

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

На правах рукописи

Соловьева Анастасия Юрьевна

МЕХАНИЗМ СБОРКИ ТРЕХЪЯДЕРНОГО МЕДНОГО ЦЕНТРА И ДЕТАЛИ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Специальность 1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.х.н., профессор, академик РАН Попов Владимир Олегович

Москва, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Медь в биологических процессах	11
1.2. Гомеостаз меди в клетке грамотрицательных бактерий	13
1.2.1. Импорт ионов меди через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий	13
1.2.2. Импорт ионов меди в цитоплазму через цитоплазматическую мембрану	15
1.2.3. Медь в цитоплазме	15
1.2.4. Экспорт меди через цитоплазматическую мембрану.	19
1.2.4.1. Cue-система	19
1.2.4.2. Cus-система.....	20
1.2.4.3. Cop/pco-система	22
1.3. Сборка медных центров ферментов <i>in vivo</i>	25
1.3.1. Сборка медных центров CuA и CuB цитохром с оксидазы (Cox)	27
1.3.2. Сборка медных центров CuA и CuZ N ₂ O-редуктазы (NosZ).....	31
1.3.3. Сборка T2 медного центра Cu,Zn-супероксиддисмутазы (SodC)	35
1.3.4. Сборка T1 и T2 медных центров медь-содержащей нитритредуктазы (NirK)	38
1.3.5. Сборка T3 медного центра тирозиназы	40
1.4. Оценка высокоаффинного связывания ионов меди с белками	43
1.5. Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) из бактерии <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i>	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1. Материалы и реактивы	48
2.2. Некоторые аналитические методы	48
2.2.1. Спектрофотометрическое определение концентрации белков и растворов	48
2.2.2. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)	49
2.2.3. Определение содержания ионов металлов в белковых препаратах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS)	50
2.2.4. Идентификация белков методом масс-спектрометрии	50
2.3. Получение и очистка белков	50
2.3.1. Получение и очистка рекомбинантного TcDH	50
2.3.2. Получение и очистка рекомбинантного цитохрома c552	51
2.3.3. Получение и очистка нативного цитохрома c546/556.....	52
2.3.4. Получение и очистка рекомбинантного trCopC.....	53
2.4. Насыщение TcDH ионами металлов	53
2.5. Определение ферментативной активности TcDH	54
2.6. Удаление ионов меди из TcDH	54

2.7. Определение стехиометрии и аффинности связывания исследуемых белков с ионами металлов	55
2.7.1. <i>Определение стехиометрии методом прямого титрования</i>	56
2.7.2. <i>Определение аффинности и стехиометрии методом конкурентного титрования</i>	56
2.7.2.1. <i>Определение аффинности TcDH к ионам Cu(II) и Zn(II) с использованием ZI</i>	56
2.7.2.2. <i>Определение аффинности TcDH к ионам Cu(II) с использованием His</i>	57
2.7.2.3. <i>Определение аффинности и стехиометрии TcDH к ионам Cu(I) с использованием Vcs/Vca</i>	58
2.7.2.4. <i>Определение аффинности trCopC к ионам Cu(II) с использованием EDTA/HEDTA</i>	59
2.7.2.5. <i>Определение аффинности trCopC к ионам Cu(I) с использованием Fz</i>	60
2.8. Определение константы диссоциации комплекса TcDH и trCopC методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК)	60
2.9. Потенциометрическое титрование цитохромов с	61
2.10. Структурные методы исследования	61
2.10.1. <i>Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)</i>	61
2.10.2. <i>Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)</i>	62
2.10.3. <i>Рентгеноструктурный анализ</i>	63
2.11. Молекулярное моделирование	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1. Кинетические свойства реакции, катализируемой TcDH	66
3.1.1. <i>Получение и очистка рекомбинантного препарата TcDH</i>	66
3.1.2. <i>Кинетические параметры реакции TcDH с нефизиологическими акцепторами электронов</i>	67
3.1.3. <i>Потенциальные физиологические акцепторы электронов реакции, катализируемой TcDH</i>	67
3.1.3.1. <i>Цитохром c552</i>	67
3.1.3.2. <i>Цитохром c546/556</i>	70
3.2. Встраивание ионов меди в активный центр TcDH <i>in vitro</i>	73
3.2.1. <i>Активация TcDH ионами Cu(II)/Cu(I)</i>	73
3.2.2. <i>Удаление ионов меди из активного центра TcDH</i>	75
3.2.3. <i>Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами металлов</i>	77
3.2.3.1. <i>Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами Cu(II)</i>	77
3.2.3.2. <i>Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами Zn(II)</i>	81
3.2.3.3. <i>Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами Cu(I)</i>	82
3.2.4. <i>Порядок встраивания ионов Cu(II) <i>in vitro</i></i>	83
3.3. CopC как металлошаперон TcDH <i>in vivo</i>	86
3.3.1. <i>Получение, очистка и характеристика рекомбинантного trCopC</i>	87
3.3.2. <i>Стехиометрия и аффинность связывания trCopC с ионами Cu(II)/Cu(I)</i>	88

3.3.3. Пространственные структуры $trCорC$	91
3.3.3.1. Общая структура $trCорC$	91
3.3.3.2. Медь-связывающий сайт $trCорC$	94
3.3.3.3. Моделирование связывания иона $Cu(I)$ в медь-связывающем сайте $trCорC$	96
3.3.4. Комплекс между $trCорC$ и $TсDH$	97
3.3.5. Перенос иона меди от $trCорC$ в активный центр $TсDH$	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107
ПРИЛОЖЕНИЕ	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДСТВ – дополнительное сверхтонкое взаимодействие
- ИПТГ – изопропил- β -тиогалактозид
- ИТК – изотермическая титрационная калориметрия
- МИ – микроволновое излучение
- β -МЭ – β -меркаптоэтанол
- ПСА - персульфат аммония
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- СВЭ – стандартный водородный электрод
- СГ – спиновой гамма-квант
- СТВ – сверхтонкие взаимодействия
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- Вса – bicinechonic acid – бицинхониновая кислота
- Вcs – bathocuproine disulfonate – батокупроин дисульфонат
- BIS-TRIS – bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane – бис(2-гидроксиэтил)амино-трис(гидроксиметил)метан
- Сох – cytochrome c oxidase – цитохром с оксидаза
- EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid – этилендиаминтетрауксусная кислота
- Fz – ferrozine – 4-[3-(2-pyridinyl)-5-(4-sulfophenyl)-1,2,4-triazin-6-yl]benzenesulfonate
феррозин – 4-[3-(2-пиридинил)-5-(4-сульфофенил)-1,2,4-триазин-6-ил]бензолсульфонат
- НEDТА – N-(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid – N-(2-гидроксиэтил)этилендиамин-N,N',N'-триуксусная кислота
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- ICP-MS – inductively coupled plasma mass spectrometry – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
- LB – Luria-Bertani medium – среда Лурия-Бертани

MALDI-TOF MS – matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

MD – молекулярная динамика

MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

MOPS – 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid – 3-(N-морфолино)-пропансульфоновая кислота

NirK – copper nitrite reductase – медная нитритредуктаза

NosZ – N₂O reductase – N₂O-редуктаза

PDB – protein data bank – банк структур белков

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride – фенилметилсульфонилфторид

pmTcDH – тиоцианатдегидрогеназа из *Pelomicrobium methylotrophicum*

r.m.s.d. – root mean square deviation – среднеквадратичное отклонение

QM/MM – квантовая механика/молекулярная механика

SDS – sodium dodecyl sulfate – додецилсульфат натрия

SDS-PAGE – SDS - polyacrylamide gel electrophoresis – SDS - электрофорез в полиакриламидном геле

Sec – secretory - секреторный

Sod – superoxide dismutase – супероксиддисмутаза

SUMO – small ubiquitin-like modifier – малый убиквитин-подобный модификатор

Tat – twin arginine translocation – транслокация с двойным аргинином

TcDH – thiocyanate dehydrogenase – тиоцианатдегидрогеназа

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

TEV – tobacco etch virus – вирус табачной мозаики

tpCopC – CopC из *Thiokalivibrio paradoxus*

tpTcDH – тиоцианатдегидрогеназа из *Thiokalivibrio paradoxus*

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

YT – yeast extract tryptone – дрожжевой экстракт триптон

ZI – zincon – 2-(-2-((-2-hydroxy-5-sulfophenyl)diazenyl)-(phenyl)methylene)hydrazinyl)benzoic acid – цинкон – 2-(-2-((-2-гидрокси-5-сульфофенил)дiazенил)-(фенил)метилена)гидразинил)бензойная кислота

ВВЕДЕНИЕ

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 (ТсДН), 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 ТсДН и детально изучить процесс сборки трехъядерного медного центра *in vitro*. Решение этой задачи имеет фундаментальное значение для понимания функционирования медного центра ТсДН 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 (ТсДН) *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 ТсДН.
2. Изучение кинетики активации ТсДН при добавлении ионов Cu(II)/Cu(I) и кинетики инактивации при удалении ионов меди из активного центра ТсДН.

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 одногеновых цитохрома c552 и c546/556 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. *tpSorC* 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. *tpSorC* 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.

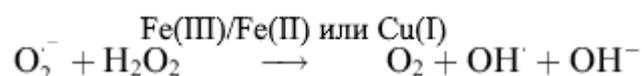
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Медь в биологических процессах

Приблизительно два миллиарда лет назад произошла кислородная катастрофа, что послужило эволюционным толчком для использования меди живыми организмами [1]. Благодаря присутствию кислорода в атмосфере, медь стала легкодоступным окислительно-восстановительным кофактором, поскольку практически нерастворимые в воде ионы Cu(I) окислились до растворимых и стабильных в водной среде ионов Cu(II). Помимо этого, окисление ионов Fe(II) до нерастворимой формы ионов Fe(III) сделало использование железа более энергетически затратным, в результате чего медь стала ключевым компонентом во многих редокс-процессах. В качестве кофакторов ферментов ионы меди необходимы в процессах окислительного фосфорилирования, метаболизма железа, образования меланина, нейромедиаторов и антиоксидантной защиты [2]. Более того, участие меди является важным в процессах врожденного иммунного ответа, в модуляции синаптической передачи и в ангиогенезе. Так, дефицит меди имеет серьезные клинические последствия, часто связанные с нейродегенерацией [3].

Восстановительный потенциал пары Cu(II)/Cu(I) составляет +160 мВ, однако он очень чувствителен к комплексообразующим лигандам и геометрии комплекса, что делает медь отличным катализатором для различных реакций переноса электрона. В связывании меди в белках наиболее часто принимают участие такие аминокислотные остатки как His, Cys и Met [4]. Согласно принципу жестких и мягких кислот и оснований [5], ион Cu(I) как мягкая кислота предпочтительно координируется остатками Cys и Met, а ион Cu(II) как пограничная кислота предпочтительно координируется более жесткими остатками His, Tyr, Thr и молекулами OH⁻ и H₂O [6]. Ион Cu(I) может быть координирован 2, 3 или 4 лигандами с линейной, тригонально-плоской или тетраэдрической геометрией [4]. Ион Cu(II) часто координирован 4, 5 или 6 лигандами с квадратно-плоской, квадратно-пирамидальной или аксиально-искаженной октаэдрической геометрией [4].

Из-за своих окислительно-восстановительных свойств медь также способна инициировать нежелательные реакции с активными формами кислорода (АФК). К таким соединениям относятся пероксид водорода и супероксид-анион, которые способны взаимодействовать с ионами металлов с переменной валентностью. В 1934 году Габер и Вейс предложили следующую реакцию, где медь (или железо) выступает в роли катализатора [7]:



Образующийся в реакции гидроксил радикал (OH^\cdot) является наиболее активным и токсичным видом АФК, способным неконтролируемо окислять практически любые типы биомолекул [8].

Более того, медь находится на вершине ряда Ирвинга — Вильямса, характеризующего энергию связывания ионов переходных металлов с лигандами, поэтому связывание ее с белками обычно является термодинамически предпочтительным процессом [9]. Хотя это способствует встраиванию меди в медные ферменты, её избыток может привести к связыванию с ферментами, содержащими в физиологическом состоянии другие металлы, и как следствие к их инактивации [10].

Таким образом, медь является важным микроэлементом, необходимым эукариотам и прокариотам, но потенциально токсичным при избытке.

У живых организмов существуют клеточные системы, которые запасают, распределяют и выводят ионы меди, доставляют их к медным ферментам и поддерживают их концентрацию на необходимом уровне. Внутри клетки концентрация свободной меди поддерживается на очень низком уровне для подавления реакции Габера-Вейса и образования АФК. Подсчитано, например, что концентрация свободной меди в клетке дрожжей намного ниже, чем один свободный ион меди на весь объем клетки [11]. Однако сверхнизкая концентрация затрудняет процесс доставки ионов меди и сборки медных центров вновь синтезированных ферментов. Высокоселективный транспорт меди к медным ферментам достигается за счет белок-белковых взаимодействий с особым классом белков - металлошаперонами, что нивелирует протекание возможных побочных реакций.

Другой стратегией уменьшения токсичного эффекта меди является компартментализация медь-содержащих белков в клетке. Так, в бактериальном цитозоле находятся медные шапероны, медь-запасающие белки и медь-чувствительные регуляторы транскрипции [12], которые связывают медь временно. Что касается медных ферментов, где медь связана постоянно и входит в состав активного центра, то они локализованы либо в бактериальной мембране, либо в периплазматическом пространстве или на клеточной поверхности. Интересно отметить, что все изученные бактериальные медные ферменты связывают медь вне цитозоля [12–14], что способствует поддержанию низкого уровня металла в цитоплазме.

На основе анализа данных геномных последовательностей прокариот (450 геномов бактерий и 35 геномов архей) и эукариот (5 геномов), были сделаны попытки определить медный протеом, или купропротеом [15,16]. Белки с медь-связывающими мотивами составляют менее 1% протеома организма, при этом примерно половина из них участвует в гомеостазе и хранении этого микроэлемента. Почти 72% видов бактерий и 31% видов

архей из анализируемой выборки используют медь в качестве кофактора [15]. У некоторых организмов (*Thermotogae*, *Chlorobi*, *Lactobacillales* и *Mollicutes*) отсутствовали медь-зависимые белки, но имелись белки-экспортеры меди, которые, по-видимому, защищают клетку от вредного воздействия металла. Более 70% предполагаемых медных белков, найденных у прокариот, имеют гомологов как у архей, так и у эукариот. Наиболее распространенным медным белком является цитохром с оксидаза (Cox), а вторым по частоте встречаемости - НАДН-дегидрогеназа II [15].

1.2. Гомеостаз меди в клетке грамотрицательных бактерий

В данном разделе будут рассмотрены системы гомеостаза меди в клетках грамотрицательных бактерий. В эту систему входят медные транспортеры, медь-запасующие белки, белки-регуляторы и металлошапероны, встраивающие медь в медные ферменты. Схема этой сети взаимодействий представлена на **Рис. 1**. Системы транспорта меди между компартментами бактериальной клетки важны не только для обеспечения оптимальной концентрации ионов меди, но и для сборки медных центров ферментов. Как будет показано позднее, биогенез кофактора медных ферментов зависит и от механизмов транспорта ионов меди как из окружающей среды, так и из цитоплазматического пула.

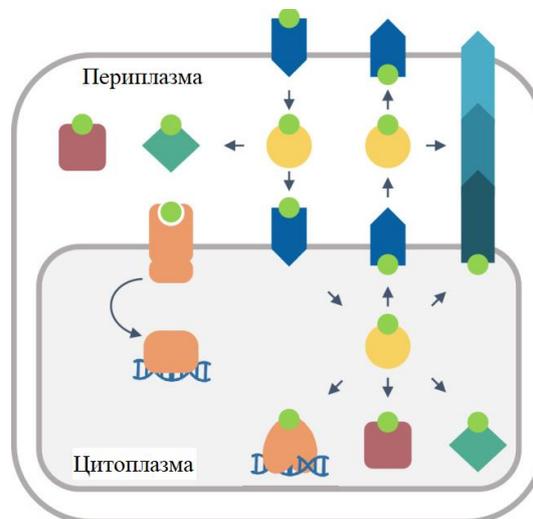


Рис. 1. Схема гомеостаза меди в клетках грамотрицательных бактерий, рисунок адаптирован из [17]. Зеленым показана медь, оранжевым – медные сенсоры/регуляторы, красным – медь-запасующие белки, желтым – металлошапероны, синим – белки-транспортеры, бирюзовым – медные ферменты.

1.2.1. Импорт ионов меди через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий

Ионы меди поступают из окружающей среды в клетку, и в случае грамотрицательных бактерий первым барьером для них является внешняя мембрана.

Малые молекулы и ионы, в частности ионы Cu(II), либо пассивно диффундируют через порины, встроенные во внешнюю мембрану, либо переносятся с затратой энергии с помощью активных переносчиков, либо транспортируются специальными секретлируемыми пептидами. Для *Pseudomonas aeruginosa* [18], *Acidithiobacillus ferrooxidans* [19] и *Rhodobacter capsulatus* [20] было показано, что высокие концентрации меди в окружающей среде увеличивают экспрессию некоторых белков наружной мембраны. Лишь некоторые из этих белков были идентифицированы и охарактеризованы, тогда как для большинства их функция остается неизвестной.

Примером порина, вовлеченного в гомеостаз меди может служить белок OmpF, который участвует в импорте меди в периплазму у *Escherichia coli*. Штамм *E. coli* с делецией гена, кодирующего OmpF, обладал устойчивостью к избытку меди в среде [21].

Примером медного переносчика активного транспорта на внешней мембране является NosA, который крайне важен для встраивания меди в активный центр N₂O-редуктазы (NosZ). Мутантный штамм *Pseudomonas stutzeri*, в котором транспортер NosA не экспрессировался, не обладал N₂O-редуктазной активностью, а в активном центре NosZ отсутствовала медь [22]. Считается, что функция NosA особенно значима в биогенезе NosZ при низкой доступности меди [23]. NosA является гомологом TonB-зависимых транспортеров наружной мембраны *E. coli*. Эти транспортные системы встречаются только у бактерий и используют протонную движущую силу для транспортировки питательных веществ через внешнюю мембрану [24]. У *P. aeruginosa* на наружной мембране также есть гомологичный TonB-зависимый переносчик OprC, экспрессия которого увеличивается при низких концентрациях ионов Cu(II) и подавляется при высоких [25].

ComC-подобные белки являются типичным элементом наружных мембран у грамотрицательных бактерий. Повышенная продукция белка ComC в мутантном штамме *E. coli* снижала проницаемость меди в клетку, при этом экспрессия ComC индуцировалась в ответ на доступность меди [26]. Однако точный механизм их действия до конца не изучен.

При остром дефиците ионов металлов в окружающей среде некоторые бактерии используют принципиально другой способ транспорта. Они синтезируют небольшие органические соединения – металлофоры, обладающие высоким сродством к определенному иону металла [24,27]. Металлофоры экспортируются во внешнюю среду, связывают ион металла и импортируются обратно во внутриклеточное пространство для дальнейшего использования. Наиболее охарактеризованными медь-связывающими металлофорами (халькофорами) являются метанобактин (mbn) [28] и иерсиниабактин. Медь могут также связывать копропорфирин III, шизокинин, стафилопин. mbn, обнаруженный у метанотрофных бактериях, относится к классу полипептидов,

связывающих как ион Cu(I), так и ион Cu(II) [28]. mbn обладает высоким сродством к иону Cu(I) с $\log K_D$ около -20, что способствует выполнению его функции связывания меди из окружающей среды в условиях низкой доступности иона металла.

1.2.2. Импорт ионов меди в цитоплазму через цитоплазматическую мембрану

После прохождения внешней мембраны ион Cu(II) попадает в периплазматическое пространство. Здесь ион Cu(II) связывается с низкомолекулярными хелаторами, такими как глутатион [10], и медными белками, в том числе CusF, CopC и другими (**Рис. 1**).

Импортёр CsoA ионов меди в цитоплазму, расположенный на внутренней мембране, относится к широко распространённому семейству CalT (CsoA-подобному транспортеру) транспортеров суперсемейства MFS (Major Facilitator Superfamily). Представители этого суперсемейства переносят большой спектр субстратов с помощью протонного градиента. Впервые CsoA был обнаружен как компонент, необходимый для созревания Cox cbb₃-типа у грамотрицательных факультативных фототрофов *R. capsulatus* [29]. Однако в работах с *Rhodobacter sphaeroides*, близким родственником *R. capsulatus*, показали, что CsoA предназначен исключительно для биогенеза Cox cbb₃-типа, но не требуется для aаз – Cox aаз-типа [30]. Консервативные мотивы M(X)₃M и H(X)₃M, расположенные в трансмембранных спиралях транспортера, важны для связывания и переноса ионов меди [31].

Транспортер RfnT, также относящийся к семейству CalT, способен переносить ионы Cu(II) через внутреннюю мембрану в цитоплазму [32]. Однако данный белок не может полностью функционально заменить CsoA как компонент, необходимый для созревания Cox cbb₃-типа у *R. capsulatus*. Несмотря на то, что ионы Cu(II) переносятся как через CsoA, так и через RfnT, дальнейший путь ионов Cu(II) определяется функциональным взаимодействием транспортера с последующими медь-связывающими белками.

1.2.3. Медь в цитоплазме

После переноса транспортерами через внутреннюю мембрану ионы Cu(II) оказываются в цитозоле, где среда является более восстановительной по сравнению с периплазматическим пространством, что способствует восстановлению ионов до состояния Cu(I). Охарактеризованные цитоплазматические медь-запасующие белки и белки-экспортеры внутренней мембраны предпочтительно связывают ионы Cu(I). Возможно, что эволюционно механизмы связывания и транспорта ионов меди были образованы до появления кислорода, когда вся медь находилась в восстановленном

состоянии. В связи с чем, эти системы первоначально были необходимы клеткам для устранения негативных эффектов от воздействия ионов Cu(I), а позже уже перестроились для функционирования в аэробных условиях [1]. В цитозоле имеются химические восстановители, такие как глутатион (GSH), цистеин и аскорбиновая кислота, а также неспецифические металлоредуктазы, которые способны восстановить Cu(II) [33,34].

Первой установленной специфичной редуктазой ионов меди является CsoG из *R. capsulatus*, которая первоначально была охарактеризована как фактор сборки Sox cbb₃-типа [35]. CsoG является мембранным белком, содержащим два железо-серных кластера [4Fe-4S] и два сайта связывания меди с участием 4 остатков Cys. Помимо участия в сборке медного центра Sox cbb₃-типа, CsoG может передавать ионы Cu(I) цитозольным медным шаперонам и медным экспортерам.

Одним из самых изученных цитоплазматических металлошаперонов является белок CopZ, который широко распространен у бактерий. Этот небольшой белок с молекулярной массой около 7-8 кДа связывает ион Cu(I) в консервативном мотиве MHCXXC и обладает высокой аффинностью к ионам Cu(I) с $\log K_D = - (17 - 18)$ [36]. Такая высокая аффинность крайне важна для уменьшения концентрации свободных токсичных ионов Cu(I) в клетке. При высокой концентрации ионов Cu(I) может происходить димеризация CopZ, в результате чего образуется четырехъядерный медный комплекс в стехиометрии Cu₄(CopZ)₂ [37]. Физиологическая роль образования подобного комплекса, скорее всего, заключается в быстром снижении концентрации ионов Cu(I) при стрессе, вызванном избытком ионов меди. Часто в геноме бактерий ген CopZ располагается в одном опероне с генами cue-системы, экспортирующей ионы меди из цитоплазмы, что свидетельствует о их взаимодействии в процессах детоксикации меди [38]. Сходство ферредоксин-подобной укладки CopZ и N-концевого домена АТФазы CopA (из cue-системы) способствует их взаимодействию и обмену Cu(I) [39]. Согласно гипотетической модели, CopZ образует комплекс с экспортирующей медь АТФазой CopA, в котором перенос иона меди с CopZ на CopA происходит с помощью последовательного обмена лигандами (**Рис. 2**) [38,39]. Комплекс CopZ-CopA дополнительно поддерживается электростатическими взаимодействиями между отрицательно заряженной поверхностью CopZ и положительно заряженной поверхностью CopA [38].

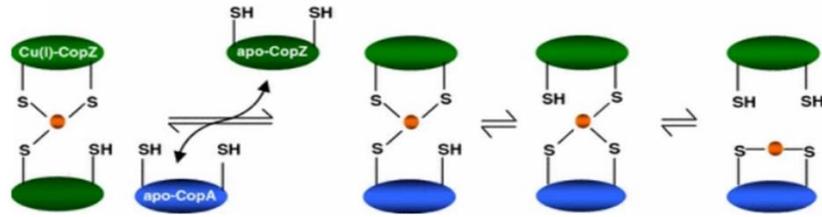


Рис. 2. Предполагаемый механизм переноса Cu(I) от CopZ к CopA [38].

Другим примером металлошаперона является CupA, обнаруженный только у нескольких видов стрептококков [40]. В отличие от CopZ, CupA имеет купредоксин-подобную укладку с биядерным медным кластером, в котором остаток Cys выступает в качестве мостикового лиганда между ионами металла (**Рис. 3, а**) [41]. Один из сайтов связывает ион Cu(I) с высоким сродством ($\log K_D = -16,1$), а другой сайт, обогащённый остатками Met, с более низким сродством ($\log K_D = -13,2$). В сайте с более высоким сродством может связываться также ион Cu(II), который восстанавливается остатками Cys [40].

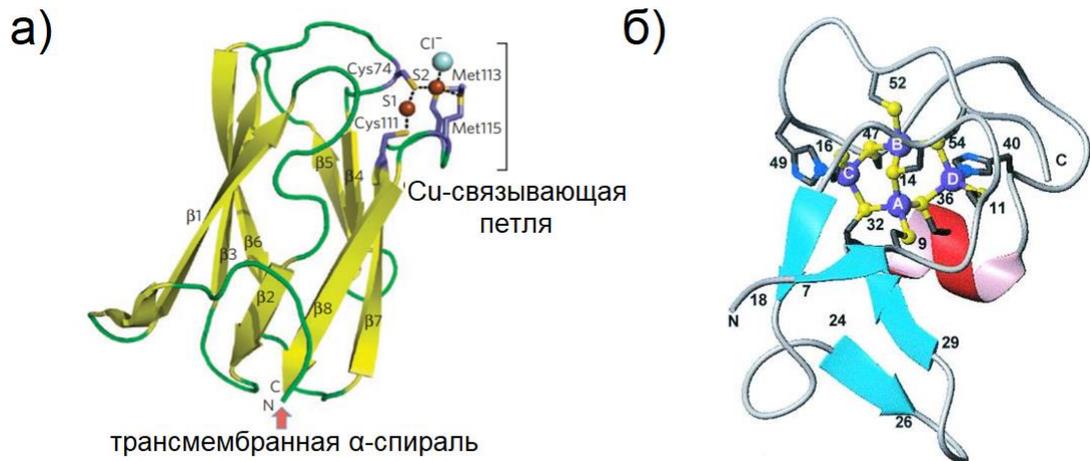


Рис. 3. а) Структура CupA *S. pneumoniae* с 2 ионами Cu(I), изображенными коричневыми сферами [41]. б) Структура SmtA *Synechococcus* PCC 7942 с 4 ионами Zn(II), изображенными синими сферами [42].

Металлотионеины объединены в крупное надсемейство белков с небольшой молекулярной массой, которые содержат много остатков Cys и способны связывать разные ионы металлов, в том числе ионы Cu(I) ($\log K_D = -15,4$) [43]. Функцией этих белков является детоксикация тяжелых металлов, регуляция метаболизма микроэлементов и защита от окислительного стресса. Металлотионеины широко распространены у эукариот, а у прокариот они встречаются редко. Впервые такой белок SmtA был охарактеризован у цианобактерии *Synechococcus* sp. [44]. У металлотионеина SmtA остатки Cys и His

формируют полость, где связываются четыре иона Zn(II) в $(Zn)_4(Cys)_9(His)_2$ кластере (**Рис. 3, б**). *In vitro* было доказано, что SmtA способен связывать также и Cu(I), однако, его роль в детоксикации меди в физиологических условиях не изучена.

До открытия цитоплазматических Cspс (Cu-storage proteins) было принято считать, что прокариотическая клетка не запасает медь из-за ее токсичности. Впервые Cspс были идентифицированы у метанотрофа *Methylosinus trichosporium* [45]: они после синтеза транспортируются в периплазму и участвуют в биогенезе медь-зависимой метанмонооксигеназы (pMMO). Однако позже был охарактеризован цитозольный тетрамерный белок Csp3, содержащий большое количество остатков Cys, связывающих около 80 ионов Cu(I) [46]. Структурные исследования гомологичного периплазматического Csp1 показали, что белок является тетрамером, мономер которого состоит из четырех α -спиралей (**Рис. 4, а**). 13 остатков Cys в каждом мономере направлены в центральную полость пучка спиралей, и ни один из них не образует дисульфидные связи (**Рис. 4, б**) [45]. Cspс обеих групп имеют приблизительно одинаковую аффинность к ионам Cu(I) ($\log K_D = -17$) [45,46]. Однако скорость диссоциации комплекса белков с ионами отличается: высвобождение иона Cu(I) из комплекса с периплазматическим Csp1 *in vitro* с помощью хелаторов происходит значительно быстрее, чем в случае с цитозольным Csp3. Цитозольный Csp3 связывает большое количество ионов Cu(I) из цитоплазмы и с достаточно низкой скоростью их освобождает, что подтверждает его физиологическую роль как бактериальной системы хранения ионов меди.

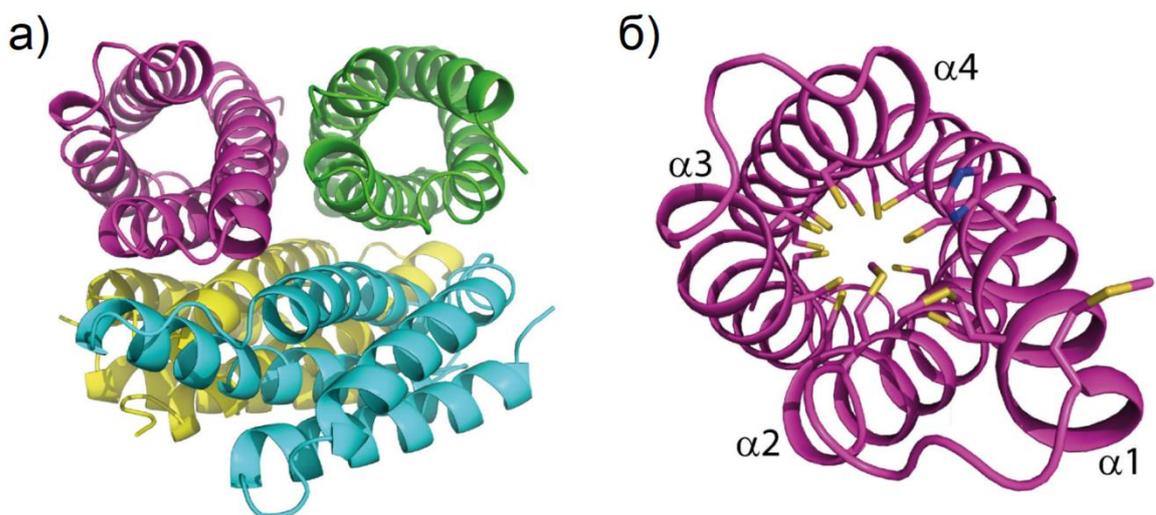


Рис. 4. а) Структура тетрамера апо-Csp1 из *M. trichosporium* [45]. Боковые группы остатков Cys направлены в центральную полость пучка из четырех спиралей и изображены в виде стержней для одного мономера на панели (б).

1.2.4. Экспорт меди через цитоплазматическую мембрану.

Системы экспорта ионов меди из цитозоля играют критическую роль в поддержании необходимой концентрации меди в периплазме для встраивания в активный центр медных ферментов, а также в удалении избытка из цитоплазмы. Наиболее изученными системами экспорта в периплазму у грамотрицательных бактерий являются *cue-* (Cu efflux), *cus-* (Cu sensing) и *cop/pco-* (copper resistance/plasmid-borne copper resistance) системы [12,47,48], которые подробно будут рассмотрены в данном разделе.

1.2.4.1. *Cue-*система

*Cue-*система является ключевым участником процесса, обеспечивающего устойчивость бактерий к высоким концентрациям меди в анаэробных и аэробных условиях [48]. *Cue-*система состоит из АТФазы Р-типа *CopA*, транспортирующей ион Cu(I) из цитозоля в периплазматическое пространство, и периплазматической мультимедной оксидазы *CueO*, окисляющей токсичный ион Cu(I) до менее токсичной формы Cu(II) [49,50]. Экспрессия этих белков регулируется белком *CueR*, реагирующим на уровень Cu(I) в цитоплазме [49,51]. Регулятор *CueR* крайне чувствителен к свободным ионам Cu(I) ($\log K_D \sim -21$, что намного меньше одного атома на клетку) [51].

АТФаза *CopA* состоит из мембранного М-домена и трех больших цитоплазматических доменов: N-домена, Р-домена и А-домена. N-домен или нуклеотид-связывающий домен способен связывать АТФ, что приводит к фосфорилированию остатка Asp Р-домена, домена фосфорилирования. Фосфорилирование вызывает конформационные изменения А-домена (актуаторный домен), что приводит к переносу Cu(I) через мембрану. Два сайта связывания иона Cu(I) , один из которых образован двумя остатками Cys и остатком Tug, а второй – остатками Asn, Met и Ser, располагаются в трансмембранной области М-домена у *CopA* из бактерий *Archeoglobus fulgidus* и *E. coli* [52]. Cu(I) связывается в обоих сайтах *CopA* в фемтомолярных (10^{-15} М) концентрациях, что предотвращает высвобождение Cu(I) перед переносом. Также у большинства бактериальных *CopA* имеется один или два сайта связывания иона Cu(I) на N-конце А-домена. N-конец имеет ферредоксинподобную укладку с консервативным мотивом CXXC [1,39]. В некоторых случаях, на С-конце также присутствует дополнительный сайт связывания иона Cu(I) , который, как предполагается, участвует в регуляции. Была предложена следующая модель транспорта иона Cu(I) из цитоплазмы посредством *CopA* [53]. Сначала ион Cu(I) связывается в петле второй трансмембранной спирали М-домена *CopA* и координируется в промежуточном сайте триадой остатков Met, Glu и Asp. При

фосфолировании Р-домена ион Cu(I) переносится в вышеупомянутые сайты мембранной части М-домена, а последующее дефосфолирование Р-домена вызывает высвобождение связанного иона в периплазму. Положительно заряженные остатки, локализованные в петле второй спирали М-домена, обеспечивают электростатическое взаимодействие с потенциальным донором ионов меди в цитоплазме.

Роль сайтов связывания иона Cu(I) на N-конце А-домена в механизме экспорта меди АТРазой *CopA* еще обсуждается. При низкой концентрации меди в цитоплазме эти сайты взаимодействуют с N-доменом, что подавляет гидролиз АТФ [54]. При высокой концентрации меди сайты на N-конце связывают Cu(I) от *CopZ* и не препятствуют протеканию реакции гидролиза АТФ. Таким образом, эти сайты выступают в роли сенсора ионов меди и регулируют потоки экспорта ионов меди из цитоплазмы.

В периплазме *CopA*, вероятно, отдает ион Cu(I) медь-связывающим белкам, например, белку *CusF*, являющемуся частью *cus*-системы [55]. Помимо этого, *CopA* способен передавать ион Cu(I) периплазматической мультимедной оксидазе *CueO*.

Второй компонент *cue*-системы, оксидаза *CueO*, катализирует окисление полученных от *CopA* ионов Cu(I) [50]. Активный центр *CueO* состоит из моноядерных Т1, Т2 и биядерного Т3 медных центров. Сайт Т1 катализирует окисление ионов Cu(I) , в то время как сайты Т2 и Т3 образуют трёхядерный центр, в котором происходит четырехэлектронное восстановление молекулярного кислорода. *CueO* отличается от других представителей семейства мультимедных оксидаз наличием дополнительной богатой остатками Met спирали, которая блокирует доступ растворителя к сайту Т1 и образует дополнительный сайт связывания меди [50].

1.2.4.2. *Cus*-система

Система экспорта *Cus*, обеспечивающая устойчивость грамотрицательных бактерий к высокой концентрации ионов меди, хорошо охарактеризована у *E.coli* [55]. Система состоит из четырех белков *CusABCF*, которые располагаются на цитоплазматической мембране, в периплазме и на внешней мембране (**Рис. 5**). *CusA* – трансмембранный белок внутренней мембраны, *CusB* – периплазматический белок, который соединяет *CusA* и *CusC*, а *CusC* является трансмембранным белком на наружной мембране. Эти белки кодируются в одном опероне с периплазматическим белком *CusF* [55].

Недостаток кислорода, вероятно, может снижать активность мультимедной оксидазы *CueO* в периплазме и эффективность ранее описанной *cue*-системы в целом, что делает функционирование *cus*-системы в процессах детоксикации меди критически важным в анаэробных условиях [56]. Также функционирование *cus*-системы представляется крайне

значимым в присутствии избытка ионов Ag(I) , поскольку ионы Ag(I) могут также снижать активность CueO . Авторы предполагают [57], что *cus*-система участвует в процессе удаления ионов Ag(I) и при этом предотвращает снижение активности *cue*-системы в аэробных условиях.

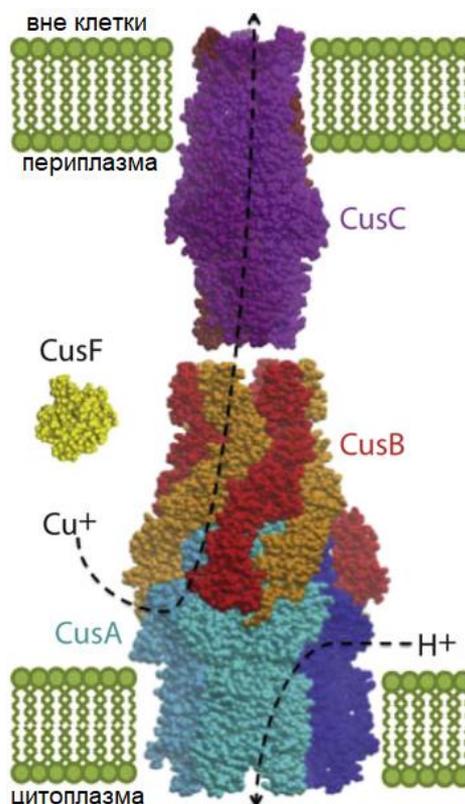


Рис. 5. Схематичное изображение *cus*-системы [55]. CusA и CusC, транспортеры внутренней и внешней мембран, являются тримерами. Периплазматический белок CusB представляет собой гексамер, а CusF – мономер. Пунктирной линией показан поток иона Cu(I) по *cus*-системе.

Антипортер семейства RND (resistance, nodulation and cell division) CusA, расположенный на внутренней мембране и транспортирующий ион Cu(I) за счет протон движущей силы, является центральным компонентом *cus*-системы [55]. CusA представляет собой гомотример, каждый мономер которого состоит из 12 трансмембранных спиралей. Важной для функционирования белка является триада консервативных остатков Met, расположенных в одном из периплазматических доменов CusA и связывающих ион Cu(I) . Связывание иона Cu(I) в центре CusA приводит к конформационным изменениям, что способствует, вероятно, движению иона по остаткам Met внутри канала в направлении к CusB (**Рис. 5**) [55].

Сокристаллизация комплекса CusA и CusB показала, что гомотример CusA взаимодействует с 6 молекулами CusB, соединенными в воронкообразную структуру, которая образует непрерывный канал транспорта иона Cu(I). На N-конце CusB располагается триада остатков Met, где, по-видимому, связывается ион Cu(I) из периплазмы, который доставляется, к примеру, CusF [55].

CusC является гомотримером, что типично для экспортных насосов наружной мембраны [55]. В структуре CusC не было найдено специфичных мотивов, способных связывать ион Cu(I), но внутренняя поверхность канала имеет множество отрицательно заряженных аминокислотных остатков, что способствует переносу положительно-заряженного иона.

CusF – небольшой периплазматический белок, который доставляет ион Cu(I) к CusB для транспорта во внеклеточную среду. CusF представляет собой β -бочонок из 5 β -слоев. В сайте связывания CusF ион Cu(I) координируется остатком His и двумя остатками Met, направленными внутрь полости β -бочонка. В координации связанного иона также участвует остаток Trp, функция которого возможно связана с защитой иона Cu(I) от окисления. Помимо выше упомянутого связывания CusF с CusB, больше половины периплазматического пула CusF взаимодействует с АТФазой CopA [58]. Таким образом, CusF является важным звеном в процессе удаления избытка меди из клетки.

1.2.4.3. Cop/рсо-система

Cop/рсо-система обычно состоит из семи белков CopABCDERS, находящимися в одном опероне [12]. CopA – это периплазматическая мультимедная оксидаза со схожей функцией, как у CueO. CopB и CopD – это транспортеры, находящиеся на внешней и внутренней мембране, соответственно. CopC представляет собой периплазматический медь-связывающий металлошаперон, а CopE связывает несколько ионов Cu(I) с $\log K_D \sim -12$ и, предположительно, способствует снижению концентрации меди при медном стрессе. CopRS – медь-чувствительные белки-регуляторы оперона. Белки PcoABCDE гомологичны белкам CopABCDE.

Предполагаемая физиологическая роль cop/рсо-системы была установлена в экспериментах с мутантными штаммами бактерий с делецированными генами белков системы в разных комбинациях [47]. Нокауты отдельных белков cop-системы приводили к фенотипу с повышенной чувствительностью к ионам меди, поэтому было предложено, что четыре белка CopABCD работают согласованно в процессе детоксикации избытка меди (Рис. 6). Однако сверхэкспрессия CopCD в отсутствие CopAB привела к гиперчувствительности клетки к меди, в связи с чем предположили, что CopCD

функционирует как импортер ионов Cu(II) в цитоплазму совместно с CopC [59]. Таким образом, полное понимание о взаимодействии белков cop/pco -системы и их физиологической функции еще не было достигнуто.

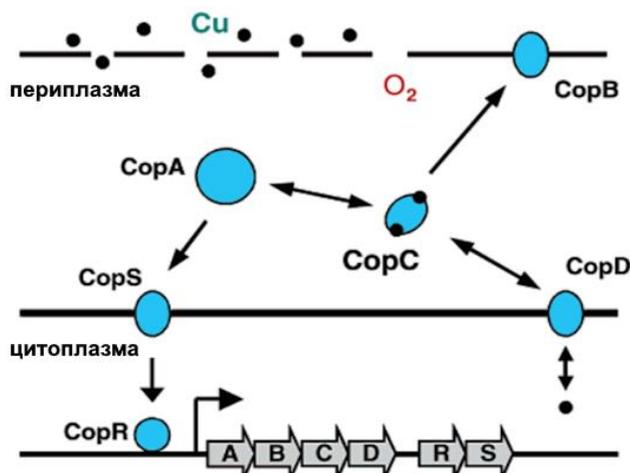


Рис. 6. Схема взаимодействия белков cop -системы в гомеостазе ионов меди [60].

Наиболее изученным белком cop -системы является периплазматический медь-связывающий белок CopC . На основании биоинформатического исследования [61], семейство CopC разделили на четыре типа: CopC типа C_{1-1} имеет два пространственно разделенных сайта связывания ионов Cu(I) и Cu(II) (частота встречаемости в бактериальных геномах – 10,8%), CopC типа C_{0-1} имеет один сайт связывания иона Cu(II) (частота встречаемости – 84,3%), CopC типа C_{1-0} имеет один сайт связывания иона Cu(I) (частота встречаемости – 0,2%), CopC типа C_{0-0} (частота встречаемости – 4,8%) не имеет медь-связывающих сайтов. На данный момент были выделены и охарактеризованы только CopC типа C_{1-1} и C_{0-1} , которые мы рассмотрим подробнее.

