

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.322.6

МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ
НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНЫХ ДАННЫХ

© 2025 г. К. М. Поляков*, С. Гаврюшов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: kmpolyakov@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

Тиоцианатдегидрогеназа — фермент, катализирующий преобразование иона тиоцианата в ион цианата с выделением двух электронов, двух протонов и нейтрального атома серы. Ранее были решены структуры тиоцианатдегидрогеназы из *Thioalkalivibrio paradoxus*. Хотя качество этих структур не безупречно (двойникование и сильная анизотропия кристаллов, неполная заселенность ионов меди, отсутствие данных о строении комплексов с аналогами субстрата), на их основе ранее был предложен механизм функционирования фермента. Недавно с атомным разрешением были решены структуры генно-инженерной копии родственного свободного фермента из *Pelomicrobium methylophilum* и его комплекса с тиомочевинной. В новых структурах удаётся надёжно установить две конформации молекулы белка с открытым и закрытым активными центрами. Новые структурные данные высокого разрешения позволили также выявить в активных центрах фермента в каждой из этих конформаций суперпозиции состояний ионов меди с различными степенями окисления с частичными заселенностями (и соответствующих лигандов). Заряды ионов меди в этих состояниях определялись по координатам ионов. В молекуле белка с закрытым активным центром наблюдаются комплексы с ингибитором (ионом тиомочевины) и молекулярным кислородом. Комплекс с тиомочевинной позволяет моделировать связывание ферментом иона тиоцианата. Предложен механизм активации атакующего кислородного лиганда, учитывающий изменения структур открытой и закрытой конформаций. Обсуждается новая схема ферментативной реакции.

Ключевые слова: рентгеноструктурный анализ белков, конформационные изменения, медьсодержащие ферменты, ферментативные реакции

DOI: 10.31857/S0026898425010103, EDN: HCMHTC

ВВЕДЕНИЕ

Недавно была решена структура тиоцианатдегидрогеназы из *Thioalkalivibrio paradoxus* (trTcDH) [1]. Тиоцианатдегидрогеназа катализирует реакцию: $\text{NCS}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NCO}^- + \text{S}^0 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. Были определены пространственные структуры природной trTcDH, ее генно-инженерного аналога и ряда мутантных форм [1, 2]. Большинство решенных структур trTcDH (6G50, 6G5M, 6I3Q, 6UWE) принадлежит к пространственной группе P2₁ с приблизительно равными параметрами *a* и *b* элементарной ячейки и углом моноклинности примерно равным 120°, что предполагает возможность двойникования. В этих структурах плоские тетрамерные молекулы фермента расположены в плоскостях, перпендикулярных оси второго порядка, формируя

слоистую структуру, в которой тетрамерные молекулы в слое связаны сильнее, чем тетрамеры из разных слоев. Такая слоистая структура облегчает образование двойников в кристаллах. Эта кристаллическая модификация позволяет собирать наборы дифракционных данных до высокого разрешения (1.45 Å), но двойникование кристаллов значительно ухудшает качество дифракционных данных. В других кристаллических модификациях trTcDH (5OEX, 5F75, 6SJI) дифракционные данные удается собрать только до разрешения 2 Å из-за их большой анизотропии. Все структуры trTcDH были решены либо по дифракционным данным от кристаллов двойников, либо от кристаллов с большой анизотропией дифракционных данных. Качество данных не позволило однозначно интерпрети-

ровать структуру активного центра ферментов, содержащую суперпозицию состояний атомов с частичными заселенностями. Кроме того, во всех структурах *trTcDH* наблюдалась частичная заселенность ионов меди активного центра (для иона Cu^{3+} заселенность не превышает 0.3).

Молекула *trTcDH* сформирована семилопастным β -пропеллером, лопастями которого являются β -слои из антипараллельных цепей. Активный центр *trTcDH*, содержащий уникальный трехядерный кластер ионов меди, располагается в центральной части белка в полости, сформированной β -слоями пропеллера. Эта полость с одной стороны закрыта C-концевым участком полипептидной цепи фермента. Доступ к ионам меди возможен только с противоположной стороны полости. Топологически строение молекулы *trTcDH* подобно строению N-концевого домена N_2O -редуктазы [3]. Во всех решенных структурах *trTcDH* молекулы фермента образуют тетрамеры из двух симметричных димеров с очень сильными межмолекулярными контактами между субъединицами димера и более слабыми контактами между димерами. По оценкам программы PISA [4] эта димерная структура является стабильной в растворе. Все субъединицы тетрамера лежат в одной плоскости.

На основании данных о структурах *trTcDH* предложен механизм каталитической стадии реакции [1], вызывающий целый ряд вопросов. Основная идея этого механизма состоит в том, что в активном центре фермента происходит гидролиз иона SCN^- гидроксил-анионом, при этом не объясняется, за счет чего сближаются две одинаково заряженные группы. Странным выглядит утверждение, что образование молекулой воды двух водородных связей с остатками гистидина и глутамата способно ее активировать, превращая в гидроксил-анион. Отдельно стоит вопрос о позиционировании молекулы субстрата в активном центре фермента методом квантово-химических расчетов при отсутствии данных о строении комплексов фермента с субстратом или его аналогами. Кроме того, предложенная схема не включает в себя всех надежно установленных данных о структуре активного центра (в частности, о наличии двух различных положений в структуре иона меди Cu^{2+}).

Ионы меди, наряду с ионами железа, играют определяющую роль в биологических процессах связывания, восстановления и активации молекулярного кислорода. Кроме того, они участвуют в цикле денитрификации при восстановлении нитритов и оксида азота. Структуры и спектроскопия медьсодержащих белков,

участвующих в переносе электронов и катализе окислительно-восстановительных процессов, подробно рассмотрена в обзоре [5]. Классификация медных центров белков, основанная на анализе координации ионов меди, приведена в работе [6]. Координационные сферы окисленных и восстановленных ионов меди различаются. Квантово-механические основы строения комплексов ионов меди можно найти в [7]. Координирование ионов Cu(I) и Cu(II) азот- и кислородсодержащими лигандами изучено для малых молекул [8–10]. Ионы меди Cu(I) могут иметь координационные числа 2 (линейная координация), 3 (плоская тригональная координация) [7, 11] и 4 (тетрагональная координация) [12]. Комплексы иона меди Cu(II) могут иметь координационные числа 4, 5 и 6. Комплексы меди Cu(II) с координационным числом 4 имеют геометрию, близкую к плоскому квадрату [8]. Искажение в сторону тетрагональной геометрии возможно лишь вследствие стерических контактов [10]. Комплексы меди Cu(II) с координационным числом 5 образуют тригональную бипирамиду [9]. Таким образом, имеется соответствие между зарядом иона меди в комплексе и строением его координационной сферы.

