

*На правах рукописи*

Соловьева Анастасия Юрьевна

**МЕХАНИЗМ СБОРКИ ТРЕХЪЯДЕРНОГО МЕДНОГО ЦЕНТРА И  
ДЕТАЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

1.5.4. Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2026 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:**

Заведующий лабораторией инженерной энзимологии  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
доктор химических наук, профессор, академик РАН  
**Попов Владимир Олегович**

**Официальные оппоненты:**

**Курочкин Илья Николаевич**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химической физики биоаналитических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

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

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится 14 мая 2026 г. в 14 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 «    » \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.233.01  
Кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Медь – один из наиболее распространенных и важных переходных металлов для живых организмах, где он выступает в роли кофактора ферментов, связанных с такими жизненно важными функциями как дыхание, защита от окислительного стресса, метаболизм железа, биосинтез гормонов и нейротрансмиттеров и т.д. Однако высокая токсичность свободных ионов меди требует наличия в клетке специализированных систем, обеспечивающих безопасный транспорт, точное встраивание в белки-мишени и выведение избытка ионов меди. Нарушение регуляции гомеостаза ионов меди приводит к многочисленным сбоям в работе живых систем, вплоть до летального исхода. В связи с этим, понимание механизмов направленного транспорта и встраивания ионов меди в ферменты, что в клетке осуществляет специальный класс белков – металлошапероны, является актуальной задачей не только для фундаментальной науки, но и для медицины.

Особый научный и практический интерес представляют медь-содержащие ферменты с выраженным биотехнологическим потенциалом. Такие ферменты, как медь-зависимые оксидазы, уже нашли применение в биоремедиации, биоэлектронике и промышленном катализе. Однако для многих перспективных ферментов, включая бактериальную тиоцианатдегидрогеназу (TcDH), молекулярные механизмы активации и участвующие в этом процессе металлошапероны остаются неисследованными.

Данная работа направлена на восполнение этого пробела. В рамках комплексного подхода, включающего биоинформатический анализ, генно-инженерные, биохимические и структурные методы, было запланировано выявить белки-партнёры TcDH и детально изучить процесс сборки трехъядерного медного центра *in vitro*. Решение этой задачи имеет фундаментальное значение для понимания функционирования медного центра TcDH и гомеостаза меди и открывает перспективы для дальнейшего биотехнологического применения.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы является исследование деталей функционирования и механизма сборки трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) *in vitro*. Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Поиск и характеристика потенциальных физиологических акцепторов электронов в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH.
2. Изучение кинетики активации TcDH при добавлении ионов Cu(II)/Cu(I) и кинетики инактивации при удалении ионов меди из активного центра TcDH.
3. Определение стехиометрии и аффинности связывания TcDH с ионами Cu(II)/Cu(I).

4. Изучение последовательности встраивания ионов меди в активный центр TcDH *in vitro*.
5. Биохимический и структурный анализ медь-связывающего белка *tpCopC*, ген которого расположен в одном кластере с геном TcDH в геноме *Thioalkalivibrio paradoxus*.
6. Функциональная характеристика *tpCopC* как металлошаперона, участвующего во встраивании ионов меди в активный центр TcDH.

**Научная новизна.** Впервые были выделены и охарактеризованы два одногемовых цитохрома с552 и с546/556 из *Tv. paradoxus*, которые могут являться физиологическими акцепторами электронов в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH. Исследованы процессы встраивания ионов Cu(II)/Cu(I) в активный центр TcDH с термодинамической и кинетической точек зрения. Оценены скорости активации/инактивации фермента TcDH при добавлении/удалении ионов меди активного центра. Определены стехиометрия и аффинность связывания ионов Cu(II)/Cu(I) в трехъядерном медном центре TcDH (сайты Cu1, Cu2 и Cu3). Методом ЭПР-спектроскопии была установлена последовательность заполнения трех сайтов TcDH при добавлении ионов меди *in vitro*. Проведен структурно-биохимический анализ медь-связывающего белка *tpCopC*, ген которого находится в ближайшем геномном окружении гена TcDH. Впервые подтверждена способность *tpCopC* играть роль металлошаперона при встраивании ионов меди в активный центр TcDH *in vitro*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Проведенное исследование предоставляет фундаментальные знания о механизме сборки уникального трехъядерного медного центра TcDH, который отличается по своей архитектуре от активных центров других известных медь-содержащих ферментов. Подробное исследование процесса встраивания *in vitro* как свободных ионов меди, так и при участии металлошаперона *tpCopC*, создает необходимую основу для дальнейшего изучения процессов созревания медного центра TcDH *in vivo*. Результаты, представленные в данной работе, вносят значительный вклад в понимание механизмов биогенеза сложных медь-содержащих ферментов.

Особую практическую значимость работа приобретает в контексте биотехнологического применения. TcDH катализирует окисление тиоцианата – стабильного соединения, образующегося в различных промышленных процессах, как производство гербицидов и инсектицидов, газификация и коксование угля, добыча золота. Исследование механизмов формирования функционально активного фермента является важнейшим этапом для разработки эффективных биологических методов детоксикации тиоцианат-содержащих отходов.

## Методология и методы исследования

В работе были использованы следующие методы: генетической инженерии, хроматографии, ферментативной кинетики, спектрофотометрии, флуоресценции, изотермической титрационной калориметрии (ИТК), потенциометрии, молекулярного моделирования, ЭПР- и ЯМР-спектроскопии, кристаллизации и рентгеноструктурного анализа.

## Положения, выносимые на защиту

1. Цитохромы *c552* и *c546/556* идентифицированы как потенциальные физиологические акцепторы электронов в реакции, катализируемой TcDH.
2. Кинетика активации TcDH демонстрирует выраженную зависимость от степени окисления ионов меди: встраивание ионов Cu(I) происходит быстрее (<1 мин) по сравнению с ионами Cu(II) (~ 24 часа). Удаление встроенных ионов меди из активного центра TcDH – кинетически медленный процесс, занимающий 7-14 дней в зависимости от природы и концентрации хелатирующего лиганда.
3. TcDH демонстрирует высокую аффинность к ионам меди в разной степени окисления. Аффинность трех медных сайтов отличается для ионов Cu(II) ( $\log K_D = - (11,7 - 16,4)$ ) и приблизительно одинакова для ионов Cu(I) ( $\log K_D = -13,0 \pm 0,3$ ).
4. Сборка трехъядерного медного центра TcDH происходит последовательно: на первом этапе одновременно заполняются сайты Cu2 и Cu1, на втором – сайт Cu3.
5. *tpCopC* демонстрирует высокую аффинность к ионам меди в разной степени окисления ( $\log K_D = -16,3 \pm 0,6$  и  $-11,1 \pm 0,2$  для иона Cu(II) и Cu(I), соответственно) и связывает их в одном сайте с разной геометрией и количеством лигандов.
6. *tpCopC* действует как специфический металлошаперон: образует комплекс с TcDH и передает ионы меди апо-ферменту через стадию восстановления связанного иона до Cu(I).

## Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке научных задач, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке научных публикаций. Вклад автора на каждом этапе исследования был определяющим. Автор благодарит за проведение ИТК-экспериментов к.б.н. О.Г. Куликову (ФИЦ Биотехнологии РАН), за помощь при проведении генно-инженерных экспериментов к.х.н. Т.В. Ракитину (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) и к.х.н. Н.И. Дергоусову (ФИЦ

Биотехнологии РАН), за проведение ICP-MS измерений к.х.н. Жилова В. И. (ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН), за проведение ЯМР-экспериментов д.х.н. Э.В. Бочарова (ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН), за проведение ЭПР-экспериментов в X-диапазоне 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), к.ф.-м.н. Е.А. Уголкову (ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН) и Л.А. Варфоломееву (ФИЦ Биотехнологии РАН), за проведение молекулярного моделирования д.х.н. М.Г. Хренову (МГУ имени М.В. Ломоносова, ФИЦ Биотехнологии РАН), за проведение рентгеноструктурных экспериментов к.б.н. К.М. Бойко и Л.А. Варфоломееву (ФИЦ Биотехнологии РАН).

**Степень достоверности полученных результатов обеспечена** использованием современных методов исследования и сертифицированного оборудования. Эксперименты проводили в нескольких повторностях с постановкой контроля. Полученные данные были проанализированы с помощью современных программ и методов статистической обработки.

#### **Финансовая поддержка**

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

#### **Публикации и апробация работы**

По материалам научной работы были опубликованы 4 статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на 7 всероссийских и международных конференциях (XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в ИБХ РАН в 2021 году, III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов в г. Сочи в 2021 году, XXXV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" в ИБХ РАН в 2023 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).

#### **Структура и объем работы**

Работа включает в себя разделы введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, приложение и список цитируемой литературы. Работа изложена на 125 страницах и содержит 44 рисунка, 6 таблиц, 197 ссылок и 1 приложение.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Первая глава** содержит обзор литературы, посвященный системам транспорта и гомеостаза меди в грамотрицательных бактериях. В главе детально проанализированы механизмы сборки медных центров ферментов и роль периплазматических металлошаперонов в этом процессе. Особое внимание также уделено методам определения аффинности связывания меди белками, что является ключевым для понимания путей переноса ионов между белками-партнерами.

В конце литературного обзора сформулированы основные задачи работы, впервые поставленные для изучения медного фермента TcDH: идентификация физиологического акцептора электронов TcDH в реакции окисления тиоцианата и исследование механизма сборки уникального трехъядерного медного центра фермента, включая поиск участвующего в этом процессе металлошаперона *in vivo*.