CopC типа C_{1-1} , охарактеризованный раньше других представителей семейства [60], находится часто в геноме в плазмидном опероне copABCD [61]. Предполагаемая функция CopC типа C_{1-1} заключается в переносе ионов $\text{Cu(I)}/\text{Cu(II)}$ к транспортерам на внешней мембране или к мультимедной оксидазе CopA , которая окисляет Cu(I) . Из структурных данных следует, что ион Cu(I) у CopC типа C_{1-1} связывается в петле, обогащенной остатками Met (Рис. 7, а), с $\log K_D = - (12 - 13)$ [62], а ион Cu(II) координируется амино- и имидазольной группами N-концевого остатка His , еще одним остатком His и молекулой воды (Рис. 7, а) с $\log K_D = - (13,5 - 13,7)$ [60,63]. Окисление Cu(I)-CopC_{1-1} или восстановление Cu(II)-CopC_{1-1} вызывало перемещение меди из одного сайта в другой, которые находятся приблизительно на расстоянии 30 Å друг от друга [60].

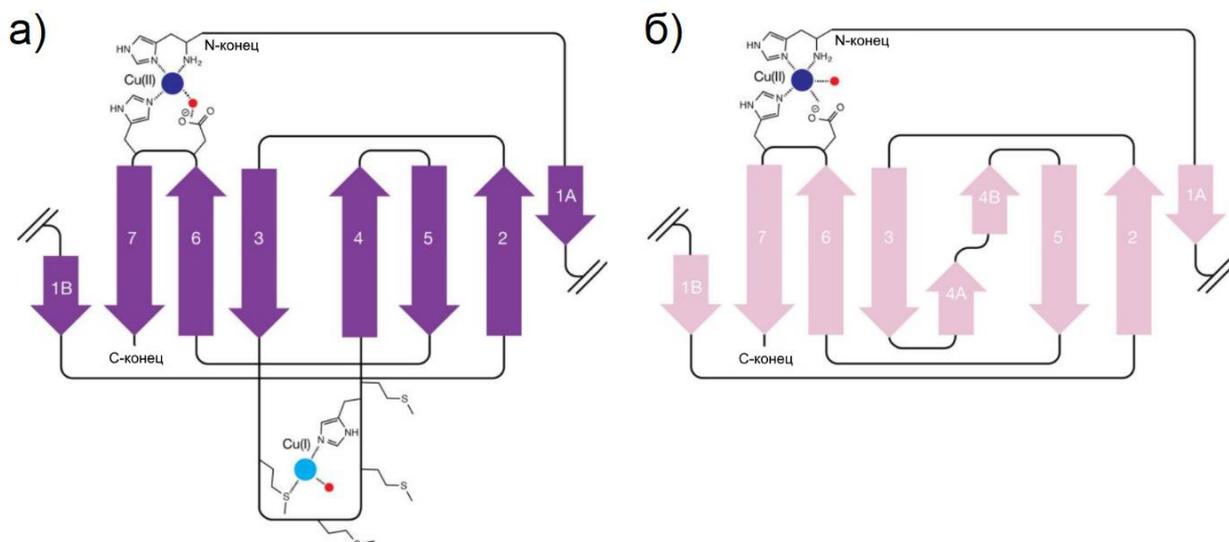


Рис. 7. Топологические диаграммы белка CopC типа а) C_{1-1} и б) C_{0-1} [61]. Ионы Cu(II) и Cu(I) показаны синими и голубыми сферами, соответственно. Молекула воды показана красными сферами.

CopC типа C_{0-1} содержит сайт связывания только иона Cu(II) и полностью лишён консервативных остатков Met сайта связывания Cu(I) (Рис. 7, б). Мотив, координирующий ион Cu(II) с участием амино- и имидазольной групп N-концевого остатка His и двух аминокислот консервативного мотива DXH, был назван мотивом «гистидиновая скрепка» [64] и характеризуется высоким сродством к ионам Cu(II) с $\log K_D = - (15 - 17)$ [65]. Также было показано, что мотив «гистидиновая скрепка» может связывать и ион Cu(I), но с меньшим сродством $\log K_D = - (5 - 6)$ [64].

В отличие от генов CopC типа C_{1-1} , гены CopC типа C_{0-1} находятся часто в одном опероне только с геном CopD без других белков сор-системы и являются хромосомными, а не плазмидными [61]. Более того, белки CopC и CopD, участвующие в импорте меди в цитоплазму, могут быть объединены в одну полипептидную цепь в геномах многих бактерий [61,66]. Предполагается, что CopC и CopD могут импортировать Cu(II) в цитоплазму для взаимодействия с медь-чувствительными транскрипционными факторами [61]. Например, ионы Cu(II), импортируемые одним белком CopCD – YcnJ у *Bacillus subtilis*, связываются с регулятором CsoR, который индуцирует экспрессию АТФазы CopA из сие-системы [67]. Также у *E. coli* ионы Cu(II), поступающие через CopD, связываются с факторами транскрипции CueR [51] и ComR [26], которые активируют экспрессию CopA и белка наружной мембраны ComC, снижающего проницаемость внешней мембраны для ионов Cu(II). Медь, импортируемая системой CopCD, может также использоваться для сборки активного центра медных ферментов. Часто рядом с генами CopCD располагаются гены, кодирующие другие периплазматические шапероны, гомологичные ScoI, PcuC и YcnI

[61] и участвующие в сборке Sox, а также гены медных ферментов, к примеру, ген медного фермента метанмонооксигеназы рММО [68]. В целом, функция CopC в качестве металлошаперона изучена недостаточно. Лишь для медь-связывающего белка YobA, гомологичного CopC, было показано, что он необходим для доставки меди к НАДН-дегидрогеназе типа II и/или другим мембранным белкам [69].

Подавляющее большинство генов, кодирующих CopC, не входят в состав канонического оперона copABCD, участвующего в механизмах устойчивости к меди, а геномное окружение этих генов весьма вариативно. В связи с чем, спектр физиологических функций семейства CopC может быть более разнообразным, чем только участие в процессах детоксикации меди (**Рис. 6**), предполагаемое ранее.

Таким образом, ион Cu(II) попадает из окружающей среды сначала в периплазматическое пространство грамотрицательной бактерии с помощью механизмов пассивного и активного транспорта. В периплазме ион Cu(II) может связываться с медными шаперонами и низкомолекулярными лигандами. Из периплазмы ион Cu(II) переносится в цитоплазму, где происходит восстановление до иона Cu(I). В цитоплазме ион Cu(I) связывается с белками-регуляторами, влияющими на экспрессию медных белков, с цитоплазматическими медными шаперонами и медь-запасующими белками. Для грамотрицательных бактерий описано три системы, экспортирующие медь в периплазму и во внеклеточное пространство. Встраивание ионов меди в активный центр медных ферментов, локализованных у грамотрицательных бактерий в мембране и в периплазме, происходит в периплазме и следующий раздел будет посвящен изученным механизмам сборки медных центров.

1.3. Сборка медных центров ферментов *in vivo*

В клетке рибосомы, находящиеся в цитоплазме, синтезируют белки. Если аминокислотная последовательность новосинтезированных полипептидов включает сигнальную последовательность, узнаваемую транспортными системами, то белок переносится в определенный клеточный компартмент или во внеклеточное пространство. Фолдинг полипептида может происходить либо сразу на рибосоме во время трансляции, либо в цитозоле, когда происходит полное освобождение синтезированного белка, либо после переноса белка к конечному месту локализации. У бактерий существуют два основных пути секреции белков через цитоплазматическую мембрану – Sec- и Tat-системы [70]. Считалось, что Sec-система переносит развернутые белки в периплазму, где они сворачиваются и приобретают кофактор, а Tat-система переносит уже свернутые белки с кофактором. Но это правило соблюдается не всегда, в частности, у грамотрицательных

бактерий медь-содержащие ферменты связывают медь только в периплазматическом пространстве [12–14], независимо от их пути транслокации.

Как уже обсуждалось выше, клетка старается снизить содержание свободной меди, однако это затрудняет процесс доставки ионов металла к медным ферментам. Для повышения эффективности этого процесса существует класс белков – металлошапероны, которые участвуют во встраивании ионов меди в активный центр ферментов. Металлошапероны по своей структуре очень разнообразны. Среди них обнаружены как небольшие белки с одним доменом, так и белки с несколькими доменами, а также растворимые или прикрепленные к мембране.

Медные ферменты у грамотрицательных бактерий локализованы на мембране или в периплазматическом пространстве, и встраивание ионов меди в их активный центр происходит в периплазме [12–14]. При высокой концентрации в периплазме ионы меди, вероятно, могут встраиваться непосредственно в активный центр медных ферментов. Однако в физиологических условиях низкой доступности меди встраивание ионов меди в активный центр медных ферментов зависит от функционирования импортеров меди в цитоплазму (пула меди из окружающей среды), цитоплазматических металлошаперонов и экспортеров меди из цитоплазмы в периплазму (пула меди из цитоплазмы) и периплазматических металлошаперонов. В случае мультимедной оксидазы CutO наиболее выраженное снижение ферментативной активности наблюдалось у штаммов бактерии, лишенных цитоплазматического металлошаперона CopZ или экспортирующей медь из цитоплазмы АТФазы CopA [71]. Снижение активности Sox sbb₃-типа наблюдалось при нокауте гена транспортера SsoA, импортирующего ионы Cu(II) из периплазмы в цитоплазму, и транспортера SsoI, экспортирующего ионы Cu(I) обратно из цитоплазмы [29,72]. Встраивание ионов меди в активный центр NosZ зависит от TonB-зависимого рецептора NosA на внешней мембране [23] и АТФазы CtpA на внутренней мембране, экспортирующей ионы Cu(I) из цитоплазмы [73]. Все это свидетельствует об участии во встраивании в активный центр медных ферментов эквивалентов меди из цитоплазмы, которые переносят АТФазы. Таким образом, ионы Cu(II) сначала из периплазмы переносятся в цитоплазму, где восстанавливаются и переносятся обратно в периплазму и только после этого встраиваются с помощью металлошаперонов в конечные мишени – ферменты. Подобный обходной маршрут является одним из самых загадочных явлений метаболизма меди.

В данном разделе будут рассмотрены уже охарактеризованные процессы сборки медных центров у грамотрицательных бактерий, происходящие в периплазме. Лишь в некоторых случаях будут рассмотрены примеры встраивания ионов меди в медные

ферменты с помощью металлошаперонов у грамположительных бактерий и эукариот, в связи с их большей изученностью.

1.3.1. Сборка медных центров CuA и CuB цитохром с оксидазы (Cox)

Цитохром с оксидаза (Cox) – фермент дыхательной цепи, расположенный на цитоплазматической мембране бактерий или на внутренней мембране митохондрий эукариот. Cox принимает электроны от цитохрома с и передает их на молекулярный кислород, что сопровождается транслокацией протонов и синтезом АТФ [74,75]. Общий состав субъединиц Cox различаются у разных организмов, но необходимые для катализа интегральная мембранная субъединица I (CoxA) и закреплённая в мембране субъединица II (CoxB) высоко консервативны. Электрон от цитохрома с переносится на биядерный медный центр CuA субъединицы CoxB, затем на низкоспиновый гем а и в итоге на высокоспиновый гем а₃ с CuB центр субъединицы CoxA, где происходит восстановление O₂ до H₂O [76]. Встраивание медных центров в молекулу Cox представляет собой сложный процесс, который включает несколько участников.

Металлошапероны бактерий, участвующие в биогенезе CuA и CuB центров Cox *in vivo*, такие как ScoI [77], PcuC [78] и Cox11 [79], находятся в периплазме. Нокауты генов ScoI и PcuC приводили к значительному снижению активности Cox [66], которую можно было восстановить добавлением высоких концентраций меди. Таким образом, участие металлошаперонов ScoI и PcuC особенно важно при физиологически низких концентрациях меди [66,80]. По структуре и функциям эти белки гомологичны эукариотическим, что неудивительно, учитывая бактериальное происхождение митохондрий. Стоит отметить, что в бактериальном геноме гены взаимодействующих белков ScoI и PcuC не всегда находятся рядом с друг другом или с генами Cox [81]. Они могут располагаться в одном кластере с генами, кодирующими NosZ, нитритредуктазы, белки гомеостаза меди или белки с неизвестными функциями. Более того, гомологи ScoI и PcuC были обнаружены у бактерий, которые не содержат центры CuA [82].

Подробный биохимический и структурный анализ комплексов периплазматического домена субъединицы CoxB у Cox aa₃-типа и металлошаперонов из бактерии *Bradyrhizobium diaoefficiens* позволил сформулировать механизм сборки CuA центра [13]. Центр CuA - биядерный медный центр со смешанной валентностью [Cu^{1.5+}:Cu^{1.5+}], где электрон делокализован между соседними ионами меди [83,84]. Ионы меди связываются консервативным мотивом H(X)₃₄CXEXC(X)₃H(X)₂M (Рис. 8, а). Два остатка Cys в CuA центре должны быть в восстановленном состоянии, чтобы ионы меди могли встраиваться.

Восстановление остатков Cys осуществляет мембраносвязанная тиоредоксин-подобная редуктаза (TrpA), содержащая мотив CVPC в активном центре [85].

Металлошаперон ScoI (или Sco) также прикреплен к цитоплазматической мембране и имеет тиоредоксин-подобную укладку с консервативным медь-связывающим мотивом $C(X)_3C...H$ (Рис. 8, б) [86–88]. У бактерии *B. dizoefficiens* перед связыванием с ионом меди окисленные остатки Cys ScoI восстанавливаются также с помощью TrpA [89]. В организмах, где TrpA отсутствует, восстановление дисульфидных связей может выполнять сам ScoI [90]. Для белков ScoI из разных бактерий было показано как связывание только иона $Cu(II)$, так и связывание обоих ионов $Cu(II)/Cu(I)$ в одном сайте. Сродство белков ScoI к ионам $Cu(II)$ было оценено в диапазоне $\log K_D = - (9 - 18)$, а к ионам $Cu(I)$ - $\log K_D = -6$ [91,92].

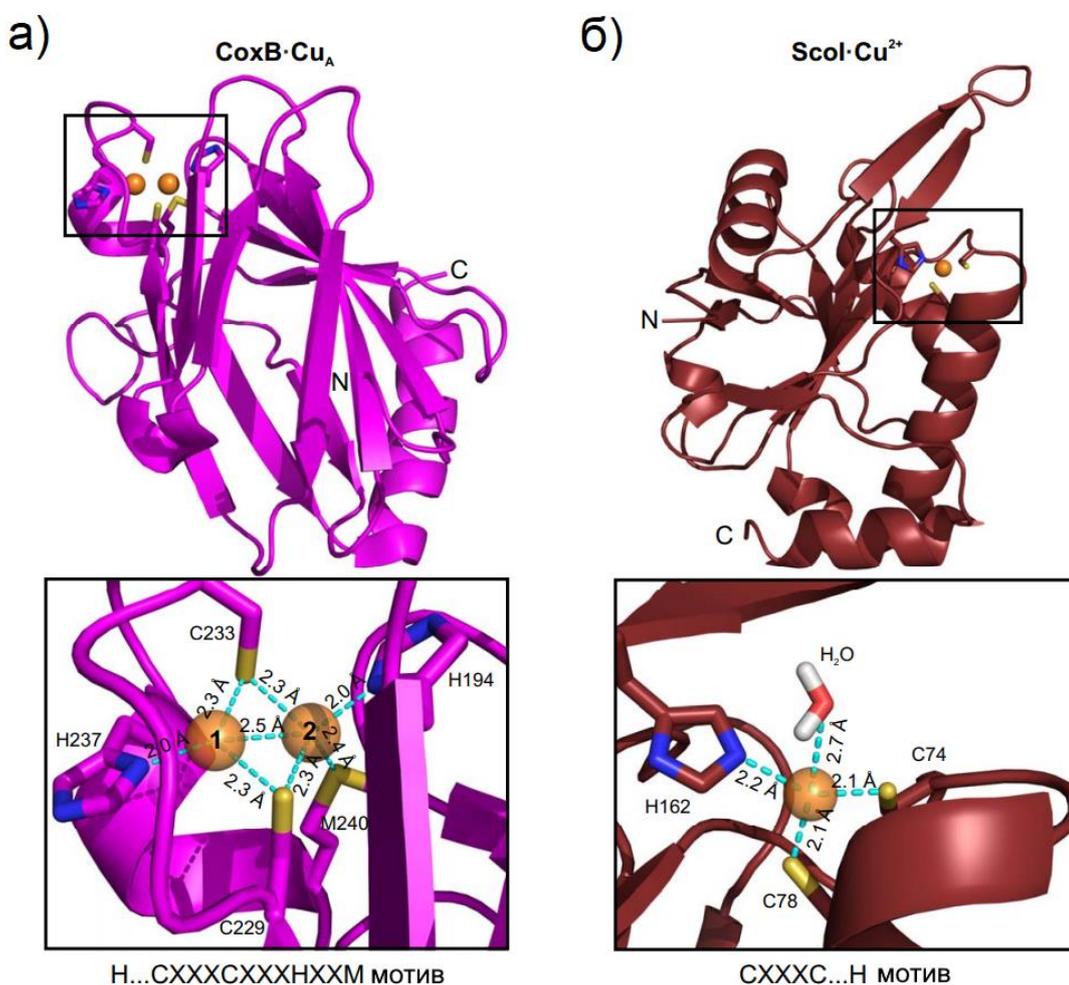


Рис. 8. Структуры а) периплазматического домена субъединицы SoxB с центром CuA и б) периплазматического домена ScoI со связанным ионом $Cu(II)$ [13]. Остатки, координирующие ионы меди, показаны в виде стержней. Координационные связи между ионами меди и остатками обозначены пунктирными линиями.

В отличие от белков ScoI, медный шаперон PcuC (или PCu_AC) является растворимым периплазматическим белком с укладкой по типу купредоксина и консервативным мотивом H(X)₆M(X)₂₁NXM [93], где связывается ион Cu(I) с высоким сродством $\log K_D \geq -16$ [66]. Помимо сайта связывания иона Cu(I), PcuC из бактерии *B. dizoeficiens* имеет сайт связывания иона Cu(II) на С-конце. Хотя многие PcuC-подобные белки имеют С-концевой мотив, богатый His/Met, у некоторых он может отсутствовать [13]. Предполагается, что в организмах, где отсутствует второй шаперон PcuC, ScoI способен выполнять его роль.

Механизм сборки Cu_A центра проходит в несколько этапов (**Рис. 9**).

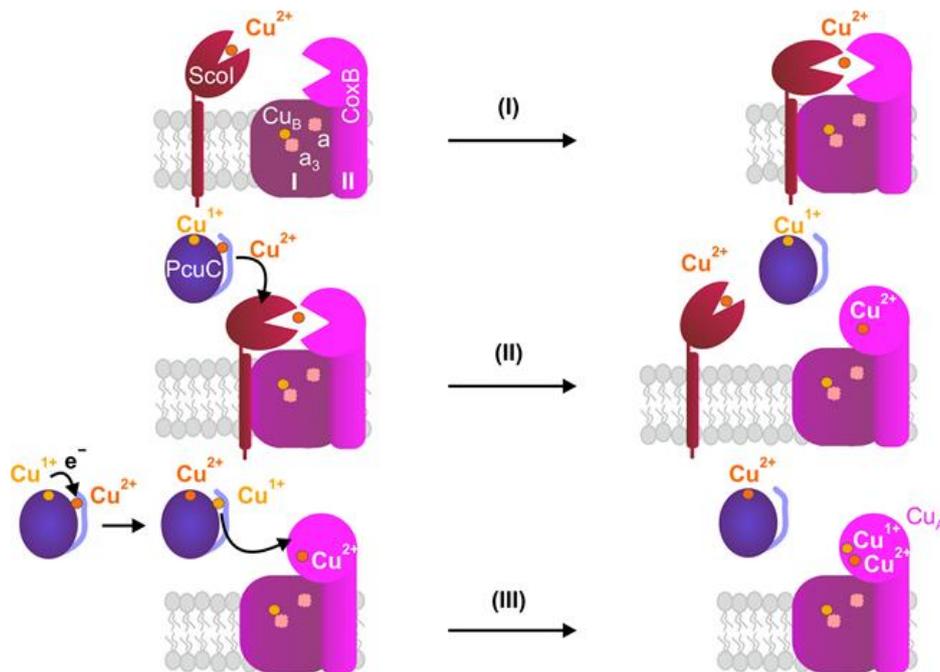


Рис. 9. Схема сборки Cu_A центра субъединицы CoxV аа3-Cox у бактерии *B. dizoeficiens* [13].

На первом этапе быстро формируется стабильный комплекс между Cu(II)-ScoI и апо-CoxV в соотношении 1:1 (**Рис. 9**). В результате образуется промежуточный медный центр с характерными спектральными свойствами, ион меди в котором координирован двумя остатками Cys ScoI и двумя остатками Cys CoxV [13]. На втором этапе происходит диссоциация комплекса ScoI-Cu(II)-CoxV под действием Cu(I)-Cu(II)-PcuC, в результате чего ион Cu(II) из сайта ScoI остается связанным с CoxV, а ион Cu(II) от PcuC из С-концевого участка переносится на ScoI (**Рис. 9**). На третьем и заключительном этапе ион Cu(I) переносится от второго эквивалента Cu(I)-Cu(II)-PcuC к Cu(II)-CoxV, что завершает сборку Cu_A центра. При этом только ион Cu(II)/Cu(I), связанный на С-концевом сайте PcuC, может передаваться на CoxV. Гибкий С-конец также играет важную роль в диссоциации стабильного комплекса ScoI-Cu(II)-CoxV, вероятно, посредством дестабилизации интерфейса комплекса. Авторы также предполагают, что на третьем этапе происходит

внутримолекулярный перенос электрона от иона Cu(I), связанного в сайте $H(X)_6M(X)_{21}NHX$, к иону Cu(II) на C-конце PcuC (**Рис. 9**), в результате чего ион меди на C-конце восстанавливается [13]. Именно поэтому необходимо участие в процессе сборки второго эквивалента Cu(I)-Cu(II)-PcuC, а не образовавшегося на втором этапе Cu(I)-PcuC.

Биогенез CuA центра Cox ba_3 -типа был также исследован у бактерии *Thermus thermophilus* [94]. Было показано *in vitro*, что два эквивалента PcuC встраивали ионы Cu(I) в CuA центр без участия ScoI. ScoI в данном случае выполнял функцию только дисульфидредуктазы для CoxV. Таким образом, существуют вариации в способах сборки CuA центра у разных бактерий.

Важными белками для сборки центров CuA/CuV являются транспортер ScoA, импортирующий ионы Cu(II) в цитоплазму [29], и транспортер ScoI, экспортирующий ионы Cu(I) в периплазму [72]. Нокауты генов этих транспортеров приводят к снижению активности Cox. Несмотря на то, что ионы меди встраиваются в Cox со стороны периплазмы, их доставка зависит от цитозольного буферного пула ионов меди. Возможная причина зависимости сборки медных ферментов от цитозольного медного пула – это необходимость получать восстановленные эквиваленты Cu(I).

В сборке CuV центра, помимо ScoI и PcuC, принимает участие еще один мембраносвязанный шаперон - Cox11 [95]. Периплазматический домен Cox11 имеет иммуноглобулин-подобную укладку с двумя консервативными остатками Cys, образующими сайт связывания иона Cu(I). Считается, что участие Cox11 во встраивании ионов меди связано с необходимостью различать сайты CuV и CuA [96]. Так, многим бактериальным Cox без CuA центра не нужен Cox11 для сборки CuV центра [97], а в этом процессе участвуют белки семейства ScoI [96].

Последовательность созревания Cox, а также роль фактора Cox11, лучше изучена для эукариотических клеток (**Рис. 10**) [98]. В схеме созревания Cox, на первом этапе происходит взаимодействие факторов сборки CuA центра и CuV центра, и на мембране образуется так называемый металлошаперонный модуль (**Рис. 10**). COX17 загружает ионами меди металлошапероны и диссоциирует из комплекса. После чего, к модулю присоединяется COX2 (субъединица Cox, гомолог субъединицы CoxV у бактерий), и происходит сборка CuA центра с участием металлошаперонов SCO1-SCO2 (гомологи ScoI-белков у бактерий). На следующем этапе к металлошаперонному модулю подходит субъединица COX1 (субъединица Cox, гомолог субъединицы CoxA у бактерий), с которой связывается гем а при участии неизвестных факторов. Исследования бактерии *R. sphaeroides* [97] и дрожжевых штаммов [99] с мутацией Cox11 показали, что фрагмент гема a_3 может быть доставлен в CuV центр в отсутствие меди, и в этом процессе важную роль

играет SURF1. И наконец, одновременно происходит формирование центра CuB с помощью металлошаперона COX11 и связывается гем а₃ в субъединице COX1.

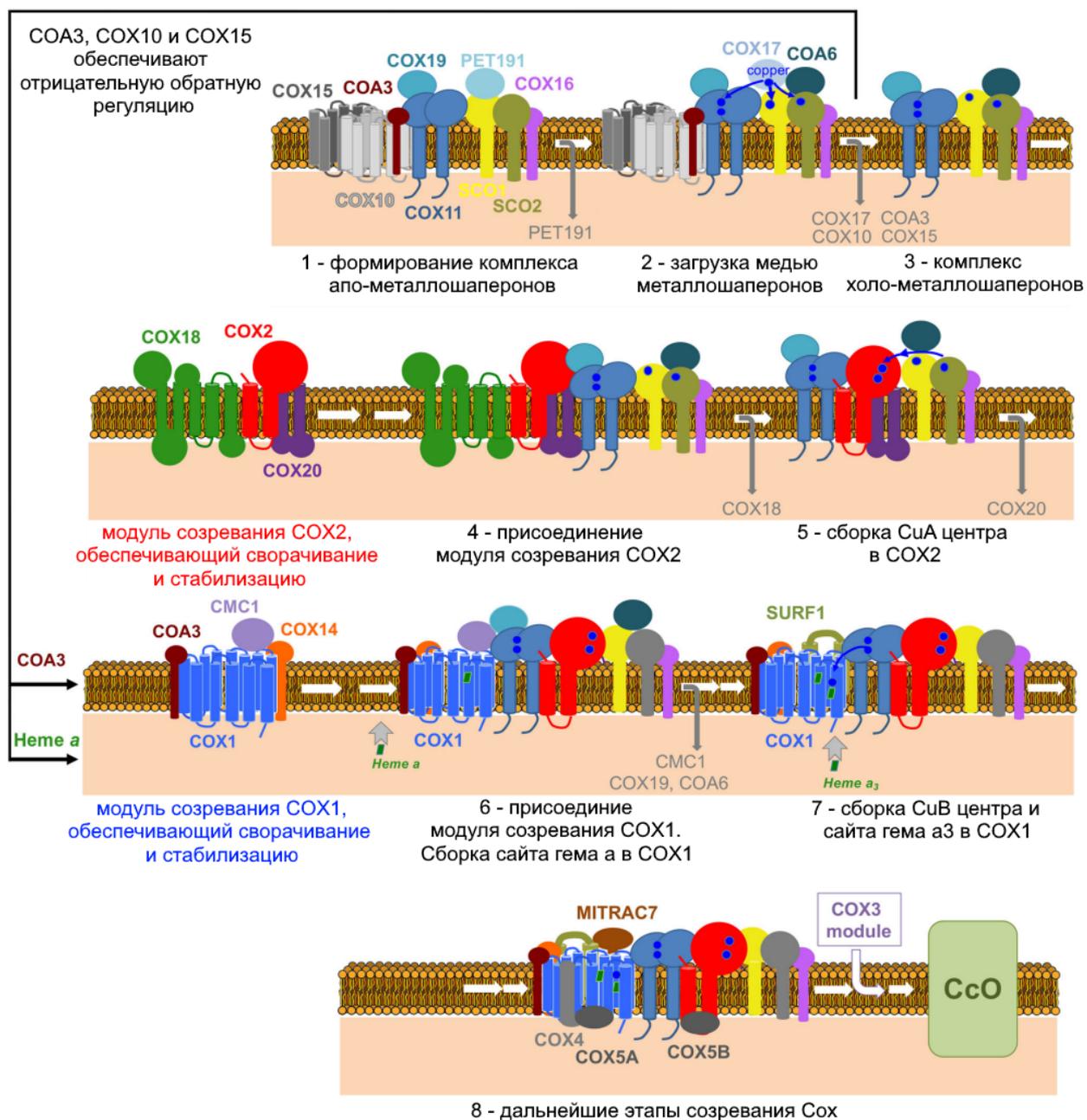


Рис. 10. Последовательность формирования активных центров субъединиц Cox в эукариотических клетках [98].

1.3.2. Сборка медных центров CuA и CuZ N₂O-редуктазы (NosZ)

N₂O-редуктаза (NosZ) – фермент, катализирующий реакцию восстановления парникового газа N₂O до N₂ на последней стадии бактериальной денитрификации. NosZ представляет собой гомодимер, мономеры которого соединяются "голова к хвосту" и содержат два медных центра CuA и CuZ. Центр CuA одного мономера располагается близко

к CuZ кластеру другого мономера, формируя сложный активный центр на границе раздела димера. Основной функцией биядерного медного центра CuA в ходе каталитического цикла (**Рис. 11, а**) является перенос одного электрона на каталитический центр CuZ [100]. Центр CuZ – уникальный среди медных ферментов четырехъядерный медный кластер [4Cu:2S] (**Рис. 11, б**), который связывает и восстанавливает N₂O во время катализа [101].

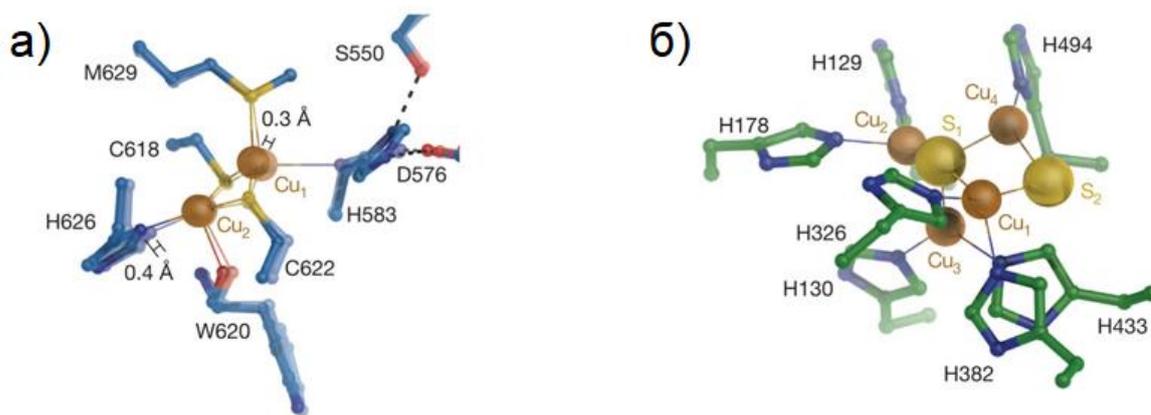


Рис. 11. Медные а) CuA и б) CuZ центры NosZ из бактерии *P. stutzeri* [101].

Сборка медных CuA и CuZ центров NosZ происходит исключительно в периплазме вне зависимости от типа транслокации полипептида по пути Sec или Tat (**Рис. 12**). В процессе встраивания ионов меди в активный центр NosZ участвуют продукты генов, входящие в один генный кластер posRZDFYL вместе с геном, кодирующим NosZ. Гены posDFY кодируют транспортер ABC-типа, состоящий из нескольких субъединиц и критически важный для сборки медных центров NosZ [23,102]. NosF – это цитоплазматическая АТФаза, NosY – интегральная мембранная субъединица транспортера с шестью трансмембранными спиралями, а NosD – медь-связывающий периплазматический белок-переносчик. При мутации генов posDFY происходит полная потеря N₂O-редуктазной активности, добавление внеклеточной меди не приводит к восстановлению активности, а NosZ содержит только центр CuA [23]. Еще одним белком, важным для сборки медных центров NosZ *in vivo*, является закрепленный в мембране медный шаперон NosL, связывающий ион Cu(I) для доставки в апо-NosZ [103,104]. При мутации гена NosL в условиях дефицита меди активность NosZ отсутствовала, причем медь полностью отсутствовала в обоих медных центрах фермента [105]. Добавление меди в среду культивирования мутантных штаммов с делецированным геном NosL приводило к встраиванию CuA сайта, но не центра CuZ [105].

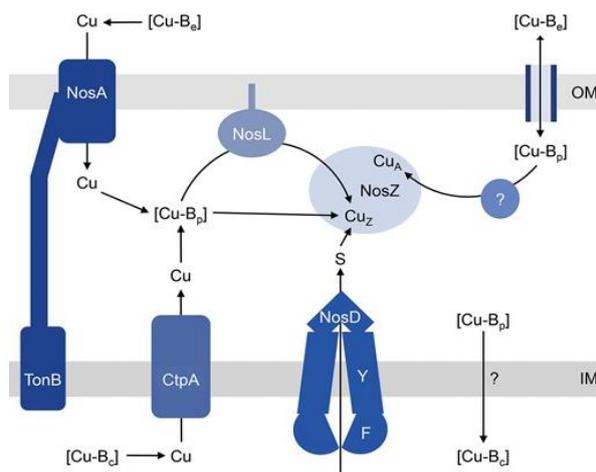


Рис. 12. Схема встраивания ионов меди в центры CuA и CuZ фермента NosZ [10]. [Cu-B_c], [Cu-B_c] и [Cu-B_p] обозначают буферные пулы меди во внеклеточном, цитозольном и периплазматическом компартментах, соответственно.

Растворимый домен NosL связывает один ион Cu(I) с высоким сродством ($\log K_D \sim -17,4$), но не ион Cu(II) [105]. Позднее было установлено, что NosL имеет биядерный смешанный центр Cu(I)-Zn(II), сформированный пятью серосодержащими остатками и одним остатком Asp [104] (**Рис. 13, а, б, стадия покоя**). Ион Zn(II), вероятно, играет структурную роль, заключающуюся в организации и стабилизации N-конца белка и в предотвращении образования внутримолекулярных дисульфидных связей, чтобы обеспечить возможность обратимого связывания иона Cu(I).

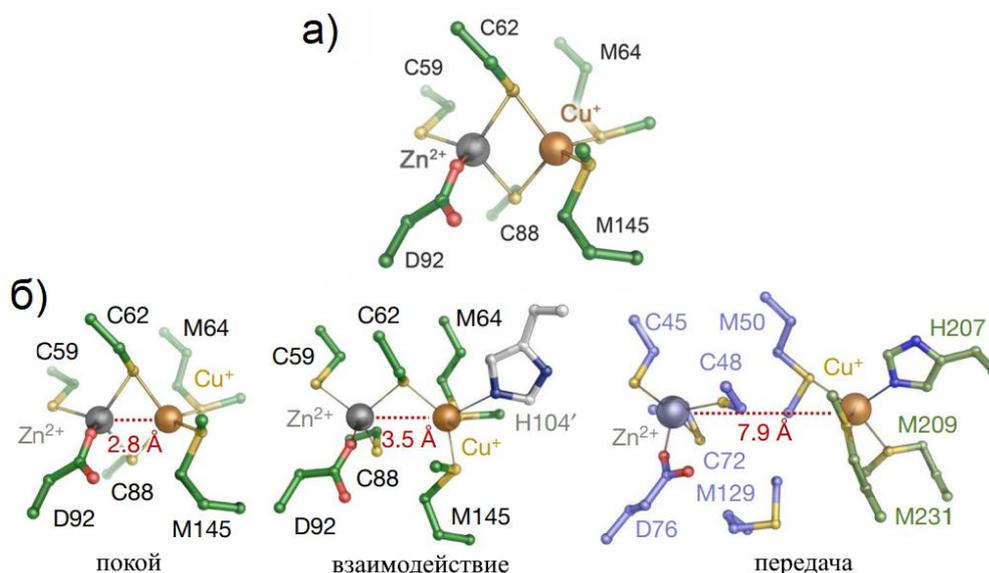


Рис. 13. а) Смешанный сайт Cu(I) - Zn(II) у металлошаперона NosL в состоянии покоя [104]. б) Схема передача иона Cu(I) от NosL через обмен лигандов к NosD [106]. Остатки NosL показаны зеленым цветом на стадиях покоя и взаимодействие, на стадии передача – синим, остаток His NosD на стадии взаимодействие – белым, остаток His NosD на стадии передача – зеленым.

С помощью метода криоэлектронной микроскопии были получены структуры NosDFY и его комплексов с NosL и NosZ из бактерии *Ps. stutzeri*, на основании которых был сформулирован механизм сборки медных центров CuA и CuZ фермента NosZ *in vivo* [106]. Долгое время считалось, что NosL локализован на внешней мембране из-за его сигнального пептида, однако полученные комплексы с транспортером NosDFY, находящимся на внутренней мембране, показали, что NosL должен располагаться на внутренней мембране для осуществления функции. В комплексе NosL и NosD (периплазматическая субъединица транспортера NosDFY) интерфейс взаимодействия включает медь-связывающий сайт NosL и триаду остатков НММ NosD (**Рис. 13, б, стадия взаимодействия**). В отсутствие АТФ наблюдалось перемещение иона Cu(I) из сайта NosL через обмен лигандов в новое положение, где ион координируется триадой НММ белка NosD и остатком M50 шаперона NosL (**Рис. 13, б, стадия передачи**). Такой комплекс остается стабильным до добавления АТФ.

Связывание АТФ NosF запускает конформационную перестройку димера NosY, в результате чего происходит поворот медь-связывающего сайта NosD в сторону от мембраны (**Рис. 14**). Заякоренный на мембране NosL не может следовать за вращением, что приводит к разрушению комплекса NosL - NosD. В новом положении NosD образует комплекс с NosZ, в котором медь-связывающий сайт NosD располагается на расстоянии менее чем 20 Å от CuA и CuZ центров фермента, что позволяет передать ион Cu(I). Последующий гидролиз АТФ в NosF приводит NosD к возвращению в первоначальную конформацию, где триада НММ обращена к мембране, а NosZ не может оставаться связанной с NosD по стерическим причинам и комплекс диссоциирует (**Рис. 14**). Таким образом, NosDFY функционирует как преобразователь механической энергии. Он использует энергию гидролиза АТФ в цитоплазме для изменения конформации субъединицы NosD в периплазме, что необходимо для смены партнера комплекса NosDFY. Пошаговая передача иона Cu(I) от NosL через NosD позволяет в конечном итоге собрать четырехъядерный центр CuZ и биядерный центр CuA. Центру CuZ для функционирования также необходимо встраивание двух сульфид-анионов, поэтому предполагают, что NosDFY также является экспортером серы [106].

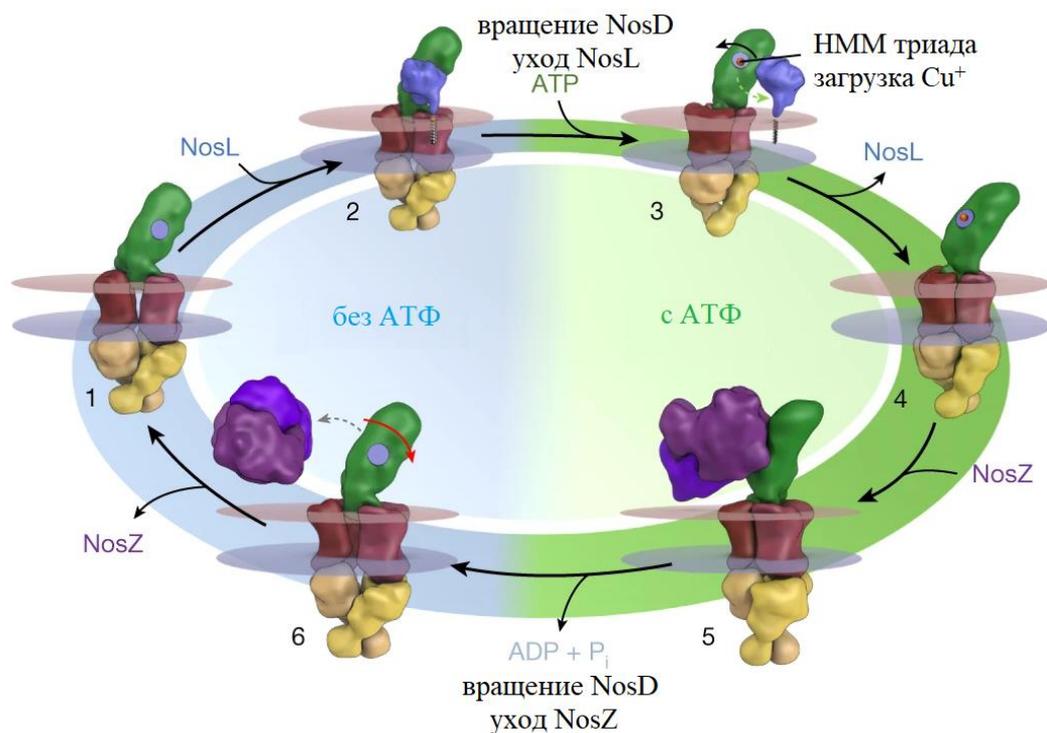


Рис. 14. Схема встраивания иона Cu(I) в апо-NosZ с участием NosDFY и NosL [106].

Другие медные шапероны, такие как PcuC, SenC2 (гомолог ScoI) и Pden_4445 [107], могут компенсировать систему NosDFYL в построении CuA центра, но не CuZ центра, по механизмам сходным со встраиванием CuA в Cox.

В условиях низкой доступности меди активность NosZ может зависеть от TonB-зависимого рецептора NosA [23], а также от АТФазы СтрА, экспортирующей ионы Cu(I) в периплазму [73] (**Рис. 12**). Таким образом, как и в случае с Cox, существует зависимость сборки медного центра NosZ от цитоплазматического пула меди.

1.3.3. Сборка T2 медного центра Cu,Zn-супероксиддисмутазы (SodC)

Cu,Zn-супероксиддисмутаза (SodC) катализирует реакцию дисмутации супероксид анион-радикала в O_2 и H_2O_2 и содержит медный T2 центр, где медь координируется 4 остатками His [108].

В клетках бактерий в сборке медного центра SodC участвует периплазматический шаперон CueP (**Рис. 15, а**) [109,110]. При нокауте гена CueP происходит уменьшение ферментативной активности SodC, однако активность восстанавливается *in vivo* при добавлении во внеклеточную среду ионов меди [111]. Предполагали, что CueP связывает один ион Cu(I) с высокой аффинностью при участии остатков Cys и His на N-конце (**Рис. 15, б**) [112]. Однако в другой работе [113] показали, что стехиометрия связывания

составила 2 иона Cu(I) на молекулу CueP со средним значением $\log K_D = -15$. На настоящий момент структуры CueP со связанными ионами меди не было получено.

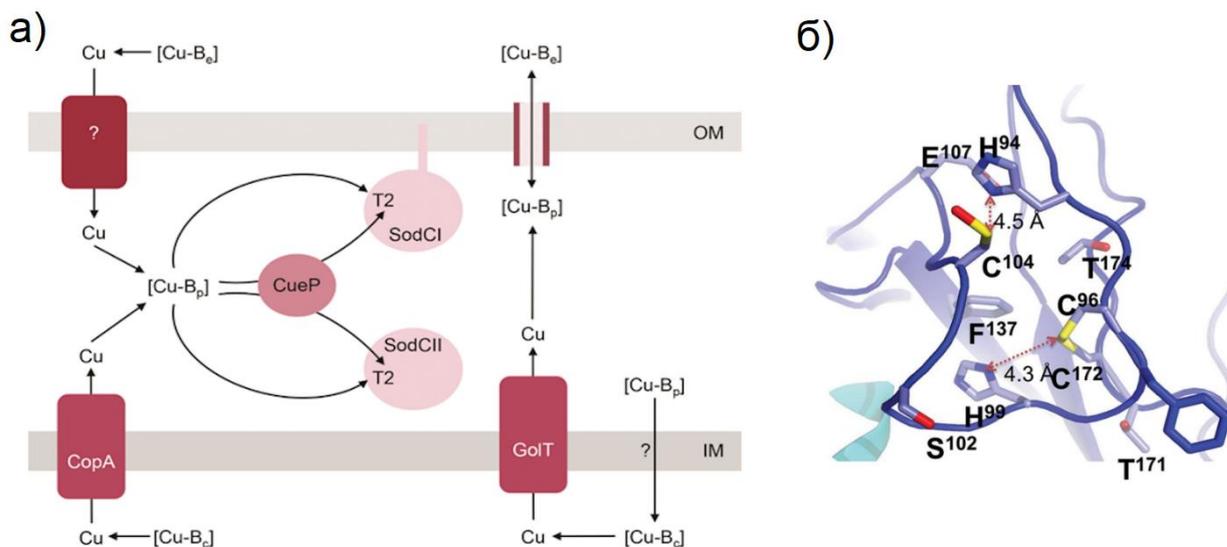


Рис. 15. а) Схема встраивания меди в T2 центр SodC [10]. [Cu-B_e], [Cu-B_c] и [Cu-B_p] обозначают буферные пулы меди во внеклеточном, цитозольном и периплазматическом компартментах, соответственно. б) Структура медного сайта CueP в апо-форме [112]. Консервативные остатки C96 и C172 образуют дисульфидный мостик, а C104 присутствует в кристаллической структуре в виде сульфеновой кислоты.