Наличие этой закономерности позволило приписать заряды ионам меди в структурах лакказ при изучении влияния на структуру фермента его восстановления за счет увеличения поглощенной кристаллом дозы ионизирующего излучения [13, 14]. В этих исследованиях определение строения координационных сфер ионов меди позволило не только идентифицировать их заряды, но и правильно интерпретировать структуру активного центра при наличии суперпозиции нескольких состояний ионов меди (с различной степенью окисления) вместе с координирующими их лигандами.

Добиться улучшения дифракционного качества кристаллов белков можно за счет использования для кристаллизации препаратов белков с точечными заменами поверхностных остатков или препаратов родственных ферментов из других организмов [15]. В случае *trTcDH* первый подход не дал результатов [2]. В рамках второго подхода в качестве объекта исследования была выбрана *TcDH* из *Pelomicrobium methylotrophicum* — *pmTcDH*. Были решены с атомным разрешением структура фермента в свободном состоянии и структура комплекса фермента с ингибитором тиомочевинной. Структуры депонированы в банк белковых структур: PDB коды 8Q9X и 8Q9Y.

Целью данной работы является исследование механизма функционирования тиоцианат-

дегидрогеназ, основанное на интерпретации новых структур высокого разрешения активных центров pmTcDH с учетом суперпозиции состояний ионов меди в различных степенях окисления вместе с соответствующими лигандами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН был наработан генно-инженерный аналог tpTcDH из *P. methylotrophicum* (pmTcDH), выращены кристаллы и на синхротроне в Японии собран набор дифракционных данных с разрешением около 1 Å для свободной формы фермента и комплекса с ее ингибитором тиомочевинной. Комплекс с тиомочевинной получен вымачиванием кристаллов свободного фермента в растворе 100 мМ тиомочевинной в течение 5 мин. Структуры решены методом молекулярного замещения с использованием программы MOLREP [16] по модели димера tpTcDH. Кристаллографическое уточнение проводили с использованием программы REFMAC5 [17]. На заключительных стадиях уточнение проводили с учетом анизотропии температурных факторов. Значения частичных заселенностей атомов модели уточнялись в ручном режиме с требованием близости температурных факторов соседних атомов. Обе структуры уточнены до фактора достоверности $R_f = 10.8\%$. Структуры были депонированы в банк белковых структур: 8Q9X (Varfolomeeva L.A., Polyakov K.M., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. (2023) PDB 8Q9X: The structure of thiocyanate dehydrogenase from *Pelomicrobium methylotrophicum* with molecular oxygen at 1.05 Å resolution. doi: <https://doi.org/10.2210/pdb8Q9X/pdb>) и 8Q9Y (Varfolomeeva L.A., Polyakov K.M., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. (2023) PDB 8Q9Y: The structure of thiocyanate dehydrogenase from *Pelomicrobium methylotrophicum* in complex with inhibitor thiourea at 1.10 Å resolution. doi: <https://doi.org/10.2210/pdb8Q9Y/pdb>).

В настоящей работе представлена интерпретация электронной плотности в активных центрах этих структур. Во всех структурах выделены состояния с суперпозицией ионов меди и соответствующих им лигандов с частичными заселенностями. Во всех состояниях активного центра определена координация ионов меди с частичными заселенностями, позволившая установить их заряды. Рисунки выполнены при помощи программы CCP4MG [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая структура pmTcDH

Независимая часть элементарной ячейки содержит димерную молекулу pmTcDH. Димер pmTcDH (в отличие от димера tpTcDH из двух эквивалентных субъединиц) сформирован двумя неэквивалентными субъединицами (рис. 1). Конформации субъединиц в димере различны. В одной субъединице димера открыт доступ молекулам растворителя в активный центр фермента (“открытая” конформация), а во второй субъединице активный центр недоступен для молекул растворителя (“закрытая” конформация). Совмещение структур субъединиц димера pmTcDH показано на рис. 2. Структуры субъединиц димера pmTcDH близки, субъединицы могут быть совмещены по координатам всех СА атомов со среднеквадратичным отклонением равным 0.53 Å. Существенные различия наблюдаются только для трех участков полипептидной цепи (251–265, 362–367 и 394–401), в которых при совмещении субъединиц расхождения в положениях их СА атомов составляют около 1 Å. Исключение этих участков из сравнения структур позволяет снизить среднеквадратичное отклонение до 0.35 Å. Эти фрагменты полипептидной цепи участвуют в формировании субстратных каналов и активных центров субъединиц (см. рис. 2).

Одновременное присутствие в одном кристалле субъединиц в “открытой” и “закрытой” конформациях позволяет предположить, что энергии этих состояний близки. Следует отметить, что структура субъединиц тождественна для фрагментов цепи, участвующих в формировании контактов между субъединицами в димере, поэтому контакты между субъединицами в димере не могут быть причиной различия их структур. Субъединицы в “закрытой” и “открытой” конформациях имеют существенные различия в межмолекулярных контактах. Однако не удастся связать изменения в конформации субъединиц с межмолекулярными контактами в кристалле (области со значительной разницей в структурах не принимают участие в межмолекулярных взаимодействиях в кристалле). На основании этого можно предположить, что конформации субъединиц связаны с их внутренним строением. Ключевыми остатками, отвечающими за стабилизацию конформаций субъединиц, являются Pro256 и Glu253. Боковая цепь остатка Pro256 в “закрытой” конформации перекрывает субстратный канал. Атомы этого остатка располагаются на месте атомов воды из субстратного

