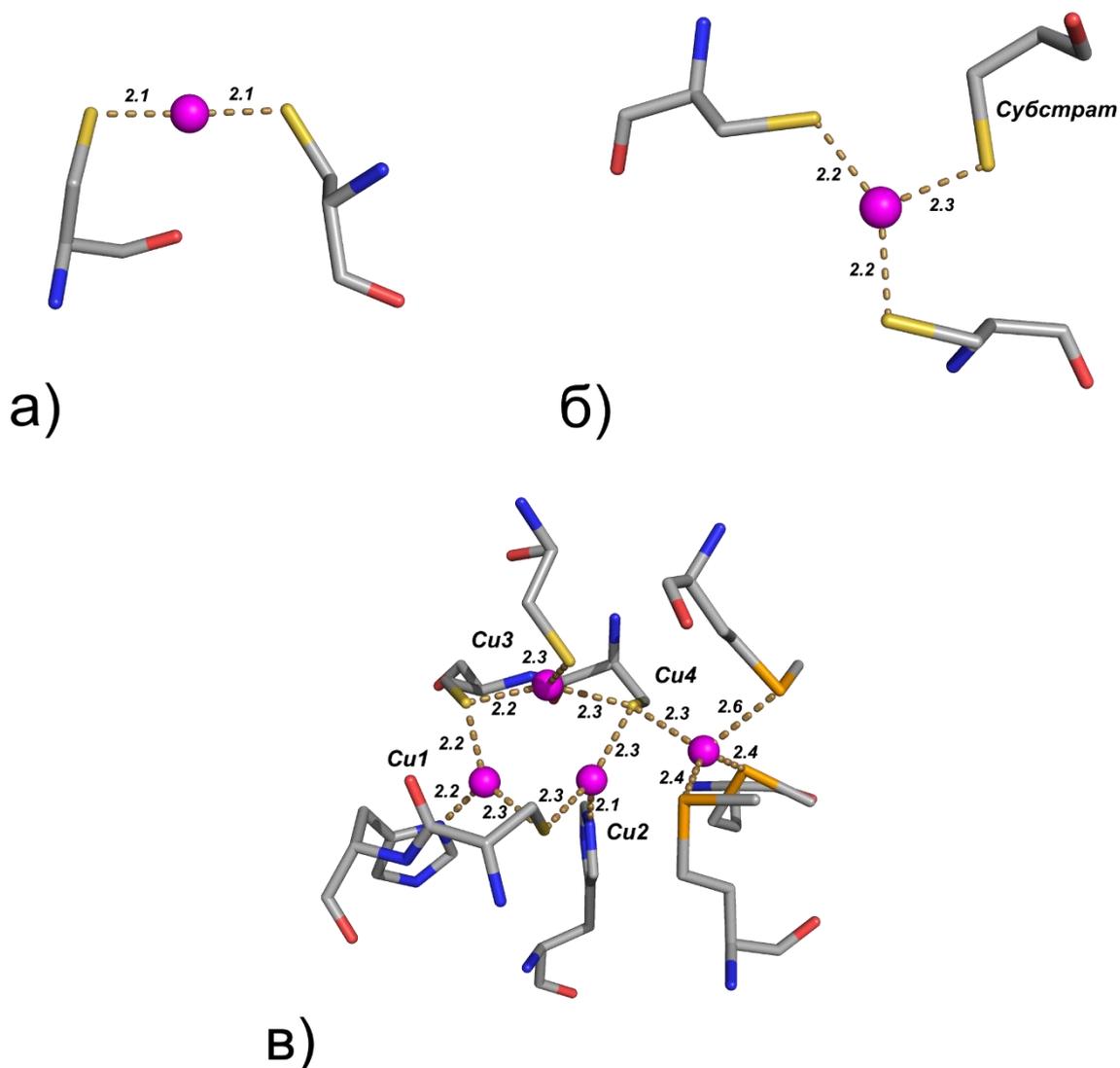


Рис. 13. Структура медного центра FGE в свободной форме (а, PDB ID: 6MUJ) и со связанным субстратом (б, PDB ID: 6S07), структура медного центра CopG (в, PDB ID: 6WIS).

Апоформа FGE обладает необычным свойством автовосстановления кофактора при активации фермента солями меди Cu^{+2} [54, 172]. Окисленная холоформа FGE поглощает в ближней ультрафиолетовой области при 348 и 375 нм [54]. Окисленная форма фермента нестабильна, поскольку в аэробных и анаэробных условиях поглощение холоформы исчезает в течение 10 и 17 минут, соответственно. Спектр ЭПР при активации FGE ионами меди Cu^{+2} в анаэробных условиях почти полностью исчезает в течение одного часа [54]. Свойство автовосстановления кофактора фермента, вероятно, связано с организацией активного центра. Линейная координация двумя остатками цистеинов характерна для высоко аффинных центров ионов меди в состоянии Cu^{+1} , что и способствует восстановлению иона меди.

Второй возможный представитель – это CopG, ген которого входит в состав оперонов, ответственных за устойчивость бактерий к изменению концентрации свободных ионов меди в среде [64]. CopG обладает укладкой по типу тиоредоксина и содержит консервативный мотив CXCC, который включает редокс-активные цистеины тиоредоксинов. Молекула белка может связывать до четырех ионов меди (Cu¹⁻⁴) (**Рис. 13в**). Согласно структурным данным, восстановленная форма белка связывает четыре иона меди, а окисленная форма – только три из-за образования дисульфидной связи между лигандами одного из ионов [176]. Возможность окислительно-восстановительных перестроек медного центра позволила авторам предположить, что CopG может проявлять оксидазную/редуктазную активность в отношении ионов меди как субстрата [176].

Четырехъядерный центр устроен следующим образом (**Рис. 13в**). В координации ионов меди Cu₁, Cu₂ и Cu₃ участвуют три остатка цистеина как мостиковые лиганды, а третьим лигандами являются остатки гистидина для ионов Cu₁ и Cu₂ и остаток цистеина для Cu₃, соответственно [176]. Ионы Cu₁, Cu₂ координированы по типу плоского треугольника, а Cu₃ – по типу тетраэдра. Ион меди Cu₄ координирован тремя остатками метионина и одним остатком цистеина по типу тетраэдра и, вероятно, располагается на месте субстрата. Дисульфидная связь в окисленной форме образуется между цистеинами, лигандами ионов Cu₁ и Cu₃, и ион Cu₃ диссоциирует из структуры.

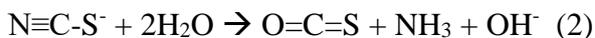
CopG имеет три максимума поглощения в видимой области при 411, 581 и 721 нм [176]. По аналогии с T1-центром предполагают [52], что линии при 411 и 581 нм соответствуют линии поглощения переноса заряда от серного к ионам меди, а линия при 721 нм – электронному переходу d-d атома меди [64]. Однако для расшифровки электронного спектра и уточнения классификации CopG требуются дальнейшие исследования.

1.5. Тиоцианатдегидрогеназа из *Thioalkalivibrio paradoxus*

Новый метаболический путь окисления тиоцианата был описан у двух видов галоалкалофильных хемолитоавтотрофных бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 и *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans*, обитающих в содовых озерах Юго-восточной Сибири, Кении и Египта [177]. Бактерии окисляют тиоцианат и накапливают нейтральную серу S₈ в гранулах. Вторым продуктом реакции является цианат, вследствие чего, данный метаболический путь был назван «цианатным»:



Второй путь деградации тиоцианата, «карбонилсульфидный», был ранее обнаружен у бактерии *Thiobacillus thioparus* [178]. В ходе данного пути происходит гидролиз тиоцианата по тройной связи N≡C и образование карбонилсульфида и аммиака по схеме:



Реакцию гидролиза тиоцианата катализирует тиоцианатгидролаза – кобальтсодержащий фермент, состоящий из трех субъединиц и гомологичный железо-зависимым нитрилгидратазам [179, 180, 181].

В геномах *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 и *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ген тиоцианатгидролазы отсутствовал. Транскриптомный анализ бактерии *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* позволил обнаружить ген фермента, тиоцианатдегидрогеназы (TcDH), который был ответственным за катализ реакции окисления тиоцианата [182]. Экспрессия гена периплазматического белка с молекулярной массой около 56 кДа возрастала при культивировании бактерии *Tv. thiocyanoxidans* на тиоцианате как единственном источнике энергии и азота. Ген тиоцианатдегидрогеназы обнаружен не только у бактерий рода *Thioalkalivibrio* [183, 184], но и у других родов серо-окисляющих бактерий [185].

Впервые тиоцианатдегидрогеназа (*tpTcDH*) была выделена из клеток *Thioalkalivibrio paradoxus* [61]. Фермент представляет собой медьсодержащую оксидоредуктазу, и позднее ему был присвоен номер 1.8.2.7 (E.C.), согласно международной классификации ферментов.

1.5.1. Биохимические свойства *tpTcDH*

tpTcDH в растворе находится в растворе в форме гомодимера с кажущейся молекулярной массой около 110 кДа. После процедуры очистки из клеток *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 *tpTcDH* не демонстрировала ферментативную активность и содержала один ион меди на молекулу белка по данным масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) [61]. Активация фермента избытком ионов меди Cu^{+1} или Cu^{+2} приводила к связыванию трех ионов меди на молекулу белка и восстановлению тиоцианатдегидрогеназной активности. Диссоциация кофакторов из активного центра в процессе выделения и очистки описана также для других медных ферментов, как рММО и лакказы [12, 186, 187].

Цианат и элементная сера являются продуктами реакции окисления тиоцианата, катализируемой *tpTcDH* (1). При этом акцепторами электронов в реакции могут служить как низкомолекулярные соединения (TMPD, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), так и макромолекулы (цитохром c_{550} из сердца лошади) с окислительно-восстановительным потенциалом более 200 мВ. Физиологическим партнером *tpTcDH* в клетке, вероятно, является цитохром c_{552} ,

экспрессия которого также возрастает при культивировании клеток тиоцианате [182], как на единственном источнике энергии и азота. Образование комплекса *tpTcDH* с цитохромом c_{552} было показано методом ЯМР-спектроскопии [188]. К эффективным ингибиторам *tpTcDH* относятся: цианид, образующий комплексы с ионами меди в обоих состояниях и ингибирующий ферментативную реакцию по конкурентному механизму; цианат, продукт реакции, ингибирующий реакцию по смешанному механизму. Ещё один смешанный ингибитор – тиомочевина [189] интересен для структурных исследований, поскольку напоминает переходное состояние, постулируемое в механизме реакции (см. далее) [61].

1.5.2. Спектральные свойства *tpTcDH*

Отсутствие интенсивных максимумов поглощения в видимой области спектра у *tpTcDH*, содержащей на молекулу три иона меди [61], свидетельствует о том, что в активном центре фермента координационные связи, близкие по свойству к ковалентным с переносом заряда, как в случае T1-, CuA- и CuZ-центрах [49], отсутствуют. Связывание тиоцианата в активном центре фермента не приводит к возникновению окрашивания образца [61], следовательно, координационная связь ионов меди с атомом серы отлична по свойствам от BCP и N₂O-редуктазы, и образование диамагнитной пары двух ионов меди в состоянии Cu⁺² через мостиковый лиганд, как в T3-центре тирозиназ и лакказ [49], не происходит. Спектральные свойства в УФ-видимой области *tpTcDH* характерны для невзаимодействующих медных T2-центров [49].

tpTcDH в свободной форме содержит на молекулу около трех эквивалентов ионов меди в состоянии Cu⁺² [61], по данным спектроскопии ЭПР. Спин всей системы равен $S = \frac{1}{2}$, что наряду с УФ-видимой спектроскопией подтверждает отсутствие обменных взаимодействий между ионами меди в активном центре фермента. Анализ второй производной спектра ЭПР в X-диапазоне (частота МИ ~ 9.4 ГГц) с привлечением данных ЭПР из Q-диапазона (частота МИ ~ 35 ГГц) позволили описать спектр *tpTcDH* (Рис. 14а) тремя невзаимодействующими ионами меди с параметрами, приведенными в таблице 2. Видно, что для двух ионов меди А и В наблюдаются сходные свойства, характерные для «типичного» комплекса меди в состоянии Cu⁺². Ион меди С выделяется меньшим значением константы СТВ A_{\parallel} , что является особенностью T1- и T0-центров [52, 75]. Таким образом, предполагают, что в свободной форме медный центр *tpTcDH* находится в состоянии [3Cu¹⁺²] [61]. Связывание субстрата KSCN в активном центре фермента в отсутствие акцептора электронов в реакционной смеси приводит к восстановлению ионов меди В и С, при этом наблюдается спектр ЭПР одного иона меди с неизменившимися параметрами (Рис. 14б, Таблица 2).

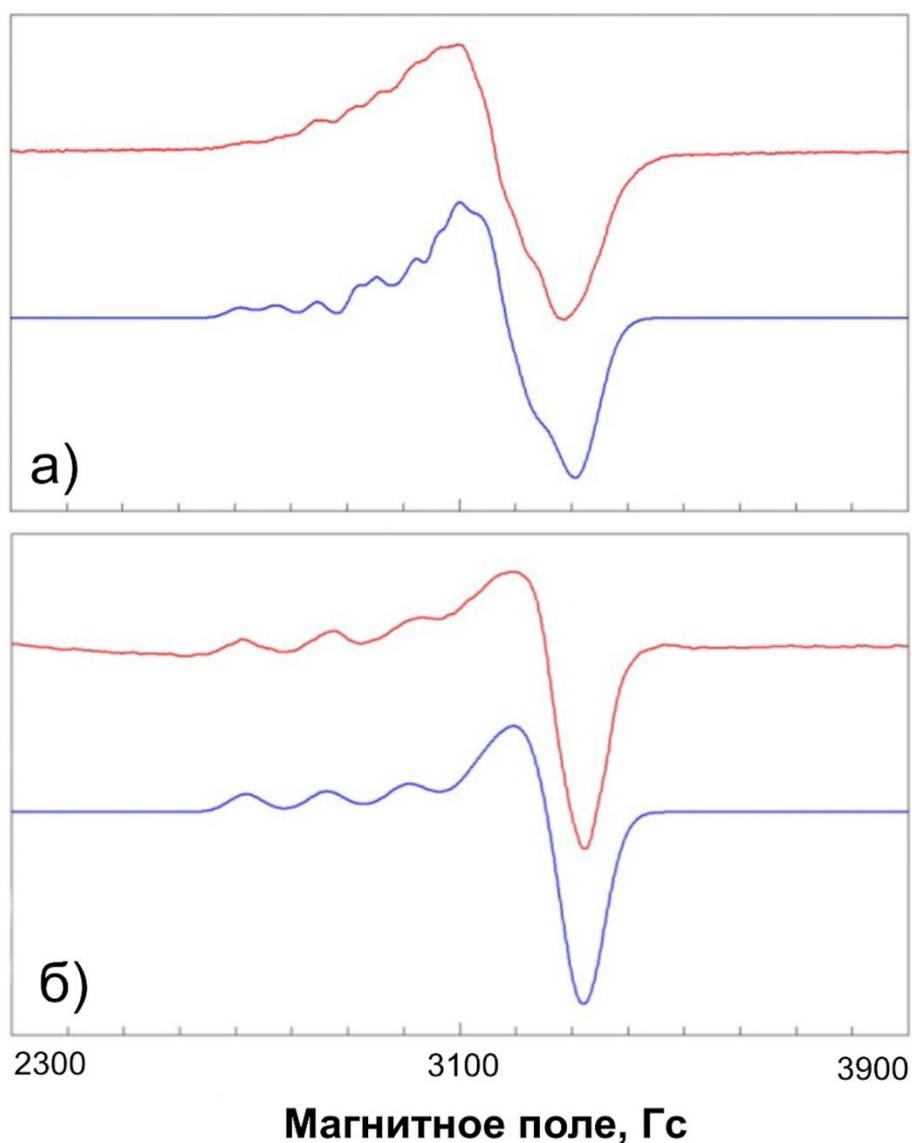


Рис. 14. Спектр ЭПР в X-диапазоне (частота МИ ~ 9.4 ГГц) *tpTcDH* в свободной форме и со связанным субстратом KSCN. Экспериментальный и симулированный спектры показаны красным и синим цветом, соответственно. Рисунок адаптирован из [61].

Таблица 2. Параметры ионов меди *tpTcDH* в спектре ЭПР в X-диапазоне (частота МИ ~ 9.4 ГГц). Данные приведены из [61].

| Ион меди | g_{\perp} | g_{\parallel} | $A_{\perp}, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ | $A_{\parallel}, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ |
|----------|-------------|-----------------|--------------------------------------|--|
| A | 2.060 | 2.295 | 30 | 145 |
| B | 2.065 | 2.240 | 30 | 150 |
| C | 2.106 | 2.195 | 10 | 80 |
| A* | 2.056 | 2.290 | 20 | 150 |

Примечание. *Параметры одного из ионов меди в спектре ЭПР в X-диапазоне, оставшегося после восстановления фермента субстратом KSCN в отсутствие акцептора.

1.5.3. Идеальное двойникование кристаллов *tpTcDH*

Пространственная структура *tpTcDH* была установлена методом РСА [61]. Стоит отметить, что для решения первой структуры методом мультиволнового аномального рассеяния потребовалось получить изоморфные производные кристаллов с тяжелоатомным рассеивателем $[\text{PtCl}_4]^{2-}$, хотя сам фермент связывает в качестве кофакторов ионы меди, которые также демонстрируют необходимый аномальный сигнал. Слабый вклад от аномального сигнала в рассеяние рентгеновских лучей, как оказалось, был вызван дефектом кристаллов *tpTcDH*. Большинство кристаллов *tpTcDH*, для которых были собраны дифракционные данные, представляли собой идеальные псевдо-мероэдрические двойники, т.е. доля каждого кристаллического домена достигала почти 0.5. Так, четыре структуры фермента дикого типа (PDB ID 6I3Q; 6G5M; 6G50; 6UWE) из шести депонированных в PDB были установлены с использованием данных с двойникованных кристаллов.

Некристаллографическая ось симметрии второго порядка и формирование в независимой части элементарной ячейки тетрамера *tpTcDH* за счет кристаллических контактов, у которого все субъединицы расположены в одной плоскости, способствовали упаковке молекул фермента слоями в кристалле. Кроме того, в низко симметричной моноклинной группе $P2_1$ кристаллов фермента два параметра элементарной ячейки были близки по значениям, а угол моноклинности между ними составлял $\sim 120^\circ$, что является признаками высоко симметричной гексагональной группы. Все вышеперечисленные структурные особенности кристаллов *tpTcDH* обусловили высокую вероятность псевдо-мероэдрического двойникования.

Как будет видно далее, двойникование кристаллов затруднило рентгеноструктурный эксперимент не только на этапе решения, но и анализа структуры.

1.5.4. Общая структура *tpTcDH*

tpTcDH представляет собой димер (**Рис. 15а**) [61], который является прочным комплексом (энергия диссоциации ΔG^{diss} составляет ~ 35 ккал/моль, по оценкам программы PISA [190]) и стабилизирован за счет гидрофобных взаимодействий и около 30 водородных связей. Субъединица фермента обладает укладкой по типу семилопастного β -пропеллера (**Рис. 15б**). В свою очередь, каждая лопасть пропеллера сформирована антипараллельными β -слоями. Активный центр *tpTcDH* располагается в центральной полости пропеллера. С одной стороны доступ в активный центр ограничен С-концевым остатком треонина, а с другой стороны располагается субстратный канал. Топологически структура субъединицы

tpTcDH напоминает N-концевой домен N_2O -редуктазы [137, 138, 142, 143, 151], содержащий CuZ-центр.

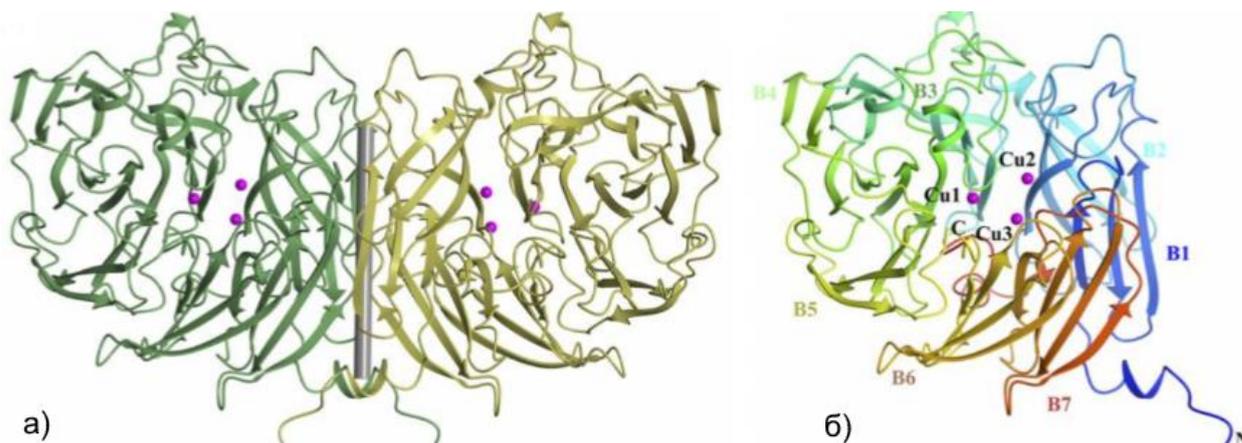


Рис. 15. Димер *tpTcDH* (а). Ось симметрии гомодимера показана серым цилиндром. Общая укладка субъединицы *tpTcDH* (б), N- и C-концы показаны синим и красным цветом, соответственно. Рисунок адаптирован из [61].

1.5.5. Уникальный трехъядерный медный центр *tpTcDH*

Активный центр *tpTcDH* располагается в центральной полости β -пропеллера [61]. В его формировании принимают участие семь остатков гистидина (H135, H136, H206, H381, H437, H482, H528), остаток аспартата (D314), лизина (K103) и глутамата (E288) (**Рис. 16а, б**), которые консервативны у гомологов фермента в других микроорганизмах [185].

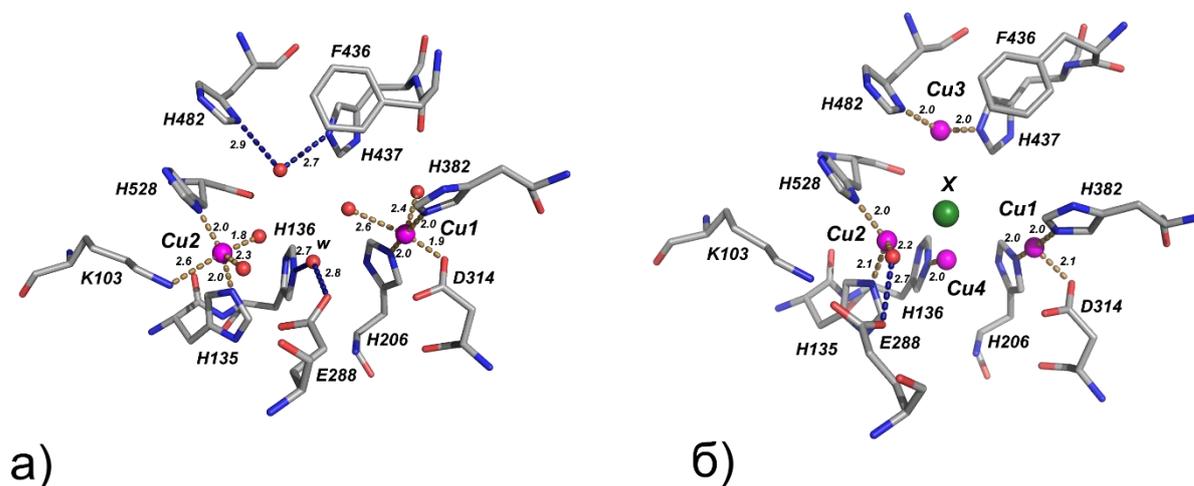


Рис. 16. Структура трехъядерного медного центра *tpTcDH* в свободной форме (а, PDB ID: 5F75) и со связанным неидентифицируемым лигандом X (б, PDB ID: 6UWE).

Полный медный центр холоформы *tpTcDH* состоит из трех ионов меди, которые обозначают как Cu1, Cu2 и Cu3 (**Рис. 16а, б**). Получение структуры *tpTcDH* с полным трехъядерным медным центром было сопряжено с трудностями, что также характерно и

для других медных ферментов [12, 54]. Например, моноядерный T2-центр, составляющий часть TNC-центра лакказ, является очень лабильным и связывается в структурах только при настаивании кристаллов ионами меди Cu^{+1} [187]. В случае *tpTcDH* таким же лабильным является ион Cu^3 . Предполагается, что это связано с устройством его координационной сферы [61]. В структурах *tpTcDH* (PDB ID: 6I3Q, 5OEX, 5F75), кристаллы которых не подвергались дополнительной обработке ионами меди, присутствовали только ионы меди $\text{Cu}1$ и $\text{Cu}2$ с высокой заселенностью (**Рис. 16а**), а ион $\text{Cu}3$ либо обладал низкой заселенностью (PDB ID: 5OEX), либо отсутствовал вовсе (PDB ID: 6I3Q, 5OEX, 5F75). Связывание иона $\text{Cu}3$ в кристаллической структуре наблюдалось только при настаивании кристаллов фермента с избытком соли CuCl (**Рис. 16б**). Однако при такой жесткой обработке качество разрешение дифракционных данных ухудшалось (PDB ID 6G5M) или/и появлялись максимумы на разностной карте электронной плотности, соответствующие дополнительным ионам меди на поверхности и в активном центре ($\text{Cu}4$ на **Рис. 16б**) (PDB ID: 6G5M, 6UWE). Вывод о том, что функционирующим полным медным центром *tpTcDH* является именно трехъядерный центр, был сделан на основании совокупности данных ИСР-MS, спектроскопии ЭПР, точечного мутагенеза и структурных данных [61].

Рассмотрим устройство координационной сферы каждого из ионов меди подробнее. Ион меди $\text{Cu}1$ координирован остатками H206, H381 и D314 (**Рис. 16а, б**). В некоторых структурах его координационная сфера дополняется одним или двумя молекулами воды (**Рис. 16а**). Стоит также отметить, что расстояние между ионом меди $\text{Cu}1$ и молекулами воды варьирует в структурах *tpTcDH*. Таким образом, в зависимости от числа различных на карте электронной плотности молекул растворителя геометрию координации иона меди $\text{Cu}1$ можно описать как плоский квадрат, квадратная пирамида/тригональная бипирамида (**Рис. 16а**) или Т-подобная (**Рис. 16б**). Предполагается, что ион меди $\text{Cu}1$ соответствует в спектре ЭПР центру А (**Таблица 2**), поскольку обладает предпочтительной геометрией координации для меди в состоянии Cu^{+2} и не восстанавливается субстратом [61].

Для иона меди $\text{Cu}2$ также наблюдается несколько вариантов координационной сферы. В структуре (PDB ID: 5F75) ион меди координирован остатками H135, H528, K103 и двумя молекулами воды по типу тригональной бипирамиды (**Рис. 16а**), в структуре (PDB ID: 6I3Q) – остатками гистидина и двумя молекулами воды по типу тетраэдра, в структуре (PDB ID: 6UWE) с неидентифицируемым лигандом – остатками гистидина и одной молекулой воды по типу плоского треугольника (**Рис. 16б**). Ион меди $\text{Cu}2$, вероятно, соответствует в спектре ЭПР центру В (**Таблица 2**) [61], поскольку обладает в одном случае геометрией координации, типичной для меди в состоянии Cu^{+2} . Однако стоит отметить, что тетраэдрическая геометрия у иона $\text{Cu}2$ может быть свойством центра С из спектра ЭПР

(Таблица 2), напоминающего T0-центр [75]. Роль координационной связи между ионом меди и K103 в каталитическом цикле остается неясной (см. далее).

Координационная сфера, свойственная иону меди в состоянии Cu^{+1} , обнаружена для иона Cu3 во всех установленных структурах – этот ион координирован линейно двумя остатками гистидина H437 и H482 (Рис. 16б). Необходимость наличия иона меди Cu3 для проявления тиоцианатдегидрогеназной активности была подтверждена точечным мутагенезом – форма фермента с заменой H482Q, в структуре (PDB ID 6SJI) которой ион меди Cu3 не связывался, не обладала ферментативной активностью [61]. Ввиду такой необычной координационной сферы для иона меди в состоянии Cu^{+2} , предполагают, что ион меди Cu3 соответствует «нетипичному» центру C в спектре ЭПР [61].

Аминокислотные остатки H136 и E288 играют важную роль в каталитическом процессе, поскольку точечные замены этих остатков на аланин приводили к полной потере ферментативной активности *tpTcDH* [61]. Данные остатки связывают за счет водородных связей консервативную молекулу воды W, которая является нуклеофильным агентом, согласно постулируемому механизму реакции (Рис. 16а)[61].

На основании представленной классификации медных центров по их организации, каждый из трех ионов меди Cu1 , Cu2 и Cu3 в отдельности можно отнести к T2-центру. Отсутствие мостиковых лигандов и расстояние между ионами меди, превышающее 5 Å, не допускает обменных электронных взаимодействий между парами ионов меди в свободной форме фермента [49]. Эти особенности делают трехъядерный медный центр *tpTcDH* уникальным среди других медных ферментов с трех- и четырехъядерным медными центрами [66, 128, 137, 138, 142, 143, 151].

Несмотря на то, что для *tpTcDH* установлено и депонировано шесть структур, включая структуру мутантной формы, качество этих структурных данных из-за ранее упомянутого двойникования и недостаточного разрешения (лучшее разрешение 1.45 Å у структуры PDB ID: 6UWE) не позволяет однозначно интерпретировать карты электронной плотности и сделать предположения о функционировании каждого из ионов меди. Изменение длин координационных связей между ионом меди Cu1 и молекулами воды, исчезновение молекул растворителя из координационной сферы иона меди Cu1 или линейная координация иона меди Cu3 одновременно могут быть объяснены и восстанавливающим воздействием рентгеновского излучения, и ошибками при уточнении из-за идеального двойникования. Невозможно также однозначно соотнести ион меди в структуре со спектром ЭПР из-за вероятных ошибок при описании координации. Низкая заселенность иона меди Cu3 и отсутствие структур комплексов *tpTcDH* с ингибиторами осложняет исследование механизма каталитической реакции.

1.5.6. Механизм реакции, катализируемой *tpTcDH*

tpTcDH катализирует окисление тиоцианата по схеме 1 с образованием цианата и элементной серы в форме S_8 [61], а также переносом двух электронов на акцептор, вероятно, цитохром c_{552} [188]. В ходе каталитической реакции происходит разрыв связи между атомами серы и углерода под действием нуклеофила и двухэлектронное окисление атома серы, а не углерода. Молекулярный кислород не является косубстратом в реакции *tpTcDH* [61].

Несмотря на отсутствие надежных структурных данных о координации ионов меди и расположении субстрата в активном центре механизм каталитической реакции *tpTcDH* был сформулирован с привлечением имеющихся экспериментальных данных и квантово-механических расчетов [61]. Реакция окисления тиоцианата, катализируемая *tpTcDH*, была разделена на три стадии: гидролиз тиоцианата; перенос двух электронов от атома серы на ионы меди активного центра; перенос электронов от ионов меди на внешний акцептор.

Стадия гидролиза тиоцианата в активном центре *tpTcDH* была рассчитана с помощью комбинированного подхода квантовой механики и молекулярной динамики (Рис. 17) [61]. Для расчетов была выбрана структура 6I3Q с лучшим разрешением 1.45 Å. Субстрат тиоцианат был размещен в активном центре *tpTcDH* следующим образом (Рис. 17-1): атом серы тиоцианата располагается между ионами меди Cu2 и Cu3 в качестве мостикового лиганда на месте неидентифицируемого лиганда в структуре 6UWE, атом азота тиоцианата входит в координационную сферу иона меди Cu1. Выбор координационной сферы иона меди Cu2 для расчетов профиля реакции был сделан в пользу той координации, где остаток K103 не координирует ион меди Cu2. При участии в координации остатка K103 энергетический барьер реакции становился очень высоким. Согласно предложенному механизму, гидролиз тиоцианата в активном центре *tpTcDH* начинается с активации консервативной молекулы воды W остатком N136 посредством депротонирования и превращения в сильный нуклеофил – гидроксил-анион OH⁻ (Рис. 17-2). Гидроксил-анион атакует атом углерода тиоцианата, при этом связь C-S разрывается, и второй протон уходит на карбоксильную группу E288 (Рис. 17-3). После гидролиза цианат связан одной координационной связью с ионом Cu1 и водородными связями с каталитическими остатками N136 и E288, сульфид-анион служит мостиковым лигандом между ионами меди Cu2 и Cu3 (Рис. 17-4). Далее два электрона с сульфида переносятся на ионы Cu2 и Cu3, и образуется сульфановая сера [S⁰], которая вместе с цианатом и двумя протонами покидает активный центр *tpTcDH*. Согласно предложенному механизму реакции, ионы Cu2 и Cu3 меняют свою степень окисления, а ион Cu1 всегда остается в

состоянии Cu^{+2} , т.е. в ходе реакции состояние медного центра *tpTcDH* меняется между $[\text{Cu}1^{+2}-\text{Cu}^{+2}-\text{Cu}3^{+2}]$ и $[\text{Cu}1^{+2}-\text{Cu}2^{+1}-\text{Cu}3^{+1}]$.

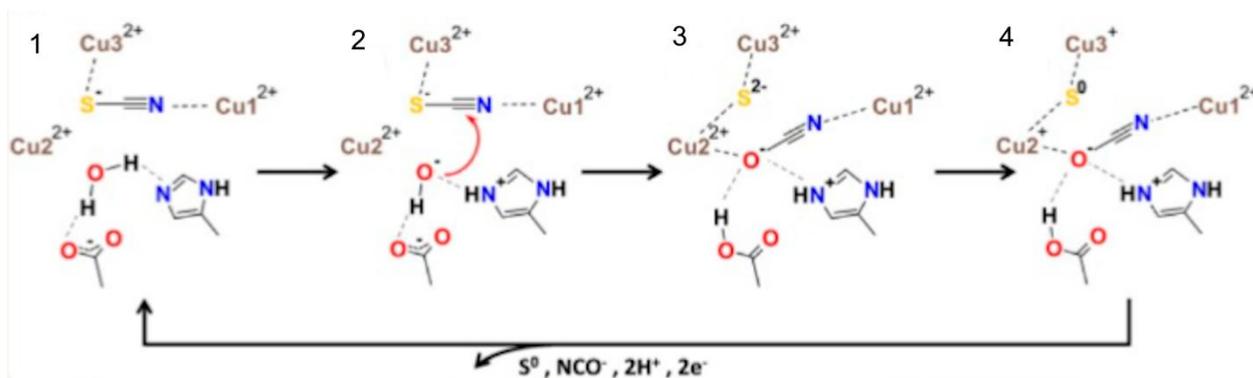


Рис. 17. Предполагаемый механизм первой стадии реакции, гидролиза тиоцианата, катализируемой *tpTcDH*. Рисунок адаптирован из [61].

Предложенный механизм каталитической реакции охватывает пока только одну стадию всего процесса. Дальнейшие этапы реакции, как окисление сульфид-аниона, выход продуктов реакции из активного центра, цепь переноса протонов и транспорт двух электронов на одноэлектронный акцептор, остаются предметом изучения и дискуссии. Особенно интересна судьба связанного сульфид-аниона. В реакциях, катализируемых моноядерным медным центром FGE и, вероятно, биядерным медным центром МТО, сульфид выделяется в виде H_2S и не окисляется в присутствии активированной молекулы кислорода [20, 114, 167]. В случае СОД сероводород может восстанавливать моноядерный Т2-центр [191], однако механизм этого процесса изучается и, вероятно, может быть связан с формированием сульфогидрильного радикала [192]. После выхода из активного центра сероводород, сульфогидрильный радикал или нейтральная сера могут в растворе собираться в полисульфиды HS_nH и аллотропную форму S_8 [192, 193, 194]. Для некоторых ферментов сероокисляющих бактерий было описано образование перисульфидных цепочек на остатках цистеина [195]. Остается также неясным до конца, как протекает перенос двух электронов от восстановленного трехъядерного медного центра *tpTcDH* на одноэлектронный акцептор – одновременно или последовательно. Таким образом, каждая стадия механизма реакции окисления тиоцианата под действием *tpTcDH* требует дальнейших исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и реактивы

Для проведения ПЦР использовали коммерческий набор реактивов Tersus Plus PCR kit (Evrogen, Россия) и ТАQ-полимеразу (Evrogen, Россия). Синтетические праймеры для проведения ПЦР и точечного мутагенеза заказывали в компании (Евроген, Россия). Для экспрессии рекомбинантной *tpTcDH* использовали рестриктазы NcoI и EcoRI (Thermo Fisher Scientific, США), вектор для клонирования pET-22b (Novagen, Германия) и штамм компетентных клеток *E. coli* BL21Star (DE3) (Stratagene, США). Для экспрессии рекомбинантной *pmTcDH* с His₆-тагом и сайтом расщепления TEV-протеазы на N-конце использовали рестриктазы NdeI и HindIII (Thermo Fisher Scientific, США), вектор для клонирования pET-21D (Novagen, Германия) и штамм компетентных клеток *E. coli* Origami (DE3) (Stratagene, США). Для экспрессии рекомбинантной *pmTcDH* с SUMO и сайтом расщепления SUMO-протеазы на N-конце использовали рестриктазы KpnI и HindIII (Thermo Fisher Scientific, США), вектор для клонирования pETSUK2 (Novagen, Германия) и штамм компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3)+pGro7 (Stratagene, США).