CueP также участвует в обеспечении клеточной устойчивости к избытку меди. При высоких концентрациях меди увеличивается экспрессия CueP [110]. CueP связывает избыток токсичных ионов Cu(I) в периплазме и препятствует неправильному встраиванию ионов меди в другие белки. При низкой доступности меди CueP служит источником ионов Cu(I) для встраивания в активный центр SodC, в то время как при высоких концентрациях меди сборка активного центра SodC, по-видимому, происходит без участия металлошаперона [114].

Встраивание меди в активный центр SodC *in vivo* также зависит от белков-экспортеров ионов Cu(I) в периплазму, таких как CopA и GolT (**Рис. 15, а**). Известно, что мембранные переносчики меди CopA и GolT доставляют медь из цитоплазмы для CueP [109]. В мутантных штаммах с делецированными генами этих АТФаз в активном центре SodC обнаруживается только ион Zn(II), однако активность восстанавливается при добавлении солей меди во внеклеточную среду [109].

Механизм сборки активного центра для Cu,Zn-Sod (Sod1) лучше изучен для клеток эукариот, где необходимо участие медного шаперона Ccs1 для встраивания ионов меди. Структура комплекса Sod1 и Ccs1 (**Рис. 16, а**) позволила сформулировать в подробностях механизм встраивания иона Cu(I) в активный центр Sod1 (**Рис. 16, б**) [115].

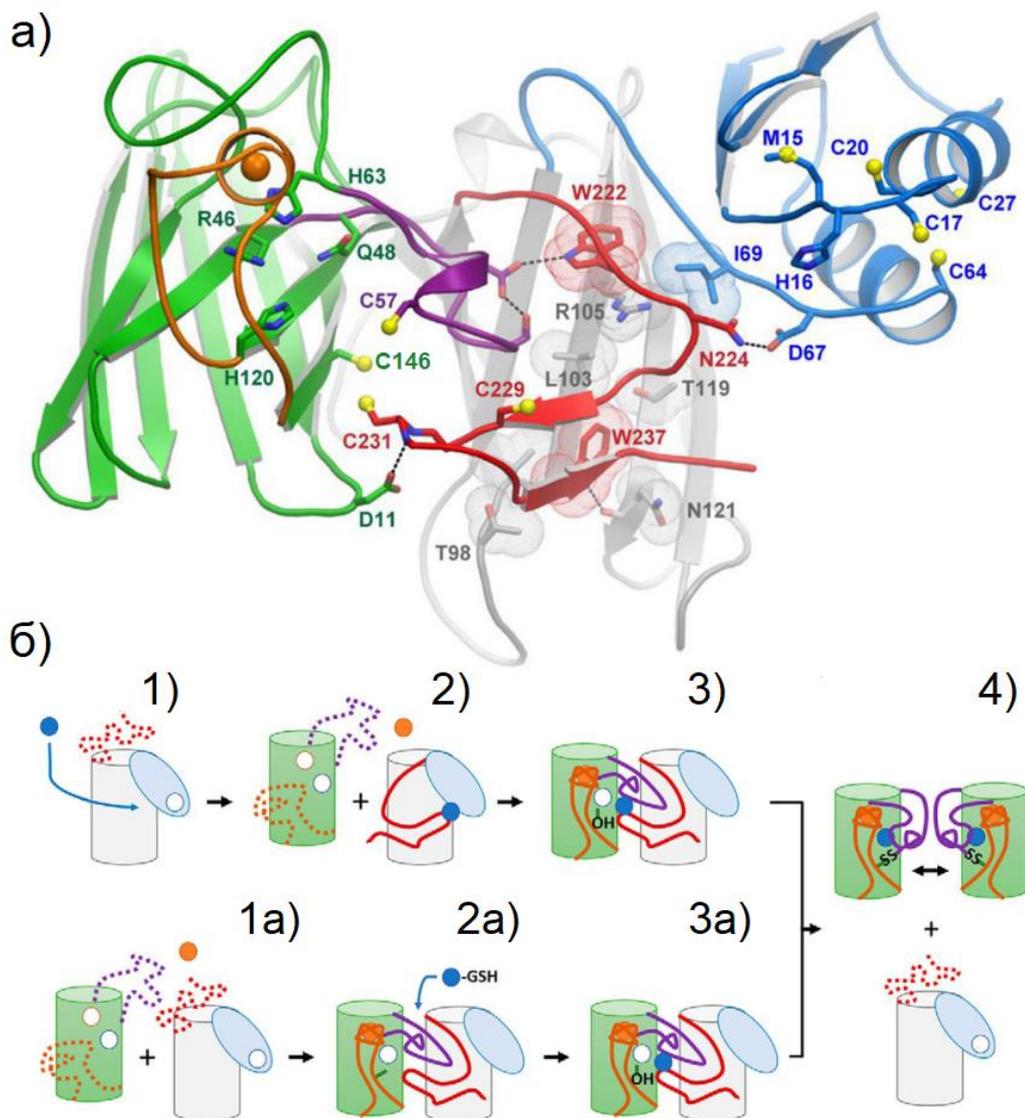


Рис. 16. а) Комплекс Sod1 (зеленым цветом обозначен β -бочонок, фиолетовым — «дисульфидная петля», вовлеченная в формирование внутримолекулярной дисульфидной связи между остатками C57 и C146, и оранжевым — электростатическая петля) и Ccs1 (синим цветом обозначен D1-домен, серым — D2-домен, а красным — D3-домен). Ионы цинка Sod1 показаны оранжевыми сферами. β -шпилька D3-домена начинается сразу после остатка N224 и содержит консервативный мотив CXC [115]. б) Схема сборки активного центра Sod1 (зеленый цилиндр изображен β -бочонок, фиолетовым — «дисульфидная петля» и оранжевым — электростатическая петля) с помощью Ccs1 (D1-домен изображен в виде голубого овала, D2-домен – в виде серого цилиндра, D3-домен – в виде красной линии) [116]. В условиях дефицита меди (стадии 1-4): 1) Ион Cu(I) (синий круг) связывается с D1-доменом и стабилизирует развернутый D3-домен; 2) Ccs1 связывается с Sod1 и способствует связыванию иона Zn(II) (оранжевый круг); 3) Ион Cu(I) связывается в промежуточном сайте, что приводит к сульфенилированию C146 и образованию дисульфидной связи в Sod1; 4) диссоциация комплекса Sod1 - Ccs1, гомодимеризация двух зрелых молекул Sod1 и связывание иона Cu(I) в активном центре Sod1. В условиях избытка свободной меди (стадии 1a-4): ион Cu(I) доставляется сразу в промежуточный сайт комплекса апо-Sod1 - Ccs1c помощью GSH, что запускает последующие аналогичные стадии.

Новосинтезированный Sod1 из неактивной мономерной формы [117,118] переходит в активную гомодимерную форму за счёт взаимодействия с Ccs1 [117,119]. Белок Ccs1 состоит из трех доменов (D1, D2 и D3): D1 расположен на N-конце и имеет медь-связывающий мотив MXCXXC с $\log K_D = -16,4$ к иону Cu(I) [116]; D2 имеет последовательность и структуру, гомологичные Sod1 [120], что позволяет предположить, что он участвует в распознавании Sod1, имитируя гомодимерные взаимодействия; D3 содержит инвариантный мотив CXС с $\log K_D = -16,6$ к иону Cu(I), который необходим для полной активации Sod1 [121].

Сборка активного центра Sod1 начинается, когда Ccs1 связывается с новосинтезированной молекулой Sod1 (**Рис. 16, б**). Домен D3 стабилизирует электростатическую петлю Sod1 и способствует формированию полноценного сайта связывания иона Zn(II) в Sod1 [122]. Благодаря двум высоко консервативным остаткам Trp (W222, W237) β -шпилька домена D3 располагается таким образом, что мотив CXС находится вблизи двух остатков Cys (C57, C146) Sod1 (**Рис. 16, а**), образуя промежуточный сайт связывания иона Cu(I). В зависимости от доступности меди в среде есть два пути сборки медного центра Sod1. При низкой доступности меди домен D1 получает необходимую медь от переносчика Ctr1 [123] и ион Cu(I) по градиенту средства перемещается в промежуточный сайт, образованный доменом D3 и Sod1 (**Рис. 16, б**). Затем ион Cu(I) вступает в реакцию с супероксидом/пероксидом и происходит сульфенилирование остатка C146 у Sod1, которое приводит к образованию внутримолекулярной дисульфидной связи между C57 и C146 и высвобождению Cu(I) из промежуточного сайта в активный центр Sod1 по градиенту средства ($\log K_D(\text{Cu(I)-Sod1}) = -20,1$) (**Рис. 16, б**). Образование дисульфидной связи также способствует разрушению комплекса Sod1-Ccs1 и образованию зрелой формы фермента (**Рис. 16, б**), после чего две зрелые молекулы образуют гомодимер Sod1. При высоком уровне меди в клетке, Cu(I)-GSN может поставлять ион Cu(I) непосредственно в промежуточный сайт, а Ccs1 будет способствовать стабилизации правильной конформации Sod1 (**Рис. 16, б**).

1.3.4. Сборка T1 и T2 медных центров медь-содержащей нитритредуктазы (NirK)

Медь-содержащая нитритредуктаза (NirK) катализирует восстановление NO_2^- до NO. NirK содержит T1 центр, который принимает и передает электрон на каталитический T2 центр, где связывается и восстанавливается NO_2^- (**Рис. 17, а**) [124]. Первоначально считалось, что в сборке T1 и T2 центров NirK не участвуют специальные металлошапероны, поскольку эти центры легко заполнялись при добавлении солей меди *in vitro*. Однако позднее было показано, что периплазматический шаперон AssA необходим для сборки

медных центров AniA (NirK) у патогенных бактерий рода *Neisseria* (Рис. 17, б) [125]. AccA имеет сильное структурное сходство с PcuC, который участвует во встраивании центров Sox. AccA содержит похожий предполагаемый мотив связывания $N(X)_{10}M(X)_{22}HXM$ иона Cu(I), а богатая остатками His С-концевая область служит вторым медь-связывающим сайтом, что и продемонстрировали в биохимических экспериментах, где один ион Cu(I) и один ион Cu(II) связываются на молекулу AccA [125]. Насыщенный медью AccA образует комплекс с AniA с $\log K_D = -5,7$ со скоростями связывания и диссоциации значительно выше ($k_{on} = 0,0005 \text{ мс}^{-1}$ и $k_{off} = 0,004 \text{ с}^{-1}$), чем в отсутствие меди [125].

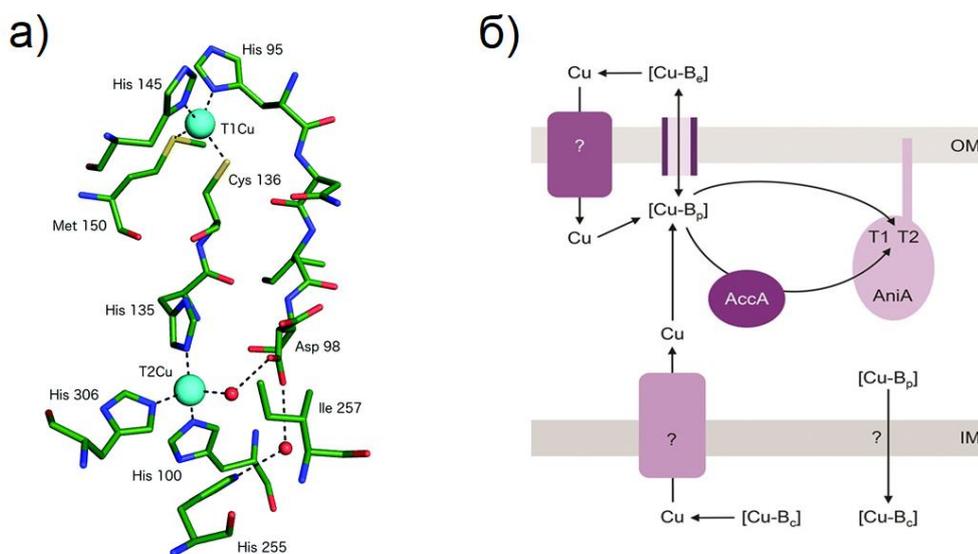


Рис. 17. а) Структура T1 и T2 медных центров NirK [124]. б) Схема встраивания меди в T1 и T2 центры AniA [10]. [Cu-B_e], [Cu-B_c] и [Cu-B_p] обозначают буферные пулы меди во внеклеточном, цитозольном и периплазматическом компартментах, соответственно.

Интересно, что делеция гена PcuC в *Bradyrhizobium japonicum* приводит к снижению активности NirK [66]. Из чего можно предположить, что помимо встраивания центра CuA у Sox, PcuC может действовать как металлошаперон и для других медных ферментов. Это хорошо коррелирует с данными, что гены металлошаперона PcuC, также и гены металлошаперона AccA, не всегда присутствуют в геномах рядом с генами NirK или с генами, кодирующими белки с центрами CuA [107].

Однако на данный момент ничего неизвестно об участии в сборке медных центров NirK других белков, например, импортирующих и экспортирующих медь белков или других металлошаперонов.

1.3.5. Сборка ТЗ медного центра тирозиназы

Тирозиназа — это фермент, который катализирует лимитирующую реакцию меланогенеза – превращение фенола в соответствующий *орто*-хинон [126–128]. ТЗ медный центр тирозиназы, состоящий из двух ионов меди (Cu^{A} и Cu^{B}), в ходе каталитического цикла принимает три окислительно-восстановительные формы [126–128]: дезокси-форма $[\text{Cu}(\text{I})\text{--Cu}(\text{I})]$, которая может связать O_2 ; окси-форма $[\text{Cu}(\text{II})\text{--O}_2^{2-}\text{--Cu}(\text{II})]$, которая катализирует реакцию; мета-форма $[\text{Cu}(\text{II})\text{--Cu}(\text{II})]$ – состояние «покоя», где два иона меди соединены одним или двумя небольшими мостиковыми лигандами, такими как молекулы воды или ионы гидроксидов.

Тирозиназа из грамположительной бактерии *Streptomyces castaneoglobisporus* кодируется бицистронным опероном, состоящим из генов, кодирующих белок-шаперон «caddie» и тирозиназу [129,130]. «Caddie» – это небольшой белок, состоящий из одного шестицепочечного β -листа и одной α -спирали. Встраивание двух ионов меди, расположенных близко в активном центре тирозиназы, затруднено из-за электростатического отталкивания между этими ионами. Добавление ионов меди к апо-тирозиназе не приводит к появлению ферментативной активности. В то время как, в комплексе с белком «caddie» происходит встраивание двух ионов меди в активный центр тирозиназы, то есть белок «caddie» действует как металлошаперон. Апо-тирозиназа образует стабильный комплекс с «caddie» [131], а холо-форма высвобождается из комплекса и «caddie» агрегирует [132].

На основании пространственных структур комплекса тирозиназы и белка «caddie», полученных в результате инкубации с ионами $\text{Cu}(\text{II})$ в течение разных промежутков времени, был предложен механизм сборки ТЗ медного центра *in vivo* (Рис. 18) [133]. Сначала ион меди связывается с сайтом Cu^{C} – медь-связывающим сайтом «caddie» (Рис. 18, б), а затем перемещается в медь-связывающий сайт тирозиназы $\text{Cu}^{\text{A-2}}$ или Cu^{B} (Рис. 18, в). Предполагается, что энергетический барьер для встраивания первого иона меди низкий, поэтому это может происходить самопроизвольно без участия «caddie». В то время как, встраивание второго иона меди в активный центр является лимитирующим процессом из-за возникающего электростатического отталкивания. Второй ион меди сначала также связывается с сайтом Cu^{C} (Рис. 18, г), а затем перемещается через сайт Cu^{D} , промежуточный сайт сформированный остатками белка «caddie», в сайт Cu^{E} , который сформирован в интерфейсе комплекса тирозиназы и «caddie» (Рис. 18, д). В этот момент координационная связь между сайтом $\text{Cu}^{\text{A-2}}$ и H54 разрывается, и первый ион меди полностью перемещается в сайт Cu^{B} (Рис. 18, д). Третий ион меди связывается с сайтом Cu^{C} (Рис. 18, е), чтобы

препятствовать обратному перемещению второго иона меди из сайта Cu^{E} обратно в сайт Cu^{D} . После чего третий ион меди сдвигается в сайт Cu^{D} , что способствует переходу второго иона меди в сайт $\text{Cu}^{\text{A-1}}$ ($\text{Cu}^{\text{A-1}}$ находится на расстоянии около 4,2 Å от Cu^{B}) (Рис. 18, ж). Затем второй ион меди перемещается в положение $\text{Cu}^{\text{A-2}}$ ($\text{Cu}^{\text{A-2}}$ — на расстоянии около 3,4 Å от Cu^{B}), в результате чего образуется мета-форма тирозиназы (Рис. 18, з). Две молекулы воды занимают положение между остатком Н54 тирозиназы и остатком Н97 «caddie» и завершают формирование активного центра тирозиназы (Рис. 18, з).

Включение ионов меди в активный центр тирозиназы и высвобождение из комплекса с белком «caddie» происходило быстрее в присутствии восстановителя NH_2OH , который способствует переходу фермента из мета-формы в дезокси-форму в аэробных условиях [132]. На основании чего заключили, что ионы $\text{Cu}(\text{I})$, но не ионы $\text{Cu}(\text{II})$, должны быть подходящими ионами для встраивания в активный центр тирозиназы *in vivo*.

Таким образом, у грамотрицательных бактерий встраивание ионов меди в активный центр ферментов *in vivo* происходит с участием металлошаперонов. Группа медных металлошаперонов представлена разнообразными негомологичными белками, а механизмы встраивания уникальны для отдельных ферментов. Особенностью сборки медных центров бактериальных ферментов является зависимость от функционирования импортирующих в цитоплазму и экспортирующих из цитоплазмы медных транспортеров. Одно из объяснений необходимости получения меди из цитоплазмы при сборке активных центров периплазматических ферментов – это контроль восстановления ионов $\text{Cu}(\text{II})$ до ионов $\text{Cu}(\text{I})$, а последние связывают металлошапероны уже в периплазме.

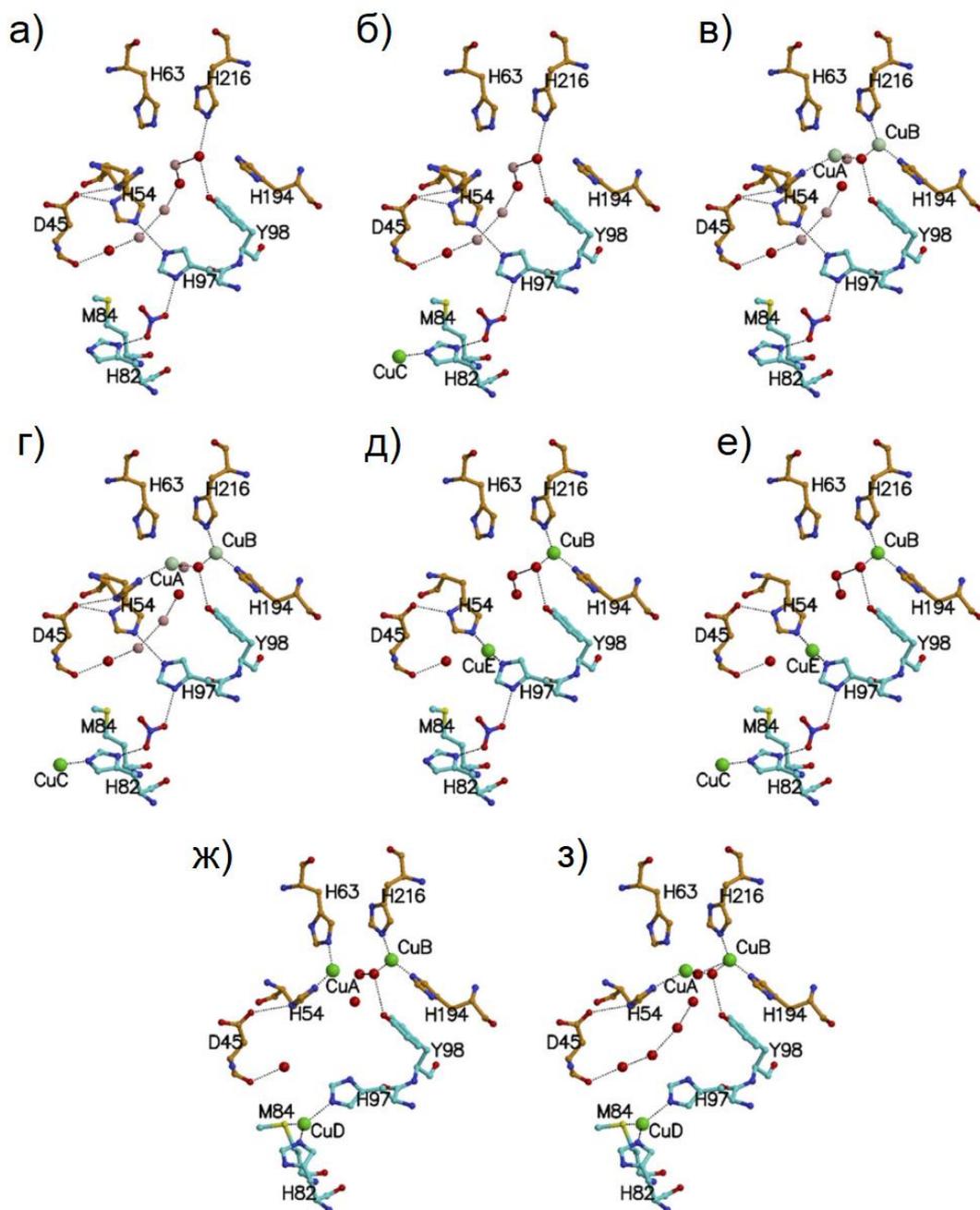


Рис. 18. Предполагаемый механизм встраивания ионов Cu(II) в активный центр тирозиназы (остатки обозначены оранжевым цветом) при участии металлошаперона «caddie» (остатки обозначены голубым цветом) [133]. Атомы меди и молекулы воды (или ионы гидроксила) обозначены зелёными и красными сферами, соответственно. а) У апо-тирозиназы остаток H54 принимает две конформации, а в канале связаны три молекулы воды с низкой заселенностью (показаны розовым цветом). б-г) Первый ион меди занимает либо сайт Cu^A, либо сайт Cu^B с низкой заселенностью (показаны бледно-зеленым цветом). д-ж) Этапы встраивания второго иона меди в активный центр тирозиназы и связывание третьего иона в сайтах белка «caddie». з) Присоединение двух молекул воды завершает формирование активного центра тирозиназы. Дополнительные лиганды сайта Cu^C «caddie» не показаны.

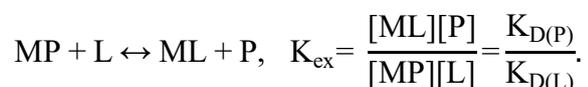
1.4. Оценка высокоаффинного связывания ионов меди с белками

Понимание того, как ионы меди передаются от одного белка к другому и в конечном счете к медным ферментам как конечным акцепторам в пути транспорта меди *in vivo* является важной областью металломики. Считается, что главными факторами, определяющими перенос иона металла, в частности меди, между белками *in vivo*, являются белок-белковое специфическое распознавание и возрастание аффинности связывания к меди от одного белка к последующему [43]. Таким образом, используя значения аффинности связывания белка к ионам можно прогнозировать о возможности передачи иона от одного белка к другому. Для термодинамической оценки, описывающей силу взаимодействия иона меди (М) с белком (Р), удобно использовать константу диссоциации $K_D = [M][P]/[MP]$ [134]. Для определения K_D на сегодняшний день разработано множество методов, включая потенциометрическое, спектрофотометрическое или калориметрическое титрование [135]. Хотя потенциометрическое титрование до сих пор считается золотым стандартом для точного определения K_D , этот подход невозможно применить в случае металл-белкового комплекса из-за сложной белковой структуры и ее зависимости от рН [135]. И спектрофотометрический, и калориметрический методы экспериментально можно проводить с помощью прямого титрования, при котором молекулы воды являются единственными лигандами, конкурирующими с белком за связывание металлов, или конкурентного титрования с использованием лиганда, специфично связывающего металл.

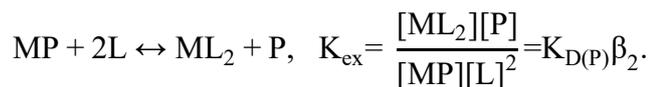
При прямом методе титрования к исследуемому белку добавляются возрастающие концентрации лигандов, в частности ионов меди, и K_D оценивается как истинное равновесие реакции с определяемыми концентрациями каждого компонента равновесия [134]. Из экспериментальных данных при титровании можно определить концентрацию одного компонента, а остальные концентрации рассчитать путем баланса масс из известных общих концентраций. Однако чувствительность методов детекции концентрации белка, ионов металла или комплекса металл-белок находится в микромолярном диапазоне. При такой концентрации в случае высокоспецифичного взаимодействия ($\log K_D < -7$) все ионы металла свяжутся с белком и истинного равновесия наблюдаться не будет, а определенное значение K_D будет представлять лишь верхний предел. К сожалению, ошибочная оценка аффинности, определенная при прямом титровании, встречается довольно часто в данных литературы, что приводит к сильно заниженным оценкам и большому расхождению в разных публикациях [134]. Например, для прионного белка, связывающего несколько ионов Cu(II), значения K_D при прямом титровании оценили в микромолярном диапазоне [136], но позднее получили наномолярное значение [134]. Также для высокоспецифичного

металлошаперона Atox1, связывающего ион Cu(I), при прямом титровании оценили значение $K_D \sim 10^{-5}$ М, что значительно отличается от истинного значения 10^{-18} М [137]. То есть ошибка в определении может быть значительна, более чем на 10 порядков, что может привести к неправильным выводам о функционировании, в частности, медь-связывающих белков и механизмах встраивания ионов металла в них.

Для определения высокоаффинного связывания ($\log K_D < -7$) используется принцип конкуренции лигандов, где используется лиганд, специфично связывающий ионы металлов [135]. При добавлении лиганда (L) с известным сродством $K_{D(L)}$ к комплексу белка (P) с ионом металла (M) происходит перераспределение иона металла между ними, и константу диссоциации исследуемого белка с одним сайтом связывания металла $K_{D(P)}$ при фиксированном pH можно оценить следующим образом [135]:



В некоторых случаях лиганд (L) образует комплекс с ионом металла (M) в соотношении M : L = 1 : 2 с константой образования β_2 , тогда $K_{D(P)}$ оценивается [135]:



Стоит отметить, преимуществом конкурентного титрования является то, что общие концентрации лиганда, белка и иона металла, используемые в эксперименте, находятся в микромолярном диапазоне, что позволяет достоверно детектировать уже равновесные концентрации с использованием современного оборудования. Однако основным ограничивающим фактором для использования этого метода является подбор оптимального лиганда на основании его значений $K_{D(L)}$ и β_2 . В случае значимой разницы между $K_{D(L)} / \beta_2$ и $K_{D(P)}$ конкурентного процесса наблюдаться не будет, а ион металла будет полностью связан либо с лигандом, либо с белком. Для надежной оценки $K_{D(P)}$ считается, что экспериментальные значения измеряемого параметра, например концентрации комплекса [MP], в присутствии конкурентного лиганда должны отличаться в идеале на 20-80% от значений без лиганда [135]. С помощью этого принципа можно рассчитать приблизительные интервалы применения лигандов для надежного определения $K_{D(P)}$. Интервалы для некоторых лигандов представлены на **Рис. 19**.

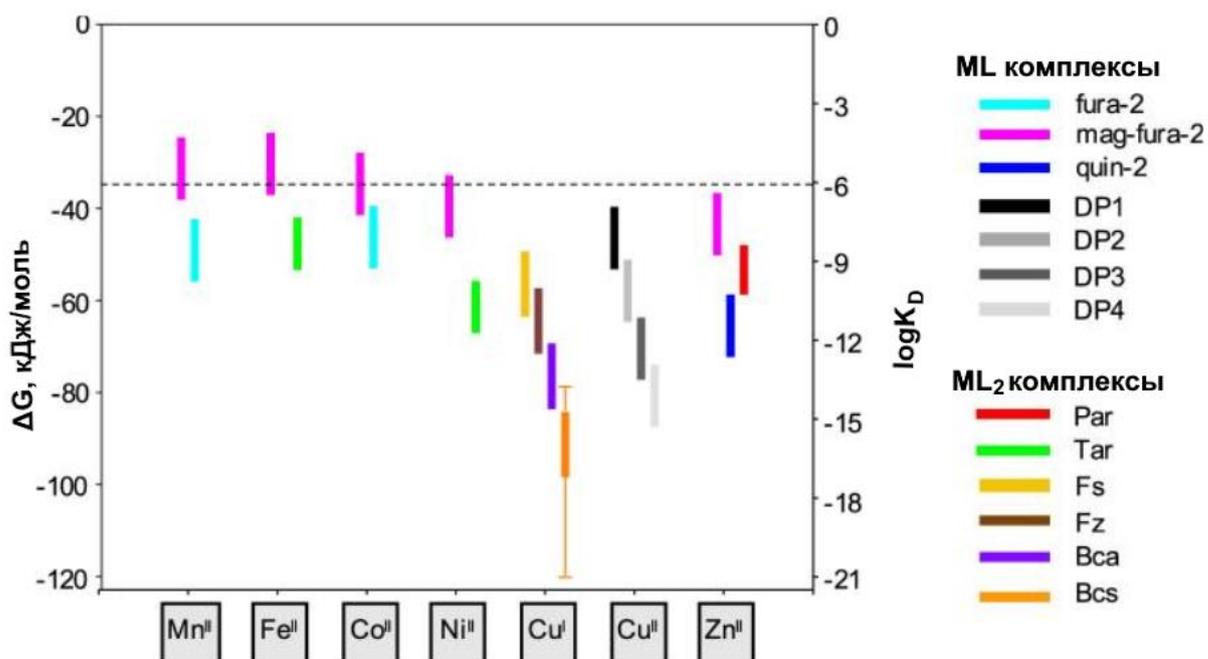


Рис. 19. Интервалы аффинности иона металла к белку $K_{D(P)}$, которые могут быть надежно определены с использованием хелатирующих лигандов [135]. Однако на практике при изменении дизайна эксперимента можно расширить этот интервал.

1.5. Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*

Бактерия *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1^T принадлежит к группе сероокисляющих бактерий, выделенных из кенийских содовых озер [138]. *Tv. paradoxus* является облигатным хемолитоавтотрофом и галоалкалофилом, который способен расти в средах с высоким содержанием солей (до 4М NaCl) при pH 9,5-10,2 и использовать тиоцианат, тиосульфат и сульфид в качестве источника энергии для роста.

Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) – это медный фермент, который впервые был выделен из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1^T. TcDH катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементарной серы [139]:



Два электрона, образовавшиеся в ходе реакции, переносятся на внешний акцептор электронов *in vivo*. Одной из задач данной диссертационной работы стали поиск и характеристика физиологических акцепторов электронов.

TcDH является гомодимером, мономер которого имеет структуру семилопастного β -пропеллера, где лопасти сформированы антипараллельными β -листами (Рис. 20, а) [139]. В центре мономера находится активный центр, состоящий из трех ионов меди (Cu_1 , Cu_2 , Cu_3) (Рис. 20, б). Согласно данным электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), ионы меди в активном центре фермента до связывания субстрата находятся в окисленном состоянии

[139]. На основании атомной структуры гомологичной TcDH из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum* [140], координационная сфера каждого иона меди была точно установлена для свободной формы фермента. В свободной форме фермент принимает открытую конформацию и активный центр доступен для субстрата. При этом ион меди Cu1 координирован по типу октаэдра при участии двух остатков His и одного остатка Asp и двух молекул воды. Ион меди Cu2 координирован по типу тригональной бипирамиды двумя остатками His, одним остатком Lys и двумя молекулами воды. Ион Cu3 координирован по типу плоского треугольника двумя остатками His и одной молекулой воды. При связывании субстрата или ингибитора активный центр фермента закрывается подвижной петлей, и координационная сфера всех трех ионов меди изменяется.

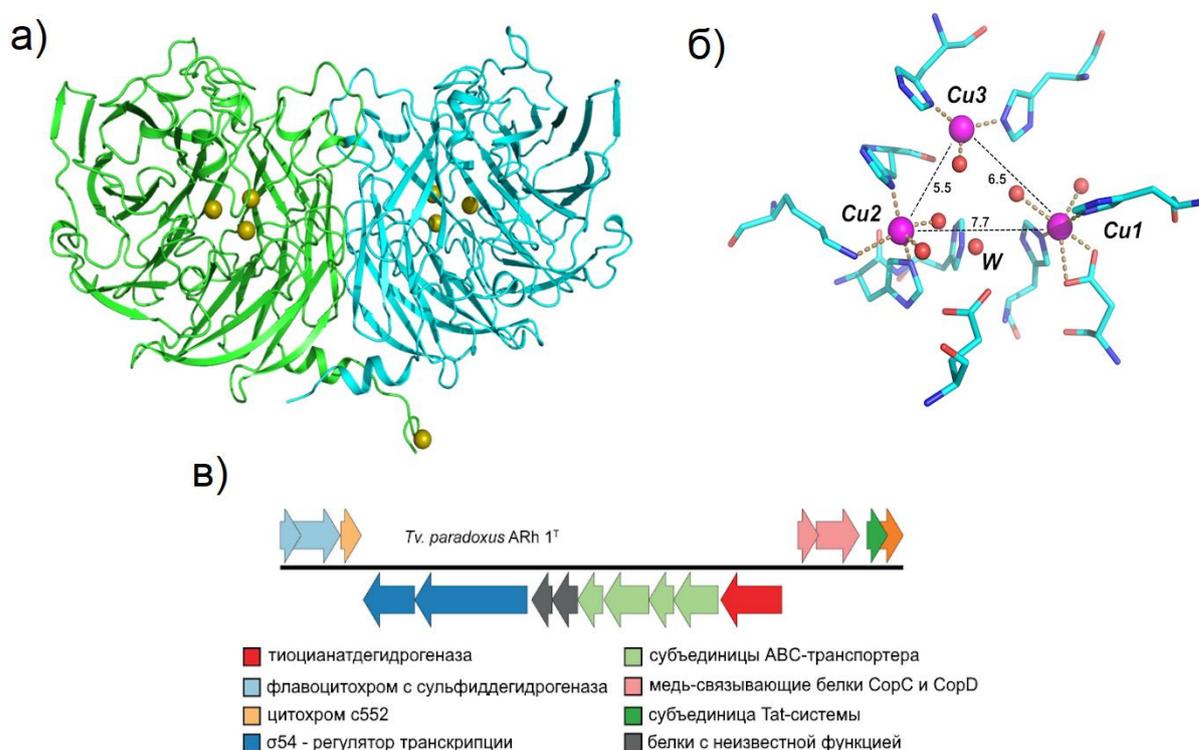


Рис. 20. а) Структура димера TcDH из *Tv. paradoxus* [139] (PDB ID: 5OEX). Ионы меди изображены желтыми сферами. б) Структура каталитического центра TcDH в свободной форме. Ионы меди обозначены пурпурными сферами. Координационные связи обозначены желтыми пунктирными линиями. в) Геномное окружение гена TcDH в геноме *Tv. paradoxus* [141].

Рекомбинантный препарат TcDH не обладает ферментативной активностью и не содержит ионы меди в активном центре. Восстановление ферментативной активности, т.е. активация, было достигнуто путем настаивания фермента с ионами Cu(II)/Cu(I). Однако эти процессы значительно отличались, так как для восстановления максимальной активности TcDH с помощью ионов Cu(II) требовалась либо больше времени, либо больший избыток

ионов меди, по сравнению с ионами Cu(I) [139]. В связи с этим в данной диссертационной работе была поставлена задача изучить процесс формирования трехъядерного медного центра TcDH при настаивании с ионами Cu(II)/Cu(I), а также оценить термодинамическую величину связывания ионов меди в активном центре.

Как было рассмотрено выше, *in vivo* сборка медных центров ферментов происходит в периплазме при участии металлошаперонов для обеспечения эффективного встраивания ионов меди. Ген периплазматического медь-связывающего белка CopC расположен рядом с геном TcDH в геноме *Tv. paradoxus* (Рис. 20, б). При культивировании на тиоцианате близкородственной бактерии *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* [142] оба белка коэкспрессировались, из чего было предположено, что CopC может участвовать во встраивании ионов меди в активный центр TcDH. В связи с этим одной из задач диссертационной работы было проведение биохимического и структурного анализа CopC типа C₀₋₁ из *Tv. paradoxus* (*tpCopC*) и изучение возможности переноса ионов меди от *tpCopC* к TcDH *in vitro*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и реактивы

На всех этапах работы использовали буферные растворы (TRIS, BIS-TRIS, MES, MOPS, HEPES), соли (NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂MoO₄, Na₂S₂O₄, CH₃COONa, CuCl₂, CuSO₄×5H₂O, K₂HPO₄, K₃[Fe(CN)₆], KSCN, MgCl₂, FeSO₄×7H₂O, ZnSO₄, MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂×2H₂O, CaCl₂, аскорбат натрия), неорганические кислоты (борную, уксусную, соляную, фосфорную), NaOH, спирты (метанол, этанол, глицерин) и другие соединения (дрожжевой экстракт, триптон, агар, агароза, бромистый этидий, ампициллин, хлорамфеникол, ИПТГ, арабиноза, имидазол, сахароза, SDS, мочевины, PMSF, EDTA, HEDTA, Bcs, Vca, Fz, ZI, His, Gly, 1,4-бензохинон, 2,6-дихлорфенолиндофенол, 1,2-нафтохинон-4-сульфоновая кислота, феназинметосульфат, лимонная кислота, акриламид, TEMED, Кумасси G-250, ПЭГ и прочие) от следующих торговых фирм: Sigma-Aldrich (США), Acros Organics (США), Angel Yeast (Китай), Servicebio (Китай), Cell Culture (США), Thermo Fisher Scientific (США), Carl Roth (Германия), Panreac AppliChem (Испания), Merck (Германия), Химмед (Россия), Хеликон (Россия), Диа-М (Россия). В работе также использовали коммерческие препараты белков: лизоцим (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия), цитохром с550 из сердца лошади (Sigma-Aldrich, США), БСА (Ambesco, США). Все растворы готовили на деионизованной воде, полученной с помощью установки Milli-Q Gradient (Millipore, США).

Маркеры молекулярных масс Pierce prestained Protein MW marker, используемые в SDS-электрофорезе, были от производителя Thermo Fisher Scientific (США), а белки-стандарты Gel Filtration Calibration kit для калибровки гель-фильтрационной колонки - от Amersham Biosciences (США).

При получении исследуемых рекомбинантных белков для клонирования использовали клетки штамма *E. coli* Mach1 (Invitrogen, США), а для экспрессии - BL21(DE3) (Novagen, Германия). Праймеры для амплификации необходимого фрагмента гена заказывали в компании (Евроген, Россия). Для клонирования использовали рестриктазы BsaI, Xho I, BamH I, Hind III (Fermentas, Латвия).

2.2. Некоторые аналитические методы

2.2.1. Спектрофотометрическое определение концентрации белков и растворов

Концентрацию белка в образце определяли по поглощению при 205 нм. У данного прямого метода есть преимущества: высокая чувствительность и независимость

коэффициента экстинкции от аминокислотного состава белка ($\epsilon_{205} = 31 \text{ мл} \times \text{мг}^{-1} \times \text{см}^{-1}$). Измерения проводили только с гомогенными препаратами в кварцевой кювете в нескольких повторностях (не менее трех).

Концентрацию белка в пробах в процессе выделения и очистки определяли методом Бредфорда. К 100 мкл образца, содержавшего 1-10 мкг белка, добавляли 1 мл реактива Бредфорда, затем инкубировали 5 мин и измеряли оптическую плотность при 595 нм. Реактив Бредфорда готовили следующим образом: растворяли 100 мг Кумасси G-250 в 50 мл 96% этилового спирта, добавляли 100 мл фосфорной кислоты и доводили водой до 1 л. Полученный раствор фильтровали и хранили в темноте. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой зависимости поглощения от концентрации белка использовали БСА.

Концентрацию гема с и коэффициент экстинкции у исследуемых цитохромов с552 и с546/556 определяли с помощью пиридинового метода [143]. В сильнощелочных восстановленных условиях происходила денатурация белка и образовывался комплекс (пиридин)₂ – гем с с известными спектральными свойствами ($\epsilon_{550} = 30270 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$).

Точную концентрацию стандартного раствора ионов Cu(II) определяли с использованием избытка Всc и аскорбата. В таких условиях все ионы Cu(II) восстанавливаются и образуют комплекс $[\text{Cu(I)-(Vcs)}_2]^{3-}$ ($\epsilon_{483} = 13000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$).

2.2.2. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)

Для анализа белкового состава проб проводили SDS-электрофорез в 5% концентрирующем и 12,5% разделяющем полиакриламидных гелях (Табл. 1) по методу Лэммли [144] на приборе Mini-Protean Tetra Cell (BioRad Laboratories, США).

Образцы готовили, смешивая образец и буфер для образцов (0,2 М TRIS, pH 6,8, 2% SDS, 20% глицерин, 0,7 М β -МЭ, 0,05% бромфеноловый синий) в объемном соотношении 1:1. Затем образцы инкубировали при 95°C в течение 5 минут. На дорожку наносили 1-10 мкг белка. Электрофорез проводили в буфере: 0,025 М TRIS, 0,192 М Gly, pH 8,2, 0,1% SDS при 120 В в концентрирующем геле и 180 В - в разделяющем. Для визуализации полос гели помещали в раствор Кумасси G-250 (0,3% Кумасси G-250, 40% метанола и 10% уксусной кислоты) на 30 мин при перемешивании. После этого гели отмывали в нагретой дистиллированной воде.

Таблица 1. Состав растворов для полимеризации 1 полиакриламидного геля для SDS-PAGE.

Компоненты	Разделяющий гель, 12,5%	Концентрирующий гель, 5%
Раствор акриламида (30% акриламида, 0,8% бисакриламида), мл	2,4	0,5
Буфер разделяющего геля (1,5 М TRIS, pH 8,8), мл	3	-
Буфер концентрирующего геля (0,5 М TRIS, pH 6,8), мл	-	1,5
H ₂ O, мл	0,6	1,0
10% SDS, мкл	60	30
10% ПСА, мкл	30	15
99% TEMED, мкл	6	3

2.2.3. Определение содержания ионов металлов в белковых препаратах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS)

Содержание ионов металла в исследуемых белках определяли методом ICP-MS на приборе Thermo iCAP Q (Thermo Scientific, США) в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. Автор выражает благодарность за проведение измерений с.н.с., к.х.н. Жилову В. И. (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН).

2.2.4. Идентификация белков методом масс-спектрометрии

Масс-спектрометрический анализ для идентификации образцов проводили в ЦКП «Промышленные Биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН на приборе MALDI TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker, Германия).