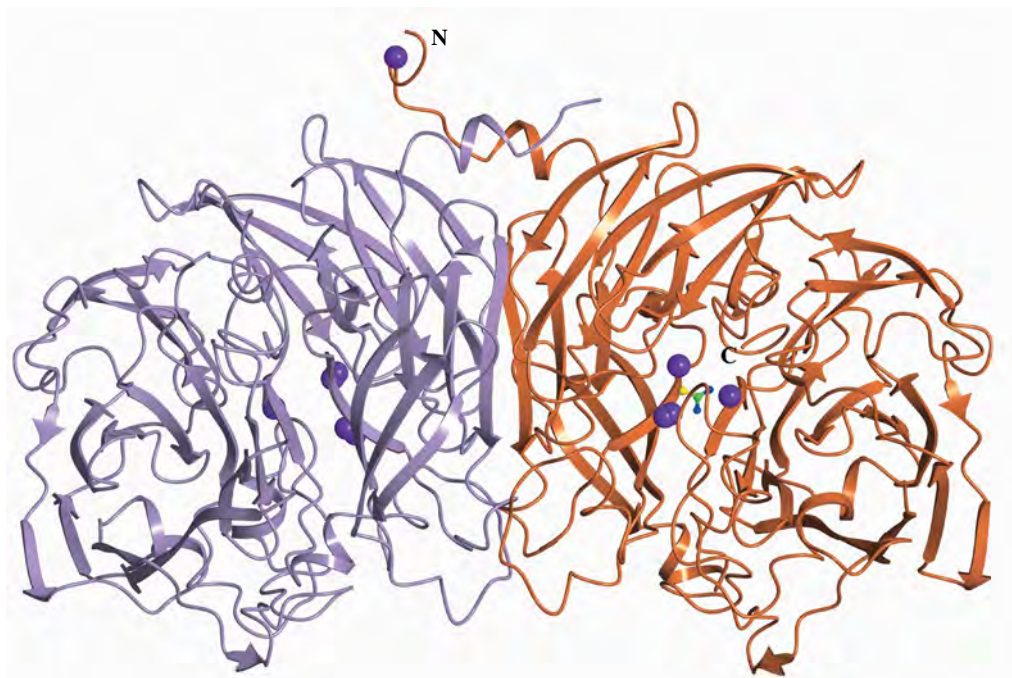


Рис. 1. Димер rmtCDH из структуры комплекса с тиомочевинной. Субъединицы в “закрытой” и “открытой” конформациях показаны в виде ленточной модели справа и слева соответственно. Ионы меди rmtCDH показаны сферами. Молекула тиомочевинной представлена в виде шаростержневой модели.

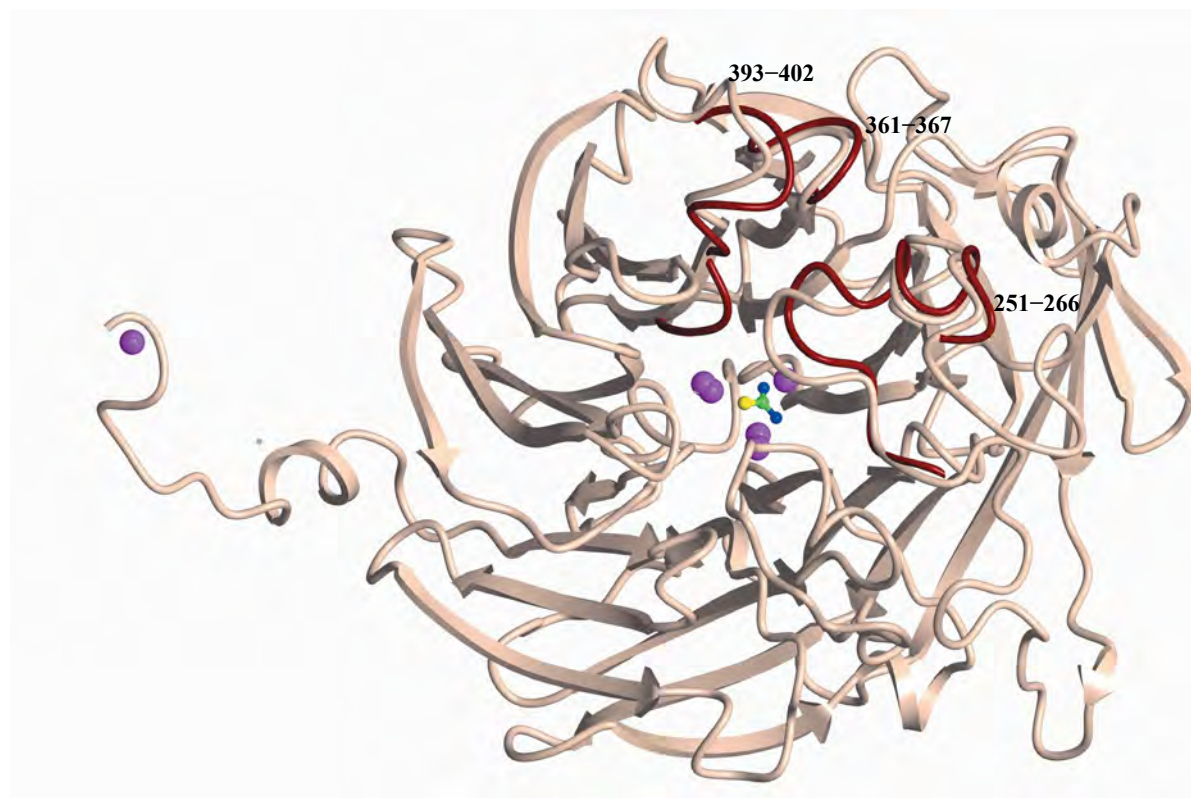


Рис. 2. Совмещение структур субъединиц rmtCDH в “закрытой” и “открытой” конформациях. Светлым тоном показан ход полипептидной цепи субъединицы в “закрытой” конформации. В темных тонах показаны петли субъединицы в “открытой” конформации, положение которых различается в субъединицах в “закрытой” и “открытой” конформациях. Сферами показаны положения ионов меди для субъединицы в “закрытой” конформации. Молекула тиомочевинной показана в виде шаростержневой модели. Вид со стороны входа в активный центр.

канала фермента в “открытой” конформации. Боковая цепь Glu253 стабилизируют структуру “открытой” и “закрытой” конформаций за счет водородных связей (см. ниже).

