

На правах рукописи

Варфоломеева Лариса Александровна

**СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХЪЯДЕРНОГО
МЕДНОГО ЦЕНТРА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2025 г.

Работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель:

Старший научный сотрудник
Лаборатории инженерной энзимологии
ФИЦ Биотехнологии РАН
Кандидат биологических наук
Бойко Константин Михайлович

Официальные оппоненты:

Тищенко Светлана Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук».

Мишин Алексей Викторович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Защита диссертации состоится « » _____ 2025 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.233.01,
Кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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 трехядерный 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.

Цели 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 methyilotrophicum*. 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 ($\text{Cu}2$ и $\text{Cu}3$).
3. Структуры комплексов *pmTcDH* с ингибитором 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 автора

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 помощь в кристаллизации 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 и обработку спектров к.х.н. Н.Н. Ефимова (ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН), к.х.н. А.В. Ротова (ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН) и к.ф.-м.н. Е.А. Уголкову (ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН).

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 мультиконференция 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В **главе 1** приведено краткое описание приложения методов рентгеноструктурного анализа (РСА) и спектроскопии ЭПР для исследования медных центров белков. Рассмотрена современная классификация медных центров ферментов. Проанализирована литература, посвященная исследованиям известных на данный момент медных центров ферментов, и подробно описаны их структурные и спектральные свойства. Отдельный раздел посвящен детальному обзору опубликованных данных о структуре и функционировании *tpTcDH*. В данном разделе обозначены проблемы структурных данных *tpTcDH*, такие как двойникование кристаллов, трудности получения полного трехъядерного медного центра в кристаллической структуре, отсутствие структур комплексов с ингибиторами и неопределенность в степени окисления каждого из ионов меди активного центра *tpTcDH*. В рамках данной работы планировалось разрешить все вышеперечисленные проблемы для уточнения закономерностей устройства и функционирования TcDH.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В **главе 2** приведено детальное описание экспериментальных методов, использованных в работе.

Объекты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны тиоцианатдегидрогеназы из бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (*tpTcDH*) и *Pelomicrobium methylotrophicum* (*pmTcDH*). В работе использовали рекомбинантные формы *pmTcDH* и *tpTcDH*, а также варианты *pmTcDH* и *tpTcDH* с точечными заменами по поверхности белковой глобулы или активному центру.

Спектроскопия ЭПР в X-диапазоне

Эксперименты по спектроскопии ЭПР образцов TcDH в X-диапазоне (частота микроволнового излучения ~ 9.5 ГГц) при температуре 20 К осуществляли совместно с сотрудниками ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН на ЭПР-спектрометре Elexsys-E680X (Bruker, США).

Рентгеноструктурный анализ

Первичный поиск условий кристаллизации исследуемых ферментов проводили с помощью автоматизированных систем Rigaku (Япония) и Oryx4 (Douglas Instruments, Великобритания) методом диффузии в парах (вариант – «сидячая капля»). Дальнейшую оптимизацию условий кристаллизации осуществляли в ручном режиме методом диффузии в парах (вариант – «висячая капля»). Комплексы фермента с ингибиторами получали путем настаивания кристаллов свободной формы ферментов. Дифракционные данные собирали на станциях РСА-Белок (КИСИ), IDA30-A3 (ESRF, Гренобль), BL41XU (SPring-8, Япония), BL17UM (SSRF, Шанхай) и лабораторном источнике XtaLAB Synergy-S (Rigaku, Япония) в ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН. Обработку дифракционных данных, решение и уточнение структур осуществляли с помощью пакета программ CrysAlis^{Pro}, XDS [1] и CCP4 [2]. Краткое описание полученных пространственных структур представлено в **таблице 1**.

Таблица 1. Пространственные структуры *tpTcDH* и *pmTcDH*, полученные в работе.

Структура	<i>tpTcDH</i> T169A	<i>tpTcDH</i> K281A	<i>tpTcDH</i> F436Q	Свободная форма <i>pmTcDH</i>
Пр. гр.	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_12_12_1$
a, b, c, Å	90.81 162.24 90.76	98.15 142.42 294.40	90.56 162.12 90.86	66.84 96.57 147.45
β , °	119.74	90.07	119.80	-
Разрешение, Å	1.80	2.07	2.00	1.05
R _{cryst} , %	18.6	17.9	17.4	10.9
R _{free} , %	25.4	23.4	21.4	12.6
Степень двойникования	0.56/0.44	1.00	0.56/0.44	1.00
Код PDB	8P3L	8P3M	8BPN	8Q9X

Таблица 1. Продолжение.

Структура	Комплекс <i>pmTcDH</i> с тиомочевинной	Комплекс <i>pmTcDH</i> с селеноцианатом	Апоформа <i>pmTcDH</i>	Активированная <i>pmTcDH</i> ^{Cu+2}
Пр. гр.	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$C222_1$	$C222_1$
a, b, c, Å	66.71 96.67 147.53	66.01 96.64 147.20	98.29 102.18 277.16	98.29 102.18 277.16
Разрешение, Å	1.10	1.80	1.45	1.80
R _{cryst} , %	10.7	18.9	16.7	17.0
R _{free} , %	12.4	23.5	19.6	22.0
Степень двойникования	1.00	1.00	1.00	1.00
Код PDB	8Q9Y	8YOU	8Z75	8Z76

Таблица 1. Продолжение.

Структура	Активированная <i>pmTcDH</i> ^{Cu+1}	Неактивированная <i>pmTcDH</i> H447Q	Активированная <i>pmTcDH</i> H447Q
Пр. гр.	$C222_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
a, b, c, Å	98.09 101.99 276.80	66.77 96.44 147.67	66.76 96.30 148.76
Разрешение, Å	2.00	1.45	1.55
R _{cryst} , %	17.5	15.0	16.4
R _{free} , %	22.4	17.4	19.5
Степень двойникования	1.00	1.00	1.00
Код PDB	8Z77	8YU5	8YU6

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В главе 3 представлены основные результаты исследования.

Первый подраздел третьей главы посвящен улучшению дифракционных свойств кристаллов *tpTcDH* посредством устранения их двойникования методом точечного мутагенеза поверхностных аминокислотных остатков белковой глобулы. Двойникование – это явление, при котором кристалл состоит из двух или более кристаллических доменов, ориентированных друг относительно друга определенным образом. Двойникование кристаллов снижает качество

дифракционных данных, усложняет решение структуры методом РСА и затрудняет интерпретацию карты электронной плотности [3, 4].

Одним из способов предотвращения двойнирования кристаллов является изменение кристаллических контактов между макромолекулами посредством внесения точечных замен на поверхности глобулы белка [5]. В случае *tpTcDH*, нарушение контактов между димерами фермента, расположенными в одной плоскости и формирующими в кристалле тетрамер, могло способствовать изменению кристаллической упаковки и препятствовать двойниванию. Для этой цели был проведен анализ междимерных контактов в тетрамере *tpTcDH*. В качестве мишеней для точечного мутагенеза были выбраны аминокислотные остатки T169, K264, K267 и K281, боковые группы которых вовлечены в образование водородных связей или солевых мостиков между двумя димерами фермента (**Рис. 1**).