2.3. Получение и очистка белков

2.3.1. Получение и очистка рекомбинантного TcDH

Получение рекомбинантного TcDH из бактерии *Tv. paradoxus* (trTcDH) было подробно описано в статье [139]. Кассета экспрессии в векторе pET-22b состояла из His₆-тага, участка расщепления TEV-протеазы и укороченного варианта гена TH1TH_RS12920, кодирующего TcDH (WP_006748988), без 77 N-концевых аминокислотных остатков,

включающих Tat-сигнальный пептид. Для экспрессии белка использовали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3). Культуру клеток выращивали в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C, 180 об/мин до $A_{600}=0,7$. Экспрессию TcDH индуцировали добавлением 0,2 мМ ИПТГ и инкубировали клетки при 25°C и 150 об/мин в течение ночи.

Клетки осаждали с помощью центрифуги CR 22N (Hitachi, Япония) в течение 20 минут при 5000 g и 4°C. Осадок клеток ресуспендировали в лизирующем буфере: 50 мМ TRIS, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ β-МЭ, 1 мкг/мл ДНКазы, а затем разрушали ультразвуком (8`2``б``60%) с помощью Vibra-Cell VCX130 (Sonic and materials, США). Для осаждения клеточного дебриса суспензию центрифугировали 20 мин при 20000 g и 4°C на приборе Allegra 64R (Beckman Coulter, США). Полученный супернатант фильтровали через 1 и 0,22 мкм фильтры и наносили на металлоаффинную колонку Ni-NTA (Qiagen, Германия) (3 мл/мин, 0,3 МПа), предварительно уравновешенную 50 мМ TRIS, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола. Элюцию рекомбинантного белка проводили линейным градиентом 500 мМ имидазола. Хроматографию проводили на приборе АСТА FPLC (GE Healthcare, США). Полученные фракции анализировали с помощью SDS-PAGE и отбирали фракции, содержавшие целевой белок. Для отщепления His₆-тага к отобраным фракциям добавляли TEV-протеазу (из расчета 1 мг TEV-протеазы на 10 мг целевого белка), инкубировали 2 часа при комнатной температуре и диализовали в течение ночи против 50 мМ TRIS, pH 8,0, 150 мМ NaCl. Затем повторно наносили на колонку Ni-NTA для отделения His₆-тага и TEV-протеазы. На последней стадии очистки, фракции с целевым белком наносили на колонку Superdex 200 10/300 (Cytiva, США) (0,7 мл/мин, 3 МПа), уравновешенную 25 мМ боратным буфером, pH 9,5, 150 мМ NaCl. Гомогенность образца TcDH анализировали методом SDS-PAGE.

Выделение и очистку рекомбинантного TcDH из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum* (pmTcDH) для ЭПР-экспериментов проводили аналогичным образом, как описано в [140].

2.3.2. Получение и очистка рекомбинантного цитохрома c552

Ген, кодирующий цитохром c552 (WP_006748979.1) без 26 аминокислот сигнального пептида, амплифицировали из геномной ДНК *Tv. paradoxus* ARh 1 с использованием праймеров: Cyt F 5' – AAAAGGATCCTCATCCGCCCCACCAC – 3' и Cyt R 5' – AAAAAAGCTTCTAGTGATGGTGCCTCGCCGTG – 3', где подчеркнуты сайты рестрикции BamH I и Hind III, соответственно. Последовательность цитохрома c552 содержит на N- и C-концах повторы His, поэтому дополнительно His₆-таг не клонировали. Полученный ПЦР-продукт клонировали в вектор pET-22b(+). Для клонирования

использовали штамм *E. coli* Mach1. Для экспрессии цитохрома c552 использовали штамм BL21(DE3), котрансформированный плазмидой pEC86 для улучшения экспрессии зрелых цитохромов с-типа в *E. coli*. Клетки выращивали в среде 2xYT (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl), содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (34 мкг/мл), при 37°C, 180 об/мин до $A_{600}=0,7$. Экспрессию индуцировали с помощью 0,2 мМ ИПТГ и инкубировали клетки при температуре 20°C, 150 об/мин в течение ночи.

Очистку цитохрома c552 проводили по методике, описанной выше для TcDH, без стадии обработки протеазой и второй стадии металлоаффинной хроматографии в связи с отсутствием His₆-тага в генетической конструкции. На последней стадии очистки, фракции с целевым белком наносили на колонку Superdex 75 10/300, уравновешенную 25 мМ боратным буфером, pH 9,5, 150 мМ NaCl. Гомогенность образца цитохрома c552 анализировали методом SDS-PAGE.

2.3.3. Получение и очистка нативного цитохрома c546/556

Клетки *Tv. paradoxus* ARh1 выращивали аэробно при 30°C и 180 об/мин. Среда для культивирования содержала: 170 мМ Na₂CO₃, 143 мМ NaHCO₃, 86 мМ NaCl, 5,7 мМ K₂HPO₄, 2,1 мМ MgCl₂, 30 мМ KSCN, 2,4 мкМ CuSO₄×5H₂O, pH 9,75, а также микроэлементы (5 мг/л EDTA, 2 мг/л FeSO₄×7H₂O, 0,1 мг/л ZnSO₄, 0,03 мг/л MnCl₂, 0,3 мг/л H₃BO₃, 0,2 мг/л CoCl₂, 0,02 мг/л NiCl₂×2H₂O, 0,02 мг/л Na₂MoO₄, 0,01 мг/л CuCl₂). Рост биомассы контролировали по увеличению A₆₀₀. По мере роста культуры и исчерпания SCN⁻ добавляли дополнительные аликвоты SCN⁻ до концентрации 10 мМ.

Цитохром c546/556 выделяли из периплазматической фракции по следующей методике. Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 минут при 5000 g и 4°C. Далее клетки ресуспендировали в лизирующем буфере: 25 мМ MOPS pH 7,5, 500 мМ (17%) сахара, 1 мг/мл лизоцима, 1 мМ PMSF, 1 мкг/мл ДНКазы, 2 мМ MgCl₂ и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Полученную взвесь разводили в два раза охлажденным раствором 1 мМ PMSF и инкубировали еще 20 мин на льду. Для осаждения клеточного дебриса суспензию центрифугировали 20 мин при 20000 g и 4°C. Полученный супернатант фильтровали через 1 и 0,22 мкм фильтры и наносили на анионообменную колонку Mono Q 10/100 GL (Cytiva, США) (4 мл/мин, 4 МПа), уравновешенную 25 мМ MOPS, pH 7,5. Элюцию осуществляли линейным градиентом 1 М NaCl. На последнем этапе очистки проводили гель-фильтрацию на колонке Superdex 200 10/300 в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5, 150 мМ NaCl. Гомогенность образца цитохрома c546/556 анализировали с помощью SDS-PAGE.

2.3.4. Получение и очистка рекомбинантного *tpCopC*

Рекомбинантный *tpCopC* (WP_006748989) из бактерии *Tv. paradoxus* с немодифицированной N-концевой аминогруппой был получен в *E. coli* с использованием конструкции с SUMO [145]. Укороченный ген, лишенный 5'-последовательности, кодирующей 30 N-концевых остатков (включая сигнальный пептид), амплифицировали из геномной ДНК *Tv. paradoxus* ARh1 с помощью праймеров *tpCopC*-SUMO-F 5' – AAAAAGGTCTCAAGGTCACGCACACCTGC-3' и *tpCopC*-SUMO-R. 5'-AAAAATCTAGATCAGTGGCTCGAGGCGGTC – 3' (сайты рестрикции BsaI и XhoI подчеркнуты). После расщепления BsaI и XhoI проводили лигирование продукта ПЦР в полилинкер pE-SUMO. Вместо нативной последовательности N-концевого сигнального пептида была введена метка (His)₆-SUMO. Полученную конструкцию подтверждали ДНК-секвенированием. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), несущего плазмиду pGro7, обеспечивающую экспрессию молекулярных шаперонов groEL и groES под контролем арабинозного промотора. Клетки выращивали в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (34 мкг/мл) и арабинозу (0,04%), при 37°C, 180 об/мин до A₆₀₀=0,7. Экспрессию *tpCopC* индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,2 мМ и инкубировали клетки при температуре 20°C, 150 об/мин в течение ночи.

Очистку *tpCopC* проводили по методике, описанной выше для TcDH. Но вместо TEV-протеазы, добавляли SUMO-протеазу (из расчета 1 мг SUMO-протеазы на 100 мг белка) и инкубировали 2 часа при 30°C. На последней стадии очистки *tpCopC* наносили на колонку Superdex 75 10/300 (Cytiva, США) (0,7 мл/мин, 0,4 МПа), уравновешенную 25 мМ MOPS, рН 7,4, 150 мМ NaCl. Гомогенность образца *tpCopC* анализировали методом SDS-PAGE.

Автор выражает благодарность с.н.с., к.х.н. Ракитиной Т. В. ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и н.с., к.х.н. Дергоусовой Н. И. ФИЦ Биотехнологии РАН за получение генно-инженерных конструкций.

2.4. Насыщение TcDH ионами металлов

Для восстановления ферментативной активности, т.е. активации, апо-TcDH (50 мкМ) инкубировали с 4 эквивалентами ионов Cu(II)/Cu(I). Ионы Cu(I) получали реакцией восстановления аскорбатом натрия непосредственно в растворе. Для изучения кинетики активации измеряли активность TcDH после добавления ионов Cu(II)/Cu(I) во времени. Измерение активности проводили, как описано в разделе 2.5. По достижении максимальной

активности образцы TcDH диализовали против 25 мМ боратного буфера, pH 9,5 в течение ночи, чтобы удалить из раствора несвязавшиеся ионы меди.

Насыщение апо-TcDH ионами Zn(II) проводили в условиях 6-кратного молярного избытка ионов в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5. Инкубацию проводили в течение ночи при 4°C, затем образец диализовали для удаления несвязавшихся ионов цинка.

Содержание металла в образцах определяли методом ICP-MS на спектрометре ICP Bruker Aurora M90 (Bruker, США).

2.5. Определение ферментативной активности TcDH

Ферментативную активность TcDH определяли по скорости восстановления акцептора электронов на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (Agilent Technologies, США). В качестве акцептора электронов в реакции окисления тиоцианата использовали $K_3[Fe(CN)_6]$ ($\epsilon_{420} = 1040 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) или цитохром c550 из сердца лошади ($\epsilon_{550} = 22500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Реакционная смесь содержала 25 мМ боратный буфер, pH 9,5, 6 мМ SCN^- , 1 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ или 50 мкМ цитохром c550, 10-50 нМ TcDH. Объем реакционной смеси составлял 1 мл. Все измерения проводили в пластиковой кювете с длиной пути 1 см при постоянной температуре 30°C. Начало реакции инициировали добавлением фермента. Для измерения константы Михаэлиса (K_M) по тиоцианату варьировали концентрацию тиоцианата (0-20 мМ) при стандартных концентрациях других компонентов.

Измерение активности TcDH с цитохромами c552 и c546/556 в качестве акцепторов электронов проводили в тех же условиях, но скорость восстановления цитохрома c552 измеряли при 552 нм ($\epsilon_{552} = 8400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), а цитохрома c546/556 – при 556 нм ($\epsilon_{556} = 14200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Для определения pH-оптимума ферментативной реакции с цитохромом c552 использовали 50 мМ MOPS, pH 6,5–8 и 25 мМ боратный буфер, pH 8–11,5.

Все кинетические измерения проводили в нескольких повторностях (не менее трех). Удельную активность рассчитывали как количество превращенного субстрата (в мкмоль) за единицу времени (мин) на 1 мг белка.

2.6. Удаление ионов меди из TcDH

Для удаления ионов меди из активного центра к активированному $(Cu)_3$ -TcDH (50 мкМ) добавляли 3-30 эквивалентов лигандов Cu(II) (EDTA, HEDTA, His и Gly) или 6-60 эквивалентов лигандов Cu(I) (Vcs, Vca и Fz). Некоторые свойства лигандов в комплексе с Cu(II)/Cu(I) представлены в **Табл. 2**. Разные соотношения лигандов мы использовали, исходя из стехиометрии их комплексов с ионами Cu(II)/Cu(I), которые указаны в **Табл. 2**.

Для изучения кинетики инактивации измеряли активность TcDH (как описано в разделе 2.5) во времени. Препараты на протяжении кинетических экспериментов по инактивации посредством удаления ионов меди хранились при 4°C в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5.

Таблица 2. Некоторые свойства комплексов лигандов с металлами.

Металл	Лиганд	Металл : Лиганд	$\epsilon_{\text{лим}}, \text{M}^{-1} \times$ см^{-1}	$\log K_D$ при pH 7,4	$\log K_D$ при pH 9,5	Ссылка
Cu(II)	EDTA	1 : 1	-	-15,9	-18	[146]*
	ZI	1 : 1	$\epsilon_{599} = 26000$	-16,3	-17,8	[147]
	HEDTA	1 : 1	-	-14,9	-16,9	[146]*
	His	1 : 1; 1 : 2	-	-8,4; -6,2	-10,0; -7,7	[146]*
	Gly	1 : 1; 1 : 2	-	-6,0; -4,7	-7,9; -6,6	[146]*
Zn(II)	ZI	1 : 1	$\epsilon_{618} = 27730$	-5,7	-8,2	[147]
Металл	Лиганд	Металл : Лиганд	$\epsilon_{\text{лим}}, \text{M}^{-1} \times$ см^{-1}	$\log \beta_2$ при pH 7,4	$\log \beta_2$ при pH 9,5	Ссылка
Cu(I)	Bcs	1 : 2	$\epsilon_{483} = 13000$	19,8	19,8	[137]
	Bca	1 : 2	$\epsilon_{562} = 7900$	17,2	17,2	[137]
	Fz	1 : 2	$\epsilon_{470} = 4320$	15,1	15,1	[62]

Примечание. *Из базы данных были взяты значения абсолютной константы образования ($^{\text{abs}}K_A$), а также первой и второй констант протонирования ($K^{H_{A1}}$ и $K^{H_{A2}}$) и рассчитаны K_D при pH 9,5 с помощью уравнения [148]: $K_D = (^{\text{abs}}K_A)^{-1} \times (1 + 10^{\text{p}K_{a1} - \text{pH}} + 10^{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2} - 2\text{pH}})$.

2.7. Определение стехиометрии и аффинности связывания исследуемых белков с ионами металлов

Стехиометрию и аффинность связывания ионов металлов с исследуемыми белками определяли методами прямого и конкурентного титрования. При прямом титровании к исследуемому белку добавляли ион металла и определяли концентрацию образовавшегося комплекса. При конкурентном титровании оценивали распределение ионов металла между исследуемым белком и лигандом, образующим хорошо охарактеризованный комплекс с ионами металла.

2.7.1. Определение стехиометрии методом прямого титрования

Формирование комплекса исследуемого белка с ионами металла при прямом титровании фиксировали по тушению триптофановой флуоресценции. Триптофаны в составе белков обладают выраженной флуоресценцией, которая изменяется в зависимости от окружения. Данное свойство используется для изучения связывания целевого белка с различными лигандами, как низкомолекулярными (в частности, ионы металлов), так и высокомолекулярными (белки) [149]. Оба исследуемых белка, TcDH и *trCopC*, имеют триптофаны в последовательности, расположенные в пределах 13 Å от сайта связывания ионов металл. Поэтому мы проводили титрование белков стандартным раствором Cu(II) и измеряли интенсивность флуоресценции триптофанов. Эксперименты проводили на спектрофлуорофотометре RF-5301PC (Shimadzu, Japan) при комнатной температуре.

Для определения стехиометрии комплекса и изучения процесса встраивания ионов Cu(II) в активный центр TcDH во времени была приготовлена серия растворов апо-TcDH (0,5 мкМ) с возрастающими концентрациями Cu(II) (0-3 μМ) в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5. Спектры флуоресценции снимали после 5 мин и на 3 день, когда было установлено полное равновесие реакции. Спектры регистрировали в диапазоне 310-400 нм при длине волны возбуждения 295 нм с шириной щели 15 нм для возбуждения и 5 нм для эмиссии, соответственно.

Препарат *trCopC* перед экспериментами по титрованию дополнительно обрабатывали 1 мМ EDTA и/или 1 мМ Вcs с 1 мМ аскорбата для полного удаления ионов меди, которые могли связаться в ходе выделения. Для разделения *trCopC* и EDTA/Вcs препарат диализовали или наносили на гель-фильтрационную колонку. Титрование апо-*trCopC* (5 мкМ) проводили стандартным раствором Cu(II) в 25 мМ MOPS, pH 7,4. После каждого добавления аликвоты Cu(II) раствор инкубировали 5-10 мин. Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 295-400 нм при длине волны возбуждения 280 нм с одинаковой шириной щели 10 нм для возбуждения и эмиссии. Для исключения эффекта разбавления контрольный образец апо-*trCopC* титровали 25 мМ MOPS, pH 7,4.

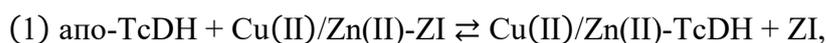
2.7.2. Определение аффинности и стехиометрии методом конкурентного титрования

2.7.2.1. Определение аффинности TcDH к ионам Cu(II) и Zn(II) с использованием ZI

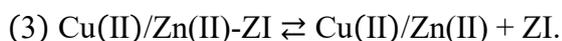
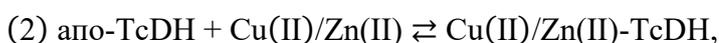
Аффинность TcDH к ионам Cu(II) и Zn(II) определяли с использованием лиганда ZI, который образует хорошо охарактеризованный окрашенный комплекс с этими металлами. Некоторые свойства комплексов Cu(II)-ZI и Zn(II)-ZI представлены в **Табл. 2**. Поскольку равновесие обменной реакции между TcDH и Cu(II)/Zn(II)-ZI устанавливалось долго, была

приготовлена серия растворов Cu(II)-ZI (5,5 мкМ Cu(II); 10 мкМ ZI) или Zn(II)-ZI (4,5 мкМ Zn(II); 10 мкМ ZI) с возрастающими концентрациями апо-ТсДН (0-50 мкМ) в 25 мМ боратном буфере рН 9,5. Неполное насыщение сайтов ZI в этих растворах позволяет нивелировать вклад свободных ионов металла в конкурентном процессе. Достижение равновесия реакции обмена определялось по стабилизации спектров этих растворов, которые регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio. В случае с Cu(II)-ZI и апо-ТсДН спектры стабилизировались через 3 дня. Концентрация Cu(II)-ZI в каждой пробе определялась по поглощению с использованием $\varepsilon_{599} = 26000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ (Табл. 2). В случае с Zn(II)-ZI и апо-ТсДН спектры стабилизировались через 1 день инкубации и концентрация Zn(II)-ZI в каждой пробе измерялась по поглощению с помощью $\varepsilon_{618} = 27730 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ (Табл. 2). В качестве контроля измеряли концентрацию свободной формы ZI ($\varepsilon_{488} = 26900 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) [150], которая медленно деградировала в ходе эксперимента.

Обменный процесс между апо-ТсДН и Cu(II)/Zn(II)-ZI описывается следующей реакцией в том случае, если в нем участвует один металл-связывающий сайт ТсДН:



которая состоит из двух реакций:



Константа равновесия (K_{ex1}) реакции (1) может выражаться следующим образом:

$$(4) K_{\text{ex1}} = \frac{[\text{Cu(II)/Zn(II)-ТсДН}][\text{ZI}]}{[\text{апо-ТсДН}][\text{Cu(II)/Zn(II)-ZI}]} = \frac{K_D(\text{Cu(II)/Zn(II)-ZI})}{K_D(\text{Cu(II)/Zn(II)-ТсДН})}.$$

Получив экспериментальные равновесные значения Cu(II)/Zn(II)-ZI и зная исходные концентрации апо-ТсДН и Cu(II)/Zn(II)-ZI, мы рассчитали равновесные концентрации всех компонентов с помощью баланса масс и получили значение константы равновесия реакции K_{ex1} . Далее рассчитывали $K_D(\text{Cu(II)/Zn(II)-ТсДН})$ для одного сайта ТсДН по уравнению с использованием известного значения $K_D(\text{Cu(II)/Zn(II)-ZI})$, указанного в Табл. 2:

$$(5) K_D(\text{Cu(II)/Zn(II)-ТсДН}) = \frac{K_D(\text{Cu(II)/Zn(II)-ZI})}{K_{\text{ex1}}}, \text{ M}.$$

2.7.2.2. Определение аффинности ТсДН к ионам Cu(II) с использованием His

Аффинность ТсДН к ионам Cu(II) определяли также с использованием His, который обладает меньшей аффинностью по сравнению с ZI (Табл. 2). His формирует с Cu(II) как комплекс Cu(II)-His, так и комплекс Cu(II)-(His)₂, которые не поглощают в видимой

области. Равновесие обменного процесса устанавливалось в течении 14 дней, поэтому была приготовлена серия растворов насыщенного медью $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$ (50 нМ) с возрастающими концентрациями His (0-1500 нМ) в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5. Равновесие обменной реакции между $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$ и His фиксировали по стабилизации ферментативной активности. Активность измеряли как описано в разделе 2.5. В качестве контроля инкубировали образец $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$ в отсутствии His и измеряли его активность.

Из расчета, что His удаляет один ион меди из $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$, $K_D(\text{Cu(II)-TcDH})$ была определена с помощью следующих уравнений, как было описано в [148]:

$$(6) [\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}] = \frac{[\text{Cu(II)}]_{\text{tot}} - [\text{Cu(II)-TcDH}]}{K_{A1}[\text{His}] + K_{A1}K_{A2}[\text{His}]^2},$$

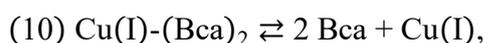
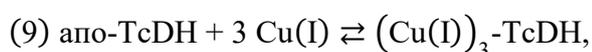
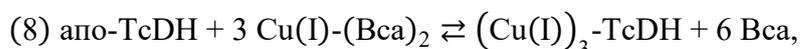
$$(7) \frac{[\text{Cu(II)-TcDH}]}{[\text{TcDH}]_{\text{tot}}} = \frac{[\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}]}{K_D(\text{Cu(II)-TcDH}) + [\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}]},$$

где $[\text{Cu(II)-TcDH}]$ оценивали, как концентрацию активного фермента ($(v/v_{\text{max}}) \times [\text{TcDH}]_{\text{tot}}$), K_{A1} и K_{A2} – константы ассоциации комплексов His с Cu(II), указанные в **Табл. 2**, а $[\text{His}]$ – равновесная концентрация свободного His.

2.7.2.3. Определение аффинности и стехиометрии TcDH к ионам Cu(I) с использованием Vcs/Vca

Стехиометрию и аффинность связывания TcDH с ионами Cu(I) определяли с использованием лигандов Vcs и Vca, формирующих с Cu(I) окрашенные комплексы $[\text{Cu(I)-(Vcs/Vca)}_2]^{3-}$ (**Табл. 2**). Эксперименты проводили в анаэробном боксе (Belle Technology, Великобритания) в атмосфере 100% N_2 в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5. В эксперименте была приготовлена серия растворов Vcs (27 мкМ) или Vca (35 мкМ) с возрастающими концентрациями Cu(II) (0-50 мкМ) в присутствии 1 мМ аскорбата натрия. После связывания всех восстановленных ионов меди с лигандом и формирования комплекса $[\text{Cu(I)-(Vcs/Vca)}_2]^{3-}$, к образцам добавляли апо-TcDH (5 мкМ). После инкубации в течении 20-30 мин регистрировали стабильные спектры поглощения образцов на спектрофотометре Lambda XLS+ (PerkinElmer Inc., США).

Оценка аффинности связывания TcDH с Cu(I) была основана на следующих уравнениях, где $\beta_2(\text{Cu(I)-(Vca)}_2)$ известная константа образования комплекса (**Табл. 2**):



$$(11) K_{\text{ex2}} = \frac{[(\text{Cu(I)})_3\text{-TcDH}][\text{Bca}]^6}{[\text{apo-TcDH}][\text{Cu(I)-Bca}_2]^3} = \frac{1}{K_D((\text{Cu(I)})_3\text{-TcDH}) \times \beta_2^3(\text{Cu(I)-Bca})_2}, \text{M}^3,$$

$$(12) K_D((\text{Cu(I)})_3\text{-TcDH}) = \frac{1}{K_{\text{ex2}} \times \beta_2^3(\text{Cu(I)-Bca})_2}, \text{M}^3.$$

Для оценки среднего значения K_D на один медный эквивалент рассчитывали кубический корень по уравнению:

$$(13) K_D^{1/3}((\text{Cu(I)})_3\text{-TcDH}) = \sqrt[3]{K_D((\text{Cu(I)})_3\text{-TcDH})}, \text{M}.$$

2.7.2.4. Определение аффинности *tpCopC* к ионам Cu(II) с использованием EDTA/HEDTA

Для определения аффинности *tpCopC* к ионам Cu(II) были использованы лиганды EDTA и HEDTA, формирующие хорошо охарактеризованные комплексы с ионами Cu(II) с высоким сродством (**Табл. 2**). Равновесие реакции устанавливалось в течение 2 часов, поэтому была приготовлена серия растворов Cu(II)-tpCopC (4 мкМ Cu(II) ; 5 мкМ *tpCopC*) с возрастающими концентрациями EDTA (0-25 мкМ)/ HEDTA (0-700 мкМ) в 25 мМ MOPS, pH 7,4. Поскольку комплексы Cu(II) с EDTA/HEDTA не поглощают в видимой области, то за ходом обменной реакции следили по флуоресценции триптофана *tpCopC*, интенсивность которой зависит от связывания Cu(II) в сайте. Спектры флуоресценции образцов регистрировали стандартно, как описано в разделе 2.7.1. Установление равновесия обменной реакции между Cu(II)-tpCopC и EDTA/HEDTA определяли по стабилизации спектров флуоресценции.

Оценка аффинности связывания *tpCopC* с Cu(II) была основана на следующих уравнениях, как описано в [65,148]:



$$(15) [\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}] = \frac{[\text{Cu}]_{\text{tot}} - [\text{Cu(II)-tpCopC}]}{K_A(\text{Cu(II)-EDTA/HEDTA}) \times [\text{EDTA/HEDTA}]},$$

$$(16) [\text{Cu(II)-tpCopC}] / [\text{tpCopC}]_{\text{tot}} = [\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}] / (K_D + [\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}]),$$

$$(17) [\text{Cu(II)-tpCopC}] / [\text{tpCopC}]_{\text{tot}} = (F_0 - F) / (F_0 - F_1),$$

где $[\text{Cu(II)}]_{\text{tot}}$ и $[\text{tpCopC}]_{\text{tot}}$ – суммарные исходные концентрации Cu(II) и *tpCopC*; F_0 , F и F_1 – интенсивность флуоресценции при 327 нм, когда сайт *tpCopC* не связан с ионами Cu(II) , связан с меньше, чем 1 эквивалентом Cu(II) , и связан с 1 эквивалентом Cu(II) , соответственно. K_A комплексов Cu(II)-EDTA/HEDTA указаны в **Табл. 2**. Концентрацию Cu(II)-tpCopC рассчитывали по интенсивности флуоресценции, используя уравнение 17, а

$K_D(\text{Cu(II)}-tp\text{CopC})$ оценивали путем аппроксимации экспериментальных данных с помощью уравнения 16.

2.7.2.5. Определение аффинности $tp\text{CopC}$ к ионам Cu(I) с использованием Fz

Для определения аффинности $tp\text{CopC}$ к ионам Cu(I) был использован лиганд Fz , образующий окрашенный комплекс $[\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-}$. Эксперименты проводили в анаэробном боксе в атмосфере 100% N_2 в 25 мМ MOPS, pH 7,4 в присутствии 1 мМ аскорбата. Раствор $[\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-}$ (50 μM Cu(I) , 135 μM Fz) титровали возрастающими концентрациями апо- $tp\text{CopC}$ (0-125 мкМ). После каждого добавления раствор инкубировали в течении 5 мин до стабилизации спектров поглощения. В качестве контроля, чтобы учесть эффект разбавления, раствор $[\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-}$ (50 μM Cu(I) , 135 μM Fz) титровали буфером. Три независимых титрования были проведены. $K_D(\text{Cu(I)}-tp\text{CopC})$ рассчитывали с использованием уравнения 18, как описано в [151]:

$$(18) 1/K_D^{tp\text{CopC}} = K_A^{tp\text{CopC}} = (\beta_2 C_0 (1-a_{\text{Fz}})(C_1/C_0 - 2a_{\text{Fz}})^2) / (a_{\text{Fz}}(C_2/C_0 - 1 + a_{\text{Fz}})),$$

где C_0 , C_1 и C_2 представляют собой исходные концентрации Cu(I) , Fz и $tp\text{CopC}$, соответственно, β_2 – константа ассоциации комплекса $[\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-}$ (Табл. 2). Концентрация $[\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-}$ была определена из поглощения при 470 нм, а a_{Fz} была рассчитана по следующей формуле: $a_{\text{Fz}} = [\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-} / C_0$. $K_D(\text{Cu(I)}-tp\text{CopC})$ определяли путем решения уравнения 18 для средних значений a_{Fz} при различных концентрациях C_2 .

2.8. Определение константы диссоциации комплекса TcDH и $tp\text{CopC}$ методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК)

Изотермическая титрационная калориметрия (ИТК) позволяет исследовать взаимодействие различных молекул с помощью измерения теплового эффекта, возникающего при связывании лиганда [152].

Термодинамические параметры связывания апо- TcDH и $\text{Cu(II)}-tp\text{CopC}$ определяли в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5 при 25°C на приборе Microcal ITC200 (Malvern, США). Аликвоты $\text{Cu(II)}-tp\text{CopC}$ по 2,6 мкл вводили в ячейку объемом 200 мкл, содержащую апо- TcDH , до достижения полного равновесия связывания. Концентрация TcDH в ячейке составляла 13 мкМ, а концентрация $\text{Cu(II)}-tp\text{CopC}$ в шприце – 230 мкМ. В качестве контроля использовали титрование буфера без белка титрантом, чтобы нивелировать неспецифические эффекты при разбавлении. Полученные кривые титрования анализировали с помощью программы MicroCal Origin для модели с одним центром связывания. Из данных определяли следующие параметры: K_D – константу диссоциации,

ΔH и ΔS – энтропию и энтальпию процесса, а ΔG – энергию Гиббса рассчитывали по уравнению: $\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$. Автор выражает благодарность за проведение ИТК-экспериментов н.с., к.б.н. Куликовой О.Г. ФИЦ Биотехнологии РАН.

2.9. Потенциометрическое титрование цитохромов с

Потенциометрическое титрование осуществляли согласно методике, описанной в статье [153]. Эксперименты проводили в анаэробном боксе в атмосфере 100% N_2 с использованием двух электродов: хлор-серебряный электрод ($Ag/AgCl$) - электрод сравнения и платиновый - электрод измерения. В растворе помимо цитохрома с (10-20 мкМ) присутствовали медиаторы (10 мкМ каждый): 1,4-бензохинон ($E^0 = +280$ мВ), 2,6 - дихлорфенолиндофенол ($E^0 = +220$ мВ), 1,2-нафтохинон-4-сульфоновая кислота ($E^0 = +217$ мВ) и феназинметосульфат ($E^0 = +80$ мВ). Измерения проводили в следующих буферах: 25 мМ ацетатный буфер, рН 3,5, рН 4,5; 25 мМ BIS-TRIS, рН 5,5; 25 мМ MES, рН 6,5; 25 мМ HEPES, рН 7,5; 25 мМ TRIS, рН 8,5; 25 мМ борат, рН 9,5, рН 10,5 содержащих также 150 мМ NaCl. Потенциометрическое титрование осуществляли как в окислительном, так и в восстановительном направлениях, используя $Na_2S_2O_4$ и $K_3[Fe(CN)_6]$ в качестве восстановителя и окислителя, соответственно. К раствору цитохрома с552 или с546/556 добавляли аликвоты восстановителя/окислителя и инкубировали до стабилизации потенциала раствора, т.е. установления состояния равновесия. Затем снимали спектры поглощения на спектрофотометре Lambda XLS+.

Для определения степени восстановления гема рассчитывали разность оптической плотности в максимуме поглощения α -линии и в изобестической точке (для цитохрома с552 – $A_{552} - A_{568}$, для цитохрома с546/556 - $A_{556} - A_{572}$). Измеренные потенциалы отсчитывали от стандартного водородного электрода (СВЭ). Кривые титрования обрабатывали уравнением Нернста для одноэлектронного центра.

2.10. Структурные методы исследования

2.10.1. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)

Структура цитохрома с552 была получена методом ЯМР. ЯМР-исследования проводили на спектрометре Bruker Avance III (Bruker, США). Моделирование комплекса TcDH и цитохрома с552 проводили с использованием интерфейса GURU на веб-сервере HADDOCK 2.4 [154,155]. Электронтранспортный путь для переноса электрона от TcDH к цитохрому с552 моделировали с использованием плагина Pathways [156] для программы

VMD [157]. Автор выражает благодарность г.н.с., д.х.н. Бочарову Е.В. ИБХ им. Шемякина и Овчинникова РАН за проведение полного цикла работ по ЯМР исследованиям.

2.10.2. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

Порядок встраивания ионов меди в активный центр ТсДН определяли с помощью электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В отличие от всех предыдущих экспериментов, которые были проведены с trТсДН, ЭПР-эксперименты проводили также с гомологичным pmТсДН (60% идентичность аминокислотной последовательности) с одинаковым медным центром (r.m.s.d. значение 0.65 Å для структур trТсДН (PDB 6UWE) и pmТсДН (PDB 8Q9X)) [140].

К апо-pmТсДН (181 µM) в 25 mM MOPS, pH 7,5, 150 mM NaCl (апо-pmТсДН) или апо-trТсДН (181 µM) в 25 mM боратном буфере, pH 9,5, 150 mM NaCl (апо-trТсДН) добавляли от 1 до 3 эквивалентов ионов Cu(II) и инкубировали в течение 24 часов. ЭПР-спектры ТсДН регистрировали на радиоспектрометре Elexsys-E680X (Bruker, США). Рабочая частота спектрометра ~ 9.8 ГГц (X-диапазон). Растворы белка охлаждали до 20 К (pmТсДН) и 100 К (trТсДН) с помощью криостата (Oxford Instruments, Великобритания).

Расчет спинового гамильтониана (СГ) и теоретических спектров по полученным экспериментальным данным осуществляли с помощью программы, описанной в [158]. В качестве функции формы линии использовали сумму функций Лоренца и Гаусса [159]. Все спектры trТсДН и спектр pmТсДН с 3 эквивалентами ионов Cu(II) были описаны ромбически-искаженным СГ с зеемановским и сверхтонким взаимодействием (СТВ) центрального иона меди:

$$(19) \text{В} = g_z \beta B_z S_z + g_x \beta B_x S_x + g_y \beta B_y S_y + A_z I_z S_z + A_x I_x S_x + A_y I_y S_y,$$

где g_z, g_x, g_y – z, x, y компоненты g-тензора; S_z, S_x, S_y – проекции оператора спина на координатные оси; I_z, I_x, I_y – проекции оператора ядерного спина меди ($I = 3/2$) на координатные оси; A_z, A_x и A_y – z, x и y компоненты тензора СТВ на ионе меди.

Спектры pmТсДН после инкубации с одним и двумя эквивалентами ионов Cu(II) были описаны ромбически-искаженным СГ с зеемановским и СТВ центрального иона меди с дополнительным сверхтонким взаимодействием (ДСТВ) с тремя ядерными спинами атомов азота $I^N=1$:

$$(20) \text{В} = g_z \beta B_z S_z + g_x \beta B_x S_x + g_y \beta B_y S_y + A_z I_z S_z + A_x I_x S_x + A_y I_y S_y + \beta \sum_{i=1}^3 (g_z a_{zi}^N I_z^N S_z + g_x a_{xi}^N I_x^N S_x + g_y a_{yi}^N I_y^N S_y),$$

где g_z, g_x, g_y – z, x, y компоненты g -тензора; S_z, S_x, S_y – проекции оператора спина на координатные оси; I_z, I_x, I_y – проекции оператора ядерного спина меди ($I = 3/2$) на координатные оси; A_z, A_x и A_y – z, x и y компоненты тензора СТВ на ионе меди; a_{zi}^N, a_{xi}^N и a_{yi}^N – z, x и y компоненты тензора ДСТВ с i -тым ядром атома азота, $i = 1, 2, 3$.

Параметры всех ЭПР-спектров находили методом наилучшего приближения между экспериментальными и теоретическими спектрами, путем минимизации функционала ошибки:

$$(21) F = \sum_i \frac{(Y_i^T - Y_i^E)^2}{N},$$

где Y_i^E – массив экспериментальных значений интенсивности сигнала ЭПР с постоянным шагом по магнитному полю B , Y_i^T – теоретические значения при тех же значениях поля B , N – число точек.

Автор выражает благодарность за проведение ЭПР-экспериментов и моделирование ЭПР-спектров в.н.с., к.х.н. Ефимову Н. Н., с.н.с., к.х.н. Ротову А. В., с.н.с., к.ф.-м.н. Уголкиной Е. А. (Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН) и м.н.с. Варфоломеевой Л.А. (ФИЦ Биотехнологии РАН).

2.10.3. Рентгеноструктурный анализ

В данной работе рентгеноструктурный анализ использовали для получения пространственных структур Cu(II)-tpCorC при pH 6,6 и pH 4,6. Препарат $tpCorC$, закристаллизованный при pH 4,6, дополнительно не насыщали ионами Cu(II) после выделения, а препарат, закристаллизованный при pH 6,6, был насыщен ионами Cu(II) .

Поиск начальных условий кристаллизации Cu(II)-tpCorC осуществляли с помощью кристаллизационного робота Oryx4 (Douglas Instruments, Великобритания) в 96-луночных планшетах (Art Robbins Instruments, США) методом диффузии паров в «сидячей капле» при 15 °С. В работе для скрининга условий кристаллизации использовали коммерческие наборы кристаллизационных растворов (Hampton Research, США). Объем капли составлял 0,2 мкл при соотношении белка к осадителю 50:50. Для кристаллизации использовали гомогенный раствор Cu(II)-tpCorC (20 мг/мл) в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5.

Для получения более крупных кристаллов проводили оптимизацию условий кристаллизации вручную методом диффузии пара в «висячей капле» в 24-луночных планшетах VDX (Hampton research, США), изменяя концентрацию компонентов в кристаллизационном растворе. Кристаллы Cu(II)-tpCorC были получены при 15°С в 0,2 М формиате аммония, pH 6,6, 20 % ПЭГ 3350 и в 0,1 М тригидрат ацетате натрия, pH 4,6, 2 М сульфате аммония.

Кристаллы Cu(II)-*tpSorC* помещали в раствор, содержащий 20% глицерин в качестве криопротектора. Набор дифракционных данных для кристаллов Cu(II)-*tpSorC* при pH 6,6 был собран на станции BL41XU в Spring-8 (Япония) при 100 К, а для кристаллов Cu(II)-*tpSorC* при pH 4,6 – на станции MASSIF-3 в ESRF (Гренобль, Франция). Данные обработаны с помощью программы DIALS [160]. Статистика сбора рентгеновских данных представлена в Табл. 3.

Таблица 3. Статистика сбора данных и уточнения структуры Cu(II)-*tpSorC*.

	Cu(II)- <i>tpSorC</i> при pH 6,6	Cu(II)- <i>tpSorC</i> при pH 4,6
Сбор данных		
Станция	BL41XU, SPring-8 (Япония)	MASSIF-3, ESRF (Гренобль, Франция)
Детектор	Eiger 16M	Eiger X 4M
Длина волны, Å	0.9999	0.9677
Температура, К	100	100
Пространственная группа	P2 ₁	P2 ₁
a, b, c, Å	28.24, 38.27, 104.67	28.08, 144.79, 55.36
β , °	90.33	90.07
Разрешение, Å	104.66-1.80 (1.84-1.80)	55.35-1.70 (1.73-1.70)
Полнота данных, %	99.5 (85.8)	98.2 (95.9)
Повторяемость	6.5	4.2
I/ σ (I)	6.4 (1.8)	7.7 (1.8)
R _{meas} , %	14.0 (79.8)	9.9 (70.0)
CC _{1/2} , %	99.5 (85.8)	99.5 (81.4)
Уточнение		
R _{cryst} , %	18.5	18.5
R _{free} , %	22.8	23.0
Степень двойникования	1.0	0.54/0.46
Cruickshank DPI	0.142	0.026
ML position error, Å	0.127	0.056
Среднеквадратичные отклонения		
Длины связей, Å	0.011	0.015
Валентные углы, °	1.975	2.148
Число неводородных атомов		
Белок	1926	3842
Лиганды	32	21
Растворитель	101	186
Общий средний В-фактор		
Средний В-фактор по белку	25.5	22.3
Средний В-фактор по растворителю	34.4	23.7
Код PDB	8YTR	8YTQ

Кристаллографические расчеты проводили с помощью пакета CCP4 [160]. Структуры Cu(II)-*tpSorC* были решены методом молекулярного замещения с помощью

программы MOLREP [161] с использованием структуры *tpSorC* (PDB 5N1T) в качестве стартовой модели. Уточнение модели проводилось с помощью программы REFMAC5 [162]. На последних циклах уточнения ионы меди уточняли в анизотропном приближении В-факторов. Ручная коррекция модели проводилась с помощью графической программы COOT [163]. Анализ кристаллических контактов проводился с использованием PISAePDB [164]. Статистика уточнений представлена в **Табл. 3**.

Автор выражает благодарность за проведение рентгеноструктурного анализа с.н.с., к.б.н. Бойко К.М. и м.н.с. Варфоломеевой Л.А. ФИЦ Биотехнологии РАН.

2.11. Молекулярное моделирование

Координаты атомов для молекулярно-динамического моделирования были взяты из кристаллической структуры Cu(II)-tpSorC (PDB ID 8YTR). Моделирование связывания иона Cu(I) в медь-связывающем сайте *tpSorC* было проведено методом MD (молекулярная динамика) QM/MM (квантовая механика/молекулярная механика). Автор выражает благодарность профессору, д.ф.-м.н. Хреновой М. Г. (МГУ им. Ломоносова, ФИЦ Биотехнологии РАН) за проведение молекулярного моделирования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Кинетические свойства реакции, катализируемой TcDH

3.1.1. Получение и очистка рекомбинантного препарата TcDH

Первичная последовательность рекомбинантного препарата TcDH состояла из 471 аминокислоты без 77 N-концевых остатков, включающих Tat-сигнальный пептид (согласно данным программы SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)). Рассчитанная молекулярная масса и изоэлектрическая точка (pI) зрелого белка равны 51977 Да и 4,89, соответственно. Рекомбинантный препарат TcDH экспрессировали в клетках *E. coli* с His₆-тагом на N-конце. Выделение проводили из клеточного лизата с помощью металл-хелатной хроматографии, после чего отщепляли His₆-таг и проводили повторную хроматографию на Ni-NTA колонке. Последнюю стадию очистки проводили методом гель-фильтрации: объем элюции TcDH соответствовал димеру (Рис. 21, а). Гомогенность препарата фермента была подтверждена с помощью SDS-PAGE (Рис. 21, б). Содержание ионов меди в полученном препарате TcDH составляло $0,05 \pm 0,01$ ионов на субъединицу (по данным ICP-MS), а ферментативная активность - $0,03 \pm 0,01$ мкмоль \times мин⁻¹ \times мг⁻¹.