В целом структура активного центра *pmTcDH* аналогична структурам активного центра *tpTcDH*. Однако следует отметить, что заселенность всех трех ионов меди активного центра *pmTcDH* близка к полной, а в активном центре “закрытой” субъединицы локализуются ион тиомочевинной и молекулярный кислород для комплекса с тиомочевинной и свободного фермента соответственно. Важно также подчеркнуть, что аминокислотные остатки, принимающие участие в координации ионов меди активного центра, не изменяют своего положения при изменении конформации субъединиц. Детально строение активного центра рассмотрено ниже.

На картах электронной плотности в районе N-концевой части “закрытой” субъединицы фермента локализован ион меди, показанный на рис. 2. Ион координирован по плоскому квадрату N-концевым атомом азота Gly43, атомами азота основной и боковой цепей остатка His44 и боковой цепью остатка His376 соседней “закрытой” субъединицы.

Общее строение активного центра pmTcDH

Как и у *tpTcDH*, активный центр *pmTcDH* располагается в центральной полости β -пропеллера. В целом, активный центр *pmTcDH* аналогичен активному центру *tpTcDH*. Высокое качество дифракционных данных позволило установить новые важные особенности в структурах *pmTcDH*. В отличие от структур *tpTcDH* в активном центре *pmTcDH* локализованы положения трех ионов меди с полной заселенностью. Структуры активных центров в “закрытой” и “открытой” конформациях отличаются. В активных центрах субъединиц в “закрытой” конформации локализованы молекула тиомочевинной и молекулярный кислород в структурах комплекса с тиомочевинной и свободного фермента соответственно. Следует отметить, что положение боковых цепей остатков гистидина, координирующих ионы меди, не меняется при изменении конформации субъединиц (H171 и H346 для первого иона меди, H100 и H493 для второго, H402 и H447 для третьего). Высокое качество электронной плотности позволяет не только надежно установить несколько положений ионов меди активного центра, но и определить строение координационных сфер ионов меди с частичной заселенностью (и тем самым

определить заряды этих ионов). Это позволило интерпретировать структуры активного центра субъединиц фермента в “закрытой” и “открытой” конформациях как суперпозицию двух состояний ионов меди с частичными заселенностями и соответствующих им лигандов. Такая интерпретация сделана как для структуры комплекса с тиомочевинной, так и для структуры свободного фермента. Ниже приведено детальное рассмотрение строения активных центров фермента в различных состояниях.

Строение активного центра pmTcDH для комплекса с тиомочевинной

Структура и электронная плотность активного центра субъединицы комплекса с тиомочевинной в “закрытой” конформации показаны на рис. 3а. В этом случае субстратный канал перекрыт. В “закрытой” конформации активного центра субъединицы *pmTcDH* можно выделить два состояния.

Заселенность первого состояния составляет $q = 0.7$ (рис. 3б). В этом состоянии в активном центре локализована молекула тиомочевинной. Ион Cu1(II) координирован по типу плоского квадрата четырьмя лигандами — атомами NE2 H171, NE2 H346, OD1 D279 и N2 тиомочевинной (здесь и далее в скобках указана степень окисления ионов меди). Ион Cu2(II) координирован пятью лигандами по типу тригональной бипирамиды (атомы ND1 H493, NE2 H100, S и N1 тиомочевинной, молекула воды). Ион Cu3(I) координирован тремя лигандами по типу плоского треугольника — атомами NE2 H402, ND1 H447, S тиомочевинной. Атом N1 тиомочевинной образует водородную связь с H101.

Заселенность второго состояния составляет 0.3 (рис. 3в). В этом состоянии ингибитор в активном центре отсутствует. Ион Cu1(I) линейно координирован атомами NE2 H171 и NE2 H346. Остаток D279 в координации иона Cu1 участия не принимает. Ион Cu2(I) координирован тремя лигандами по типу плоского треугольника — атомами ND1 H493, NE2 H100 и молекулой воды. Ион Cu3(I) линейно координирован — атомами NE2 H402 и ND1 H447. В активном центре на месте молекулы тиомочевинной располагаются две молекулы воды. Одна молекула воды W находится на месте атома N1 тиомочевинной и образует водородную связь с H100 (см. ниже). Вторая молекула воды находится на месте атома серы тиомочевинной.