**Во второй главе** перечислены материалы и широкий спектр использованных в работе методов: генно-инженерные, хроматографические, спектрофотометрические, спектрофлуориметрические, калориметрические, потенциометрические и структурные (рентгеноструктурный анализ, ЭПР- и ЯМР-спектроскопия).

### Объекты исследования

Объектами исследования являются медный фермент TcDH из бактерии *Ty. paradoxus* ARh1, TcDH из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum* (в ЭПР-экспериментах), а также другие белки из *Ty. paradoxus*: медь-связывающий белок *tpCopC*, одnogемовые цитохромы *c* – *c552* и *c546/556*. В работе использовали рекомбинантные формы этих белков, за исключением нативной формы цитохрома *c546/556*.

**В третьей главе** изложены основные результаты работы.

**Первый подраздел третьей главы** посвящен характеристике кинетических параметров и поиску физиологических акцепторов реакции, катализируемой TcDH:



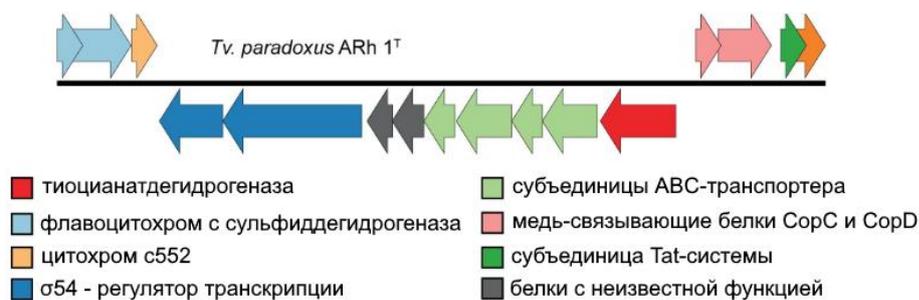
Рекомбинантный TcDH получали из клеток *E.coli* BL21(DE3), содержащих экспрессионный вектор pET-22b с геном TH1TH\_RS12920, кодирующим TcDH (WP\_006748988). Очищали TcDH с His<sub>6</sub>-тагом на N-конце при помощи металл-хелатной хроматографии, после чего отщепляли His<sub>6</sub>-таг TEV-протеазой. Последней стадией очистки была гель-фильтрация, по результатам которой рекомбинантный TcDH был димером. После выделения TcDH практически не содержал ионов меди в активном центре ( $0,05 \pm 0,01$  ионов на мономер по данным ICP-MS (масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой)) и не обладал ферментативной активностью ( $0,03 \pm 0,01$  мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup>). Для

восстановления активности, т.е. активации фермента, апо-TcDH инкубировали с избытком ионов Cu(I), а затем проводили диализ для удаления несвязавшихся ионов меди.

Максимальная активность рекомбинантного препарата (Cu)<sub>3</sub>-TcDH, активный центр которого содержит три иона меди (Cu1, Cu2 и Cu3), в реакции окисления тиоцианата с использованием двух нефизиологических акцепторов электронов *in vitro*, цитохрома c550 из сердца лошади ( $E_0 = +260$  мВ) и K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ( $E_0 = +420$  мВ), была приблизительно одинакова и составляла  $10,1 \pm 0,3$  и  $10,7 \pm 0,2$  мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup>, соответственно. Значения константы Михаэлиса (K<sub>M</sub>) по субстрату – SCN<sup>-</sup> с цитохромом c550 и K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] также были близки и составляли  $1,27 \pm 0,07$  и  $1,00 \pm 0,05$  мМ, соответственно.

В клетке электроны, образующиеся в реакции TcDH, должны передаваться на физиологический акцептор, и мы предприняли поиск такого партнера. На последней стадии очистки нативного TcDH из периплазматической фракции *Tv. paradoxus* с ферментом стабильно совместно очищались два цитохрома — c552 и c546/556. Мы выделили оба белка, охарактеризовали их и проверили способность функционировать в качестве акцепторов электронов для TcDH.

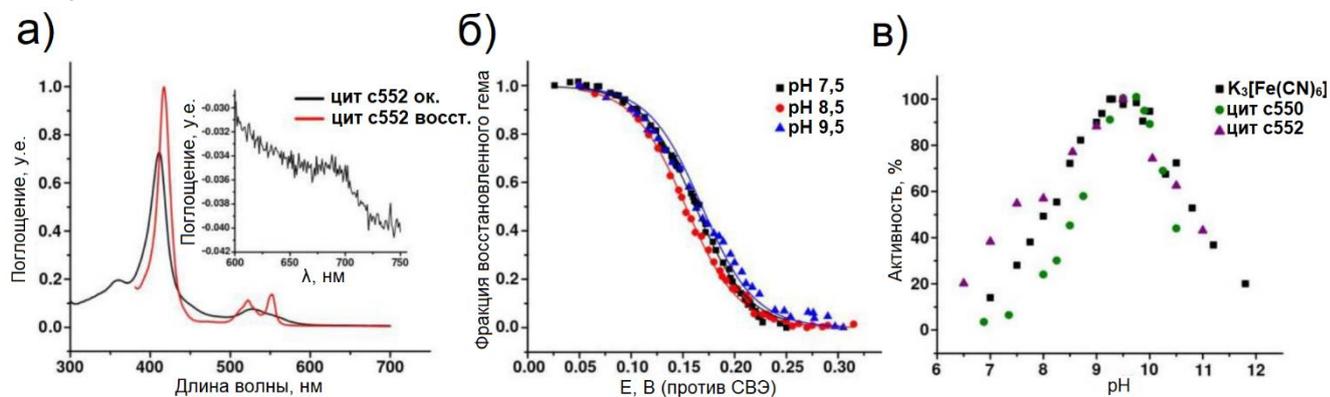
Ген цитохрома c552 в геноме *Tv. paradoxus* находится рядом с геном, кодирующим TcDH (Рис. 1). Гены гомологичных цитохромов были обнаружены в геномах бактерий рода *Thioalkalivibrio*, содержащих TcDH. Более того, исследование транскриптома близкородственной бактерии *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh 2T продемонстрировало тиоцианат-зависимую индукцию экспрессии TcDH и цитохрома c552.



**Рис. 1.** Геномное окружение гена TcDH в геноме *Tv. paradoxus*.

Рекомбинантный цитохром c552 получали из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных вектором pET-22b с геном, кодирующим цитохром c552. Белок очищали с помощью металл-хелатной хроматографии, используя His-содержащие мотивы на N- и C-концах цитохрома c552. Последней стадией очистки была гель-фильтрация, по результатам которой цитохром c552 в растворе является мономером с молекулярной массой 18 кДа.

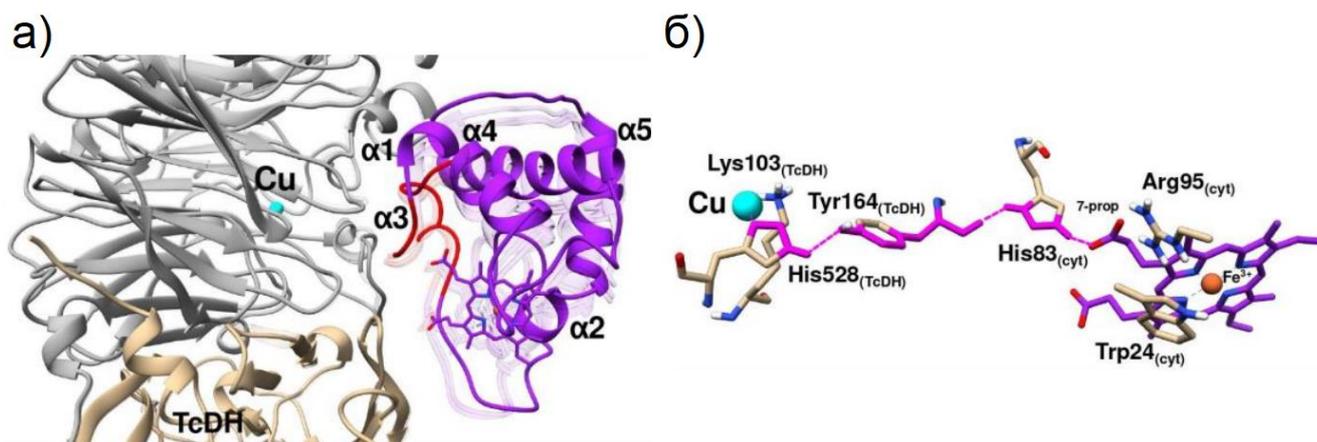
Цитохром с552 обладал типичными для цитохромов с-типа спектрами с максимумами поглощения при 411 нм (линия Soret или  $\gamma$ -) и 528 нм (Q-линия) в окисленном состоянии, и максимумами при 417 нм (линия Soret или  $\gamma$ -), 522 нм ( $Q_v(\beta)$ -линия) и 552 нм ( $Q_0(\alpha)$  – линия) – в восстановленном (Рис. 2, а).



**Рис. 2.** Характеристика рекомбинантного цитохрома с552. а) Видимые спектры поглощения окисленного (черная линия) и восстановленного (красная линия) цитохрома с552 при рН 9,5. На вставке показан пик при 695 нм, характерный для Met-координированных гемов с. б) Кривые потенциометрического титрования цитохрома с552 при разных значениях рН (потенциалы приведены по отношению к стандартному водородному электроду (СВЭ)). в) рН-зависимости активности ТсДН с использованием цитохромов с552, с550 из сердца лошади и  $K_3[Fe(CN)_6]$  в качестве акцепторов электронов.