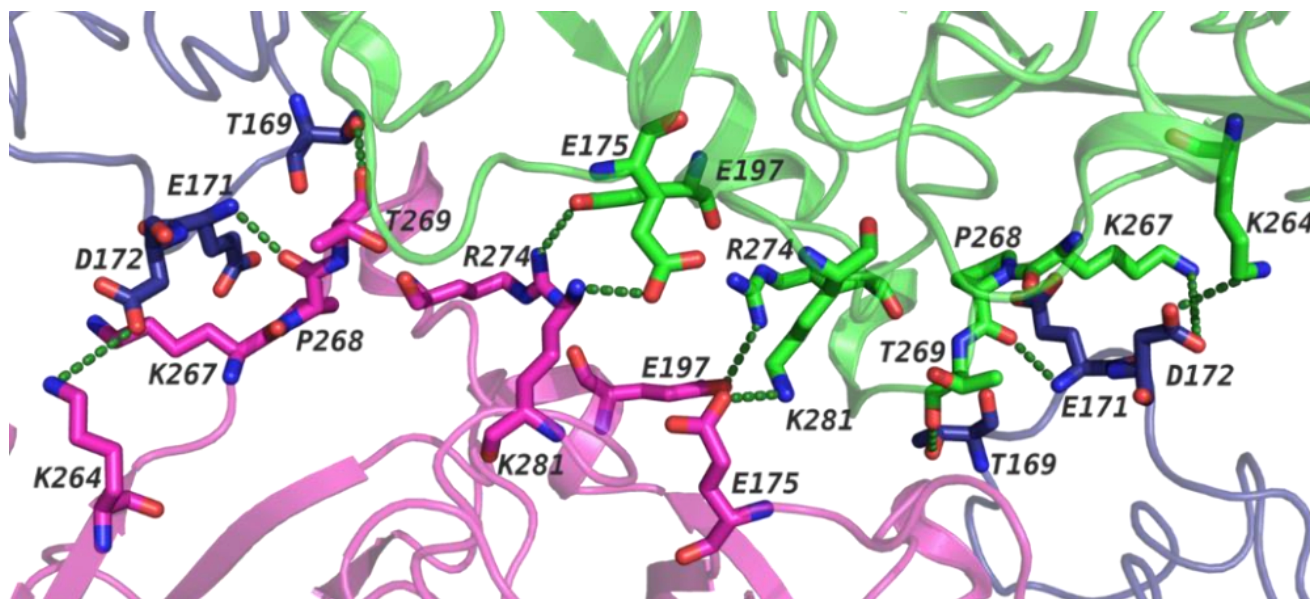


Рис. 1. Аминокислотные остатки на поверхности глобулы *tpTcDH*, вовлеченные в формирование междимерных контактов в кристаллическом тетрамере фермента. Две субъединицы димеров, участвующие в формировании большей площади интерфейса тетрамера, обозначены розовым и зеленым цветами, а две другие – фиолетовым цветом. Зелеными пунктирными линиями обозначены водородные связи и солевые мостики между аминокислотными остатками.

Все полученные формы *tpTcDH* с заменами по поверхности обладали ферментативной активностью. Для форм *tpTcDH* T169A, K281A и с двойной заменой (K264A, K267A) были получены кристаллы. Кристаллы *tpTcDH* (K264A, K267A) давали дифракционную картину с разрешением ~ 3 Å, поэтому от работы с ними в дальнейшем отказались. Структура *tpTcDH* T169A была решена с разрешением 1.80 Å и являлась двойником (**Таблица 1**). Анализ структуры показал, что замена T169A не привела к нарушению междимерных контактов и изменению планарной структуры тетрамера (**Рис. 2а**). Кристаллы *tpTcDH* K281A принадлежали к новой кристаллической модификации и не были двойниками (**Таблица 1**). Нарушение контактов между димерами посредством замены K281A способствовало искажению планарности тетрамера фермента в кристалле (**Рис. 2б**), изменению упаковки и, как следствие, невозможности образования кристаллов-двойников. Однако, качество структурных данных *tpTcDH* K281A оставалось недостаточным для исследования тонких деталей строения активного центра фермента, ввиду большого значения одного из параметров ячейки и относительно невысокого разрешения – 2.07 Å.

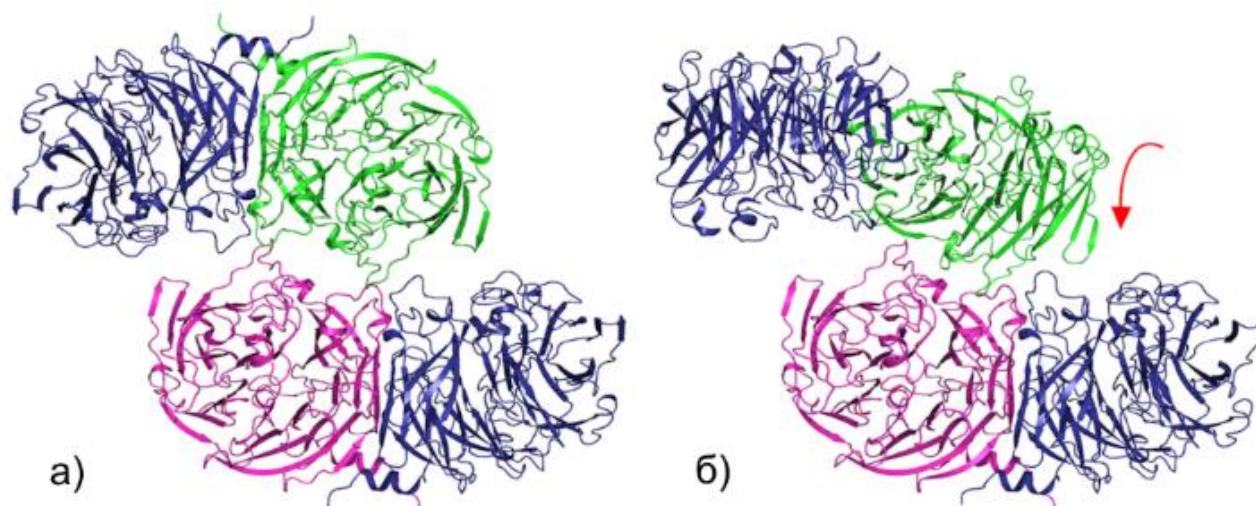


Рис. 2. Строение тетрамера рекомбинантных форм *tpTcDH* T169A (а) и *tpTcDH* K281A (б). Красная стрелка указывает направление, в котором один из димеров *tpTcDH* K281A повернут относительно плоскости второго в тетрамере.

Во втором подразделе третьей главы представлены результаты структурных исследований гомологичного *tpTcDH* фермента из бактерии *Pelomicrobium methylophilum* (*pmTcDH*) со степенью идентичности первичной последовательности ~ 69 %. В отличие от *tpTcDH*, кристаллы *pmTcDH* оказались более перспективными для рентгеноструктурных исследований, поскольку давали дифракционную картину с атомным разрешением – 1.05 Å (Таблица 1).

Субъединица димера *pmTcDH* представляет собой семилопастный β-пропеллер (Рис. 3а) и идентична структуре *tpTcDH*. В центральной полости пропеллера располагается активный центр фермента, содержащий три иона меди Cu1, Cu2 и Cu3.