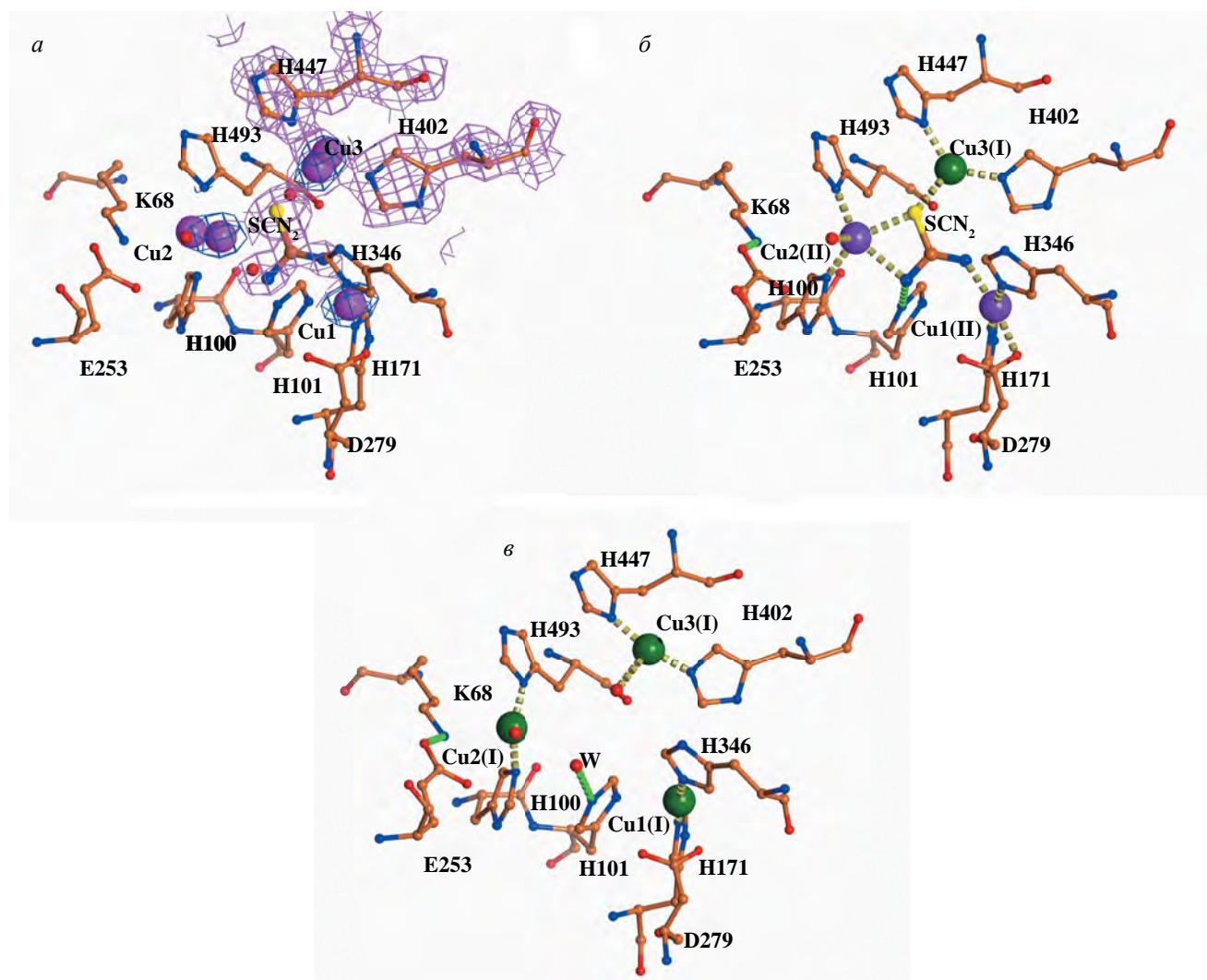


Рис. 3. Активный центр субъединицы комплекса pmTcDH с тиомочевинной в “закрытой” конформации. *a* — Модель комплекса и электронная плотность ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) для уровней 1σ и 5σ . Первое состояние (*б*) и второе состояние (*в*) активного центра субъединицы pmTcDH в “закрытой” конформации. Аминокислотные остатки активного центра и тиомочевина представлены в виде шаростержневой модели. Молекулы воды показаны малыми сферами. Ионы меди в степенях окисления II и I показаны большими сферами. “Атакующая” молекула воды обозначена W. Координационные связи и водородные связи с остатками H101 и K68 показаны пунктирными линиями.

В “закрытой” конформации субъединицы pmTcDH субстратный канал закрыт остатком P256. При этом боковая цепь E253 образует водородную связь с остатком K68, что способствует стабилизации “закрытой” конформации.

В структуре комплекса с тиомочевинной в “открытой” конформации можно также выделить два состояния активного центра фермента. В этих структурах субстратный канал открыт, а в активном центре наблюдаются только кислородные лиганды. Заселенность первого состояния составляет 0.35 (рис. 4а). Ион Cu1(II) координирован пятью лигандами по типу тригональной бипирамиды, образованной атомами

NE2 H171, NE2 H346, OD2 D279 и двумя молекулами воды. Ион Cu2(II) также координирован пятью лигандами по типу тригональной бипирамиды, сформированной атомами ND1 H493, NE2 H100, NZ K68 и двумя молекулами воды. Ион Cu3(I) координирован тремя лигандами по типу плоского треугольника: атомами NE2 H402, ND1 H447 и молекулой воды. В “открытой” конформации на месте ингибитора тиомочевинной в структуре комплекса находятся три кислородных лиганда. Одна молекула воды расположена на месте атома N1 тиомочевинной, вторая — на месте атома S, третья — на месте атома N2.

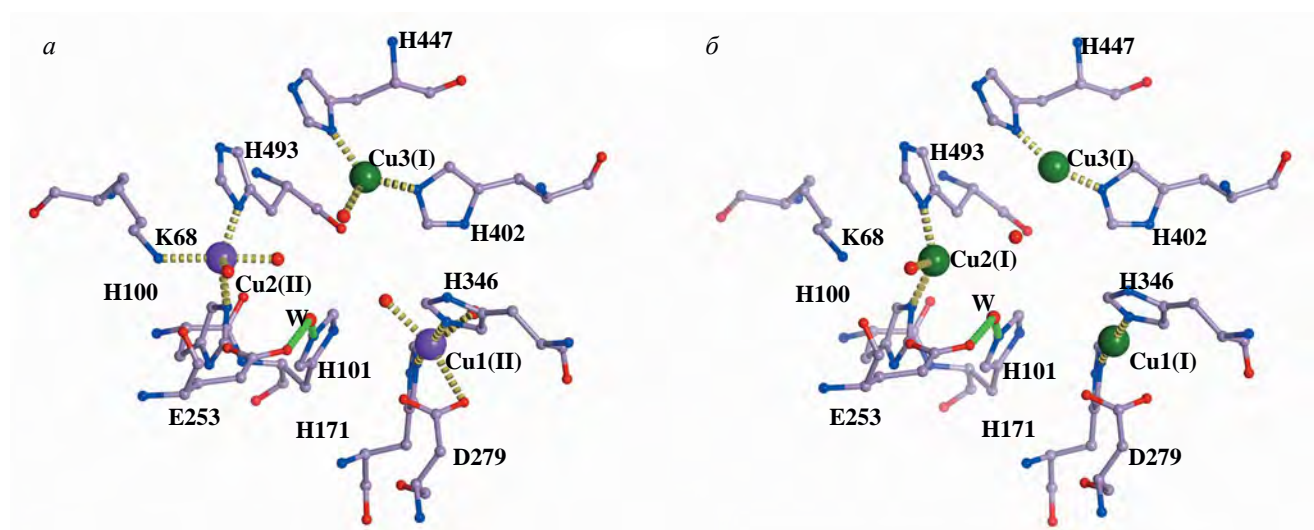


Рис. 4. Первое состояние (а) и второе состояние (б) активного центра субъединицы pmTcDH в “открытой” конформации структуры комплекса с тиомочевинной. Аминокислотные остатки активного центра представлены в виде шаростержневой модели. Молекулы воды показаны малыми сферами. Ионы меди в степенях окисления II и I показаны большими сферами. “Атакующая” молекула воды обозначена W. Координационные связи и водородные связи с молекулой воды W показаны пунктирными линиями.