Редокс-потенциал цитохрома с552 практически не менялся в диапазоне рН 7,5-9,5 со средним значением  $\sim 160$  мВ (Рис. 2, б). Цитохром с552 способен функционировать *in vitro* как акцептор электронов в реакции окисления тиоцианата под действием ТсДН: активность с ним составила  $7,3 \pm 1,1$   $\mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ , что немного ниже по сравнению со значениями, полученными с нефизиологическими акцепторами цитохромом с550 и  $K_3[Fe(CN)_6]$ . рН-оптимум этой реакции составил 9,5, что соответствует среде обитания бактерии *Tv. paradoxus* и значениям рН-оптимума реакции с другими акцепторами (Рис. 2, в).

Методом ЯМР-спектроскопии были определены структура цитохрома с552 (PDB ID 7O9U) и участок взаимодействия цитохрома с552 и ТсДН (Рис. 3, а), а также построена модель комплекса ТсДН и цитохрома с552. Для этой модели с использованием плагина Pathways был построен путь переноса электронов от иона  $Cu_2$  активного центра ТсДН к гему цитохрома (Рис. 3, б), который включает Н528, координирующий ион  $Cu_2$ , Y164, расположенный в петле 157-164 ТсДН, и Н83, расположенный в  $\alpha 3$ -спирали цитохрома с552 и связанный водородной связью с пропионатными группами гема с.



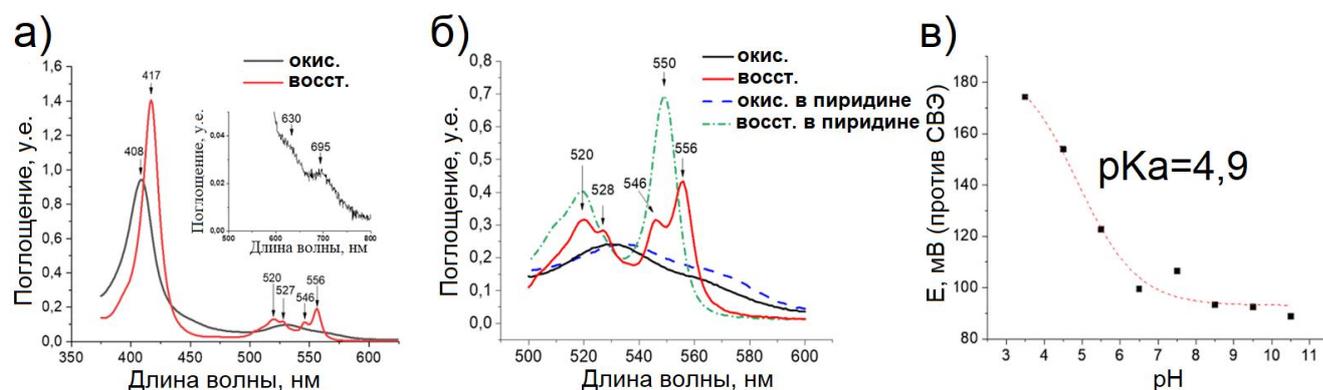
**Рис. 3.** а) Структура комплекса ТсДН (мономеры окрашены серым и светло-коричневым цветом) и цитохрома с552 (окрашен фиолетовым цветом). б) Предполагаемый путь передачи электрона от восстановленного иона сайта  $\text{Cu}2$  ТсДН к железу гема цитохрома с552.

Нативный цитохром с546/556 выделяли из периплазмы клеток *Tv. paradoxus*, которые выращивали аэробно при  $30^\circ\text{C}$  в минеральной карбонат-бикарбонатной среде, содержащей суммарно  $0,6 \text{ M Na}^+$ , рН 9,75, с  $\text{SCN}^-$  в качестве единственного источника энергии и азота. Очистку проводили с помощью анионообменной хроматографии и гель-фильтрации, по результатам которой цитохром с546/556 является мономером с молекулярной массой 10,5 кДа.

Цитохром с546/556 обладал необычными спектральными свойствами для цитохромов с-типа в восстановленном состоянии. Максимумы поглощения в окисленном состоянии находились при 408 нм (линия Soret или  $\gamma^-$ ) и 530 нм (Q-линия), а в восстановленном наблюдалось расщепление  $Q_v(\beta)$  - и  $Q_0(\alpha)$  - линий, с максимумами поглощения при 520/528 нм и 546/556 нм, соответственно (**Рис. 4, а**). В спектре денатурированного цитохрома, полученного в щелочном пиридиновом буфере, раздвоение Q-линий не наблюдалось, а максимум поглощения  $Q_0$ -линии был при 550 нм (**Рис. 4, б**), следовательно, необычные спектральные свойства цитохрома с546/556 связаны с влиянием полипептидной цепи на электронные свойства гема. Обычно расщепление спектральных линий в видимом спектре цитохромов с связывают с асимметричным воздействием электрического поля заряженных аминокислотных остатков второй координационной сферы гема и отрицательно заряженных пропионатных групп на распределение зарядов гема.

Зависимость редокс-потенциала цитохрома с546/556 от рН описывается двухфазной кривой: при рН от 6,5 до 10,5 значение потенциала приблизительно одинаковое и находится в диапазоне +89 - +107 мВ; при значениях рН ниже 6,5 редокс-потенциал цитохрома с546/556 увеличивается и достигает максимального значения +174,3 мВ при рН 3,5 с характерным значением  $\text{pK}_a = 4,9 \pm 0,4$  (**Рис. 4, в**).

Данное значение рКа приблизительно соответствует значению рI белка и, по-видимому, отражает общее изменение поверхностного заряда глобулы.



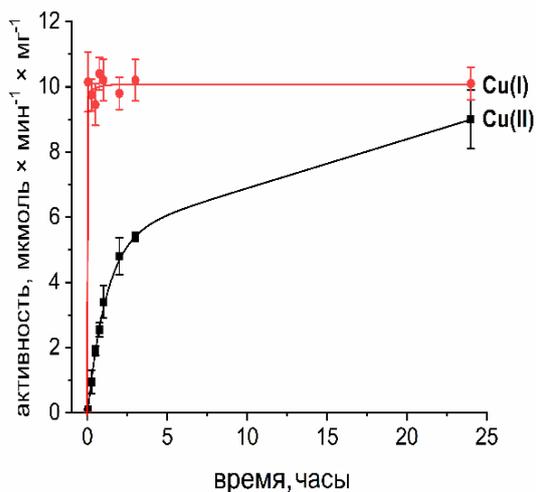
**Рис. 4.** Характеристика нативного цитохрома с546/556. а) Видимые спектры поглощения окисленного (черная линия) и восстановленного (красная линия) цитохрома с546/556 при рН 9,5. На вставке показан пик при 695 нм, характерный для Met-координированных гемов с. б) Спектры поглощения в области  $Q_v(\beta)$  и  $Q_0(\alpha)$ -линий окисленного и восстановленного цитохрома с546/556 при рН 9,5 и в щелочном пиридиновом буфере. в) рН-зависимость редокс-потенциала цитохрома с546/556 (потенциалы приведены по отношению к СВЭ).

Нами было показано, что цитохром с546/556 способен принимать электроны в ходе реакции, катализируемой ТсДН. Максимальная скорость реакции окисления тиоцианата с использованием цитохрома с546/556 в качестве акцептора электронов составляла  $10,3 \pm 1,5$  мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup>, что сравнимо с нефизиологическими акцепторами - цитохромом с550 и  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

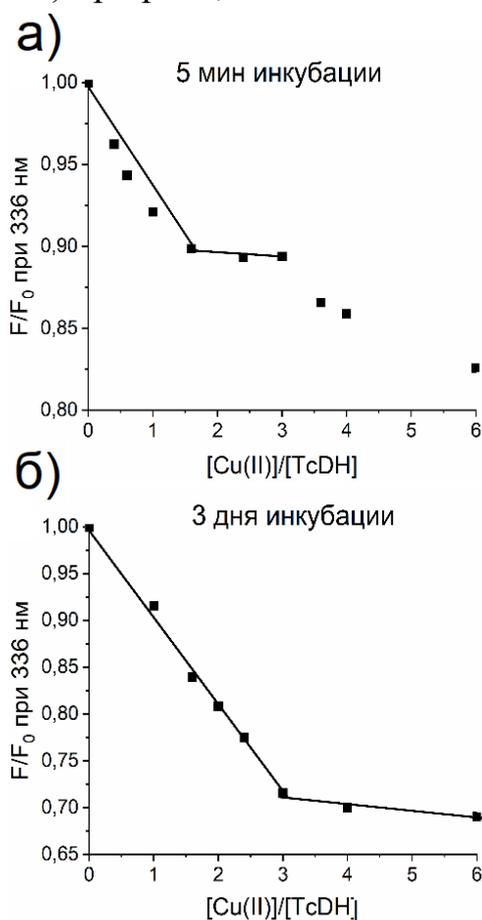
Таким образом, два одноклеточных цитохрома с552 и с546/556 из *Tv. paradoxus* могут выполнять функцию физиологического акцептора электронов для ТсДН.

**Второй подраздел третьей главы** посвящен термодинамической и кинетической оценкам связывания ионов меди в активном центре ТсДН, а также процессу сборки трехъядерного медного центра *in vitro*.

Для изучения кинетики активации к апо-ТсДН добавляли четырехкратный избыток ионов  $Cu(II)/Cu(I)$  (Рис. 5). Максимальная активность ТсДН при инкубации с ионами  $Cu(II)$  была достигнута в течение 24 часов, в то время как максимальная активность ТсДН при инкубации с ионами  $Cu(I)$  наблюдалась уже в течение минуты. Оба препарата, активированные разными способами, по окончании процесса активации обладали одинаковой активностью  $10,0 \pm 1,0$  мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup> и одинаковым содержанием ионов меди на субъединицу  $2,5 \pm 0,3$  (ICP-MS).