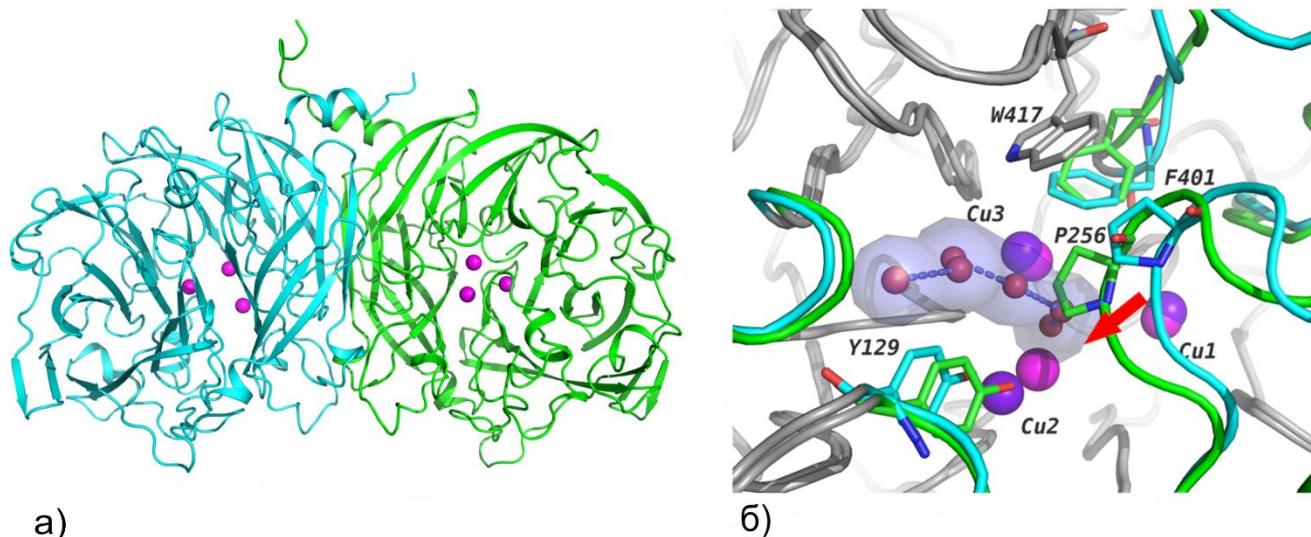


Рис. 3. Димер *pmTcDH* (а). Субъединицы димера показаны разными цветами. Ионы меди показаны розовыми сферами. Субстратный канал *pmTcDH* (б). Субъединицы в закрытой и открытой конформациях совмещены по всем Cα-атомам (r.m.s.d. 0.53 Å). Зеленым и голубым цветом обозначены различающиеся положения петель у субъединиц в закрытой и открытой конформациях. Ионы меди обозначены розовыми и фиолетовыми сферами для закрытой и открытой конформаций, соответственно. Молекулы растворителя, связанные водородными связями (голубые пунктирные линии) в канале, показаны красными сферами и голубой полупрозрачной поверхностью. Красная стрелка указывает направление смещения аминокислотного остатка P256 при закрытии канала.

Несмотря на сходство субъединиц, димеры *pm*TcDH и *tp*TcDH имеют важное структурное отличие. В случае *pm*TcDH субъединицы димера в кристалле принимают две разные конформации – открытую и закрытую, а в случае *tp*TcDH – всегда одинаковые. В открытой конформации активный центр доступен для молекул растворителя из внешней среды посредством субстратного канала (Рис. 3б). В закрытой конформации аминокислотный остаток R256 из подвижной петли 251-266 смещается на ~ 3 Å и перекрывает канал, разрывая цепочку из связанных водородными связями молекул воды (Рис. 3б).

Обе субъединицы димера *pm*TcDH содержат в активном центре три иона меди Cu1, Cu2 и Cu3 с полной заселенностью. В координации ионов меди принимают участие шесть аминокислотных остатков гистидина, а также аминокислотные остатки лизина и аспартата (Рис. 4а, б). Два каталитических аминокислотных остатка H101 и E253 в закрытой конформации образуют водородные связи с консервативной молекулой воды W (Рис. 4б), выполняющей роль нуклеофила в реакции. Высокое качество дифракционных данных позволило выявить тонкие различия в архитектуре трехъядерного медного центра в каждой из конформаций. Так, на основании корреляции между заселенностью ионов меди и их лигандов можно выделить два состояния медного центра в обеих субъединицах, которые на основании координации можно обозначить как окисленное и восстановленное. Исходя из устройства координационной сферы, в окисленном состоянии центра два иона меди Cu1 и Cu2, вероятно, находятся в состоянии Cu^{+2} , а в восстановленном состоянии – два или все три иона в зависимости от конформации (открытой или закрытой) в состоянии Cu^{+1} . Предполагается, что окисленное состояние в обеих конформациях возникает в ходе каталитического цикла (Рис. 4а, б), а восстановленное состояние (на рисунке не показано) представляет собой артефакт рентгеноструктурного эксперимента.

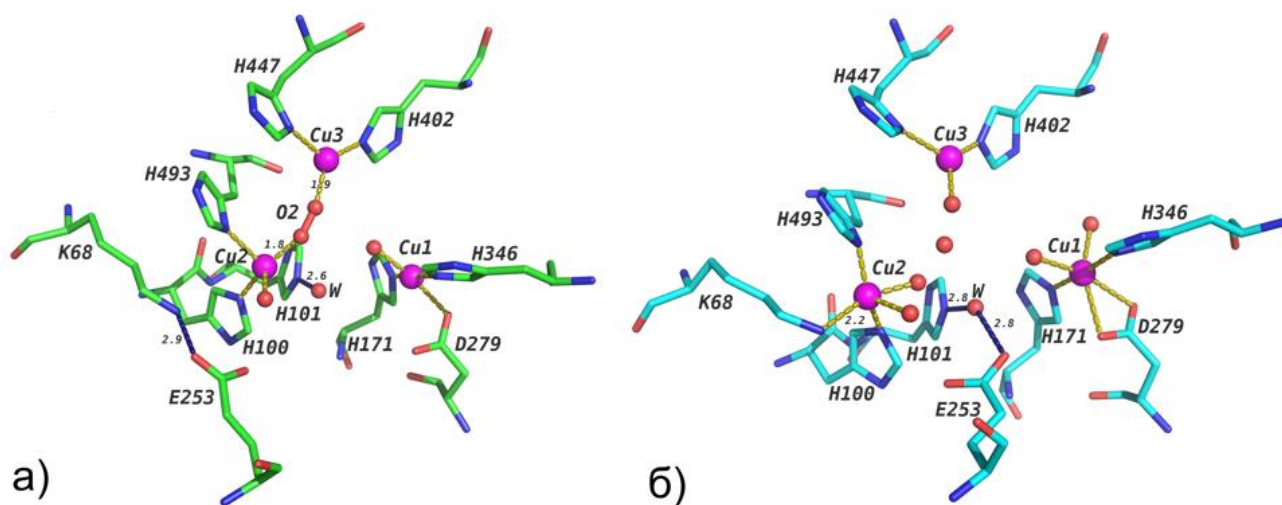


Рис. 4. Структура активного центра свободной формы *pm*TcDH в закрытой (а) и открытой (б) конформации для окисленного состояния. Консервативная молекула воды обозначена «W». Координационные и водородные связи показаны желтыми и синими пунктирными линиями, соответственно.

В закрытом активном центре свободной формы *pm*TcDH обнаружен молекулярный кислород с заселенностью 0.7 (Рис. 4а), что соответствует заселенности окисленного состояния. В закрытой конформации и окисленном состоянии устройство трехъядерного центра *pm*TcDH выглядит следующим образом (Рис. 4а): ион меди Cu1 координирован аминокислотными остатками H171, H346, D279 и молекулой воды по типу плоского квадрата, ион меди Cu2 – аминокислотными остатками H100, H493, кислородом и молекулой воды по типу тетраэдра, ион меди Cu3 – аминокислотными остатками H402, H447 и кислородом по типу треугольника. Переход в восстановленное состояние с заселенностью 0.3 сопровождается изменением

геометрии координации ионов меди Cu1 и Cu3 на линейную, а иона меди Cu2 – на треугольную. Один из каталитических аминокислотных остатков – E253 образует водородную связь с аминокислотным остатком K68, а второй – H101 связывает консервативную молекулу воды W.

В открытом активном центре свободной формы *ptTcDH* на месте лигандов обнаружены только молекулы растворителя. При этом заселенность окисленного состояния составляет 0.35 (Рис. 4б), а восстановленного соответственно – 0.65. В окисленном состоянии ион меди Cu1 координирован аминокислотными остатками H171, H346, D279 и двумя молекулами воды по типу октаэдра, ион меди Cu2 – аминокислотными остатками K68, H100, H493 и двумя молекулами воды по типу тригональной бипирамиды, ион меди Cu3 – аминокислотными остатками H402, H447 и молекулой воды по типу треугольника. В восстановленном состоянии геометрия координации ионы меди Cu1 изменяется на тетраэдрическую, иона меди Cu2 – на треугольную, а иона меди Cu3 – на линейную. Консервативная молекула воды W удерживается двумя водородными связями с каталитическими аминокислотными остатками H101 и E253.