Заселенность второго состояния составляет 0.65 (рис. 4б). Ион Cu1(I) координирован линейно атомами NE2 H171 и NE2 H346. Ион Cu2(I) координирован тремя лигандами по типу плоского треугольника — атомами ND1 H493, NE2 H100 и молекулой воды. Ион Cu3(I) координирован линейно — атомами NE2 H402 и ND1 H447.

В “открытой” конформации фермента активный центр доступен для растворителя извне и остаток P256 не препятствует связыванию молекул воды в субстратном канале. Боковая цепь E253 развернута в сторону от K68 и, наряду с H101, образует водородную связь с молекулой воды W.

Строение активного центра свободного фермента pmTcDH

Качество электронной плотности позволяет также выделить в структурах свободного фермента по два состояния как в “открытой”, так и в “закрытой” конформациях субъединицы, включающие ионы меди с частичной заселенностью и соответствующие лиганды.

Модель структуры активного центра субъединицы в “закрытой” конформации показана на рис. 5. Первое состояние включает молекулярный кислород и три иона меди с соответствующими лигандами с заселенностью $q = 0.7$. Ион Cu1(II) координирован четырьмя лигандами (NE2 H171, NE2 H346, OD1 D279 и молекулой воды) по типу плоского квадрата.

Ион Cu2(II) координирован пятью лигандами по типу трехгранной бипирамиды. Координация включает атомы ND1 H493, NE2 H100, O молекулярного кислорода, две молекулы воды (включая W). Ион Cu3(I) координирован

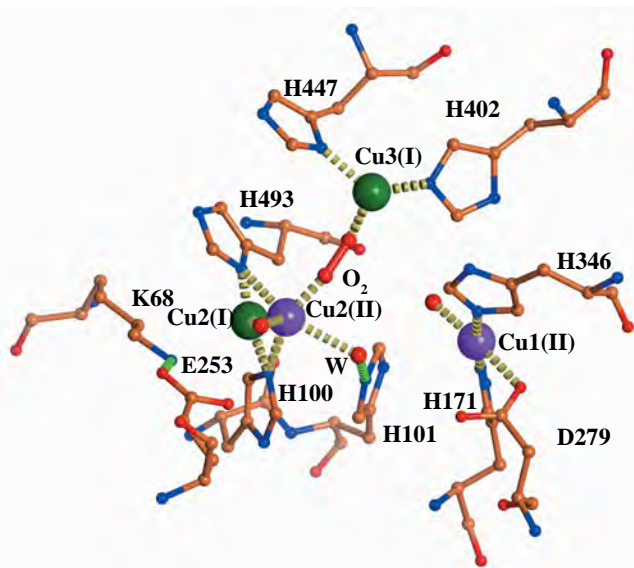


Рис. 5. Активный центр субъединицы свободного pmTcDH в “закрытой” конформации. Аминокислотные остатки активного центра и молекулы воды представлены в виде шаростержневой модели. Ионы меди в степенях окисления II и I показаны большими сферами. “Атакующая” молекула воды обозначена W. Координационные связи и водородные связи с остатками H101 и K68 показаны пунктирными линиями.

тремя лигандами (NE2 H402, ND1 H447, O молекулярного кислорода) по типу плоского треугольника.

Заселенность второго состояния составляет 0.3 (см. рис. 5). Ион Cu1(I) координирован линейно — атомами NE2 H171 и NE2 H346. Ион Cu2(I) координирован тремя лигандами по типу плоского треугольника — атомами ND1 H493, NE2 H100 и молекулой воды. Ион Cu3(I) координирован линейно — атомами NE2 H402 и ND1 H447.

Структуры свободного фермента в “открытой” конформации практически полностью идентичны структурам комплекса с тиомочевинной в “открытой” конформации и их описания не приведены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Новые данные о структуре активного центра TcDH можно суммировать следующим образом. Комплекс фермента с тиомочевинной может служить моделью переходного состояния, возникающего при атаке нуклеофилом атома углерода тиоцианата. На основании структуры комплекса фермента с тиомочевинной можно предположить, каким образом субстрат (ион тиоцианата) связывается в активном центре pmTcDH (рис. 6). Атом серы тиоцианата связывается в активном центре фермента аналогично атому серы тиомочевины. В этом положении атом серы может образовывать две координационные связи с ионами меди Cu2 и Cu3. Атом азота тиоцианата соответствует атому азота аминоксиппы тиомочевины из координационной сферы иона Cu1 и формирует с ним координационную связь. Молекула воды W, расположенная вблизи положения атома азота второй аминоксиппы тиомочевины, может играть роль атакующей группы.

В структурах свободного фермента и комплекса с тиомочевинной установлено, что субъединицы в димере pmTcDH находятся в двух различных состояниях. В “открытой” конформации есть свободный доступ растворителя в активный центр фермента. В “закрытой” конформации боковая цепь остатка P256 перекрывает субстратный канал, разрывая цепочку связанных водородными связями молекул воды. Эти два состояния присутствуют одновременно в одном кристалле. Комплексы фермента с тиомочевинной и молекулярным кислородом обнаружены только для субъединиц в “закрытой” конформации (см. рис. 3а, рис. 5). Успешное получение комплекса с тиомочевинной методом вымачивания кристаллов свободного фермента

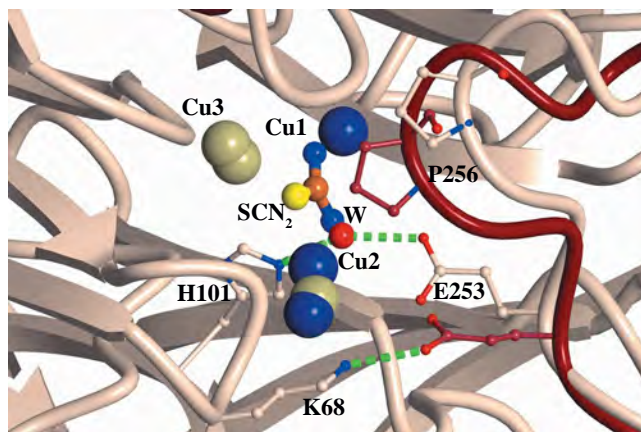


Рис. 6. Совмещение активных центров структуры комплекса с тиомочевинной в “закрытой” и “открытой” конформациях. Светлым тоном показана структура в “открытой” конформации. Фрагмент структуры, соответствующий “закрытой” конформации, выделен темным тоном. Ионы меди в структурах в “открытой” и “закрытой” конформациях в степенях окисления II и I показаны большими сферами (темный и светлый тон соответственно). Молекула тиомочевины показана в виде шаростержневой модели. “Атакующая” молекула воды обозначена W. Водородные связи показаны пунктирными линиями. Вид со стороны входа в активный центр. Боковая цепь Pro256 в закрытой конформации блокирует доступ в активный центр фермента.