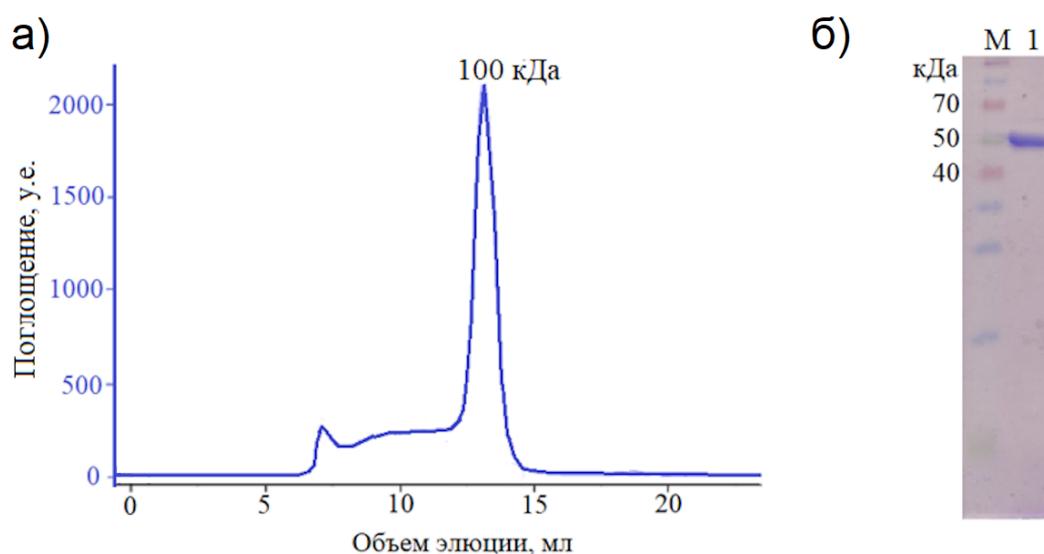


Рис. 21. Характеристика рекомбинантного препарата TcDH. а) Хроматограмма гель-фильтрации рекомбинантного препарата TcDH на колонке Superdex 200 10/300 в 25 мМ боратном буфере, рН 9,5, содержащего 150 мМ NaCl. б) Электрофореграмма рекомбинантного препарата TcDH (1), М – маркеры молекулярной массы.

Для восстановления активности, т.е. активации фермента, апо-TcDH инкубировали с 4х кратным избытком ионов Cu(I), затем проводили диализ для удаления несвязавшихся ионов меди. Ионы Cu(I) получали восстановлением ионов Cu(II) аскорбатом натрия *in situ*, со стехиометрией этой реакции 1 к 1. На следующем этапе работы были охарактеризованы

кинетические параметры реакции TcDH с использованием нефизиологических акцепторов электронов *in vitro*, а также были проведены поиск и характеристика потенциальных физиологических акцепторов электронов из бактерии *Tv. paradoxus*.

3.1.2. Кинетические параметры реакции TcDH с нефизиологическими акцепторами электронов

Для активного препарата (Cu)₃-TcDH были охарактеризованы кинетические параметры реакции окисления тиоцианата с использованием нефизиологических акцепторов электронов *in vitro* цитохрома c550 из сердца лошади ($E_0 = +260$ мВ) и K₃[Fe(CN)₆] ($E_0 = +420$ мВ). Кинетические параметры ферментативной реакции представлены в Табл. 4.

Таблица 4. Кинетические параметры реакции TcDH с нефизиологическими акцепторами электронов.

Акцептор электронов	v_{max} , $\mu\text{MOL} \times \text{MIN}^{-1} \times \text{MG}^{-1}$	K_m (SCN ⁻), мМ
цитохром c550	$10,1 \pm 0,3$	$1,27 \pm 0,07$
K ₃ [Fe(CN) ₆]	$10,7 \pm 0,2$	$1,00 \pm 0,05$

3.1.3. Потенциальные физиологические акцепторы электронов реакции, катализируемой TcDH

В ходе каталитического цикла TcDH происходит окисление тиоцианата до цианата и элементарной серы, а также образуются два электрона. В клетке электроны должны передаваться акцептору электронов. В ходе выделения нативного препарата из периплазматической фракции бактерий *Tv. paradoxus* два цитохрома с очищались вместе с TcDH на последней стадии. Методом MALDI-TOF MS один из цитохромов был идентифицирован как белок WP_006748979.1 (цитохром c552), ген которого находится рядом с геном, кодирующим TcDH (Рис. 20, в). Гены гомологичных белков были обнаружены в геномах бактерий рода *Thioalkalivibrio*, содержащих TcDH [165]. Другой цитохром, идентифицированный MALDI-TOF MS как WP_006746912.1 (цитохром c546/556), не находится в одном генном кластере с TcDH в геноме *Tv. paradoxus*.

3.1.3.1. Цитохром c552

Анализ первичной последовательности показал, что цитохром c552 имеет гем-связывающий мотив CVRCH, 26 остатков сигнального пептида (по данным программы SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)) и несколько повторов

методом металлоаффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией. Гомогенность препарата подтверждали SDS-PAGE (**Рис. 22, б**).

Цитохром с552 имел типичные для цитохромов с-типа спектры в видимой области с максимумами поглощения при 411 нм (линия Soret или γ -) и при 528 нм (Q-линия) в окисленном состоянии и максимумами поглощения при 417 нм (линия Soret или γ -), при 522 нм ($Q_v(\beta)$ -линия) и 552 нм ($Q_0(\alpha)$ – линия) в восстановленном состоянии (**Рис. 22, в**). Также у окисленной формы цитохрома имелся небольшой максимум при 695 нм, характерный для гема с с координирующим остатком Met (**Рис. 22, в, вставка**). Коэффициент экстинкции (ϵ) цитохрома с552 был определен как $\epsilon_{552} = 8400 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ с помощью пиридинового метода.

Определение окислительно-восстановительного потенциала цитохрома с552 проводили методом потенциометрического титрования с контролем поглощения α -полосы при 552 нм при трех различных значениях pH – 7,5, 8,5 и 9,5 (**Рис. 22, г**). Значения редокс потенциала цитохрома с552 ($162,1 \pm 0,5$ мВ при pH 7,5; $152,8 \pm 0,5$ мВ при pH 8,5 и $164,1 \pm 0,3$ мВ при pH 9,5) практически не менялись в исследуемом диапазоне pH.

Для характеристики цитохрома с552 как акцептора электронов для ТсДН определяли скорость ферментативной реакция окисления тиоцианата. Ферментативная активность ТсДН при pH 9,5 с цитохромом с552 составила $7,3 \pm 1,1$ мкмоль \times мин⁻¹ \times мг⁻¹, что доказывает возможность цитохрома с552 принимать электроны в ходе реакции, катализируемой ТсДН. Полученное значение активности незначительно ниже в сравнении со значениями с нефизиологическими акцепторами электронов, которые составили $10,1 \pm 0,3$ и $10,7 \pm 0,2$ мкмоль \times мин⁻¹ \times мг⁻¹ для цитохрома с550 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (**Табл. 4**).

pH-оптимум активности ТсДН с акцептором цитохромом с552 был при pH 9,5 (**Рис. 22, д**). Это значение pH соответствует pH среды обитания организма-хозяина *Tv. paradoxus*. Такое же значение оптимума ферментативной реакции наблюдалось и для других использованных в работе акцепторов электронов – цитохрома с550 из сердца лошади и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (**Рис. 22, д**). При использовании цитохромов с550 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в качестве акцепторов электронов pH-зависимости скорости реакции ТсДН имели колоколообразную форму, рКа кислой и щелочной ветвей которой равны 8,5 и 10,5. Эти значения рК связывали с протонированием/депротонированием важных каталитических остатков His и Lys в активном центре ТсДН [139]. На графике pH-зависимости активности ТсДН с цитохромом с552 появляется дополнительное плечо в более кислой области pH (**Рис. 22, д**).

Структуру цитохрома с552 определили методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии. Цитохром с552 имеет глобулярную часть, состоящую из 5 α -спиралей (остатки 24-132), где формируется гем-связывающий карман (**Рис. 23, а**), и N- (остатки 1-

23) и С- концевые (остатки 133-153) неупорядоченные участки, обогащенные остатками His (Рис. 22, а). С помощью подхода HADDOCK (High Ambiguity Driven Beel-Protein Docking) – белок-белкового докинга, основанного на анализе изменений химического сдвига при титровании цитохрома с552 ТсДН, был картирован участок взаимодействия ТсДН и цитохрома с552 (Рис. 23, а). С помощью плагина Pathways был предложен путь переноса электронов от восстановленного иона сайта Cu₂ к гему цитохрома с552, который включает Н528, координирующий ион Cu₂, Y164, расположенный в петле 157-164 ТсДН, и Н83, расположенный в α3-спирали цитохрома с552 и связанный водородной связью с пропионатными группами гема с. (Рис. 23, б)

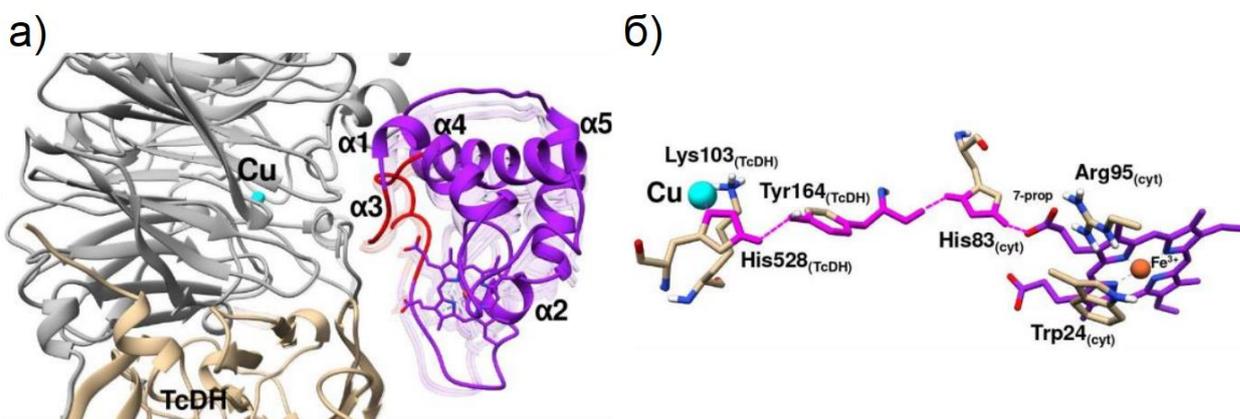


Рис. 23. а) Структура комплекса ТсДН (мономеры окрашены серым и светло-коричневым цветом) - цитохром с552 (окрашен фиолетовым цветом). Наложенные структуры первого этапа моделирования показаны полупрозрачной лентой. б) Прогнозируемый для комплекса ТсДН – цитохром с552 путь передачи электрона от восстановленного иона сайта Cu₂ ТсДН к железу гема цитохрома с552.

3.1.3.2. Цитохром с546/556

В ходе очистки нативного ТсДН из периплазматической фракции клеток *Tv. paradoxus* на последней стадии гель-фильтрации очищалось совместно еще несколько белков, в том числе и цитохром с546/556 с молекулярной массой около 10 кДа. Одновременная очистка при выделении белков в некоторых случаях может свидетельствовать о том, что белки образуют специфичные комплексы в клетке для выполнения определенной функции. В связи с этим, мы проверили способность цитохрома с546/556 выступать в роли акцептора электронов ТсДН в реакции окисления тиоцианата.

Нативный цитохром с546/556 был выделен из бактерии *Tv. paradoxus*. Анализ аминокислотной последовательности цитохрома показал, что белок состоит из 105 аминокислот, включает Sec-сигнальную последовательность из 22 аминокислот на N-конце (по данным программы SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)) и

содержит 1 гем-связывающий мотив CLSCH. Рассчитанные молекулярная масса и изоэлектрическая точка зрелого белка составили 9400 Да и 4,7, соответственно. Гомогенность препарата подтвердили с помощью SDS-электрофореза (Рис. 24, а). Цитохром с546/556 в растворе является мономером (Рис. 24, б).

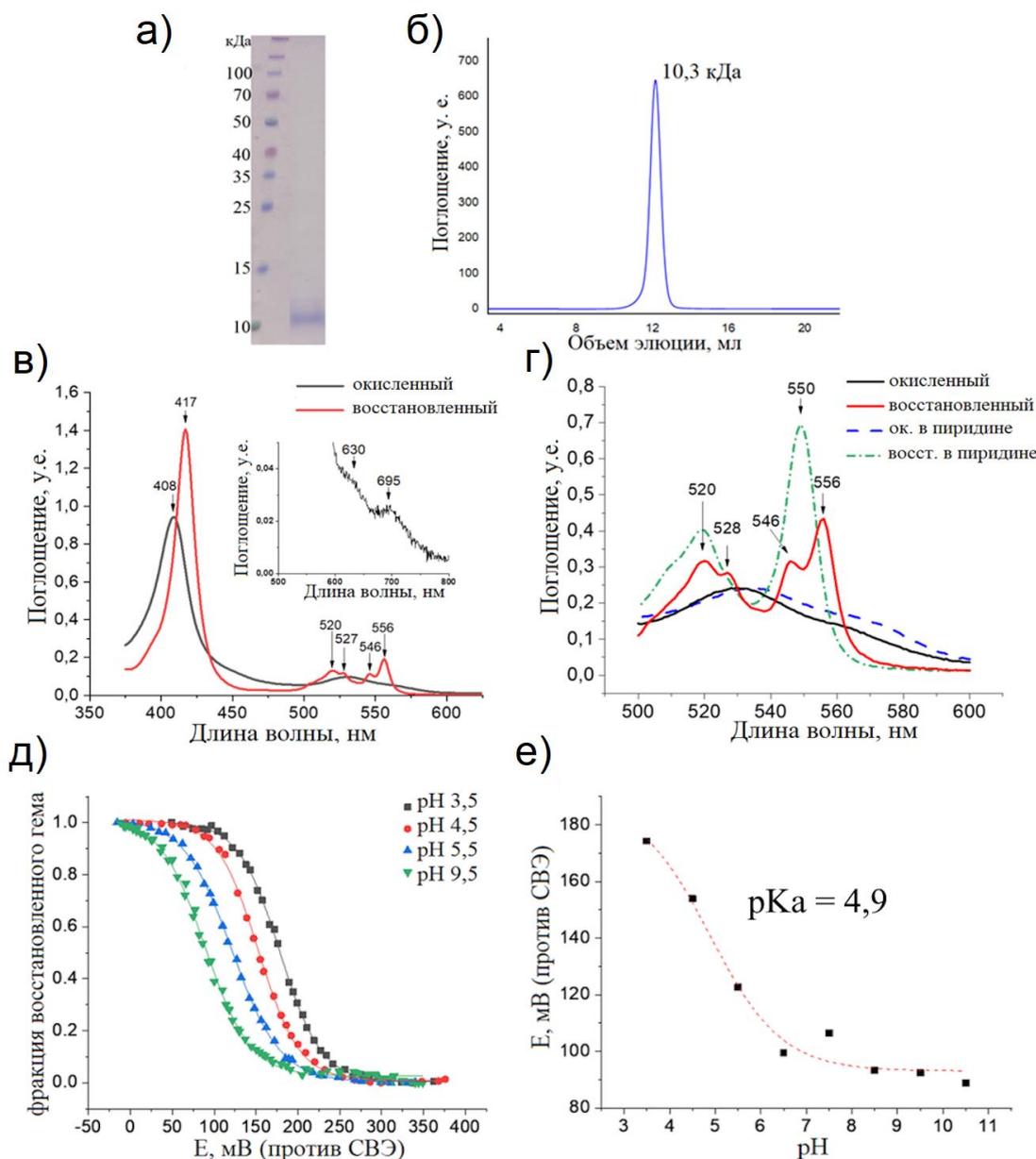


Рис. 24. Характеристика нативного цитохрома с546/556. а) Электрофореграмма цитохрома с546/556 (окрашивание Кумасси G-250). На первой дорожке маркеры молекулярной массы. б) Хроматограмма цитохрома с546/556 в 25 мМ боратном буфере, рН 9,5, 150 мМ NaCl. Основной пик соответствует мономеру. в) Видимый спектр поглощения окисленного (черная линия) и восстановленного (красная линия) цитохрома с546/556 в 25 мМ борате, рН 9,5, 150 мМ NaCl при температуре 25°C. На вставке показан пик при 695 нм, характерный для Мет-координированных гемов с. г) Спектры поглощения в области $Q_V(\beta)$ и $Q_0(\alpha)$ -линий окисленной и восстановленной форм цитохрома с546/556 в 25 мМ борате, рН 9,5, 150 мМ NaCl и в щелочном пиридиновом буфере. д) Кривые потенциометрического титрования цитохрома с546/556 при разных рН (потенциалы приведены по отношению к стандартному водородному электроду (СВЭ)). е) рН-зависимость редокс-потенциала цитохрома с546/556.

Анализ гомологичных белков с помощью сервера BLAST показал, что на основании идентичности аминокислотных последовательностей цитохром с546/556 можно отнести к классу IC [166]. Ближайшими гомологами цитохрома с546/556 с известной пространственной структурой являются цитохром *psc552* из *Pseudomonas nautica* (степень гомологии – 44%) [167], цитохром с554 из *Vibrio parahaemolyticus* (41%) [168], цитохром с553 из *Desulfovibrio vulgaris* (37%) [169], а также дигемовый цитохром с4 из *Pseudomonas aeruginosa* (35%) [170].

Цитохром с546/556 в окисленной форме обладал спектром поглощения, характерным для низкоспинового гема с координацией His/Met (**Рис. 24, в**) с максимумами поглощения при 408 нм (линия Soret или γ -), при 530 нм (Q-линия) и небольшим пиком при 695 нм, который характерен для Met-координированных гемов [171]. Небольшое плечо, обнаруженное в спектре окисленного цитохрома в области ~630 нм (**Рис. 24, в**), может быть связано с присутствием в образце примеси высокоспиновой формы [171]. Смесь низкоспинового основного состояния гема с небольшой примесью высокоспинового гема была обнаружена для гомологичных дигемовых цитохромов с4 [170,172]. Спектр оставался неизменным в интервале pH 3,5-10,5, а значит координация гема остатками Met и His в аксиальных положениях не изменялась в этом диапазоне pH.

В спектре восстановленного цитохрома с546/556 максимум поглощения Soret-линии находился при 417 нм, однако, Q-линии были нетипичны для одnogемовых цитохромов. Значительное расщепление $Q_v(\beta)$ - и $Q_0(\alpha)$ - линий наблюдалось при комнатной температуре (**Рис. 24, в, г**), с максимумами поглощения при 520/528 нм и 546/556 нм, соответственно. В случае цитохрома с546/556 сдвиг между максимумами $Q_0(\alpha)$ - линии составлял 329 см^{-1} , что больше по сравнению с известными похожими случаями раздвоённых или асимметричных полос у цитохромов с из других организмов ($99 - 197\text{ см}^{-1}$) [173–175]. В спектре, полученном в щелочном пиридиновом буфере, раздвоение линий исчезло, а максимум поглощения $Q_0(\alpha)$ - линии наблюдался при 550 нм (**Рис. 24, г**). Это свидетельствует о том, что цитохром с546/556 относится к с-типу, а его необычные спектральные свойства связаны с влиянием полипептидной цепи на электронные свойства гема. Спектры поглощения цитохрома с546/556 в восстановленном состоянии также не изменялись в диапазоне pH 3,5 - 10,5. Таким образом, изменение общего поверхностного заряда белковой глобулы цитохрома с546/556 при снижении pH (pI (цитохрома с546/556) = 4,7) не оказывало влияния ни на форму спектров, ни на величину расщепления линий в спектре. 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 [176,177]. Таким образом, расщепление линий у цитохрома c546/556 в Q-области видимого спектра свидетельствует об асимметричном окружении гема в структуре. Коэффициент экстинкции (ϵ) цитохрома c546/556 был определен как $\epsilon_{556} = 14200 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ с помощью пиридинового метода.

Потенциометрическая кривая титрования цитохрома c546/556 описывается уравнением Нернста для одноэлектронного переноса с редокс потенциалом $106,5 \pm 1,2 \text{ мВ}$ при pH 7,5 (против стандартного водородного электрода (СВЭ)) (Рис. 24, д). Зависимость редокс потенциала цитохрома c546/556 от pH описывается двухфазной кривой: при pH от 6,5 до 10,5 значение потенциала приблизительно одинаковое и находится в диапазоне $+89 - +107 \text{ мВ}$; при значениях pH ниже 6,5 редокс потенциал цитохрома c546/556 увеличивается и достигает максимального значения $+174,3 \text{ мВ}$ при pH 3,5 с характерным значением $pK_a = 4,9 \pm 0,4$ (Рис. 24, е). Данное значение pK_a приблизительно соответствует значению pI белка и, по-видимому, отражает общее изменение поверхностного заряда глобулы.

Стоит отметить, что большинство гомологов c546/556, как и другие цитохромы класса I, являются более высокопотенциальными (от $+190$ до $+480 \text{ мВ}$) [167,169,170,172,178]. Низкое значение окислительно-восстановительного потенциала можно объяснить общим отрицательным зарядом поверхности цитохрома c546/556 ($pI = 4,7$) при нейтральных значениях pH, в то время как гомологичные цитохромы *psc552* ($pI = 9,2$), c553 ($pI = 9,5$) и c554 ($pI = 9,6$) заряжены положительно [166,179].

Нами было показано, что цитохром c546/556 способен принимать электроны в ходе реакции, катализируемой ТсДН. Максимальная скорость реакции окисления тиоцианата с использованием цитохрома c546/556 в качестве акцептора электронов составляла $10,3 \pm 1,5 \text{ мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$, что сравнимо с другими нефизиологическими акцепторами электронов (Табл. 4).

3.2. Встраивание ионов меди в активный центр ТсДН *in vitro*

3.2.1. Активация ТсДН ионами Cu(II)/Cu(I)

На следующем этапе работы мы оценили скорость активации апо-ТсДН с помощью ионов Cu(II)/Cu(I) . Кинетика активации с помощью ионов Cu(II) значительно отличается от активации с ионами Cu(I) (Рис. 25). 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⁻¹ \times мг⁻¹ и одинаковым содержанием ионов меди на субъединицу $2,5 \pm 0,3$ (ICP-MS).

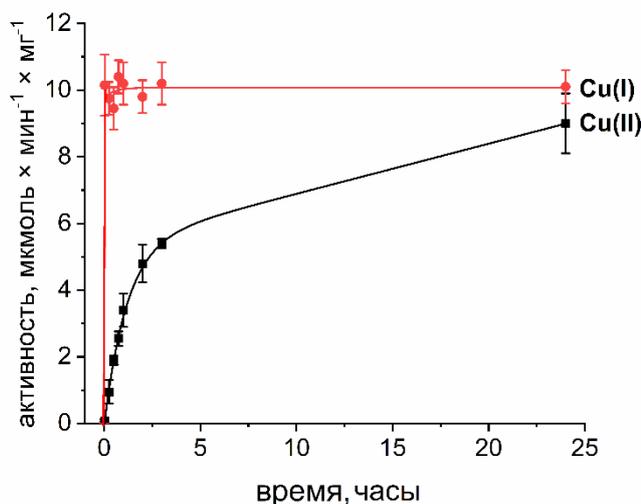


Рис. 25. Кинетика активации рекомбинантного препарата TcDH (50 мкМ) с ионами Cu(II) (черная кривая)/Cu(I) (красная кривая) (200 мкМ) в 25 мМ боратном буфере pH 9,5. Активность измеряли в трех повторностях по стандартной методике, как описано в разделе 2.5.

Вероятной причиной разницы в процессах активации TcDH ионами Cu(II) и Cu(I) является различное строение гидратных оболочек ионов. Для встраивания в активный центр фермента, ионы меди должны пройти через субстратный канал, радиус которого в наиболее узком месте составляет 1,5 Å с учетом ван-дер-ваальсовых радиусов окружающих аминокислотных остатков. В водных растворах ионы Cu(II) образуют комплекс с пятью или шестью молекулами воды (эффективный (стоксов) радиус гидратированного иона составляет 4,1 Å), а ионы Cu(I) – с двумя или четырьмя (эффективный (стоксов) радиус гидратированного иона - 3,3 Å) [180–182]. Таким образом, для прохождения канала необходима дегидратация ионов меди. Вероятно, процесс встраивания ионов Cu(II) является более энергозатратным, поскольку требует удаления большего числа лигандов из гидратной оболочки ионов.

Стоит отметить, что разница в эффективности встраивания ионов меди в разных степенях окисления в активный центр наблюдалась и для других медных ферментов, например, для лакказ [183–185]. У лакказы из бактерии *Bacillus subtilis* происходило неполное насыщение медных сайтов ($2,5 \pm 0,3$ ионов меди из 4 на молекулу белка) при инкубации с Cu(II), а при инкубации с Cu(I) все медные сайты были заполнены ($4,2 \pm 0,7$ ионов меди из 4 на молекулу белка) [183]. Для другой лакказы из *Corioloropsis caperata* с незаполненным T2 центром связывание иона меди в этом центре и появление ферментативной активности было достигнуто только при инкубации с ионами Cu(I) [185].

Добавление восстановителя ускоряло встраивание ионов меди в активный центр апо-тирозины, а значит, ионы Cu(I) встраиваются также быстрее, чем Cu(II) [132]. В связи с чем постулировали, что активные центры перечисленных белков синтезируются *in vivo* за счет включения эквивалентов Cu(I) [132,183,184].

3.2.2. Удаление ионов меди из активного центра TcDH

Для исследования кинетики инактивации посредством удаления ионов меди из активного центра к активному ферменту (Cu)₃-TcDH добавляли лиганды, образующие комплексы с ионами Cu(II)/Cu(I) (**Рис. 26**). Диссоциацию ионов меди из активного центра наблюдали по снижению ферментативной активности.

Установление равновесия процесса инактивации (Cu)₃-TcDH с помощью медь-хелатирующих лигандов занимало несколько суток (**Рис. 26**). При инкубации (Cu)₃-TcDH с Gly снижение активности не наблюдалось (**Рис. 26, а**), что свидетельствует о более высокой аффинности сайтов TcDH к ионам Cu(II) по сравнению с Gly (**Табл. 2**). При инкубации (Cu)₃-TcDH с лигандом His активность снижалась приблизительно на 25%, то есть один или несколько сайтов TcDH демонстрируют аффинность к ионам Cu(II), сравнимую с His (**Табл. 2**). При инкубации (Cu)₃-TcDH с более аффинными к ионам Cu(II) лигандами – EDTA и HEDTA – практически полная инактивация фермента в условиях 3х кратного избытка лигандов происходила только через 14 дней (**Рис. 26, а**). Процесс инактивации (Cu)₃-TcDH с помощью EDTA зависел от концентрации лиганда, так при инкубации с 30 эквивалентами EDTA фермент инактивировался через 7 дней (**Рис. 26, б**). Скорость инактивации фермента зависит от концентрации добавляемого лиганда, следовательно, удаление ионов меди из активного центра TcDH происходит через процесс обмена лигандами. В ином случае, скорость-лимитирующая стадия определялась бы диссоциацией меди из активного центра TcDH и не зависела бы от концентрации лиганда.

Инактивация (Cu)₃-TcDH также происходила при добавлении к ферменту лигандов, формирующих комплексы с ионами Cu(I) (**Рис. 26, в**). При инкубации с 6 эквивалентами Vcs и Vca активность TcDH сначала резко снижалась на 15% и не изменялась в течение двух суток (**Рис. 26, в**). Затем ферментативная активность продолжила снижаться, что говорит об увеличении скорости инактивации фермента. При большей концентрации Vca активность TcDH также падала в течение двух суток на 15%, а дальнейшее увеличение скорости инактивации зависело от концентрации (**Рис. 26, г**), как и в случае с EDTA. Инкубация фермента с Fz незначительно влияла на уровень активности (Cu)₃-TcDH во временных рамках эксперимента (**Рис. 26, в**).

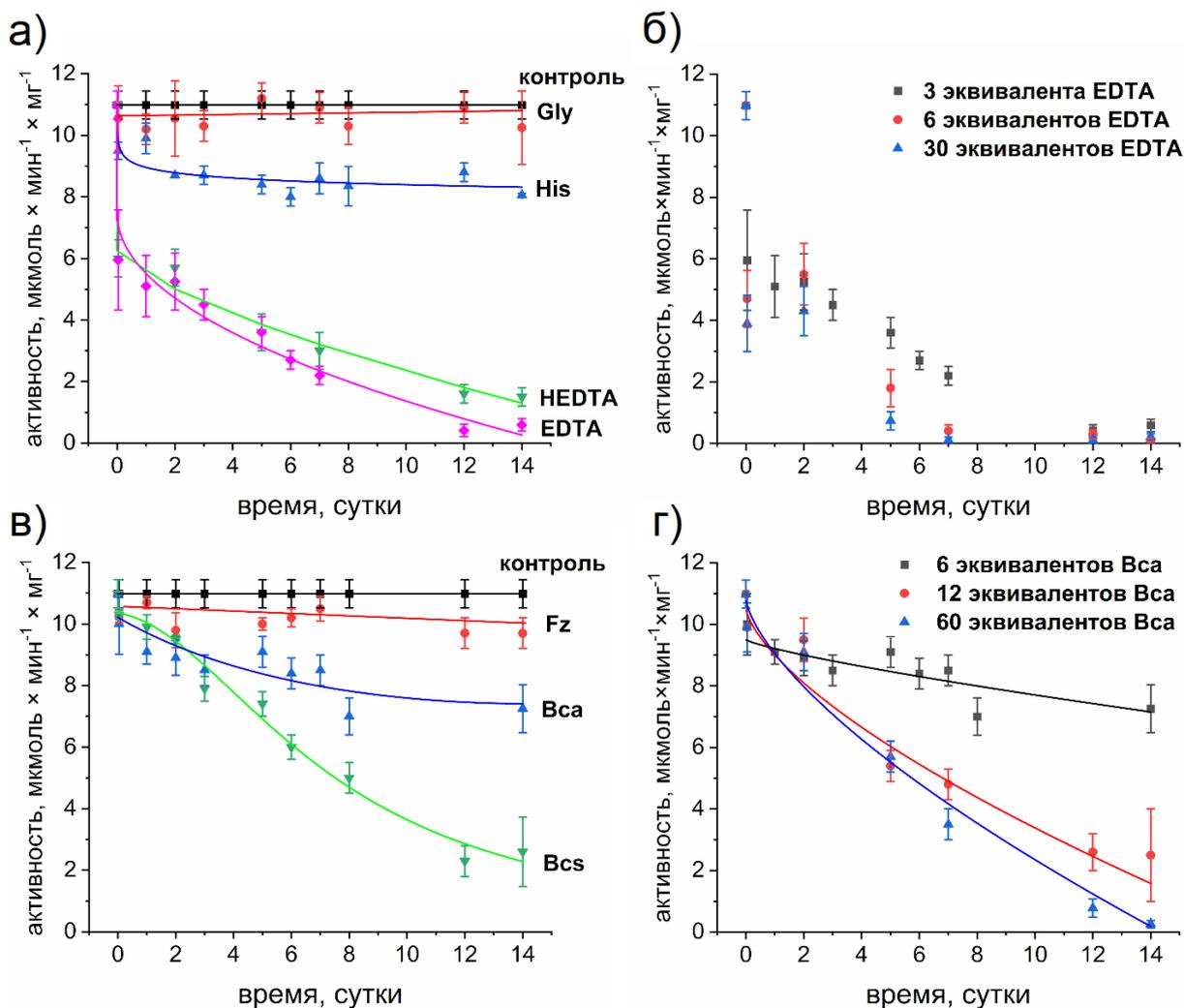


Рис. 26. Кинетика инактивации $(Cu)_3$ -TcDH (50 μ M) при добавлении: а) 3 эквивалентов лигандов Cu(II): Gly (красная кривая), His (голубая кривая), HEDTA (зеленая кривая), EDTA (пурпурная кривая); б) 3-30 эквивалентов EDTA; в) 6 эквивалентов лигандов Cu(I): Fz (красная кривая), Bca (голубая кривая), Bcs (зеленая кривая); г) 6-60 эквивалентов Bca в 25 mM боратном буфере pH 9,5. Контроль без добавления лигандов обозначен черной линией на а) и в). Активность измеряли в трех повторностях по стандартной методике, как описано в разделе 2.5.

Согласно полученным данным, удаление ионов меди из активного центра TcDH является кинетически медленным процессом, что можно объяснить низкой доступностью медных сайтов TcDH. Три иона меди располагаются в центральной полости β -пропеллера TcDH на дне субстратного канала на расстоянии 12 \AA от поверхности, что создает препятствие для непосредственного проникновения в активный центр фермента таких больших молекул, как например EDTA. Схожая медленная кинетика инактивации наблюдалась для медных центров других ферментов, таких как Cu/Zn-супероксиддисмутаза и CuA домен цитохром с оксидазы [43]. Также в работе [43] было показано, что металлотионеины, обладающие сравнимым с медными ферментами высоким сродством к

ионам Cu(I), не могли эффективно удалять ионы меди из активного центра медных ферментов. Малодоступность медных сайтов 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*. Это контрастирует с находящимися на поверхности белка медными сайтами переносчиков, что соответствует их функции транспорта меди в клетке [186].

3.2.3. Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами металлов

Термодинамическая оценка связывания ионов металла в активном центре TcDH важна для понимания механизмов их встраивания как *in vitro*, так и *in vivo*. В связи с чем, было решено оценить аффинность связывания ионов Cu(II)/Cu(I) в трех медных сайтах TcDH, а также охарактеризовать специфичность сайтов для иона Cu(II) по сравнению с другим двухвалентным ионом Zn(II).

3.2.3.1. Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами Cu(II)

Последовательность TcDH содержит 15 остатков Trp (**Рис. 27, а**), что позволяет использовать метод тушения флуоресценции триптофанов для определения стехиометрии связывания ионов Cu(II) в активном центре фермента. Остаток W452 (нумерация остатков по гену с учетом сигнального пептида) формирует стенку субстратного канала и располагается рядом с активным центром (с сайтом Cu₃), следующий за ним остаток W453 располагается на поверхности белковой глобулы (**Рис. 27, б**). Остаток W287 находится в начале подвижной петли 289-301, которая закрывает субстратный канал при изменении конформации фермента (**Рис. 27, б**). Вероятно, при заполнении сайтов TcDH ионами меди изменяется окружение и, как следствие, флуоресценция перечисленных остатков. Остальные 12 Trp удалены от активного центра и скорее всего не вносят вклад в изменение интенсивности флуоресценции.

a)

tpTcDH	KYVKVQDFYDQLGKYVLVAPGKFSGTVAATDLSTG	W	TMA	W	LAA	W	NYGDTCPIMHHMAAF	140
	PSPDPYKEFEFVNTQGGKNLFIYGVPTVEDPGE	G	MKIYRIK	YD	G	TRMNLQRDAAE	VSG	200
	LGLGVHVTITPEADGYAVGDGQKDICAEFDRE	T	MVRYA	W	A	F	W	260
	MTIKRLKPTLPGGRYDLQGSKGNKID	W	ELVPGGELAI	E	D	G	KVSGDRPLHSVANDALV	320
	RGK	W	AVASMR	L	P	G	V	380
	CVVFDRENQVPVAVLAGPKGT	P	S	Q	F	Q	L	440
	QAGFSPDGQSFLFMNSLRQNNIMV	W	D	S	S	N	H	500
	DDPTT	W	E	K	K	A	V	548
	ESPD	W	R	G	A	P	N	
	T	P	D	A	K	K	I	
	Y	V	T	M	W	W	P	
	S	P	T	P	N	G	I	
	A	V	I	D	A	V	N	
	W	E	V	L	K	E	V	
	D	L	G	P	D	M	H	
	T	L	A	I	T	Y	D	
	G	K	F	V	V	G	T	
	L	S	G					
	Q	N	T	A	S	A	I	
	V	M	E	T	E	T	D	
	E	V	L	G	F	L	P	
	S	P	M	G	H	D	N	
	V	I	V	P	R	T	L	
	E	D	L	R	I	S	R	
	S	T	T	T				

б)

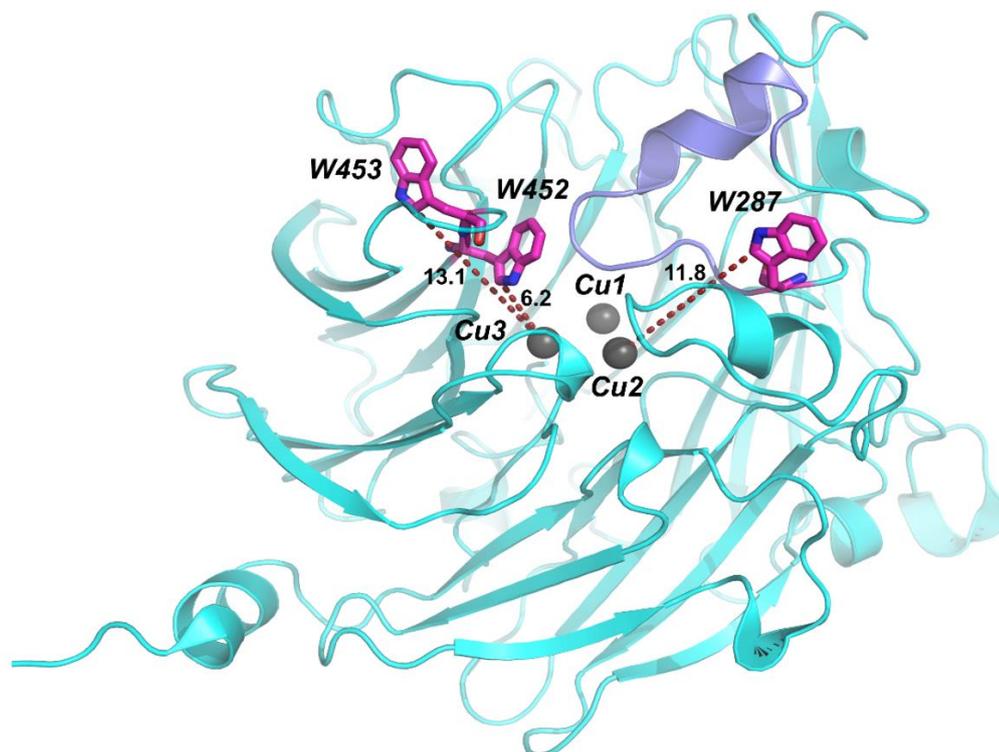


Рис. 27. Остатки Trp в структуре TcDH из *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1. В аминокислотной последовательности TcDH а) остатки W287, W452 и W453, которые располагаются рядом с активным центром, показаны розовым цветом, тогда как другие остатки Trp показаны синим цветом. б) В структуре TcDH (PDB ID 6UWE) остаток W452 образует стенку субстратного канала и расположен рядом с ионом Cu3, остаток W453 следует за W452. Остаток W287 расположен в начале гибкой петли 289-301 (фиолетовый), которая закрывает субстратный канал при изменении конформации фермента. Расстояние от остатков W287, W452 и W453 до ближайшего иона меди показано красной пунктирной линией.

TcDH излучает интенсивную флуоресценцию с максимумом эмиссии при 336 нм при возбуждении на длине волны 295 нм. Добавление ионов Cu(II) к апо-TcDH приводило к тушению флуоресценции. Поскольку процесс полного встраивания ионов Cu(II) в активный центр TcDH представляет собой длительный процесс (на основании экспериментов по кинетике активации (**Рис. 25**)), то была приготовлена серия растворов апо-TcDH с возрастающими концентрациями ионов Cu(II). Через 5 мин после добавления ионов Cu(II) к ферменту перегиб кривой титрования наблюдался при 1,6 эквивалентах ионов, однако,

при высоких концентрациях Cu(II) снижение флуоресценции продолжалось (**Рис. 28, а**). Через 3 дня после инкубации форма кривой титрования изменилась: перегиб был зафиксирован при 3 эквивалентах ионов Cu(II) (**Рис. 28, б**). Дальнейшее увеличение времени инкубации не приводило к изменению формы кривой титрования.

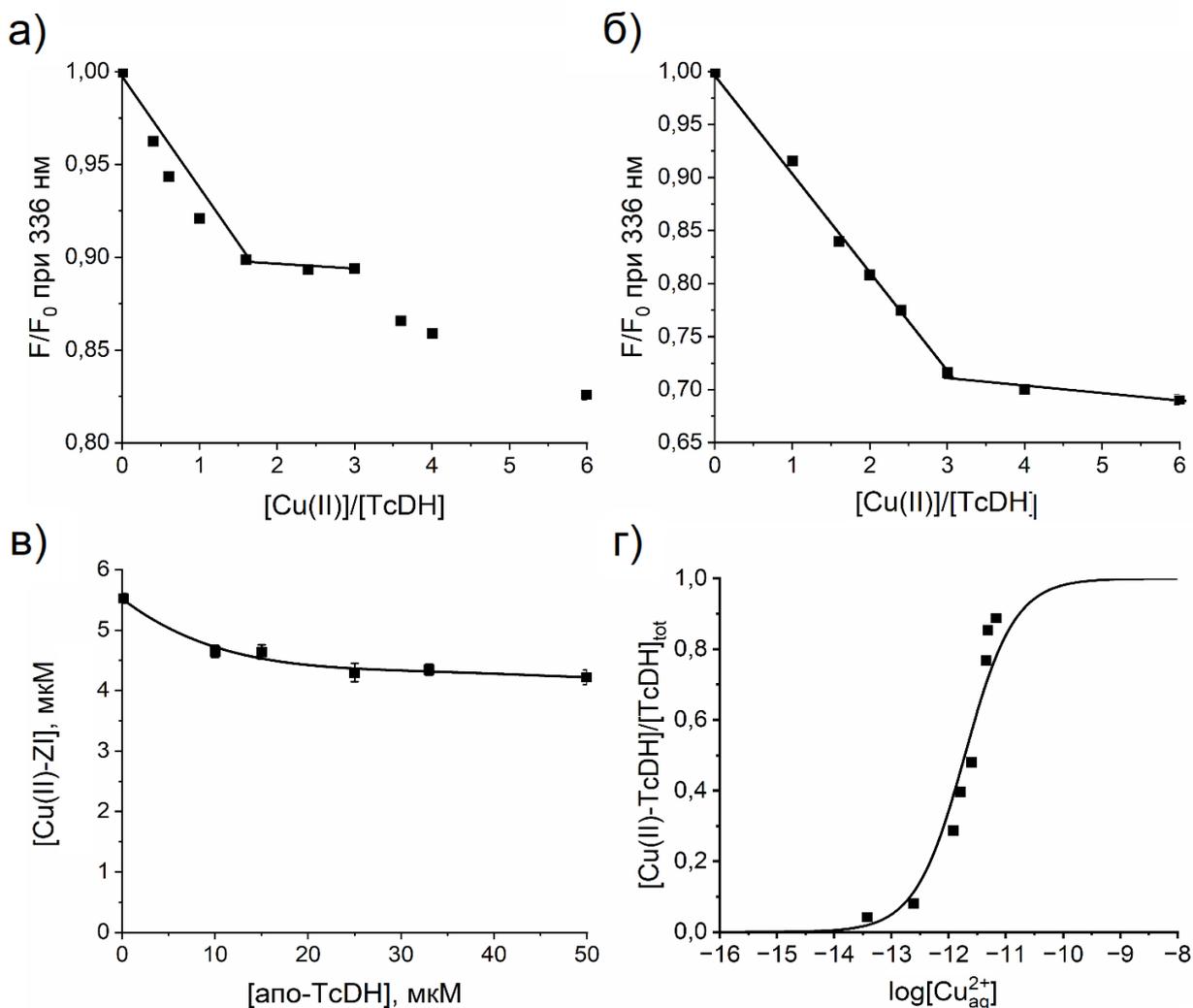


Рис. 28. Связывание TcDH с ионами Cu(II). а) Изменение интенсивности флуоресценции (F/F_0) апо-TcDH (0,5 мкМ) при 336 нм в зависимости от соотношения $[Cu(II)]/[TcDH]$ после 5 мин инкубации и б) после 3 дней. в) Зависимость концентрации комплекса Cu(II)-ZI (5,5 мкМ Cu(II), 10 мкМ ZI) от концентрации апо-TcDH (0-50 мкМ) позволяет рассчитать $\log K_D$ для сайта TcDH $\geq -16,4 \pm 0,2$ с помощью уравнений 4-5. г) Зависимость $[Cu(II)-TcDH]/[TcDH]_{tot}$ от $\log[Cu_{aq}^{2+}]$ при варьировании концентрации $Niis$ с использованием уравнения 7 дает приближенную оценку $\log K_D = -11,7 \pm 0,1$. Все эксперименты проводили в 25 мМ боратном буфере, pH 9.5.