**Рис. 5.** Кинетика активации ТсДН (50 мкМ) ионами Cu(II)/Cu(I) (200 мкМ) при pH 9,5.



**Рис. 6.** Изменение интенсивности флуоресценции ( $F/F_0$ ) апо-ТсДН (0,5 мкМ) при 336 нм в зависимости от соотношения  $[Cu(II)]/[TcDH]$  после а) 5 мин и б) 3 дней инкубации при pH 9,5.

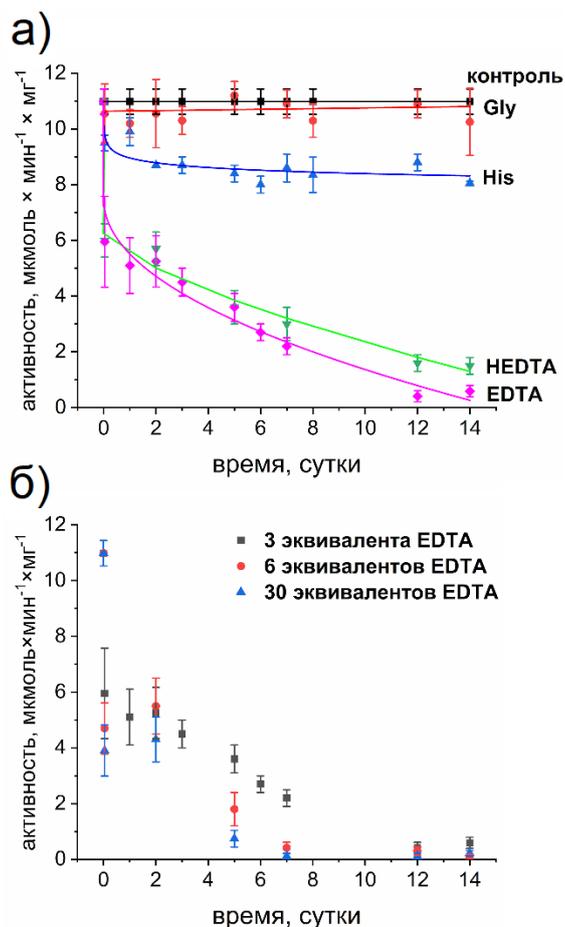
Поскольку рядом с активным центром близко расположены три остатка Trp, то при добавлении ионов Cu(II) к апо-ТсДН окружение Trp изменяется и происходит тушение их флуоресценции. С помощью этого метода была определена стехиометрия связывания ионов Cu(II) с ТсДН во времени. Через 5 мин после добавления ионов Cu(II) к апо-ТсДН резкий перегиб кривой титрования, который соответствует стехиометрии ионов Cu(II) на мономер ТсДН, наблюдался при 1,6 эквивалентах ионов (Рис. 6, а). Через 3 дня после инкубации форма кривой титрования изменилась: перегиб был зафиксирован ровно при 3 эквивалентах ионов Cu(II) (Рис. 6, б). Таким образом, 1,6 ионов Cu(II) на мономер ТсДН связываются быстро в течение нескольких минут, тогда как полное заполнение 3 сайтов ионами Cu(II) происходит медленно, что коррелирует с медленной активацией ТсДН ионами Cu(II) (Рис. 5).

Вероятными причинами медленного встраивания ионов Cu(II) в активный сайт ТсДН по сравнению с ионами Cu(I), по-видимому, являются отличия в строении гидратных оболочек ионов Cu(II)/Cu(I) и в разнице их зарядов. Для встраивания в активный центр ТсДН, ионы меди должны пройти через субстратный канал, радиус которого в наиболее узком месте составляет 1,5 Å, поэтому необходима дегидратация ионов. Вероятно, процесс встраивания ионов Cu(II), образующих комплекс с 5-6 молекулами воды, является более энергозатратным по сравнению с ионами Cu(I), образующими комплекс с 2-4

молекулами воды, поскольку требует удаления большего числа молекул воды из гидратной оболочки ионов. Другой причиной медленного встраивания ионов  $\text{Cu(II)}$  может быть электростатическое отталкивание, возникающее между уже встроившимися в активный центр и невстроившимися ионами  $\text{Cu(II)}$ . В случае ионов  $\text{Cu(I)}$ , обладающих меньшим положительным зарядом, чем ионы  $\text{Cu(II)}$ , сила электростатического отталкивания между ионами, вероятно, меньше, в связи с чем полное заполнение активного центра фермента происходит быстро.

Для исследования кинетики инактивации посредством удаления ионов меди из активного центра к  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  были добавлены разные лиганды, образующие комплексы с ионами  $\text{Cu(II)}$ . Установление равновесия инактивации  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  с помощью лигандов занимало несколько суток (Рис. 7). При инкубации  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  с Gly снижение активности не наблюдалось (Рис. 7, а), что свидетельствует о более высокой аффинности сайтов TcDH к ионам  $\text{Cu(II)}$  по сравнению с Gly ( $\log K_{D1} = -7,9$ ). При инкубации  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  с лигандом His активность снижалась приблизительно на 25%, то есть один или несколько сайтов TcDH демонстрируют аффинность к ионам  $\text{Cu(II)}$ , сравнимую с His ( $\log K_{D1} = -10,0$ ;  $\log K_{D2} = -7,8$ ). При инкубации  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  с более аффинными к ионам  $\text{Cu(II)}$  лигандами – EDTA ( $\log K_D = -18,0$ ) и HEDTA ( $\log K_D = -16,9$ ) – практически полная инактивация фермента в условиях трехкратного избытка лигандов происходила только через 14 дней (Рис. 7, а). Процесс инактивации  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  с помощью EDTA зависел от концентрации лиганда: так при инкубации с 30 эквивалентами EDTA фермент инактивировался уже через 7 дней (Рис. 7, б).

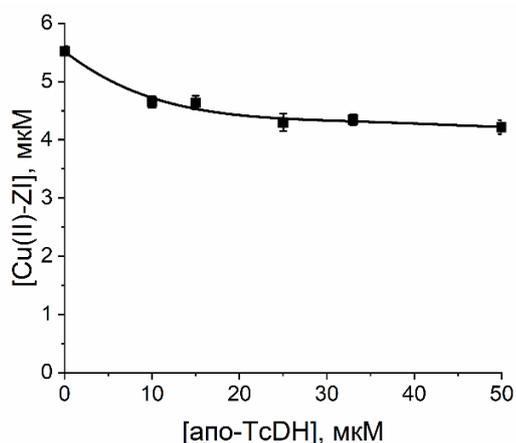
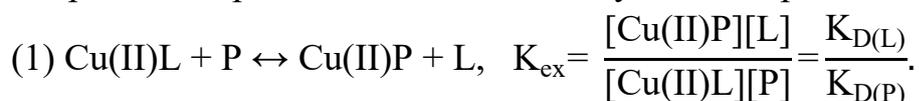
Кинетически медленный процесс инактивации TcDH при удалении ионов меди можно объяснить низкой доступностью активного центра TcDH: три иона меди располагаются в центральной полости  $\beta$ -пропеллера TcDH на дне субстратного



**Рис. 7.** Кинетика инактивации  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  (50 мкМ) а) при добавлении 3 эквивалентов лигандов ионов  $\text{Cu(II)}$ ; б) 3-30 эквивалентов EDTA при pH 9,5.

канала на расстоянии 12 Å от поверхности. Малодоступность медных центров ферментов как конечных акцепторов в пути транспорта меди, по-видимому, является способом снизить потерю ионов меди при взаимодействии с более высокоаффинными белками/молекулами *in vivo*.

Аффинность связывания ионов Cu(II) в трех медных сайтах Cu1, Cu2 и Cu3 медного центра TcDH была определена методом конкурентного титрования с использованием лигандов иона Cu(II) – ZI (Zincon) ( $\log K_D = -17,8$ ) и His ( $\log K_{D1} = -10,0$ ;  $\log K_{D2} = -7,8$ ). При добавлении апо-белка к комплексу меди с лигандом (L) с известным сродством  $K_{D(L)}$  происходит перераспределение иона Cu(II) между белком (P) и лигандом (L), и  $K_{D(P)}$  исследуемого белка с одним сайтом связывания Cu(II) при фиксированном pH можно оценить следующим образом:



**Рис. 8.** Зависимость концентрации комплекса Cu(II)-ZI (5,5 мкМ Cu(II), 10 мкМ ZI) от концентрации апо-ТсДН (0-50 мкМ) при pH 9,5.

аффинности сайтов TcDH к ионам Cu(II) как  $\log K_D \geq -16,4 \pm 0,2$  (уравнение 1).

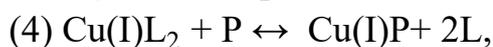
Инкубация  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  с His приводила к снижению активности, а значит, диссоциации ионов Cu(II) из активного центра TcDH (**Рис. 7, а**). His образует комплекс с ионами Cu(II), как в соотношении 1 к 1 с  $\log K_{D1} = -10,0$ , так и 1 к 2 с  $\log K_{D2} = -7,8$ , поэтому расчет проводили по следующим уравнениям:

$$(2) [\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}] = \frac{[\text{Cu(II)}]_{\text{tot}} - [\text{Cu(II)-TcDH}]}{K_{D1}^{-1}[\text{His}] + K_{D1}^{-1}K_{D2}^{-1}[\text{His}]^2}, \quad (3) \frac{[\text{Cu(II)-TcDH}]}{[\text{TcDH}]_{\text{tot}}} = \frac{[\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}]}{(K_D(\text{Cu(II)-TcDH}) + [\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}])}$$

где  $[\text{Cu(II)-TcDH}]$  оценивали, как концентрацию активного фермента ( $(v/v_{\text{max}}) \times [\text{TcDH}]_{\text{tot}}$ ), а  $[\text{His}]$  – равновесная концентрация свободного His.