позволяет предположить, что тиомочевина способна проникать за счет теплового движения даже в закрытый субстратный канал субъединицы в “закрытой” конформации и связываться там. Надо подчеркнуть, что связывание иона тиомочевины в активном центре субъединицы в “открытой” конформации не наблюдается, хотя проникновение в активный центр в этих условиях существенно облегчено.

В структурах pmTcDH, как и в структуре tpTcDH [1], кислородный лиганд W, расположенный вблизи атома азота второй аминоксиппы тиомочевины (см. рис. 6), может играть роль атакующей группы в ферментативной реакции. В “открытой” конформации обеих структур фермента эта вода образует две водородные связи с остатками E253 и H101 (см. рис. 6). В структурах в “закрытой” конформации она образует водородную связь только с H101 (см. рис. 3в, рис. 5). В активации атакующей воды основная роль принадлежит остатку E253. Этот остаток занимает два различных положения в структурах “открытой” и “закрытой” конформаций (см. рис. 6). В “закрытой” конформации боковая цепь E253 образует водородную связь с боковой цепью

остатка K68. При переходе субъединицы фермента в “открытую” конформацию боковая цепь E253 разрывает водородную связь с боковой цепью остатка K68. Причем при разрыве этой связи протон остается у лизина. E253 в депротонированном состоянии разворачивается к “атакующей” воде W и образует с ней водородную связь за счет ее протона (см. рис. 6). При образовании этой водородной связи протон переходит на E253, а “атакующая” вода W превращается в гидроксил-анион. В этом активированном состоянии OH^- способен атаковать субстрат. Можно предположить, что после преобразования субстрата в продукт при участии гидроксил-аниона, протонированный E253 при изменении конформации на “закрытую” возвращается к K68 и образует водородную связь за счет своего протона (см. рис. 6).

Для определения роли ионов меди в ферментативной реакции рассмотрим изменения в структурах окружения ионов меди активного центра при изменении их состояний окисления и изменении конформации субъединиц. Ион CuI не изменяет своего положения ни в зависимости от степени окисления, ни в зависимости от изменения конформации субъединиц (см. рис. 6). При его восстановлении меняется только число координирующих лигандов, что делает его похожим на T2-центр лакказ [14]. Принимая во внимание связывание тиомочевины ферментом, можно предположить, что роль этого иона меди состоит в связывании атома азота субстрата за счет координационной связи. Координационная сфера иона Cu3 во всех состояниях медного кластера pmTcDH соответствует восстановленному состоянию (см. рис. 3б, в, рис. 4а, б, рис. 5). Перечисленные соображения позволяют сделать вывод, что роль иона сводится к правильному позиционированию в активном центре молекулы субстрата за счет формирования координационной связи с атомом серы, а ион не участвует в переносе электронов в процессе ферментативной реакции. Ион меди Cu2 связан с внешним акцептором электронов электронно-транспортной цепью, включающей остаток H493 (один из остатков, координирующих ион Cu2) и три молекулы воды, связанных водородными связями. Эта цепь выявлена во всех решенных структурах активного центра pmTcDH . Координационная сфера иона Cu2 подвергается наиболее сложным перестройкам в процессе закрытия субстратного канала и окисления-восстановления. Ион Cu2 может занимать в активном центре pmTcDH три положения: одно восстановленное и два окисленных (см. рис. 6). Можно предпо-

ложить, что наличие структур с восстановленным ионом меди Cu2(I) обусловлено отсутствием акцептора электронов в кристаллах фермента. Положение иона Cu2(I) совпадает в субъединицах pmTcDH в “закрытой” и “открытой” конформациях во всех структурах (свободного фермента и комплекса с тиомочевинной). При окислении ион Cu2 может смещаться от своего восстановленного состояния в две противоположные стороны. В “открытой” субъединице он смещается в сторону боковой цепи K68 (см. рис. 4), а в “закрытой” — в сторону атома серы в комплексе с тиомочевинной (см. рис. 3б) или кислорода в свободном ферменте (см. рис. 5). Расстояние между этими положениями иона Cu2 приблизительно равно 2 Å. Это свидетельствует о ключевой роли иона Cu2 в ферментативной реакции. Изменение конформации субъединицы из “открытой” в “закрытую” сопровождается перестроением координационной сферы этого иона при его восстановлении. Именно этот ион в восстановленном состоянии способен участвовать в переносе электронов от субстрата на внешний акцептор. В одном из своих окисленных состояний в “закрытой” конформации он координирует атом серы тиомочевины в структуре комплекса или один из атомов молекулярного кислорода в свободном ферменте.

Принимая во внимание все детали структуры pmTcDH во всех наблюдаемых состояниях активного центра в “открытой” и “закрытой” конформациях, можно сформулировать механизм каталитической реакции следующим образом (рис. 7).