Таким образом, 1,6 ионов Cu(II) на мономер TcDH связываются быстро в течение нескольких минут, тогда как полное заполнение 3 сайтов ионами Cu(II) происходит медленно, что коррелирует с медленной активацией TcDH ионами Cu(II) (**Рис. 25**). Как обсуждалось выше, медленное встраивание ионов Cu(II) в активный центр TcDH может быть связано с энергозатратным процессом дегидратации ионов. Еще одной причиной

медленной активации фермента ионами Cu(II) может быть электростатическое отталкивание, возникающее между уже встроившимися в активный центр и невстроившимися ионами Cu(II). В случае ионов Cu(I), обладающих меньшим положительным зарядом, чем ионы Cu(II), сила электростатического отталкивания между ионами, вероятно, меньше, в связи с чем полное заполнение активного центра фермента происходит быстро. В случае биядерного T3 медного центра тирозиназы также предполагают, что встраивание второго иона меди является лимитирующей стадией сборки центра из-за электростатического отталкивания и требует участия металлошаперона даже *in vitro* [133].

Резкий перегиб кривой, наблюдаемый при прямом титровании TcDH с ионами Cu(II) (**Рис. 28, б**), свидетельствует о высоком сродстве связывания сайтов фермента с ионами меди ($\log K_D < -7$), значит, оценка K_D с использованием данного метода будет занижена [135]. Поэтому аффинность сайтов оценивали методом конкурентного титрования с лигандом ZI, связывающим ионы Cu(II) с известным сродством (**Табл. 2**). Серию растворов комплекса Cu-ZI(II) с разной концентрацией апо-TcDH инкубировали в течении 3 дней до установления равновесия реакции. Как было показано в [147], комплекс Cu(II)-ZI устойчив в щелочных условиях во временных рамках эксперимента, в то время как свободная форма ZI медленно деградировала на 5%, что учитывалось в качестве контроля при расчетах. Это позволило правильно оценить процесс распределения ионов металла между TcDH и ZI. Из полученных данных видно, что добавление апо-TcDH приводило к снижению концентрации комплекса Cu(II)-ZI, что свидетельствует о диссоциации комплекса Cu(II)-ZI и связывании ионов Cu(II) с апо-TcDH (**Рис. 28, в**). Однако ферментативная активность TcDH в этих пробах не увеличивалась, следовательно, не все медные сайты фермента заполняются в данных условиях. На основании полученных данных, невозможно точно установить количество сайтов TcDH, участвующих в процессе конкуренции с Cu(II)-ZI, однако, с помощью уравнений 4-5 можно оценить наибольшее значение аффинности сайтов TcDH к ионам Cu(II) как $\log K_D \geq -16,4 \pm 0,2$.

Из данных, полученных в разделе 3.2.2, следует, что инкубация (Cu)₃-TcDH с His приводила к снижению активности, а значит, вытеснению ионов Cu(II) из сайтов фермента (**Рис. 26, а**). Инкубация (Cu)₃-TcDH с разными концентрациями His позволила нам оценить значение $\log K_D = -11,7 \pm 0,1$ с помощью уравнений 6-7 (**Рис. 28, г**). Таким образом, 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.

3.2.3.2. Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами Zn(II)

Для определения специфичности сайтов TcDH к ионам Cu(II) были установлены стехиометрия связывания и аффинность к иону другого металла - Zn(II). Ионы Zn(II) характеризуются наиболее сходными свойствами с ионами Cu(II): 1) близкие значения радиуса иона (0,73 Å и 0,74 Å для 6-координированных комплексов Cu(II) и Zn(II) соответственно [187]); 2) одинаковое число лигандов и похожие предпочтительные геометрии координации в комплексах [188]. Образец TcDH, инкубированный с ионами Zn(II), не обладал ферментативной активностью, однако, связывал ионы Zn(II): содержание ионов на мономер составило $2,0 \pm 0,5$ (ICP-MS).

Аффинность к ионам Zn(II) также оценивали с использованием конкурирующего лиганда ZI, образующего окрашенный комплекс с ионами Zn(II) с известным сродством (Табл. 2). Серию растворов комплекса Zn(II)-ZI инкубировали с возрастающими концентрациями апо-TcDH в течение 1 дня. Комплекс Zn(II)-ZI не стабилен в течение длительного времени в щелочных условиях [147]: его концентрация в контроле снизилась примерно на 10%, что было учтено при расчетах. Инкубирование Zn(II)-ZI с апо-TcDH приводило к снижению концентрации комплекса, что свидетельствовало о переходе Zn(II) в комплекс с TcDH (Рис. 29). Точное количество сайтов TcDH, участвующих в процессе конкуренции с Zn(II)-ZI, неизвестно, однако данные ICP-MS позволяют предположить, что ионы Zn(II) могут связываться в двух сайтах фермента. В связи с тем, что нельзя однозначно утверждать, обладают ли эти сайты близким сродством, используя уравнения 4-5, мы оценили наивысшее возможное значение аффинности TcDH к ионам Zn(II) как $\log K_D \geq -9,6 \pm 0,2$ при pH 9,5.

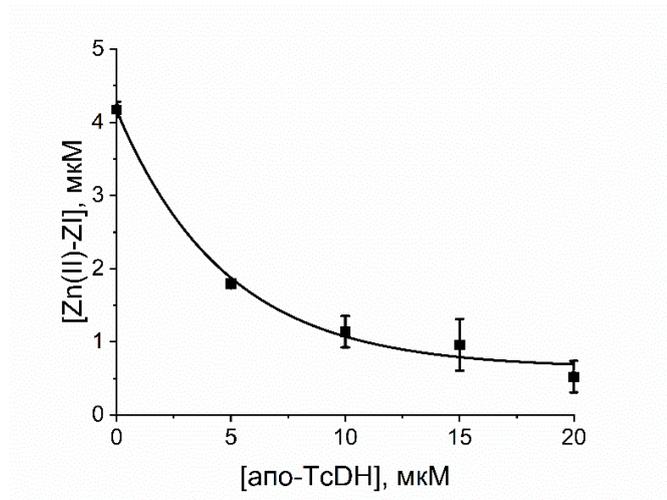


Рис. 29. Связывание TcDH с ионами Zn(II). Зависимость концентрации комплекса Zn(II)-ZI (4,5 мкМ Cu(II), 10 мкМ ZI) от концентрации апо-TcDH (0-20 мкМ) в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5 позволяет рассчитать $\log K_D \geq -9,6 \pm 0,2$ для сайта TcDH с помощью уравнений 4-5.

3.2.3.3. Стехиометрия и аффинность связывания TcDH с ионами Cu(I)

Для определения стехиометрии и аффинности TcDH к ионам Cu(I) в конкурентном титровании использовали лиганды Vcs и Vca, образующие окрашенные комплексы $[\text{Cu(I)}-(\text{Vca/Vcs})_2]^{3-}$ с известным сродством (Табл. 2). К раствору апо-TcDH и Vcs/Vca добавляли возрастающие концентрации ионов Cu(I). Если сайты TcDH обладают меньшим сродством к ионам Cu(I), чем низкомолекулярный лиганд, добавленные ионы Cu(I) образуют комплекс только с лигандом. В этом случае кривая титрования выйдет на плато при концентрации Cu(I), равной половине концентрации лиганда в растворе, потому что комплекс $[\text{Cu(I)}-(\text{Vca/Vcs})_2]^{3-}$ формируется в соотношении 1:2 (Табл. 2). Такую ситуацию наблюдали при использовании в качестве лиганда Vcs: перегиб на кривой титрования располагается в точке с концентрациями Cu(I) и Vcs 14,5 мкМ и 27 мкМ в растворе, соответственно (Рис. 30, а). Это свидетельствует о том, что аффинность сайтов TcDH меньше, чем у Vcs. При добавлении ионов Cu(I) к раствору с Vca (35 мкМ) и апо-TcDH (5 мкМ) кривая титрования вышла на плато при 32,5 мкМ Cu(I), что значительно отличалось от рассчитанного перегиба в случае отсутствия конкуренции – 17,5 мкМ (Рис. 30, б). Вычитая концентрацию комплекса $[\text{Cu(I)}-(\text{Vca})_2]^{3-}$ – 17,5 мкМ, в результате получили, что 5 мкМ апо-TcDH связывает 15 мкМ Cu(I). Такое соотношение соответствует связыванию 3 эквивалентов Cu(I) с одним мономером TcDH. Используя уравнения 11-13 для участка кривой титрования до выхода на плато, было рассчитано среднее значение $\log K_D^{1/3} ((\text{Cu(I)})_3\text{-TcDH}) = -13,0 \pm 0,3$ при pH 9,5 на один сайт фермента. Таким образом, TcDH связывает 3 иона Cu(I) с субпиколярной аффинностью.

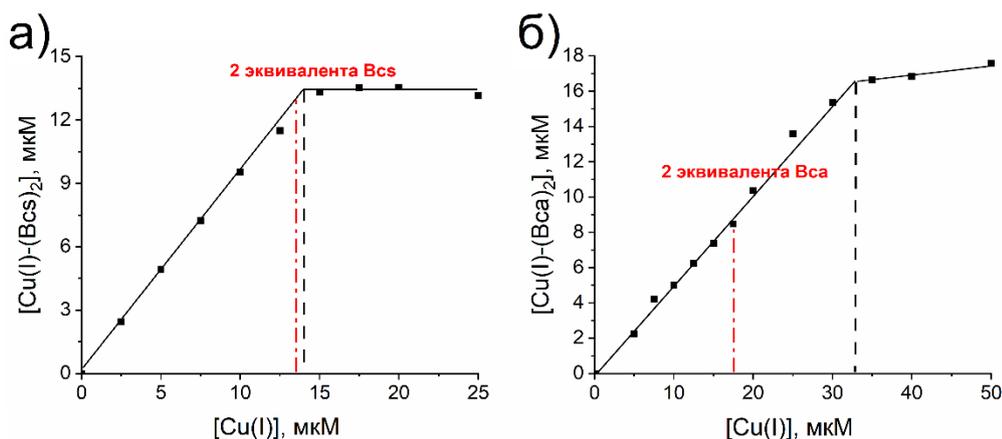


Рис. 30. Связывание TcDH с ионами Cu(I). а) Изменение концентрации комплекса $[\text{Cu(I)}(\text{Vcs})_2]^{3-}$ в присутствии Vcs (27 мкМ) и апо-TcDH (5 мкМ) в зависимости от концентрации Cu(I). б) Изменение концентрации комплекса $[\text{Cu(I)}(\text{Vca})_2]^{3-}$ в присутствии Vca (35 мкМ) и апо-TcDH (5 мкМ) в зависимости от концентрации Cu(I). Красным пунктиром обозначен рассчитанный перегиб при отсутствии конкуренции, черным – экспериментально измеренный. Все эксперименты проводили в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5 в присутствии 1 мМ аскорбата в анаэробных условиях.

3.2.4. Порядок встраивания ионов Cu(II) *in vitro*

Порядок связывания ионов Cu(II) в трехъядерном медном центре TcDH исследовали методом ЭПР-спектроскопии в X-диапазоне. К образцу апо-TcDH добавляли 1, 2 или 3 эквивалента Cu(II) , инкубировали 24 часа и далее регистрировали спектры. Согласно ранее опубликованным данным [139], спектр $(\text{Cu})_3\text{-TcDH}$ описывается тремя невзаимодействующими ионами Cu(II) , которые отличаются своим окружением. Для подтверждения, что сборка активного центра происходит по одному механизму в ЭПР-экспериментах помимо trTcDH, который является основным объектом данной диссертационной работы, использовали гомологичный rmTcDH (60% идентичность аминокислотной последовательности [140]). Рассчитанные параметры теоретических спектров trTcDH и rmTcDH, инкубированных с разным количеством эквивалентов Cu(II) , приведены в **Табл. П1-8 (Приложение)**. Полученные результаты как с trTcDH, так и с rmTcDH, качественно были похожи. Однако спектры rmTcDH, полученные при более низкой температуре (для rmTcDH при 20 К, для trTcDH при 100 К), демонстрировали лучшее разрешение.

Спектры образцов TcDH, инкубированных с 1 эквивалентом Cu(II) , можно описать двумя медными сайтами (А и В) с разной долей и разным окружением (**Рис. 31, а, г, Табл. 5**). Спектры образцов TcDH, инкубированных с 2 эквивалентами Cu(II) , также соответствуют суперпозиции двух медных сайтов (А и В). Доля вклада сайтов в спектр изменяется (**Рис. 31, б, д, Табл. 5**), что свидетельствует о продолжении заполнения сайтов Cu1 и Cu2. Наконец, спектры образцов TcDH, инкубированных с 3 эквивалентами Cu(II) , описываются тремя медными сайтами (А, В и С) (**Рис. 31, в, е, Табл. 5**).

На второй производной спектров rmTcDH 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 как ДСТВ сайта А с участием трех ядер азотных лигандов (**Рис. 31, а, б, вставки**). В структуре этот сайт соответствует сайту Cu2, поскольку в координации только этого иона участвуют три азотных лиганда (два остатка His и один остаток Lys (**Рис. 20, б**)). Кроме того, сайт Cu2 располагается ближе к субстратному каналу. Второй сайт В, который заполняется при 1 эквиваленте Cu(II) , вероятно, является сайт Cu1. Согласно рентгеноструктурным данным [140], сайты Cu1 и Cu2 координируются типичным образом для ионов Cu(II) с участием 6 и 5 лигандов, соответственно, что может свидетельствовать об их близких значениях аффинности и что отличает их от трехкоординированного сайта Cu3, который, по-видимому, обладает

наименьшей аффинностью и заполняется последним (сайт С в ЭПР-спектрах) (Рис. 20, б) [140].

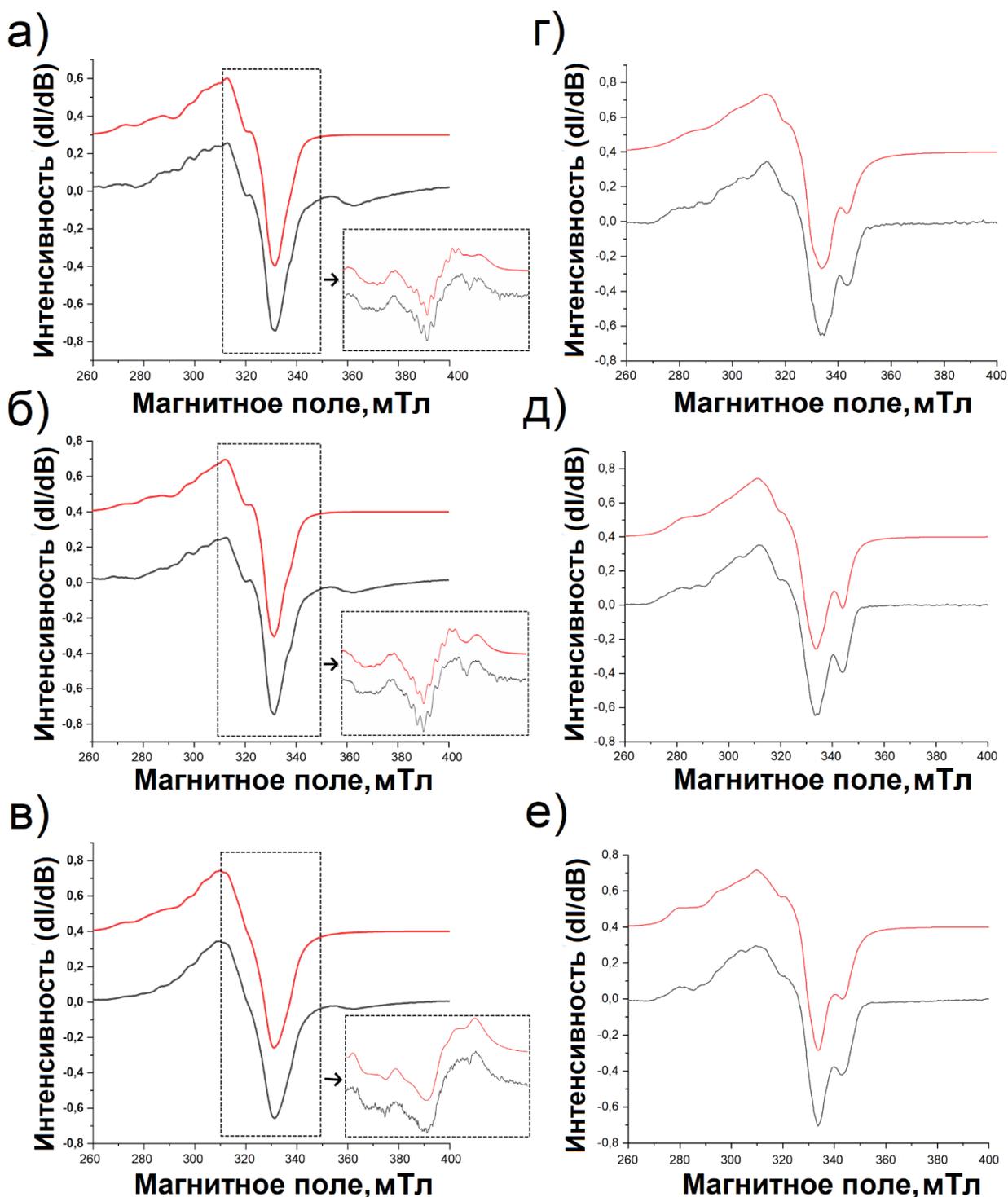


Рис. 31. Экспериментальные (черная линия) и теоретические (красная линия) ЭПР-спектры rTcDH при инкубации с а) 1, б) 2 или в) 3 эквивалентами Cu(II) (20 К, X-диапазон) и trTcDH при инкубации с г) 1, д) 2 или е) 3 эквивалентами Cu(II) (100 К, X-диапазон). На вставках панелей а), б) и в) представлены производные соответствующих экспериментальных (черная линия) и рассчитанных спектров (красная линия).

Таблица 5. Вклад медных сайтов в интенсивность теоретических ЭПР-спектров TcDH при добавлении одного, двух или трех эквивалентов ионов Cu(II).

Cu(II), экв.	Сайт в ЭПР спектрах TcDH	Структурный сайт TcDH	pmTcDH	tpTcDH
			Доля, %	Доля, %
1	A	Cu2	66,8	59,2
	B	Cu1	33,2	40,8
2	A	Cu2	59,6	57,8
	B	Cu1	40,4	42,2
3	A	Cu2	33,3	33,3
	B	Cu1	33,3	33,3
	C	Cu3	33,3	33,3

Визуализировав процесс заполнения медных сайтов TcDH методом ЭПР-спектроскопии, можно предположить механизм встраивания ионов меди в сайты Cu1, Cu2, Cu3 фермента *in vitro*. Встраивание ионов меди в активный центр TcDH – это двухстадийный процесс, где на первом этапе заполняются два центра, а на втором этапе связывается третий ион (**Рис. 32**). Сначала заполняется сайт Cu2, так как он ближе всех располагается к субстратному каналу. Но поскольку сайты Cu1 и Cu2, вероятно, обладают близким сродством 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) [189].

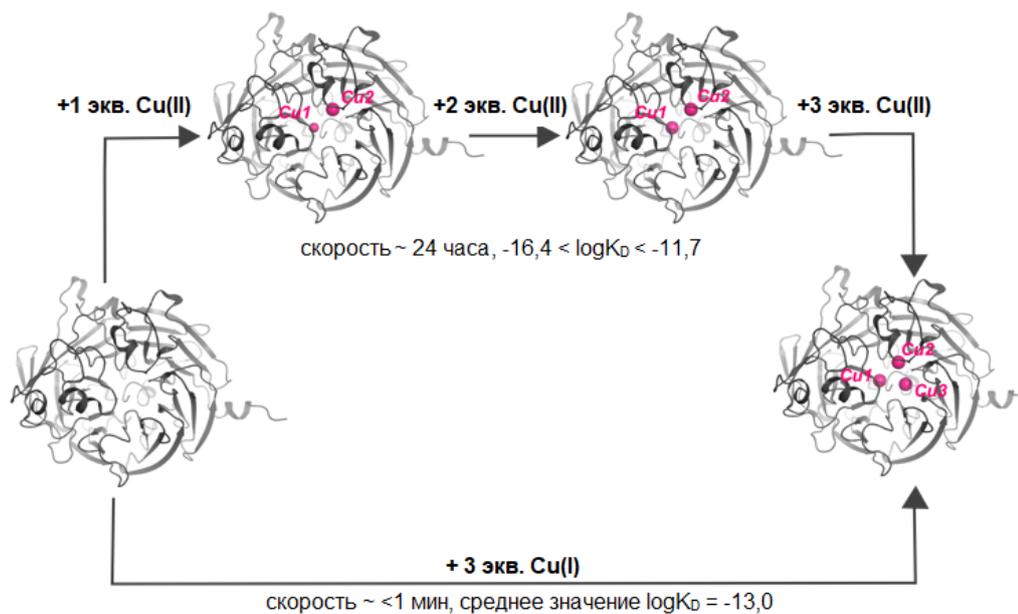


Рис. 32. Схема сборки трехъядерного медного центра TcDH *in vitro*.

Таким образом, мы установили последовательность заполнения трех медных сайтов TсDH. Медные сайты TсDH обладают высокой аффинностью как к ионам Cu(II) (значения лежат в диапазоне $-11,7 \geq \log K_D \geq -16,4$ для трех сайтов при pH 9,5), так и ионам Cu(I) (среднее значение $\log K_D = -13,0$ для трех сайтов при pH 9,5), что предотвращает потерю ионов в ходе окислительно-восстановительного цикла. Согласно данным ЭПР и координации меди в сайтах TсDH (Рис. 20, б), можно предположить, что аффинность сайтов к ионам Cu(II) возрастает в ряду $Cu_3 \ll Cu_1 \approx Cu_2$. На основании рентгеноструктурных данных [140], ион Cu2 в восстановленном состоянии координирован по типу плоского треугольника двумя His и H₂O, ион Cu3 – линейно двумя His (Рис. 33). Ион Cu1 в восстановленном состоянии может координироваться, например, линейно также с помощью двух His (Рис. 33), такая координация иона Cu(I) встречалась у Aβ16 пептида [190]. Из чего можно предположить, что аффинность трех сайтов к ионам Cu(I) может быть близка. Погруженный вглубь глобулы активный центр предотвращает потерю ионов меди даже при взаимодействии с более аффинными соединениями/белками. Оценённые термодинамические параметры и избирательность TсDH к степени окисления меди проливают свет на механизмы встраивания меди в активный центр *in vivo*. Скорее всего, сборка медного центра TсDH происходит с участием металлошаперона, связывающего Cu(I) с $\log K_D > -13$ при pH 9,5. В связи с чем, следующим этапом работы стал поиск такого металлошаперона, который может встраивать ионы меди в активный центр TсDH *in vivo*.

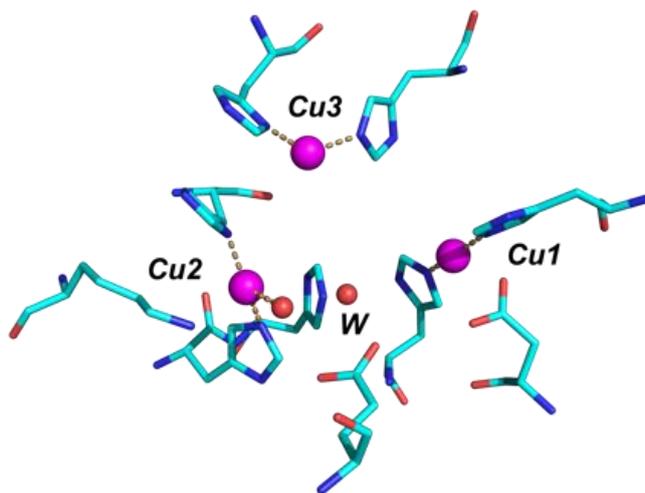


Рис. 33. Предполагаемая структура активного центра TсDH в восстановленном состоянии.

3.3. CopC как металлошаперон TсDH *in vivo*

Как обсуждалось во Введении, в геноме бактерии *Tv. paradoxus* рядом с геном TсDH находится ген CopC (Рис. 20, в), который относится к большому семейству медь-связывающих белков. Для близкородственной бактерии *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans*

наблюдалась коэкспрессия генов *CopC* и *TcDH* при культивировании бактерии на тиоцианате [142]. В связи с этим, предположили, что *CopC* может выполнять роль металлошаперона для *TcDH*, т.е. участвовать во встраивании ионов меди в активный центр фермента *in vivo*. На данном этапе работы был получен и подробно охарактеризован рекомбинантный препарат *tpCopC* и изучена его роль как металлошаперона *TcDH*.

3.3.1. Получение, очистка и характеристика рекомбинантного *tpCopC*

Анализ первичной последовательности показал, что *tpCopC* состоит из 160 аминокислот, включая 30 остатков сигнального пептида (по данным программы SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)). Рассчитанные значения молекулярной массы и изоэлектрической точки (pI) зрелого белка составили 14019 Да и 5,07, соответственно. Ген *tpCopC* был получен без сигнальной последовательности в конструкции с SUMO. Наличие His₆-тага на N-конце SUMO позволило провести очистку рекомбинантного *tpCopC* с использованием металлоаффинной хроматографии, после чего SUMO отщепляли. В результате был выделен *tpCopC* с немодифицированным N-концом, что крайне важно для формирования его медь-связывающего мотива «гистидиновая скрепка». На последней стадии очистки проводилась гель-фильтрация: объем элюции *tpCopC* соответствовал димеру белка (Рис. 34, а). Гомогенность *tpCopC* подтверждали SDS-PAGE (Рис. 34, а).

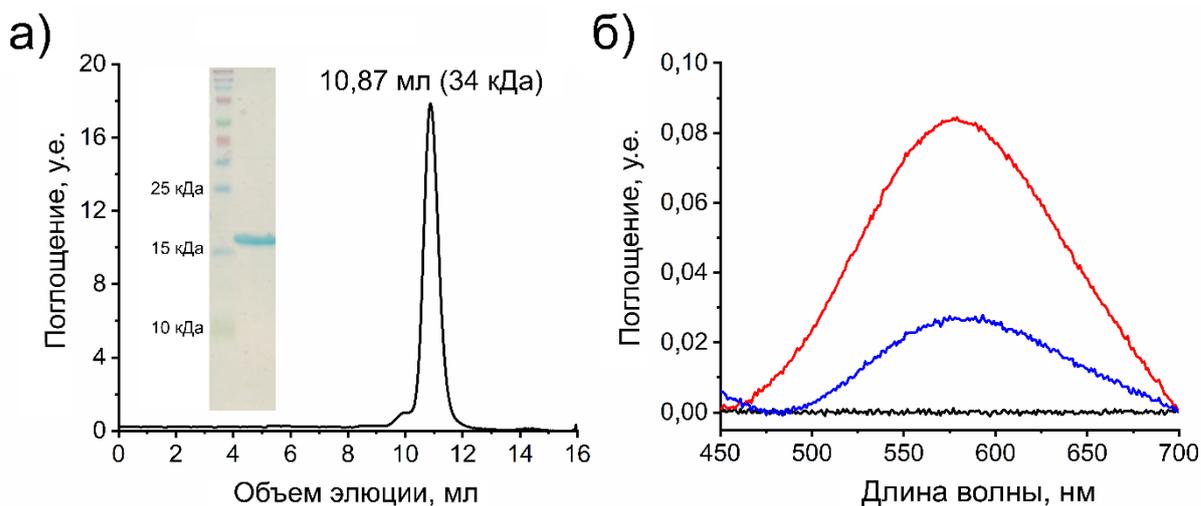


Рис. 34. Характеристика рекомбинантного образца *tpCopC*. а) Хроматограмма гель-фильтрации *tpCopC* на колонке Superdex 75 10/300 в 25 мМ MOPS буфере, pH 7,4, 150 мМ NaCl; вставка - электрофореграмма *tpCopC*. б) Спектры поглощения 1,8 мМ апо-*tpCopC* (черная линия), 1,8 мМ Cu(II)-*tpCopC* (красная линия) и после добавления 27 мМ аскорбата (синяя линия) в 25 мМ боратном буфере, pH 9,5.

Спектр Cu(II)-*tpCopC* имел максимум поглощения при 579 нм ($\epsilon_{579} = 47 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (**Рис. 34, б**), который близок к максимумам поглощения гомологичных Cu(II)-*CopC* из других бактерий [63,65]. При добавлении избытка аскорбата в качестве восстановителя к Cu(II)-*tpCopC* наблюдалось значительное снижение оптической плотности (**Рис. 34, б**), что свидетельствовало о восстановлении Cu(II) до Cu(I).

3.3.2. Стехиометрия и аффинность связывания *tpCopC* с ионами Cu(II)/Cu(I)

Стехиометрию комплекса *tpCopC* с ионами Cu(II) определяли методом прямого титрования по тушению флуоресценции триптофана. Аминокислотная последовательность *tpCopC* содержит один остаток W134 (нумерация остатков по гену), поэтому *tpCopC* способен флуоресцировать с максимумом при 327 нм при длине возбуждения 280 нм (**Рис. 35, а**). При добавлении к апо-*tpCopC* (5 мкМ) ионов Cu(II) происходило тушение флуоресценции триптофана с выраженной точкой перегиба при 1 эквиваленте ионов Cu(II) (**Рис. 35, б**), то есть *tpCopC* связывает 1 ион Cu(II) на мономер. Резкий перегиб кривой титрования белка свидетельствует о высокой аффинности сайта связывания ($\log K_D < -7$) [135].

Для корректной оценки K_D комплекса Cu(II)-*tpCopC* были использованы лиганды EDTA и HEDTA, которые связывают ионы Cu(II) с известной аффинностью и для которых значения K_D с ионами Cu(II) приведены в **Табл. 2**. Добавление EDTA/HEDTA к образцу Cu(II)-*tpCopC* приводило к восстановлению интенсивности флуоресценции, значит, ионы Cu(II) диссоциировали из комплекса с *tpCopC* и связывались с лигандами (**Рис. 35, в**). С помощью уравнений 14-17 было рассчитано значение $\log K_D = -16,3 \pm 0,6$ при pH 7,4 для Cu(II)-*tpCopC* (**Рис. 35, г**). Полученное значение $\log K_D$ близко к значению константы гомологичного *CopC* типа C_{0-1} из бактерии *Pseudomonas fluorescens* (*pfCopC*) ($\log K_D = -15,5$ при pH 7,4 [65]), однако $\log K_D$ комплекса Cu(II)-*tpCopC* значительно ниже, чем для *CopC* типа C_{1-1} ($\log K_D = -13,5$ и $-13,7$ для *ecPcoC* из бактерии *E. coli* и *psCopC* из бактерии *Pseudomonas syringae*, соответственно [60,63,148]).

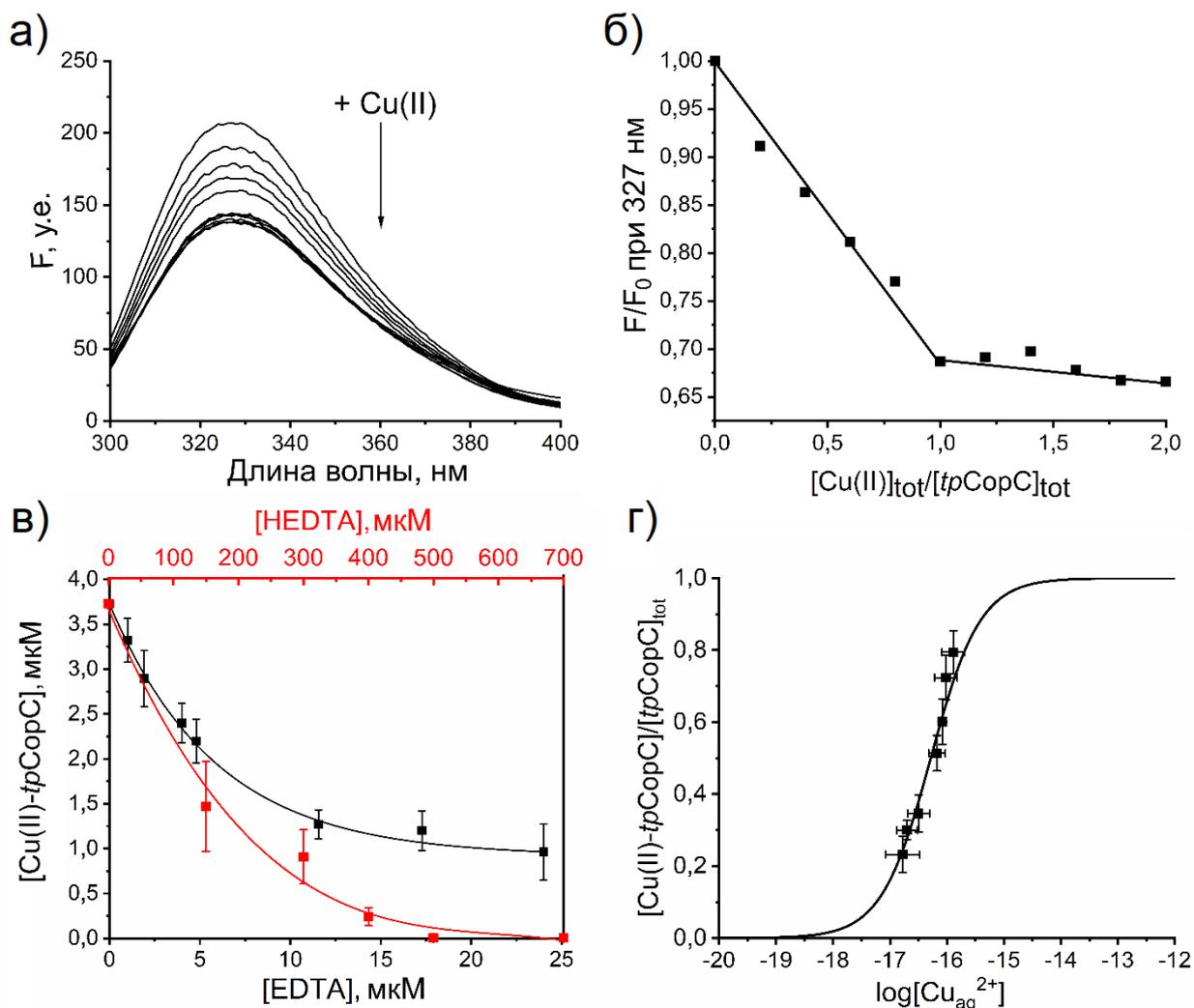


Рис. 35. Определение стехиометрии и K_D для Cu(II)-tpSorC с помощью прямого (а, б) и конкурентного (в, г) титрования. а) Тушение флуоресценции триптофана апо-tpSorC (5 мкМ) при добавлении ионов Cu(II). б) Зависимость изменения флуоресценции (F/F_0) от соотношения $[Cu(II)]_{tot}/[tpSorC]_{tot}$. в) Зависимость концентрации Cu(II)-tpSorC от концентрации конкурирующего лиганда EDTA (черная кривая) и HEDTA (красная кривая). г) Зависимость соотношения $[Cu(II)-tpSorC]/[tpSorC]_{tot}$ от $\log[Cu_{aq}^{2+}]$ при варьировании концентрации EDTA, описываемая уравнением 16, позволила оценить значение $\log K_D = -16,3 \pm 0,6$ для Cu(II)-tpSorC. Все эксперименты проводили в 25 MOPS буфере, pH 7,4.

При добавлении ионов других двухвалентных металлов, как Zn(II), Ni(II) и Ca(II), к апо-tpSorC изменения интенсивности флуоресценции были незначительны по сравнению с эффектом, возникающим при связывании иона Cu(II) (Рис. 36, а). Таким образом, медь-связывающий сайт tpSorC демонстрирует высокую специфичность к ионам Cu(II).

Как описано в разделе 3.3.1, после добавления аскорбата к раствору Cu(II)-tpSorC поглощение при 579 нм, характерное для комплекса Cu(II)-tpSorC, уменьшилось (Рис. 34, б), что свидетельствует о восстановлении связанного иона Cu(II). Однако при добавлении аскорбата к Cu(II)-tpSorC спектр флуоресценции менялся незначительно (Рис. 36, б),

следовательно, окружение остатка W134 существенно не изменялось, и, вероятно, ион меди оставался связанным с *tpSorC*, но уже в восстановленном состоянии.

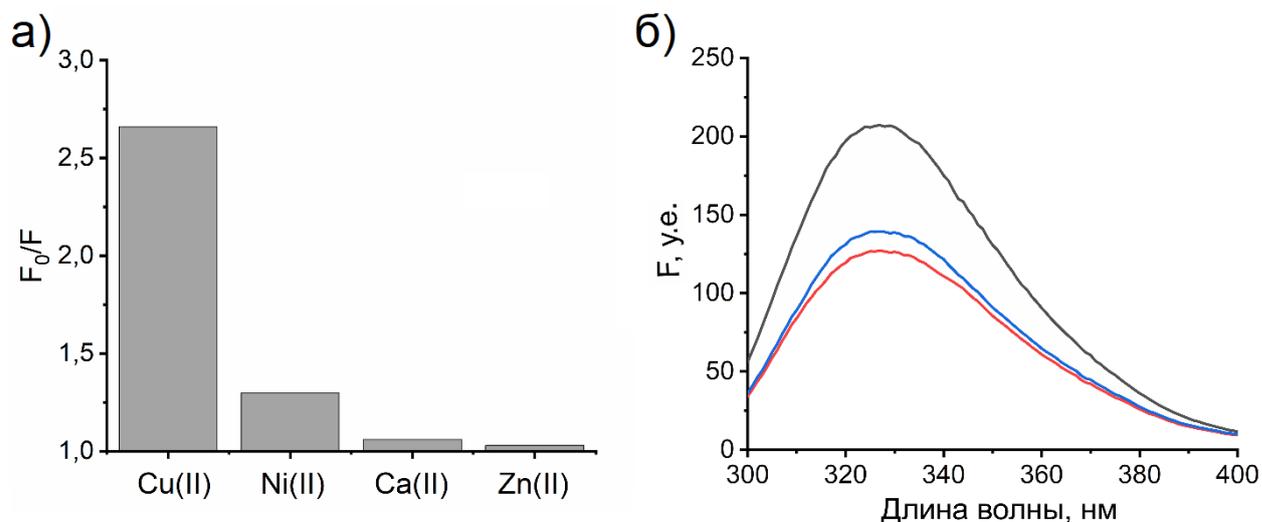


Рис. 36. а) Тушение флуоресценции апо-*tpSorC* (5 мкМ) при добавлении ионов Cu(II), Zn(II), Ni(II), Ca(II) (10 мкМ каждый). б) Спектры флуоресценции апо-*tpSorC* (5 мкМ) (черная линия), Cu(II)-*tpSorC* (5 мкМ) (красная линия) и в присутствии аскорбата (150 мкМ) (синия линия).

Для оценки аффинности связывания иона Cu(I) с *tpSorC*, был использован лиганд Fz, образующий окрашенный комплекс $[\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-}$ с известной аффинностью (Табл. 2). При титровании комплекса $[\text{Cu(I)}-(\text{Fz})_2]^{3-}$ раствором апо-*tpSorC* происходило снижение оптической плотности при 470 нм (Рис. 37, а), следовательно, ионы Cu(I) диссоциировали из комплекса с Fz и связывались с *tpSorC* (Рис. 37, б). Используя уравнение 18, мы оценили значение $\log K_D = -11,1 \pm 0,2$ для комплекса Cu(I)-*tpSorC* при pH 7,4. Ранее в литературе считали, что SorC типа S_{0-1} связывают ионы Cu(I) с более низкой аффинностью. Так, для гомологичного *pfSorC* было получено значение $\log K_D = -5$ для комплекса Cu(I)-*pfSorC* при pH 6,6 [64]. С большой вероятностью данная оценка занижена, поскольку в упомянутой работе был использован метод прямого титрования с помощью ИТК, а также в качестве стандартного раствора Cu(I) применяли комплекс $[\text{Cu(I)}(\text{MeCN}_4)]^+$ [64]. Стоит отметить, что при расчетах K_D комплекса Cu(I)-*pfSorC* не был учтен вклад конкуренции MeCN_4 за ионы Cu(I) [64], что могло занижить оценку [191]. Как обсуждалось в разделе 1.4, с помощью метода прямого титрования в литературе часто получали заниженные значения средства связывания белка с металлами, в то время как конкурентное титрование с охарактеризованным лигандом обеспечивает корректную оценку [135,137]. Близкое значение высокой аффинности к ионам Cu(I) с измеренным значением $\log K_D$ комплекса Cu(I)-*tpSorC* демонстрирует пептид A β 16 ($\log K_D = -10,6$ при pH 7,4), имеющий схожую структуру медь-связывающего мотива [190].

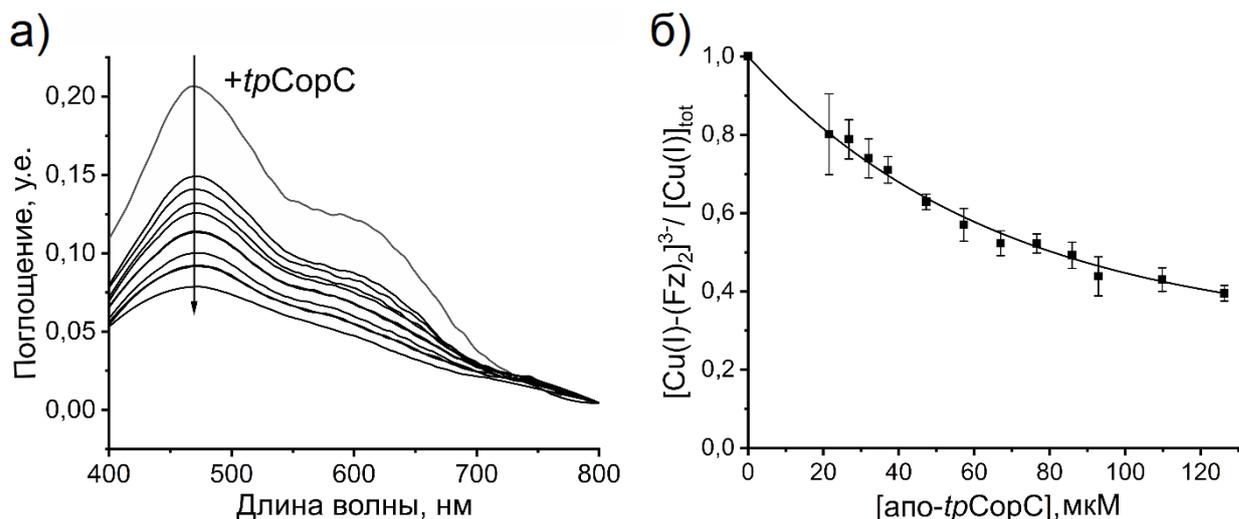


Рис. 37. Определение K_D комплекса Cu(I)-tpCopC с помощью конкурентного титрования. а) Спектры поглощения $[\text{Cu(I)-(Fz)}_2]^{3-}$ (Cu(I) , $50 \mu\text{M}$; Fz , $135 \mu\text{M}$) при титровании с помощью апо- tpCopC (0-125 мкМ) в анаэробных условиях. б) Зависимость $[\text{Cu(I)-(Fz)}_2]^{3-} / [\text{Cu(I)}]_{\text{tot}}$ при титровании апо- tpCopC (0-125 мкМ) в анаэробных условиях. Все эксперименты проводили в 25 MOPS буфере, pH 7,4.

Таким образом, tpCopC , относящийся к CopC типа C_{0-1} , имеет высокую аффинность к меди в двух степенях окисления ($\log K_D = -16,3 \pm 0,6$ для ионов Cu(II) и $-11,1 \pm 0,2$ для ионов Cu(I)). У tpCopC в аминокислотной последовательности отсутствуют другие медь-связывающие мотивы, кроме мотива «гистидиновой скрепки», поэтому ион Cu(I) , вероятно, связывается также в этом же сайте. Для определения структуры координационной сферы связанных ионов Cu(II) и Cu(I) в сайте tpCopC мы обратились к методу рентгеноструктурного анализа.

3.3.3. Пространственные структуры tpCopC

3.3.3.1. Общая структура tpCopC

Структуры tpCopC со связанными ионами меди были получены при pH 6,6 и 4,6 и решены с разрешением $1,80 \text{ \AA}$ и $1,70 \text{ \AA}$, соответственно (Табл. 3). Как и другие CopC типа C_{0-1} (pfCopC и mstCopC из бактерии *Methylosinus trichosporium* ОВЗб) [61,64], tpCopC содержит только один сайт связывания Cu(II) – «гистидиновая скрепка», состоящий из N-концевого остатка His и двух аминокислотных остатков консервативной последовательности DXH (Рис. 38).