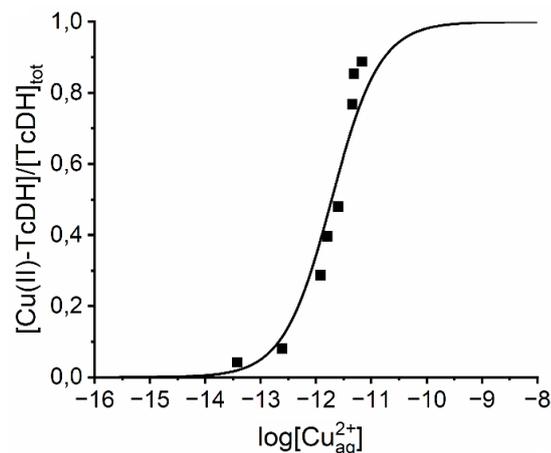
Инкубация  $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$  с разными концентрациями His позволила оценить значение  $\log K_D = -11,7 \pm 0,1$  с помощью уравнений 2-3 (Рис. 9). То есть три медных сайта TcDH обладают разным сродством к ионам Cu(II), значения которых лежат в диапазоне  $-11,7 \geq \log K_D \geq -16,4$  при pH 9,5.

Стехиометрию и аффинность связывания TcDH с ионами Cu(I) также определяли конкурентным методом с использованием лиганда - Вса (бицинхолиновая кислота), который образует комплекс с ионом Cu(I) в соотношении 1 к 2 с константой образования  $\log \beta_2 = 17,2$ . Тогда  $K_{D(P)}$  исследуемого белка при фиксированном pH в данном случае можно оценить следующим образом:

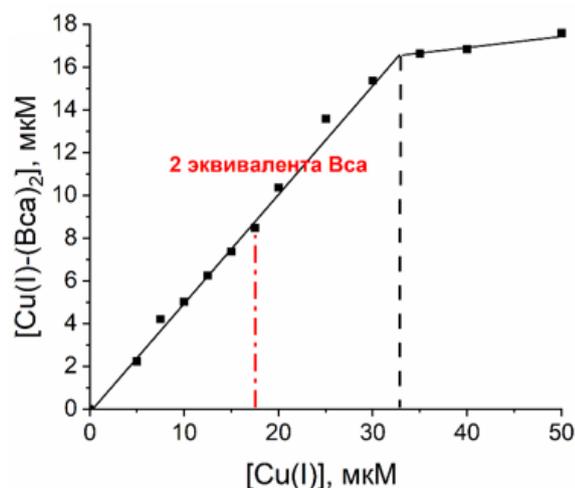


$$K_{\text{ex}} = \frac{[\text{Cu(I)P}][\text{L}]^2}{[\text{Cu(I)L}_2][\text{P}]} = \frac{1}{K_{D(P)}\beta_2}.$$

При добавлении к апо-TcDH и Вса возрастающих концентраций ионов Cu(I) увеличивалась оптическая плотность при 562 нм, что свидетельствует об образовании комплекса  $\text{Cu(I)-(Vca)}_2$  (Рис. 10). Однако кривая титрования вышла на плато не при концентрации ионов Cu(I), равной половине концентрации Вса в растворе (при 17,5 мкМ), а значительно позже, при 32,5 мкМ, что свидетельствует о том, что 15 мкМ ионов Cu(I) связались с апо-TcDH (5 мкМ) (Рис. 10). Это соответствует 3 эквивалентам Cu(I) на мономер TcDH. Для расчета аффинности

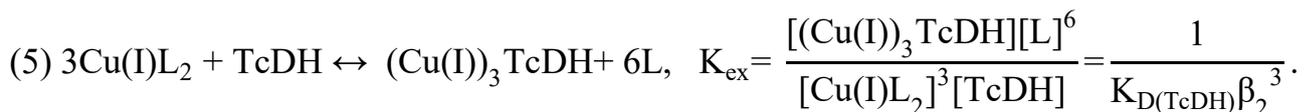


**Рис. 9.** Зависимость  $[\text{Cu(II)-TcDH}]/[\text{TcDH}]_{\text{tot}}$  от  $\log[\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}]$  при варьировании концентрации His при pH 9,5.

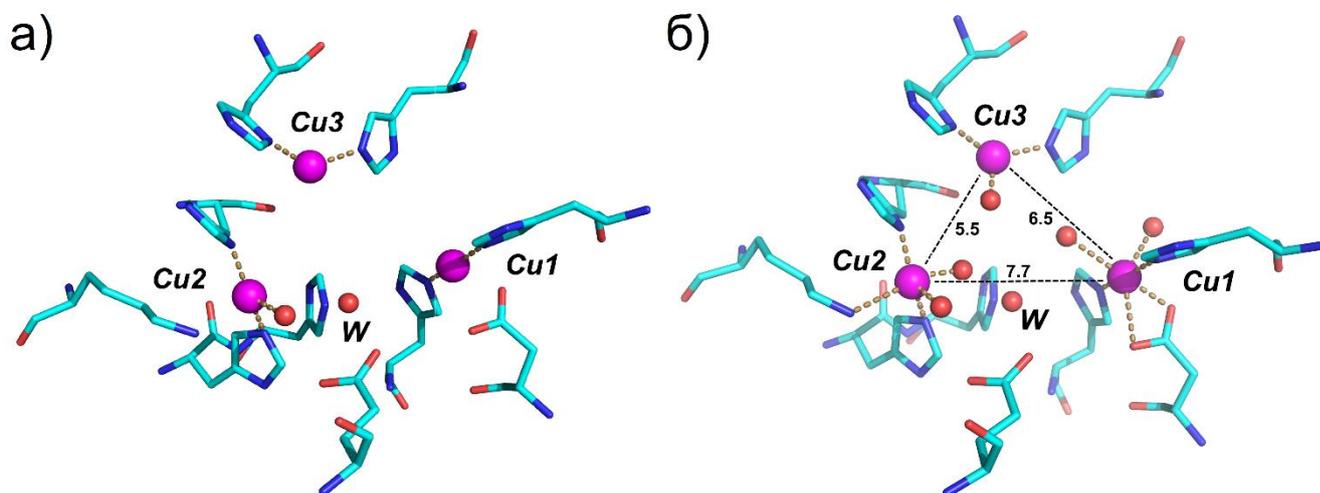


**Рис. 10.** Изменение концентрации комплекса  $[\text{Cu(I)(Vca)}_2]^{3-}$  в присутствии Вса (35 мкМ) и апо-TcDH (5 мкМ) в зависимости от концентрации Cu(I) при pH 9,5. Красным пунктиром обозначен рассчитанный перегиб при отсутствии конкуренции, черным – экспериментально измеренный.

TcDH к 3 ионам Cu(I) использовали следующее уравнение:



Поскольку все три сайта TcDH конкурируют за ион Cu(I) с Вса при данных условиях, то аффинность этих сайтов, по-видимому, близка. Исходя из рентгеноструктурных данных, ионы меди в восстановленном состоянии в трех сайтах могут координироваться сходным образом с участием 2 остатков His (**Рис. 11, а**), что дополнительно свидетельствует об их близкой аффинности. Если извлечь кубический корень из получившегося значения  $K_{\text{D(TcDH)}}$  в уравнении 5, то можно рассчитать среднее значение аффинности для трех сайтов TcDH, которое составило  $\log K_{\text{D}} = -13,0 \pm 0,3$  при pH 9,5.



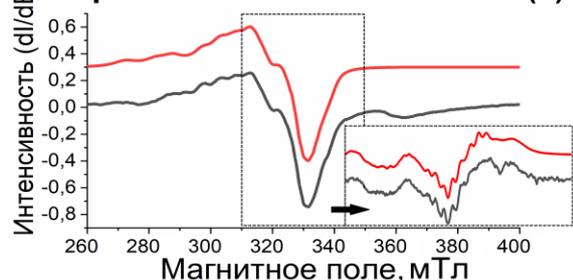
**Рис. 11.** Структура активного центра TcDH из *Tv. paradoxus* а) в восстановленном (предполагаемая модель) и б) в окисленном состоянии (PDB ID 5OEX).

Порядок связывания ионов Cu(II) в трехъядерном медном центре TcDH исследовали методом ЭПР-спектроскопии в X-диапазоне, как с TcDH из *Tv. paradoxus*, так и из *P. methylotrophicum*. Спектр TcDH с 1 эквивалентом Cu(II) можно описать двумя медными сайтами с разной долей и разным окружением (**Рис. 12, Табл. 1**). Спектр TcDH с 2 эквивалентами Cu(II) также был описан двумя медными сайтами (**Рис. 12, Табл. 1**). Наконец, спектр TcDH с 3 эквивалентами Cu(II) описали тремя медными сайтами (**Рис. 12, Табл. 1**). На второй производной спектров TcDH после добавления 1 и 2 эквивалентов ионов Cu(II) в диапазоне магнитных полей от 310 до 350 мТл мы наблюдаем дополнительные линии, которые можно интерпретировать для сайта с большей долей как ДСТВ (дополнительное сверхтонкое взаимодействие) неспаренного электрона с тремя ядрами азотных лигандов (**Рис. 12, вставка**). В структуре этот сайт соответствует сайту Cu2, поскольку в координации только этого иона участвуют три азотных лиганда – 2 остатка His и Lys (**Рис. 11, б**). Вторым сайтом, который заполняется при

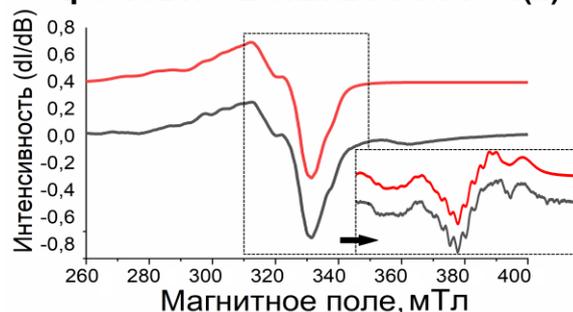
1 эквиваленте Cu(II), вероятно, является сайт Cu1. Сайты Cu1 и Cu2 координируются типичным образом для ионов Cu(II) с участием 6 и 5 лигандов, что может свидетельствовать об их близких значениях аффинности и что отличает их от трехкоординированного сайта Cu3 (Рис. 11, б).