На основании структурных данных высокого разрешения и известной предпочтительной координационной сферы для различных степеней окисления меди [6], было предположено, что в свободной форме *ptTcDH* в окисленном состоянии ионы меди Cu1 и Cu2 находятся в состоянии Cu^{+2} , а ион меди Cu3 – в состоянии Cu^{+1} . Однако, данные спектроскопии ЭПР в X-диапазоне показывают, что в растворе состояние трехъядерного медного центра свободной формы фермента описывается как $[\text{Cu}^{+2}\text{-Cu}^{+2}\text{-Cu}^{+2}]$ (Рис. 5, Таблица 2).

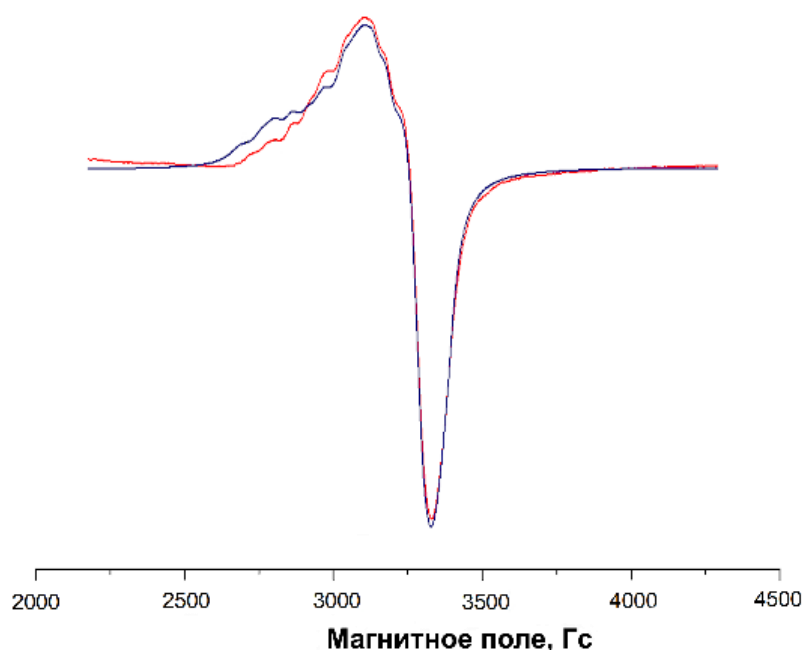


Рис.5. Экспериментальный (красный) и рассчитанный (синий) спектры ЭПР в X-диапазоне свободной формы *ptTcDH*.

Таблица 2. Параметры рассчитанного спектра ЭПР в X-диапазоне свободной формы *ptTcDH*.

Ион меди	g_x	g_y	g_z	$A_x, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_y, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_z, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	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

Следующий этап работы был посвящен получению структуры комплексов *ptTcDH* с ингибиторами для установления ориентации субстрата тиоцианата в активном центре фермента.

Результаты этих исследований представлены в **третьем и четвертом подразделах третьей главы** для тиомочевины (**Рис. 6**) и аналога субстрата селеноцианата (**Рис. 7а, б**). Тиомочевина ингибирует тиоцианатдегидрогеназную активность по смешанному механизму [7]. Структура комплекса *pmTcDH* с тиомочевинной была установлена с атомным разрешением 1.10 Å (**Таблица 1**). Высокое качество дифракционных данных позволило идентифицировать два положения ионов меди и, как и в структуре свободной формы, выделить два состояния трехъядерного центра, окисленное (**Рис. 6**) и восстановленное (на рисунке не показано), в закрытой и открытой конформациях. Тиомочевина обнаружена только в активном центре субъединицы в закрытой конформации с заселенностью 0.7 (**Рис. 6**), коррелирующей с заселенностью окисленного состояния. Геометрия координации ионов меди и архитектура активного центра в обоих состояниях в закрытой конформации сходна с таковыми для свободной формы фермента, за исключением природы связавшегося лиганда (**Рис. 4а, 6**). Положение тиомочевины в активном центре напоминает модель гипотетического переходного состояния [8]: атом серы тиомочевины служит мостиковым лигандом для ионов меди Cu2 и Cu3, один из атомов азота образует координационную связь с ионом меди Cu1, а второй зафиксирован водородной связью с H101 на месте консервативной воды W. Архитектура активного центра в двух состояниях в открытой конформации комплекса *pmTcDH* идентична архитектуре открытой конформации свободной формы фермента (**Рис. 4б**).

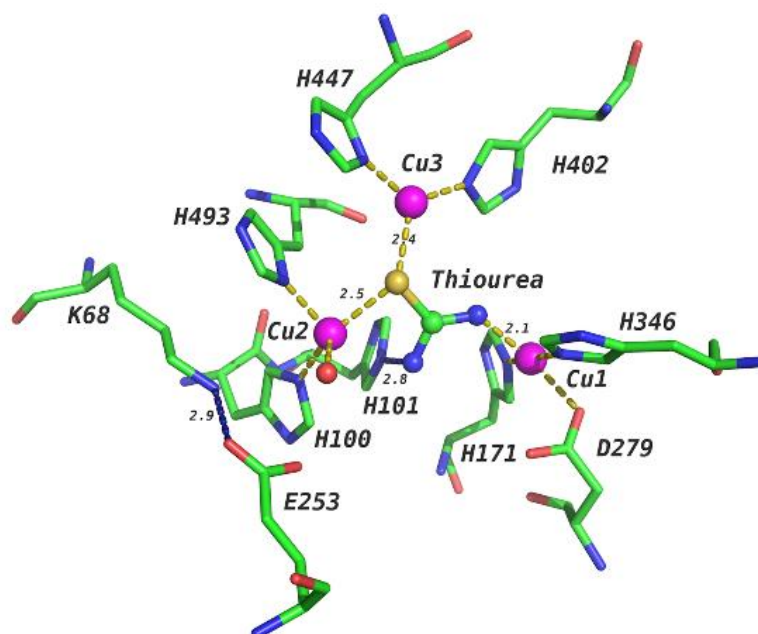


Рис. 6. Архитектура активного центра комплекса с тиомочевинной субъединицы *pmTcDH* в закрытой конформации для окисленного состояния. Координационные и водородные связи показаны желтыми и синими пунктирными линиями, соответственно.

Селеноцианат (SeCN^-) является аналогом субстрата и эффективным ингибитором TcDH – фермент не может использовать селеноцианат как субстрат для восстановления акцептора электронов в реакции. Комплекс *pmTcDH* с селеноцианатом получали настаиванием кристаллов в растворе ингибитора с концентрацией 5 мМ в течение 24 часов. Настаивание кристаллов с селеноцианатом привело к ухудшению разрешения: набор дифракционных данных был собран с разрешением 1.80 Å (**Таблица 1**). Рентгеноструктурный эксперимент проводили при длине волны на краю поглощения селена (0.968 Å), в связи с чем, было однозначно определено положение аномальных рассеивателей, т.е. атомов селена, в активном центре. Селен был обнаружен в активном центре обеих субъединиц димера *pmTcDH* в качестве мостикового лиганда ионов меди Cu2 и Cu3 (**Рис. 7а, б**): в закрытой конформации – целый анион

селеноцианата с заселенностью 0.6, в открытой – только атом селена с заселенностью 0.7. Архитектура активного центра в закрытой конформации совпадала с архитектурой активного центра структур свободного фермента и комплекса с тиомочевиной (Рис. 4а, 6, 7в). Селеноцианат располагался в активном центре похожим образом, как тиомочевина или субстрат в постулируемой модели: атом селена образовывал координационные связи с ионами меди Cu2 и Cu3, атом азота – с ионом меди Cu1. В свою очередь, положение ионов меди Cu2 и Cu3 в открытой конформации структуры комплекса (Рис. 7г) отличалось от их положения в двух других структурах *ptTcDH* (Рис. 4б) и скорее соответствовало их положению в закрытой конформации со связанным мостиковым лигандом (Рис. 4а, 6). Вероятным объяснением невозможности восстановления акцептора электронов в реакции с селеноцианатом является различие в химических свойствах серы и селена: ввиду большего размера атома селен может образовывать более прочный комплекс с ионами меди Cu2 и Cu3.