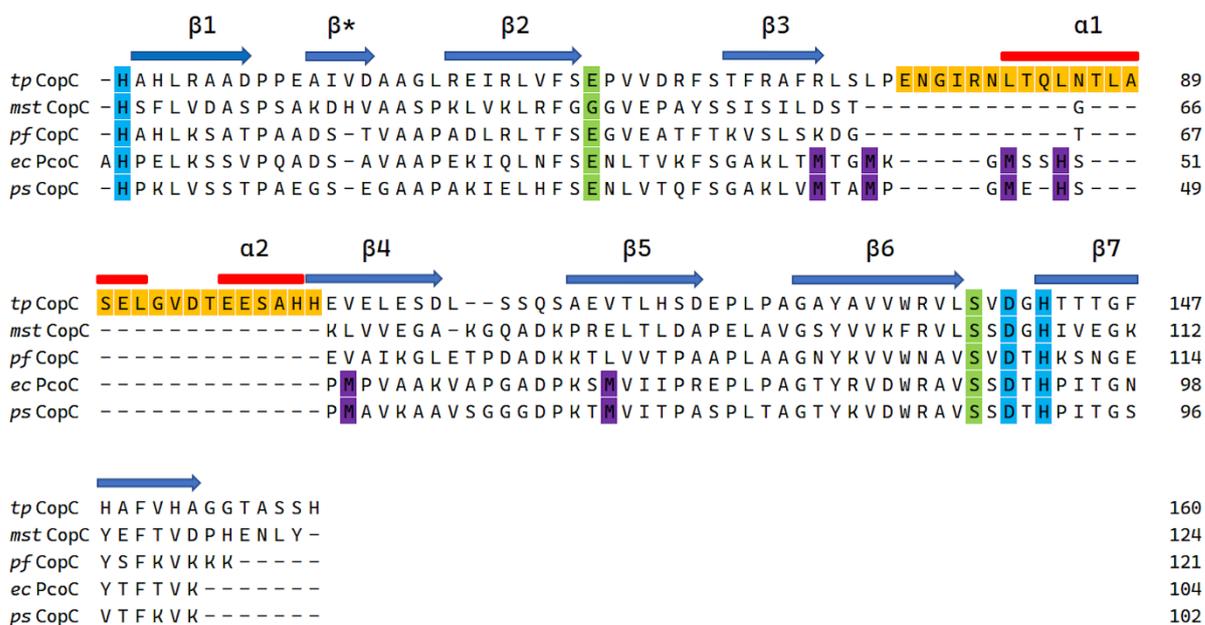


Рис. 38. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей CopC типа C_{0-1} (*tp*CopC (PDB ID 8YTR), *pf*CopC (PDB ID 6NFQ), *mst*CopC (PDB ID 5ICU)) и типа C_{1-1} (*ec*PcoC (PDB ID 1LYQ), *ps*CopC (PDB ID 2C9Q)) было выполнено с использованием Clustal O (1.2.4) [192]. Нумерация последовательностей соответствует нумерации аминокислотных остатков в кристаллических структурах. Элементы вторичной структуры *tp*CopC проиллюстрированы следующим образом: β -слои и α -спирали обозначены синими стрелками и красными линиями, соответственно. Аминокислотные остатки, образующие мотив «гистициновая скрепка», показаны синим цветом. Аминокислотные остатки, образующие сайт связывания Cu(I) у CopC типа C_{1-1} , показаны фиолетовым цветом. Консервативные аминокислотные остатки вторичной координационной сферы показаны зеленым цветом. 27 аминокислотных остатков *tp*CopC, образующие две дополнительные α -спирали и длинную петлю, петлю 3 (остатки 72–81), и участвующие в формировании димерного интерфейса, показаны оранжевым цветом.

Общая структура *tp*CopC идентична структурам других представителей семейства (Рис. 39), однако, имеет некоторые отличия. Во-первых, у *tp*CopC имеется дополнительная вставка из 27 аминокислот, образующая длинную петлю (петля 3) и две α -спиралями (Рис. 38). Данная вставка отсутствует у других гомологов (Рис. 38) и, как считается, участвует в белок-белковых взаимодействиях [193]. Во-вторых, *tp*CopC представляет собой стабильный гомодимер как в растворе (Рис. 34, а), так и в кристалле (Рис. 39, а). Согласно оценке PISA [164], площадь интерфейса (S) в комплексе составляет $798,0 \text{ \AA}^2$, а свободная энергия сольватации при образовании интерфейса ($\Delta_i G$) - $-8,4$ ккал/моль. Гомодимер *tp*CopC стабилизирован 12 водородными связями, электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. В предыдущих исследованиях только для *ps*CopC с насыщенными сайтами Cu(II) и Cu(I) [60] наблюдалось наличие димерной формы в кристалле, в образовании которой участвовали связанные ионы меди обоих мономеров. Напротив, в

случае *tpCopC* ионы меди расположены на противоположных концах гомодимера и не участвуют в образовании димерного интерфейса (Рис. 39, а).

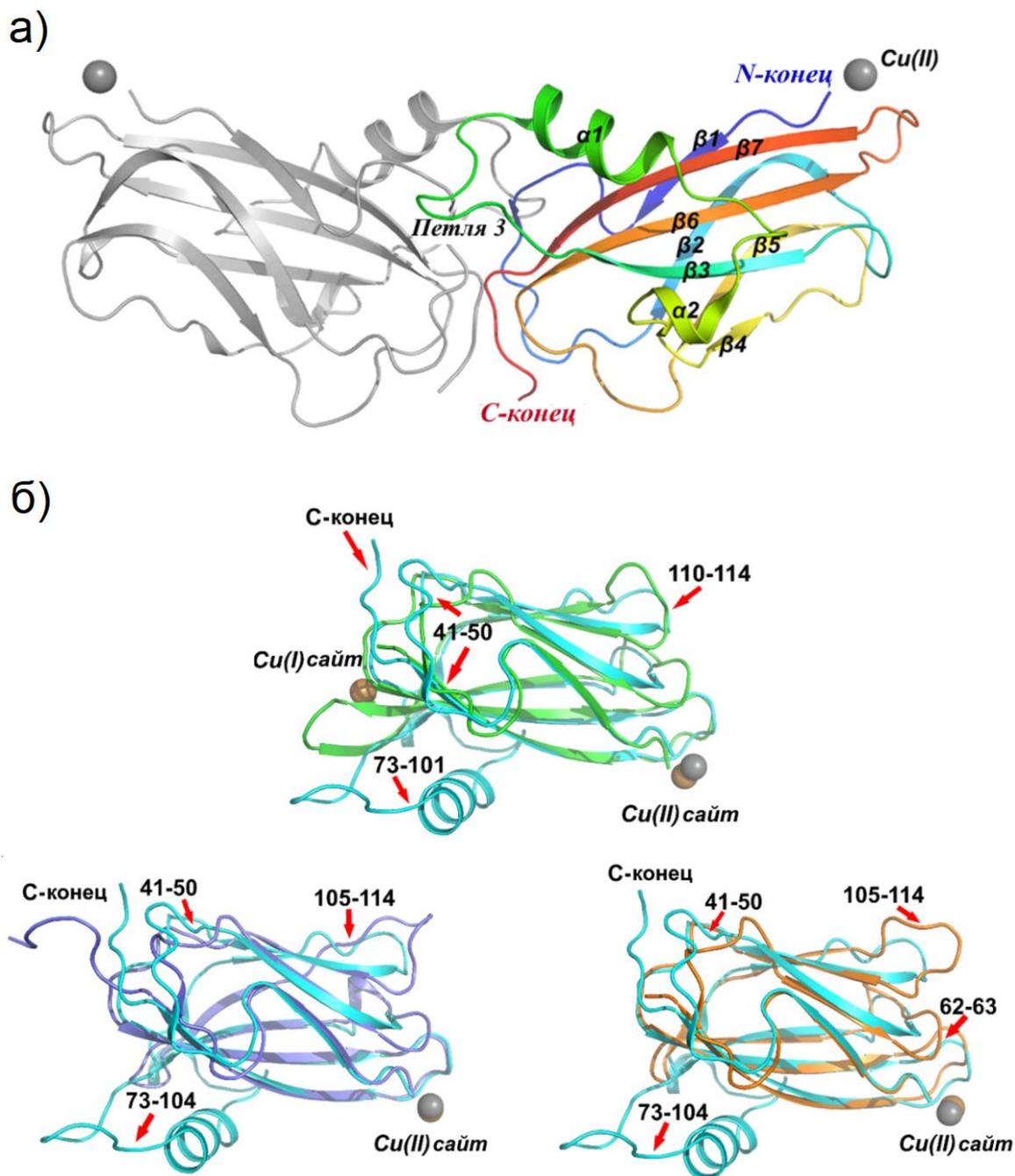


Рис. 39. а) Общая структура гомодимера *tpCopC*. Первый мономер окрашен градиентом от N-конца (синий) к С-концу (красный), второй мономер окрашен в серый цвет. б) Совмещение структуры Cu(II)-tpCopC (PDB ID 8YTQ, pH 6,6) (синяя) со структурами гомологов: с *psCopC* (PDB ID 2C9Q) (зеленая) по 79 Ca -атомам со среднеквадратичным отклонением 0,99 Å, с *mstCopC* (PDB ID 5ICU) (фиолетовая) по 69 Ca -атомам со среднеквадратичным отклонением 1,16 Å и в) с *pfCopC* (PDB ID 6NFQ) (оранжевая) по 68 Ca -атомам со среднеквадратичным отклонением 0,92 Å. Ион меди в структуре Cu(II)-tpCopC показан серой сферой, ионы меди в структурах гомологов показаны желтыми сферами. Стрелки указывают на разницу в положении полипептидных цепей (нумерация представлена согласно структуре *tpCopC*).

Сравнение структур *tpSorC*, полученных при pH 6,6 и pH 4,6, выявило некоторые различия в ходе основной цепи. Петля 110-113 в двух структурах занимает различные положения (Рис. 40). Данная петля образует ряд водородных связей с участком полипептидной цепи, содержащим консервативный остаток из вторичной координационной сферы E58. Стоит также отметить, что в ранее полученной структуре комплекса *tpSorC* - флавоцитохром с сульфиддегидрогеназа петля 110-113 не видна на карте электронной плотности [193]. Кроме того, структуры *tpSorC*, полученные при pH 6,6 и pH 4,6, имеют отличия в координации связанного иона меди.

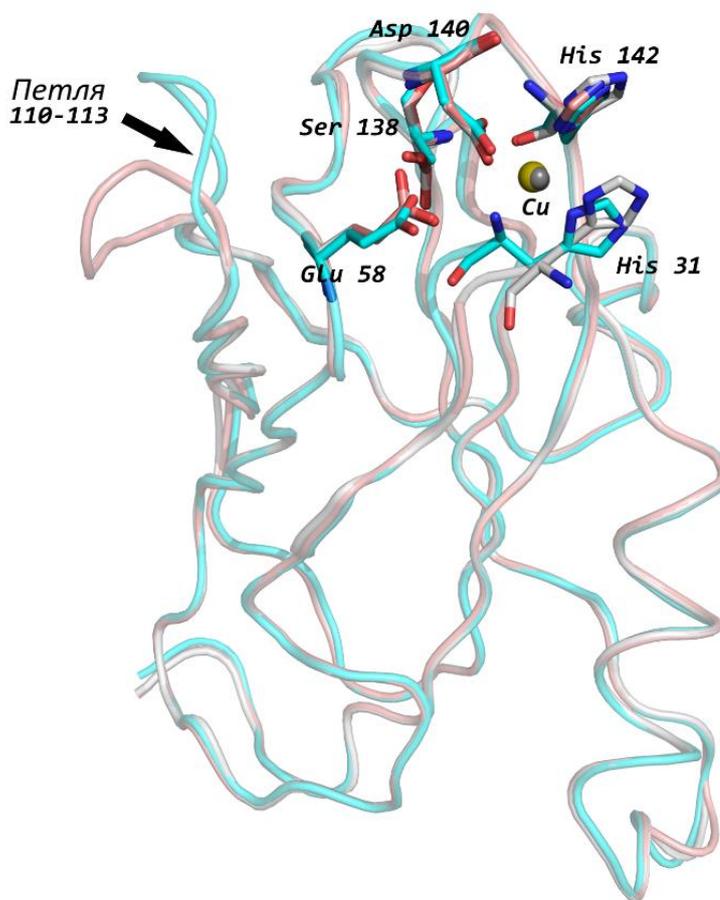


Рис. 40. Совмещение структур *tpSorC* при pH 6,6 (голубая) и pH 4,6 (розовая). Ион меди в структуре при pH 6,6 показан желтой сферой, в структуре при pH 4,6 - серой сферой. Остатки, участвующие в координации иона меди, а также формирующие вторую координационную сферу обозначены.

3.3.3.2. Медь-связывающий сайт *tpSorC*

Сайт связывания ионов меди структуры Cu(II)-*tpSorC* при pH 6,6 по типу «гистидиновой скрепки» сформирован N-концевым остатком H31 (нумерация остатков по гену *tpSorC*) и остатками D140 и H142 консервативного мотива DXH. Геометрия

координации иона меди в структуре *tpCopC* соответствует квадратной пирамиде с молекулой воды в аксиальном положении (**Рис. 41, а**), которую удалось различить на карте электронной плотности благодаря более высокому разрешению в сравнении с ранее полученной структурой комплекса *tpCopC* - флавоцитохром с сульфиддегидрогеназа [193]. Длины координационных связей между ионом меди и четырьмя экваториальными лигандами (**Рис. 41, а**) составляют 2,0 Å, а расстояние между ионом меди и молекулой воды равно 2,2 Å. Структура медь-связывающего сайта *tpCopC* идентична структуре медного центра гомолога *mstCopC* (PDB ID 5ICU) [61], за исключением отсутствия анизотропии вдоль оси между координирующими остатками D140 и H142, как у *mstCopC*.

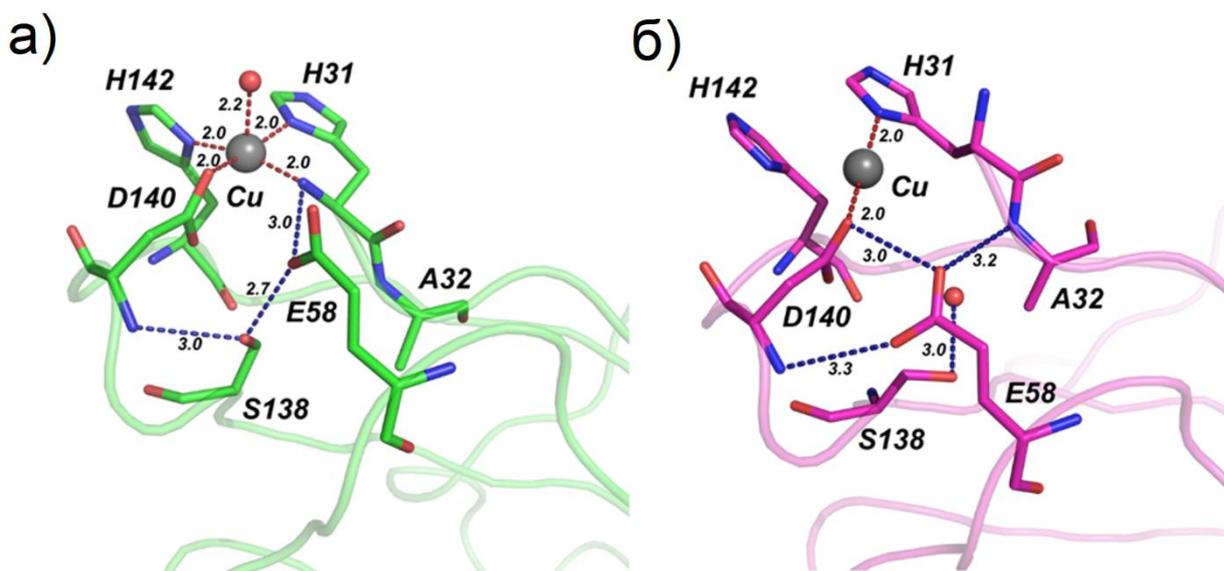


Рис. 41. а) Структура медь-связывающего сайта *tpCopC* при pH 6,6. б) Структура медь-связывающего сайта *tpCopC* при pH 4,6. Ион меди показан серой сферой, молекулы воды – красными сферами. Координационные и водородные связи показаны красными и синими пунктирными линиями, соответственно.

Вторичная координационная сфера иона Cu(II) в структуре *tpCopC* при pH 6,6 также организована сходным образом, как и у гомологов *pfCopC* и *psCopC*. Консервативные остатки E58 и S138 жестко фиксируют положение петли, формирующей мотив «гистидиновой скрепки» за счет образования сети водородных связей (**Рис. 41, а**). Остаток E58 стабилизирует положение N-концевой аминогруппы H31. В свою очередь, остаток S138 образует водородные связи с остатком E58 и атомом азота аминогруппы основной цепи остатка D140. Нарушение водородных связей, образованных консервативными остатками Glu и Ser, очень критично для структуры мотива «гистидиновой скрепки». Например, в структуре *psCopC* [60], полученной при кислом pH 4,5, это привело к флип-флоп переходу

координирующего остатка Asp и выходу его карбоксильного кислорода из координационной сферы иона меди.

Структура *tpCorC* была также получена при более кислом значении pH 4,6. В данном случае образец, который был закристаллизован, не обрабатывали дополнительно ионами меди после выделения, однако, в структуре обнаружили ионы меди с заселенностью 0,2-0,3 в медь-связывающем сайте. В трех из четырех молекул из независимой части элементарной ячейки N-концевой остаток H31 неупорядочен и неразличим на карте электронной плотности. В четвертой молекуле *tpCorC*, ион меди координирован линейно остатками H31 и D140, что отличается от координации при pH 6,6 (**Рис. 41, б**). При этом свободная аминогруппа остатка H31 не участвует в координации связанного иона меди и образовании водородной связи с остатком E58. Остаток E58 формирует три другие водородные связи с остатками A32 и D140, а боковая группа остатка S138 формирует водородную связь только с молекулой воды (**Рис. 41, б**). Наблюдаемая линейная геометрия координации предпочтительна для иона Cu(I). В случае структуры *tpCorC* при pH 4,6 частичное восстановление связанного иона меди и перестроение структуры центра могло произойти под действием рентгеновского излучения. Кислые значения pH кристаллизационного раствора, вероятно, облегчают процесс восстановления иона меди за счет протонирования остатка E58 и нарушения водородной связи между этим остатком и N-концевой аминогруппой H31. Возможно, именно такое строение имеет сайт связывания *tpCorC* с ионом Cu(I). Стоит отметить, что пептид Aβ16, ассоциированный с болезнью Альцгеймера, связывает ион Cu(II) аналогично мотиву «гистидиновой скрепки» CorC с помощью N-концевой аминогруппы ($\log K_D = -9,8$ при pH 7,4), тогда как ион Cu(I) ($\log K_D = -10,6$ при pH 7,4) обычно координируется двумя остатками His в линейной конфигурации [190].

3.3.3.3. Моделирование связывания иона Cu(I) в медь-связывающем сайте *tpCorC*

С использованием структуры *tpCorC* (PDB ID 8YTR) было смоделировано связывание иона Cu(I) в медь-связывающем сайте методом QM/MM MD. В модели ион Cu(I) координируется боковыми группами H142, H31 и D140 (**Рис. 42**). Координационные связи с молекулой воды и аминогруппой H31 разрываются. Полученная модель отличается от координации Cu(I), предполагаемой на основе структуры *tpCorC* при pH 4,6, наличием дополнительного лиганда H142. Учитывая экспонированность центра к растворителю и зависимость структуры сходных медных центров от pH [190,194,195], линейная координация иона Cu(I) может формироваться при слабокислых значениях pH при

протонировании H142 и свободной аминогруппы, а треугольная – при нейтральных рН при протонировании только свободной аминогруппы.

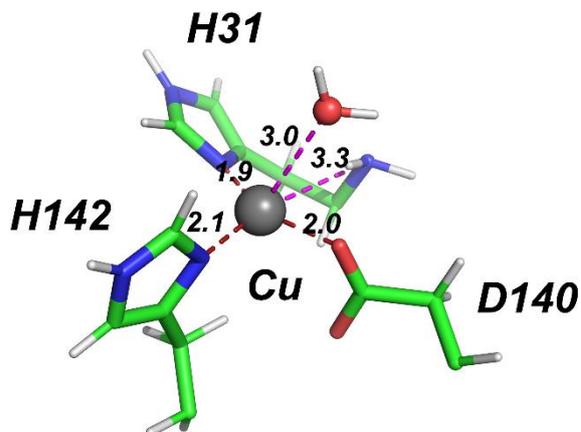


Рис. 42. Модель связывания иона Cu(I) в медь-связывающем сайте *tpCopC*. Ион меди показан серой сферой, молекула воды – красной сферой. Координационные связи и электростатические взаимодействия показаны красными и пурпурными пунктирными линиями соответственно.

3.3.4. Комплекс между *tpCopC* и *TcDH*

Для передачи иона меди от *tpCopC* к *TcDH*, два белка должны формировать комплекс. Изучение взаимодействия двух белков из бактерии *Tv. paradoxus* проводили при рН 9,5 [142], поскольку данное значение является физиологическим для бактерии, а также является оптимумом активности *TcDH* [139]. Для характеристики взаимодействия *tpCopC* и *TcDH* был использован метод ИТК (**Рис. 43**). Апо-*TcDH* и Cu(II)-*tpCopC* формируют комплекс в соотношении 1 : 1. Из полученных параметров, была рассчитана $\log K_D$ комплекса $-5,7 \pm 0,3$.

Стоит отметить, что образование гетерокомплекса *TcDH* - Cu(II)-*tpCopC* не удалось наблюдать с помощью гель-фильтрации. Ранее другой комплекс между медь-связывающим белком MEMO1 (онкогенный белок, связанный с раком) и медным шапероном Atox1 также не удалось обнаружить методом гель-фильтрации, хотя $\log K_D$ комплекса составила $-6,7$ [196].

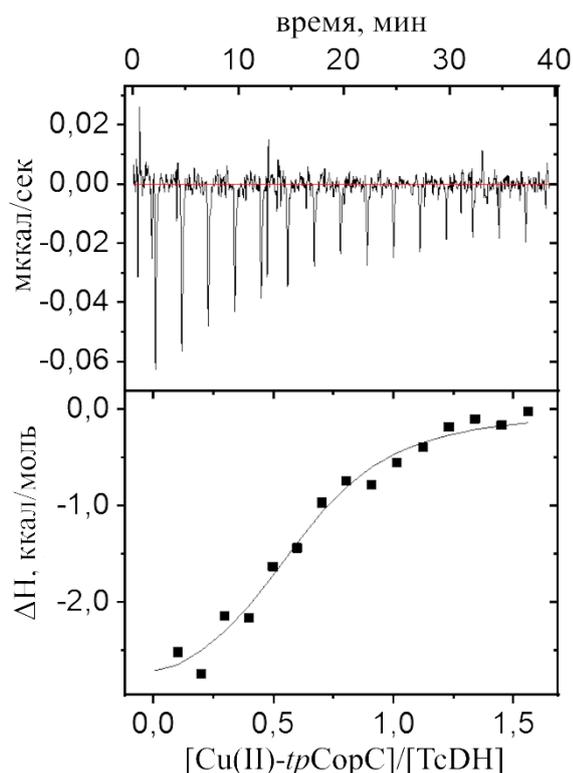


Рис. 43. Определение K_D комплекса апо-ТсДН и Cu(II)-*tpCopC* методом ИТК: верхняя панель - ИТК кривая титрования и нижняя панель – изотерма связывания. $\Delta H = -3,1$ ккал/моль, $\Delta G = -7,7$ ккал/моль, $T\Delta S = -16,1$ ккал/моль. Эксперимент проводили в трех независимых повторностях в боратном буфере, pH 9,5, 25 °С.

3.3.5. Перенос иона меди от *tpCopC* в активный центр ТсДН

Способность передавать ионы меди *tpCopC* в активный центр ТсДН была исследована *in vitro*. Для этого инкубировали апо-ТсДН и Cu(II)-*tpCopC* при pH 9,5 в соотношении 1 : 4, после чего белки разделяли с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300. Из полученных данных следует, что после инкубации ТсДН и Cu(II)-*tpCopC* в течение 1 часа ферментативная активность ТсДН возросла незначительно до $0,3 \text{ мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ (Табл. 6), что соответствует менее 5% активного фермента. Содержание иона меди в ТсДН, после инкубации с Cu(II)-*tpCopC*, составило $0,6 \pm 0,1$ иона на субъединицу. Увеличение времени инкубации с 1 часа до 24 часов не приводило к значимому изменению активности ТсДН и содержанию ионов меди на мономер (Табл. 6). В контроле при инкубации ТсДН со свободными ионами Cu(II) в течении 1 часа активность составляла приблизительно половину от максимальной, а при увеличении инкубации до 24 часов – активность была максимальной (Табл. 6). Перенос $0,5 \pm 0,2$ ионов свидетельствует о том, что аффинность сайтов ТсДН значительно не превышает аффинность *tpCopC*, то есть полное заполнение сайтов не происходит по термодинамическим причинам. Вероятно,

происходит частичное заполнение сайтов Cu1 и Cu2 TcDH, согласно порядку заполнения сайтов TcDH (**Рис. 32**).

Таблица 6. Ферментативная активность и содержание ионов меди у препаратов TcDH, активированных разными способами.

TcDH, активированный с помощью	Активность, $\mu\text{кмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$	Содержание меди, моль/моль субъединицы TcDH (ICP-MS)
неактивный	$0,03 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
Cu(II), 1 час (контроль)	$4,4 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,2$
Cu(II), 24 часа (контроль)	$9,0 \pm 0,9$	$2,4 \pm 0,2$
Cu(II)- <i>tpCorC</i> , 1 час	$0,3 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
Cu(II)- <i>tpCorC</i> , 24 часа	$0,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
Cu(I) (Cu(II) + 1 мМ аскорбат), 1 час (контроль)	$9,3 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,3$
Cu(I)- <i>tpCorC</i> (Cu(II)- <i>tpCorC</i> + 1 мМ аскорбат), 1 час	$8,4 \pm 2,0$	$2,4 \pm 0,1$

Примечание. *Концентрация TcDH при инкубации во всех экспериментах 50 мкМ, концентрация Cu(II) и Cu(II)-*tpCorC* – 200 мкМ. Инкубация проводилась в 25 мМ боратном буфере, рН 9,5, при комнатной температуре. Активность измеряли по стандартной методике, как описано в разделе 2.5.

При инкубации апо-TcDH с Cu(II)-*tpCorC* в восстановительных условиях (в присутствии аскорбата) в течение часа ситуация меняется драматически: активность TcDH достигает максимального значения и происходит полное встраивание ионов меди в активный центр (**Табл. 6**). Важно отметить, что восстановление Cu(II)-*tpCorC* не сопровождается диссоциацией комплекса из-за высокой аффинности *tpCorC* к меди в двух степенях окисления, а перенос иона меди в активный центр TcDH происходит через образование промежуточного Cu(I)-*tpCorC*. Поскольку аффинность сайтов TcDH к ионам Cu(I) выше, чем у *tpCorC*, происходит перенос ионов Cu(I) от *tpCorC* к TcDH.

Таким образом, наиболее вероятный механизм переноса ионов меди от *tpCorC* к TcDH включает промежуточное восстановление Cu(II)-*tpCorC* до Cu(I)-*tpCorC* с последующим образованием комплекса TcDH-Cu(I)-*tpCorC* (**Рис. 44**). Затем ион Cu(I) передается по градиенту сродства от *tpCorC* к TcDH. Высокое сродство *tpCorC* к ионам

Cu(II) позволяет эффективно захватывать ионы меди в условиях их низкой доступности в окислительной среде периплазмы. В комплексе с акцепторным белком связанные ионы Cu(I) достаточно легко диссоциируют из восстановленной формы Cu(I)-*tp*CopC. Вопрос о механизме восстановления комплекса Cu(II)-*tp*CopC *in vivo* и потенциальных участниках этого процесса остается открытым. Однако, если принять во внимание высокую экспонированность сайта «гистидиновой скрепки» CopC к растворителю, в этом процессе могут участвовать неспецифические низкомолекулярные восстановители, такие как восстановленная форма глутатиона, которая может присутствовать в значительных количествах в периплазматической фракции [197].

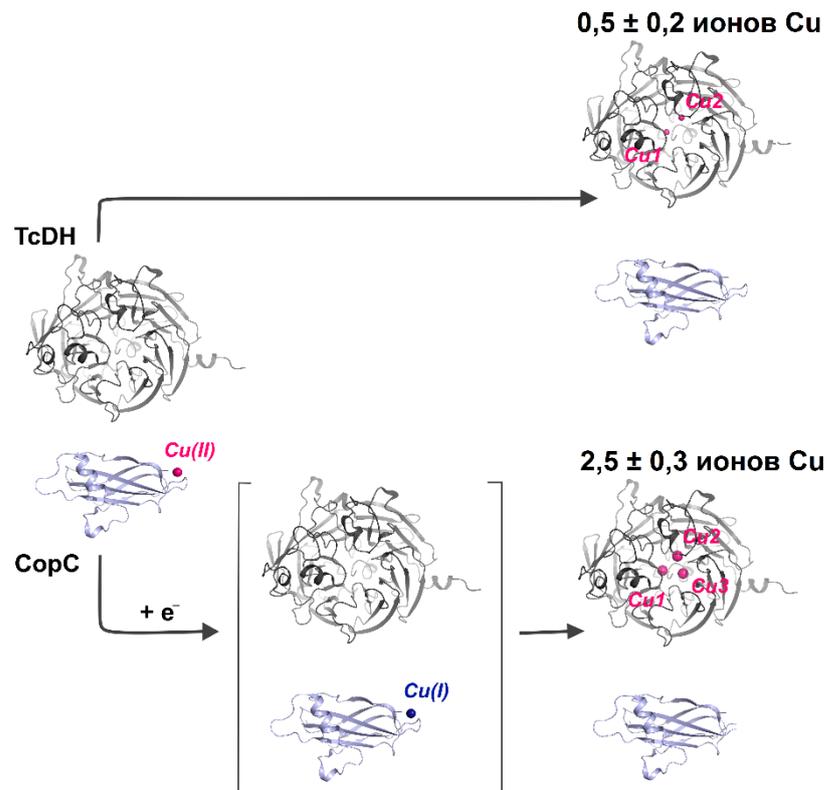


Рис. 44. Схема сборки трехъядерного медного центра TcDH с помощью *tp*CopC.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лишь для некоторых медь-содержащих ферментов были изучены процессы встраивания ионов меди в активный центр и идентифицированы металлошапероны, которые принимают участие в этом процессе. Данное направление исследований в биогенезе медь-содержащих ферментов является сложной, но интересной задачей, поскольку требует изучения взаимодействия белков, происходящего в клетке. Исследование взаимодействия белков *in vitro*, а также оценка термодинамического параметра высокоаффинного связывания ионов металла с белками для определения механизма передачи ионов от донора ионов меди к акцептору, являются необходимыми этапами для установления механизма сборки медных центров *in vivo*. Для ключевого метаболического фермента TcDH из бактерии *Tv. paradoxus*, обладающего трехъядерным медным центром (Cu1, Cu2 и Cu3) с уникальной архитектурой, процесс встраивания ионов меди *in vitro* с образованием каталитически активной формы фермента был впервые подробно изучен в данной работе.

На первом этапе работы были измерены кинетические параметры (K_M и v_{max}) реакции окисления тиоцианата до цианата с образованием двух электронов, которую катализирует TcDH, с нефизиологическими акцепторами электронов. Возможная роль акцептора электронов в реакции TcDH *in vivo* была исследована для двух белков – цитохромов c552 и c546/556. Было показано, что оба цитохрома способны принимать электроны в реакции, катализируемой TcDH.

Эксперименты по кинетике активации TcDH показали, что процесс встраивания ионов Cu(I) в активный центр фермента является быстрым процессом (< 1 мин) по сравнению с ионами Cu(II) (~ 24 часа). По-видимому, это связано с отличиями в строении гидратной оболочки и разницей в зарядах ионов Cu(II) и Cu(I), а также особенностями строения субстратного канала TcDH, ведущего к активному центру. Исходя из разницы в скоростях активации с помощью Cu(II)/Cu(I), мы предполагаем, что сборка активного центра TcDH *in vivo* происходит с участием ионов Cu(I).

При удалении ионов меди из активного центра TcDH наблюдалась медленное снижение ферментативной активности (7-14 суток) даже в присутствии лигандов, обладающих более высокой аффинностью к ионам Cu(II) и Cu(I) по сравнению с TcDH. Возможное объяснение связано с низкой доступностью активного центра TcDH, располагающегося на дне узкого субстратного канала на расстоянии 12 Å от поверхности глобулы. Можно предположить, что, помимо высокого сродства к ионам меди,

малодоступность активного центра является важным приспособлением для сохранения кофактора у медных ферментов как конечных акцепторов меди *in vivo*.

TсDH демонстрирует высокую аффинность к ионам меди в двух степенях окисления, что важно для предотвращения потери ионов в ходе каталитического цикла окисления/восстановления. Согласно полученной оценке, значения $\log K_D$ трех сайтов TсDH для ионов Cu(II) лежат в диапазоне $-11,7 \geq \log K_D \geq -16,4$ при pH 9,5, причем аффинность сайтов увеличивается в ряду $Cu_3 \ll Cu_1 \approx Cu_2$. Все три сайта TсDH также способны связывать ионы Cu(I) со средним значением $\log K_D = -13,0 \pm 0,3$ при pH 9,5.

С помощью ЭПР-спектроскопии был визуализирован процесс встраивания ионов меди в активный центр TсDH. Изначально медь встраивается в сайт Cu₂, находящийся ближе всех к субстратному каналу, а затем распределяется между сайтами Cu₁ и Cu₂ ввиду их близкой аффинности к ионам Cu(II). Последним заполняется сайт Cu₃, что связано с более низкой аффинностью сайта по сравнению с Cu₁ и Cu₂ из-за нетипичной для иона Cu(II) координации.

В качестве металлошаперона, участвующего в сборке активного центра TсDH *in vivo*, был предложен *tpCopC*, относящийся к широко распространенному у бактерий семейству медь-связывающих белков. Подробная биохимическая характеристика показала, что *tpCopC* демонстрирует высокую аффинность как к ионам Cu(II) ($\log K_D = -16,3 \pm 0,6$ при pH 7,4), так и ионам Cu(I) ($\log K_D = -11,1 \pm 0,2$ при pH 7,4). С помощью рентгеноструктурного анализа было показано, что ион Cu(II) координируется в мотиве «гистидиновая скрепка» с участием аминогруппы и имидазольного кольца концевой H31, боковых групп консервативных остатков D140 и H142 и молекулы воды. Из результатов QM/MM MD, ион Cu(I) может быть координирован боковыми цепями H142, H31 и D140 в тригональной геометрии, благоприятной для иона Cu(I).

TсDH и Cu(II)-*tpCopC* образуют комплекс с $\log K_D = -5,7 \pm 0,3$, и в комплексе происходит передача связанного иона меди между белками. В окисленных условиях наблюдается перенос в активный центр TсDH около $0,5 \pm 0,2$ ионов меди на субъединицу от Cu(II)-*tpCopC*, тогда как в восстановленных – $2,4 \pm 0,1$ ионов меди, причем в последнем случае активность TсDH достигает максимального значения. Таким образом, механизм передачи иона меди от *tpCopC* к TсDH скорее всего включает стадию промежуточного восстановления Cu(II)-*tpCopC* до Cu(I)-*tpCopC* с последующим образованием комплекса TсDH - Cu(I)-*tpCopC*, в котором вследствие значительно более низкого сродства *tpCopC* к ионам Cu(I) происходит перенос ионов меди в активный центр TсDH по градиенту роста аффинности. Вопрос о восстановителе, участвующим в данном процессе, остается

открытым, но высокая доступность медного сайта *tpCopC* растворителю способствует восстановлению с помощью, например, 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 TcDH.
2. Встраивание ионов Cu(I) в активный центр TcDH *in vitro* происходит быстрее (<1 мин), чем ионов Cu(II) (~ 24 часа). Удаление ионов меди из активного центра TcDH с помощью высокоаффинных лигандов ионов меди является кинетически медленным процессом (~7-14 дней) в зависимости от лиганда и его концентрации.
3. TcDH 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. TcDH 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 TcDH *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 H31, боковыми группами остатков D140, H142 и молекулой воды в аксиальном положении в квадратно-пиримидальной геометрии. Ион Cu(I) связывается в том же сайте боковыми группами H31, D140 и H142 в тригональной геометрии.
6. TcDH 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 TcDH через промежуточную стадию восстановления до Cu(I)-*tpCopC*, т.е. выполнять роль металлошаперона TcDH *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. Габибова 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 одногемового цитохрома с из галоалкалофильных бактерий рода *Thiolkalivibrio* // 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 одногемовых 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 *Thiolkalivibrio paradoxus*// 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. 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boal A. K., Rosenzweig A. C. Structural biology of copper trafficking // *Chem. Rev.* - 2009. - Vol. 109, № 10. - P. 4760–4779.
2. Robinson N. J., Winge D. R. Copper metallochaperones // *Annu. Rev. Biochem.* - 2010. - Vol. 79, № 1. - P. 537–562.
3. Giampietro R., Spinelli F., Contino M., Colabufo N. A. The pivotal role of copper in neurodegeneration: A new strategy for the therapy of neurodegenerative disorders // *Mol. Pharm.* - 2018. - Vol. 15, № 3. - P. 808–820.
4. Rubino J. T., Franz K. J. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function // *J. Inorg. Biochem.* - 2012. - Vol. 107, № 1. - P. 129–143.
5. Pearson R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles // *J. Chem. Educ.* - 1968. - Vol. 45, № 9. - P. 581.
6. Messerschmidt A. Copper Metalloenzymes // *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, - 2010. - P. 489–545.
7. Harber, F.; Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // *Proc. R. Soc. London. Ser. A - Math. Phys. Sci.* - 1934. - Vol. 147, № 861. - P. 332–351.
8. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2007. - Vol. 39, № 1. - P. 44–84.
9. Foster A. W., Osman D., Robinson N. J. Metal preferences and metallation // *J. Biol. Chem.* - 2014. - Vol. 289, № 41. - P. 28095–28103.
10. Stewart L. J., Thaqi D., Kobe B., McEwan A. G., Waldron K. J., Djoko K. Y. Handling of nutrient copper in the bacterial envelope // *Metallomics*. - 2019. - Vol. 11, № 1. - P. 50–63.
11. Rae T. D., Schmidt P. J., Pufahl R. A., Culotta V. C., V. O'Halloran T. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase // *Science (80-)*. - 1999. - Vol. 284, № 5415. - P. 805–808.
12. Rensing C., McDevitt S. F. The Copper metallome in prokaryotic cells // *Met. Ions Life Sci.* - 2013. - Vol. 12. - P. 417–450.
13. Canonica F., Klose D., Ledermann R., Sauer M. M., Abicht H. K., Quade N., Gossert A. D., Chesnov S., Fischer H.-M., Jeschke G., Hennecke H., Glockshuber R. Structural basis and mechanism for metallochaperone-assisted assembly of the Cu A center in cytochrome oxidase // *Sci. Adv.* - 2019. - Vol. 5, № 7.
14. Ekici S., Pawlik G., Lohmeyer E., Koch H.-G., Daldal F. Biogenesis of cbb3-type cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus* // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* - 2012. -

Vol. 1817, № 6. - P. 898–910.

15. Ridge P. G., Zhang Y., Gladyshev V. N. Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen // *PLoS One* / ed. Volff J.-N. - 2008. - Vol. 3, № 1. - P. e1378.
16. Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. Occurrence of copper proteins through the three domains of life: A bioinformatic approach // *J. Proteome Res.* - 2008. - Vol. 7, № 1. - P. 209–216.
17. Novoa-Aponte L., Argüello J. M. Unique underlying principles shaping copper homeostasis networks // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* - 2022. - Vol. 27, № 6. - P. 509–528.
18. Teitzel G. M., Geddie A., De Long S. K., Kirisits M. J., Whiteley M., Parsek M. R. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* - 2006. - Vol. 188, № 20. - P. 7242–7256.
19. Almárcegui R. J., Navarro C. A., Paradelo A., Albar J. P., von Bernath D., Jerez C. A. New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a quantitative proteomic analysis // *J. Proteome Res.* - 2014. - Vol. 13, № 2. - P. 946–960.
20. Selamoglu N., Önder Ö., Öztürk Y., Khalfaoui-Hassani B., Blaby-Haas C. E., Garcia B. A., Koch H.-G., Daldal F. Comparative differential cuproproteomes of *Rhodobacter capsulatus* reveal novel copper homeostasis related proteins // *Metallomics.* - 2020. - Vol. 12, № 4. - P. 572–591.
21. Lutkenhaus J. F. Role of a major outer membrane protein in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* - 1977. - Vol. 131, № 2. - P. 631–637.
22. Mokhele K., Tang Y. J., Clark M. A., Ingraham J. L. A *Pseudomonas stutzeri* outer membrane protein inserts copper into N₂O reductase // *J. Bacteriol.* - 1987. - Vol. 169, № 12. - P. 5721–5726.
23. Wunsch P., Herb M., Wieland H., Schiek U. M., Zumft W. G. Requirements for Cu A and Cu-S Center Assembly of Nitrous Oxide Reductase Deduced from Complete Periplasmic Enzyme Maturation in the Nondenitrifier *Pseudomonas putida* // *J. Bacteriol.* - 2003. - Vol. 185, № 3. - P. 887–896.
24. Schalk I. J., Cunrath O. An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa* // *Environ. Microbiol.* - 2016. - Vol. 18, № 10. - P. 3227–3246.
25. Yoneyama H., Nakae T. Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein // *Microbiology.* - 1996. - Vol. 142, № 8. - P. 2137–2144.
26. Mermod M., Magnani D., Solioz M., Stoyanov J. V. The copper-inducible ComR (YcfQ) repressor regulates expression of ComC (YcfR), which affects copper permeability of the outer membrane of *Escherichia coli* // *BioMetals.* - 2012. - Vol. 25, № 1. - P. 33–43.

27. Kenney G. E., Rosenzweig A. C. Chalkophores // *Annu. Rev. Biochem.* - 2018. - Vol. 87, № 1. - P. 645–676.
28. Kenney G. E., Rosenzweig A. C. Genome mining for methanobactins // *BMC Biol.* - 2013. - Vol. 11, № 1. - P. 17.
29. Ekici S., Yang H., Koch H.-G., Daldal F. Novel transporter required for biogenesis of cbb 3 -Type cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus* // *MBio* / ed. Shuman H. A. - 2012. - Vol. 3, № 1.
30. Khalfaoui-Hassani B., Wu H., Blaby-Haas C. E., Zhang Y., Sandri F., Verissimo A. F., Koch H.-G., Daldal F. Widespread distribution and functional specificity of the copper importer CcoA: distinct Cu uptake routes for bacterial cytochrome c oxidases // *MBio* / ed. Shuman H. A. - 2018. - Vol. 9, № 1. - P. e00065-18.
31. Khalfaoui-Hassani B., Verissimo A. F., Koch H.-G., Daldal F. Uncovering the transmembrane metal binding site of the novel bacterial major facilitator superfamily-type copper importer CcoA // *MBio* / ed. Shuman H. A. - 2016. - Vol. 7, № 1. - P. e01981-15.
32. Zhang Y., Blaby-Haas C. E., Steimle S., Verissimo A. F., Garcia-Angulo V. A., Koch H.-G., Daldal F., Khalfaoui-Hassani B. Cu Transport by the Extended Family of CcoA-like Transporters (CalT) in Proteobacteria // *Sci. Rep.* - 2019. - Vol. 9, № 1. - P. 1208.
33. Aliaga M. E., López-Alarcón C., Bridi R., Speisky H. Redox-implications associated with the formation of complexes between copper ions and reduced or oxidized glutathione // *J. Inorg. Biochem.* - 2016. - Vol. 154. - P. 78–88.
34. Hatori Y., Inouye S., Akagi R. Thiol-based copper handling by the copper chaperone Atox1 // *IUBMB Life.* - 2017. - Vol. 69, № 4. - P. 246–254.
35. Marckmann D., Trasnea P.-I., Schimpf J., Winterstein C., Andrei A., Schmollinger S., Blaby-Haas C. E., Friedrich T., Daldal F., Koch H.-G. The cbb 3 -type cytochrome oxidase assembly factor CcoG is a widely distributed cupric reductase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2019. - Vol. 116, № 42. - P. 21166–21175.
36. Zhou L., Singleton C., Le Brun N. E. High Cu(I) and low proton affinities of the CXXC motif of *Bacillus subtilis* CopZ // *Biochem. J.* - 2008. - Vol. 413, № 3. - P. 459–465.
37. Hearnshaw S., West C., Singleton C., Zhou L., Kihlken M. A., Strange R. W., Le Brun N. E., Hemmings A. M. A Tetranuclear Cu(I) Cluster in the Metallochaperone Protein CopZ // *Biochemistry.* - 2009. - Vol. 48, № 40. - P. 9324–9326.
38. Lu Z. H., Dameron C. T., Solioz M. The *Enterococcus hirae* paradigm of copper homeostasis: copper chaperone turnover, interactions, and transactions // *BioMetals.* - 2003. - Vol. 16, № 1. - P. 137–143.
39. Singleton C., Hearnshaw S., Zhou L., Le Brun N. E., Hemmings A. M. Mechanistic

insights into Cu(I) cluster transfer between the chaperone CopZ and its cognate Cu(I)-transporting P-type ATPase, CopA // *Biochem. J.* - 2009. - Vol. 424, № 3. - P. 347–356.