Полученные результаты с обоими препаратами ТсДН качественно были похожи. Однако спектры ТсДН, полученные при более низкой температуре (для ТсДН из *P. methylotrophicum* при 20 К, для ТсДН из *Tv. paradoxus* при 100 К), демонстрировали лучшее разрешение.

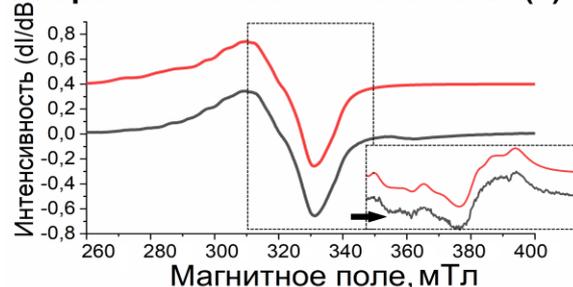
**аро-ТсДН + 1 эквивалент Cu(II)**



**аро-ТсДН + 2 эквивалента Cu(II)**



**аро-ТсДН + 3 эквивалента Cu(II)**



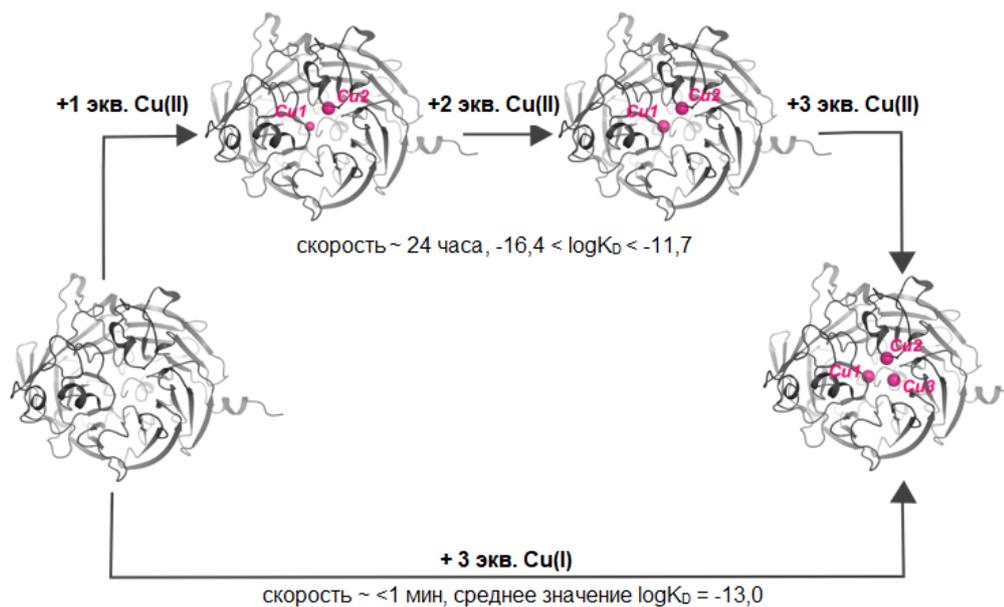
**Табл. 1.** Вклад медных сайтов в интенсивность теоретических ЭПР-спектров ТсДН при добавлении 1, 2 или 3 эквивалентов ионов Cu(II).

Cu(II), экв.	Центр	ТсДН из <i>P. methylotrophicum</i>	ТсДН из <i>Tv. paradoxus</i>
		Доля, %	Доля, %
1	Cu2	66,8	59,2
	Cu1	33,2	40,8
2	Cu2	59,6	57,8
	Cu1	40,4	42,2
3	Cu2	33,3	33,3
	Cu1	33,3	33,3
	Cu3	33,3	33,3

**Рис. 12.** Экспериментальные (черная линия) и теоретические (красная линия) ЭПР-спектры ТсДН из *P. methylotrophicum* при инкубации с 1, 2 или 3 эквивалентами Cu(II) (20 К, X-диапазон). На вставках панелей представлены вторые производные экспериментальных (черная линия) и теоретических (красная линия) спектров.

Таким образом, сборка трехъядерного медного центра ТсДН – это двухстадийный процесс, где на первом этапе заполняются два центра, а на втором этапе связывается третий ион. Сначала заполняется сайт Cu2, так как он ближе всех располагается к субстратному каналу. Поскольку сайты Cu1 и Cu2, вероятно, обладают близким средством к ионам Cu(II), часть ионов переходит в сайт Cu1. То

есть Cu2 является промежуточным пунктом для заполнения центра Cu1. Последним встраивается ион меди в сайт Cu3 с наименьшей аффинностью и нетипичной координацией для ионов Cu(II) (Рис. 13). По-видимому, аффинность сайтов к ионам Cu(II) возрастает в ряду Cu3 << Cu1 ≈ Cu2 в диапазоне  $\log K_D = -(11,7 - 16,4)$ . Оценённые термодинамические параметры и избирательность TcDH к степени окисления меди (Рис. 5) проливают свет на механизмы встраивания меди в активный центр *in vivo*. Скорее всего, сборка медного центра TcDH происходит с участием металлошаперона, связывающего ионы Cu(I) с  $\log K_D > -13,0$ . В связи с чем, следующим этапом работы стал поиск такого металлошаперона, который может встраивать ионы меди в активный центр TcDH *in vivo*.



**Рис. 13.** Схема сборки трехъядерного медного центра TcDH *in vitro*.

**Третий и последний подраздел третьей главы** посвящен медь-связывающему белку CopC из *Tv. paradoxus* (*tpCopC*), ген которого находится рядом с геном TcDH в геноме. Для близкородственной бактерии *Tv. thiocyanoxidans* наблюдалась коэкспрессия генов CopC и TcDH при культивировании бактерии на тиоцианате. Поэтому мы предположили, что *tpCopC* может функционировать в качестве металлошаперона для TcDH.

Рекомбинантный *tpCopC* был получен из клеток *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS, содержащих экспрессионный вектор pE-SUMO с геном *tpCopC* (WP\_006748989) и слитым с ним геном белка SUMO с His<sub>6</sub>-тагом на N-конце. Очищали CopC с помощью металл-хелатной хроматографии, после чего белок SUMO отщепляли SUMO-протеазой. Последняя стадия очистки включала гель-фильтрацию, по результатам которой *tpCopC* был гомодимером с молекулярной массой около 30 кДа.

Стехиометрию связывания *tpCopC* с ионами Cu(II) определяли методом прямого титрования по тушению флуоресценции остатка Trp у *tpCopC*. Резкий перегиб кривой титрования наблюдался при добавлении 1 эквивалента иона Cu(II) к апо-*tpCopC*, то есть *tpCopC* связывает 1 ион Cu(II) (Рис. 14, а).

Аффинность связывания *tpCopC* с ионами Cu(II) определяли конкурентным методом с использованием лигандов – EDTA ( $\log K_D = -15,9$ ) и HEDTA ( $\log K_D = -14,9$ ) при pH 7,4. Добавление EDTA/HEDTA к образцу Cu(II)-*tpCopC* приводило к восстановлению интенсивности флуоресценции, следовательно, ионы Cu(II) диссоциировали из комплекса с *tpCopC* и связывались с лигандами (Рис. 14, б). С помощью уравнения 1 было рассчитано значение  $\log K_D = -16,3 \pm 0,6$  для Cu(II)-*tpCopC* при pH 7,4, что близко к значениям, полученным для гомологичных CopC.