Для приготовления сред культивирования клеток *E. coli* использовали дрожжевой экстракт (Angel Yeast, Китай), триптон (Cell Culture, Швейцария) и хлорид натрия (Химмед, Россия). Для наработки белков в экспрессионном штамме использовали ампицилин (Хеликон, Россия), хлорамфеникол (Хеликон, Россия), IPTG (Thermo Fisher Scientific, США) и арабинозу (Acros Organics, Бельгия).

Для выделения и очистки рекомбинантных препаратов *tpTcDH* и *pmTcDH* использовали TRIS (Sigma-Aldrich, США), MOPS (VWR, США), хлорид натрия (Carl Roth, Германия), имидазол (Acros Organics, Бельгия), борную кислоту (Sigma-Aldrich, США), гидроксид натрия (Panreac AppliChem, Испания), концентрированную соляную кислоту (Panreac AppliChem, Испания), PMSF (Panreac AppliChem, Испания), хлорид магния (Sigma-Aldrich, США), ДНКазу (Thermo Fisher Scientific, США), β-МЭ (Acros Organics, Бельгия), ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), ДТТ (Sigma-Aldrich, США), TEV-протеазу и SUMO-протеазу. Для активации препаратов использовали хлорид меди (Sigma-Aldrich, США) и аскорбат натрия (Sigma-Aldrich, США).

Для проведения денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) использовали глицин (Merck, Германия), акриламид (Acros Organics, Бельгия), метиленбисакриламид (Sigma-Aldrich, США), SDS (Panreac AppliChem, Испания), персульфат аммония (Panreac AppliChem, Испания), TEMED (Servicebio, Китай), бромфеноловый синий

(Sigma-Aldrich, США), глицерин (Panreac AppliChem, Испания), Coomassie G250 (Sigma-Aldrich, США).

В качестве белков стандартов для электрофореза использовали маркеры молекулярных масс Pierce prestained Protein MW marker (Thermo Fisher Scientific, США). Для калибровки гель-фильтрационной колонки использовали набор белков-стандартов Gel Filtration Calibration kit (Amersham Biosciences, США).

Для измерения ферментативной тиоцианатдегидрогеназной активности использовали тиоцианат калия (Acros Organics, Бельгия), цитохром c_{550} из сердца лошади (Sigma-Aldrich, США), гексацианоферрат калия (Sigma-Aldrich, США). В работе использовали также селеноцианат калия (Sigma-Aldrich, США), тиомочевину (Реахим, Россия) для изучения свойств комплексов фермента с ингибиторами.

Для кристаллизации препаратов с помощью кристаллизационного робота использовали коммерческие наборы растворов Salt Rx, Peg Rx, Peg Ion, Crystal Screen и Index (Hampton research, США). Для оптимизации условий кристаллизации препаратов использовали HEPES (Sigma-Aldrich, США), BIS-TRIS (Sigma-Aldrich, США), формиат натрия (Fluka, Германия), трех-замещенный цитрат натрия (Sigma-Aldrich, США), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Acros Organics, Бельгия), Li_2SO_4 (Sigma-Aldrich, США), ПЭГ 3350 (Sigma-Aldrich, США), ПЭГ 8000 (Sigma-Aldrich, США). В качестве криопротектирующих агентов использовали глицерин (Sigma-Aldrich, США), этиленгликоль (Hampton research, США) и ПЭГ400 (Molecular dimensions limited, Великобритания).

2.2. Получение рекомбинантных препаратов *tpTcDH* и *pmTcDH*

2.2.1. Получение генно-инженерных конструкций *tpTcDH* и *pmTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами

Процедура получения генетических конструкций *tpTcDH* и *pmTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами, а также штаммов-продуцентов рассмотрена подробно в [61]. Для *tpTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами была получена одна конструкция с His₆-тагом и сайтом расщепления TEV-протеазы на N-конце. Для *pmTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами были получены две конструкции. Первая конструкция *pmTcDH* содержала His₆-таг и сайт расщепления TEV-протеазы на N-конце и была использована для рентгеноструктурных экспериментов. Вторая конструкция *pmTcDH* содержала последовательность SUMO и сайт расщепления SUMO-протеазы на N-конце и была использована для спектроскопии ЭПР.

Автор выражает благодарность с.н.с., к.х.н. Ракитиной Татьяне Владимировне ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и м.н.с. Комолову Александра Сергеевича НИЦ «Курчатовский институт», н.с., к.х.н. Дергоусовой Наталье Ивановне и м.н.с. Шипкову Николаю Сергеевичу ФИЦ Биотехнологии РАН за проведение молекулярно-биологических экспериментов.

2.2.2. Экспрессия *tpTcDH* и *pmTcDH* в клетках *E. coli*

Экспрессию *tpTcDH* и *pmTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами проводили в штаммах *E. coli* BL21Star (DE3) и Origami (DE3) в конструкции с сайтом узнавания TEV-протеазы, *pmTcDH* «дикого типа» для спектроскопии ЭПР – BL21(DE3)+pGro7 в конструкции с SUMO. Культуру клеток выращивали в среде LB, содержащей ампициллин и хлорамфеникол, при 37 °С до тех пор, пока значение оптической плотности культуры при 600 нм не достигало 0.7. В первых двух штаммах экспрессию белка индуцировали добавлением 0.2 мМ IPTG, в последнем – 0.2 мМ IPTG и 20% арабинозы. Культуру инкубировали при 25 °С в течение 12 часов.

2.2.3. Выделение и очистка *tpTcDH* и *pmTcDH*

Клетки осаждали центрифугированием при 4 °С и 5000 g в течение 20 минут на центрифуге CR22N (Hitachi, Япония). Осадок клеток ресуспендировали в 4-кратном объеме буферного раствора 50 мМ TRIS-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ β-МЭ, 1 мкг/мл ДНКазы. Далее клетки разрушали на льду воздействием ультразвука при помощи источника ультразвуковых волн Vibra-Cell VCX130 (Sonic and materials, США). После обработки полученную суспензию центрифугировали при 20000 g и 4 °С в течение 30 минут при помощи центрифуги Allegra 64R (Beckman Coulter, США). Супернатант фильтровали последовательно через 1-мкм стеклянный фильтр (GVS Filter Technology, США) и 0.22-мкм фильтр с PES-мембраной (GVS Filter Technology, США). После фильтрации супернатант наносили на металло-аффинную колонку Ni-NTA (Qiagen, Германия), уравновешенную 50 мМ TRIS-HCl, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазолом. Фракции целевого белка элюировали линейным градиентом буферного раствора 50 мМ TRIS-HCl, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазола. Объединённые фракции целевого белка инкубировали с TEV-протеазой в присутствии 1 мМ ЭДТА при 25 °С в течение 2 часов для удаления гистидинового тага и переводили в буферный раствор 50 мМ TRIS-HCl, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазолом посредством диализа против 1 л раствора при 4 °С. Для очистки от TEV-протеазы целевой белок повторно наносили на металло-аффинную

колонку. На последнем этапе очистки фракции *tpTcDH* и *pmTcDH* концентрировали до 10 мг/мл и наносили на гель-фильтрационную колонку Superdex 200 10/300 GL (Cytiva, США), уравновешенную 25 мМ боратным буфером, pH 9.5, 150 мМ NaCl и 25 мМ MOPS, pH 7.5, 150 мМ NaCl, соответственно.

Все этапы процедуры выделения и очистки *pmTcDH* в конструкции с SUMO, за исключением стадии инкубации с протеазой для удаления тага, идентичны процедуре выделения и очистки *pmTcDH* в конструкции с сайтом расщепления TEV-протеазы. После первой металло-аффинной хроматографии объединённые фракции целевого белка инкубировали с SUMO-протеазой в присутствии 1 мМ ДТТ при 25 °С в течение 2 часов для отщепления SUMO от *pmTcDH* и переводили в буферный раствор 50 мМ TRIS-HCl, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазолом посредством диализа против 1 л раствора при 4 °С.

2.3. Аналитические методы характеристики *tpTcDH* и *pmTcDH*

2.3.1. Определение концентрации белка

Концентрацию белка в образцах после первой и второй стадий металло-аффинной хроматографии определяли методом Бредфорда [196] с использованием БСА в качестве стандарта. Концентрацию белка после заключительной стадии гель-фильтрации в объединённых фракциях определяли спектрофотометрически при длине волны 205 нм с коэффициентом экстинкции $\epsilon_{205} = 31$ мл/мг. Все измерения проводили на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (Agilent, США).

2.3.2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ

Чистоту и гомогенность образцов после процедуры очистки оценивали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ в присутствии SDS с использованием 5% концентрирующего и 12.5% разделяющего гелей. В качестве буферного раствора для образцов использовали 2-кратный раствор 125 мМ TRIS-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 20% глицерина, 20% β -МЭ, 0.02% бромфенолового синего. Пробы готовили следующим образом: к раствору белка добавляли 2-кратный буферный раствор для образцов, перемешивали и выдерживали в течение 5 минут при температуре 95 °С. Электрофорез проводили в электрофоретической ячейке Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием в качестве источника постоянного тока PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories). Напряжение составляло 180 В. Полосы белков окрашивали в геле раствором Кумасси R-250.

2.3.3. Определение содержания меди в образцах

Содержание ионов меди образцах фермента определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) на спектрометре ICP Bruker Aurora M90 (Bruker, США). Автор выражает благодарность за проведение измерений сотруднику Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН с.н.с., к.х.н. Жилову Валерию Ивановичу.

2.4. Активация *tpTcDH* и *pmTcDH* ионами меди

2.4.1. Активация *tpTcDH* и *pmTcDH* для спектроскопии ЭПП

Образцы *tpTcDH* и *pmTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами активировали добавлением пятикратного мольного избытка CuCl_2 в присутствии пятикратного избытка аскорбата натрия. Избыток ионов меди из образцов *tpTcDH* и *pmTcDH* удаляли диализом при 4 °C против 25 мМ бората, pH 9.5, 150 мМ NaCl и 25 мМ MOPS, pH 7.5, 150 мМ NaCl, соответственно.

2.4.2. Активация препаратов *tpTcDH* и *pmTcDH* для кристаллизации

Образцы *tpTcDH* с точечными заменами активировали трехкратным мольным избытком CuCl_2 . Образцы *pmTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами активировали десятикратным мольным избытком CuCl_2 . Избыток ионов меди перед кристаллизацией не удаляли.

2.5. Определение ферментативной активности

Ферментативную активность образцов *tpTcDH* и *pmTcDH* определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (Agilent, США) при 30 °C, используя в качестве акцепторов электронов цитохром c_{550} из сердца лошади с коэффициентом экстинкции $\epsilon_{550} = 22.4 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ или $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ с коэффициентом экстинкции $\epsilon_{420} = 1.04 \text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Реакционная смесь состояла из 25 мМ бората, pH 9.5, 6 мМ KSCN и 50 мкМ цитохрома c_{550} или 10 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Реакцию начинали внесением 10 нМ или 150 нМ *tpTcDH* и *pmTcDH*, соответственно.

2.6. Спектроскопия ЭПР в X-диапазоне

2.6.1. Параметры съемки спектров ЭПР

Измерения спектров ЭПР в X-диапазоне (частота МИ ~ 9.5 ГГц) исследуемых образцов проводили на спектрометре Elexys-E680X (Bruker, США) при температуре 20 К, поддерживаемой термоблоком (Oxford instruments, Великобритания). Образцы исследуемых белков вносили в ампулы в объеме 50 мкл с помощью шприца (Hamilton, США) и замораживали в резонаторе при температуре 80 К. Параметры измерения спектра ЭПР были следующими: мощность МИ составляла 0.02 мВт (аттенюация 20 дБ), амплитуда модуляции составляла 5 Гс

Автор выражает благодарность в.н.с., к.х.н. Ефимову Николаю Николаевичу и с.н.с., к.х.н. Ротову Александру Викторовичу Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН за измерение спектров ЭПР в X-диапазоне.

2.6.2. Определение количества ионов меди по интегральной интенсивности

Для определения количества парамагнитных центров в образцах исследуемых белков была построена калибровочная зависимость интегральной интенсивности спектров ЭПР от количества ионов меди с использованием стандартного раствора CuCl_2 в DMSO с концентрациями 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 и 1.75 мМ (Рис. 18а, б). Интегральную интенсивность для стандартных растворов и исследуемых образцов с вычетом базовой линии пустой ампулы рассчитывали в OriginPro версия SR1 b9.5.1.195 (OriginLab Corporation, США), дважды интегрируя интенсивность исходных спектров ЭПР.

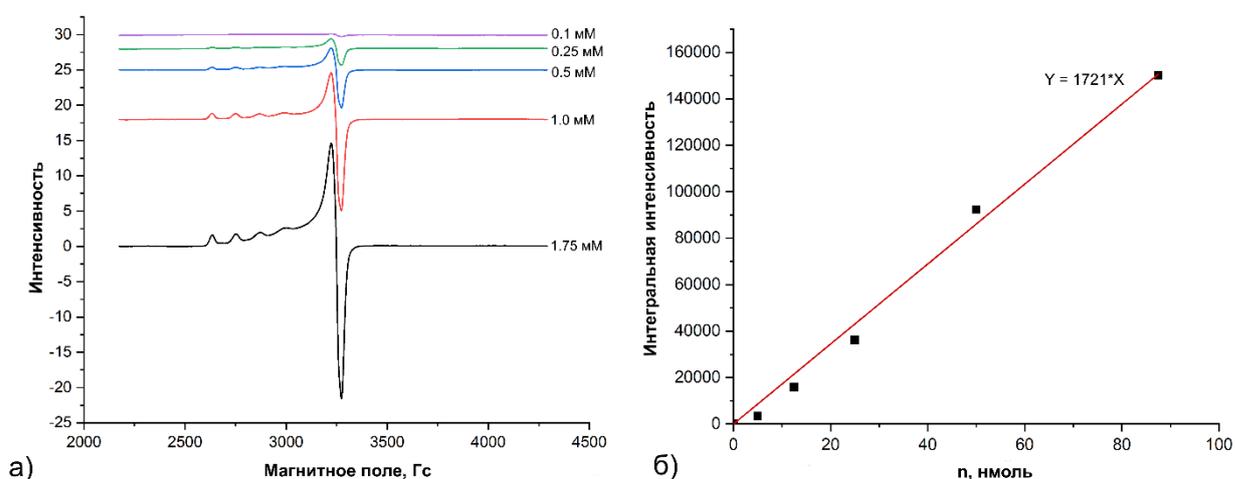


Рис. 18. Спектры ЭПР стандартного раствора CuCl_2 в DMSO с концентрацией 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 и 1.75 мМ (а). Калибровочная зависимость интегральной интенсивности спектров ЭПР от количества вещества ионов меди Cu^{2+} в стандартных растворах (б).

2.6.3. Расчет теоретических спектров ЭПР и параметров медных центров в образцах

Экспериментальные спектры ЭПР описывали ромбическим приближением спинового гамильтониана, учитывающим зеемановские взаимодействия и сверхтонкие взаимодействия (СТВ) с ядерным спином меди для спектра свободной формы *pmTcDH* «дикого типа» и еще дополнительные сверхтонкие взаимодействия с ядерными спинами трех атомов азота для комплекса *pmTcDH* с 1 мМ SeCN. Теоретические спектры рассчитывали при помощи программы, описанной в [197].

Автор выражает благодарность с.н.с., к.х.н. Уголкиной Елене Александровне Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН за расчет теоретических спектров ЭПР в X-диапазоне.

2.7. Кристаллизация методом диффузии паров

2.7.1. Автоматизированный поиск условий кристаллизации с помощью кристаллизационного робота

Первичный поиск условий кристаллизации образцов *tpTcDH* с точечными заменами T169A, K281A и (K264A, K267A) осуществляли с помощью кристаллизационного робота Rigaku (Япония) в НИЦ «Курчатовский институт». Первичный поиск условий кристаллизации образца *tpTcDH* с точечной заменой F436Q и *pmTcDH* «дикого типа» осуществляли с помощью кристаллизационного робота Oryx4 (Douglas Instruments, Великобритания) в 96-луночных планшетах (Art Robbins Instruments, США) методом диффузии паров в «сидячей капле». Для *pmTcDH* с точечной заменой H447Q автоматизированный поиск условий кристаллизации не проводился и образец кристаллизовали в условиях кристаллизации фермента «дикого типа». Концентрация белка в препаратах составляла 10 мг/мл. Образцы *tpTcDH* и *pmTcDH* находились в 25 мМ боратном буфере, pH 9.5, 150 мМ NaCl или в 25 мМ MOPS, pH7.5, 150 мМ NaCl, соответственно.

Авто выражает благодарность Николаевой Алене Юрьевне НИЦ «Курчатовский институт» за поиск условий кристаллизации образцов *tpTcDH* T169A, K281A и (K264A, K267A).

2.7.2. Оптимизация условий кристаллизации

Оптимизацию найденных условий кристаллизации образцов *tpTcDH* и *pmTcDH* с целью получения крупных кристаллов осуществляли методом диффузии паров в «висячей капле» в 24-луночных планшетах VDX (Hampton research, США), варьируя концентрацию

солей или ПЭГ. Условия кристаллизации, где были получены хорошо дифрагирующие кристаллы *tpTcDH* и *pmTcDH* и для которых были собраны наборы дифракционных данных, приведены в **таблице 3**.

*2.7.3. Настаивание кристаллов свободной формы *pmTcDH* с ингибиторами*

Структуры комплексов *pmTcDH* «дикого типа» с ингибиторами тиомочевинной и селеноцианатом получали методом настаивания кристаллов. Кристаллы помещали в кристаллизационный раствор, содержащий 100 мМ тиомочевины или 5 мМ селеноцианата, на 1 минуту и 24 часа, соответственно.

*2.7.4. Настаивание кристаллов апоформы *pmTcDH* ионами меди*

Для восстановления трехъядерного медного центра апоформы *pmTcDH* «дикого типа» кристаллы апо-фермента помещали в кристаллизационный раствор, содержащий 1 мМ CuCl_2 или 1 мМ CuCl_2 в присутствии 1 мМ аскорбата натрия, на 24 часа и 12 часов, соответственно.

2.8. Рентгеноструктурный анализ

2.8.1. Сбор и обработка дифракционных данных

Перед сбором дифракционных данных кристаллы исследуемых белков переносили на 5-10 секунд в раствор, содержащий в качестве криопротектирующего агента 20% глицерина или этиленгликоля. Дифракционные данные собирали при температуре 100 К. Длина волны, источник излучения и детектор для всех наборов данных *tpTcDH* и *pmTcDH* указаны в **таблице 3**. Обработку дифракционных данных проводили с помощью программ XDS и XSCALE [198], или DIALS и AIMLESS [199, 200], или CrysAlis^{Pro} 1.0.43 (Rigaku, Япония). Наборы для всех структур были обработаны с учетом равенства фриделевских пар $\mathbf{F}(h, k, l) = \mathbf{F}(-h, -k, -l)$, за исключением набора комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом, где учитывался вклад аномального рассеяния атома селена. Кристаллографические расчеты осуществляли с помощью пакета программ CCP4 [200]. Статистика сбора данных представлена в **таблице 3**.

2.8.2. Решение и уточнение структур

Все структуры решали методом молекулярного замещения с помощью программы MOLREP [201]. Для решения структур *tpTcDH* с точечными заменами T169A, K281A и F436Q тетрамер *tpTcDH* «дикого типа» (PDB ID: 5OEX) был использован в качестве стартовой модели. Для решения структуры свободной формы *pmTcDH* «дикого типа»

димер *tpTcDH* (PDB ID: 5OEX) был использован в качестве стартовой модели. Для решения остальных структур комплекса *pmTcDH* с ингибиторами и *pmTcDH* с точечными заменами димер свободной формы *pmTcDH* был использован в качестве стартовой модели.

Уточнение моделей *tpTcDH* и *pmTcDH* проводили в программе REFMAC5 [39]. После каждых десяти циклов уточнения модели корректировали в ручном режиме в графической программе COOT [202], исследуя рассчитанные ($2Fo-Fc$) и разностную карты электронной плотности. Для структуры комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом была также рассчитана аномальная карта электронной плотности. Для структур *tpTcDH* с точечными заменами T169A и F436Q на заключительных этапах уточнения учитывали возможность двойникования. Для структур с разрешением не выше 1.30 Å тепловой B-фактор для атомов ионов меди с заселенностью 0.4 и больше уточняли анизотропно, в остальных случаях – изотропно. Для структур с атомным разрешением тепловой B-фактор уточняли анизотропно для всех неводородных атомов на финальных циклах уточнения, а атомы водородов в фиксированной позиции уточняли с изотропным B-фактором. Статистика уточнения моделей представлена в **таблице 3**.

2.8.3. Анализ пространственных структур

Визуальный анализ структур осуществляли при помощи программ COOT [202] и Rmол версия 4.6.0 (Schrodinger, США). Совмещение структур по элементам вторичной структуры или заданным участкам полипептидной цепи проводили при помощи программы LSQKAB [203]. Анализ межмолекулярных контактов и оценку площадей и свободной энергии формирования интерфейсов в белковых комплексах осуществляли с помощью программы PDBePISA [190].

Таблица 3. Статистика сбора данных и уточнения структур *tpTcDH* и *pmTcDH*.

| | <i>tpTcDH</i> T169A | <i>tpTcDH</i> K281A | <i>tpTcDH</i> F436Q |
|----------------------------------|--|--|--|
| Условия кристаллизации | 0.2 М (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 М Bis-Tris, pH 5.5, 25% ПЭГ 3350 | 0.5 М (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 М цитрат натрия трех-замещенный, pH 5.6, 0.7 М Li ₂ SO ₄ | 0.7 М D, L-яблочная к-та, pH 7.0, 20% ПЭГ 3350 |
| Сбор данных | | | |
| Станция | РСА-Белок, КИСИ | BL41XU, SPring-8 (Япония) | ID30A-3, ESRF (Гренобль, Франция) |
| Детектор | MarCCD 165 | Eiger 16M | Eiger X 4M |
| Длина волны, Å | 0.7931 | 1.0000 | 0.9677 |
| Температура, К | 100 | 100 | 100 |
| Пространственная группа | <i>P</i> ₂ ₁ | <i>P</i> ₂ ₁ | <i>P</i> ₂ ₁ |
| a, b, c, Å | 90.81, 162.24, 90.76 | 98.15, 142.42, 294.40 | 90.56, 162.12, 90.86 |
| β, ° | 119.74 | 90.07 | 119.80 |
| Разрешение, Å | 81.12–1.80 (1.85–1.80) | 49.12–2.07 (2.10–2.07) | 81.06–2.00 (2.03–2.00) |
| Полнота данных, % | 98.8 (94.4) | 98.8 (99.8) | 93.9 (95.4) |
| Число независимых рефлексов | 208077 (14719) | 485243 (20586) | |
| Повторяемость | 6.75 (6.32) | 2.92 (2.96) | 4.3 (4.3) |
| I/σ(I) | 6.57 (1.70) | 6.91 (1.52) | 7.3 (2.6) |
| R _{meas} , % | 27.3 (129.0) | 15.3 (99.3) | 13.4 (53.4) |
| CC _{1/2} , % | 98.7 (72.0) | 99.1 (40.8) | 99.2 (83.7) |
| Уточнение | | | |
| R _{cryst} , % | 18.6 | 17.9 | 17.4 |
| R _{free} , % | 25.4 | 23.4 | 21.4 |
| Степень двойникования | 0.56/0.44 | 1.0 | |
| Cruickshank DPI | 0.024 | 0.199 | 0.034 |
| ML position error, Å | 0.078 | 0.153 | 0.080 |
| Среднеквадратичные отклонения | | | |
| Длины связей, Å | 0.018 | 0.018 | 0.017 |
| Валентные углы, ° | 3.000 | 2.816 | 2.290 |
| Число неводородных атомов | | | |
| Белок | 14547 | 57915 | 14514 |
| Ионы меди | 8 | 32 | 8 |
| Другие | | | 14 |
| Растворитель | 743 | 2419 | 422 |
| Общий средний В-фактор | | | |
| Средний В-фактор по белку | 18.9 | 27.9 | 22.5 |
| Средний В-фактор по растворителю | 19.8 | 27.3 | 19.3 |
| Код PDB | 8P3L | 8P3M | 8BPN |

Таблица 3. Продолжение.

| | <i>рт</i> ТсДН «дикий тип» свободная форма | <i>рт</i> ТсДН «дикий тип» в комплексе с тиомочевинной | <i>рт</i> ТсДН «дикий тип» в комплексе с селеноцианатом |
|----------------------------------|--|--|---|
| Условия кристаллизации | 0.2 М формиата натрия, 20% ПЭГ 3350 | 0.2 М формиата натрия, 20% ПЭГ 3350 | 0.2 М формиата натрия, 20% ПЭГ 3350 |
| Сбор данных | | | |
| Станция | BL41XU, SPring-8 (Япония) | BL41XU, SPring-8 (Япония) | ID30A-3, ESRF (Гренобль, Франция) |
| Детектор | Eiger 16M | Eiger 16M | Eiger X 4M |
| Длина волны, Å | 0.70 | 0.70 | 0.9677 |
| Температура, К | 100 | 100 | 100 |
| Пространственная группа | $P2_12_12_1$ | $P2_12_12_1$ | $P2_12_12_1$ |
| a, b, c, Å | 66.84, 96.57, 147.45 | 66.71, 96.67, 147.53 | 67.03, 96.67, 147.25 |
| β , ° | | | |
| Разрешение, Å | 50.00-1.05 (1.10-1.05) | 50.00-1.10 (1.15-1.10) | 50.00-1.80 (1.85-1.80) |
| Полнота данных, % | 99.9 (99.9) | 93.0 (95.3) | 96.5 (97.5) |
| Повторяемость | 6.8 | 2.8 | 4.3 |
| I/ σ (I) | 14.2 (2.5) | 17.5 (3.0) | 12.2 (1.6) |
| R _{meas} , % | 6.4 (87.5) | 3.0 (39.5) | 8.7 (113.0) |
| CC _{1/2} , % | 99.9 (77.5) | 100.0 (85.4) | 99.6 (75.8) |
| Уточнение | | | |
| R _{cryst} , % | 10.9 | 10.7 | 18.9 |
| R _{free} , % | 12.6 | 12.4 | 23.5 |
| Степень двойникования | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Cruickshank DPI | 0.019 | 0.022 | 0.142 |
| ML position error, Å | 0.013 | 0.016 | 0.094 |
| Среднеквадратичные отклонения | | | |
| Длины связей, Å | 0.015 | 0.018 | 0.015 |
| Валентные углы, ° | 1.860 | 1.956 | 2.256 |
| Число неводородных атомов | | | |
| Белок | 14385 | 14522 | 7254 |
| Ионы меди | 7 | 7 | 7 |
| Другие | 38 | 28 | 11 |
| Растворитель | 1319 | 1285 | 850 |
| Общий средний B-фактор | | | |
| Средний B-фактор по белку | 13.7 | 15.4 | 20.5 |
| Средний B-фактор по растворителю | 24.8 | 29.3 | 28.5 |
| Код PDB | 8Q9X | 8Q9Y | 8YOU |

Таблица 3. Продолжение.

| | <i>pm</i> TcDH «дикий тип» апоформа | Неактивированная <i>pm</i> TcDH H447Q | Активированная <i>pm</i> TcDH H447Q |
|----------------------------------|---|---|---|
| Условия кристаллизации | 0.1 М HEPES, pH 7.5, 8% этиленгликоля, 20% ПЭГ 8000 | 0.1 М HEPES, pH 7.5, 8% этиленгликоля, 20% ПЭГ 8000 | 0.1 М HEPES, pH 7.5, 8% этиленгликоля, 20% ПЭГ 8000 |
| Сбор данных | | | |
| Станция | BL17UM, SSRF (Китай) | BL17UM, SSRF (Китай) | BL17UM, SSRF (Китай) |
| Детектор | Eiger2 X 16M | Eiger2 X 16M | Eiger2 X 16M |
| Длина волны, Å | 0.9792 | 0.9792 | 0.9792 |
| Температура, К | 100 | 100 | 100 |
| Пространственная группа | <i>C</i> 222 ₁ | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ |
| a, b, c, Å | 98.29, 102.18, 277.16 | 66.77, 96.44, 147.67 | 66.76, 96.30, 148.76 |
| β, ° | | | |
| Разрешение, Å | 50.00-1.45 (1.50-1.45) | 50.00-1.45 (1.50-1.45) | 50.00-1.55 (1.60-1.55) |
| Полнота данных, % | 99.5 (98.8) | 97.6 (96.2) | 99.5 (99.2) |
| Повторяемость | 13.1 | 6.7 | 6.5 |
| I/σ(I) | 20.3 (2.6) | 19.0 (3.8) | 13.3 (2.0) |
| R _{meas} , % | 7.1 (105.5) | 6.6 (60.9) | 13.7 (201.8) |
| CC _{1/2} , % | 99.9 (82.8) | 99.9 (86.5) | 99.8 (50.3) |
| Уточнение | | | |
| R _{cryst} , % | 16.7 | 15.0 | 16.4 |
| R _{free} , % | 19.6 | 17.3 | 19.5 |
| Степень двойникования | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Cruickshank DPI | 0.064 | 0.058 | 0.076 |
| ML position error, Å | 0.046 | 0.035 | 0.055 |
| Среднеквадратичные отклонения | | | |
| Длины связей, Å | 0.016 | 0.014 | 0.015 |
| Валентные углы, ° | 2.263 | 2.018 | 2.068 |
| Число неводородных атомов | | | |
| Белок | 10914 | 7365 | 7292 |
| Ионы меди | 3 | 5 | 8 |
| Другие | 49 | 30 | 17 |
| Растворитель | 1315 | 1044 | 992 |
| Общий средний B-фактор | | | |
| Средний B-фактор по белку | 19.1 | 14.8 | 18.6 |
| Средний B-фактор по растворителю | 28.1 | 25.4 | 27.5 |
| Код PDB | 8Z75 | 8YU5 | 8YU6 |

Таблица 3. Продолжение.

| | активированная <i>pmTcDH</i> ^{Cu+1} «дикий тип» | неактивированная <i>pmTcDH</i> ^{Cu+2} «дикий тип» |
|----------------------------------|--|--|
| Условия кристаллизации | 0.1 М HEPES, pH 7.5, 8% этиленгликоля, 20% ПЭГ 8000 | 0.1 М HEPES, pH 7.5, 8% этиленгликоля, 20% ПЭГ 8000 |
| Сбор данных | | |
| Станция | XtaLAB Synergy-S Rigaku (ИОХ) | BL17UM, SSRF (Китай) |
| Детектор | HyPix 6000E | Eiger2 X 16M |
| Длина волны, Å | 1.5418 | 0.9792 |
| Температура, К | 100 | 100 |
| Пространственная группа | <i>C</i> 222 ₁ | <i>C</i> 222 ₁ |
| a, b, c, Å | 98.09 101.99 276.80 | 97.80 101.75 276.35 |
| β, ° | | |
| Разрешение, Å | 27.71-2.00 (2.03-2.00) | 50.00-1.80 (1.85-1.80) |
| Полнота данных, % | 99.6 (96.5) | 98.8 (98.2) |
| Повторяемость | 13.0 | 6.7 |
| I/σ(I) | 14.2 (4.3) | 12.7 (2.0) |
| R _{meas} , % | 15.6 (58.9) | 11.0 (121.7) |
| CC _{1/2} , % | 99.7 (82.7) | 99.8 (67.9) |
| Уточнение | | |
| R _{cryst} , % | 17.5 | 17.0 |
| R _{free} , % | 22.4 | 22.0 |
| Степень двойникования | 1.0 | 1.0 |
| Cruickshank DPI | 0.185 | 0.125 |
| ML position error, Å | 0.118 | 0.096 |
| Среднеквадратичные отклонения | | |
| Длины связей, Å | 0.017 | 0.015 |
| Валентные углы, ° | 2.369 | 2.272 |
| Число неводородных атомов | | |
| Белок | 10858 | 10858 |
| Ионы меди | 9 | 9 |
| Другие | 4 | 17 |
| Растворитель | 612 | 699 |
| Общий средний B-фактор | | |
| Средний B-фактор по белку | 13.2 | 29.5 |
| Средний B-фактор по растворителю | 19.0 | 34.4 |
| Код PDB | 8Z77 | 8Z76 |

* В скобках приведены значения для данных высокого разрешения

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изменение дифракционных свойств кристаллов *tpTcDH* методом точечного мутагенеза

3.1.1. Анализ кристаллических контактов в кристаллах *tpTcDH*

Первый этап работы был посвящен улучшению качества кристаллов *tpTcDH* с использованием методов геной инженерии.

Кристаллы *tpTcDH* четырех депонированных структур (PDB ID: 6I3Q, 6G5M, 6G5O, 6UWE) из шести принадлежат к моноклинной пространственной группе $P2_1$ с приблизительно равными параметрами a и $c \sim 90.5 \text{ \AA}$ элементарной ячейки и углом моноклинности между ними $\beta \sim 120^\circ$. Такое соотношение параметров в низко симметричной группе, которое соответствует более высоко симметричной группе, приводит к возникновению псевдо-мероздрического двойникования кристаллов. В случае кристаллов *tpTcDH* наблюдается идеальное двойникование с долей каждого кристаллического домена около 0.5, что и при так невысоком разрешении структур ухудшает его, по оценкам, в ~ 1.26 раз [37].

Во всех структурах *tpTcDH* в независимой части элементарной ячейки обнаружен тетрамер фермента, который существует только в кристалле за счет симметричных контактов. В растворе, по данным гель-фильтрации, тетрамер не обнаружен. Тетрамер (на примере структуры PDB ID: 6I3Q) сформирован двумя симметричными димерами. Субъединицы в димере *tpTcDH* формируют прочные контакты за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий и ~ 30 водородных связей. По оценкам программы PISA, энергия сольватация при образовании димерного интерфейса *tpTcDH* ΔG^i и площадь поверхности взаимодействия составляют -37.0 ккал/моль и 2590 \AA^2 , соответственно. В свою очередь, тетрамер *tpTcDH* представляет собой менее прочный макромолекулярный комплекс. Электростатические взаимодействия и ~ 8 водородных связей связывают два димера в тетрамере фермента, при этом энергия сольватации при образовании интерфейса ΔG^i и площадь поверхности взаимодействия составляют -2.0 ккал/моль и $\sim 900 \text{ \AA}^2$, соответственно. Оба димера в тетрамере *tpTcDH* расположены в одной плоскости. В структуре тетрамера субъединицы можно разделить на внутренние и внешние, для которых значение r.m.s.d. (root mean square deviation – среднеквадратичное отклонение) при совмещении по всем C α -атомам составляет 0.3 \AA . Площадь интерфейса между внутренними субъединицами в тетрамере фермента оценивается как $\sim 400 \text{ \AA}^2$, а площадь интерфейса между внутренней и внешней субъединицами – как $\sim 244 \text{ \AA}^2$. Взаимодействия между боковыми группами пар аминокислотных остатков R274-E197 и K281-E175 (здесь и далее

в этом разделе нумерация приведена для *tpTcDH*) связывают две внутренние субъединицы (Рис. 19). В случае внутренней и внешней субъединиц образованию контактов способствуют электростатические взаимодействия между боковыми группами пар аминокислотных остатков E171-K264 и D172-K267 и водородные связи между атомами основной цепи пары аминокислотных остатков P268-E171 и между атомами основной цепи и гидроксильной группы пары T269-T169 (Рис. 19).