40. Neubert M. J., Dahlmann E. A., Ambrose A., Johnson M. D. L. Copper chaperone CupA and zinc control CopY regulation of the Pneumococcal cop operon // *mSphere* / ed. Sawers G. - 2017. - Vol. 2, № 5. - P. e00372-17.

41. Fu Y., Tsui H.-C. T., Bruce K. E., Sham L.-T., Higgins K. A., Lisher J. P., Kazmierczak K. M., Maroney M. J., Dann C. E., Winkler M. E., Giedroc D. P. A new structural paradigm in copper resistance in *Streptococcus pneumoniae* // *Nat. Chem. Biol.* - 2013. - Vol. 9, № 3. - P. 177–183.

42. Blindauer C. A., Harrison M. D., Parkinson J. A., Robinson A. K., Cavet J. S., Robinson N. J., Sadler P. J. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2001. - Vol. 98, № 17. - P. 9593–9598.

43. Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Kozyreva T., Zovo K., Palumaa P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations // *Nature*. - 2010. - Vol. 465, № 7298. - P. 645–648.

44. Olafson R. W., Abel K., Sim R. G. Prokaryotic metallothionein: Preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1979. - Vol. 89, № 1. - P. 36–43.

45. Vita N., Platsaki S., Baslé A., Allen S. J., Paterson N. G., Crombie A. T., Murrell J. C., Waldron K. J., Dennison C. A four-helix bundle stores copper for methane oxidation // *Nature*. - 2015. - Vol. 525, № 7567. - P. 140–143.

46. Vita N., Landolfi G., Baslé A., Platsaki S., Lee J., Waldron K. J., Dennison C. Bacterial cytosolic proteins with a high capacity for Cu(I) that protect against copper toxicity // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6, № 1. - P. 39065.

47. Argüello J. M., Raimunda D., Padilla-Benavides T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* - 2013. - Vol. 3. - P. 73.

48. Bondarczuk K., Piotrowska-Seget Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria // *Cell Biol. Toxicol.* - 2013. - Vol. 29, № 6. - P. 397–405.

49. Grass G., Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2001. - Vol. 286, № 5. - P. 902–908.

50. Singh S. K., Grass G., Rensing C., Montfort W. R. Cuprous Oxidase Activity of CueO from *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* - 2004. - Vol. 186, № 22. - P. 7815–7817.

51. Changela A., Chen K., Xue Y., Holschen J., Outten C. E., O'Halloran T. V., Mondragón A. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR // *Science* (80-.). - 2003. - Vol. 301, № 5638. - P. 1383–1387.

52. González-Guerrero M., Argüello J. M. Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: Soluble

- Cu + chaperones directly transfer Cu + to transmembrane transport sites // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2008. - Vol. 105, № 16. - P. 5992–5997.
53. Gourdon P., Liu X.-Y., Skjørringe T., Morth J. P., Møller L. B., Pedersen B. P., Nissen P. Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase // *Nature*. - 2011. - Vol. 475, № 7354. - P. 59–64.
54. Argüello J. M., Patel S. J., Quintana J. Bacterial Cu(+)-ATPases: models for molecular structure–function studies // *Metallomics*. - 2016. - Vol. 8, № 9. - P. 906–914.
55. Mealman T. D., Blackburn N. J., McEvoy M. M. Metal Export by CusCFBA, the Periplasmic Cu(I)/Ag(I) Transport System of *Escherichia coli* // *Current Topics in Membranes*. Elsevier, - 2012. - Vol. 69, № I. 163–196 p.
56. Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O’Halloran T. V. The Independent cue and cusSystems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* - 2001. - Vol. 276, № 33. - P. 30670–30677.
57. Singh S. K., Roberts S. A., McDevitt S. F., Weichsel A., Wildner G. F., Grass G. B., Rensing C., Montfort W. R. Crystal Structures of Multicopper Oxidase CueO Bound to Copper(I) and Silver(I) // *J. Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 286, № 43. - P. 37849–37857.
58. Padilla-Benavides T., George Thompson A. M., McEvoy M. M., Argüello J. M. Mechanism of ATPase-mediated Cu⁺ export and delivery to periplasmic chaperones: the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF. // *J. Biol. Chem.* - 2014. - Vol. 289, № 30. - P. 20492–20501.
59. Cha J.-S., Cooksey D. A. Copper Hypersensitivity and Uptake in *Pseudomonas syringae* Containing Cloned Components of the Copper Resistance Operon // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1993. - Vol. 59, № 5. - P. 1671–1674.
60. Zhang L., Koay M., Maher M. J., Xiao Z., Wedd A. G. Intermolecular Transfer of Copper Ions from the CopC Protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal Structures of Fully Loaded Cu I Cu II Forms // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006. - Vol. 128, № 17. - P. 5834–5850.
61. Lawton T. J., Kenney G. E., Hurley J. D., Rosenzweig A. C. The CopC Family: Structural and Bioinformatic Insights into a Diverse Group of Periplasmic Copper Binding Proteins // *Biochemistry*. - 2016. - Vol. 55, № 15. - P. 2278–2290.
62. Xiao Z., Gottschlich L., van der Meulen R., Udagedara S. R., Wedd A. G. Evaluation of quantitative probes for weaker Cu(i) binding sites completes a set of four capable of detecting Cu(i) affinities from nanomolar to attomolar // *Metallomics*. - 2013. - Vol. 5, № 5. - P. 501.
63. Djoko K. Y., Xiao Z., Huffman D. L., Wedd A. G. Conserved Mechanism of Copper Binding and Transfer. A Comparison of the Copper-Resistance Proteins PcoC from *Escherichia coli* and CopC from *Pseudomonas syringae* // *Inorg. Chem.* - 2007. - Vol. 46, № 11. - P. 4560–

4568.

64. Ipsen J. Ø., Hernández-Rollán C., Muderspach S. J., Brander S., Bertelsen A. B., Jensen P. E., Nørholm M. H. H., Lo Leggio L., Johansen K. S. Copper binding and reactivity at the histidine brace motif: insights from mutational analysis of the *Pseudomonas fluorescens* copper chaperone CopC // *FEBS Lett.* / ed. Ferguson S. - 2021. - Vol. 595, № 12. - P. 1708–1720.

65. Wijekoon C. J. K., Young T. R., Wedd A. G., Xiao Z. CopC protein from *Pseudomonas fluorescens* SBW25 features a conserved novel high-affinity Cu(II) binding site // *Inorg. Chem.* - 2015. - Vol. 54, № 6. - P. 2950–2959.

66. Serventi F., Youard Z. A., Murset V., Huwiler S., Bühler D., Richter M., Luchsinger R., Fischer H.-M., Brogioli R., Niederer M., Hennecke H. Copper starvation-inducible protein for cytochrome oxidase biogenesis in *Bradyrhizobium japonicum* // *J. Biol. Chem.* - 2012. - Vol. 287, № 46. - P. 38812–38823.

67. Hirooka K., Edahiro T., Kimura K., Fujita Y. Direct and indirect regulation of the *ycnKJI* operon involved in copper uptake through two transcriptional repressors, YcnK and CsoR, in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* - 2012. - Vol. 194, № 20. - P. 5675–5687.

68. Kenney G. E., Sadek M., Rosenzweig A. C. Copper-responsive gene expression in the methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Metallomics.* - 2016. - Vol. 8, № 9. - P. 931–940.

69. Hadley R. C., Zhitnitsky D., Livnat-Levanon N., Masrati G., Vigonsky E., Rose J., Bent-Tal N., Rosenzweig A. C., Lewinson O. The copper-linked *Escherichia coli* AZY operon: Structure, metal binding, and a possible physiological role in copper delivery // *J. Biol. Chem.* - 2022. - Vol. 298, № 1. - P. 101445.

70. Natale P., Brüser T., Driessen A. J. M. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* - 2008. - Vol. 1778, № 9. - P. 1735–1756.

71. Öztürk Y., Blaby-Haas C. E., Daum N., Andrei A., Rauch J., Daldal F., Koch H.-G. Maturation of *Rhodobacter capsulatus* Multicopper Oxidase CutO depends on the CopA copper efflux pathway and requires the cutF product // *Front. Microbiol.* - 2021. - Vol. 12. - P. 720644.

72. González-Guerrero M., Raimunda D., Cheng X., Argüello J. M. Distinct functional roles of homologous Cu + efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa* // *Mol. Microbiol.* - 2010. - Vol. 78, № 5. - P. 1246–1258.

73. Hassani B. K., Astier C., Nitschke W., Ouchane S. CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes // *J. Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285, № 25. - P. 19330–19337.

74. Ostermeier C. Cytochrome c oxidase // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 1996. - Vol. 6, № 4. - P.

460–466.

75. Yoshikawa S. Cytochrome c oxidase. - 2002. - P. 341–395.
76. Kaila V. R. I., Verkhovsky M. I., Wikström M. Proton-Coupled Electron Transfer in Cytochrome Oxidase // *Chem. Rev.* - 2010. - Vol. 110, № 12. - P. 7062–7081.
77. Thompson A. K., Gray J., Liu A., Hosler J. P. The roles of *Rhodobacter sphaeroides* copper chaperones PCuAC and Sco (PrrC) in the assembly of the copper centers of the aa3-type and the cbb3-type cytochrome c oxidases // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* - 2012. - Vol. 1817, № 6. - P. 955–964.
78. Trasnea P., Utz M., Khalfaoui-Hassani B., Lagies S., Daldal F., Koch H. Cooperation between two periplasmic copper chaperones is required for full activity of the cbb 3 -type cytochrome c oxidase and copper homeostasis in *Rhodobacter capsulatus* // *Mol. Microbiol.* - 2016. - Vol. 100, № 2. - P. 345–361.
79. Gurumoorthy P., Ludwig B. Deciphering protein–protein interactions during the biogenesis of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* // *FEBS J.* - 2015. - Vol. 282, № 3. - P. 537–549.
80. Bühler D., Rossmann R., Landolt S., Balsiger S., Fischer H.-M., Hennecke H. Disparate Pathways for the Biogenesis of Cytochrome Oxidases in *Bradyrhizobium japonicum* // *J. Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285, № 21. - P. 15704–15713.
81. Arnesano F., Banci L., Bertini I., Martinelli M. Ortholog search of proteins involved in copper delivery to cytochrome c oxidase and functional analysis of paralogs and gene neighbors by genomic context // *J. Proteome Res.* - 2005. - Vol. 4, № 1. - P. 63–70.
82. Barth K. R., Isabella V. M., Clark V. L. Biochemical and genomic analysis of the denitrification pathway within the genus *Neisseria* // *Microbiology.* - 2009. - Vol. 155, № 12. - P. 4093–4103.
83. Andrews D., Mattatall N. R., Arnold D., Hill B. C. Expression, purification, and characterization of the CuA–cytochrome c domain from subunit II of the *Bacillus subtilis* cytochrome caa3 complex in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* - 2005. - Vol. 42, № 2. - P. 227–235.
84. Chacón K. N., Blackburn N. J. Stable Cu(II) and Cu(I) Mononuclear Intermediates in the Assembly of the CuA Center of *Thermus thermophilus* Cytochrome Oxidase // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - Vol. 134, № 39. - P. 16401–16412.
85. Canonica F., Hennecke H., Glockshuber R. Biochemical pathway for the biosynthesis of the Cu A center in bacterial cytochrome c oxidase // *FEBS Lett.* - 2019. - Vol. 593, № 21. - P. 2977–2989.
86. Balatri E., Banci L., Bertini I., Cantini F., Ciofi-Baffoni S. Solution Structure of Sco1 //

Structure. - 2003. - Vol. 11, № 11. - P. 1431–1443.

87. Williams J. C., Sue C., Banting G. S., Yang H., Glerum D. M., Hendrickson W. A., Schon E. A. Crystal Structure of Human SCO1 // *J. Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280, № 15. - P. 15202–15211.

88. Abajian C., Rosenzweig A. C. Crystal structure of yeast Sco1 // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* - 2006. - Vol. 11, № 4. - P. 459–466.

89. Mohorko E., Abicht H. K., Bühler D., Glockshuber R., Hennecke H., Fischer H.-M. Thioredoxin-like protein TlpA from *Bradyrhizobium japonicum* is a reductant for the copper metallochaperone ScoI // *FEBS Lett.* - 2012. - Vol. 586, № 23. - P. 4094–4099.

90. Timón-Gómez A., Nývltová E., Abriata L. A., Vila A. J., Hosler J., Barrientos A. Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2018. - Vol. 76. - P. 163–178.

91. Hill B. C., Andrews D. Differential affinity of BsSCO for Cu(II) and Cu(I) suggests a redox role in copper transfer to the CuA center of cytochrome c oxidase // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* - 2012. - Vol. 1817, № 6. - P. 948–954.

92. Xu S., Andrews D., Hill B. C. The affinity of yeast and bacterial SCO proteins for CU(I) and CU(II). A capture and release strategy for copper transfer // *Biochem. Biophys. Reports.* - 2015. - Vol. 4. - P. 10–19.

93. Blundell K. L. I. M., Hough M. A., Vijgenboom E., Worrall J. A. R. Structural and mechanistic insights into an extracytoplasmic copper trafficking pathway in *Streptomyces lividans* // *Biochem. J.* - 2014. - Vol. 459, № 3. - P. 525–538.

94. Abriata L. A., Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Gkazonis P., Spyroulias G. A., Vila A. J., Wang S. Mechanism of CuA assembly // *Nat. Chem. Biol.* - 2008. - Vol. 4, № 10. - P. 599–601.

95. Greiner P., Hannappel A., Werner C., Ludwig B. Biogenesis of cytochrome c oxidase — in vitro approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* - 2008. - Vol. 1777, № 7–8. - P. 904–911.

96. Thompson A. K., Smith D., Gray J., Carr H. S., Liu A., Winge D. R., Hosler J. P. Mutagenic Analysis of Cox11 of *Rhodobacter sphaeroides*: Insights into the Assembly of Cu B of Cytochrome c Oxidase // *Biochemistry.* - 2010. - Vol. 49, № 27. - P. 5651–5661.

97. Hiser L., Di Valentin M., Hamer A. G., Hosler J. P. Cox11p Is Required for Stable Formation of the CuBand Magnesium Centers of Cytochrome c Oxidase // *J. Biol. Chem.* - 2000. - Vol. 275, № 1. - P. 619–623.

98. Nývltová E., Dietz J. V., Seravalli J., Khalimonchuk O., Barrientos A. Coordination of metal center biogenesis in human cytochrome c oxidase // *Nat. Commun.* - 2022. - Vol. 13, № 1.

- P. 3615.

99. Khalimonchuk O., Bird A., Winge D. R. Evidence for a Pro-oxidant Intermediate in the Assembly of Cytochrome Oxidase // *J. Biol. Chem.* - 2007. - Vol. 282, № 24. - P. 17442–17449.
100. Kroneck P. M. H. Walking the seven lines: binuclear copper A in cytochrome c oxidase and nitrous oxide reductase // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* - 2018. - Vol. 23, № 1. - P. 27–39.
101. Pomowski A., Zumft W. G., Kroneck P. M. H., Einsle O. N₂O binding at a [4Cu:2S] copper–sulphur cluster in nitrous oxide reductase // *Nature.* - 2011. - Vol. 477, № 7363. - P. 234–237.
102. Zumft W. G., Kroneck P. M. H. Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea // *Advances in Microbial Physiology.* - 2006. - Vol. 52, № 06. 107–227 p.
103. McGuirl M. A., Bollinger J. A., Coper N., Scott R. A., Dooley D. M. Expression, purification, and characterization of NosL, a novel Cu(I) protein of the nitrous oxide reductase (nos) gene cluster // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* - 2001. - Vol. 6, № 2. - P. 189–195.
104. Prasser B., Schöner L., Zhang L., Einsle O. The copper chaperone NosL forms a heterometal site for Cu delivery to nitrous oxide reductase // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2021. - Vol. 60, № 34. - P. 18810–18814.
105. Bennett S. P., Soriano-Laguna M. J., Bradley J. M., Svistunenko D. A., Richardson D. J., Gates A. J., Le Brun N. E. NosL is a dedicated copper chaperone for assembly of the CuZ center of nitrous oxide reductase // *Chem. Sci.* - 2019. - Vol. 10, № 19. - P. 4985–4993.
106. Müller C., Zhang L., Zipfel S., Topitsch A., Lutz M., Eckert J., Prasser B., Chami M., Lü W., Du J., Einsle O. Molecular interplay of an assembly machinery for nitrous oxide reductase // *Nature.* - 2022. - Vol. 608, № 7923. - P. 626–631.
107. Sullivan M. J., Gates A. J., Appia-Ayme C., Rowley G., Richardson D. J. Copper control of bacterial nitrous oxide emission and its impact on vitamin B12 -dependent metabolism // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2013. - Vol. 110, № 49. - P. 19926–19931.
108. MacPherson I. S., Murphy M. E. P. Type-2 copper-containing enzymes // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2007. - Vol. 64, № 22. - P. 2887–2899.
109. Osman D., Patterson C. J., Bailey K., Fisher K., Robinson N. J., Rigby S. E. J., Cavet J. S. The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu, Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P(1B)-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP // *Mol. Microbiol.* - 2013. - Vol. 87, № 3. - P. 466–477.
110. Pezza A., Pontel L. B., López C., Soncini F. C. Compartment and signal-specific codependence in the transcriptional control of *Salmonella* periplasmic copper homeostasis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2016. - Vol. 113, № 41. - P. 11573–11578.

111. Fenlon L. A., Slauch J. M. Cytoplasmic copper detoxification in *Salmonella* can contribute to SodC metalation but is dispensable during systemic infection // *J. Bacteriol.* / ed. O'Toole G. - 2017. - Vol. 199, № 24. - P. e00437-17.
112. Yoon B.-Y., Kim Y.-H., Kim N., Yun B.-Y., Kim J.-S., Lee J.-H., Cho H.-S., Lee K., Ha N.-C. Structure of the periplasmic copper-binding protein CueP from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2013. - Vol. 69, № 10. - P. 1867–1875.
113. Subedi P., Paxman J. J., Wang G., Ukuwela A. A., Xiao Z., Heras B. The Scs disulfide reductase system cooperates with the metallochaperone CueP in *Salmonella* copper resistance // *J. Biol. Chem.* - 2019. - Vol. 294, № 44. - P. 15876–15888.
114. Gort A. S., Ferber D. M., Imlay J. A. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* - 1999. - Vol. 32, № 1. - P. 179–191.
115. Fetherolf M. M., Boyd S. D., Taylor A. B., Kim H. J., Wohlschlegel J. A., Blackburn N. J., Hart P. J., Winge D. R., Winkler D. D. Copper-zinc superoxide dismutase is activated through a sulfenic acid intermediate at a copper ion entry site // *J. Biol. Chem.* - 2017. - Vol. 292, № 29. - P. 12025–12040.
116. Boyd S. D., Calvo J. S., Liu L., Ullrich M. S., Skopp A., Meloni G., Winkler D. D. The yeast copper chaperone for copper-zinc superoxide dismutase (CCS1) is a multifunctional chaperone promoting all levels of SOD1 maturation // *J. Biol. Chem.* - 2019. - Vol. 294, № 6. - P. 1956–1966.
117. Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E. Atomic-resolution monitoring of protein maturation in live human cells by NMR // *Nat Chem Biol.* - 2013. - Vol. 9, № 5. - P. 297–299.
118. Luchinat E., Barbieri L., Rubino J. T., Kozyreva T., Cantini F., Banci L. In-cell NMR reveals potential precursor of toxic species from SOD1 FALS mutants. // *Nat. Commun. England*, - 2014. - Vol. 5. - P. 5502.
119. Banci L., Bertini I., Cantini F., Kozyreva T., Massagni C., Palumaa P., Rubino J. T., Zovo K. Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS). // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. United States*, - 2012. - Vol. 109, № 34. - P. 13555–13560.
120. Lamb A. L., Wernimont A. K., Pufahl R. A., Culotta V. C., O'Halloran T. V., Rosenzweig A. C. Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase // *Nat. Struct. Biol.* - 1999. - Vol. 6, № 8. - P. 724–729.
121. Schmidt P. J., Rae T. D., Pufahl R. A., Hamma T., Strain J., O'Halloran T. V., Culotta V.

- C. Multiple Protein Domains Contribute to the Action of the Copper Chaperone for Superoxide Dismutase // *J. Biol. Chem.* - 1999. - Vol. 274, № 34. - P. 23719–23725.
122. Boyd S. D., Liu L., Bulla L., Winkler D. D. Quantifying the Interaction between Copper-Zinc Superoxide Dismutase (Sod1) and its Copper Chaperone (Ccs1) // *J. Proteomics Bioinform.* - 2018. - Vol. 11, № 4.
123. Aller S. G., Unger V. M. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2006. - Vol. 103, № 10. - P. 3627–3632.
124. Horrell S., Kekilli D., Strange R. W., Hough M. A. Recent structural insights into the function of copper nitrite reductases // *Metallomics.* - 2017. - Vol. 9, № 11. - P. 1470–1482.
125. Jen F. E.-C., Djoko K. Y., Bent S. J., Day C. J., McEwan A. G., Jennings M. P. A genetic screen reveals a periplasmic copper chaperone required for nitrite reductase activity in pathogenic *Neisseria* // *FASEB J.* - 2015. - Vol. 29, № 9. - P. 3828–3838.
126. Solomon E. I., Sundaram U. M., Machonkin T. E. Multicopper oxidases and oxygenases // *Chem. Rev.* - 1996. - Vol. 96, № 7. - P. 2563–2606.
127. Rolff M., Schottenheim J., Decker H., Tuzek F. Copper–O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme // *Chem. Soc. Rev.* - 2011. - Vol. 40, № 7. - P. 4077.
128. Quist D. A., Diaz D. E., Liu J. J., Karlin K. D. Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* - 2017. - Vol. 22, № 2–3. - P. 253–288.
129. Katz E., Thompson C. J., Hopwood D. A. Cloning and Expression of the Tyrosinase Gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans* // *Microbiology.* - 1983. - Vol. 129, № 9. - P. 2703–2714.
130. Ikeda K., Masujima T., Suzuki K., Sugiyama M. Cloning and sequence analysis of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1996. - Vol. 45, № 1–2. - P. 80–85.
131. Kohashi P. Y., Kumagai T., Matoba Y., Yamamoto A., Maruyama M., Sugiyama M. An efficient method for the overexpression and purification of active tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobisporus* // *Protein Expr. Purif.* - 2004. - Vol. 34, № 2. - P. 202–207.
132. Matoba Y., Kihara S., Muraki Y., Bando N., Yoshitsu H., Kuroda T., Sakaguchi M., Kayama K., Tai H., Hirota S., Ogura T., Sugiyama M. Activation Mechanism of the *Streptomyces* Tyrosinase Assisted by the Caddie Protein // *Biochemistry.* - 2017. - Vol. 56, № 41. - P. 5593–5603.
133. Matoba Y., Bando N., Oda K., Noda M., Higashikawa F., Kumagai T., Sugiyama M. A

- Molecular Mechanism for Copper Transportation to Tyrosinase That Is Assisted by a Metallochaperone, Caddie Protein // *J. Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 286, № 34. - P. 30219–30231.
134. Xiao Z., Wedd A. G. The challenges of determining metal–protein affinities // *Nat. Prod. Rep.* - 2010. - Vol. 27, № 5. - P. 768.
135. Young T. R., Xiao Z. Principles and practice of determining metal–protein affinities // *Biochem. J.* - 2021. - Vol. 478, № 5. - P. 1085–1116.
136. Whittal R. M., Ball H. L., Cohen F. E., Burlingame A. L., Prusiner S. B., Baldwin M. A. Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry // *Protein Sci.* - 2000. - Vol. 9, № 2. - P. 332–343.
137. Xiao Z., Brose J., Schimo S., Ackland S. M., La Fontaine S., Wedd A. G. Unification of the Copper(I) Binding Affinities of the Metallo-chaperones Atx1, Atox1, and Related Proteins // *J. Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 286, № 13. - P. 11047–11055.
138. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Lysenko A. M., Mityushina L. L., Kuenen J. G. Thioalkalivibrio thiocyanoxidans sp. nov. and Thioalkalivibrio paradoxus sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2002. - Vol. 52, № 2. - P. 657–664.
139. 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.
140. Varfolomeeva L. A., Shipkov N. S., Dergousova N. I., Boyko K. M., Khrenova M. G., Tikhonova T. V., Popov V. O. Molecular mechanism of thiocyanate dehydrogenase at atomic resolution // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2024. - Vol. 279. - P. 135058.
141. Berben T., Overmars L., Sorokin D. Y., Muyzer G. Comparative genome analysis of three thiocyanate oxidizing Thioalkalivibrio species isolated from soda lakes // *Front. Microbiol.* - 2017. - Vol. 8. - P. 254.
142. Berben T., Balkema C., Sorokin D. Y., Muyzer G. Analysis of the Genes Involved in Thiocyanate Oxidation during Growth in Continuous Culture of the Haloalkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacterium Thioalkalivibrio thiocyanoxidans ARh 2 T Using Transcriptomics // *mSystems* / ed. Rust M. - 2017. - Vol. 2, № 6.
143. Barr I., Guo F. Pyridine Hemochromagen Assay for Determining the Concentration of Heme in Purified Protein Solutions // *BIO-PROTOCOL.* - 2015. - Vol. 5, № 18.
144. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* - 1970. - Vol. 227, № 5259. - P. 680–685.
145. Panavas T., Sanders C., Butt T. R. SUMO Fusion Technology for Enhanced Protein Production in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems. - 2009. - P. 303–317.

146. Smith A. E., Martell R. M. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database 46, Version 8.0, U.S. Dept. of Commerce [Electronic resource]. - 2004. - P. NIST Standard Reference Data Program, Gaithersburg. URL: <https://www.nist.gov/srd/nist46>.
147. Kocyla A., Pomorski A., Krężel A. Molar absorption coefficients and stability constants of Zincon metal complexes for determination of metal ions and bioinorganic applications // *J. Inorg. Biochem.* - 2017. - Vol. 176. - P. 53–65.
148. Young T. R., Wijekoon C. J. K., Spyrou B., Donnelly P. S., Wedd A. G., Xiao Z. A set of robust fluorescent peptide probes for quantification of Cu(II) binding affinities in the micromolar to femtomolar range // *Metalomics.* - 2015. - Vol. 7, № 3. - P. 567–578.
149. Yamine A., Gao J., Kwan A. Tryptophan Fluorescence Quenching Assays for Measuring Protein-ligand Binding Affinities: Principles and a Practical Guide // *BIO-PROTOCOL.* - 2019. - Vol. 9, № 11.
150. Säbel C. E., Neureuther J. M., Siemann S. A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon // *Anal. Biochem.* - 2010. - Vol. 397, № 2. - P. 218–226.
151. Alies B., Badei B., Faller P., Hureau C. Reevaluation of Copper(I) Affinity for Amyloid- β Peptides by Competition with Ferrozine—An Unusual Copper(I) Indicator // *Chem. – A Eur. J.* - 2012. - Vol. 18, № 4. - P. 1161–1167.
152. Lin K., Wu G. Isothermal Titration Calorimetry Assays to Measure Binding Affinities In Vitro. - 2019. - P. 257–272.
153. Dobbin P. S., Butt J. N., Powell A. K., Reid G. A., Richardson D. J. Characterization of a flavocytochrome that is induced during the anaerobic respiration of Fe^{3+} by *Shewanella frigidimarina* NCIMB400. // *Biochem. J.* - 1999. - Vol. 342 (Pt 2, № Pt 2. - P. 439–448.
154. Dominguez C., Boelens R., Bonvin A. M. J. J. HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information // *J. Am. Chem. Soc.* - 2003. - Vol. 125, № 7. - P. 1731–1737.
155. van Zundert G. C. P., Rodrigues J. P. G. L. M., Trellet M., Schmitz C., Kastiris P. L., Karaca E., Melquiond A. S. J., van Dijk M., de Vries S. J., Bonvin A. M. J. J. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes // *J. Mol. Biol.* - 2016. - Vol. 428, № 4. - P. 720–725.
156. Balabin I. A., Hu X., Beratan D. N. Exploring biological electron transfer pathway dynamics with the Pathways Plugin for VMD // *J. Comput. Chem.* - 2012. - Vol. 33, № 8. - P. 906–910.
157. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* - 1996. - Vol. 14, № 1. - P. 33–38.

158. Rakitin Y. V., Latin G. M., Minin V. V. Interpretation of EPR Spectra of Coordination Compounds. Moscow: Nauka, - 1993. 339 (in Russian) p.
159. Lebedev Y. S., Muromtsev V. I. EPR and relaxation of stabilized radicals. Moscow: Khimija, - 1972. 256 (in Russian) p.
160. Agirre J. et al. The CCP 4 suite: integrative software for macromolecular crystallography // *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* - 2023. - Vol. 79, № 6. - P. 449–461.
161. Vagin A., Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2010. - Vol. 66, № 1. - P. 22–25.
162. Murshudov G. N., Skubák P., Lebedev A. A., Pannu N. S., Steiner R. A., Nicholls R. A., Winn M. D., Long F., Vagin A. A. REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2011. - Vol. 67, № 4. - P. 355–367.
163. Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., Cowtan K. Features and development of Coot // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2010. - Vol. 66, № 4. - P. 486–501.
164. Krissinel E., Henrick K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State // *J. Mol. Biol.* - 2007. - Vol. 372, № 3. - P. 774–797.
165. Tsallagov S. I., Sorokin D. Y., Tikhonova T. V., Popov V. O., Muyzer G. Comparative Genomics of *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1T and *Guyarkeria* sp. SCN-R1, Halophilic Chemolithoautotrophic Sulfur-Oxidizing Gammaproteobacteria Capable of Using Thiocyanate as Energy Source // *Front. Microbiol.* - 2019. - Vol. 10.
166. Alvarez-Paggi D., Hannibal L., Castro M. A., Oviedo-Rouco S., Demicheli V., Tórtora V., Tomasina F., Radi R., Murgida D. H. Multifunctional Cytochrome c : Learning New Tricks from an Old Dog // *Chem. Rev.* - 2017. - Vol. 117, № 21. - P. 13382–13460.
167. Brown K., Nurizzo D., Besson S., Shepard W., Moura J., Moura I., Tegoni M., Cambillau C. MAD Structure of *Pseudomonas nautica* Dimeric Cytochrome c552 Mimics the c4 Dihemic Cytochrome Domain Association // *J. Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 289, № 4. - P. 1017–1028.
168. AKAZAKI H., KAWAI F., CHIDA H., HIRANO T., HAKAMATA W., PARK S.-Y., NISHIO T., OKU T. Expression, Purification, Physicochemical Characterization and Structural Analysis of Cytochrome c 554 from *Vibrio parahaemolyticus* Strain RIMD2210633 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 2010. - Vol. 74, № 5. - P. 1113–1115.
169. Blackledge M. J., Medvedeva S., Poncin M., Guerlesquin F., Bruschi M., Marion D. Structure and Dynamics of Ferrocycytochrome553 from Studied by NMR Spectroscopy and Restrained Molecular Dynamics // *J. Mol. Biol.* - 1995. - Vol. 245, № 5. - P. 661–681.
170. Carpenter J. M., Zhong F., Ragusa M. J., Louro R. O., Hogan D. A., Pletneva E. V. Structure and redox properties of the diheme electron carrier cytochrome c4 from *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Inorg. Biochem.* - 2020. - Vol. 203. - P. 110889.

171. Moore G. R., Pettigrew G. W. *Cytochromes c. Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, - 1990. 1–479 p.
172. AKAZAKI H., FUTAMI Y., SHIBAYAMA N., SHIRASAKI I., NAKADE H., CHIDA H., HAKAMATA W., PARK S.-Y., NISHIO T., OKU T. Physicochemical Properties of Diheme Cytochrome c 4 of Unknown Function from *Vibrio parahaemolyticus* Strain RIMD2210633 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 2008. - Vol. 72, № 10. - P. 2791–2794.
173. Ambler R. P., Daniel M., McLellan L., Meyer T. E., Cusanovich M. A., Kamen M. D. Amino acid sequences of cytochrome c -554(548) and cytochrome c ' from a halophilic denitrifying bacterium of the genus *Paracoccus* // *Biochem. J.* - 1987. - Vol. 248, № 2. - P. 365–371.
174. Fauque G., Bruschi M., Le Gall J. Purification and some properties of cytochrome C553(550) isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* Norway // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1979. - Vol. 86, № 4. - P. 1020–1029.
175. Baymann F., Tron P., Schoepp-Cothenet B., Aubert C., Bianco P., Stetter K.-O., Nitschke W., Schütz M. Cytochromes c 555 from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus* (VF5). 1. Characterization of Two Highly Homologous, Soluble and Membranous, Cytochromes c 555 // *Biochemistry.* - 2001. - Vol. 40, № 45. - P. 13681–13689.
176. Reddy K. S., Angiolillo P. J., Wright W. W., Laberge M., Vanderkooi J. M. Spectral Splitting in the α (Q 0,0) Absorption Band of Ferrous Cytochrome c and Other Heme Proteins // *Biochemistry.* - 1996. - Vol. 35, № 39. - P. 12820–12830.
177. Manas E. S., Vanderkooi J. M., Sharp K. A. The Effects of Protein Environment on the Low Temperature Electronic Spectroscopy of Cytochrome c and Microperoxidase-11 // *J. Phys. Chem. B.* - 1999. - Vol. 103, № 30. - P. 6334–6348.
178. Di Rocco G., Battistuzzi G., Borsari M., De Rienzo F., Ranieri A., Tutino M. L., Sola M. Cloning, expression and physicochemical characterization of a di-heme cytochrome c 4 from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* - 2008. - Vol. 13, № 5. - P. 789–799.
179. Liu J., Chakraborty S., Hosseinzadeh P., Yu Y., Tian S., Petrik I., Bhagi A., Lu Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers // *Chem. Rev.* - 2014. - Vol. 114, № 8. - P. 4366–4369.
180. Burda J. V., Pavelka M., Šimánek M. Theoretical model of copper Cu(I)/Cu(II) hydration. DFT and ab initio quantum chemical study // *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* - 2004. - Vol. 683, № 1–3. - P. 183–193.
181. Persson I. Structures of Hydrated Metal Ions in Solid State and Aqueous Solution // *Liquids.* - 2022. - Vol. 2, № 3. - P. 210–242.

182. Ohtaki H., Radnai T. Structure and dynamics of hydrated ions // *Chem. Rev.* - 1993. - Vol. 93, № 3. - P. 1157–1204.
183. Durão P., Chen Z., Fernandes A. T., Hildebrandt P., Murgida D. H., Todorovic S., Pereira M. M., Melo E. P., Martins L. O. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* - 2008. - Vol. 13, № 2. - P. 183–193.
184. Blackburn N. J., Ralle M., Hassett R., Kosman D. J. Spectroscopic analysis of the trinuclear cluster in the Fet3 protein from yeast, a multinuclear copper oxidase // *Biochemistry.* - 2000. - Vol. 39, № 9. - P. 2316–2324.
185. Glazunova O. A., Polyakov K. M., Fedorova T. V., Dorovatovskii P. V., Koroleva O. V. Elucidation of the crystal structure of *Coriolopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2015. - Vol. 71, № 4. - P. 854–861.
186. Andrei A., Öztürk Y., Khalfaoui-Hassani B., Rauch J., Marckmann D., Trasnea P.-I., Daldal F., Koch H.-G. Cu Homeostasis in Bacteria: The Ins and Outs // *Membranes (Basel).* - 2020. - Vol. 10, № 9. - P. 242.
187. Shannon R. D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides // *Acta Crystallogr. Sect. A.* - 1976. - Vol. 32, № 5. - P. 751–767.
188. Laitaoja M., Valjakka J., Jänis J. Zinc Coordination Spheres in Protein Structures // *Inorg. Chem.* - 2013. - Vol. 52, № 19. - P. 10983–10991.
189. Cotton A. F., Wilkinson S. G. *Advanced Inorganic Chemistry, Third Edition (1972).* - 1972. - Vol. 3rd ed. - P. 807–818.
190. Yako N., Young T. R., Cottam Jones J. M., Hutton C. A., Wedd A. G., Xiao Z. Copper binding and redox chemistry of the A β 16 peptide and its variants: insights into determinants of copper-dependent reactivity // *Metallomics.* - 2017. - Vol. 9, № 3. - P. 278–291.
191. Johnson D. K., Stevenson M. J., Almadidy Z. A., Jenkins S. E., Wilcox D. E., Grosseohme N. E. Stabilization of Cu($\text{Cu}(\text{scp})$) for binding and calorimetric measurements in aqueous solution // *Dalt. Trans.* - 2015. - Vol. 44, № 37. - P. 16494–16505.
192. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D., Higgins D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // *Mol. Syst. Biol.* - 2011. - Vol. 7, № 1.
193. Osipov E. M., Lilina A. V., Tsallagov S. I., Safonova T. N., Sorokin D. Y., Tikhonova T. V., Popov V. O. Structure of the flavocytochrome c sulfide dehydrogenase associated with the copper-binding protein CopC from the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium

Thioalkalivibrio paradoxus ARh 1 // Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol. - 2018. - Vol. 74, № 7. - P. 632–642.

194. Chaplin A. K., Wilson M. T., Hough M. A., Svistunenko D. A., Hemsworth G. R., Walton P. H., Vijgenboom E., Worrall J. A. R. Heterogeneity in the Histidine-brace Copper Coordination Sphere in Auxiliary Activity Family 10 (AA10) Lytic Polysaccharide Monooxygenases // J. Biol. Chem. - 2016. - Vol. 291, № 24. - P. 12838–12850.

195. Gómez-Piñeiro R. J., Drosou M., Bertaina S., Decroos C., Simaan A. J., Pantazis D. A., Orio M. Decoding the Ambiguous Electron Paramagnetic Resonance Signals in the Lytic Polysaccharide Monooxygenase from Photorhabdus luminescens // Inorg. Chem. - 2022. - Vol. 61, № 20. - P. 8022–8035.

196. Zhang X., Walke G. R., Horvath I., Kumar R., Blockhuys S., Holgersson S., Walton P. H., Wittung-Stafshede P. Memo1 binds reduced copper ions, interacts with copper chaperone Atox1, and protects against copper-mediated redox activity in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2022. - Vol. 119, № 37.

197. Knoke L. R., Zimmermann J., Lupilov N., Schneider J. F., Celebi B., Morgan B., Leichert L. I. The role of glutathione in periplasmic redox homeostasis and oxidative protein folding in Escherichia coli // Redox Biol. - 2023. - Vol. 64. - P. 102800.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1. Параметры теоретического ЭПР-спектра $trTcDH$, инкубированного с одним эквивалентом $Cu(II)$, в X-диапазоне (частота МИ $\sim 9,8$ ГГц, 100 К).

Сайт	g_x	g_y	g_z	$A_x, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_y, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_z, 10^{-4}$ $см^{-1}$	Доля, %
A (Cu2)	2,072	2,131	2,207	48	54	151	59,2
B (Cu1)	2,019	2,106	2,177	57	48	178	40,8

Таблица П2. Параметры теоретического ЭПР-спектра $trTcDH$, инкубированного с двумя эквивалентами $Cu(II)$, в X-диапазоне (частота МИ $\sim 9,8$ ГГц, 100 К).

Сайт	g_x	g_y	g_z	$A_x, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_y, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_z, 10^{-4}$ $см^{-1}$	Доля, %
A (Cu2)	2,072	2,126	2,213	47	54	162	57,8
B (Cu1)	2,016	2,105	2,156	56	47	170	42,2

Таблица П3. Параметры теоретического ЭПР-спектр $trTcDH$, инкубированного с тремя эквивалентами $Cu(II)$, в X-диапазоне (частота МИ $\sim 9,8$ ГГц, 100 К).

Сайт	g_x	g_y	g_z	$A_x, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_y, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_z, 10^{-4}$ $см^{-1}$	Доля, %
A (Cu2)	2,085	2,144	2,207	49	56	155	33,3
B (Cu1)	2,030	2,133	2,154	56	47	192	33,3
C (Cu3)	2,026	2,064	2,236	40	28	163	33,3

Таблица П4. Параметры теоретического ЭПР-спектра $rtTcDH$, инкубированного с одним эквивалентом $Cu(II)$, в X-диапазоне (частота МИ $\sim 9,8$ ГГц, 20 К) с учетом дополнительных сверхтонких взаимодействий (ДСТВ) сайта A (Cu2) с тремя атомами азота.

Сайт	g_x	g_y	g_z	$A_x, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_y, 10^{-4}$ $см^{-1}$	$A_z, 10^{-4}$ $см^{-1}$	Доля, %
A (Cu2)	2,072	2,122	2,285	38	45	163	66,8
B (Cu1)	2,025	2,146	2,211	11	49	158	33,2

Таблица П5. Параметры ДСТВ с тремя атомами азота для сайта А (Cu2) в теоретическом ЭПР-спектре rTcDH , инкубированного с одним эквивалентом Cu(II).

Атом азота	$A_x, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_y, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_z, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$
N ₁	16	17	-
N ₂	16	14	-
N ₃	13	10	-

Таблица П6. Параметры теоретического ЭПР-спектра rTcDH , инкубированного с двумя эквивалентами Cu(II), в X-диапазоне (частота МИ ~ 9,8 ГГц, 20 К) с учетом дополнительных сверхтонких взаимодействий (ДСТВ) сайта А (Cu2) с тремя атомами азота.

Сайт	g_x	g_y	g_z	$A_x, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_y, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_z, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	Доля, %
А (Cu2)	2,071	2,123	2,284	37	46	163	59,6
В (Cu1)	2,025	2,147	2,213	14	49	159	40,4

Таблица П7. Параметры ДСТВ с тремя атомами азота для сайта А (Cu2) в теоретическом ЭПР-спектре rTcDH , инкубированного с двумя эквивалентами Cu(II).

Атом азота	$A_x, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_y, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_z, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$
N ₁	15	15	-
N ₂	15	15	-
N ₃	13	10	-

Таблица П8. Параметры теоретического ЭПР-спектра rTcDH , инкубированного с тремя эквивалентами Cu(II), в X-диапазоне (частота МИ ~ 9,8 ГГц, 20 К).

Сайт	g_x	g_y	g_z	$A_x, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_y, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	$A_z, 10^{-4} \text{ см}^{-1}$	Доля, %
А (Cu2)	2,089	2,126	2,284	36	42	171	33,3
В (Cu1)	2,030	2,140	2,216	14	43	156	33,3
С (Cu3)	2,051	2,083	2,271	34	36	114	33,3