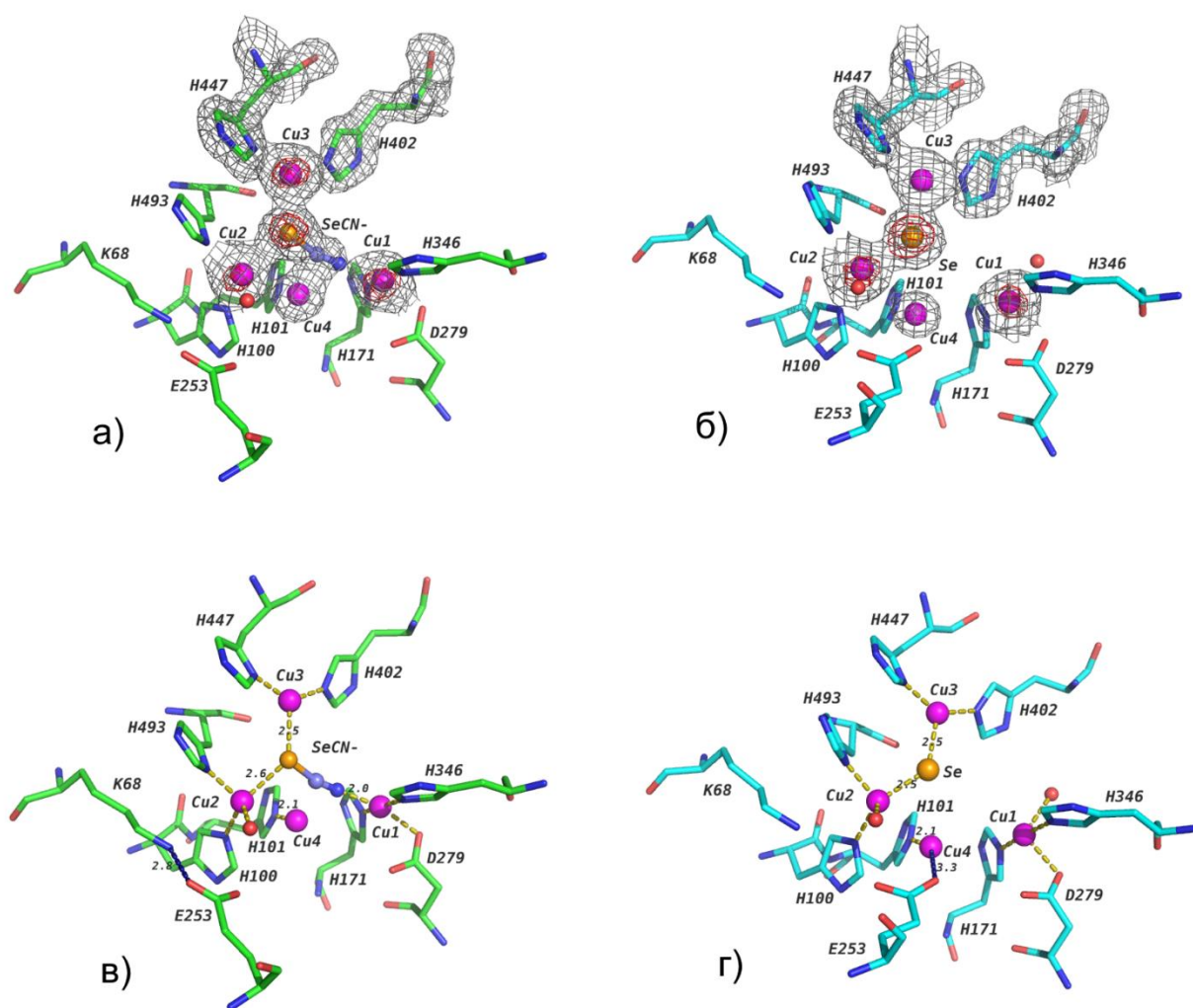


Рис. 7. Структура активного центра комплекса *ptTcDH* с селеноцианатом. $2F_o-F_c$ карта электронной плотности на уровне срезки 1σ и аномальная карта на уровне срезки 5σ показаны серой и красной сетчатой поверхностью для ионов меди и селеноцианата для закрытой (а) и открытой (б) конформаций структуры комплекса *ptTcDH* с селеноцианатом. Структура активного центра комплекса *ptTcDH* с селеноцианатом в закрытой (в) и открытой (г) конформациях. Координационные и водородные связи показаны желтыми и синими пунктирными линиями.

Связывание селеноцианата в трехъядерном медном центре *ptTcDH* приводило к уменьшению интегральной интенсивности спектров ЭПР примерно на $\sim 75\%$ (Рис. 8а). Расчет

параметров полученного спектра показал, что в спектре виден только один ион меди в состоянии Cu^{+2} (Рис. 8б, Таблица 3). Стоит отметить, что данный ион меди характеризуется отличными параметрами по сравнению со свободной формой (Таблицы 2, 3) и наличием трех азотных лигандов в координационной сфере, о чем свидетельствуют в спектре линии дополнительных сверхтонких взаимодействий (Рис. 8б). Полученные спектральные данные хорошо согласуются со структурой комплекса: ионы меди $\text{Cu}2$ и $\text{Cu}3$, вероятно, восстанавливаются при образовании комплекса с атомом селена, а ион меди $\text{Cu}1$ остается окисленным и координирован тремя атомами азота, включая один от селеноцианата. Состояние трехъядерного медного центра $pt\text{TcDH}$ со связанным селеноцианатом можно описать как $[\text{Cu}1^{+2}-\text{Cu}2^{+1}-\text{Cu}3^{+1}]$.