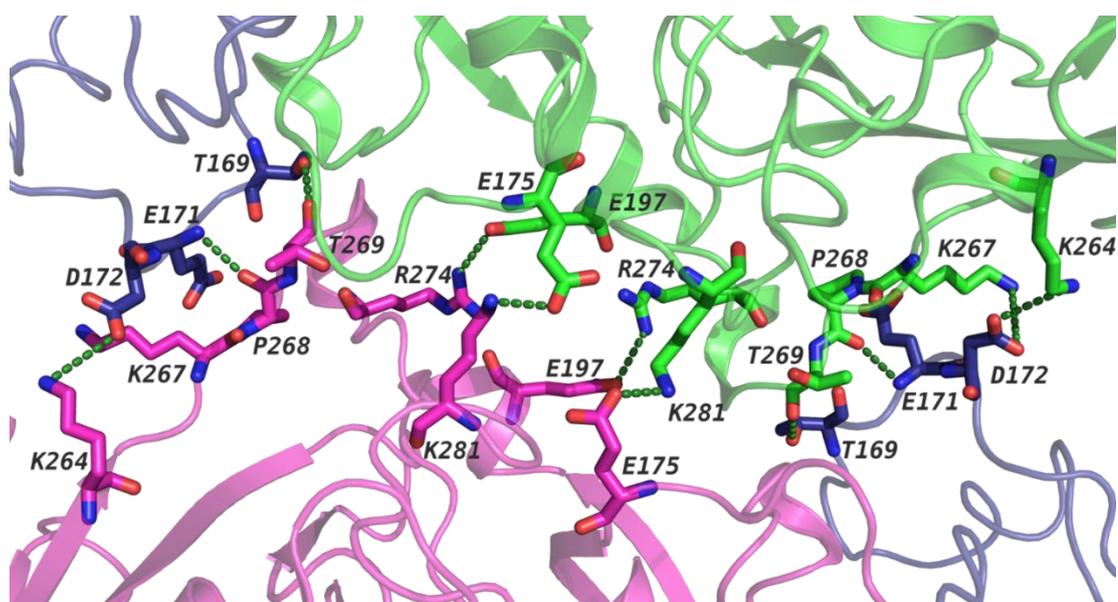


Рис. 19. Область контактов димеров в тетрамере *tpTcDH* «дикого типа» (PDB ID: 6I3Q). Внутренние субъединицы показаны розовым и зеленым цветом, внешние субъединицы – темно-фиолетовым цветом. Для внутренних субъединиц элементы вторичной структуры показаны в виде ленточной модели, для внешних субъединиц элементы вторичной структуры не показаны. Водородные связи и электростатические взаимодействия показаны зелеными пунктирными линиями.

Плоская структура тетрамера *tpTcDH* обуславливает слоистую упаковку молекул фермента в кристалле, что способствует возникновению двойникового кристаллов фермента и, как следствие, общему снижению качества дифракционных данных. Точечные замены аминокислотных остатков, вовлеченных в формирование интерфейса и образование контактов между димерами *tpTcDH* в тетрамере, могут привести к нарушению плоской структуры тетрамера, к изменению упаковки молекул в кристалле и к исчезновению возможности двойникового кристаллования. В качестве мишеней для точечного мутагенеза были выбраны аминокислотные остатки, у которых боковая группа участвует в формировании контактов между димерами в тетрамере, при этом эти аминокислотные остатки не участвуют во взаимодействиях, стабилизирующих правильную укладку субъединицы и димера. Аминокислотные остатки K281, T169, K264, K267 были выбраны в качестве мишеней для замены на аланина, боковая группа которого не может участвовать в такого рода взаимодействиях.

3.1.2. Получение рекомбинантных форм *tpTcDH* с точечными заменами поверхностных остатков

Три рекомбинантные формы *tpTcDH* с заменами T169A и K281A и двойной заменой (K264A, K267A) были выделены и охарактеризованы. Согласно данным гель-фильтрации, все три формы фермента находились в растворе в виде димера с молекулярной массой около 110 кДа (Рис. 20а-в). Все три формы *tpTcDH* также обладали тиоцианатдегидрогеназной активностью в реакции с цитохромом c_{550} в качестве акцептора электронов (Рис. 20г), значения которой были сравнимы с удельной активностью фермента «дикого типа» [61]. Таким образом, точечные замены поверхностных аминокислотных остатков не повлияли на общую укладку фермента и структуру активного центра.

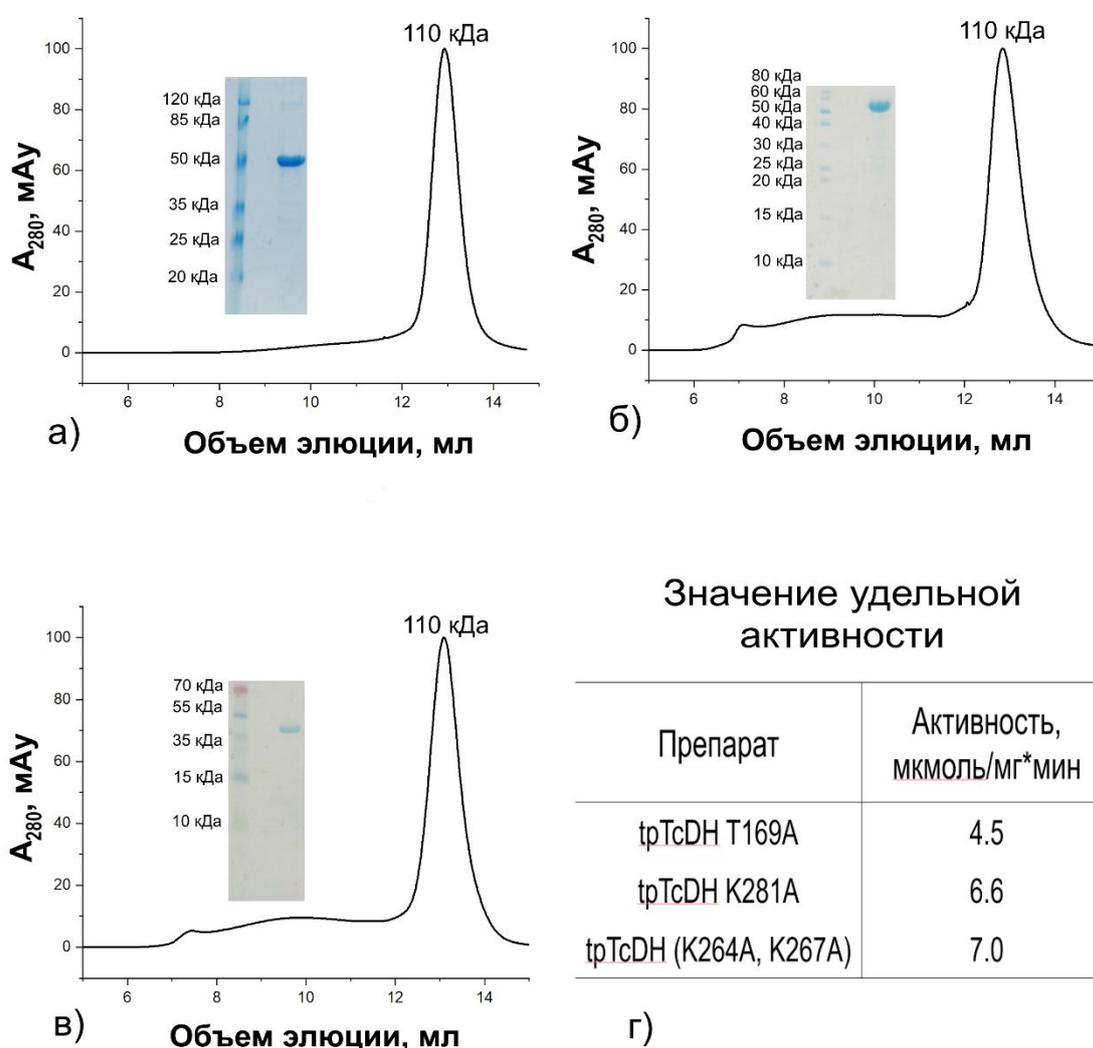


Рис. 20. Основной пик, соответствующий димеру, на профиле элюции рекомбинантных форм *tpTcDH* с заменами T169A (а), K281A (б) и (K264A, K267A) (в) на колонке Superdex 200 в 25 мМ боратном буфере, pH 9.5, 150 мМ NaCl и электрофореграммы препаратов на врезках соответствующих панелей. Значение удельной активности в реакции с 6 мМ тиоцианата и 50 мкМ цитохрома c_{550} рекомбинантных форм *tpTcDH* с заменами T169A, K281A и (K264A, K267A) (г).

После активации ионами меди, для каждой из трех рекомбинантных форм фермента подбирали условия кристаллизации методом диффузии паров. Кристаллы *tpTcDH* с двойной заменой (K264A, K267A) оказались неперспективными для рентгеноструктурных исследований, поскольку давали дифракционную картину с разрешением ~ 3 Å. Для рекомбинантных форм *tpTcDH* с заменами T169A и K281A были собраны наборы дифракционных данных с разрешением 1.80 и 2.07 Å, решены и уточнены структуры, депонированные в PDB с кодами 8P3L и 8P3M (**Таблица 3**).

3.1.3. Структура рекомбинантной формы *tpTcDH* с заменой T169A

Кристалл *tpTcDH* T169A принадлежал к моноклинной группе $P2_1$ с приблизительно равными параметрами **a** и **c** и углом моноклинности **β** около $\sim 120^\circ$ (**Таблица 3**). Как и все кристаллы *tpTcDH* с такой кристаллической модификацией, кристалл *tpTcDH* T169A представлял собой идеальный двойник с долей каждого кристаллического домена 0.56 и 0.44, что учитывали при уточнении структуры. В независимой части элементарной ячейки расположен один тетрамер *tpTcDH* T169A (**Рис. 21a**). Структуры тетрамера рекомбинантной формы с заменой и тетрамера фермента «дикого типа» (PDB ID: 6I3Q) идентичны (значение г.м.с.д. 0.2 Å при совмещении по всем C α -атомам). Невозможность образования водородной связи между карбонильным кислородом пептидной связи аминокислотного остатка T269 и боковой цепью аминокислотного остатка A169 не привела к изменению структуры тетрамера. Таким образом, водородная связь T169-T269 не является определяющим фактором в стабилизации структуры тетрамера фермента.

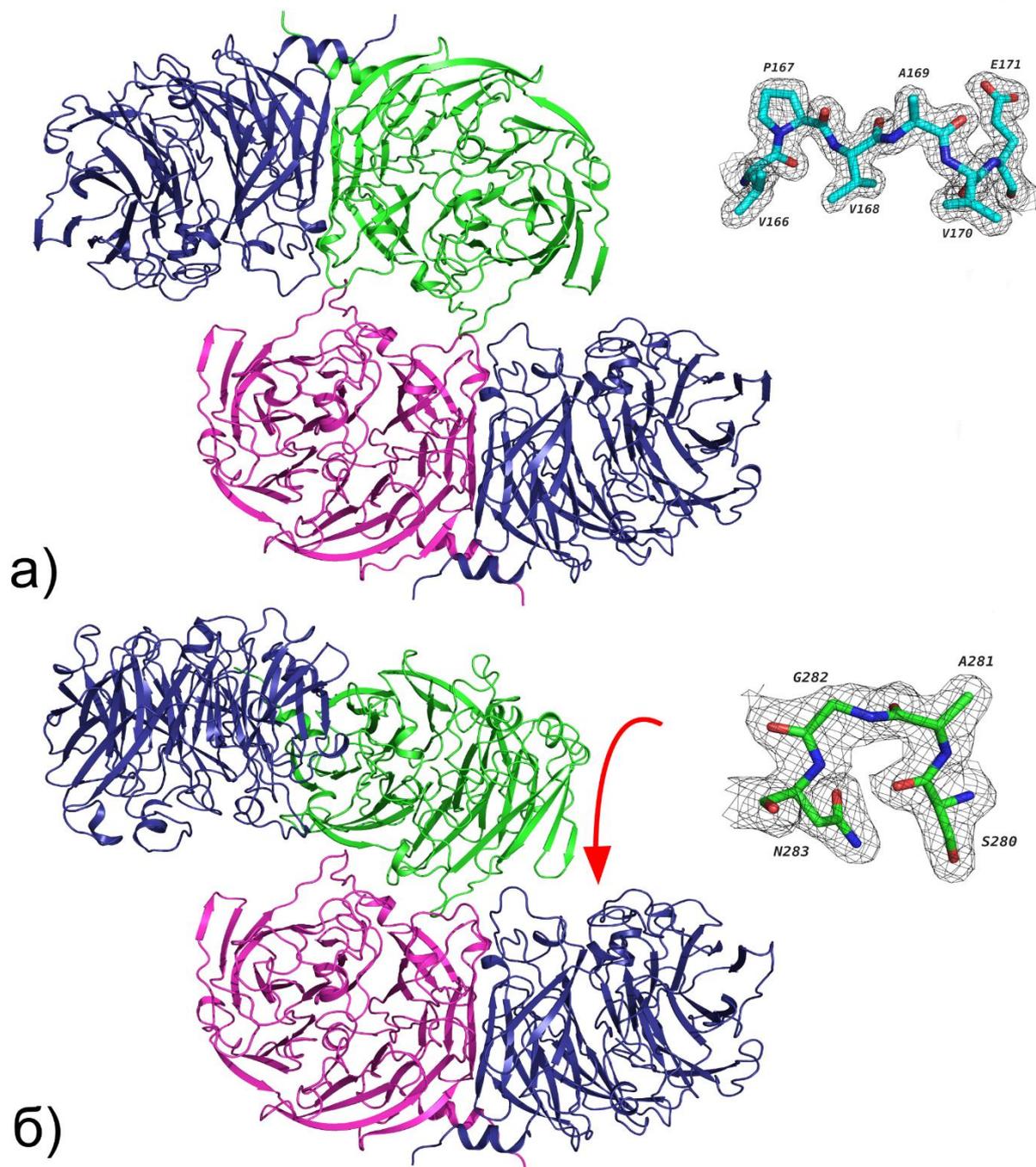


Рис. 21. Структура тетрамеров рекомбинантной формы *tpTcdH* с заменой T169A (а, PDB ID: 8P3L) и K281A (б, PDB ID: 8P3M). Структуры совмещены по всем Ca -атомам внутренней субъединицы нижнего димера. Внутренние субъединицы показаны розовым и зеленым цветом, внешние субъединицы – темно-фиолетовым цветом. Красная стрелка указывает направление, в котором один из димеров *tpTcdH* K281A отклонился от плоскости второго в тетрамере. На врезках представлены $2F_o - F_c$ карты электронной плотности на уровне срезы 1σ для замененных A169 (а) и A281 (б) и ближайших аминокислотных остатков.

В активном центре всех четырех субъединиц *tpTcdH* T169A обнаружены только два иона меди Cu1 и Cu2, а ион Cu3 отсутствует. Рекомбинантную форму с заменой активировали ионами меди Cu^{+2} без дополнительного настаивания кристаллов солью CuCl.

3.1.4. Структура рекомбинантной формы *tpTcDH* с заменой K281A

Дифракционные данные рекомбинантной формы *tpTcDH* K281A были проиндексированы в двух пространственных группах $P2_12_12_1$ и $P2_1$ с одинаковыми параметрами элементарной ячейки $\mathbf{a} = 98.08 \text{ \AA}$, $\mathbf{b} = 142.12 \text{ \AA}$ и $\mathbf{c} = 293.25 \text{ \AA}$ и углом $\beta = 90.07^\circ$ для моноклинной группы (Таблица 3). Моноклинная группа $P2_1$ была выбрана как правильная для кристалла фермента, поскольку при обработке в этой группе не нарушался закон погасания рефлексов, определялось положение всех полипептидных цепей при молекулярном замещении и структура уточнялась до лучших значений R_{cryst} и R_{free} (Таблица 3).

Независимая часть элементарной ячейки содержит восемь димеров *tpTcDH* K281A. Замена K281A не повлияла на правильность фолдинга субъединиц и устройство димеров фермента. Димеры рекомбинантного фермента с заменой K281A формируют тетрамер (Рис. 21б), однако, он отличается от тетрамеров фермента «дикого типа» и формы с заменой T169A. В тетрамере *tpTcDH* K281A субъединицы можно разделить также на внутренние и внешние. В отличие от тетрамеров других структур фермента, внешние субъединицы *tpTcDH* K281A не участвуют в образовании интерфейса тетрамера. Кроме того, поверхность взаимодействия между внутренними субъединицами изменилась: площадь поверхности взаимодействия составляет $\sim 370 \text{ \AA}^2$, а боковые группы A281 и E175 не вовлечены в образование интерфейса. Результатом нарушения взаимодействий между E175 и A281 стало искажение плоской структуры тетрамера. Димеры в составе тетрамера *tpTcDH* K281A повернуты примерно на 30° друг относительно друга по сравнению с плоским тетрамером фермента «дикого типа». Отклонение от планарности тетрамера способствовало альтернативной упаковке молекул в кристалле, не допускающей двойникования.

Ионы Cu1 и Cu2 обнаружены в активном центре всех шестнадцати субъединиц *tpTcDH* K281A, а ион Cu3 отсутствует, как и в большинстве установленных структур фермента. Несмотря на то, что благодаря произведенной замене удалось предотвратить двойникование кристаллов, качество дифракционных данных (разрешение 2.07 \AA и значение $R_{\text{free}} = 23.4\%$ уточненной модели, Таблица 3) по-прежнему недостаточно для изучения тонких деталей строения медного центра фермента.

3.2. Структура свободной холоформы *ptTcDH*

Генно-инженерный подход по улучшению качества кристаллов *tpTcDH* путем точечного мутагенеза поверхностных остатков не привел к положительному результату,

3.2.2. Общая структура *pmTcDH*

Рекомбинантный препарат *pmTcDH* был очищен до гомогенного состояния (**Рис. 23а**). Фермент представляет собой димер в растворе с массой около ~ 110 кДа, как и *tpTcDH*, согласно данным гель-фильтрации (**Рис. 23б**). Рекомбинантный препарат *pmTcDH* перед кристаллизацией был активирован 10-кратным мольным избытком ионов Cu^{2+} . Фермент связывает три иона меди из расчета на молекулу и также проявляет тиоцианатдегидрогеназную активность ~ 0.6 мкмоль/мг \times мин с цитохромом c_{550} и ферроцианидом в качестве акцепторов электронов, значение которой на порядок меньше удельной активности *tpTcDH*.

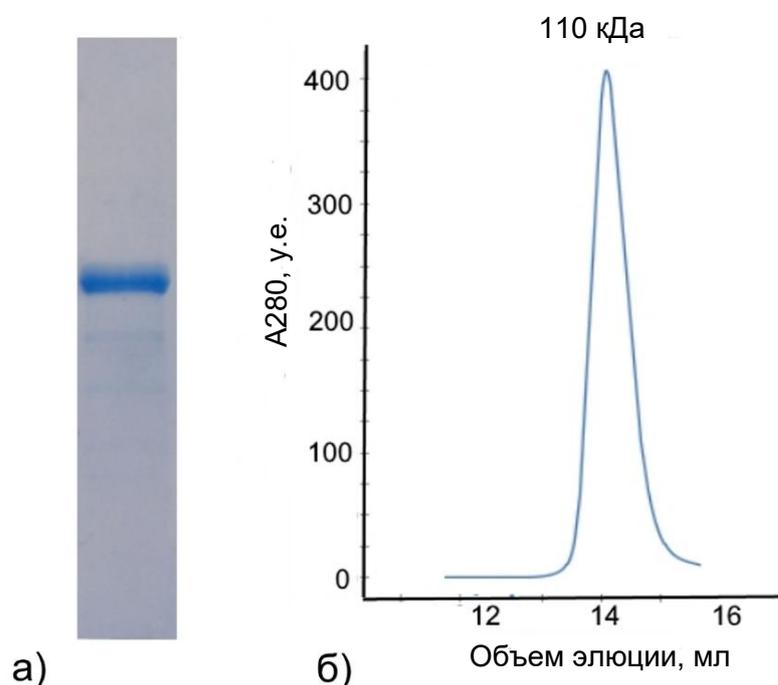


Рис. 23. Электрофореграмма рекомбинантного препарата *pmTcDH* после последнего этапа очистки (а). Основной пик на профиле элюции рекомбинантного препарата *pmTcDH* на колонке Superdex 200 в 25 mM MOPS, pH 7.5, 150 mM NaCl (б).

3.2.3. Общая структура *pmTcDH*

Кристаллы *pmTcDH* принадлежали к пространственной группе $P2_12_12_1$ и рассеивали рентгеновское излучение до разрешения 1.05 \AA (**Таблица 3**). В отличие от всех структур *tpTcDH*, один димер *pmTcDH* обнаружен в независимой части элементарной ячейки (**Рис. 24а**) и не образует тетрамерную структуру с симметричными молекулами. Ферменты заметно различаются поверхностным зарядом глобулы: *tpTcDH* содержит на поверхности много отрицательно заряженных аминокислотных остатков и обладает кислым значением $\text{pI} \sim 4.9$, а *pmTcDH*, наоборот, содержит больше положительно заряженных

аминокислотных остатков и обладает слабо щелочным значением $pI \sim 7.8$. Другой заряд глобулы и аминокислотные замены на поверхности, вероятно, препятствуют образованию тетрамера и обуславливают другую упаковку молекул *pmTcDH* в кристалле.

Строение субъединицы *pmTcDH* аналогично строению субъединицы *tpTcDH*: полипептидная цепь фермента принимает укладку по типу семилопастного β -пропеллера, сформированного антипараллельными β -слоями (**Рис. 24а**). С-концевой участок полипептидной цепи формирует α -спираль и ограничивает центральную полость β -пропеллера с одной стороны. С другой стороны в центральную полость пропеллера ведет субстратный канал. В центральной полости располагается активный центр фермента с тремя ионами меди. Две субъединицы *pmTcDH* образуют прочный димер (энергия сольватации при образовании интерфейса ΔG^i и площадь взаимодействия составляют -27.8 ккал/моль и 2511 \AA^2). Димер *pmTcDH* несимметричен, в отличие от димера *tpTcDH*, поскольку субъединицы в димере принимают различные конформации, закрытую и открытую.

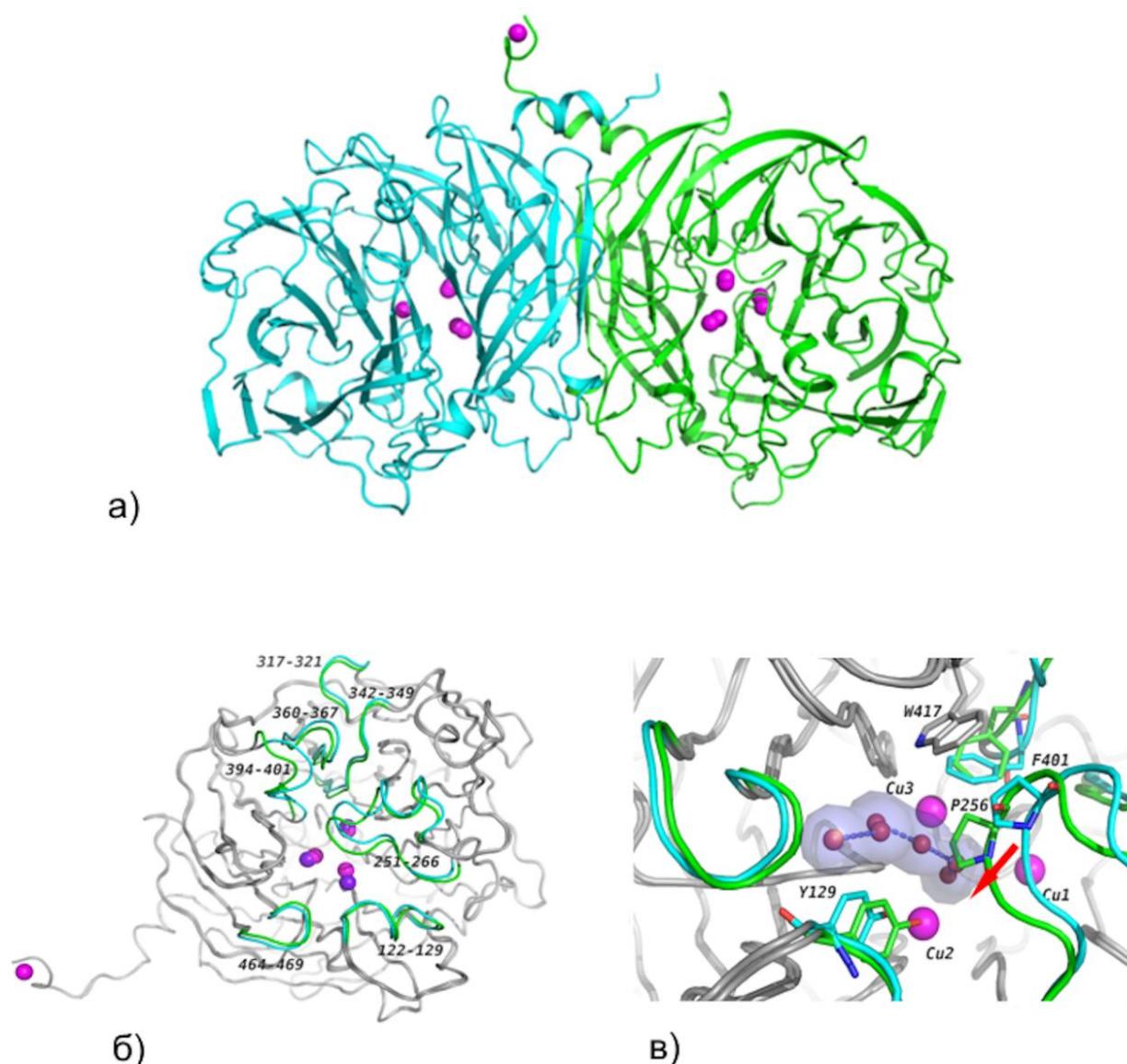


Рис. 24. Димер свободной холоформы *pmTcDH* (PDB ID: 8Q9X) состоит из субъединиц в закрытой (зеленая) и открытой (голубая) конформациях (а). Субъединицы *pmTcDH* в закрытой и открытой конформациях совмещаются по эквивалентным $\text{C}\alpha$ -атомам с помощью программы LSQKAB со значением r.m.s.d. 0.53 Å (б). Субстратный канал *pmTcDH* (в). На двух последних панелях участки полипептидной цепи, не меняющие свое положение при конформационных переходах, обозначены серым цветом. Участки полипептидной цепи, различающиеся положением у субъединиц в закрытой и открытой конформациях, обозначены зеленым и голубым цветом, соответственно. Ионы меди активного центра у субъединиц в закрытой и открытой конформациях показаны розовыми и темно-фиолетовыми сферами, соответственно. Молекулы воды в субстратном канале показаны красными сферами и голубой поверхностью. Водородные связи показаны синими пунктирными линиями. Направление смещения P256 при закрытии субстратного канала показано красной стрелкой.

3.2.4. Закрытая и открытая конформации *pmTcDH*

Активный центр субъединицы *pmTcDH* в закрытой конформации не доступен для молекул растворителя извне, а в открытой конформации молекулы воды могут проникать в активный центр фермента. Субъединицы димера фермента совмещаются по всем $\text{C}\alpha$ -атомам со значением r.m.s.d. 0.53 Å. В ходе нескольких циклов совмещения структур двух

субъединиц с помощью программы LSQKAB [203] участки полипептидной цепи, различающиеся своим положением более, чем на 1 Å, исключались из расчета, и значение r.m.s.d. между структурно идентичными областями снизилось до 0.31 Å. Данная процедура позволила однозначно установить семь участков полипептидной цепи фермента, положение которых изменяется при открытии/закрытии активного центра фермента: это петли 122-129, 251-266, 317-321, 342-349, 360-367, 394-401 и 464-469 (**Рис. 24б**). Петли 251-266 и 394-401 отклоняются на наибольшее расстояние, около 3 Å, в процессе конформационных переходов.

Вторым отличием структур субъединиц *pmTcDH* в закрытой и открытой конформациях является то, что N-конец субъединицы в закрытой конформации структурирован и различим на $2Fo-Fc$ карте электронной плотности из-за связывания дополнительного поверхностного иона меди Cu_{add} (**Рис. 24а, б**). Данный «искусственный» медный центр обеспечивает кристаллический контакт между субъединицей в закрытой конформации и субъединицей в открытой конформации симметричного димера ($x+1/2, -y+1/2, -z; 0, 0, 0$). Ион Cu_{add} координирован по типу плоского квадрата азотными лигандами свободной аминокислотной группы N-концевого G43, пептидной связи и имидазольного кольца H44 и также атомом Nδ1 имидазольного кольца H376 симметричной молекулы фермента (**Рис. 25**). Аминокислотные остатки G43 и H44 относятся к сайту разрезания TEV-протеазы, искусственно добавленному к последовательности фермента в генетической конструкции для очистки фермента с помощью His₆-тага. Структура «искусственного» медного центра Cu_{add} напоминает по устройству медные центры типа НВМ медь-запасающих и -транспортирующих белков [158, 159, 160, 161] и ферментов LPMO и pMMO [12, 157]. Стоит также отметить, что НВМ центр медь-запасающих белков обладают высокой аффинностью к ионам меди [206]. Наличие дополнительного медного центра Cu_{add} на N-конце фермента может заметно осложнить интерпретацию ЭПР-спектров данного образца *pmTcDH*.

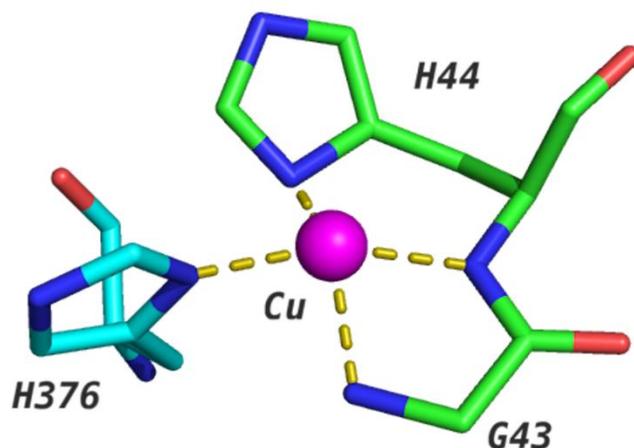


Рис. 25. Дополнительный поверхностный ион Cu_{add} связывается на N-конце субъединицы в закрытой конформации (зеленая) и образует симметричный контакт с субъединицей $(x+1/2, -y+1/2, -z; 0, 0, 0)$ в открытой конформации (голубая). Этот ион координирован по типу плоского квадрата остатками G43, H44, являющимися частью сайта разрезания TEV-протеазы, и H376 и напоминает медный центр НВМ [12, 157, 158]. Координационные связи показаны золотыми пунктирными линиями.

Субъединицы *pmTcDH* в закрытой и открытой конформациях также отличаются числом симметричных контактов в кристаллической структуре: субъединица в закрытой конформации образует 6 контактов, а субъединица в открытой конформации – 5 контактов.

Важной особенностью структуры *pmTcDH* в кристалле является то, что в активном центре субъединицы в закрытой конформации фермента всегда связывается лиганд, а в активном центре субъединицы в открытой конформации лиганд обнаруживается не всегда (см. далее).

В большинстве структур *tpTcDH* обе субъединицы димера находятся в открытой конформации, и только в структуре 6UWE со связанным неидентифицированным лигандом обе субъединицы принимают закрытую конформацию. Совмещение обеих субъединиц димера *pmTcDH* в закрытой и открытой конформациях с субъединицей *tpTcDH* в открытой конформации (PDB ID: 6I3Q) по всем эквивалентным $\text{C}\alpha$ -атомам дает значение r.m.s.d. 0.73 и 0.65 Å, а с субъединицей *tpTcDH* в закрытой конформации (PDB ID: 6UWE) – 0.58 и 0.76 Å, соответственно. Положение подвижных участков полипептидной цепи, претерпевающих конформационные изменения в процессе закрытия/открытия субстратного канала, совпадает для аналогичных конформаций двух ферментов.

3.2.5. Субстратный канал *pmTcDH*

Субстратный канал *pmTcDH* по форме напоминает воронку. В самом узком месте, в области аминокислотного остатка P256, диаметр воронки составляет около 3 Å с учетом

ван-дер-ваальсовых радиусов атомов аминокислотных остатков, что позволяет проникать в активный центр фермента молекулам субстрата или ингибиторов. Длина субстратного канала составляет $\sim 11 \text{ \AA}$. В открытой конформации непрерывная цепочка молекул воды, связанных водородными связями, располагается в субстратном канале и соединяет пул внешнего растворителя с активным центром фермента, а в закрытой конформации эта цепочка разрывается (**Рис. 24в**).

В формировании субстратного канала принимают участие аминокислотные остатки 417-419 и 445-447, принадлежащие неподвижным петлям, и аминокислотные остатки 122-129, 251-266, 394-401 и 464-469 (**Рис. 24б, в**), смещающиеся в процессе конформационных переходов. Гидрофобные аминокислотные остатки преимущественно участвуют в образовании стенок канала. Основную роль в ограничении доступа растворителя в активный центр фермента играет аминокислотный остаток R256, боковая группа которого при закрытии канала сдвигается на расстояние $\sim 3 \text{ \AA}$ в сторону Y129 и прерывает цепочку из молекул воды (**Рис. 24в**). Движение R256 сопровождается перестроением сети водородных связей и конформационными переходами основной цепи F401, входящего в состав стенки субстратного канала, и боковых групп Q347 и С-концевого T513. Данные конформационные изменения должны быть скоординированы друг с другом при связывании субстрата и закрытии субстратного канала и подробно рассмотрены ниже.

Аминокислотные остатки, формирующие подвижные петли, стенки субстратного канала и центральную полость β -пропеллера консервативны у *pmTcDH* и *tpTcDH*. Например, в области субстратного канала наблюдаются всего две замены в позициях F261A и K467N (**Рис. 22**), расположенных на поверхности у входа в субстратный канал.

3.2.6. Общая структура активного центра *pmTcDH*

Активный центр *pmTcDH* включает трехъядерный медный центр, состоящий из трех ионов меди Cu1, Cu2 и Cu3 (**Рис. 26а**). На основании организации координационной сферы каждый из ионов меди можно рассматривать как T2-центр, согласно предложенной классификации [62, 88]. Все аминокислотные остатки активного центра консервативны у *pmTcDH* и *tpTcDH*. В их число входят шесть аминокислотных остатков гистидина H100, H171, H346, H402, H447, H493 и аминокислотные остатки лизина K68 и аспартата D279, координирующие ионы меди, два каталитических аминокислотных остатка H101 и E253 (**Рис. 22**), связывающие консервативную молекулу воды W. Кроме того, у *pmTcDH* и *tpTcDH* консервативны остатки, формирующие стенки канала и активного центра, как Q347, F401 и С-концевой T513 (**Рис. 22**). Интересно, что у гомологов фермента со степенью

идентичности аминокислотных последовательностей менее 30% присутствуют одновременные замены по этим трем положениям [185].

Высокое качество и атомное разрешение дифракционных данных кристалла *mtTcDH* позволило различить несколько положений ионов меди с разной заселенностью в активном центре фермента и однозначно описать координационную сферу для каждого такого состояния (**Рис. 26а, 27а, 28а**). На основании структурных данных такого качества можно предположить возможные степени окисления ионов меди для разных положений исходя из предпочтительных координационных сфер, установить корреляцию между положениями ионов меди и их лигандами и выделить несколько состояний трехъядерного центра. Однако стоит учитывать, что белковое окружение может сильно исказить тип координации иона металла, как в случае с T1-центром для обеспечения выполняемой функции [77].

3.2.7. Архитектура трехъядерного медного центра *mtTcDH* в закрытой конформации

Все три иона меди Cu1, Cu2 и Cu3 в активном центре субъединицы *mtTcDH* в закрытой конформации обладают суммарной полной заселенностью (**Рис. 26а**). Расстояния между ионами меди в трехъядерном центре и длины координационных связей приведены в **таблицах 4, 5**. Максимум на *2Fo-Fc* карте электронной плотности между ионами меди Cu2 и Cu3 соответствовал двухатомному лиганду и был описан молекулой кислорода. При описании максимума двумя молекулами воды с заселенностью 0.5 возникал положительный пик на разностной карте между ними.