Для оценки аффинности связывания *tpCopC* с ионами Cu(I) использовали лиганд – Fz (феррозин), образующий окрашенный комплекс с ионами Cu(I) в стехиометрии 1 к 2 с  $\log \beta_2 = 15,1$ . При титровании комплекса  $[\text{Cu(I)-(Fz)}_2]^{3-}$  раствором апо-*tpCopC* происходило снижение концентрации комплекса (Рис. 15), которое фиксировали по снижению оптической плотности при 470 нм. То есть происходили диссоциация иона Cu(I) из комплекса  $[\text{Cu(I)-(Fz)}_2]^{3-}$  и его последующее связывание с апо-*tpCopC*. С помощью уравнения 4 было рассчитано значение  $\log K_D = -11,1 \pm 0,2$  для комплекса Cu(I)-*tpCopC* при pH 7,4. Ранее для гомологичного CopC была определена более

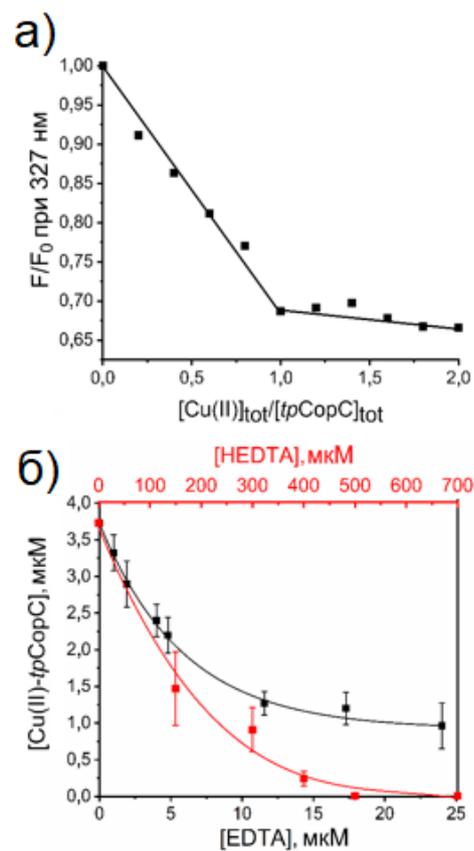


Рис. 14. а) Зависимость изменения флуоресценции ( $F/F_0$ ) от соотношения  $[\text{Cu(II)}]_{\text{tot}}/[\text{tpCopC}]_{\text{tot}}$ . б) Зависимость концентрации Cu(II)-*tpCopC* от концентрации лиганда EDTA (черная кривая) и HEDTA (красная кривая) при pH 7,4.

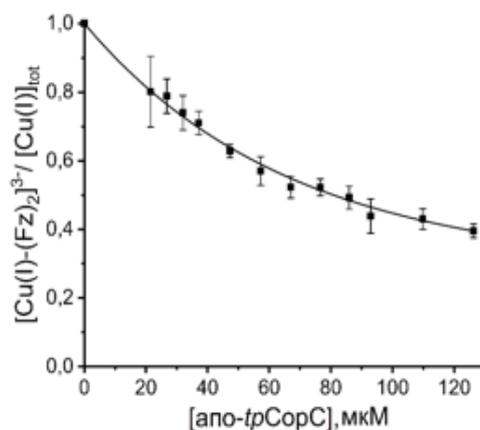
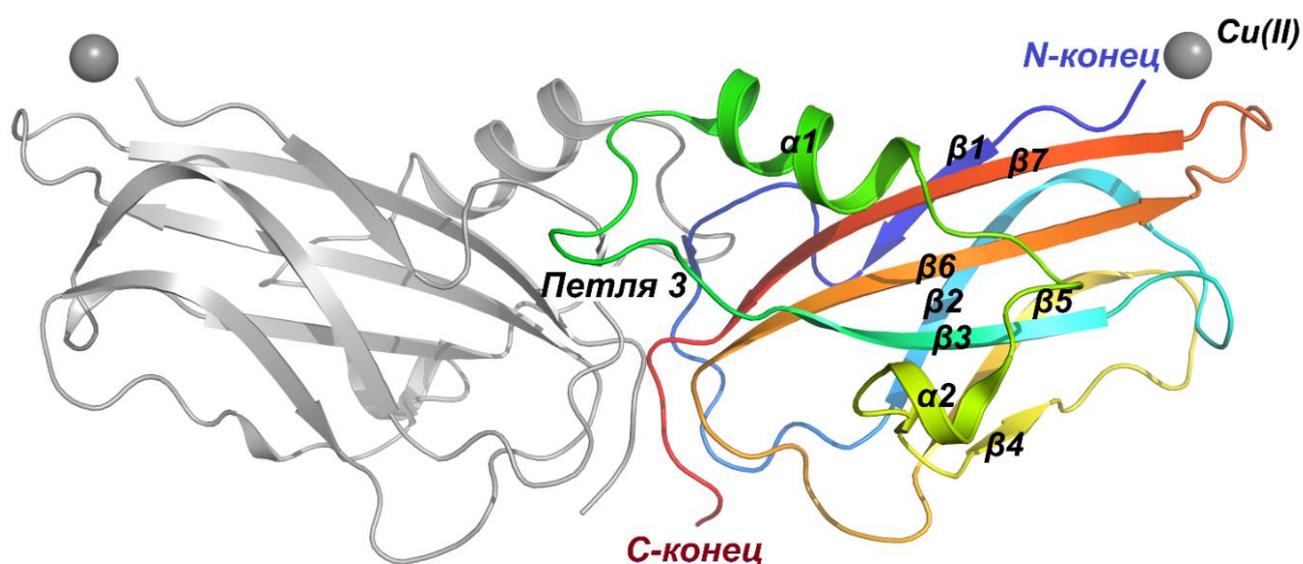


Рис. 15. Зависимость  $[\text{Cu(I)-(Fz)}_2]^{3-}/[\text{Cu(I)}]_{\text{tot}}$  при титровании апо-*tpCopC* (0-125  $\mu\text{M}$ ) в анаэробных условиях при pH 7,4.

низкая аффинность ( $\log K_D = -5,0$ ). С большой вероятностью данная оценка занижена, поскольку в работе был использован метод прямого титрования, который часто недооценивает истинное значение аффинности по сравнению с методом конкурентного титрования.

Структура *tpCorC* с ионом  $\text{Cu(II)}$  была получена при pH 6,6 и решена с разрешением 1,80 Å (PDB ID 8YTQ) методом рентгеноструктурного анализа. Общая структура *tpCorC* идентична структурам других представителей семейства *CorC*, но имеет некоторые отличия (Рис. 16). Во-первых, у *tpCorC* имеется дополнительная вставка из 27 аминокислот, образующая длинную петлю (петля 3) и две  $\alpha$ -спирали (Рис. 16). Во-вторых, *tpCorC* является единственным гомодимером среди других представителей семейства *CorC* (Рис. 16).

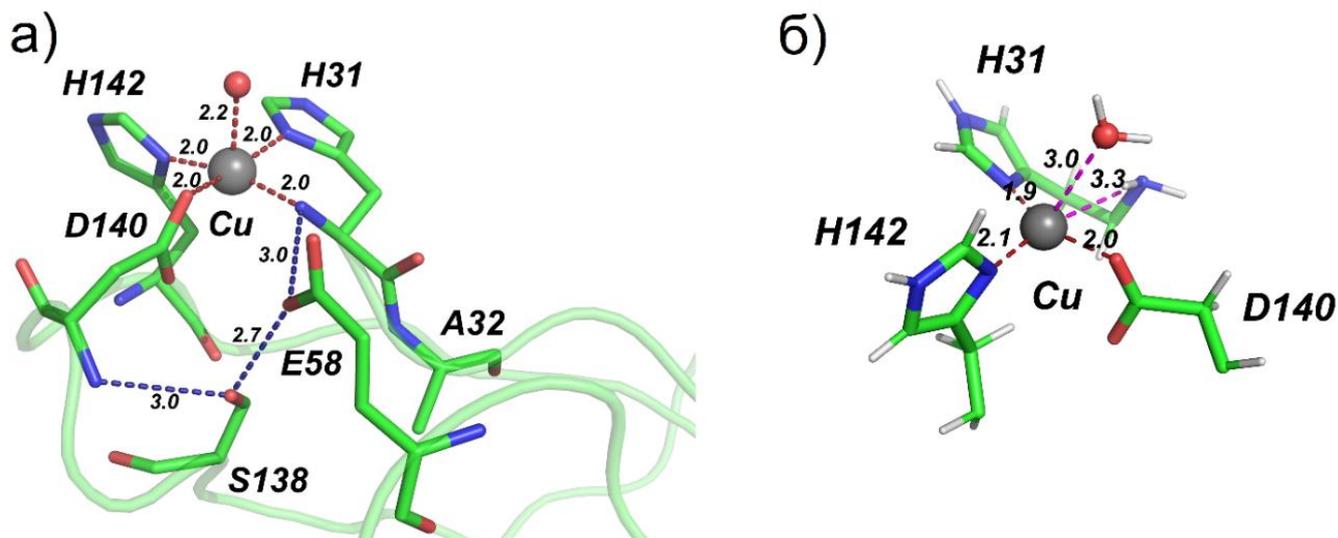


**Рис. 16.** Общая структура гомодимера *tpCorC*. Первый мономер окрашен градиентом от N-конца (синий) к C-концу (красный), второй мономер окрашен в серый цвет.

Сайт связывания иона меди  $\text{Cu(II)-tpCorC}$ , названный мотивом «гистидиновая скрепка», сформирован N-концевым остатком H31 (нумерация остатков по гену *tpCorC*) и консервативными остатками D140 и H142 (Рис. 17, а). Геометрия координации иона  $\text{Cu(II)}$  в структуре *tpCorC* соответствует квадратной пирамиде с молекулой воды в аксиальном положении (Рис. 17, а).

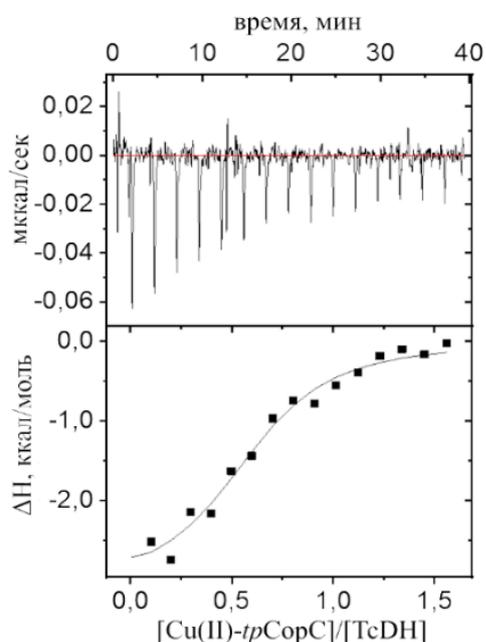
Поскольку у *tpCorC* отсутствуют другие медь-связывающие сайты, кроме мотива «гистидиновой скрепки», то ион  $\text{Cu(I)}$ , вероятно, связывается в этом же сайте. С помощью метода QM/MM (квантовая механика/молекулярная механика) MD (молекулярная динамика) было проведено моделирование связывания иона  $\text{Cu(I)}$  с *tpCorC*. Из полученных результатов, ион  $\text{Cu(I)}$  может быть координирован

боковыми цепями H142, H31 и D140 в тригональной геометрии, благоприятной для иона Cu(I) (Рис. 17, б).