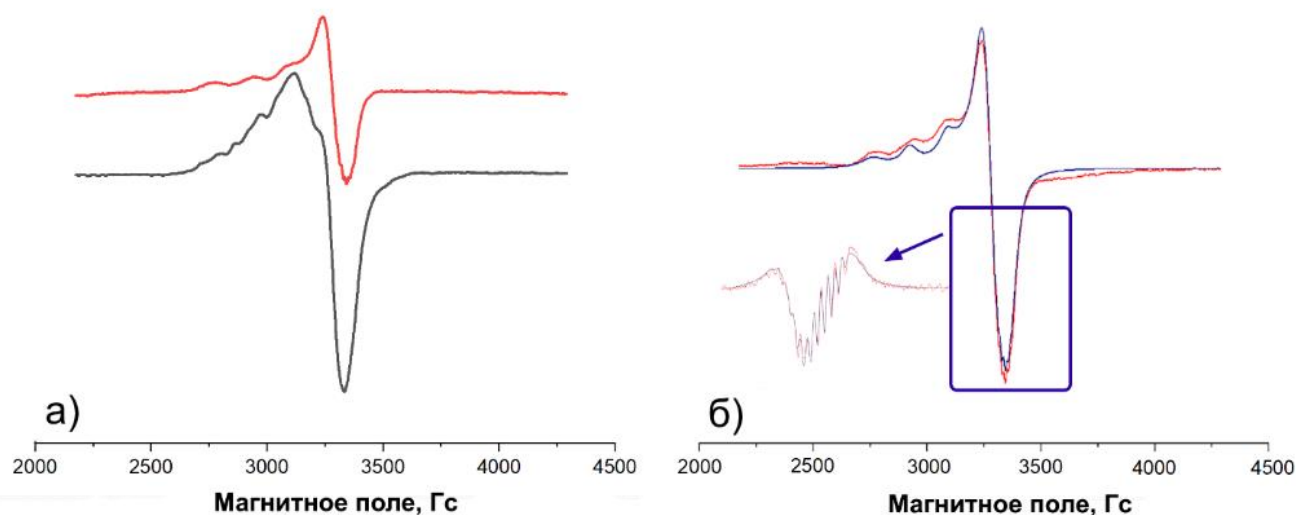


Рис. 8. Спектры ЭПР в X-диапазоне $pt\text{TcDH}$ в свободной форме (черный) и в комплексе с 1 мМ селеноцианата (красный) при температуре 20 К (а). Экспериментальный (красный) и рассчитанный (синий) спектры ЭПР комплекса $pt\text{TcDH}$ с селеноцианатом (б). Во врезке в левом нижнем углу показаны вторые производные спектров, демонстрирующие линии дополнительных сверхтонких взаимодействий с тремя азотными лигандами: экспериментальный (красный) и рассчитанный (синий).

Таблица 3. Параметры рассчитанного спектра ЭПР в X-диапазоне комплекса $pt\text{TcDH}$ 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

Различие в конформации субъединиц олигомерного белка в кристалле может быть вызвано связыванием кофактора в активном центре [9], поэтому для уточнения влияния ионов меди активного центра на упаковку и принимаемую конформацию субъединиц была решена структура апоформы $pt\text{TcDH}$ (без ионов меди), которая подробно рассмотрена в **пятом подразделе третьей главы**. Несмотря на то, что кристаллы апоформы $pt\text{TcDH}$ были получены в тех же условиях, что и кристаллы холоформы, их пространственная группа и упаковка молекул отличались (Таблица 1). Кроме того, обе субъединицы димера находились в закрытой конформации, в которой подвижная петля 251-266 фиксирована большим числом водородных связей – 13, чем в открытой – 9. Ионы меди $\text{Cu}1$ и $\text{Cu}3$ в активном центре отсутствовали, а ион $\text{Cu}2$ был обнаружен с заселенностью 0.2 (Рис. 9а). Несмотря на фактически полное отсутствие кофакторов активный центр апоформы хорошо структурирован. Аминокислотные остатки занимают те же положения, что и в закрытой конформации холоформы, за исключением лиганда

иона меди Cu1 – аминокислотного остатка H346 (**Рис. 9б**), боковая группа которого разворачивается от центра связывания иона меди и фиксируется сетью из водородных связей. Анализ структур апо- и холо-*pmTcDH* не выявил корреляцию между числом кристаллических контактов и конформацией молекулы фермента.

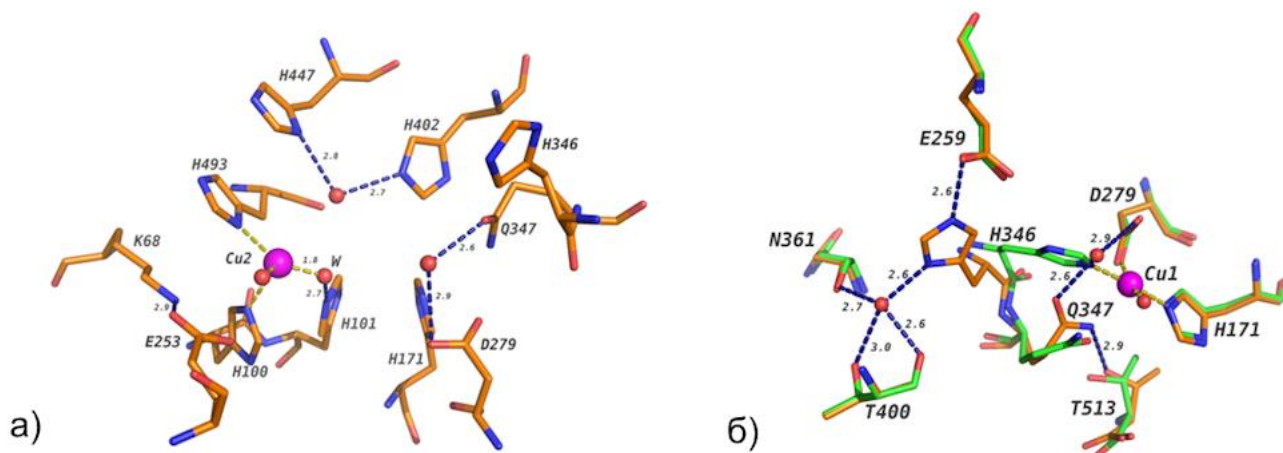


Рис. 9. Структура активного центра апоформы *pmTcDH* (а). Совмещение структуры апоформы *pmTcDH* (оранжевый) со структурой закрытой субъединицы холоформы (зеленый) по всем Ca-атомам (б). Координационные и водородные связи показаны желтыми и синими пунктирными линиями.

Восстановление полного трехъядерного медного центра в кристалле апоформы *pmTcDH* происходило при настаивании кристаллов как с 1 мМ ионов меди Cu^{+2} ($\text{pmTcDH}^{\text{Cu}+2}$), так и с 1 мМ Cu^{+1} ($\text{pmTcDH}^{\text{Cu}+1}$). Интересно отметить, что встраивание ионов меди в активный центр фермента приводило также к изменению конформации субъединиц. В связи с чем, в кристалле были обнаружены несколько состояний димера *pmTcDH*: в структуре $\text{pmTcDH}^{\text{Cu}+2}$ был обнаружен димер с обеими субъединицами в закрытой конформации (**Рис. 10а**), а в структуре $\text{pmTcDH}^{\text{Cu}+1}$ димер с субъединицами в разной конформации (**Рис. 10б**) и с обеими субъединицами в открытой конформации (**Рис. 10в**). Таким образом, наличие ионов меди в активном центре *pmTcDH* определяет упаковку и конформацию молекул фермента в кристалле.

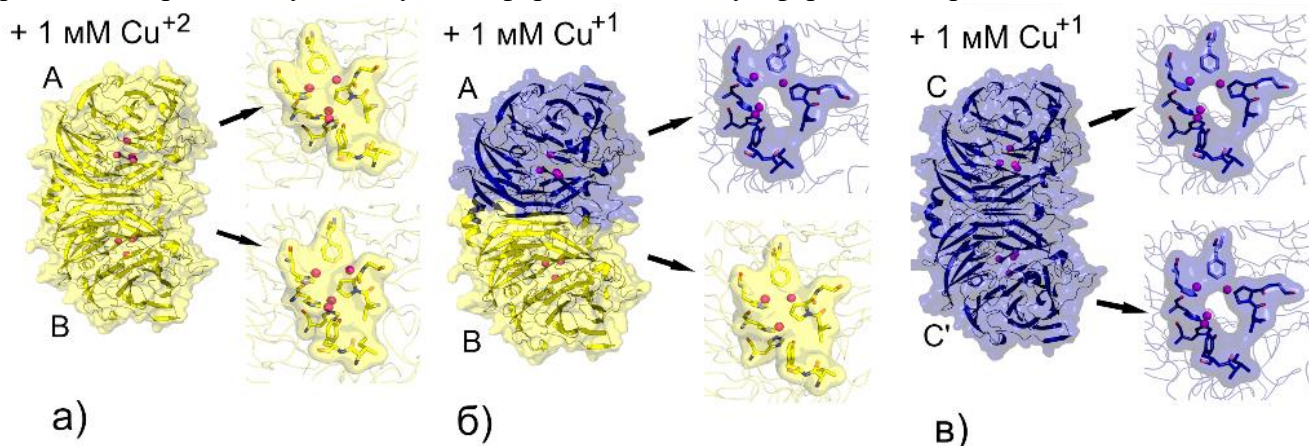


Рис. 10. Конформации субъединиц димера *pmTcDH* после настаивания кристаллов ионами меди: две закрытые субъединицы в структуре $\text{pmTcDH}^{\text{Cu}+2}$ (а), открытая (сверху) и закрытая (внизу) субъединицы в структуре $\text{pmTcDH}^{\text{Cu}+1}$ (б), две открытые субъединицы в структуре $\text{pmTcDH}^{\text{Cu}+1}$ (в). На панелях а–в приведены врезки с изображением аминокислотных остатков, формирующих субстратный канал.