Ион меди Cu1 в структуре свободного фермента занимает два положения с заселенностью 0.85 и 0.15, соответственно. В положении с большей заселенностью ион меди Cu1 координирован по типу плоского квадрата атомами Nε2 H171, Nε2 H346, Oδ1 D279 и молекулой воды (заселенность 0.7) (**Рис. 26б**). При отсутствии молекулы воды геометрия координации иона меди Cu1 соответствует треугольной (**Рис. 26в**). Минорное положение иона меди Cu1 с заселенностью 0.15, вероятно, является артефактом эксперимента (ион меди Cu1 координирован линейно атомами Nε2 H171 и Nε2 Q347), поэтому не рассматривается. Положение иона меди Cu1 с квадратной геометрий предпочтительно для иона меди в состоянии Cu^{+2} , в остальных случаях – для иона меди в состоянии Cu^{+1} .

Ион меди Cu2 занимает два положения с заселенностью 0.7 и 0.3, соответственно. В положении с заселенностью 0.7 ион меди Cu2 координирован по типу тетраэдра (**Рис. 26б**), где атомы Nδ1 H493, Nε2 H100 и O2 молекулярного кислорода (заселенность лиганда 0.7) образуют основание, а молекула воды находится в вершине. В положении с заселенностью

0.3 ион меди Cu2 координирован по типу треугольника атомами Nδ1 H493, Nε2 H100 и молекулой воды (**Рис. 26в**). Координационная сфера в положении с заселенностью 0.7 соответствует иону меди в состоянии Cu⁺², в положении с заселенностью 0.3 – иону меди в состоянии Cu⁺¹.

Для иона меди Cu3 можно также выделить два состояния с заселенностью 0.7 и 0.3 на основании корреляции с заселенностью лиганда, молекулярного кислорода. В состоянии с заселенностью 0.7 ион меди Cu3 координирован по типу треугольника атомами Nδ1 H447, Nε2 H402 и O1 молекулярного кислорода (**Рис. 26б**). В состоянии, когда молекулярный кислород отсутствует в активном центре, только два лиганда Nδ1 H447 и Nε2 H402 принимают участие в координации иона меди Cu3 (**Рис. 26в**). Координационная сфера иона меди Cu3 в присутствии и отсутствие лиганда предпочтительна для иона меди в состоянии Cu⁺¹.

На основании полученных структурных данных в закрытой конформации *pt*TсDH можно выделить два состояния трехядерного медного центра. Окисленное состояние [Cu1⁺²-Cu2⁺²-Cu3⁺¹] (с заселенностью 0.7) соответствует состоянию со связанным молекулярным кислородом. В восстановленном состоянии [Cu1⁺¹-Cu2⁺¹-Cu3⁺¹] (с заселенностью 0.3) в активном центре лиганд отсутствует. Исходя из устройства координационной сферы, ион Cu3 находится всегда в состоянии Cu⁺¹. Учитывая равенство заселенностей лиганда и одного из положений ионов Cu2 и Cu3, можно предположить, что окисленное состояние активного центра в закрытой конформации соответствует состоянию со связанным субстратом. По данным спектроскопии ЭПР, восстановленное состояние активного центра при инкубации с субстратом не возникает [61] и скорее всего является артефактом рентгеноструктурного эксперимента.

Один из каталитических аминокислотных остатков E253 не формирует в закрытой конформации водородную связь с атакующей молекулой воды W (**Рис. 26б, в**). Его боковая группа развернута в другую сторону и образует водородные связи с атомами Nζ(z) K68, OH Y129, Nε2 Q121 и молекулой воды из координационной сферы иона меди Cu2. Данные водородные связи, вероятно, способствуют стабилизации закрытой конформации субъединицы, поскольку E253 располагается в начале подвижной петли аминокислотного остатка P256. Стабилизирующая роль E253 в общей структуре субъединицы подтверждается тем, что все рекомбинантные формы с заменами по этому положению у *tp*TсDH образовывали агрегаты [61].

Атакующая молекула воды W зафиксирована за счет одной водородной связи с каталитическим остатком H101 (**Рис. 26б, в**). Расстояние между атакующей молекулой воды и ионом меди Cu2 в положении с заселенностью 0.7 составляет 2.5 Å, что превышает

длину координационной связи. Однако электростатические взаимодействия между ионом меди и активированным гидроксидом-анионом в ходе реакции могут способствовать стабилизации отрицательного заряда на атоме кислорода.

В закрытой конформации боковая группа Q347 направлена в сторону иона меди Cu1 (расстояние между ионом меди Cu1 и атомом Oε1 составляет 2.7 Å) и образует водородные связи с боковой группой T513 и молекулой воды из координационной сферы иона меди Cu1. При этом угол ψ основной цепи F401 принимает значение -139.0° .

Молекулярный кислород, обнаруженный в активном центре, связывается между двумя ионами меди Cu2 и Cu3 способом, отличным от T3-центра. Молекулярный кислород в активном центре *pmTcDH* служит мостиковым лигандом для двух ионов меди, однако каждый его атом образует координационную связь только с одним ионом меди (**Рис. 266**), что может соответствовать комплексу с пероксидом [56]. В T3-центре при связывании молекулы кислорода образуется комплекс с пероксидом другого строения [6], где каждый атом пероксид-аниона образует координационные связи с обоими ионами меди. Различия в структуре образуемых кислородных комплексов определяются устройством медного центра – расстояние между ионами меди Cu2 и Cu3 в активном центре *pmTcDH* больше (**Таблица 4**), чем между двумя ионами T3-центра.

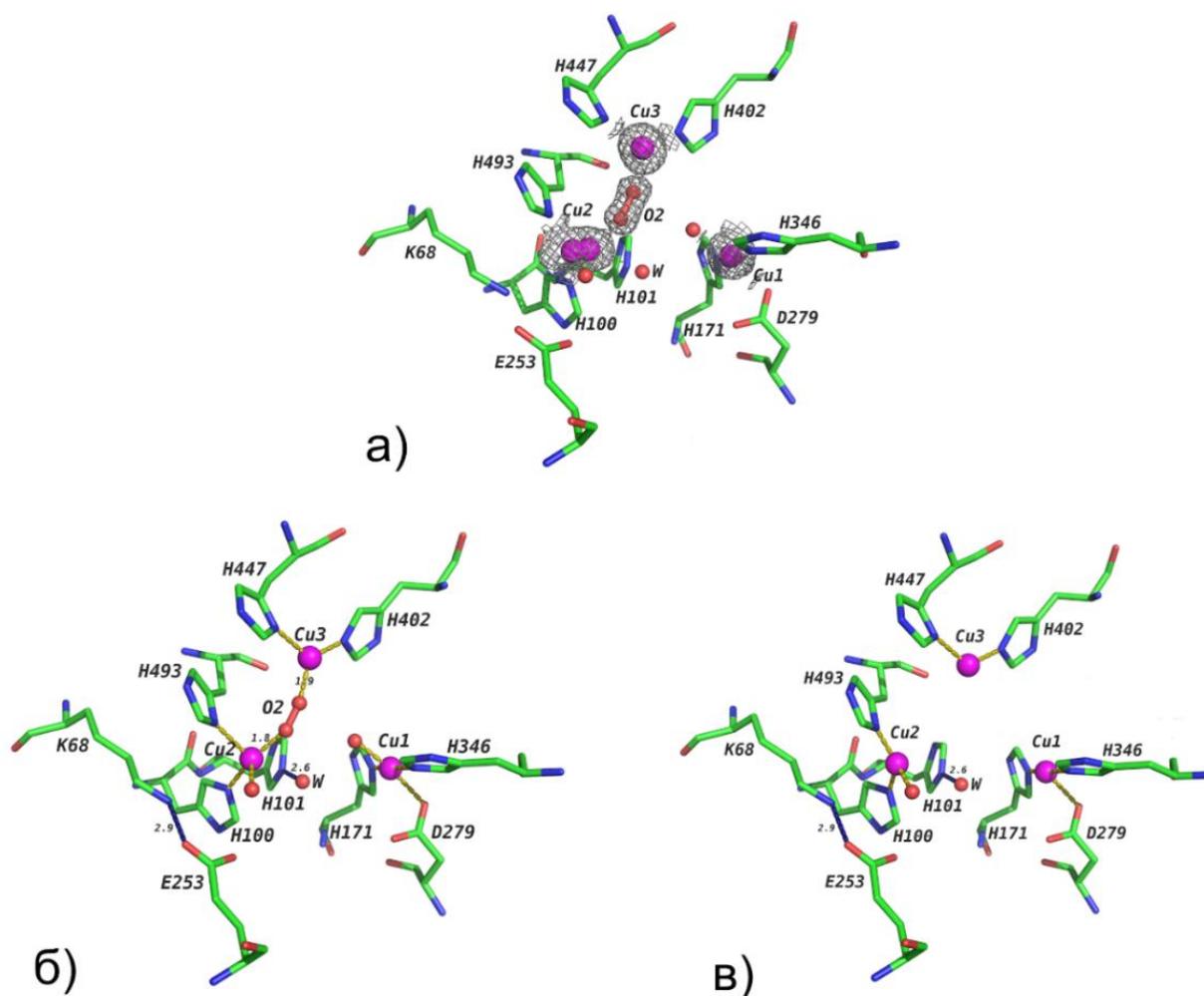


Рис. 26. В активном центре субъединицы в закрытой конформации *pmTcDH* (PDB ID: 8Q9X) $2Fo-Fc$ карта электронной плотности показана для ионов меди Cu1, Cu2, Cu3, молекулярного кислорода и остатков H402 и H447 на уровне срезки 1σ (а). Схема трехъядерного медного центра *pmTcDH* в закрытой конформации в окисленном и восстановленном состояниях с заселенностью 0.7 (б) и 0.3 (в). Ионы меди Cu1, Cu2, Cu3 показаны розовыми сферами. Молекулы растворителя показаны красными сферами, а атакующая молекула воды обозначена «W». Координационные и водородные связи показаны золотыми и темно-синими пунктирными линиями, соответственно.

Таблица 4. Расстояния между ионами меди Cu1, Cu2, Cu3 активного центра субъединиц в закрытой и открытой конформации в структуре свободной холоформы *pmTcDH* (PDB ID: 8Q9X).

| Пары ионов меди | Расстояния между парами ионов меди активного центра, Å | | | |
|-----------------|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Закрытая конформация | | Открытая конформация | |
| | Состояние центра с q=0.7* | Состояние центра с q=0.3* | Состояние центра с q=0.35* | Состояние центра с q=0.65* |
| Cu1 и Cu2 | 5.9 | 6.7 | 8.3 | 7.1 |
| Cu1 и Cu3 | 5.8 | 5.8 | 6.6 | 6.9 |
| Cu2 и Cu3 | 4.7 | 5.1 | 5.8 | 5.5 |

* Состояния трехъядерного центра *pmTcDH* для двух конформациях с разными заселенностями (q), выделенных на основании корреляции между заселенностями нескольких положений ионов меди и их лигандов и подробно рассмотренные в тексте.

Таблица 5. Длины координационных связей в трехъядерном медном центре в структуре свободной холоформы *mtTcDH* (PDB ID: 8Q9X).

| Структура | Свободный фермент | | | | | |
|---|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| | Cu1 | | | | Cu2 | |
| Ион | Cu1 | | Cu2 | | Cu2 | |
| Конформация | Закрытая | | Открытая | | Закрытая | |
| Заселенность | 0.7 | 0.3 | 0.35 | 0.65 | 0.7 | 0.3 |
| Лиганд (Длина координационной связи, Å; заселенность) | Oδ1 D279 (2.2; 1.0) | Oδ1 D279 (2.2; 1.0) | Oδ1/2 D279 (2.5/2.4; 1.0) | Oδ1/2 D279 (2.5/2.4; 1.0) | НОН (2.2; 1.0) | НОН (2.2; 1.0) |
| | №2 Н171 (1.9; 1.0) | №2 Н171 (1.9; 1.0) | №2 Н171 (2.0; 1.0) | №2 Н171 (2.0; 1.0) | №2 Н100 (2.0; 1.0) | №2 Н100 (1.9; 1.0) |
| | №2 Н346 (2.0; 1.0) | №2 Н346 (2.0; 1.0) | №2 Н346 (2.0; 1.0) | №2 Н346 (2.0; 1.0) | №1 Н493 (2.1; 1.0) | №1 Н493 (1.8; 1.0) |
| | НОН (1.9; 0.6) | | НОН (2.1; 0.3) | | O2 (1.8; 0.7) | |
| | | | НОН (2.1; 0.3) | | | |
| Геометрия | Плоский квадрат | Треугольник | Октаэдр | Тетраэдр | Тетраэдр | Треугольник |
| Вероятный заряд* | +2 | +1 | +2 | +2 | +2 | +1 |

Таблица 5. Продолжение.

| Структура | Свободный фермент | | | | | |
|---|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Cu2 | | Cu3 | | | |
| Ион | Cu2 | | Cu3 | | Cu3 | |
| Конформация | Открытая | | Закрытая | | Открытая | |
| Заселенность | 0.35 | 0.65 | 0.7 | 0.3 | 0.35 | 0.65 |
| Лиганд (Длина координационной связи, Å; заселенность) | НОН (2.2; 1.0) | НОН (2.2; 1.0) | №2 Н402 (2.0; 1.0) | №2 Н402 (2.0; 1.0) | №2 Н402 (2.0; 1.0) | №2 Н402 (1.9; 1.0) |
| | №2 Н100 (2.0; 1.0) | №2 Н100 (2.0; 1.0) | №1 Н447 (2.0; 1.0) | №1 Н447 (2.0; 1.0) | №1 Н447 (2.2; 1.0) | №1 Н447 (1.8; 1.0) |
| | №1 Н493 (1.9; 1.0) | №1 Н493 (2.0; 1.0) | O1 (1.9; 0.7) | | НОН (1.9; 0.35) | |
| | №ζ К68 (2.2; 1.0) | | | | | |
| | НОН (1.9; 0.35) | | | | | |
| Геометрия | Тригональная бипирамида | Треугольник | Треугольник | Линейная | Треугольник | Линейная |
| Вероятный заряд* | +2 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

* Вероятный заряд предложен исходя из предпочтительной координации ионов Cu^{+1} и Cu^{+2} .

3.2.8. Архитектура трехъядерного медного центра *mtTcDH* в открытой конформации

В активном центре открытой субъединицы все три иона меди Cu1, Cu2 и Cu3 также обладают суммарной полной заселенностью (**Рис. 27а**). Расстояния между ионами меди в активном центре и длины координационных связей приведены в **таблицах 4, 5**.

Ион меди Cu1 занимает одно положение и координирован по типу октаэдра шестью лигандами: атомы Oδ1 и Oδ2 D279 и две молекулы воды образуют основание, а атомы №2 Н171, №2 Н346 располагаются в вершинах (**Рис. 27б**). Такая геометрия координации является предпочтительной для иона меди в состоянии Cu^{+2} . Заселенность молекул воды в

координационной сфере составляет 0.3. На основании этого можно заключить, что в 70% молекул белка в кристалле координация иона меди Cu1 изменяется на тетраэдрическую, также возможную для состояния Cu^{+2} .

Ион меди Cu2 занимает два положения с заселенностью 0.35 и 0.65, соответственно. В положении с заселенностью 0.35 ион меди Cu2 координирован по типу тригональной бипирамиды, где атомы N δ 1 H493, N ϵ 2 H100 и молекула воды образуют основание, а атом N ζ (z) K68 и вторая молекула воды находятся в вершинах (**Рис. 27б**). В положении с заселенностью 0.65 ион меди Cu2 координирован по типу треугольника атомами N δ 1 H493, N ϵ 2 H100 и молекулой воды (**Рис. 27в**). Координационная сфера в положении с заселенностью 0.35 предпочтительна для иона меди в состоянии Cu^{+2} , в положении с заселенностью 0.65 – для иона меди в состоянии Cu^{+1} .

Для иона меди Cu3 можно также выделить два состояния с заселенностью 0.35 и 0.65, соответственно. В состоянии с заселенностью 0.35 ион меди Cu3 координирован по типу треугольника атомами N δ 1 H447, N ϵ 2 H402 и молекулой воды (**Рис. 27б**). В состоянии с заселенностью 0.65 только два лиганда N δ 1 H447 и N ϵ 2 H402 принимают участие в координации иона меди Cu3 (**Рис. 27в**). Координационная сфера иона меди Cu3 в обоих состояниях предпочтительна для иона меди в состоянии Cu^{+1} .

Таким образом, трехъядерный медный центр субъединицы *pt*TсDH в открытой конформации у большей доли молекул (заселенность 0.65) находится в восстановленном состоянии $[\text{Cu}1^{+2}-\text{Cu}2^{+1}-\text{Cu}3^{+1}]$ (**Рис. 27в**), что вызвано, вероятно, восстанавливающим воздействием рентгеновского излучения. Окисленное состояние центра в кристалле (заселенность 0.35) описывается $[\text{Cu}1^{+2}-\text{Cu}2^{+2}-\text{Cu}3^{+1}]$. Как и в закрытой конформации, степень окисления иона меди Cu3 также всегда соответствует Cu^{+1} , учитывая устройство его координационной сферы. На основании ранее полученных данных спектроскопии ЭПР для *tp*TсDH [61], можно предполагать, что окисленное состояние является исходным состоянием фермента до связывания субстрата

В открытом активном центре оба каталитических аминокислотных остатка, E253 и H101, образуют водородные связи с консервативной молекулой воды W (**Рис. 27б, в**). Боковая группа E253 не формирует водородные связи с аминокислотными остатками K68 и Y129, однако водородные связи с аминокислотным остатком Q121 и молекулой воды из координационной сферы иона меди Cu2 остаются. При этом N ζ (z)-атом K68 входит в координационную сферу иона меди Cu2, и длина координационной связи составляет 2.2 Å (**Таблица 5**).

Положение аминокислотных остатков Q347 и F401 изменяется в открытой конформации по сравнению с закрытой. Боковая группа Q347 развернута в другую сторону

от иона меди Cu1 и связана водородными связями с боковой и основной цепью T513, карбонильным кислородом основной цепи аминокислотного остатка F401 и молекулой воды. Угол ψ у основной цепи остатка F401 равен 10.8° .

В активном центре субъединицы *pmTcDH* в открытой конформации лиганды не обнаружены, и все пики на карте электронной плотности описаны молекулами воды (**Рис. 27а**).

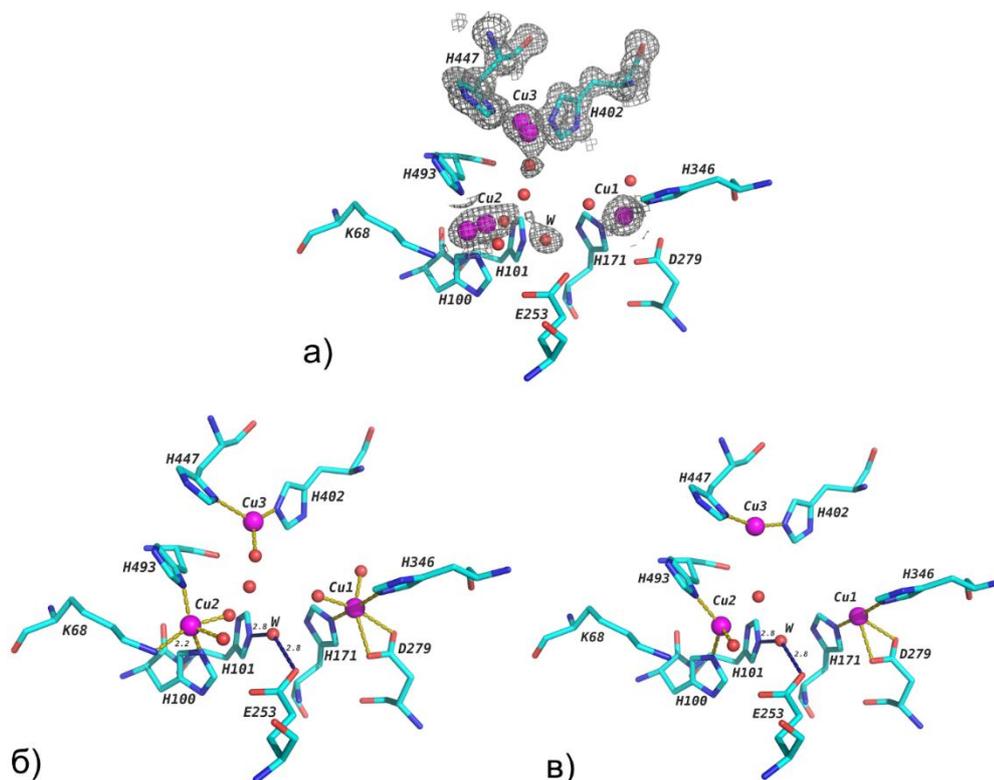


Рис. 27. В активном центре субъединицы в открытой конформации свободной холоформы *pmTcDH* (PDB ID: 8Q9X) $2Fo-Fc$ карта электронной плотности показана для ионов меди Cu1, Cu2, Cu3, молекулы воды и аминокислотных остатков H402 и H447 на уровне среза 1σ (а). Схема окисленного и восстановленного состояний трехъядерного медного центра *pmTcDH* в открытой конформации с заселенностью 0.35 (б) и 0.65 (в), соответственно. Ионы меди Cu1, Cu2, Cu3 показаны розовыми сферами. Молекулы растворителя показаны красными сферами, а атакующая молекула воды обозначена «W». Координационные и водородные связи показаны золотыми и темно-синими пунктирными линиями, соответственно.

3.2.9. Спектр ЭПР *pmTcDH*

Спектры ЭПР в X-диапазоне рекомбинантной *pmTcDH* сравнивали с референсным спектром, записанным для нативной *tpTcDH*, выделенной из клеток *Th. paradoxus* (**Рис. 28а**). В спектре рекомбинантной *pmTcDH* (синий, **Рис. 28а**), которая содержала сайт отщепления TEV-протеазы и связывала в структуре дополнительную ион меди Cu_{add} на N-конце после отщепления His₆-тага (**Рис. 24а, б, 25**), действительно был обнаружен заметный сигнал от иона меди (четыре линии СТВ для $g\parallel$), который отсутствовал в спектре нативной *tpTcDH*. Специально для спектроскопии ЭПР была получена другая генетическая конструкция *pmTcDH* с отщепляемым белком SUMO уже на С-конце белка для

предотвращения формирования «искусственного» медного центра. Как видно, спектр нового препарата *pmTcDH* (красный, **Рис.28а**) после интенсивного диализа идентичен спектру нативной *tpTcDH* по форме. Расчет числа ионов меди по интегральной интенсивности спектра ЭПР с использованием стандартного раствора CuCl_2 в DMSO показал, что молекула *pmTcDH* содержит ~ 2.6 иона меди на молекулу, что согласуется с данными ICP-MS – 3.3 иона меди на молекулу.

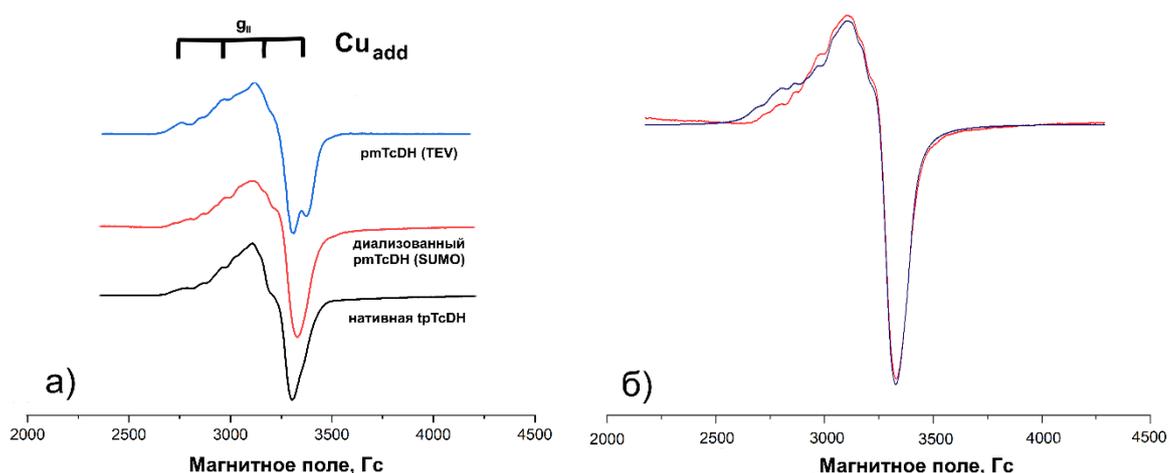


Рис. 28. Сравнение спектров ЭПР в X-диапазоне нативной *tpTcDH* (черный), рекомбинантной *pmTcDH* в конструкции с His₆-тагом (синий) и сайтом TEV-протеазы и рекомбинантной *pmTcDH* в конструкции с SUMO (красный) (а). Расчет спектра ЭПР *pmTcDH* (б): экспериментальный (красный) и рассчитанный с параметрами из таблицы 6 (синий).

Для лучшей аппроксимации с экспериментальными данными, спектр *pmTcDH*, в отличие от спектра *tpTcDH* в работе [61], симулировали в ромбическом приближении, где компоненты по двум осям x и y неравны $g_x \neq g_y \neq g_{\perp}$ и $A_x \neq A_y \neq A_{\perp}$, а параметры g_z и A_z соответствуют g_{\parallel} и A_{\parallel} . Экспериментальный спектр был аппроксимирован суммарным спектром от трех не взаимодействующих ионов меди с равным вкладом (**Рис. 28б, Таблица 6**). При этом видно, что все три иона меди по своим параметрам близки к «типичному» комплексному соединению меди Cu^{+2} с большим значением константы СТВ A_z и ни один из них не проявляет свойств T0-центра, в отличие от *tpTcDH* (**Таблица 6**). Данные ЭПР противоречат рентгеноструктурным данным *pmTcDH*, что ион меди Cu_3 всегда находится в восстановленном состоянии Cu^{+1} , и предполагают, что в свободной форме состояние трехъядерного центра можно описать как $[\text{Cu}^{+1+2}-\text{Cu}^{2+2}-\text{Cu}^{3+2}]$. Стоит отметить, что в литературе встречаются примеры медных центров ферментов (РНМ), где в структуре координация у иона меди предпочтительна для иона меди в состоянии Cu^{+1} , а спектр ЭПР соответствует спектру «типичного» комплекса иона меди Cu^{+2} . Таким образом, требуются дальнейшие эксперименты для расшифровки спектра ЭПР и сопоставления его со структурой.

Таблица 6. Параметры рассчитанного спектра ЭПР в X-диапазоне (частота МИ ~ 9.5 ГГц) свободной формы *pmTcDH*.

| Ион меди | g_x | g_y | g_z | $A_x, 10^{-4}$ см ⁻¹ | $A_y, 10^{-4}$ см ⁻¹ | $A_z, 10^{-4}$ см ⁻¹ | Концентрация, % |
|----------|-------|-------|-------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| 1 | 2.087 | 2.117 | 2.289 | 24.0 | 42.4 | 185.6 | 31.0 |
| 2 | 2.044 | 2.089 | 2.256 | 15.3 | 14.4 | 161.8 | 32.5 |
| 3 | 2.033 | 2.131 | 2.215 | 21.9 | 36.9 | 169.5 | 36.5 |

3.3. Пространственная структура комплекса *pmTcDH* с ингибитором тиомочевинной

Тиомочевина, как один из эффективных ингибиторов *tpTcDH* [189], была выбрана в качестве лиганда для проведения рентгеноструктурных экспериментов по изучению ориентации связывания субстрата в активном центре *pmTcDH*. Кинетические эксперименты показали, что тиомочевина ингибирует тиоцианатдегидрогеназную активность по смешанному механизму [189]. Структура комплекса *pmTcDH* с ингибитором тиомочевинной была получена методом настаивания кристаллов свободного фермента в кристаллизационном растворе, содержавшем 100 мМ тиомочевинной. Процедура настаивания не привела к ухудшению качества кристаллов – дифракционные наборы для комплекса фермента с тиомочевинной были собраны с атомным разрешением (**Таблица 3**).

Субъединицы в димере *pmTcDH* в структуре комплекса также находятся в разных конформациях, которые полностью совпадают с субъединицами свободного фермента в аналогичных конформациях при совмещении по всем C α -атомам (r.m.s.d. составляет 0.6 Å). Максимум на (2*F_o*-*F_c*) карте электронной плотности, соответствующий связавшейся тиомочевинной, был обнаружен только в закрытом активном центре (**Рис. 29а**). Ионы меди в структуре комплекса также занимают несколько положений (**Рис. 29а**) и при этом обладают суммарной полной заселенностью. Расстояния между ионами меди в активном центре и длины координационных связей приведены в **таблицах 7, 8**.

В активном центре субъединицы *pmTcDH* в закрытой конформации ион меди Cu1 занимает два положения с заселенностью 0.9 и 0.1 (минорное положение на рисунке не показано), ион меди Cu2 – два положения с заселенностью 0.7 и 0.3, ион меди Cu3 – два положения с заселенностью 0.7 и 0.3 (**Рис. 29а**). Заселенность тиомочевинной составляет 0.7. Таким образом, положения ионов меди Cu2 и Cu3 с заселенностью 0.7 соответствуют состоянию активного центра со связанным ингибитором (**Рис. 29б**), а положения с заселенностью 0.3 – состоянию активного центра, когда ингибитор не связался (**Рис. 29в**).

В закрытой конформации структуры комплекса с тиомочевинной ион меди Cu1 в положении с заселенностью 0.9 координирован по типу плоского квадрата атомами N ϵ 2 H171, N ϵ 2 H346, O δ 1 D279 и N2 тиомочевинной (**Рис. 29б**). В отсутствие тиомочевинной в

координационной сфере иона меди Cu1 остаются только три лиганда с геометрией по типу треугольника (**Рис. 29в**). Минорное положение иона меди Cu1 с заселенностью 0.10, где ион координирован линейно атомами Oε1 N171 и Nε2 Q347, вероятно, является артефактом эксперимента и не рассматривается. Геометрия координации иона меди Cu1 по типу плоского квадрата предпочтительна для иона меди в состоянии Cu^{+2} , в остальных случаях – для иона меди в состоянии Cu^{+1} .

Ион меди Cu2 в положении с заселенностью 0.7 координирован по типу тетраэдра, где атомы Nδ1 H493, Nε2 H100 и S тиомочевины образуют основание, а молекула воды находится в вершине (**Рис. 29б**). В положении с заселенностью 0.3 ион меди Cu2 координирован по типу треугольника атомами Nδ1 H493, Nε2 H100 и молекулой воды (**Рис. 29в**). Координационная сфера в положении с заселенностью 0.7 соответствует иону меди в состоянии Cu^{+2} , в положении с заселенностью 0.3 – иону меди в состоянии Cu^{+1} .

Ион меди Cu3 в состоянии с заселенностью 0.7 координирован по типу треугольника атомами Nδ1 H447, Nε2 H402 и S тиомочевины (**Рис. 29б**). В отсутствие тиомочевины, ион меди Cu3 координирован линейно двумя лигандами Nδ1 H447 и Nε2 H402 в состоянии с заселенностью 0.3 (**Рис. 29в**). Координационная сфера иона меди Cu3 в присутствии и отсутствие лиганда предпочтительна для иона меди в состоянии Cu^{+1} .

Таким образом, рассмотрев устройство координационной сферы каждого иона меди трехъядерного центра *pmTcDH* в разных положениях, можно предположить, что трехъядерный центр со связанным лигандом находится в окисленном состоянии [Cu^{+2} - Cu^{+2} - Cu^{+1}], как и в случае структуры свободного фермента. Восстановленное состояние центра [Cu^{+1} - Cu^{+1} - Cu^{+1}] также, наверное, возникает под воздействием рентгеновского излучения.

Положения каталитических аминокислотных остатков E253 и H101 (**Рис.26б, в, 29б, в**) и формирующих стенки субстратного канала и активного центра аминокислотных остатков Q347 и F401 в закрытой конформации полностью совпадают у структур комплекса и свободного фермента. Консервативная молекула воды W образует одну водородную связь с H101. Как и в случае структуры свободного фермента, аминокислотный остаток K68 не входит в состав координационной сферы иона меди Cu2, а участвует в формировании сети водородных связей с каталитическим аминокислотным остатком E253.

На основании ориентации тиомочевины в закрытом активном центре *pmTcDH* можно предположить модель связывания субстрата – тиоцианата. Атом серы тиомочевины выполняет роль мостикового лиганда между ионами меди Cu2 и Cu3 и соответствует атому серы в субстрате. Расстояние между ионами меди составляет в таком биядерном комплексе 4.5 Å (**Таблица 7**), а длины координационных связей S-Cu2 и S-Cu3 – 2.5 и 2.4 Å,

соответственно (**Таблица 8**). Атом азота N2 тиомочевины образует координационную связь с ионом меди Cu1 и водородную связь с боковой группой Q347, и его положение соответствует положению атома азота тиоцианата. Атом азота N1 второй аминогруппы тиомочевины располагается на месте атакующей воды W и образует водородную связь с каталитическим аминокислотным остатком H101. В отсутствие тиомочевины в активном центре на месте атомов S1 и N1 находятся две молекулы воды с заселенностью 0.3. Тиомочевина может служить аналогом переходного состояния, которое возникает в ходе катализируемой реакции, согласно ранее предложенному механизму [61]. Интересно отметить, что для комплекса фермента с серосодержащим лигандом, тиомочевинной или субстратом, максимум поглощения в видимой области не обнаружен, хотя длины координационных связей между ионами меди и серным лигандом сравнимы со значением длин координационных связей в CuA-центре (**Рис. 9а**) [140]. На основании этого можно предположить, что координационные связи S-Cu в активном центре *pmTcDH* менее прочные, поэтому не происходит заметного переноса заряда от лиганда к иону меди. Вероятно, это свойство медного центра определяется выполняемой функцией фермента.

Архитектура открытого активного центра комплекса *pmTcDH* с тиомочевинной полностью совпадает с архитектурой открытого активного центра структуры свободного фермента, в связи с этим, ее детальное описание не приводится.

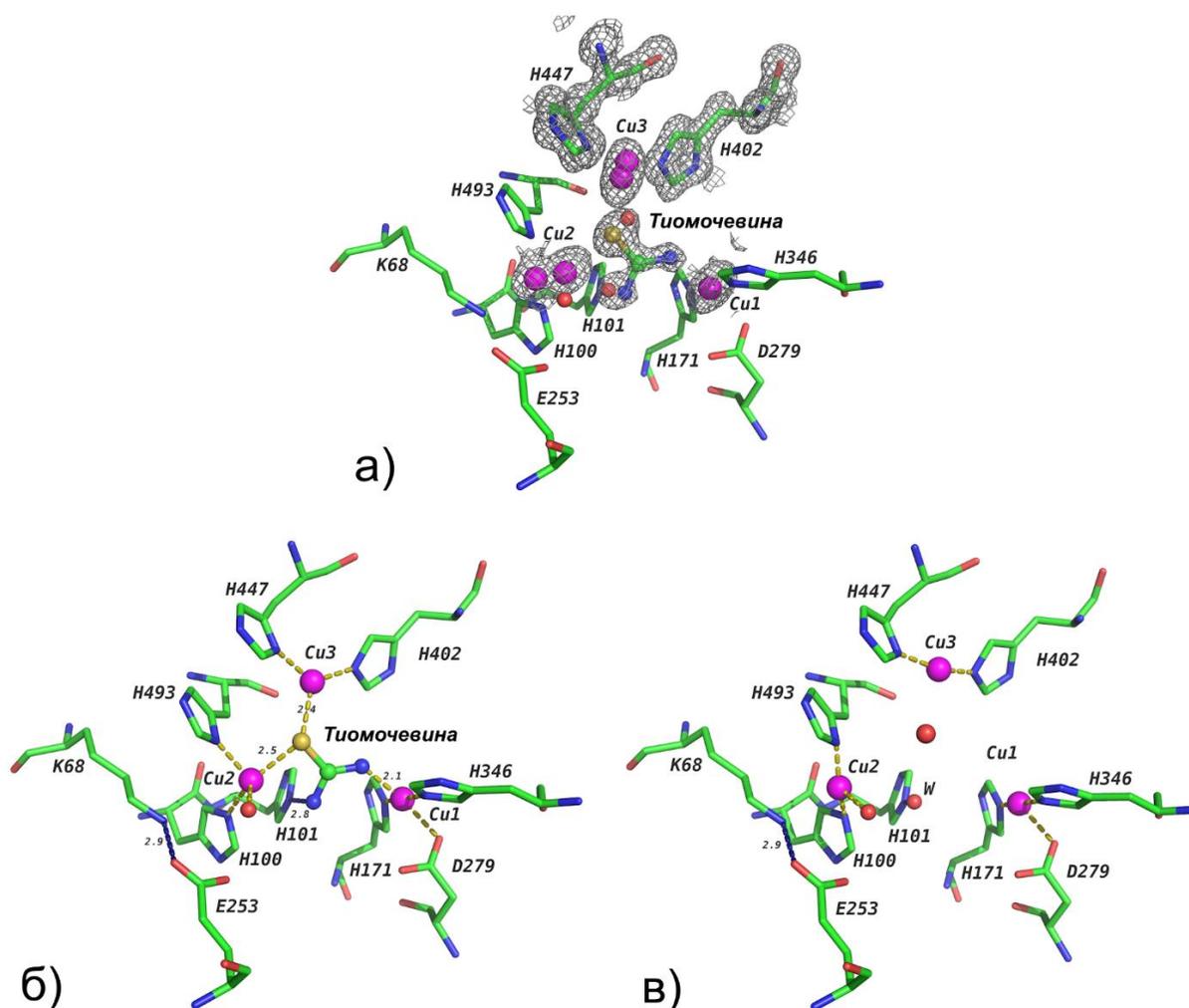


Рис. 29. В активном центре субъединицы в закрытой конформации комплекса *ptTcDH* с тиомочевинной (PDB ID: 8Q9Y) *2Fo-Fc* карта электронной плотности показана для ионов меди Cu1, Cu2, Cu3, тиомочевины и остатков H402 и H447 на уровне срезаки 1σ (а). Схема трехъядерного медного центра *ptTcDH* в закрытой конформации с заселенностью 0.7 (б) и 0.3 (в). Ионы меди Cu1, Cu2, Cu3 показаны розовыми сферами. Молекулы растворителя показаны красными сферами, а атакующая молекула воды обозначена «W». Координационные и водородные связи показаны золотыми и темно-синими пунктирными линиями, соответственно.