**Рис. 17.** а) Структура сайта связывания иона Cu(II) *tpCopC*. б) Модель сайта связывания иона Cu(I) *tpCopC*. Ион меди показан серой сферой, молекулы воды – красными сферами. Координационные и водородные связи, а также электростатические взаимодействия показаны красными, синими и пурпурными пунктирными линиями, соответственно.

Для передачи иона меди от *tpCopC* к TcDH, два белка должны сформировать комплекс. Изучение взаимодействия двух белков из бактерии *Tv. paradoxus* проводили при pH 9,5, поскольку данное значение является физиологическим для бактерии, а также является оптимумом активности TcDH. Для характеристики взаимодействия *tpCopC* и TcDH был использован метод ИТК (Рис. 18). Апо-TcDH и Cu(II)-*tpCopC* формируют комплекс в соотношении 1 к 1 с  $\log K_D = -5,7 \pm 0,3$ .



**Рис. 18.** Определение  $K_D$  комплекса апо-TcDH и Cu(II)-*tpCopC* методом ИТК при pH 9,5: верхняя панель - ИТК кривая титрования и нижняя панель – изотерма связывания.  $\Delta H = -3,1$  ккал/моль,  $\Delta G = -7,7$  ккал/моль,  $T\Delta S = -16,1$  ккал/моль.

При инкубации апо-ТсДН и Cu(II)-*tpCopC* было показано, что  $0,5 \pm 0,2$  ионов меди из 3 возможных переносится и встраивается в активный центр ТсДН в течение 1 часа, при этом активность увеличивается незначительно с  $0,03 \pm 0,01$  до  $0,3 \pm 0,1$  мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup>. Вероятно, происходит частичное заполнение сайтов Cu1 и Cu2 у ТсДН, согласно порядку заполнения сайтов ТсДН (Рис. 13). Поскольку аффинность сайтов Cu1 и Cu2 к ионам Cu(II) значительно не превышает аффинность *tpCopC*, то полное заполнение сайтов не происходит по термодинамическим причинам. Увеличение времени инкубации апо-ТсДН и Cu(II)-*tpCopC* до 24 часов не приводило к увеличению содержания ионов меди в активном центре ТсДН.

При инкубации апо-ТсДН с Cu(II)-*tpCopC* в восстановительных условиях (в присутствии аскорбата) в течение 1 часа активность ТсДН достигала максимального значения ( $9,3 \pm 0,5$  мкмоль  $\times$  мин<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup>) и происходило полное встраивание ионов меди в активный центр ( $2,5 \pm 0,3$  иона меди на мономер ТсДН).

Таким образом, наиболее вероятный механизм переноса ионов меди от *tpCopC* к ТсДН *in vivo* включает промежуточное восстановление Cu(II)-*tpCopC* до Cu(I)-*tpCopC*. Затем ион Cu(I) передается по градиенту сродства от *tpCopC* к ТсДН. Вопрос о механизме восстановления комплекса Cu(II)-*tpCopC* *in vivo* и потенциальных участниках этого процесса остается открытым. Если принять во внимание высокую экспонированность сайта «гистидиновой скрепки» *CopC* к растворителю, то в этом процессе могут участвовать неспецифические низкомолекулярные восстановители, такие как восстановленная форма глутатиона.

## ВЫВОДЫ

1. Два одногемовых цитохрома с552 и с546/556 из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* способны выполнять роль физиологических акцепторов электронов в реакции окисления тиоцианата, катализируемой ТсДН.
2. Встраивание ионов Cu(I) в активный центр ТсДН *in vitro* происходит быстрее (<1 мин), чем ионов Cu(II) (~ 24 часа). Удаление ионов меди из активного центра ТсДН с помощью высокоаффинных лигандов ионов меди является кинетически медленным процессом (~7-14 дней) в зависимости от лиганда и его концентрации.
3. ТсДН обладает высокой аффинностью к ионам Cu(II) с  $\log K_D$  в интервале - (11,7 – 16,4). Аффинность сайтов медного центра к ионам Cu(II) увеличивается в ряду Cu3 << Cu1 ≈ Cu2. ТсДН обладает высокой аффинностью к ионам Cu(I) со средним значением  $\log K_D = -13,0 \pm 0,3$  для трех сайтов медного центра.
4. Сборка медного центра ТсДН *in vitro* происходит в следующей последовательности: сначала одновременно заполняются сайты Cu2 и Cu1, а впоследствии – сайт Cu3.
5. Медь-связывающий белок *tpCopC* из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* демонстрирует высокую аффинность как к ионам Cu(II) ( $\log K_D = -16,3 \pm 0,6$ ), так и ионам Cu(I) ( $\log K_D = -11,1 \pm 0,2$ ). Связанный ион Cu(II) координируется амино- и боковой группами остатка Н31, боковыми группами остатков D140, Н142 и молекулой воды в аксиальном положении в квадратно-пирамидальной геометрии. Ион Cu(I) связывается в том же сайте боковыми группами Н31, D140 и Н142 в тригональной геометрии.
6. ТсДН и Cu(II)-*tpCopC* образуют комплекс с  $\log K_D = -5,7 \pm 0,3$ . Cu(II)-*tpCopC* способен передавать и встраивать три иона меди в активный центр ТсДН через промежуточную стадию восстановления до Cu(I)-*tpCopC*, т.е. выполнять роль металлошаперона ТсДН *in vitro*.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. 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 // International Journal of Molecular Sciences - 2022. - Vol. 23, № 17. - P. 9969. **IF 4.9 (WoS)**.
2. Varfolomeeva L. A., **Solovieva A. Y.**, Shipkov N. S., Sluchanko N. N., Boyko K. M., Khrenova M. G., Tikhonova T. V., Popov V. O. Relationship between the structure and physicochemical properties of cytochrome c546/556 from the bacterium Thioalkalivibrio paradoxus ARh1 // Biochemical and Biophysical Research Communications - 2025. - Vol. 778. - P. 152340. **IF 2.2 (WoS)**.
3. **Solovieva A. Y.**, Kulikova O. G., Varfolomeeva L. A., Dergousova N. I., Boyko K. M., Khrenova M. G., Tikhonova T. V., Popov V. O. CopC as a potential metallochaperone delivering copper ions to the active site of a thiocyanate dehydrogenase // International Journal of Biological Macromolecules. - 2025. - Vol. 322. - P. 146801. **IF 8.5 (WoS)**.
4. **Solovieva A. Y.**, Varfolomeeva L. A., Efimov N. N., Rotov A. V., Ugolkova E. A., Dergousova N. I., Tikhonova T. V., Popov V. O. Assembling a unique three-copper center of thiocyanate dehydrogenase *in vitro* // International Journal of Biological Macromolecules. - 2026. - Vol. 348. - P. 150768. **IF 8.5 (WoS)**.

### Тезисы докладов

1. **Соловьева А.Ю.** Изучение механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методами стационарной кинетики // Сборник тезисов XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: 8-11 февраля 2021 / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой, сост.: к.б.н. Стукачева Е.А. – С. 38
2. **Соловьева А.Ю.**, Хренова М.Г., Тихонова Т.В., Попов В.О. Исследование механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методом ингибиторного анализа // 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»: 3-8 октября 2021 / под ред. А.Г. Габиева и М.А. Островского. – С.131.

3. **Соловьева А.Ю.**, Варфоломеева Л.А., Дергоусова Н.И., Тихонова Т.В., Попов В.О. Необычные спектральные свойства одноклеточного цитохрома с из галоалкалофильных бактерий рода *Thiokalivibrio* // Сборник тезисов XXXV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" 7-10 февраля 2023 / под редакцией д.х.н. Т.В. Овчинниковой, составители: Овчинникова Т. В., Шереметьева Э. В. - С.35.
4. **Соловьева А.Ю.**, Дергоусова Н.И., Бочаров Э.В., Варфоломеева Л.А., Устинникова Т.Б., Тихонова Т.В., Попов В.О. Структурные исследования одноклеточных цитохромов с – потенциальных акцепторов электронов в реакции, катализируемой тиоцианатдегидрогеназой // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – М.: Издательство «Адмирал принт». – 2023 – С. 216.
5. **Solovieva A.Y.**, Varfolomeeva L.A., Dergousova N.I., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural features of cytochrome c that determine the splitting of Q-lines // V International school of structural biology « Structural biology: main problems and approaches to their solution» (IBCh RAS, Moscow, June 5-7, 2024) – 2024. – P. 80.
6. **Solovieva A.Y.**, Varfolomeeva L.A., Kulikova O. G., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural study of apo- and holo-CopC from *Thiokalivibrio paradoxus*// 14<sup>th</sup> 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. 544-545.
7. **Solovieva A.Y.**, Varfolomeeva L.A., Kulikova O. G., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural features of the copper-binding protein CopC from a haloalkaliphilic bacterium // International conference «Biomembranes'24» (MIPT, October 7-11, 2024) – 2024. – P. 239.