В шестом подразделе третьей главы представлены результаты исследования роли консервативных аминокислотных остатков активного центра в каталитической реакции методом точечного мутагенеза.

Аминокислотный остаток F436 в активном центре *tpTcDH* (F401 у *pmTcDH*) формирует стенку активного центра и, наряду с Q382 (Q347 у *pmTcDH*), является консервативным у гомологичных представителей с идентичностью аминокислотных последовательностей более 50% [10]. Точечная замена данного фенилаланина на гидрофильный глутамин привела к полной потере ферментативной активности. Однако, способность связывать ионы меди в активном центре сохранилась - по данным ICP-MS, *tpTcDH* F436Q содержала 3 иона меди на субъединицу.

Структура *tpTcDH* F436Q была решена с разрешением 2.0 Å и уточнялась как двойник. Ион меди Cu3 отсутствовал в активном центре *tpTcDH* F436Q, как в большинстве структур *tpTcDH*. Анализ структуры *tpTcDH* F436Q показал, что замена нарушила взаимно скоординированные перестройки активного центра, происходящие при закрытии/открытии субстратного канала. У *tpTcDH* «дикого типа» движение P291 (P256 у *pmTcDH*) сопровождается поворотом боковой группы Q382 в сторону иона меди Cu1, реорганизацией сети водородных связей, а также флип-флоп переходом основной цепи F436 (ψ изменяется с 10.8° на -138.0°) (Рис. 11а, б). В структуре *tpTcDH* F436Q открытое положение подвижной петли с аминокислотным остатком P291 оказалось не всегда синхронизированным с перестроением основной цепи Q436: в одной субъединице положения Q382 и Q436 соответствовали открытой конформации (Рис. 11в), тогда как в двух других положения Q382 и Q436 соответствовали закрытой конформации (Рис. 11г). Кроме того, нарушились стэкинг-взаимодействия с аминокислотным остатком W452. Таким образом, аминокислотный остаток F436 играет важную роль в поддержании согласованности конформационных переходов при открытии/закрытии субстратного канала.

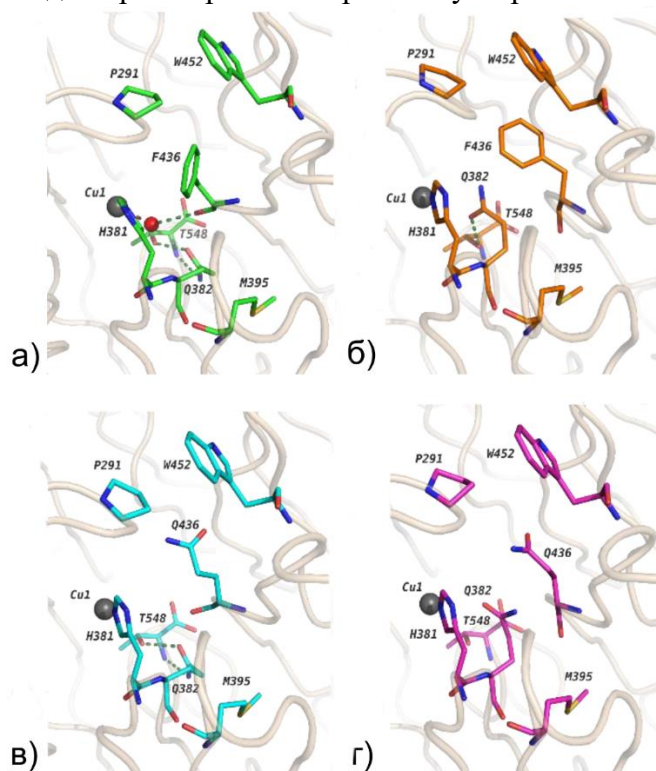


Рис. 11. Положение аминокислотных остатков Q382 и F436 в субъединице в открытой конформации *tpTcDH* «дикого типа» (PDB ID 6I3Q) (а), в субъединице в закрытой конформации *tpTcDH* «дикого типа» (PDB ID 6UWE) (б). Правильное расположение аминокислотных остатков Q382 и Q436 в соответствии с открытой подвижной петлей с P291 в субъединице *tpTcDH* F436Q (в), нарушенное расположение аминокислотных остатков Q382 и Q436 в субъединице *tpTcDH* F436Q (г). Водородные связи показаны пунктирными линиями.

Аминокислотный остаток H447 у *pmTcDH* координирует ион меди Cu3. Предполагалось, что замена данного остатка на глутамин, не образующий прочные координационные связи с ионами меди, позволит получить фермент, неспособный связывать ион меди Cu3. В свою очередь, данная форма фермента с неполным медным центром упростит расшифровку спектров ЭПР и поможет выявить роль иона меди Cu3 в каталитическом процессе. Рекомбинантная форма *pmTcDH* H447Q не обладала ферментативной активностью и связывала около ~ 2.5 ионов меди на субъединицу фермента, согласно данным ICP-MS.

Кристаллы холоформы *pmTcDH* H447Q, полученные после активации фермента ионами меди по стандартной методике и при кристаллизации в условиях как для «дикого типа», давали дифракционную картину с разрешением около 5-6 Å. В связи с чем, сперва были получены кристаллы неактивированной *pmTcDH* H447Q, для которых была установлена структура с разрешением 1.45 Å (Таблица 1). Субъединицы в димере *pmTcDH* H447Q имели разные конформации – закрытую и открытую. При этом архитектура активного центра неактивированной *pmTcDH* H447Q в закрытой конформации со связанными ионами меди Cu1 и Cu2 с заселенностью 0.2 совпадала с архитектурой активного центра апоформы *pmTcDH* «дикого типа» (Рис. 8а), а архитектура активного центра в открытой конформации со связанными ионами меди Cu1 и Cu2 с заселенностью 0.8 и 0.5 была идентична архитектуре холоформы «дикого типа» (Рис. 4б). Для подтверждения факта, что замена H447Q привела к потере способности связывать ион меди Cu3, кристаллы неактивированной *pmTcDH* H447Q настаивали с 1 mM ионов меди Cu⁺¹. Обработка кристаллов ионами меди привела к тому, что в обе субъединицы димера *pmTcDH* H447Q встроились не только ионы меди Cu1 и Cu2 с полной заселенностью, но ион меди Cu3 – с заселенностью 0.2 (Рис. 12а, б). Замена H447Q не привела к полной потере способности связывать ион меди Cu3 в активном центре, однако изменение лиганда в координационной сфере иона меди Cu3 оказалось критичным для ферментативной активности. Таким образом, для исключения иона меди Cu3 из трехъядерного медного центра требуется провести замены координирующих гистидинов на аминокислотные остатки, не способные образовывать координационные связи с ионами металла, как например, аланин.