Таблица 7. Расстояния между ионами меди Cu1, Cu2, Cu3 активного центра субъединиц в закрытой и открытой конформации в структуре комплекса *ptTcDH* с тиомочевинной (PDB ID: 8Q9Y).

| Пары ионов меди | Расстояния между парами ионов меди активного центра, Å | | | |
|-----------------|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Закрытая конформация | | Открытая конформация | |
| | Состояние центра с $q=0.7^*$ | Состояние центра с $q=0.3^*$ | Состояние центра с $q=0.35^*$ | Состояние центра с $q=0.65^*$ |
| Cu1 и Cu2 | 6.5 | 7.2 | 8.1 | 7.1 |
| Cu1 и Cu3 | 5.4 | 6.3 | 6.6 | 7.0 |
| Cu2 и Cu3 | 4.5 | 6.0 | 5.8 | 5.4 |

* Состояния трехъядерного центра *ptTcDH* для двух конформациях с разными заселенностями (q), выделенных на основании корреляции между заселенностями нескольких положений ионов меди и их лигандов и подробно рассмотренные в тексте.

Таблица 8. Длины координационных связей в трехъядерном медном центре в структуре комплекса *pmTcDH* с тиомочевинной (PDB ID: 8Q9Y).

| Структура | Комплекс фермента с тиомочевинной | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| Ион | Cu1 | | | | Cu2 | |
| Конформация | Закрытая | | Открытая | | Закрытая | |
| Заселенность | 0.7 | 0.3 | 0.35 | 0.65 | 0.7 | 0.3 |
| Лиганд (Длина связи, Å; заселенность) | Oδ1 D279 (2.2; 1.0) | Oδ1 D279 (2.2; 1.0) | Oδ1/2 D279 (2.5/2.4; 1.0) | Oδ1/2 D279 (2.5/2.4; 1.0) | НОН (2.3; 1.0) | НОН (2.3; 1.0) |
| | №2 Н171 (1.9; 1.0) | №2 Н171 (1.9; 1.0) | №2 Н171 (2.0; 1.0) | №2 Н171 (2.0; 1.0) | №2 Н100 (2.1; 1.0) | №2 Н100 (1.9; 1.0) |
| | №2 Н346 (1.9; 1.0) | №2 Н346 (1.9; 1.0) | №2 Н346 (2.0; 1.0) | №2 Н346 (2.0; 1.0) | №δ1 Н493 (2.1; 1.0) | №δ1 Н493 (1.8; 1.0) |
| | N2 Тиомочевинны (2.1; 0.7) | | НОН (2.2; 0.2) | | S Тиомочевинны (2.5; 0.7) | |
| | | | НОН (2.2; 0.2) | | | |
| Геометрия | Плоский квадрат | Треугольник | Октаэдр | Тетраэдр | Тетраэдр | Треугольник |
| Вероятный заряд* | +2 | +1 | +2 | +2 | +2 | +1 |

Таблица 8. Продолжение.

| Структура | Комплекс фермента с тиомочевинной | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Ион | Cu2 | | | Cu3 | | |
| Конформация | Открытая | | Закрытая | | Открытая | |
| Заселенность | 0.35 | 0.65 | 0.7 | 0.3 | 0.35 | 0.65 |
| Лиганд (Длина связи, Å; заселенность) | НОН (2.2; 1.0) | НОН (2.2; 1.0) | №2 Н402 (2.0; 1.0) | №2 Н402 (1.8; 1.0) | №2 Н402 (2.0; 1.0) | №2 Н402 (1.9; 1.0) |
| | №2 Н100 (1.9; 1.0) | №2 Н100 (2.0; 1.0) | №δ1 Н447 (2.0; 1.0) | №δ1 Н447 (1.9; 1.0) | №δ1 Н447 (2.0; 1.0) | №δ1 Н447 (1.9; 1.0) |
| | №δ1 Н493 (1.9; 1.0) | №δ1 Н493 (2.0; 1.0) | S Тиомочевинны (2.4; 0.7) | | НОН (1.9; 0.35) | |
| | №ζ К68 (2.2; 1.0) | | | | | |
| | НОН (2.0; 0.35) | | | | | |
| Геометрия | Тригональная бипирамида | Треугольник | Треугольник | Линейная | Треугольник | Линейная |
| Вероятный заряд* | +2 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

* Вероятный заряд предложен исходя из предпочтительной координации ионов Cu^{+1} и Cu^{+2} .

3.4. Связывание аналога субстрата селеноцианата в активном *pmTcDH*

3.4.1. Структура комплекса *pmTcDH* с аналогом субстрата селеноцианатом

Селеноцианат ($SeCN^-$) представляет собой селеносодержащий аналог субстрата. Ферментативная реакция с селеноцианатом в роли субстрата с последующим переносом электронов на внешний акцептор не протекает, хотя селен является более сильным восстановителем, чем сера [207]. Селеноцианат является эффективным конкурентным

ингибитором *tpTcDH* ($K_i = 6 \mu\text{M}$) и *pmTcDH* ($K_i = 1.2 \mu\text{M}$). Вследствие этого, было решено получить структуру комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом.

Комплекс *pmTcDH* с селеноцианатом получали методом настаивания кристаллов фермента в кристаллизационном растворе с 5 мМ SeCN^- в течение 24 часов. Концентрация ингибитора, превышающая 5 мМ, приводила к разрушению кристаллов. Настаивание кристаллов *pmTcDH* с селеноцианатом ухудшило дифракционные свойства кристаллов: дифракционный набор данных для структуры комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом был собран с разрешением 1.80 Å (Таблица 3).

Край поглощения рентгеновского излучения атомом селена находится в области длины волны около 1 Å [208], при которой были собраны дифракционные данные для структуры комплекса. Учитывая аномальный вклад атома селена в интенсивность рефлексов, для набора можно рассчитать аномальные карты электронной плотности и однозначно установить положение атомов селена в структуре. На аномальных картах электронной плотности максимумы, соответствующие атомам селена, были обнаружены в активном центре обеих субъединиц димера, закрытой и открытой (Рис. 30а, б). Таким образом, селеноцианат способен связываться и фиксироваться прочно в активном центре субъединиц в обеих конформациях, в отличие от молекулярного кислорода и тиомочевина.

Структура субъединиц комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом в закрытой и открытой конформациях полностью совпадает при совмещении по всем $\text{C}\alpha$ -атомам с субъединицами в аналогичной конформации свободного фермента (r.m.s.d. составляет ~ 0.15 Å). Из-за меньшего качества дифракционных данных структуры комплекса с селеноцианатом (Таблица 3) вторые положения ионов меди активного центра, охарактеризованные в двух других структурах *pmTcDH*, неразличимы на карте электронной плотности (Рис. 30а, б). Тем не менее, все три иона меди $\text{Cu}1$, $\text{Cu}2$ и $\text{Cu}3$ обеих субъединиц димера обладают полной заселенностью. Расстояния между ионами меди в активном центре и длины координационных связей между ионами меди и их лигандами представлены в таблицах 9, 10.

В закрытом активном центре ион меди $\text{Cu}1$ координирован по типу плоского квадрата атомами $\text{N}\epsilon 2$ H171, $\text{N}\epsilon 2$ H346, $\text{O}\delta 1$ D279 и N селеноцианата (Рис. 30в). Ион меди $\text{Cu}2$ координирован по типу тетраэдра, где атомы $\text{N}\delta 1$ H493, $\text{N}\epsilon 2$ H100 и молекула вода образуют основание, и атом Se селеноцианата находится в вершине. Ион меди $\text{Cu}3$ координирован по типу треугольника атомами $\text{N}\delta 1$ H447, $\text{N}\epsilon 2$ H402 и Se селеноцианата. На основании устройства координационной сферы можно предположить, что ионы меди $\text{Cu}1$ и $\text{Cu}2$ находятся в окисленном состоянии Cu^{+2} , ион $\text{Cu}3$ – в восстановленном состоянии Cu^{+1} , а состояние всего центра описывается $[\text{Cu}1^{+2}-\text{Cu}2^{+2}-\text{Cu}3^{+1}]$.

Положение аминокислотных остатков E253, H101, Q347 и F401 идентично положениям этих остатков в закрытом активном центре двух других структур (**Рис. 30в**). Максимум на $2Fo-Fc$ карте электронной плотности на месте консервативной молекулы воды W не мог быть описан молекулой растворителя, поскольку расстояние до каталитического аминокислотного остатка H101 было равно 2.2 Å (на рисунке не показано). Такое расстояние является коротким для водородной связи и соответствует координационной связи с ионом меди, например. Из-за недостаточного качества данных не представляется возможным однозначно утверждать, что это ион меди с маленькой заселенностью, а не молекула растворителя, поэтому данный максимум оставили в структуре неопианным. В структуре *tpTcDH* 6UWE данный максимум на карте электронной плотности на месте каталитической воды был описан как дополнительный ион меди Cu4 с заселенностью 0.5.

Селеноцианат с заселенностью 0.6 связывается активном центре *ptTcDH* в закрытой конформации аналогично тиомочевине в структуре комплекса (**Рис. 29б, 30в**). Атом селена выступает в роли мостикового лиганда для ионов меди Cu2 и Cu3. Длины координационных связей Se-Cu2 и Se-Cu3 составляют 2.6 и 2.5 Å, соответственно, (**Таблица 9, Рис. 30в**) и немного превышают значения длин связей между атомом серы и ионами меди в комплексе с тиомочевинной (**Таблица 8, Рис. 29б**). Атом азота селеноцианата образует координационную связь с ионом меди Cu1 и водородную связь с боковой группой аминокислотного остатка Q347. Геометрия иона селеноцианата в активном центре искажена от идеальной: молекула селеноцианата нелинейна, угол Se-C-N составляет 168°.

В активном центре *ptTcDH* в открытой конформации аномальный сигнал от атома селена также был обнаружен (**Рис. 30б**). Электронная плотность была различима только для одного атома селена (с заселенностью 0.7), а для атомов C и N селеноцианата отсутствовала. Вероятно, селеноцианат подвергся первому этапу каталитического превращения в открытой субъединице фермента, и атом селена остался связанным с ионами меди. Длины координационных связей Se-Cu2 и Se-Cu3 в открытой субъединице составляют 2.5 и 2.6 Å, соответственно (**Рис. 30г**).

В активном центре открытой субъединицы *ptTcDH* ион меди Cu1 координирован по типу тетраэдра атомами Nε2 H171, Nε2 H346, Oδ1 D279 и молекулой воды (**Рис. 30г**). Положение и координация ионов меди Cu2 и Cu3 в открытой конформации этой структуры отличается от двух предыдущих структур, поскольку в активном центре, вероятно, остался промежуточный продукт реакции. Ион меди Cu2 координирован по типу тетраэдра, где атомы Nδ1 H493, Nε2 H100 и молекула вода образуют основание, и атом Se находится в вершине. Аминокислотный остаток K68 не образует координационную связь с ионом меди

Cu₂. Ион меди Cu₃ координирован по типу треугольника атомами Nδ1 H447, Nε2 H402 и атомом Se. Положение ионов меди Cu₂ и Cu₃ соответствует положению ионов в закрытом активном центре со связанным лигандом (**Рис. 26а, 29а**), а не исходному свободному состоянию активного центра в открытой конформации до связывания лиганда (**Рис. 26б**). Исходя из геометрии координации ионов меди активного центра, можно предположить, что ионы меди Cu₁ и Cu₂ находятся в окисленном состоянии Cu²⁺, ион Cu₃ – в восстановленном состоянии Cu⁺, а состояние всего центра описывается [Cu¹⁺²-Cu²⁺²-Cu³⁺¹].

Положение аминокислотных остатков E253, H101, Q347 и F401 в активном центре субъединицы в открытой конформации структуры комплекса с селеноцианатом совпадает с их положениями в структуре свободного фермента и комплекса с тиомочевинной (**Рис. 26в, 30г**). Как и в закрытой конформации, максимум на *2Fo-Fc* карте электронной плотности на месте консервативной молекулы воды W не был интерпретирован, поскольку расстояние до аминокислотного остатка H101 не соответствует длине водородной связи.

Селеноцианат в активном центре *pmTcDH*, вероятно, подвергается в кристалле в одной из субъединиц димера, ферментативному расщеплению. Однако стоит напомнить, что фермент не способен использовать селеноцианат в качестве донора электронов и восстанавливать акцептор электронов. Этот факт можно объяснить следующим образом. Фермент способен связывать селеноцианат и катализировать на первом обороте стадию с формированием промежуточного биядерного медного комплекса с мостиковым атомом селена. Геометрия трехъядерного медного центра *pmTcDH* способствует образованию более прочного комплекса с селеном, чем с серой, поскольку при большем размере атома селена значение длин координационных связей с ионами меди активного центра близко к значениям длин связей с атомом серы в структуре комплекса с тиомочевинной. Вероятно, это является причиной того, что в реакции с селеноцианатом в качестве субстрата восстановление акцептора электронов не происходит. Данное предположение требует дальнейшего экспериментального подтверждения. Интересно отметить, что белок SELENBP1 сначала также был охарактеризован как селен-связывающий [209], и уже позднее обнаружили у него медь-зависимую метантиолоксидазную активность [115].

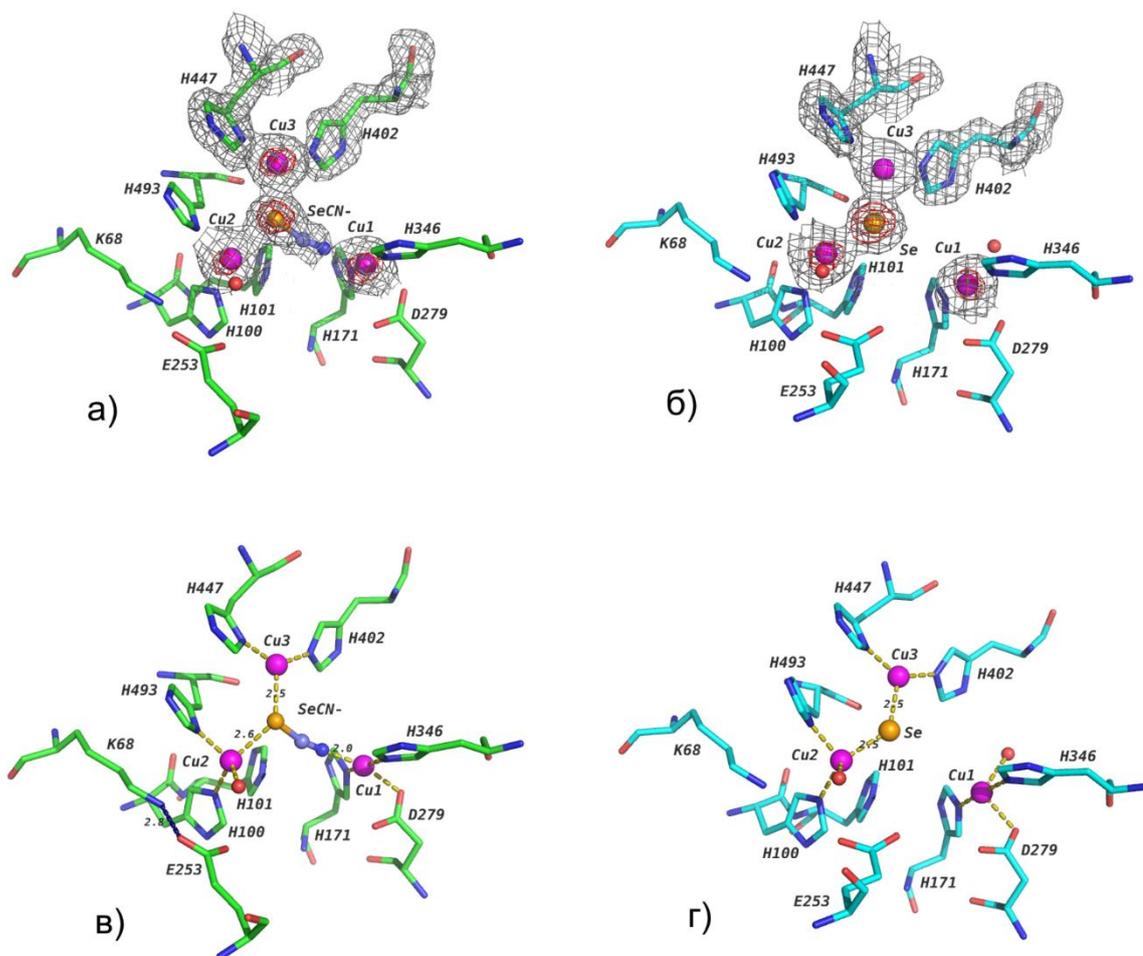


Рис. 30. Аномальная карта на уровне срезки 5σ и $2Fo-Fc$ карта электронной плотности на уровне срезки 1σ показаны для ионов меди, лиганда и остатков H402 и H447 структуры комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом (PDB ID: 8YOU) в виде красной и серой сети: для субъединицы в закрытой конформации (а), для субъединицы в открытой конформации (б). Схема трехъядерного медного центра комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом в закрытой (в) и в открытой (г) конформациях. Ионы меди Cu1, Cu2, Cu3 показаны розовыми сферами. Молекулы растворителя показаны красными сферами. Атом селена показан золотой сферой. Координационные и водородные связи показаны золотыми и темно-синими пунктирными линиями, соответственно.

Таблица 9. Расстояния между ионами меди Cu1, Cu2, Cu3 активного центра субъединиц в закрытой и открытой конформации в структуре комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом (PDB ID: 8YOU).

| Пары ионов меди | Расстояния между парами ионов меди активного центра, Å | |
|-----------------|--|----------------------|
| | Закрытая конформация | Открытая конформация |
| Cu1 и Cu2 | 6.1 | 6.5 |
| Cu1 и Cu3 | 6.0 | 6.3 |
| Cu1 и Cu2 | 4.7 | 4.7 |

Таблица 10. Длины координационных связей в трехъядерном медном центре в закрытой и открытой конформации в структуре комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом (PDB ID: 8YOU).

| Структура | Комплекс с SeCN ⁻ | | | | | |
|--|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------|
| | Cu1 | | Cu2 | | Cu3 | |
| Ион | | | | | | |
| Конформация | Закрытая | Открытая | Закрытая | Открытая | Закрытая | Открытая |
| Заселенность | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Лиганд (Длина связи, Å; заселенность) | Oδ1 D279 (2.1; 1.0) | Oδ1 D279 (2.3; 1.0) | НОН (2.4; 1.0) | НОН (2.3; 1.0) | Nε2 H402 (2.0; 1.0) | Nε2 H402 (2.0; 1.0) |
| | Nε2 H171 (1.9; 1.0) | Nε2 H171 (2.0; 1.0) | Nε2 H100 (2.0; 1.0) | Nε2 H100 (2.0; 1.0) | Nδ1 H447 (2.0; 1.0) | Nδ1 H447 (2.0; 1.0) |
| | Nε2 H346 (2.0; 1.0) | Nε2 H346 (2.0; 1.0) | Nδ1 H493 (2.0; 1.0) | Nδ1 H493 (2.1; 1.0) | Se SeCN ⁻ (2.5; 0.6) | Se (2.6; 0.7) |
| | N SeCN ⁻ (2.0; 0.6) | НОН (2.4; 0.7) | Se SeCN ⁻ (2.6; 0.6) | Se (2.6; 0.7) | | |
| Геометрия | Плоский квадрат | Тетраэдр | Тетраэдр | Тетраэдр | Треугольник | Треугольник |
| Вероятный заряд* | +2 | +2 | +2 | +2 | +1 | +1 |

* Вероятный заряд предложен исходя из предпочтительной координации ионов Cu⁺¹ и Cu⁺².

3.4.2. Спектр ЭПР *pmTcDH* при связывании ингибитора – селеноцианата

Состояние трехъядерного медного центра *pmTcDH* после связывания селеноцианата и образования мостикового комплекса двух ионов меди Cu2 и Cu3 с атомом селена было охарактеризовано методом спектроскопии ЭПР в X-диапазоне. К ферменту добавляли селеноцианат до конечной концентрации 1 мМ в отсутствие акцептора электронов и записывали спектр. Общая интегральная интенсивность спектра после добавления селеноцианата снижалась в ~ три раза по сравнению со спектром свободного фермента (**Рис. 31а**). Симуляция полученного спектра комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом показала, что связывание селеноцианата приводит к восстановлению двух ионов меди и в спектре ЭПР виден только один ион меди в состоянии Cu⁺² с параметрами, представленными в **таблице 11**. Стоит отметить, что рассчитанные параметры для данного спектра не совпадают ни с одними параметрами ионов меди в свободной форме фермента (**Таблица 6**). Полученный результат наглядно демонстрирует, насколько чувствителен метод спектроскопии ЭПР к любым изменениям координационной сферы парамагнитного центра. Важная деталь также была обнаружена в спектре комплекса *pmTcDH* с селеноцианатом в процессе анализа второй производной – в области перпендикулярной компоненты спектра были разрешены дополнительные линии. Эти линии представляют собой результат дополнительных сверхтонких взаимодействий неспаренного электрона

меди с ядрами трех азотных лигандов (**Таблица 12**), т.е. три атома азота участвуют в координации иона. Полученные спектральные данные хорошо согласуются с кристаллической структурой: ионы меди Cu2 и Cu3 координируются атомом селена и восстанавливаются, а ион меди Cu1 остается окисленным и координируется тремя атомами азота, включая один атом селеноцианата. После связывания селеноцианата трехъядерный центр принимает состояние $[Cu1^{+2}-Cu2^{+1}-Cu3^{+1}]$. При этом, вероятно, затруднены дальнейшая диссоциация селена из активного центра и передача электронов на акцептор.

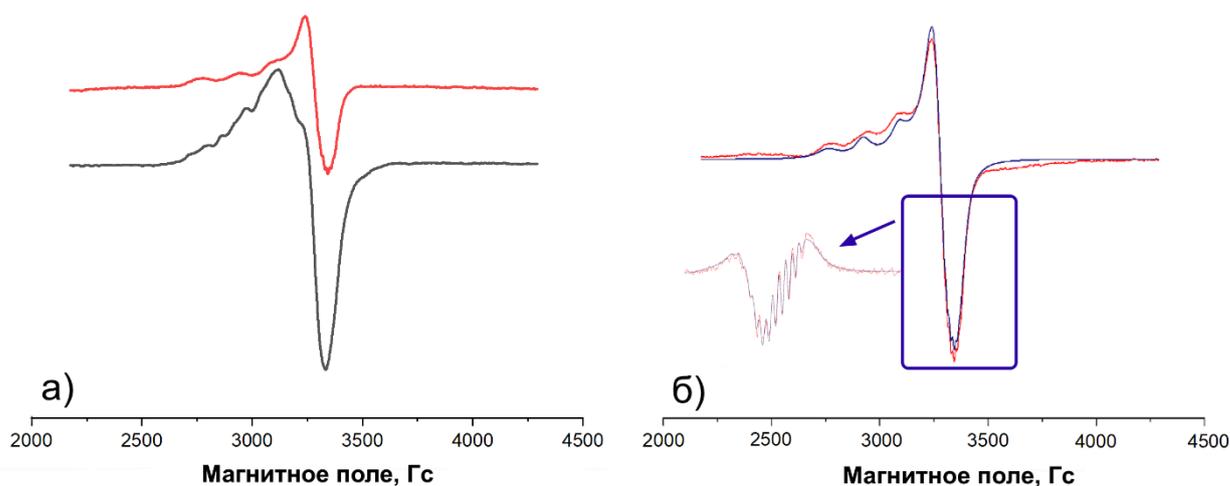


Рис. 31. Спектры ЭПР в X-диапазоне при температуре 20 К *pmTcDH* в свободной форме (черный) и в комплексе с 1 мМ селеноцианата (красный) без нормирования амплитуды (а). Спектр комплекса *pmTcDH* с 1 мМ селеноцианата: экспериментальный (красный) и рассчитанный (синий) (б). Во врезке в правом нижнем углу показаны вторые производные спектров, демонстрирующие дополнительные линии суперсверхтонких взаимодействий с тремя азотными лигандами: экспериментальный (красный) и рассчитанный (синий).

Таблица 11. Параметры рассчитанного спектра ЭПР в X-диапазоне (частота МИ ~ 9.5 ГГц) комплекса *pmTcDH* с ингибитором селеноцианатом.

| g_x | g_y | g_z | $A_x, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ | $A_y, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ | $A_z, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ |
|-------|-------|-------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 2.060 | 2.042 | 2.246 | 9.2 | 16.0 | 173.8 |

Таблица 12. Параметры констант суперсверхтонких взаимодействий иона меди с тремя азотными лигандами в спектре комплекса *pmTcDH* с ингибитором селеноцианатом.

| Атом азота | $A_x, \text{ Гс}$ | $A_y, \text{ Гс}$ | $A_z, \text{ Гс}$ |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| N ₁ | 14.99 | 14.48 | - |
| N ₂ | 15.32 | 16.04 | - |
| N ₃ | 13.25 | 13.06 | - |

3.5. Влияние ионов меди в активном центре на упаковку и конформацию молекул *pmTcDH* в кристалле

3.5.1. Структура апоформы *pmTcDH*

Различие в конформации субъединиц олигомерного белкового комплекса в кристалле может быть обусловлено связыванием кофактора или субстрата в активном центре [210], поэтому для установления возможной роли ионов меди активного центра *pmTcDH* на упаковку и конформацию молекул фермента в кристалле была решена структура апоформы. Перед кристаллизацией образец *pmTcDH* не активировали ионами меди. Кристаллы апоформы *pmTcDH* были получены в тех же условиях кристаллизации, что и кристаллы холоформы фермента (Таблица 3), однако, они принадлежали к другой пространственной группе – $C222_1$. В независимой части элементарной ячейки обнаружены три молекулы *pmTcDH*: один димер (субъединицы А и В) и одна субъединица (субъединица С). Другая субъединица (С') второго димера относится к симметричной части $(-x, y, -z+1/2; 2, 0, -1)$.

Все три субъединицы *pmTcDH* из независимой части элементарной ячейки полностью совпадают при совмещении по всем $C\alpha$ -атомам (Таблица 13) и принимают закрытую конформацию, что подтверждает сравнение со структурами закрытой и открытой конформаций холоформы свободного фермента (Таблица 13). В закрытой конформации *pmTcDH* аминокислотные остатки подвижной петли 251-266 образуют большее число водородных связей (13) с соседними участками полипептидной цепи по сравнению с открытой конформацией (9 водородных связей). Водородные связи между аминокислотными остатками E253 и K68, E253 и Y129, G257 и Y397, E259 и H346 характерны только для закрытой конформации. Одинаковое число аминокислотных остатков различимо на N-концевом участке полипептидной цепи трех молекул на карте электронной плотности, и дополнительный ион меди Cu_{add} не обнаружен в структуре. В ходе анализа кристаллических контактов структур апоформы и холоформы не выявлено взаимосвязи между конформациями молекул и числом симметричных контактов.

Таблица 13. Сравнение субъединиц апоформы *pmTcDH* (PDB ID: 8Z75), *pmTcDHCu⁺²* (PDB ID: 8Z76) и *pmTcDHCu⁺¹* (PDB ID: 8Z77) с закрытой субъединицей апоформы и с закрытой и открытой субъединицами холоформы (PDB ID: 8Q9X). Приведены значения среднеквадратичного отклонения (Å) при совмещении по С α -атомам. Название субъединиц, принимающих закрытую конформацию, обозначены жирным шрифтом.

| Структура | Субъединицы | Среднеквадратичное отклонение (r. m.s.d.), Å | | |
|------------------------------|-------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | | Закрытая субъединица апоформы | Закрытая субъединица холоформы | Открытая субъединица холоформы |
| Апоформа <i>pmTcDH</i> | A | | 0.26 | 0.59 |
| | B | 0.22 | 0.23 | 0.62 |
| | C | 0.17 | 0.25 | 0.61 |
| <i>pmTcDH^{Cu+2}</i> | A | 0.21 | 0.29 | 0.52 |
| | B | 0.25 | 0.21 | 0.61 |
| | C | 0.29 | 0.26 | 0.43 |
| <i>pmTcDH^{Cu+1}</i> | A | 0.39 | 0.41 | 0.38 |
| | B | 0.26 | 0.20 | 0.57 |
| | C | 0.42 | 0.39 | 0.42 |

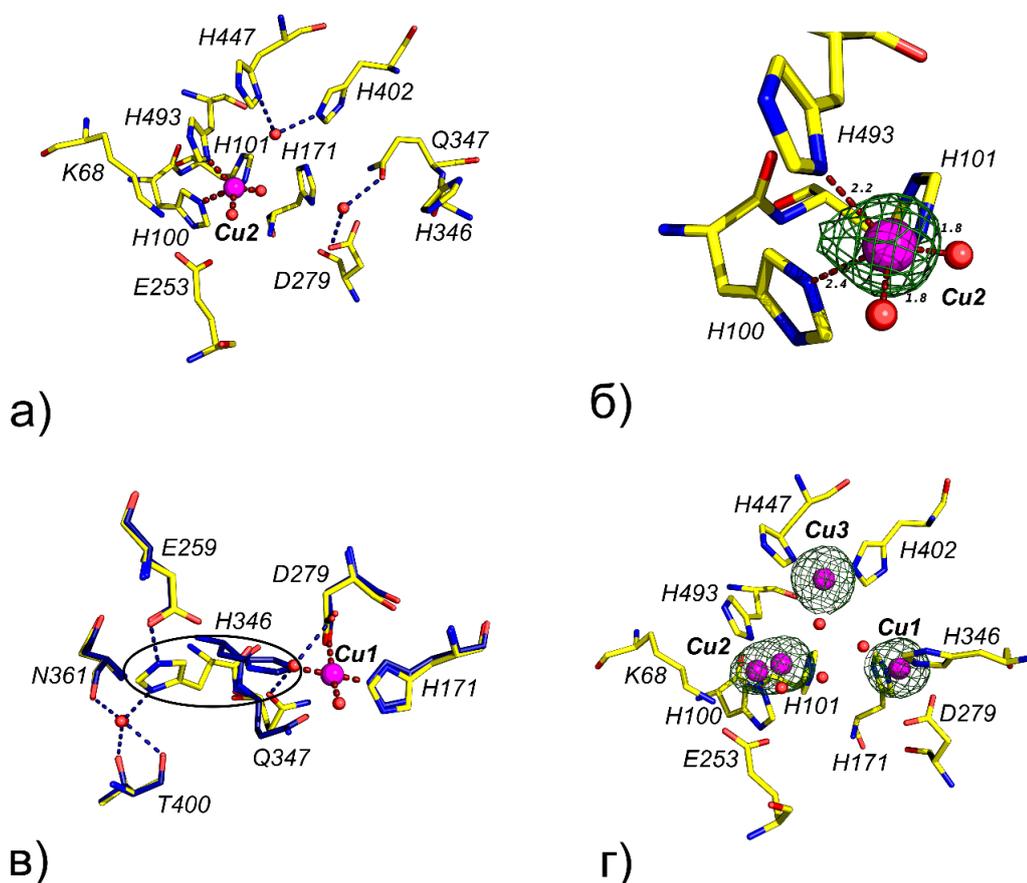


Рис. 32. Активный центр апоформы *pmTcDH* (PDB ID: 8Z75, а). Карта разностной электронной плотности для иона меди Cu2 с заселенностью 0.2 показана зеленой сетью на уровне срезаки 3 σ структуры апоформы (б). Совмещение по всем С α -атомам структур апоформы (PDB ID: 8Z75, желтая) с закрытой субъединицей холоформы (PDB ID: 8Q9X, синяя) (в). Аминокислотный остаток H346, изменяющий свой положение отмечен овалом. Карта разностной электронной плотности на уровне срезаки 3 σ показана для ионов меди Cu1, Cu2 и Cu3 зеленой сетью после настаивания кристаллов апоформы ионами меди Cu⁺² (PDB ID: 8Z76, г). Ионы меди показаны розовыми сферами, а молекулы растворителя – красными сферами. Координационные и водородные связи показаны красным и темно-синим цветами, соответственно.

Активный центр во всех трех субъединицах апоформы *pmTcDH* хорошо структурирован, несмотря на отсутствие кофакторов. Аминокислотные остатки активного центра *pmTcDH* различимы на карте электронной плотности и занимают одно положение, в отличие от структуры неактивированного образца *tpTcDH* (PDB ID: 6G50). В активном центре апоформы отсутствуют ионы меди Cu1 и Cu3 (**Рис. 32а**). Однако, на месте иона меди Cu2 во всех трех субъединицах из независимой части был обнаружен максимум на разностной карте электронной плотности. Связавшимся лигандом в этом положении может быть только ион металла с невысокой заселенностью, поскольку расстояния от максимума до атомов азота гистидинов были короткие для водородной связи и соответствовали длине координационной связи. Согласно данным ICP-MS, апоформа *pmTcDH* связывает 0.1 иона меди в расчете на молекулу, поэтому данный максимум был описан ионом меди с заселенностью 0.2. Вероятно, фермент в процессе экспрессии в клетках *E. coli* связывает медь. Ион меди Cu2 располагается в положении, удаленном от K68 (**Рис. 32б**), что коррелирует с закрытой конформацией субъединицы. Ион координирован по типу тетраэдра атомами N δ 1 H493, N ϵ 2 H100 и двумя молекулами воды. Одна из молекул воды является консервативной молекулой воды W. В ранее решенных структурах данная молекула воды не входила в координационную сферу иона меди Cu2. Возможно, в структуре апоформы из-за отсутствия других лигандов ион меди Cu2 образует координационную связь с этой молекулой.

Интересно отметить, что положения аминокислотных остатков, координирующих ионы меди Cu2 и Cu3, в апоформе не изменились. В то время как, наблюдаются перестройки координирующих лигандов в центре связывания иона меди Cu1 (**Рис. 32в**). Боковая группа H346 отворачивается от места связывания иона меди Cu1 на $\sim 180^\circ$ и образует водородные связи с аминокислотным остатком E259, входящим в состав «закрывающей» петли, и молекулой воды, удерживаемой водородными связями с основной цепью аминокислотных остатков N361 и T400. Сеть водородных связей между подвижной «закрывающей» петлей 251-266 и «жестко» фиксированными участками полипептидной цепи посредством H346 стабилизирует также закрытую конформацию субъединицы в отсутствие кофактора. Боковая группа аминокислотного остатка Q347 фиксирована в центре иона Cu1 водородными связями с D279 и C-концевым T513. Такая позиция боковой цепи Q347 стерически препятствует размещению боковой цепи H346 в положении для координации иона Cu1.

Положение аминокислотных остатков H101, E253 и F401 полностью совпадает с аналогичным положением остатков в закрытой конформации холоформы фермента.

3.5.2. Встраивание ионов меди в активный центр апоформы в кристалле

Для восстановления трехъядерного медного центра, кристаллы апоформы *pmTcDH* настаивали ионами меди Cu^{+2} (*pmTcDH*^{Cu⁺²}, PDB ID: 8Z76) и ионами меди Cu^{+1} (*pmTcDH*^{Cu⁺¹}, PDB ID: 8Z77), поскольку часто для встраивания кофакторов в активный центр медных белков в кристалле требуется определенная степень окисления ионов меди [54, 187]. Формирование полного трехъядерного центра в каждой субъединице димера *pmTcDH* было достигнуто в ходе обеих процедур. В первом случае требуется большее время настаивания, что связано, вероятно, с различным устройством гидратной оболочки ионов меди Cu^{+2} и Cu^{+1} .

Сравнение всех трех субъединиц из независимой части структур *pmTcDH*^{Cu⁺²} и *pmTcDH*^{Cu⁺¹} со структурами апоформы и холоформы показало, что связывание ионов меди в активном центре приводит к изменению конформации. При настаивании кристаллов ионами меди Cu^{+2} положение петли 251-266 в двух субъединицах димера А и В соответствует закрытой конформации, а в субъединице С обнаружены два положения данной петли (**Рис. 33а**). При настаивании кристаллов ионами меди Cu^{+1} одна субъединица В оставалась в закрытой конформации, а субъединицы А и С переходили в открытую конформацию. Стоит отметить, что аминокислотные остатки F401 и Q347, формирующие стенки активного центра и участвующие в конформационных переходах, и каталитический E253, стабилизирующий петлю 251-266 в закрытой конформации, плохо различимы на карте электронной плотности в обеих структурах. Это свидетельствует о подвижности этих участков полипептидной цепи фермента в кристалле. Полученные данные позволили выявить набор состояний димера *pmTcDH*, где обе субъединицы находятся в закрытой конформации (**Рис. 33б**), принимают разные конформации (**Рис. 33в**) и обе в открытой конформации (**Рис. 33г**). Контакты с симметричными молекулами не препятствуют процессу конформационных переходов у субъединиц *pmTcDH* в кристалле. Для субъединиц А и С, формирующих большее число контактов, наблюдаются конформационные переходы и большая подвижность петли 251–266 в сравнении с субъединицей В в обеих структурах *pmTcDH*^{Cu⁺²} и *pmTcDH*^{Cu⁺¹}. Подводя итог, в отсутствие ионов меди молекула фермента в кристалле находится в наиболее «жесткой» - закрытой конформации. Наличие ионов меди определяют упаковку и конформацию молекул в кристалле.

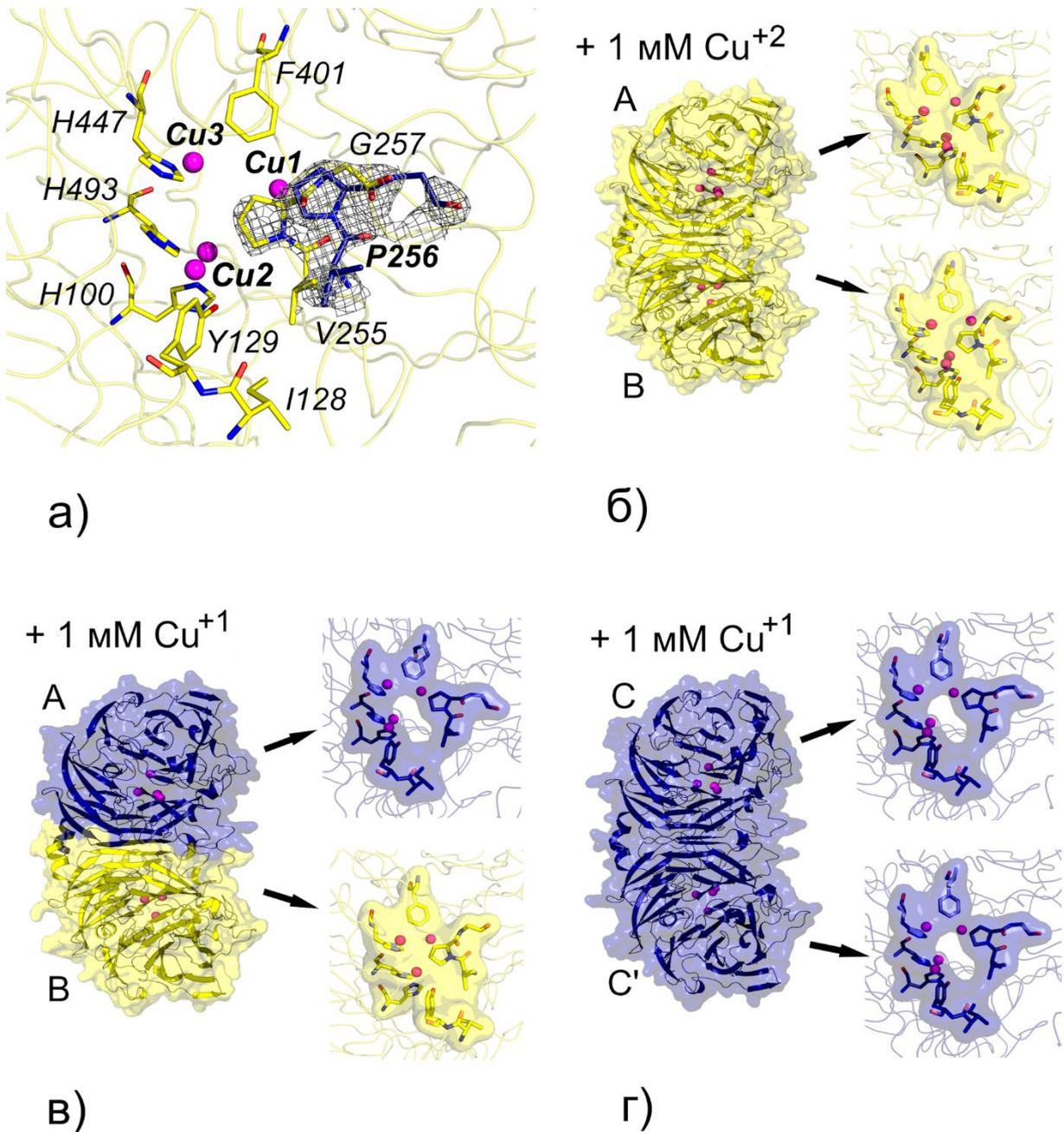


Рис. 33. Два положения аминокислотного остатка P256 на карте электронной плотности $2Fo - Fc$ на уровне срезки 1σ , соответствующие закрытой и открытой конформации, в активном центре субъединицы С структуры $pmTcDHCu^{+2}$ после настаивания кристаллов ионами меди Cu^{+2} (а, PDB ID: 8Z76). Конформации субъединиц димера $pmTcDH$ после настаивания кристаллов ионами меди: две закрытые субъединицы А и В в структуре $pmTcDHCu^{+2}$ (б, PDB ID: 8Z76), открытая А (сверху) и закрытая В (внизу) субъединицы в структуре $pmTcDHCu^{+1}$ (в, PDB ID: 8Z77), две открытые субъединицы С и симметричная С' в структуре $pmTcDHCu^{+1}$ (г, PDB ID: 8Z77). На панелях б–г приведены врезки с изображением остатков, формирующих субстратный канал.

3.6. Точечные замены аминокислотных остатков в активном центре TcDH

Метод точечного мутагенеза аминокислотных остатков является мощным инструментом в исследовании функционирования ферментов. Именно этим методом была показана значимость каталитических остатков гистидина и глутамата в активном центре

tpTcDH для правильного фолдинга и осуществления каталитической реакции [61]. Однако роль некоторых аминокислотных остатков, как Q347 и F401 у *pmTcDH* или Q382 и F436 у *tpTcDH* (Рис. 22), консервативных у ряда микроорганизмов [185], не до конца ясна. Важным вопросом для понимания механизма действия TcDH также остается роль ионов меди Cu² и Cu³ в переносе электронов от субстрата на внешний акцептор. Получение неполного медного центра TcDH путем замены координирующих гистидинов может способствовать установлению роли ионов Cu¹, Cu³ и Cu³ в ферментативной реакции. В связи с чем, были получены рекомбинантные формы *tpTcDH* с заменой F436Q (Рис. 34а) и *pmTcDH* с заменой H447Q (Рис. 34б) и установлены их пространственные структуры.

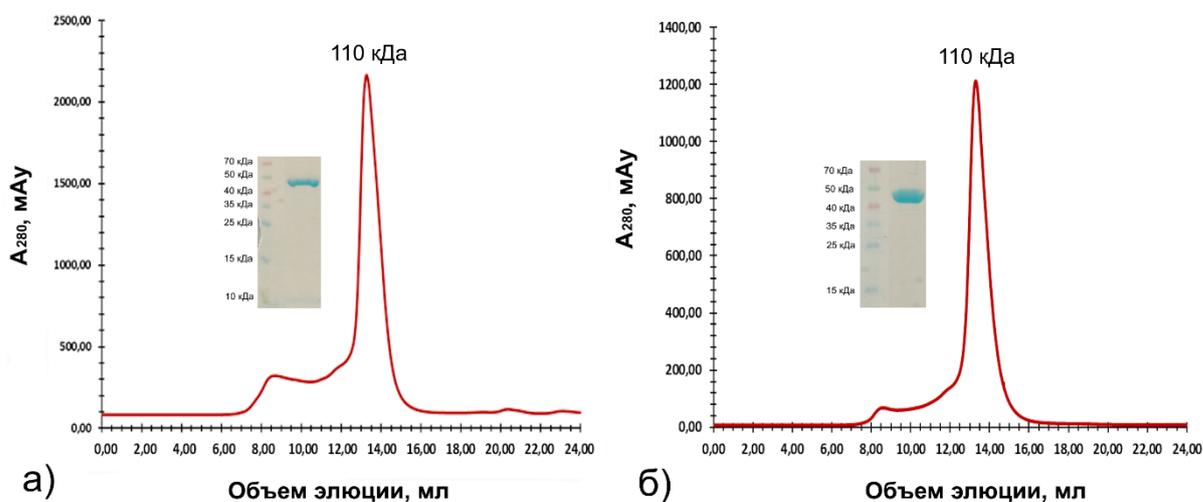


Рис. 34. Основной пик, соответствующий димеру, на профиле элюции рекомбинантных форм *tpTcDH* с заменой F436Q в 25 мМ боратном буфере, pH 9.5, 150 мМ NaCl (а) и *pmTcDH* с заменой H447Q в 25 мМ MOPS, pH 7.5, 150 мМ NaCl (б) на колонке Superdex 200. Электрофореграммы препаратов представлены на врезках соответствующих панелей. Обе рекомбинантные формы не обладали ферментативной активностью.

3.6.1. Структура рекомбинантной формы *tpTcDH* с заменой F436Q

Аминокислотный остаток F436 (нумерация приведена для *tpTcDH*) консервативен у *tpTcDH* и *pmTcDH*, находится в ближайшем окружении иона меди Cu³ и формирует стенку активного центра. Для установления роли данного аминокислотного остатка в каталитическом процессе его заменили на гидрофильный глутамин. Рекомбинантная форма *tpTcDH* F436Q представляет собой димер в растворе (Рис. 34а), содержит три иона меди на молекулу по данным ICP-MS и не проявляет ферментативной активности. Кристаллы рекомбинантной формы были двойниками (Таблица 3), как и большинство кристаллов фермента «дикого типа». В независимой части элементарной ячейки обнаружен тетрамер *tpTcDH* F436Q, состоящий из внутренних и внешних субъединиц. Замена F436Q не повлияла на правильность фолдинга фермента. Остаток Q436 был различим на картах

электронной плотности во всех четырех субъединицах независимой части элементарной ячейки.

В активном центре *tpTcDH* F436Q обнаружены только два иона меди Cu1 и Cu2. На месте иона меди Cu3 располагается максимум на карте электронной плотности, который может быть описан только молекулой растворителя из-за расстояний до координирующих N437 и N482, превышающих длину координационной связи и соответствующих длине водородной связи. Остаток F436 предшествует лиганду иона меди Cu3, аминокислотному остатку N437, поэтому замена могла повлиять на окружение иона меди и аффинность связывания. Однако данные ICP-MS это предположение опровергают, следовательно, фермент до кристаллизации содержал полный трехъядерный центр. Отсутствие иона меди Cu3 в активном центре в пространственной структуре – частая проблема кристаллических структур *tpTcDH* «дикого типа» [61].

Все субъединицы тетрамера *tpTcDH* имеют одинаковую конформацию, либо открытую конформацию в большинстве структур, либо закрытую конформацию в одной структуре (PDB ID: 6UWE). Аминокислотный остаток P291 (P256 у *pmTcDH*), выполняющий ключевую роль в закрытии субстратного канала, смещается к Y164 и H528 (Y129 и H493 у *pmTcDH*) и закрывает доступ в активный центр. Движение P291 сопровождается флип-флоп-переходом аминокислотного остатка в положении 436 (401 у *pmTcDH*) и поворотом боковой группы Q382 (Q347 у *pmTcDH*). В открытой конформации (**Рис. 35а**) карбонильный кислород остатка 436 (угол ψ составляет 10.8°) образует водородную связь с молекулой растворителя из координационной сферы Cu1, тогда как Q382 образует две водородные связи с боковой и основной цепью T548 (T513 у *pmTcDH*). При переходе в закрытую конформацию (**Рис. 35б**) боковая группа Q382 образует одну водородную связь с T548, поворачивается в сторону иону Cu1, замещает молекулу растворителя из координационной сферы этого иона меди и занимает место карбонильной группы F436. Карбонильный кислород аминокислотного остатка F436 (угол ψ составляет -138.0°) поворачивается в направлении M395. Наконец, в закрытой форме ароматическое кольцо F436 участвует в стэкинг-взаимодействиях с H381 (H346 у *pmTcDH*) и W452 (W417 у *pmTcDH*).

Совмещение структуры *tpTcDH* F436Q по всем C α -атомам со структурами фермента «дикого типа» в открытой (PDB ID: 6I3Q) (r.m.s.d. 0.18 Å) и закрытой конформациях (PDB ID: 6UWE) (r.m.s.d. 0.37 Å) показало, что положение P291 во всех четыре субъединицах рекомбинантной формы совпадает с его положением в открытой конформации. Однако, в случае *tpTcDH* F436Q движение P291 не синхронизировано с конформационными изменениями Q382 и Q436. В одной из внешних субъединиц *tpTcDH* F436Q конформация

боковой цепи Q382, карбонильной группы Q436 и положение P291 соответствуют открытой конформации (**Рис. 35в**). Напротив, в структурах обеих внутренних субъединиц положения Q382 и Q436 не коррелируют с движением P291 (**Рис. 35г**): оба аминокислотных остатка глутамина занимают положения, соответствующие закрытой конформации фермента при открытом субстратном канале. Различие в положении большой гидрофобной боковой группы F436 в открытой и закрытой конформациях позволяет рассматривать этот остаток как один из триггеров в конформационных переходах. Таким образом, замена F436Q привела к нарушению тонко настроенных взаимодействий в архитектуре активного центра, что затронуло правильность конформационных переходов.

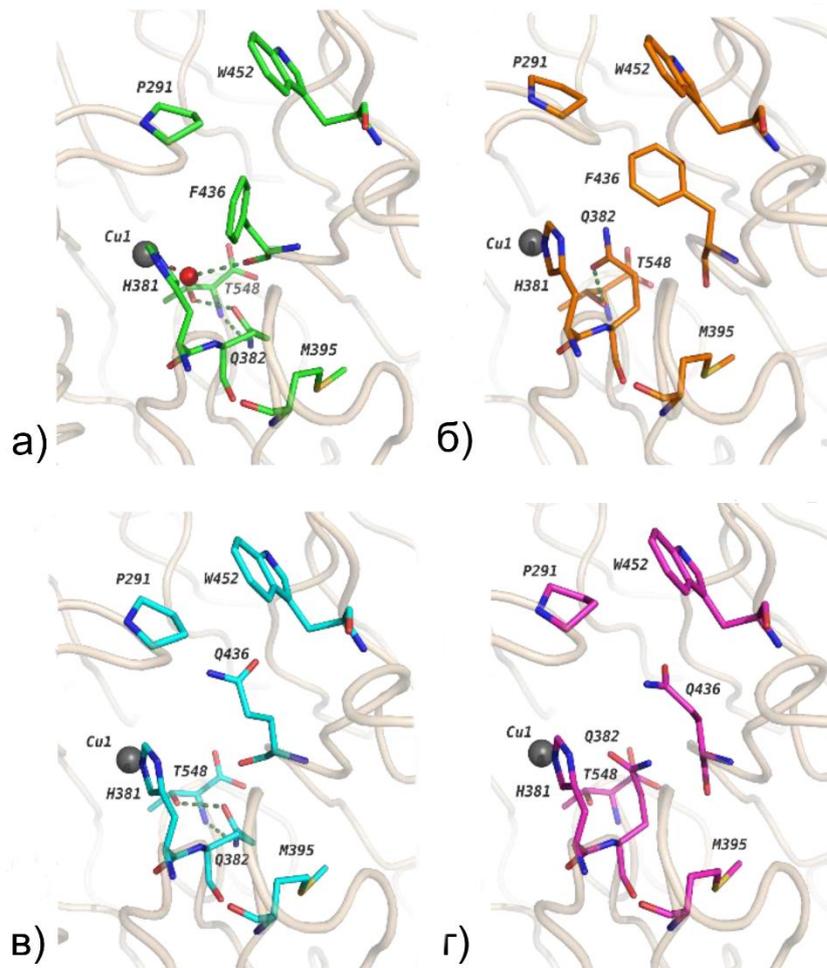


Рис. 35. Расположение аминокислотных остатков Q382 и 436 в открытой субъединице нативной *tpTcDH* (PDB ID: 6I3Q) (а), в закрытой субъединице нативной *tpTcDH* (PDB ID: 6UWE) (б), во внешней субъединице *tpTcDH* F436Q (PDB ID: 8BPN) (в), во внутренней субъединице *tpTcDH* F436Q (PDB ID: 8BPN) (г). Водородные связи показаны пунктирными линиями.

3.6.2. Структура *ptTcDH* с заменой H447Q

Аминокислотный остаток H447 у *ptTcDH* участвует в координации иона меди Cu³⁺. Замена данного остатка на глутамин, не образующий прочные координационные связи с ионами меди, вероятно, не повлияет на правильность общей укладки белка, но может

привести к неспособности связывать ион меди Cu³. Данная замена позволит получить вариант неполного медного центра и упростить расшифровку спектров ЭПР. Рекомбинантная форма *pmTcDH* с заменой H447Q представляет собой димер в растворе (Рис. 34б), содержит 2.5 иона меди на молекулу по данным ICP-MS и не проявляет ферментативной активности.

Кристаллы *pmTcDH* H447Q, активированной по стандартной методике 10-кратным мольным избытком ионов Cu⁺², были получены в условиях кристаллизации фермента «дикого типа». Однако данные кристаллы давали дифракционную картину с разрешением не лучше, чем 6 Å. В связи с чем кристаллическую структуру активированной *pmTcDH* H447Q решали в два этапа. На первом этапе была установлена структура неактивированной *pmTcDH* H447Q из аналогичных условий кристаллизации (PDB ID: 8YU5). Структура активированной *pmTcDH* H447Q была получена настаиванием кристаллов неактивированной формы в течение 9 часов в кристаллизационном растворе, содержащем 1 mM CuCl₂ и 1 mM аскорбата натрия.

В структуре неактивированной *pmTcDH* H447Q (PDB ID: 8YU5) субъединицы димера из независимой части элементарной ячейки находились в закрытой и открытой конформациях, как и в структуре свободной холоформы фермента «дикого типа». Несмотря на отсутствие процедуры активации перед кристаллизацией, дополнительный поверхностный ион меди Cu_{add} с заселенностью 0.7 был обнаружен на N-конце субъединицы в закрытой конформации. Точечная замена H447Q была видна на карте электронной плотности в обеих субъединицах димера.

В активном центре субъединицы в закрытой конформации неактивированной *pmTcDH* H447Q обнаружены такие же перестройки, как и в апоформе фермента «дикого типа» (Рис. 32в, 36а). Аминокислотный остаток H346, участвующий в координации иона меди Cu1, развернут от медного центра в сторону и образует водородные связи с E259 и через молекулу воды с двумя аминокислотными остатками N361 и T400. При этом на месте ионов меди Cu1 и Cu2 обнаружены максимумы на карте электронной плотности, которые могут быть описаны только ионами металла с невысокой заселенностью. Данные максимумы описали ионами меди, предполагая, что *pmTcDH* H447Q может связать небольшое количество ионов меди в процессе экспрессии. Ион меди Cu1 с заселенностью 0.2 координирован атомами Nε2 H171, Oδ1 D279 и двумя молекулами воды по типу плоского квадрата (Рис. 36а). Ион меди Cu2 с заселенностью 0.2 координирован по типу тетраэдра атомами Nδ1 H493, Nε2 H100 и двумя молекулами воды, причем одна из них является атакующей молекулой воды W. Ион меди Cu3 отсутствует. Положение каталитических аминокислотных остатков H101 и E253 аналогично их положению в

закрытой субъединице апоформы и холоформы фермента «дикого типа». Структура активного центра субъединицы в открытой конформации *pmTcDH* H447Q почти совпадает со структурой активного центра открытой субъединицы фермента «дикого типа» (Рис. 296, 366). Ион меди Cu1 с заселенностью 0.8 координирован атомами Nε2 H171, Nε2 H346, Oδ1 и Oδ2 D279 и двумя молекулами воды по типу октаэдра. Ион меди Cu2 с заселенностью 0.5 координирован пятью лигандами по типу тригональной бипирамиды при участии K68. Ион меди Cu3 отсутствует в активном центре. Каталитические E253 и H101 образуют водородные связи с атакующей молекулой воды W. Стоит подчеркнуть, что зафиксированная разница между заселенностью ионов меди Cu1 и Cu2 в закрытой и открытой конформациях подтверждает заключение, сделанное на основании данных для апоформы *pmTcDH* «дикого типа», что состав медного центра фермента влияет на его упаковку и конформацию в кристалле.

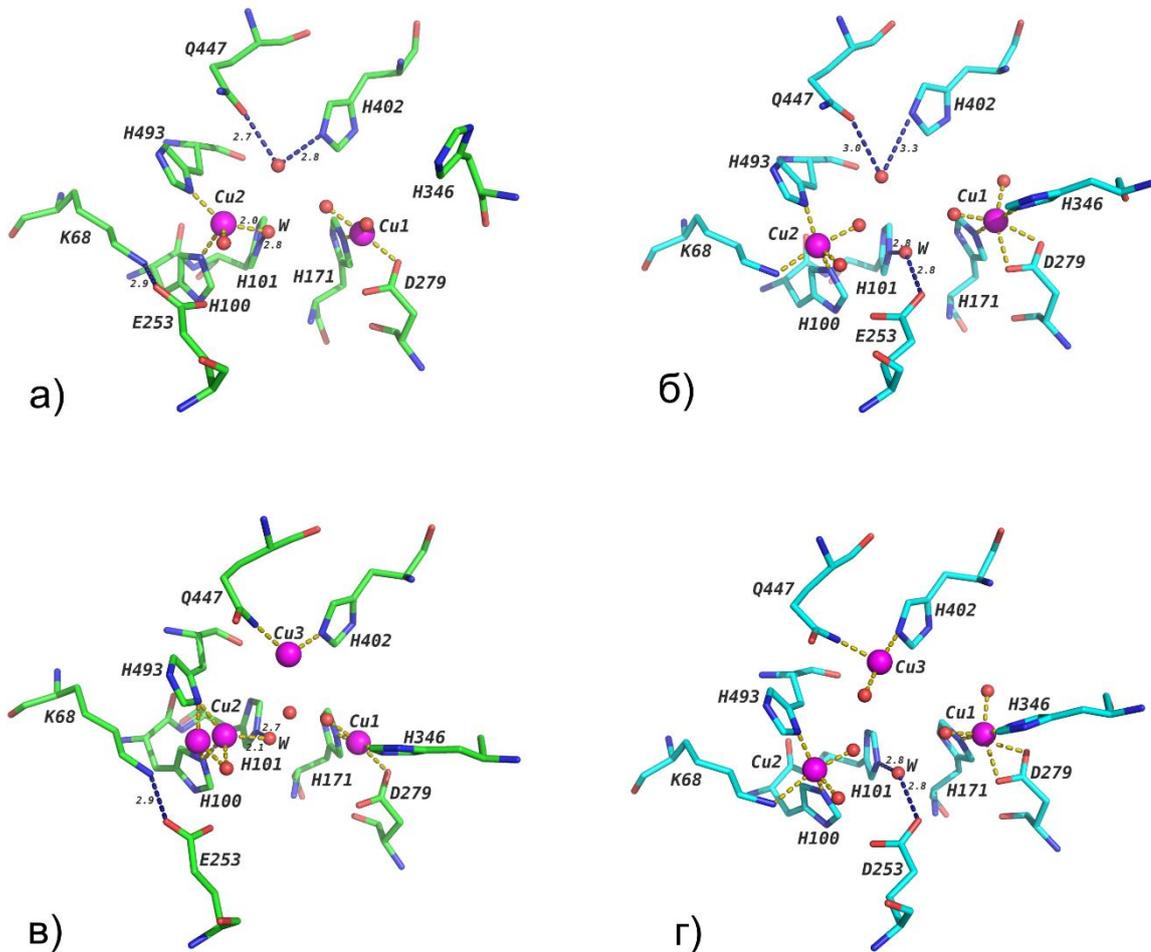


Рис. 36. Схема активного центра неактивированной *pmTcDH* H447Q (PDB ID: 8YU5) для субъединиц в закрытой (а) и открытой (б) конформациях. Схема активного центра *pmTcDH* H447Q (PDB ID: 8YU6) после активации кристалла ионами Cu^{+1} для субъединиц в закрытой (в) и открытой (г) конформациях. Ионы меди показаны розовыми сферами, молекулы растворителя – красными сферами. Координационные и водородные связи показаны золотыми и синими пунктирными линиями, соответственно.

Настаивание кристаллов неактивированной *pmTcDH* H477Q с ионами меди Cu^{+1} привело к снижению разрешения до 1.55 Å (Таблица 3). При этом, конформация субъединиц димера не изменилась, в отличие от структур апоформы фермента «дикого типа».

Настаивание кристаллов с ионами меди Cu^{+1} привело к встраиванию ионов меди в активный центр *pmTcDH* H477Q обеих субъединиц (PDB ID: 8YU6). Структура активного центра субъединицы в закрытой конформации совпадает с соответствующей структурой холоформы фермента «дикого типа» (Рис. 28б, 36в). Ион меди $\text{Cu}1$ с заселенностью 0.8 координирован атомами Nε2 H171, Nε2 H346, Oδ1 D279 и молекулой воды по типу плоского квадрата. Ион меди $\text{Cu}2$ в структуре занимает два положения. В одном из положений ион меди $\text{Cu}2$ с заселенностью 0.6 координирован по типу тетраэдра атомами Nδ1 H493, Nε2 H100 и двумя молекулами воды, причем одна из них является атакующей молекулой воды W. Во втором положении с заселенностью 0.3 ион меди $\text{Cu}2$ координирован по типу плоского треугольника атомами Nδ1 H493, Nε2 H100 и молекулой воды. Ион меди $\text{Cu}3$ с заселенностью 0.2 координирован линейно атомами Nε1 Q447, Nε2 H402. Структура активного центра субъединицы в открытой конформации активированной *pmTcDH* H447Q совпадает со структурой холоформы фермента «дикого типа» (Рис. 29б, 36г). Ион меди $\text{Cu}1$ с полной заселенностью координирован по типу октаэдра атомами Nε2 H171, Nε2 H346, Oδ1 и Oδ2 D279 и двумя молекулами воды. Ион меди $\text{Cu}2$ с полной заселенностью занимает одно положение и координирован по типу тригональной бипирамиды атомами Nδ1 H493, Nε2 H100, Nζ(z) K68 и двумя молекулами воды. Ион меди $\text{Cu}3$ с заселенностью 0.2 координирован по типу плоского треугольника атомами Nε1 Q447, Nε2 H402 и молекулой воды. Аминокислотные остатки H101 и E253 образуют водородные связи с атакующей молекулой воды W.

Замена H447Q не привела к полной потере способности связывать ион меди $\text{Cu}3$ в активном центре фермента, что также проявляется и в сходной форме спектра ЭПР со спектром фермента «дикого типа» (Рис. 37). Однако изменение лиганда в координационной сфере иона меди $\text{Cu}3$ оказалось критичным для ферментативной активности. Таким образом, для исключения иона меди $\text{Cu}3$ из трехъядерного медного центра требуется провести замены координирующих гистидинов на аминокислотные остатки, не способные образовывать координационные связи с ионами металла, как например, аланин.

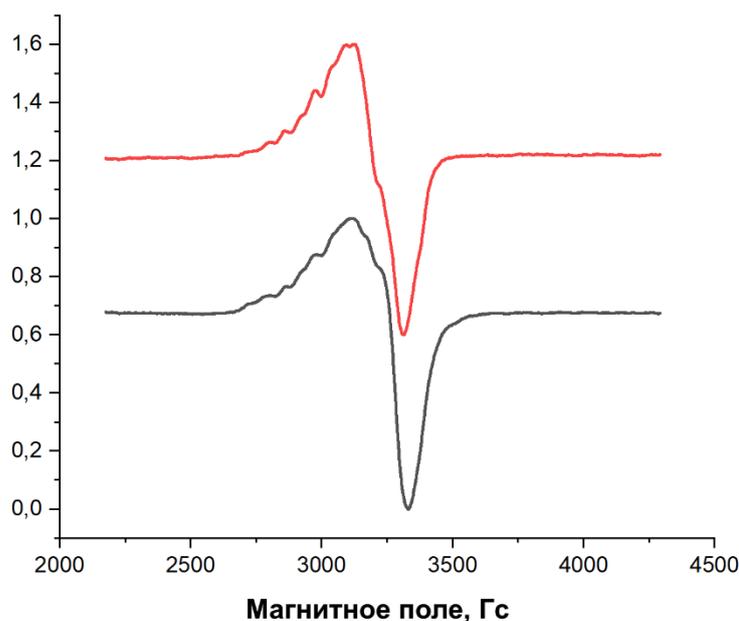


Рис. 37. Спектры ЭПР в X-диапазоне (~9.5 ГГц) *pmTcDH* «дикого типа» (черный) и *pmTcDH* H447Q (красный).

3.7. Перестройки активного центра в ходе первых этапов каталитического процесса

Структурные и спектральные данные, полученные в работе для ферментов *tpTcDH* и *pmTcDH* «дикого типа» и с точечными заменами, позволили детализировать механизм каталитической реакции тиоцианатдегидрогеназы.

В одном кристалле *pmTcDH* были охарактеризованы две конформации фермента: одна субъединица димера принимает закрытую конформацию, а вторая – открытую. Активный центр открытой субъединицы *pmTcDH* доступен для внешнего растворителя и лигандов через субстратный канал (**Рис. 26в**). В закрытой конформации боковая группа R256 блокирует субстратный канал, тем самым, ограничивая доступ к активному центру фермента. Открытая конформация *pmTcDH* соответствует свободной форме фермента до связывания субстрата, а закрытая конформация – форме фермента со связанным субстратом.

Лиганды могут проникать в активный центр обеих субъединиц димера *pmTcDH* в кристалле посредством тепловых движений. Молекулярный кислород и тиомочевина способны прочно удерживаться только в активном центре закрытой конформации (**Рис. 28б, 30б**), в то время как селеноцианат и атом селена остаются связанными в обеих субъединицах (**Рис. 31в, г**). Вероятно, это связано с большей прочностью комплекса ионов меди Cu_2 и Cu_3 с атомом селена в качестве мостикового лиганда, чем с атомом серы или кислорода. Образование прочного комплекса в активном центре может препятствовать

протеканию ферментативной реакции с селеноцианатом, что подтверждается кинетическими экспериментами и спектроскопией ЭПР.

Структуры комплексов *pmTcDN* с тиомочевинной и селеноцианатом могут служить моделью ориентации субстрата тиоцианата в активном центре фермента (**Рис. 30б, 31в**). Положение атомов серы тиомочевины и селена селеноцианата в закрытой конформации фермента соответствует положению атома серы тиоцианата, где атом серы или селена образует две координационные связи с ионами меди Cu_2 и Cu_3 . Атом азота одной из аминокислотных групп тиомочевины или атом азота селеноцианата участвует в координации иона меди Cu_1 и соответствует атому азота субстрата.

Консервативная молекула воды *W* выполняет роль нуклеофила в ферментативной реакции. Два каталитических аминокислотных остатка H101 и E253 депротонируют молекулу воды, превращая ее в гидроксил-анион, согласно постулируемому механизму реакции [61]. Новые структурные данные для *pmTcDN* с атомным разрешением позволили охарактеризовать конформационные перестройки каталитического E253 в ходе связывания субстрата и закрытия активного центра и предположить путь переноса протона от консервативной молекулы воды (**Рис. 38**). В открытой конформации оба каталитических аминокислотных остатка H101 и E253 образуют водородные связи с атакующей молекулой воды *W* (**Рис. 29б**), при этом боковая группа K68 координирует ион меди Cu_2 . В закрытой конформации атакующая молекула воды удерживается только одной водородной связью с H101 (**Рис. 28б, 30б, 31в**). Вероятно, аминокислотный остаток E253 играет ключевую роль в активации нуклеофила и транспорте протона. Протон по водородной связи может переходить от консервативной молекулы воды на карбоксильную группу E253, боковая группа которого изменяет положение и образует водородные связи с K68, Y129 и Q121 (**Рис. 38**). При этом консервативная молекула воды превращается в гидроксил-анион. Координационная связь между K68 и ионом меди Cu_2 разрывается, и ион меди смещается для связывания субстрата. Вероятным акцептором протона от E253 является K68, поскольку аминокислотные остатки Q121, Y129 и молекула воды вероятнее всего находятся в протонированной форме. В ходе переноса протона и разрыва координационной связи с ионом меди Cu_2 на аминокислотной группе K68 возникает положительный заряд.