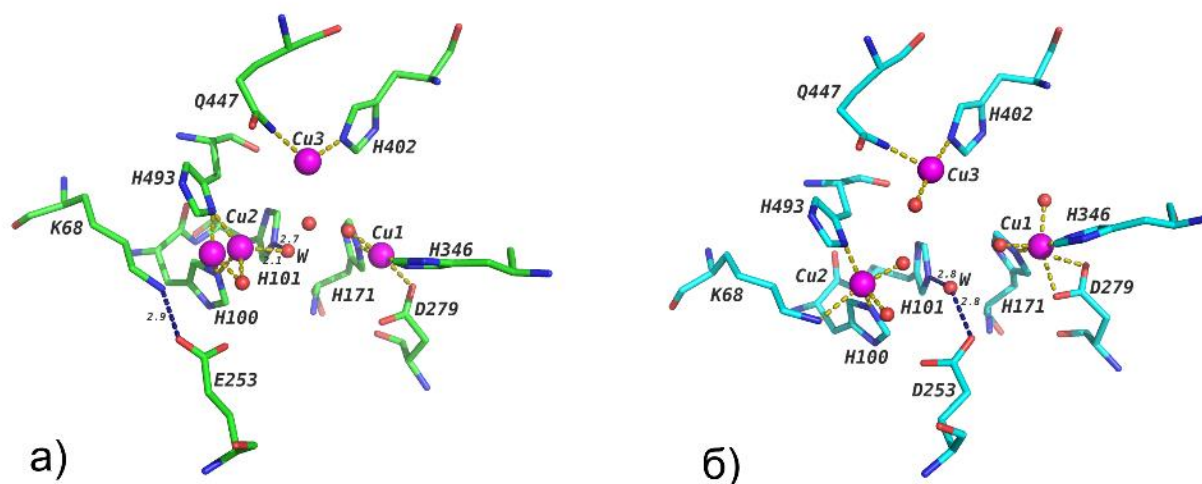


Рис. 12. Структура активного центра активированной *pmTcDH* H447Q в закрытой (а) и открытой (б) конформации после настаивания кристаллов с 1 mM Cu⁺¹. Для иона меди Cu2 показано два положения. Координационные и водородные связи показаны желтыми и синими пунктирными линиями.

В седьмом подразделе третьей главы суммированы основные результаты исследования, которые позволили охарактеризовать важные детали строения TcDH, описать перестройки активного центра при связывании субстрата и детализировать механизм каталитической реакции

(Рис. 13а-г). Проведенное структурно-функциональное исследование позволяет предположить, что у свободной формы фермента все три иона меди окислены (Рис. 13а), т.е. состояние центра соответствует $[Cu1^{+2}-Cu2^{+2}-Cu3^{+2}]$. Связывание тиоцианата в активном центре TcDH приводит к следующим изменениям (Рис. 13б): аминокислотный остаток P256 закрывает субстратный канал, каталитический E253 забирает один протон у молекулы воды W с образованием активированного гидроксил-аниона OH^- и переносит его на K68. При этом разрывается координационная связь между ионом меди $Cu2$ и K68, и ион меди $Cu2$ сдвигается в сторону связавшегося субстрата и образует с ним новую координационную связь (Рис. 13в). После закрытия активного центра атом серы тиоцианата выступает в роли мостикового лиганда для ионов меди $Cu2$ и $Cu3$, атом азота тиоцианата удерживается координационной связью с ионом меди $Cu1$ (Рис. 13в). В результате переноса протона на аминогруппе K68 возникает положительный заряд (Рис. 13в). Активированный гидроксил-анион OH^- , связанный водородной связью с H101, атакует атом углерода субстрата, что приводит к разрыву связи атома углерода с серой (Рис. 13в). После нуклеофильной атаки цианат остается связанным с ионом меди $Cu1$ и каталитическим H101, а атома серы субстрата – с ионами $Cu2$ и $Cu3$ (Рис. 13г). Далее происходит двухэлектронное окисление атома серы. На основании полученных данных можно предположить, что электроны от субстрата поступают на ионы меди $Cu2$ и $Cu3$ и затем на внешний акцептор. Этапы переноса электронов на акцептор и выхода продукта реакции из активного центра в каталитической реакции *pmTcDH* требуют дальнейшего исследования.

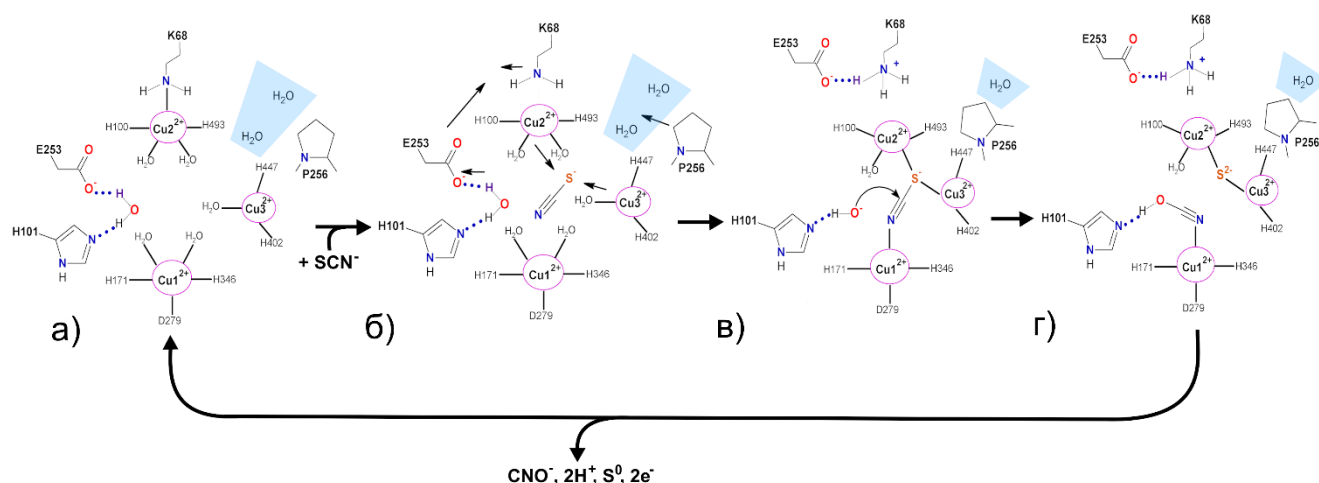


Рис. 13. Схема механизма каталитической реакции TcDH: этапы связывании субстрата, активации нуклеофила и нуклеофильной атаки. Свободная форма фермента до связывания тиоцианата (а), соответствующая открытой конформации. Связывание субстрата в активном центре TcDH и активация нуклеофила (б). Конформационные 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).

ВЫВОДЫ

1. Точечная замена T169A на поверхности не привела к изменению упаковки молекул *tpTcDH* в кристалле и исчезновению двойникового. Точечная замена K281A на поверхности привела к изменению упаковки молекул фермента в кристалле и исчезновению двойникового. 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 methylophilum* (*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., Дергоусова Н.И., 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 (TCDH) 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., 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.
5. **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). – 2022. – Т. II. – С. 122.

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. Kabsch W. Xds // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2010. – Feb. – Vol. 66, № Pt 2. – P. 125-32.
2. 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. – Jun 1. – Vol. 79, № Pt 6. – P. 449-461.
3. Dauter Z., Jaskolski M. Crystal pathologies in macromolecular crystallography // *Postepy Biochem.* – 2016. – Vol. 62, № 3. – P. 401-407.
4. Thompson M. C. Identifying and Overcoming Crystal Pathologies: Disorder and Twinning // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1607. – P. 185-217.
5. Derewenda Z. S. Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2010. – May. – Vol. 66, № Pt 5. – P. 604-15.
6. Advanced inorganic chemistry. / Wilkinson G., Cotton F. A. – 3 изд. – New York, 1972.
7. 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.
8. 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. – Mar 10. – Vol. 117, № 10. – P. 5280-5290.
9. 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. – May 16. – Vol. 89, № 4. – P. 545-53.
10. 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.