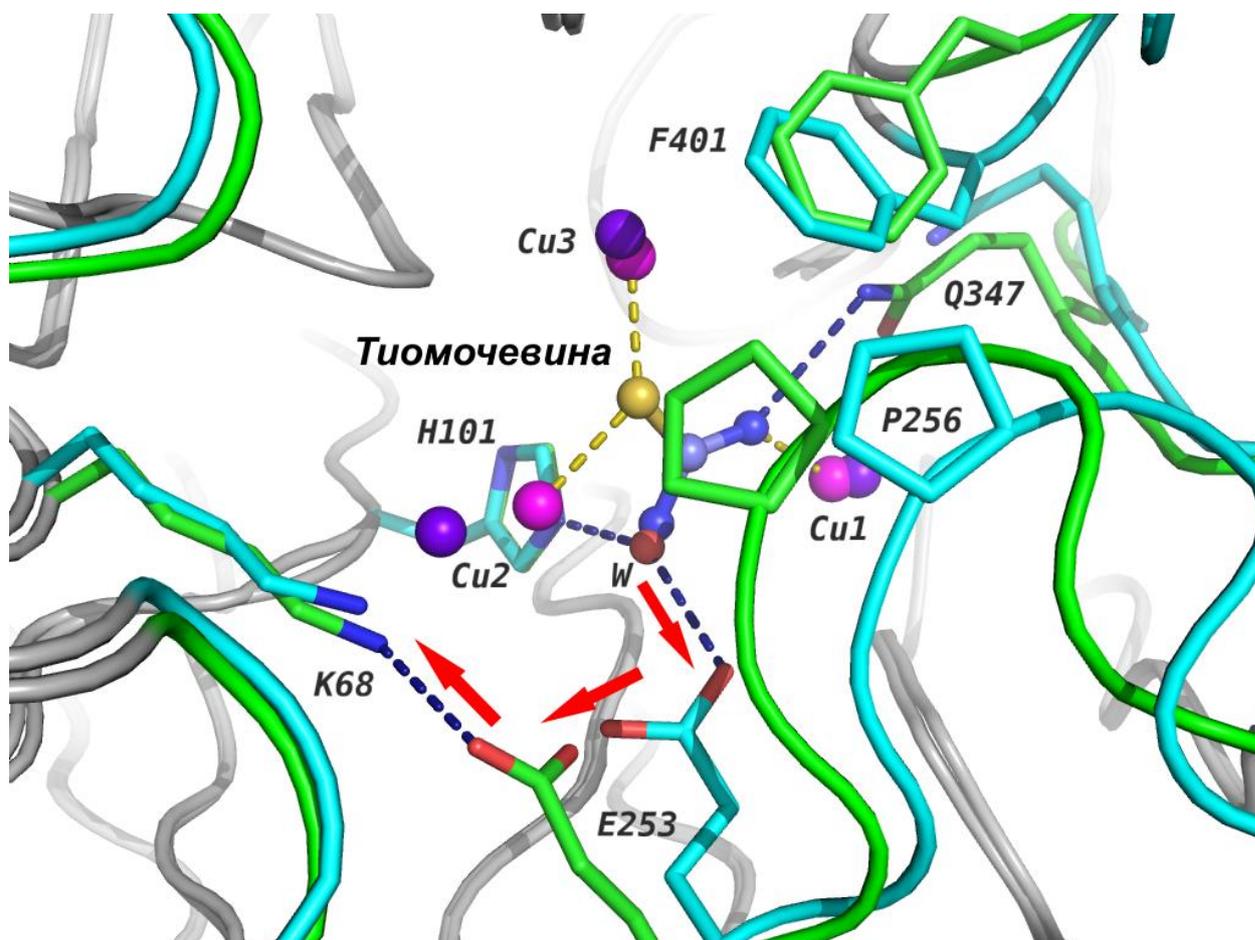


Рис. 38. Конформационные перестройки активного центра *pmTcDH* при связывании субстрата и закрытии субстратного канала. Участки полипептидной цепи, не меняющие положение в ходе конформационных переходов, показаны серым цветом. Участки полипептидной цепи, изменяющие свое положение, показаны для закрытой и открытой конформаций зеленым и голубым, соответственно. Ионы меди в закрытом и открытом активном центре показаны розовыми и темно-фиолетовыми сферами. Атакующая молекула воды (W) показана красной сферой. Координационные и водородные связи показаны золотыми и темно-синими пунктирными линиями, соответственно. Предполагаемый путь переноса протона от атакующей молекулой воды на аминогруппу K68 показан красными стрелками.

Структурные данные *pmTcDH* с атомным разрешением наряду с данными ЭПР-спектроскопии позволили охарактеризовать геометрию координации медных центров, установить их степень окисления и предположить их функцию в каталитической реакции.

Ион меди Cu1 не меняет свое положение в активном центре фермента независимо от степени окисления и конформации субъединиц. В структурах комплексов с ингибиторами ион меди Cu1 связывает атом азота тиомочевина или селеноцианат (Рис. 30б, 31в), участвуя в правильном позиционировании лиганда. Связывание селеноцианата в активном центре не приводит к восстановлению данного иона. Вероятно, роль иона меди Cu1 заключается в правильном позиционировании субстрата в активном центре.

В свободной форме фермента ион меди Cu3 находится в состоянии Cu^{+2} , согласно данными спектроскопии ЭПР, что противоречит структурным данным, где в обеих конформаций геометрия координации этого иона соответствует координации

восстановленного иона. Вероятно, это обусловлено восстанавливающим воздействием рентгеновского излучения. Ион меди Cu³ смещается в сторону связавшегося лиганда. Связывания селеноцианата в активном центре приводит к восстановлению иона меди Cu³, из чего можно заключить, что данный ион меди участвует в окислении субстрата и переносе электронов.

Координационная сфера иона меди Cu² претерпевает наибольшие перестройки при закрытии активного центра и изменении степени окисления. Этот ион может занимать три положения в активном центре фермента (**Рис. 286, 296**). Одно положение с треугольной геометрией координационной сферы совпадает для закрытой и открытой конформаций и, вероятно, соответствует восстановленному состоянию Cu⁺¹. Два других положения с тетраэдрической и бипирамидальной геометрией соответствуют окисленному состоянию Cu⁺² и смещены друг относительно друга на ~ 2 Å. Положение с тетраэдрической геометрией характерно для закрытой конформации, а в открытой обнаружено только при связанном атоме селена. В этом положении в активном центре связан лиганд – молекулярный кислород, тиомочевина, селеноцианат или атом селена (**Рис. 286, 306, 31в, г**). Положение с бипирамидальной геометрией обнаружено только в открытой конформации фермента (**Рис. 296**). Переход между двумя окисленными положениями в ходе конформационных изменений и связывания лиганда (субстрата, ингибитора) сопровождается смещением иона меди Cu² на ~ 2 Å в сторону лиганда. Движение ионов меди к субстрату было также показано для тирозиназ с использованием структурных данных высокого разрешения [21]. Можно заключить, что ион меди Cu² играет ключевую роль в процессе окисления субстрата и транспорте электронов на акцептор.

Полученные структурные данные и данные спектроскопии ЭПР позволили детализировать первые этапы каталитической реакции ТсДН, включая этапы связывания субстрата в активном центре, активации атакующей молекулы воды W и нуклеофильной атаки. Схема механизма реакции представлена на **рисунке 39**. В свободной форме фермента трехъядерный медный центр находится в состоянии [Cu¹⁺²-Cu²⁺²-Cu³⁺²], а R256 не ограничивает доступ в активный центр (**Рис. 39а**). Атакующая молекула воды W связана двумя водородными связями с аминокислотными остатками H101 и E253 (**Рис. 39а**). Отрицательно заряженный тиоцианат по субстратному каналу проникает в активный центр фермента, образуя при этом две координационные связи атомом азота с ионом меди Cu¹ и атомом серы с ионом меди Cu³ (**Рис. 39б**). Ион меди Cu² смещается в сторону связавшегося субстрата, что приводит к разрыву координационной связи с K68 и формированию мостикового комплекса Cu²-S-Cu³ (**Рис. 39б**). Каталитический E253 забирает протон у молекулы воды W, меняют свое положение и образует водородную связь с K68 (**Рис. 39б**).

При этом P256 закрывает субстратный канал (**Рис. 39б**). В закрытом активном центре каталитический E253 переносит один из протонов субстрата на K68 (**Рис. 39в**), в результате чего на аминогруппе возникает положительный заряд, препятствующий возвращению иона меди Cu2 в исходное положение. Активированный гидроксил-анион, удерживаемый водородной связью с каталитическим H101, атакует атом углерода тиоцианата, что приводит к разрыву связи между углеродом и серой (**Рис. 39в**). После нуклеофильной атаки цианат остается связанным с ионом меди Cu1 и каталитическим H101 (**Рис. 39г**). Атом серы в мостиковом комплексе с ионами Cu2 и Cu3 подвергается двухэлектронному окислению, а электроны с ионов меди передаются на внешний акцептор электронов. Этапы окисления субстрата, транспорта электронов и выхода конечных продуктов из активного центра требуют дальнейшего исследования.

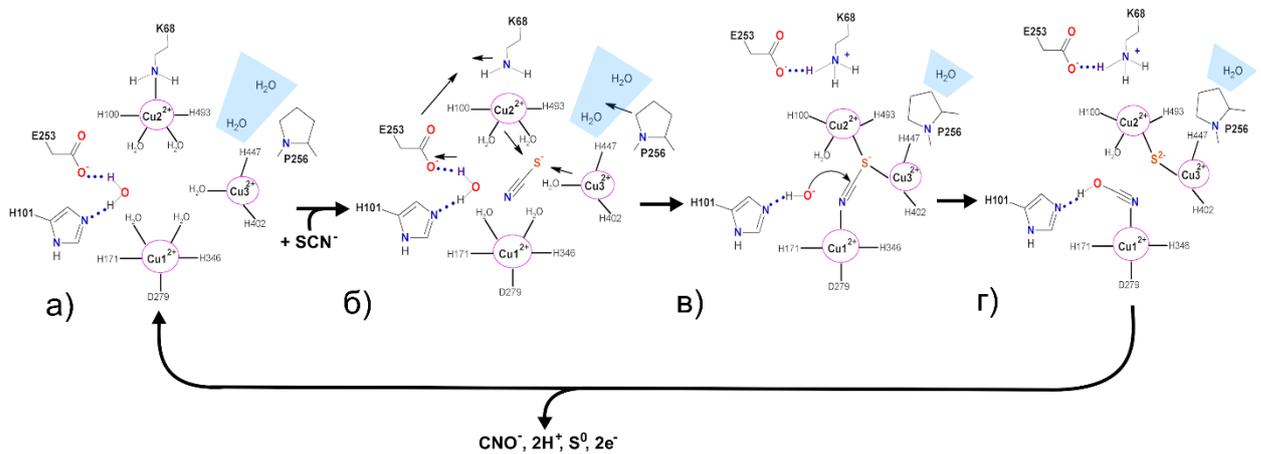


Рис. 39. Схема механизма каталитической реакции TcDH: этапы связывания субстрата, активации нуклеофила и нуклеофильной атаки. Свободная форма фермента до связывания тиоцианата (а), соответствующая открытой конформации. Связывание субстрата в активном центре TcDH и активация нуклеофила (б). Конформационные перестройки активного центра обозначены черными стрелками. Нуклеофильная атака гидроксил-аниона в закрытой конформации фермента показана черной стрелкой (в). Промежуточные продукты перед этапом переноса электронов (г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Медные ферменты участвуют в катализе широкого спектра окислительно-восстановительных реакций у живых организмов. Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) – один из таких медных ферментов, который катализирует уникальную реакцию окисления тиоцианата у сероокисляющих бактерий. Представленная работа посвящена структурной и функциональной характеристике трехъядерного медного центра TcDH (Cu₁₋₃).

На первом этапе работы была проведена оптимизация качества кристаллов TcDH с целью получения надежных структурных данных для правильной интерпретации карт электронной плотности и исследования тонких деталей архитектуры активного центра. Генно-инженерный подход с конструированием рекомбинантных форм с заменами аминокислотных остатков T169A и K281A на поверхности *tp*TcDH из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 не привел к заметному улучшению качества кристаллов фермента. Результатом поиска среди гомологичных ферментов стала структура *pm*TcDH из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum* с атомным (1.05 Å) разрешением.

Невероятно высокое разрешение рентгеноструктурных данных свободной формы *pm*TcDH позволило точно описать координационную сферу каждого из трех ионов меди в двух конформациях фермента, открытой и закрытой, и выявить важные структурные перестройки. Открытая конформация соответствует свободной форме фермента до связывания субстрата, закрытая конформация – форме со связанным субстратом. В процессе конформационного перехода происходит перестроение сети из водородных связей, изменение положения каталитического аминокислотного остатка E253 и смещение двух ионов меди Cu₂ и Cu₃ в сторону связавшегося лиганда. Методом спектроскопии ЭПР показано, что в свободной форме фермента все три иона меди активного центра находятся в состоянии Cu⁺².

Впервые установлены структуры комплексов *pm*TcDH с ингибиторами, тиомочевинной и селеноцианатом, подтверждающие модель связывания субстрата в активном центре фермента. Атом серы/селена образует мостиковый комплекс с ионами меди Cu₂ и Cu₃, а атом азота координирует ион меди Cu₁. Согласно данным спектроскопии ЭПР, связывание селеноцианата в активном центре фермента приводит к восстановлению ионов меди Cu₂ и Cu₃, а ион меди Cu₁ остается в состоянии Cu⁺². Тиомочевина структурно напоминает переходное состояние, которое возникает в ходе каталитической реакции, согласно ранее предложенному механизму.

В работе показано влияние ионов меди Cu₁₋₃ в активном центре на упаковку молекул *pm*TcDH и их конформацию в кристалле. В отсутствии связанных кофакторов

молекулы апоформы фермента принимают закрытую конформацию. Встраивание ионов меди при настаивании кристаллов апоформы *pmTcDH* ионами Cu^{+2} и Cu^{+1} и формирование полного трехъядерного медного центра приводит к конформационным переходам молекул фермента.

В рамках работы методом точечного мутагенеза показана значимость двух аминокислотных остатков активного центра TcDH для протекания каталитической реакции. Аминокислотный остаток F436 у *tpTcDH*, формирующий стенку активного центра и консервативный у ряда тиоцианатденидрогеназ, в том числе и у *pmTcDH*, обеспечивает правильные и скоординированные перестроения активного центра при закрытии/открытии субстратного канала. Его замена на глутамин приводит к полной потере ферментативной активности, что связано с нарушением взаимодействий, необходимых для конформационных переходов между закрытой и открытой конформациями. Аминокислотный остаток H447 у *pmTcDH* является лигандом иона меди Cu^3 . Рекомбинантная форма *pmTcDH* с заменой H447 сохранила способность связывать ион меди Cu^3 , однако полностью потеряла ферментативную активность.

В конце настоящей работы были обобщены все полученные данные о структуре и функционировании TcDH и роли ионов меди в реакции. Предполагается, что роль иона меди Cu^1 ограничивается обеспечением правильной ориентации субстрата в активном центре фермента, а ионы меди Cu^2 и Cu^3 участвуют в его окислении. Каталитический аминокислотный остаток E253 активирует нуклеофил в ходе каталитического процесса и участвует в транспорте протона. Были также детализированы первые этапы каталитической реакции, включающие связывание субстрата, активацию консервативной молекулы воды за счет депротонирования и нуклеофильную атаку.

ВЫВОДЫ

1. Точечная замена T169A на поверхности не привела к изменению упаковки молекул *tpTcDH* в кристалле и исчезновению двойникования. Точечная замена K281A на поверхности привела к изменению упаковки молекул фермента в кристалле и исчезновению двойникования. Точечный мутагенез не способствовал улучшению дифракционных свойств кристаллов *tpTcDH* для исследования деталей устройства активного центра.
2. Благодаря атомному разрешению (1.05 Å), охарактеризован трехъядерный медный центр тиоцианатдегидрогеназы из *Pelomicrobium methylotrophicum* (*pmTcDH*) в двух конформациях фермента, открытой и закрытой. Открытая конформация соответствует свободной форме фермента, закрытая конформация – форме фермента со связанным субстратом. Архитектура активного центра *pmTcDH* в закрытой и открытой конформациях отличается координационной сферой ионов меди, расположением каталитического аминокислотного остатка E253 и ионов меди Cu² и Cu³.
3. Впервые установлены структуры комплексов *pmTcDH* с ингибитором тиомочевинной (с разрешением 1.1 Å) и аналогом субстрата селеноцианатом (с разрешением 1.8 Å). На основании полученных структурных данных подтверждена модель ориентации субстрата и переходного состояния в активном центре фермента. Атом серы/селена выполняет роль мостикового лиганда ионов меди Cu² и Cu³, а атом азота координирует ион меди Cu¹.
4. В отсутствие ионов меди молекулы апоформы *pmTcDH* принимают закрытую конформацию в кристалле. Формирование полного трехъядерного медного центра в структуре апоформы происходит при настаивании кристаллов ионами Cu⁺² и Cu⁺¹. Ионы меди активного центра влияют на упаковку и конформацию субъединиц *pmTcDH* в кристалле.
5. Замена консервативного аминокислотного остатка F436 активного центра на глутамин приводит к полной потере ферментативной активности *tpTcDH*. Данный аминокислотный остаток важен в процессе конформационного перехода при закрытии/открытии субстратного канала.
6. Уточнены роли каждого из ионов меди трехъядерного центра TcDH и детализирован механизм каталитической реакции. Ион меди Cu¹ участвует в правильном позиционировании атома азота субстрата, а ионы меди Cu² и Cu³ – в последующем окислении субстрата. Каталитический аминокислотный остаток E253 участвует в активации нуклеофила и переносе протона.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Kulikova O.G., Dergousova N.I., Rakitina T.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Probing the role of a conserved phenylalanine in the active site of thiocyanate dehydrogenase // *Crystals*. – 2022. – Vol. 12. – P. 1787. **IF 2.6 (WoS)**.
2. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Дергоусова Н.И., Дороватовский П.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Улучшение дифракционных свойств кристаллов тиоцианатдегидрогеназы // *Кристаллография*. – 2023. – Т. 68(6). – С. 888-893. **IF 0.7 (WoS)**.
3. **Varfolomeeva L.A.**, Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Khrenova M.G., Tikhonova T.V., Popov V.O. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – Vol. 279. – P. 135058. **IF 7.0 (WoS)**.
4. **Варфоломеева Л.А.**, Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Н. И. Дергоусова, Миняев М.Е., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Влияние ионов меди на упаковку и конформацию тиоцианатдегидрогеназы в кристалле // *Кристаллография*. – 2025. – Т. 70(1). – С. 10-17. **IF 0.7 (WoS)**.

Тезисы докладов

1. **Varfolomeeva L.A.**, Polyakov K.M., Komolov A.S., Rakitina T.V., Tikhonova T.V., Popov V.O. Crystallization and structure analysis of the mutant forms of thiocyanate dehydrogenase from *Thioalkalivibrio paradoxus* // *Biocatalysis: Fundamentals and applications. Abstracts of 12th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications” (Saint-Petersburg, June 24-28, 2019)* – 2019. – P. 122.
2. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Тихонова Т.В., Попов В.О. Кристаллизация и структурный анализ мутантных форм тиоцианатдегидрогеназы из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* с заменами K281A и K264A, K267A // Сборник тезисов II Межвузовской студенческой конференции «Студенческий биохимический форум – 2020» (9–10 февраля 2020, МГУ) – 2020. – С. 21-22.
3. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Модификация поверхностных остатков тиоцианатдегидрогеназы (ТCDH) предотвращает двойникование кристаллов фермента // Сборник тезисов «XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2021, ИБХ РАН). – 2021. – С. 8.

4. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Цаллагов С.И., Шабалин И.Г., Хренова М.Г., Бойко К.М., Ракитина Т.В., Хаген В.Р., Тихонова Т.В., Попов В.О. Новый медьсодержащий фермент тиоцианатдесульфуреза – от структурных исследований к механизму действия // Сборник тезисов “III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «белки и пептиды». VII Съезд физиологов СНГ” (Сочи – Дагомыс, Россия 3–8 октября 2021). – 2021. – Т. II. – С. 122.
5. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестройки медного кластера тиоцианатдегидрогеназы из *Hydrogenophila bacterium* в процессе каталитической реакции на основе рентгеноструктурных данных с атомным разрешением // Сборник тезисов «XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2022, ИБХ РАН). – 2022. – С. 13.
6. **Варфоломеева Л.А.**, Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Консервативный остаток f436 не участвует в сборке медного кластера активного центра, но стабилизирует конформацию последнего в тиоцианатдегидрогеназе // Сборник тезисов “Актуальные аспекты современной микробиологии XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Сателлитная конференция для молодых ученых «Современная структурная биология» (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г.) – 2022. – С. 48-49.
7. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестроение трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы в процессе катализа // Сборник тезисов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, Россия 25-29 июня 2023) – 2023. – Т. I. – С. 52.
8. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. The subunits in a dimer of thiocyanate dehydrogenase function independently // V International school of structural biology « Structural biology: main problems and approaches to their solution» (IBCh RAS, Moscow, June 5-7, 2024) – 2024. – P. 84.
9. **Varfolomeeva L.A.**, Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Details of the structure and function of the bacterial thiocyanate dehydrogenase with the unique copper active site // 14th International Multiconference «Bioinformatics of Genome

regulation and Structure / Systems Biology» (BGRS/SB-2024) (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, August 5-10, 2024) – 2024. – P. 619-620.

10. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Copper ions influence thiocyanate dehydrogenase crystal packing and subunit conformation // International conference «Biomembranes'24» (MIPT, October 7-11, 2024) – 2024. – P. 112.

11. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Khrenova M.G., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural basis of thiocyanate oxidation in the trinuclear copper center of thiocyanate dehydrogenase // VI International scientific and practical conference «POSTGENOM'2024», XI Russian symposium «Proteins and peptides», Russian-Chinese life sciences congress (Moscow region, «Patriot», October 29 – November 2 2024) – 2024. – P. 348.

12. **Варфоломеева Л.А.**, Ефимов Н.Н., Ротов А.В., Уголкова Е.А., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Детали функционирования трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназ // Сборник тезисов Конференции Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ (г. Москва, 20-22 февраля 2025) – 2025.

13. **Варфоломеева Л.А.**, Соловьева А.Ю., Ефимов Н.Н., Ротов А.В., Уголкова Е.А., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Характеристика свойств медных центров белков trCopC и pmTcDH методом спектроскопии ЭПР // Сборник тезисов XV Конференции молодых ученых по общей и неорганической химии (ИОНХ им. Н.С. Курнакова, г. Москва, 8-11 апреля 2025) – 2025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biomolecular EPR Spectroscopy. / Hagen W. R. – 1 изд. – Boca Raton: CRC Press, 2008.
2. Chaplin A. K., Wilson M. T., Hough M. A., Svistunenko D. A., Hemsworth G. R., Walton P. H., Vijgenboom E., Worrall J. A. R. Heterogeneity in the Histidine-brace Copper Coordination Sphere in Auxiliary Activity Family 10 (AA10) Lytic Polysaccharide Monooxygenases // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291, № 24. – P. 12838-12850.
3. Munzone A., El Kerdi B., Fanuel M., Rogniaux H., Ropartz D., Reglier M., Royant A., Simaan A. J., Decroos C. Characterization of a bacterial copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenase with an unusual second coordination sphere // *FEBS J.* – 2020. – Vol. 287, № 15. – P. 3298-3314.
4. Gomez-Pineiro R. J., Drosou M., Bertaina S., Decroos C., Simaan A. J., Pantazis D. A., Orio M. Decoding the Ambiguous Electron Paramagnetic Resonance Signals in the Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Photobacterium luminescens* // *Inorg. Chem.* – 2022. – Vol. 61, № 20. – P. 8022-8035.
5. Farrar J. A., Thomson A. J., Cheesman M. R., Dooley D. M., Zumft W. G. A model of the copper centres of nitrous oxide reductase (*Pseudomonas stutzeri*). Evidence from optical, EPR and MCD spectroscopy // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 294, № 1-2. – P. 11-5.
6. Kipouros I., Solomon E. I. New mechanistic insights into coupled binuclear copper monooxygenases from the recent elucidation of the ternary intermediate of tyrosinase // *FEBS Lett.* – 2023. – Vol. 597, № 1. – P. 65-78.
7. Pogni R., Baratto M. C., Sinicropi A., Basosi R. Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol. 72, № 5. – P. 885-96.
8. Martorana A., Vazquez-Duhalt R., Aguila S. A., Basosi R., Baratto M. C. Spectroscopic characterization of 2,6-dimethoxyphenol radical intermediates in the *Coriobacterium jeikeium* laccase-mediator system // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2014. – Vol. 107. – P. 100-105.
9. Chauhan S., Kline C. D., Mayfield M., Blackburn N. J. Binding of copper and silver to single-site variants of peptidylglycine monooxygenase reveals the structure and chemistry of the individual metal centers // *Biochemistry.* – 2014. – Vol. 53, № 6. – P. 1069-80.
10. Zhang L., Bill E., Kroneck P. M. H., Einsle O. A [3Cu:2S] cluster provides insight into the assembly and function of the Cu(Z) site of nitrous oxide reductase // *Chem. Sci.* – 2021. – Vol. 12, № 9. – P. 3239-3244.

11. Lyubenova S., Maly T., Zwicker K., Brandt U., Ludwig B., Prisner T. Multifrequency pulsed electron paramagnetic resonance on metalloproteins // *Acc. Chem. Res.* – 2010. – Vol. 43, № 2. – P. 181-9.
12. Ross M. O., MacMillan F., Wang J., Nisthal A., Lawton T. J., Olafson B. D., Mayo S. L., Rosenzweig A. C., Hoffman B. M. Particulate methane monooxygenase contains only mononuclear copper centers // *Science.* – 2019. – Vol. 364, № 6440. – P. 566-570.
13. Jodts R. J., Ross M. O., Koo C. W., Doan P. E., Rosenzweig A. C., Hoffman B. M. Coordination of the Copper Centers in Particulate Methane Monooxygenase: Comparison between Methanotrophs and Characterization of the Cu(C) Site by EPR and ENDOR Spectroscopies // *J Am. Chem. Soc.* – 2021. – Vol. 143, № 37. – P. 15358-15368.
14. van Wonderen J. H., Kostrz D. N., Dennison C., MacMillan F. Refined distances between paramagnetic centers of a multi-copper nitrite reductase determined by pulsed EPR (iDEER) spectroscopy // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2013. – Vol. 52, № 7. – P. 1990-3.
15. Lyubenova S., Siddiqui M. K., Vries M. J., Ludwig B., Prisner T. F. Protein-protein interactions studied by EPR relaxation measurements: cytochrome c and cytochrome c oxidase // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111, № 14. – P. 3839-46.
16. Gamble Jarvi A., Bogetti X., Singewald K., Ghosh S., Saxena S. Going the dHis-tance: Site-Directed Cu(2+) Labeling of Proteins and Nucleic Acids // *Acc. Chem. Res.* – 2021. – Vol. 54, № 6. – P. 1481-1491.
17. Bogetti X., Hasanbasri Z., Hunter H. R., Saxena S. An optimal acquisition scheme for Q-band EPR distance measurements using Cu(2+)-based protein labels // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2022. – Vol. 24, № 24. – P. 14727-14739.
18. Earl L. A., Falconieri V., Milne J. L., Subramaniam S. Cryo-EM: beyond the microscope // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2017. – Vol. 46. – P. 71-78.
19. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Zidek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A. W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature.* – 2021. – Vol. 596, № 7873. – P. 583-589.
20. Miarzlou D. A., Leisinger F., Joss D., Haussinger D., Seebeck F. P. Structure of formylglycine-generating enzyme in complex with copper and a substrate reveals an acidic pocket for binding and activation of molecular oxygen // *Chem. Sci.* – 2019. – Vol. 10, № 29. – P. 7049-7058.

21. Fujieda N., Umakoshi K., Ochi Y., Nishikawa Y., Yanagisawa S., Kubo M., Kurisu G., Itoh S. Copper-Oxygen Dynamics in the Tyrosinase Mechanism // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2020. – Vol. 59, № 32. – P. 13385-13390.
22. van Montfort R. L. M., Workman P. Structure-based drug design: aiming for a perfect fit // *Essays Biochem.* – 2017. – Vol. 61, № 5. – P. 431-437.
23. Diakou I., Papakonstantinou E., Papageorgiou L., Pierouli K., Dragoumani K., Spandidos D. A., Bacopoulou F., Chrousos G. P., Eliopoulos E., Vlachakis D. Novel computational pipelines in antiviral structure-based drug design (Review) // *Biomed. Rep.* – 2022. – Vol. 17, № 6. – P. 97.
24. Garman E. F., Weik M. Radiation Damage in Macromolecular Crystallography // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1607. – P. 467-489.
25. Komori H., Sugiyama R., Kataoka K., Miyazaki K., Higuchi Y., Sakurai T. New insights into the catalytic active-site structure of multicopper oxidases // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2014. – Vol. 70, № Pt 3. – P. 772-9.
26. Polyakov K. M., Gavryushov S., Ivanova S., Fedorova T. V., Glazunova O. A., Popov A. N., Koroleva O. V. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2017. – Vol. 73, № Pt 5. – P. 388-401.
27. Polyakov K. M., Gavryushov S., Fedorova T. V., Glazunova O. A., Popov A. N. The subatomic resolution study of laccase inhibition by chloride and fluoride anions using single-crystal serial crystallography: insights into the enzymatic reaction mechanism // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2019. – Vol. 75, № Pt 9. – P. 804-816.
28. Schmidt M. Time-Resolved Macromolecular Crystallography at Modern X-Ray Sources // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1607. – P. 273-294.
29. Murakawa T., Suzuki M., Fukui K., Masuda T., Sugahara M., Tono K., Tanaka T., Iwata S., Nango E., Yano T., Tanizawa K., Okajima T. Serial femtosecond X-ray crystallography of an anaerobically formed catalytic intermediate of copper amine oxidase // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2022. – Vol. 78, № Pt 12. – P. 1428-1438.
30. Dauter Z., Jaskolski M. Crystal pathologies in macromolecular crystallography // *Postepy Biochem.* – 2016. – Vol. 62, № 3. – P. 401-407.
31. Thompson M. C. Identifying and Overcoming Crystal Pathologies: Disorder and Twinning // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1607. – P. 185-217.
32. Wilson A. J. S. Determination of Absolute from Relative X-Ray Intensity Data // *Nature.* – 1942. – Vol. 150. – P. 151-152.
33. Wilson A. J. S. The probability distribution of X-ray intensities // *Acta Crystallogr.* – 1949. – Vol. 2. – P. 318-321.

34. Yeates T. O. [22] Detecting and overcoming crystal twinning // *Methods Enzymol.* – 1997. – Vol. 276. – P. 344-358.
35. Padilla J. E., Yeates T. O. A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2003. – Vol. 59, № Pt 7. – P. 1124-30.
36. Lebedev A. A., Vagin A. A., Murshudov G. N. Intensity statistics in twinned crystals with examples from the PDB // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2006. – Vol. 62, № Pt 1. – P. 83-95.
37. Campeotto I., Lebedev A., Schreurs A. M. M., Kroon-Batenburg L. M. J., Lowe E., Phillips S. E. V., Murshudov G. N., Pearson A. R. Pathological macromolecular crystallographic data affected by twinning, partial-disorder and exhibiting multiple lattices for testing of data processing and refinement tools // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 14876.
38. Yang F., Dauter Z., Wlodawer A. Effects of crystal twinning on the ability to solve a macromolecular structure using multiwavelength anomalous diffraction // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2000. – Vol. 56, № Pt 8. – P. 959-64.
39. Murshudov G. N., Skubak P., Lebedev A. A., Pannu N. S., Steiner R. A., Nicholls R. A., Winn M. D., Long F., Vagin A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2011. – Vol. 67, № Pt 4. – P. 355-67.
40. Derewenda Z. S. Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2010. – Vol. 66, № Pt 5. – P. 604-15.
41. Malawski G. A., Hillig R. C., Monteclaro F., Eberspaecher U., Schmitz A. A., Crusius K., Huber M., Egner U., Donner P., Muller-Tiemann B. Identifying protein construct variants with increased crystallization propensity--a case study // *Protein Sci.* – 2006. – Vol. 15, № 12. – P. 2718-28.
42. Neau D. B., Gilbert N. C., Bartlett S. G., Dassey A., Newcomer M. E. Improving protein crystal quality by selective removal of a Ca(2+)-dependent membrane-insertion loop // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2007. – Vol. 63, № Pt 11. – P. 972-5.
43. Muto T., Tsuchiya D., Morikawa K., Jingami H. Site-specific unglycosylation to improve crystallization of the metabotropic glutamate receptor 3 extracellular domain // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2009. – Vol. 65, № Pt 3. – P. 236-41.
44. Corsini L., Hothorn M., Scheffzek K., Sattler M., Stier G. Thioredoxin as a fusion tag for carrier-driven crystallization // *Protein Sci.* – 2008. – Vol. 17, № 12. – P. 2070-9.
45. Dutzler R., Campbell E. B., MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels // *Science.* – 2003. – Vol. 300, № 5616. – P. 108-12.

46. Cieslik M., Derewenda Z. S. The role of entropy and polarity in intermolecular contacts in protein crystals // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2009. – Vol. 65, № Pt 5. – P. 500-9.
47. Backmark A., Nyblom M., Tornroth-Horsefield S., Kosinska-Eriksson U., Norden K., Fellert M., Kjellbom P., Johanson U., Hedfalk K., Lindkvist-Petersson K., Neutze R., Horsefield R. Affinity tags can reduce merohedral twinning of membrane protein crystals // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2008. – Vol. 64, № Pt 11. – P. 1183-6.
48. Pushie M. J., Zhang L., Pickering I. J., George G. N. The fictile coordination chemistry of cuprous-thiolate sites in copper chaperones // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1817, № 6. – P. 938-47.
49. Solomon E. I., Heppner D. E., Johnston E. M., Ginsbach J. W., Cirera J., Qayyum M., Kieber-Emmons M. T., Kjaergaard C. H., Hadt R. G., Tian L. Copper active sites in biology // *Chem. Rev.* – 2014. – Vol. 114, № 7. – P. 3659-853.
50. Kipouros I., Stanczak A., Ginsbach J. W., Andrikopoulos P. C., Rulisek L., Solomon E. I. Elucidation of the tyrosinase/O(2)/monophenol ternary intermediate that dictates the monooxygenation mechanism in melanin biosynthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2022. – Vol. 119, № 33. – P. e2205619119.
51. *Advanced inorganic chemistry.* / Wilkinson G., Cotton F. A. – 3 изд. – New York, 1972.
52. Solomon E. I., Hadt R. G., Snyder B. E. R. Activating Metal Sites for Biological Electron Transfer // *Isr. J. Chem.* – 2016. – Vol. 56, № 9-10. – P. 649-659.
53. Solomon E. I. Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: blue to green to red copper sites // *Inorg. Chem.* – 2006. – Vol. 45, № 20. – P. 8012-25.
54. Appel M. J., Meier K. K., Lafrance-Vanasse J., Lim H., Tsai C. L., Hedman B., Hodgson K. O., Tainer J. A., Solomon E. I., Bertozzi C. R. Formylglycine-generating enzyme binds substrate directly at a mononuclear Cu(I) center to initiate O(2) activation // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2019. – Vol. 116, № 12. – P. 5370-5375.
55. Gray H. B., Malmstrom B. G., Williams R. J. Copper coordination in blue proteins // *J Biol Inorg. Chem.* – 2000. – Vol. 5, № 5. – P. 551-9.
56. Kim B., Karlin K. D. Ligand-Copper(I) Primary O(2)-Adducts: Design, Characterization, and Biological Significance of Cupric-Superoxides // *Acc. Chem. Res.* – 2023. – Vol. 56, № 16. – P. 2197-2212.
57. Solomon E. I., Ginsbach J. W., Heppner D. E., Kieber-Emmons M. T., Kjaergaard C. H., Smeets P. J., Tian L., Woertink J. S. Copper dioxygen (bio)inorganic chemistry // *Faraday Discuss.* – 2011. – Vol. 148. – P. 11-39; discussion 97-108.

58. Lee J. Y., Karlin K. D. Elaboration of copper-oxygen mediated C-H activation chemistry in consideration of future fuel and feedstock generation // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2015. – Vol. 25. – P. 184-93.
59. Elwell C. E., Gagnon N. L., Neisen B. D., Dhar D., Spaeth A. D., Yee G. M., Tolman W. B. Copper-Oxygen Complexes Revisited: Structures, Spectroscopy, and Reactivity // *Chem. Rev.* – 2017. – Vol. 117, № 3. – P. 2059-2107.
60. Bhunia S., Pawar G. G., Kumar S. V., Jiang Y., Ma D. Selected Copper-Based Reactions for C-N, C-O, C-S, and C-C Bond Formation // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2017. – Vol. 56, № 51. – P. 16136-16179.
61. Tikhonova T. V., Sorokin D. Y., Hagen W. R., Khrenova M. G., Muyzer G., Rakitina T. V., Shabalin I. G., Trofimov A. A., Tsallagov S. I., Popov V. O. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2020. – Vol. 117, № 10. – P. 5280-5290.
62. Rubino J. T., Franz K. J. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function // *J. Inorg. Biochem.* – 2012. – Vol. 107, № 1. – P. 129-43.
63. Abriata L. A. Analysis of copper-ligand bond lengths in X-ray structures of different types of copper sites in proteins // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2012. – Vol. 68, № Pt 9. – P. 1223-31.
64. Hausrath A. C., McEvoy M. M. Structural Analyses of the Multicopper Site of CopG Support a Role as a Redox Enzyme // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2023. – Vol. 1414. – P. 97-121.
65. Perez-Henarejos S. A., Alcaraz L. A., Donaire A. Blue Copper Proteins: A rigid machine for efficient electron transfer, a flexible device for metal uptake // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2015. – Vol. 584. – P. 134-48.
66. Komori H., Higuchi Y. Structural insights into the O₂ reduction mechanism of multicopper oxidase // *J. Biochem.* – 2015. – Vol. 158, № 4. – P. 293-8.
67. Xue Y., Okvist M., Hansson O., Young S. Crystal structure of spinach plastocyanin at 1.7 Å resolution // *Protein Sci.* – 1998. – Vol. 7, № 10. – P. 2099-105.
68. Barrett M. L., Harvey I., Sundararajan M., Surendran R., Hall J. F., Ellis M. J., Hough M. A., Strange R. W., Hillier I. H., Hasnain S. S. Atomic resolution crystal structures, EXAFS, and quantum chemical studies of rusticyanin and its two mutants provide insight into its unusual properties // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45, № 9. – P. 2927-39.
69. Scharf B., Engelhard M. Halocyanin, an archaebacterial blue copper protein (type I) from *Natronobacterium pharaonis* // *Biochemistry.* – 1993. – Vol. 32, № 47. – P. 12894-900.

70. Cunane L. M., Chen Z. W., Durley R. C., Mathews F. S. X-ray structure of the cupredoxin amicyanin, from *Paracoccus denitrificans*, refined at 1.31 Å resolution // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 1996. – Vol. 52, № Pt 4. – P. 676-86.
71. Antonyuk S. V., Strange R. W., Sawers G., Eady R. R., Hasnain S. S. Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – Vol. 102, № 34. – P. 12041-6.
72. Paraskevopoulos K., Sundararajan M., Surendran R., Hough M. A., Eady R. R., Hillier I. H., Hasnain S. S. Active site structures and the redox properties of blue copper proteins: atomic resolution structure of azurin II and electronic structure calculations of azurin, plastocyanin and stellacyanin // *Dalton Trans.* – 2006. – № 25. – P. 3067-76.
73. Hart P. J., Nersissian A. M., Herrmann R. G., Nalbandyan R. M., Valentine J. S., Eisenberg D. A missing link in cupredoxins: crystal structure of cucumber stellacyanin at 1.6 Å resolution // *Protein Sci.* – 1996. – Vol. 5, № 11. – P. 2175-83.
74. Lieberman R. L., Arciero D. M., Hooper A. B., Rosenzweig A. C. Crystal structure of a novel red copper protein from *Nitrosomonas europaea* // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40, № 19. – P. 5674-81.
75. Lancaster K. M., DeBeer George S., Yokoyama K., Richards J. H., Gray H. B. Type-zero copper proteins // *Nat. Chem.* – 2009. – Vol. 1, № 9. – P. 711-5.
76. Basumallick L., Szilagyi R. K., Zhao Y., Shapleigh J. P., Scholes C. P., Solomon E. I. Spectroscopic studies of the Met182Thr mutant of nitrite reductase: role of the axial ligand in the geometric and electronic structure of blue and green copper sites // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125, № 48. – P. 14784-92.
77. Malmstrom B. G. Rack-induced bonding in blue-copper proteins // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – Vol. 223, № 3. – P. 711-8.
78. Blumberger J., Bernasconi L., Tavernelli I., Vuilleumier R., Sprik M. Electronic structure and solvation of copper and silver ions: a theoretical picture of a model aqueous redox reaction // *J Am Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126, № 12. – P. 3928-38.
79. Karlsson B. G., Tsai L. C., Nar H., Sanders-Loehr J., Bonander N., Langer V., Sjolín L. X-ray structure determination and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* azurin mutant Met121Glu // *Biochemistry.* – 1997. – Vol. 36, № 14. – P. 4089-95.
80. Zaitseva I., Zaitsev V., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres // *Journal of Biological Inorganic Chemistry* – 1996. – Vol. 1. – P. 15-23.

81. Xu F., Palmer A. E., Yaver D. S., Berka R. M., Gambetta G. A., Brown S. H., Solomon E. I. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase. Axial perturbations of the T1 copper // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 18. – P. 12372-5.
82. Durao P., Bento I., Fernandes A. T., Melo E. P., Lindley P. F., Martins L. O. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2006. – Vol. 11, № 4. – P. 514-26.
83. Marshall N. M., Garner D. K., Wilson T. D., Gao Y. G., Robinson H., Nilges M. J., Lu Y. Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range // *Nature.* – 2009. – Vol. 462, № 7269. – P. 113-6.
84. Berry S. M., Baker M. H., Reardon N. J. Reduction potential variations in azurin through secondary coordination sphere phenylalanine incorporations // *J. Inorg. Biochem.* – 2010. – Vol. 104, № 10. – P. 1071-8.
85. Yamaguchi T., Taborosi A., Sakai C., Akao K., Mori S., Kohzuma T. Systematic elucidation of the second coordination sphere effect on the structure and properties of a blue copper protein, pseudoazurin // *J. Inorg. Biochem.* – 2023. – Vol. 246. – P. 112292.
86. Hadt R. G., Sun N., Marshall N. M., Hodgson K. O., Hedman B., Lu Y., Solomon E. I. Spectroscopic and DFT studies of second-sphere variants of the type 1 copper site in azurin: covalent and nonlocal electrostatic contributions to reduction potentials // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134, № 40. – P. 16701-16.
87. Liu J., Chakraborty S., Hosseinzadeh P., Yu Y., Tian S., Petrik I., Bhagi A., Lu Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers // *Chem. Rev.* – 2014. – Vol. 114, № 8. – P. 4366-469.
88. MacPherson I. S., Murphy M. E. Type-2 copper-containing enzymes // *Cell Mol. Life Sci.* – 2007. – Vol. 64, № 22. – P. 2887-99.
89. Pintus F., Sabatucci A., Maccarrone M., Dainese E., Medda R. Amine oxidase from *Euphorbia characias*: Kinetic and structural characterization // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2018. – Vol. 65, № 1. – P. 81-88.
90. Vallet S. D., Ricard-Blum S. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links // *Essays Biochem.* – 2019. – Vol. 63, № 3. – P. 349-364.
91. Vakal S., Jalkanen S., Dahlstrom K. M., Salminen T. A. Human Copper-Containing Amine Oxidases in Drug Design and Development // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25, № 6.
92. Whittaker J. W. The radical chemistry of galactose oxidase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – Vol. 433, № 1. – P. 227-39.
93. Kersten P., Cullen D. Copper radical oxidases and related extracellular oxidoreductases of wood-decay Agaricomycetes // *Fungal Genet. Biol.* – 2014. – Vol. 72. – P. 124-130.

94. Yin D. T., Urresti S., Lafond M., Johnston E. M., Derikvand F., Ciano L., Berrin J. G., Henrissat B., Walton P. H., Davies G. J., Brumer H. Structure-function characterization reveals new catalytic diversity in the galactose oxidase and glyoxal oxidase family // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 10197.
95. Andberg M., Mollerup F., Parikka K., Koutaniemi S., Boer H., Juvonen M., Master E., Tenkanen M., Kruus K. A Novel *Colletotrichum graminicola* Raffinose Oxidase in the AA5 Family // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2017. – Vol. 83, № 20.
96. McGrath A. P., Hilmer K. M., Collyer C. A., Shepard E. M., Elmore B. O., Brown D. E., Dooley D. M., Guss J. M. Structure and inhibition of human diamine oxidase // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48, № 41. – P. 9810-22.
97. Shepard E. M., Dooley D. M. Inhibition and oxygen activation in copper amine oxidases // *Acc. Chem. Res.* – 2015. – Vol. 48, № 5. – P. 1218-26.
98. Ito N., Phillips S. E., Stevens C., Ogel Z. B., McPherson M. J., Keen J. N., Yadav K. D., Knowles P. F. Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase // *Nature.* – 1991. – Vol. 350, № 6313. – P. 87-90.
99. Prigge S. T., Kolhekar A. S., Eipper B. A., Mains R. E., Amzel L. M. Amidation of bioactive peptides: the structure of peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase // *Science.* – 1997. – Vol. 278, № 5341. – P. 1300-5.
100. Chen P., Bell J., Eipper B. A., Solomon E. I. Oxygen activation by the noncoupled binuclear copper site in peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase. Spectroscopic definition of the resting sites and the putative Cu(II)-OOH intermediate // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43, № 19. – P. 5735-47.
101. Maheshwari S., Shimokawa C., Rudzka K., Kline C. D., Eipper B. A., Mains R. E., Gabelli S. B., Blackburn N., Amzel L. M. Effects of copper occupancy on the conformational landscape of peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase // *Commun. Biol.* – 2018. – Vol. 1. – P. 74.
102. Crespo A., Marti M. A., Roitberg A. E., Amzel L. M., Estrin D. A. The catalytic mechanism of peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase investigated by computer simulation // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128, № 39. – P. 12817-28.
103. Chufan E. E., Prigge S. T., Siebert X., Eipper B. A., Mains R. E., Amzel L. M. Differential reactivity between two copper sites in peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. — Vol. 132, № 44. – P. 15565-72.
104. Tainer J. A., Getzoff E. D., Beem K. M., Richardson J. S., Richardson D. C. Determination and analysis of the 2 Å-structure of copper, zinc superoxide dismutase // *J. Mol. Biol.* – 1982. – Vol. 160, № 2. – P. 181-217.

105. Hernandez-Santoyo A., Landa A., Gonzalez-Mondragon E., Pedraza-Escalona M., Parra-Unda R., Rodriguez-Romero A. Crystal structure of Cu / Zn superoxide dismutase from *Taenia solium* reveals metal-mediated self-assembly // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278, № 18. – P. 3308-18.
106. Ciriolo M. R., Desideri A., Paci M., Rotilio G. Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I).glutathione complex // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265, № 19. – P. 11030-4.
107. Polizio F., Bizzarri A. R., Cannistraro S., Desideri A. Solvent effects on the distribution of conformational substates in native and azide reacted Cu, Zn superoxide dismutase. An EPR study // *Eur. Biophys. J.* – 1997. – Vol. 26, № 4. – P. 291-7.
108. Searcy D. G., Whitehead J. P., Maroney M. J. Interaction of Cu,Zn superoxide dismutase with hydrogen sulfide // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1995. – Vol. 318, № 2. – P. 251-63.
109. Dodd F. E., Hasnain S. S., Abraham Z. H., Eady R. R., Smith B. E. Structures of a blue-copper nitrite reductase and its substrate-bound complex // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 1997. – Vol. 53, № Pt 4. – P. 406-18.
110. Abraham Z. H., Lowe D. J., Smith B. E. Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres // *Biochem. J.* – 1993. – Vol. 295 (Pt 2), № Pt 2. – P. 587-93.
111. Cristaldi J. C., Ferroni F. M., Dure A. B., Ramirez C. S., Dalosto S. D., Rizzi A. C., Gonzalez P. J., Rivas M. G., Brondino C. D. Heterologous production and functional characterization of *Bradyrhizobium japonicum* copper-containing nitrite reductase and its physiological redox partner cytochrome c(550) // *Metallomics.* – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. 2084-2097.
112. Barreiro D. S., Oliveira R. N. S., Pauleta S. R. Biochemical Characterization of the Copper Nitrite Reductase from *Neisseria gonorrhoeae* // *Biomolecules.* – 2023. – Vol. 13, № 8.
113. Hedison T. M., Shanmugam M., Heyes D. J., Edge R., Scrutton N. S. Active Intermediates in Copper Nitrite Reductase Reactions Probed by a Cryotrapping-Electron Paramagnetic Resonance Approach // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2020. – Vol. 59, № 33. – P. 13936-13940.
114. Eyice O., Myronova N., Pol A., Carrion O., Todd J. D., Smith T. J., Gurman S. J., Cuthbertson A., Mazard S., Mennink-Kersten M. A., Bugg T. D., Andersson K. K., Johnston A. W., Op den Camp H. J., Schafer H. Bacterial SBP56 identified as a Cu-dependent methanethiol oxidase widely distributed in the biosphere // *ISME J.* – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 145-160.
115. Pol A., Renkema G. H., Tangerman A., Winkel E. G., Engelke U. F., de Brouwer A. P. M., Lloyd K. C., Araiza R. S., van den Heuvel L., Omran H., Olbrich H., Oude Elberink M., Gilissen C., Rodenburg R. J., Sass J. O., Schwab K. O., Schafer H., Venselaar H., Sequeira J. S., Op den Camp H. J. M., Wevers R. A. Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis // *Nat. Genet.* – 2018. – Vol. 50, № 1. – P. 120-129.

116. Philipp T. M., Gong W., Kohnlein K., Ohse V. A., Muller F. I., Priebs J., Steinbrenner H., Klotz L. O. SEMO-1, a novel methanethiol oxidase in *Caenorhabditis elegans*, is a pro-aging factor conferring selective stress resistance // *Biofactors*. – 2022. – Vol. 48, № 3. – P. 699-706.
117. Philipp T. M., Gernoth L., Will A., Schwarz M., Ohse V. A., Kipp A. P., Steinbrenner H., Klotz L. O. Selenium-binding protein 1 (SELENBP1) is a copper-dependent thiol oxidase // *Redox Biol.* – 2023. – Vol. 65. – P. 102807.
118. Cuff M. E., Miller K. I., van Holde K. E., Hendrickson W. A. Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin // *J Mol Biol.* – 1998. – May 15. – Vol. 278, № 4. – P. 855-70.
119. Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J. C., Krebs B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center // *Nat. Struct. Biol.* – 1998. – Vol. 5, № 12. – P. 1084-90.
120. Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., Yoshitsu H., Sugiyama M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 13. – P. 8981-90.
121. Fujieda N., Yabuta S., Ikeda T., Oyama T., Muraki N., Kurisu G., Itoh S. Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 30. – P. 22128-40.
122. Ginsbach J. W., Kieber-Emmons M. T., Nomoto R., Noguchi A., Ohnishi Y., Solomon E. I. Structure/function correlations among coupled binuclear copper proteins through spectroscopic and reactivity studies of NspF // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2012. – Vol. 109, № 27. – P. 10793-7.
123. Kanteev M., Goldfeder M., Fishman A. Structure-function correlations in tyrosinases // *Protein Sci.* – 2015. – Vol. 24, № 9. – P. 1360-9.
124. Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H., Inlow J. K. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species // *J. Inorg. Biochem.* – 2006. – Vol. 100, № 1. – P. 108-23.
125. Kato S., Matsui T., Gatsogiannis C., Tanaka Y. Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology // *Biophys. Rev.* – 2018. – Vol. 10, № 2. – P. 191-202.
126. Decker H., Rimke T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 40. – P. 25889-92.
127. Kaintz C., Mauracher S. G., Rompel A. Type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* – 2014. – Vol. 97. – P. 1-35.
128. Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. Laccases: a never-ending story // *Cell Mol. Life Sci.* – 2010. – Vol. 67, № 3. – P. 369-85.
129. Messerschmidt A., Rossi A., Ladenstein R., Huber R., Bolognesi M., Gatti G., Marchesini A., Petruzzelli R., Finazzi-Agro A. X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase

from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands // *J. Mol. Biol.* – 1989. – Vol. 206, № 3. – P. 513-29.

130. Mizutani K., Toyoda M., Sagara K., Takahashi N., Sato A., Kamitaka Y., Tsujimura S., Nakanishi Y., Sugiura T., Yamaguchi S., Kano K., Mikami B. X-ray analysis of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* at 2.3 Å resolution using a twinned crystal // *Acta Crystallogr. Sect F Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2010. – Vol. 66, № Pt 7. – P. 765-70.

131. Smith A. W., Camara-Artigas A., Wang M., Allen J. P., Francisco W. A. Structure of phenoxazinone synthase from *Streptomyces antibioticus* reveals a new type 2 copper center // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45, № 14. – P. 4378-87.

132. Taylor A. B., Stoj C. S., Ziegler L., Kosman D. J., Hart P. J. The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – Vol. 102, № 43. – P. 15459-64.

133. Wikstrom M., Krab K., Sharma V. Oxygen Activation and Energy Conservation by Cytochrome c Oxidase // *Chem. Rev.* – 2018. – Vol. 118, № 5. – P. 2469-2490.

134. Solomon E. I. Dioxygen Binding, Activation, and Reduction to H₂O by Cu Enzymes // *Inorg. Chem.* – 2016. – Vol. 55, № 13. – P. 6364-75.

135. Morgada M. N., Murgida D. H., Vila A. J. Purple Mixed-Valent Copper A // *Met. Ions Life Sci.* – 2020. – Vol. 20.

136. Shinzawa-Itoh K., Hatanaka M., Fujita K., Yano N., Ogasawara Y., Iwata J., Yamashita E., Tsukahara T., Yoshikawa S., Muramoto K. The 1.3-Å resolution structure of bovine cytochrome c oxidase suggests a dimerization mechanism // *BBA Adv.* – 2021. – Vol. 1. – P. 100009.

137. Brown K., Tegoni M., Prudencio M., Pereira A. S., Besson S., Moura J. J., Moura I., Cambillau C. A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7, № 3. – P. 191-5.

138. Haltia T., Brown K., Tegoni M., Cambillau C., Saraste M., Mattila K., Djinovic-Carugo K. Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 369, № Pt 1. – P. 77-88.

139. Pauleta S. R., Carepo M. S. P., Moura I. The Tetranuclear Copper-Sulfide Center of Nitrous Oxide Reductase // *Met. Ions Life Sci.* – 2020. – Vol. 20.

140. Robinson H., Ang M. C., Gao Y. G., Hay M. T., Lu Y., Wang A. H. Structural basis of electron transfer modulation in the purple CuA center // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, № 18. – P. 5677-83.

141. Fisher O. S., Kenney G. E., Ross M. O., Ro S. Y., Lemma B. E., Batelu S., Thomas P. M., Sosnowski V. C., DeHart C. J., Kelleher N. L., Stemmler T. L., Hoffman B. M., Rosenzweig A.

- C. Characterization of a long overlooked copper protein from methane- and ammonia-oxidizing bacteria // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 4276.
142. Brown K., Djinojic-Carugo K., Haltia T., Cabrito I., Saraste M., Moura J. J., Moura I., Tegoni M., Cambillau C. Revisiting the catalytic CuZ cluster of nitrous oxide (N₂O) reductase. Evidence of a bridging inorganic sulfur // *J. Biol Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 52. – P. 41133-6.
143. Paraskevopoulos K., Antonyuk S. V., Sawers R. G., Eady R. R., Hasnain S. S. Insight into catalysis of nitrous oxide reductase from high-resolution structures of resting and inhibitor-bound enzyme from *Achromobacter cycloclastes* // *J. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 362, № 1. – P. 55-65.
144. Soulimane T., Buse G., Bourenkov G. P., Bartunik H. D., Huber R., Than M. E. Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus* // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19, № 8. – P. 1766-76.
145. Kelly M., Lappalainen P., Talbo G., Haltia T., van der Oost J., Saraste M. Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 22. – P. 16781-7.
146. Ramirez B. E., Malmstrom B. G., Winkler J. R., Gray H. B. The currents of life: the terminal electron-transfer complex of respiration // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1995. – Vol. 92, № 26. – P. 11949-51.
147. Farrar J. A., Lappalainen P., Zumft W. G., Saraste M., Thomson A. J. Spectroscopic and mutagenesis studies on the CuA centre from the cytochrome-c oxidase complex of *Paracoccus denitrificans* // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – Vol. 232, № 1. – P. 294-303.
148. Prudencio M., Pereira A. S., Tavares P., Besson S., Cabrito I., Brown K., Samyn B., Devreese B., Van Beeumen J., Rusnak F., Fauque G., Moura J. J., Tegoni M., Cambillau C., Moura I. Purification, characterization, and preliminary crystallographic study of copper-containing nitrous oxide reductase from *Pseudomonas nautica* 617 // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39, № 14. – P. 3899-907.
149. Aoyama H., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K., Hirata K., Yamashita E., Tsukihara T., Ogura T., Yoshikawa S. A peroxide bridge between Fe and Cu ions in the O₂ reduction site of fully oxidized cytochrome c oxidase could suppress the proton pump // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – Vol. 106, № 7. – P. 2165-9.
150. Bhagi-Damodaran A., Michael M. A., Zhu Q., Reed J., Sandoval B. A., Mirts E. N., Chakraborty S., Moenne-Loccoz P., Zhang Y., Lu Y. Why copper is preferred over iron for oxygen activation and reduction in haem-copper oxidases // *Nat. Chem.* – 2017. – Vol. 9, № 3. – P. 257-263.
151. Pomowski A., Zumft W. G., Kroneck P. M., Einsle O. N₂O binding at a [4Cu:2S] copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase // *Nature.* – 2011. – Vol. 477, № 7363. – P. 234-7.

152. Chen P., DeBeer George S., Cabrito I., Antholine W. E., Moura J. J., Moura I., Hedman B., Hodgson K. O., Solomon E. I. Electronic structure description of the $\mu(4)$ -sulfide bridged tetranuclear Cu(Z) center in N(2)O reductase // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124, № 5. – P. 744-5.
153. Johnston E. M., Dell'Acqua S., Pauleta S. R., Moura I., Solomon E. I. Protonation state of the Cu(4)S(2) Cu(Z) site in nitrous oxide reductase: redox dependence and insight into reactivity // *Chem. Sci.* – 2015. – Vol. 6, № 10. – P. 5670-5679.
154. Johnston E. M., Dell'Acqua S., Ramos S., Pauleta S. R., Moura I., Solomon E. I. Determination of the active form of the tetranuclear copper sulfur cluster in nitrous oxide reductase // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 136, № 2. – P. 614-7.
155. Prasser B., Schoner L., Zhang L., Einsle O. The Copper Chaperone NosL Forms a Heterometal Site for Cu Delivery to Nitrous Oxide Reductase // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2021. – Vol. 60, № 34. – P. 18810-18814.
156. Muller C., Zhang L., Zipfel S., Topitsch A., Lutz M., Eckert J., Prasser B., Chami M., Lu W., Du J., Einsle O. Molecular interplay of an assembly machinery for nitrous oxide reductase // *Nature.* – 2022. – Vol. 608, № 7923. – P. 626-631.
157. Frandsen K. E., Simmons T. J., Dupree P., Poulsen J. C., Hemsworth G. R., Ciano L., Johnston E. M., Tovborg M., Johansen K. S., von Freiesleben P., Marmuse L., Fort S., Cottaz S., Driguez H., Henrissat B., Lenfant N., Tuna F., Baldansuren A., Davies G. J., Lo Leggio L., Walton P. H. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monoxygenases // *Nat. Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 12, № 4. – P. 298-303.
158. Zhang L., Koay M., Maher M. J., Xiao Z., Wedd A. G. Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128, № 17. – P. 5834-50.
159. Lawton T. J., Kenney G. E., Hurley J. D., Rosenzweig A. C. The CopC Family: Structural and Bioinformatic Insights into a Diverse Group of Periplasmic Copper Binding Proteins // *Biochemistry.* – 2016. – Vol. 55, № 15. – P. 2278-90.
160. Osipov E. M., Lilina A. V., Tsallagov S. I., Safonova T. N., Sorokin D. Y., Tikhonova T. V., Popov V. O. Structure of the flavocytochrome c sulfide dehydrogenase associated with the copper-binding protein CopC from the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1 // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2018. – Vol. 74, № Pt 7. – P. 632-642.
161. Udagedara S. R., Wijekoon C. J. K., Xiao Z., Wedd A. G., Maher M. J. The crystal structure of the CopC protein from *Pseudomonas fluorescens* reveals amended classifications for the CopC protein family // *J. Inorg. Biochem.* – 2019. – Vol. 195. – P. 194-200.

162. Walton P. H., Davies G. J., Diaz D. E., Franco-Cairo J. P. The histidine brace: nature's copper alternative to haem? // *FEBS Lett.* – 2023. – Vol. 597, № 4. – P. 485-494.
163. Cutsail G. E., 3rd, Ross M. O., Rosenzweig A. C., DeBeer S. Towards a unified understanding of the copper sites in particulate methane monooxygenase: an X-ray absorption spectroscopic investigation // *Chem Sci.* – 2021. – Vol. 12, № 17. – P. 6194-6209.
164. Koo C. W., Tucci F. J., He Y., Rosenzweig A. C. Recovery of particulate methane monooxygenase structure and activity in a lipid bilayer // *Science.* – 2022. – Vol. 375, № 6586. – P. 1287-1291.
165. Bissaro B., Eijsink V. G. H. Lytic polysaccharide monooxygenases: enzymes for controlled and site-specific Fenton-like chemistry // *Essays Biochem.* – 2023. – Vol. 67, № 3. – P. 575-584.
166. Bissaro B., Rohr A. K., Muller G., Chylenski P., Skaugen M., Forsberg Z., Horn S. J., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V. G. H. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H(2)O(2) // *Nat. Chem. Biol.* – 2017. – Oct. – Vol. 13, № 10. – P. 1123-1128.
167. Dierks T., Schmidt B., von Figura K. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1997. – Vol. 94, № 22. – P. 11963-8.
168. Carlson B. L., Ballister E. R., Skordalakes E., King D. S., Breidenbach M. A., Gilmore S. A., Berger J. M., Bertozzi C. R. Function and structure of a prokaryotic formylglycine-generating enzyme // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 29. – P. 20117-25.
169. Roeser D., Dickmanns A., Gasow K., Rudolph M. G. De novo calcium/sulfur SAD phasing of the human formylglycine-generating enzyme using in-house data // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2005. – Vol. 61, № Pt 8. – P. 1057-66.
170. Holder P. G., Jones L. C., Drake P. M., Barfield R. M., Banas S., de Hart G. W., Baker J., Rabuka D. Reconstitution of Formylglycine-generating Enzyme with Copper(II) for Aldehyde Tag Conversion // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 25. – P. 15730-15745.
171. Knop M., Engi P., Lemnar R., Seebeck F. P. In Vitro Reconstitution of Formylglycine-Generating Enzymes Requires Copper(I) // *Chembiochem.* – 2015. – Vol. 16, № 15. – P. 2147-50.
172. Knop M., Dang T. Q., Jeschke G., Seebeck F. P. Copper is a Cofactor of the Formylglycine-Generating Enzyme // *Chembiochem.* – 2017. – Vol. 18, № 2. – P. 161-165.
173. Meury M., Knop M., Seebeck F. P. Structural Basis for Copper-Oxygen Mediated C-H Bond Activation by the Formylglycine-Generating Enzyme // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2017. – Vol. 56, № 28. – P. 8115-8119.
174. Leisinger F., Miarzlou D. A., Seebeck F. P. Non-Coordinative Binding of O(2) at the Active Center of a Copper-Dependent Enzyme // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2021. – Vol. 60, № 11. – P. 6154-6159.

175. Wu Y., Zhao C., Su Y., Shaik S., Lai W. Mechanistic Insight into Peptidyl-Cysteine Oxidation by the Copper-Dependent Formylglycine-Generating Enzyme // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2023. – Vol. 62, № 7. – P. e202212053.
176. Hausrath A. C., Ramirez N. A., Ly A. T., McEvoy M. M. The bacterial copper resistance protein CopG contains a cysteine-bridged tetranuclear copper cluster // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, № 32. – P. 11364-11376.
177. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Lysenko A. M., Mityushina L. L., Kuenen J. G. Thioalkalivibrio thiocyanoxidans sp. nov. and Thioalkalivibrio paradoxus sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes // *Int J Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 52, № Pt 2. – P. 657-664.
178. Katayama Y., Kanagawa T., Kuraishi H. Emission of carbonyl sulfide by Thiobacillus thioparus grown with thiocyanate in pure and mixed cultures // *FEMS Microbiology Letters.* – 1993. – Vol. 114, № 2. – P. 223-227.
179. Katayama Y., Narahara Y., Inoue Y., Amano F., Kanagawa T., Kuraishi H. A thiocyanate hydrolase of Thiobacillus thioparus. A novel enzyme catalyzing the formation of carbonyl sulfide from thiocyanate // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267, № 13. – P. 9170-5.
180. Katayama Y., Hashimoto K., Nakayama H., Mino H., Nojiri M., Ono T. A., Nyunoya H., Yohda M., Takio K., Odaka M. Thiocyanate hydrolase is a cobalt-containing metalloenzyme with a cysteine-sulfinic acid ligand // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128, № 3. – P. 728-9.
181. Arakawa T., Kawano Y., Kataoka S., Katayama Y., Kamiya N., Yohda M., Odaka M. Structure of thiocyanate hydrolase: a new nitrile hydratase family protein with a novel five-coordinate cobalt(III) center // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 366, № 5. – P. 1497-509.
182. Berben T., Balkema C., Sorokin D. Y., Muyzer G. Analysis of the Genes Involved in Thiocyanate Oxidation during Growth in Continuous Culture of the Haloalkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacterium Thioalkalivibrio thiocyanoxidans ARh 2(T) Using Transcriptomics // *mSystems.* – 2017. – Vol. 2, № 6.
183. Berben T., Overmars L., Sorokin D. Y., Muyzer G. Comparative Genome Analysis of Three Thiocyanate Oxidizing Thioalkalivibrio Species Isolated from Soda Lakes // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 254.
184. Berben T., Overmars L., Sorokin D. Y., Muyzer G. Diversity and Distribution of Sulfur Oxidation-Related Genes in Thioalkalivibrio, a Genus of Chemolithoautotrophic and Haloalkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacteria // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 160.
185. Tsallagov S. I., Sorokin D. Y., Tikhonova T. V., Popov V. O., Muyzer G. Comparative Genomics of Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1(T) and Guyparkeria sp. SCN-R1, Halophilic

Chemolithoautotrophic Sulfur-Oxidizing Gammaproteobacteria Capable of Using Thiocyanate as Energy Source // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 898.

186. Glazunova O. A., Polyakov K. M., Fedorova T. V., Dorovatovskii P. V., Koroleva O. V. Elucidation of the crystal structure of *Coriolopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2015. – Vol. 71, № Pt 4. – P. 854-61.

187. Osipov E. M., Polyakov K. M., Tikhonova T. V., Kittl R., Dorovatovskii P. V., Shleev S. V., Popov V. O., Ludwig R. Incorporation of copper ions into crystals of T2 copper-depleted laccase from *Botrytis aclada* // *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* – 2015. – Vol. 71, № Pt 12. – P. 1465-9.

188. Britikov V. V., Bocharov E. V., Britikova E. V., Dergousova N. I., Kulikova O. G., Solovieva A. Y., Shipkov N. S., Varfolomeeva L. A., Tikhonova T. V., Timofeev V. I., Shtykova E. V., Altukhov D. A., Usanov S. A., Arseniev A. S., Rakitina T. V., Popov V. O. Unusual Cytochrome c552 from *Thioalkalivibrio paradoxus*: Solution NMR Structure and Interaction with Thiocyanate Dehydrogenase // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 17.

189. Khrenova M. G., Soloveva A. Y., Varfolomeeva L. A., Tikhonova T. V., Popov V. O. The O to S substitution in urea brings inhibition activity against thiocyanate dehydrogenase // *Mendeleev Communication.* – 2021. – Vol. 31. – P. 373-375.

190. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 372, № 3. – P. 774-97.

191. Bolic B., Mijuskovic A., Popovic-Bijelic A., Nikolic-Kokic A., Spasic S., Blagojevic D., Spasic M. B., Spasojevic I. Reactions of superoxide dismutases with HS(-)/H₂S and superoxide radical anion: An in vitro EPR study // *Nitric Oxide.* – 2015. – Vol. 51. – P. 19-23.

192. Doman A., Doka E., Garai D., Bogdandi V., Balla G., Balla J., Nagy P. Interactions of reactive sulfur species with metalloproteins // *Redox Biol.* – 2023. – Vol. 60. – P. 102617.

193. Bogdandi V., Ida T., Sutton T. R., Bianco C., Ditroi T., Koster G., Henthorn H. A., Minnion M., Toscano J. P., van der Vliet A., Pluth M. D., Feelisch M., Fukuto J. M., Akaike T., Nagy P. Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell? // *Br. J. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 176, № 4. – P. 646-670.

194. Iciek M., Bilaska-Wilkosz A., Kozdrowicki M., Gorny M. Reactive sulfur species and their significance in health and disease // *Biosci. Rep.* – 2022. – Vol. 42, № 9.

195. Tanabe T. S., Leimkuhler S., Dahl C. The functional diversity of the prokaryotic sulfur carrier protein TusA // *Adv. Microb. Physiol.* – 2019. – Vol. 75. – P. 233-277.

196. Kielkopf C. L., Bauer W., Urbatsch I. L. Bradford Assay for Determining Protein Concentration // *Cold Spring Harb. Protoc.* – 2020. – Vol. 2020, № 4. – P. 102269.
197. Интерпретация спектров ЭПР координационных соединений. / Ракитин Ю. В., Ларин Г. М., Минин В. В. – Москва: Наука, 1993.
198. Kabsch W. Xds // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2010. – Vol. 66, № Pt 2. – P. 125-32.
199. Winter G., Waterman D. G., Parkhurst J. M., Brewster A. S., Gildea R. J., Gerstel M., Fuentes-Montero L., Vollmar M., Michels-Clark T., Young I. D., Sauter N. K., Evans G. DIALS: implementation and evaluation of a new integration package // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2018. – Vol. 74, № Pt 2. – P. 85-97.
200. Agirre J., Atanasova M., Bagdonas H., Ballard C. B., Basle A., Beilsten-Edmands J., Borges R. J., Brown D. G., Burgos-Marmol J. J., Berrisford J. M., Bond P. S., Caballero I., Catapano L., Chojnowski G., Cook A. G., Cowtan K. D., Croll T. I., Debreczeni J. E., Devenish N. E., Dodson E. J., Drevon T. R., Emsley P., Evans G., Evans P. R., Fando M., Foadi J., Fuentes-Montero L., Garman E. F., Gerstel M., Gildea R. J., Hatti K., Hekkelman M. L., Heuser P., Hoh S. W., Hough M. A., Jenkins H. T., Jimenez E., Joosten R. P., Keegan R. M., Keep N., Krissinel E. B., Kolenko P., Kovalevskiy O., Lamzin V. S., Lawson D. M., Lebedev A. A., Leslie A. G. W., Lohkamp B., Long F., Maly M., McCoy A. J., McNicholas S. J., Medina A., Millan C., Murray J. W., Murshudov G. N., Nicholls R. A., Noble M. E. M., Oeffner R., Pannu N. S., Parkhurst J. M., Pearce N., Pereira J., Perrakis A., Powell H. R., Read R. J., Rigden D. J., Rochira W., Sammito M., Sanchez Rodriguez F., Sheldrick G. M., Shelley K. L., Simkovic F., Simpkin A. J., Skubak P., Sobolev E., Steiner R. A., Stevenson K., Tews I., Thomas J. M. H., Thorn A., Valls J. T., Uski V., Uson I., Vagin A., Velankar S., Vollmar M., Walden H., Waterman D., Wilson K. S., Winn M. D., Winter G., Wojdyr M., Yamashita K. The CCP4 suite: integrative software for macromolecular crystallography // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2023. – Vol. 79, № Pt 6. – P. 449-461.
201. Vagin A., Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2010. – Vol. 66, № Pt 1. – P. 22-5.
202. Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., Cowtan K. Features and development of Coot // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2010. – Vol. 66, № Pt 4. – P. 486-501.
203. Kabsch W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors // *Acta Crystallogr A Foundations and Advances.* – 1976. – Vol. 32, № 5. – P. 922-923.
204. Slobodkina G. B., Merkel A. Y., Novikov A. A., Bonch-Osmolovskaya E. A., Slobodkin A. I. *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Extremophiles.* – 2020. – Vol. 24, № 1. – P. 177-185.

205. Sievers F., Higgins D. G. Clustal omega // *Curr. Protoc. Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 48. – P. 3 13 1-3 13 16.
206. Wijekoon C. J., Young T. R., Wedd A. G., Xiao Z. CopC protein from *Pseudomonas fluorescens* SBW25 features a conserved novel high-affinity Cu(II) binding site // *Inorg. Chem.* – 2015. – Vol. 54, № 6. – P. 2950-9.
207. Cupp-Sutton K. A., Ashby M. T. Biological Chemistry of Hydrogen Selenide // *Antioxidants* (Basel). – 2016. – Vol. 5, № 4.
208. Combs G. F., Jr., Garbisu C., Yee B. C., Yee A., Carlson D. E., Smith N. R., Magyarosy A. C., Leighton T., Buchanan B. B. Bioavailability of selenium accumulated by selenite-reducing bacteria // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 1996. – Vol. 52, № 3. – P. 209-25.
209. Raucci R., Colonna G., Guerriero E., Capone F., Accardo M., Castello G., Costantini S. Structural and functional studies of the human selenium binding protein-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1814, № 4. – P. 513-22.
210. Hakansson K., Doherty A. J., Shuman S., Wigley D. B. X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes // *Cell.* – 1997. – Vol. 89, № 4. – P. 545-53.