В начале каталитического цикла (стадия а) молекула фермента находится в “открытой” конформации. Ионы Cu1(II) и Cu2(II) окислены и ион Cu3(I) находится в восстановленном состоянии. Ионы Cu1 и Cu3 координированы двумя молекулами воды. Третья молекула воды (“атакующая” вода W, см. рис. 3в) образует водородную связь с остатками E253 и H101. Аминокислотный остаток K68 координирует ион меди Cu2 . Благодаря электростатическому притяжению, ион SCN^- (субстрат) входит в активный центр, находящийся в “открытой” конформации. При вхождении в активный центр ион SCN^- восстанавливает ион меди Cu2(II) , входящий в электронно-транспортную цепь, до Cu2(I) . Связывание нейтрального радикала SCN^\cdot сопровождается замещением им двух молекул воды, координирующих ионы Cu1 и Cu3 . Восстановление иона Cu2 вызывает его смещение от K68 и изменение его координационной сферы (в плоскую тригональную координацию) с потерей его координа-

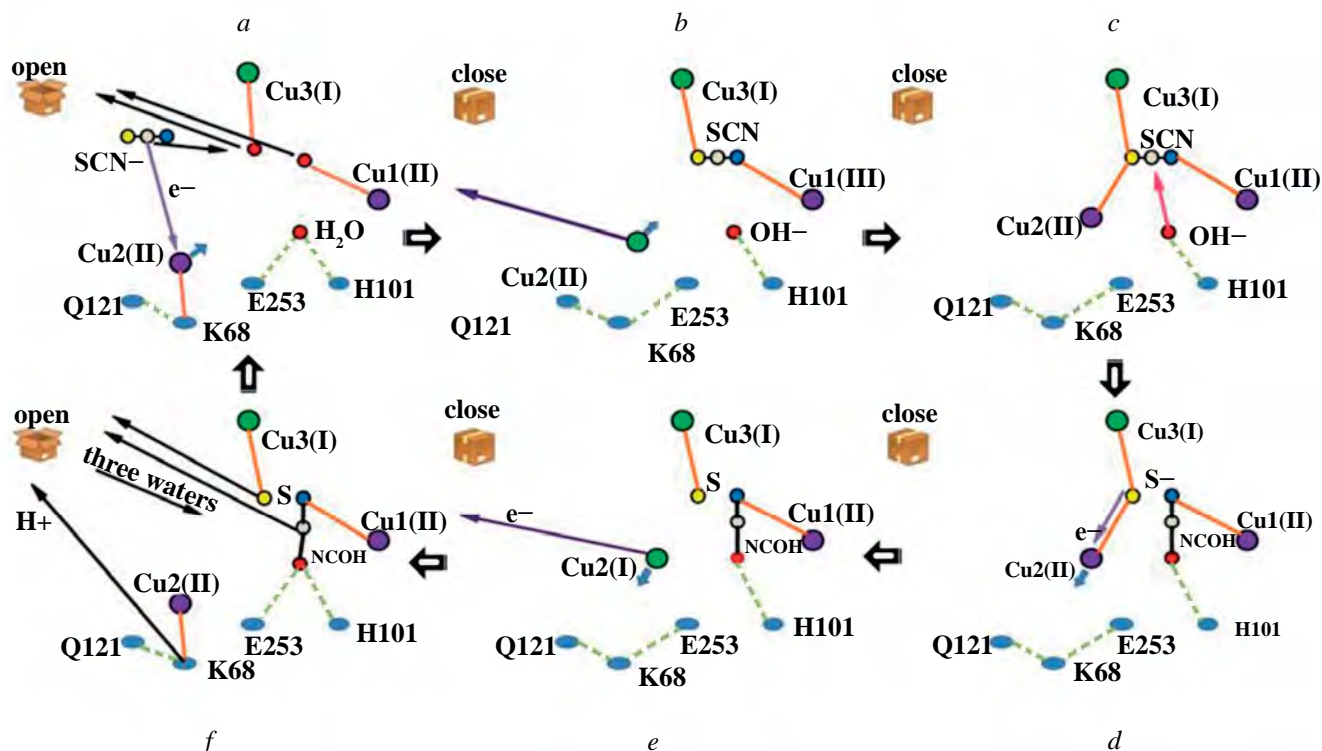


Рис. 7. Предполагаемый механизм каталитического цикла pmTcDH в реакции $\text{NCS}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NCO}^- + \text{S}^0 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. Ключевые координационные связи показаны светлыми линиями. Ковалентные связи показаны черными линиями. Пунктирные линии обозначают водородные связи. Окисленные и восстановленные ионы меди показаны большими сферами. Малые короткие стрелки показывают смещение иона меди Cu2 при изменении степени окисления. Длинные стрелки показывают перенос электронов, а также перемещение молекул в активном центре. Открытые и закрытые коробки обозначают “открытую” и “закрытую” конформации молекулы hbTcDH соответственно.

ции K68. Именно это изменение координации Cu2 инициирует трансформацию “открытой” конформации активного центра в “закрытую”. Это изменение конформации субъединицы ведет к разрыву водородной связи между E253 и “атакующей” водой W и смещению ее боковой цепи в протонированном состоянии (объяснено ниже) к K68. В “закрытой” конформации E253 образует с K68 водородную связь за счет этого протона, которая компенсирует потерю координационной связи K68 с ионом меди в открытой конформации субъединицы.

На второй стадии (стадия b) субъединица находится в закрытой конформации. Ион меди Cu1(II) окислен, в то время как Cu2(I) и Cu3(I) восстановлены. Субстрат в форме нейтрального радикала SCN· связан в активном центре так, что его атом азота замещает молекулу воды из координационной сферы Cu1(II) и формирует координационную связь с Cu1(II), а атом серы замещает вторую молекулу воды и формирует координационную связь с ионом Cu3(I). Положение атома серы субстрата соответствует

положению атома серы в комплексе с молекулой тиомочевина. Ион Cu2(I) сбрасывает свой электрон на акцептор через трансферную цепь (см. выше). Окисление иона Cu2 ведет к его дальнейшему перемещению от K68 к атому серы субстрата. Разрыв водородной связи между боковой цепью остатка E253 и молекулой воды W при переключении конформации субъединицы приводит к протонированию глутамата (см. выше) и трансформации этой молекулы воды в атакующий гидроксил-ион (OH^-).

На третьей стадии реакции (стадия c) окисленный ион Cu2(II) пятикоординирован атомами: ND1 H493, NE2 H100, S от SCN и двумя кислородными лигандами (один из них ион OH^- в позиции W). Ион OH^- связан с H101 через водородную связь. Атом серы субстрата имеет две координационные связи с Cu2(II) и Cu3(I), а атом азота субстрата образует координационную связь с Cu1(II). Взаимодействия атома серы субстрата с ионами меди Cu2(II) и Cu3(I) и его атома азота с ионом Cu1(II) ослабляют ковалентные связи в молекуле субстрата.

Положение иона OH^- позволяет осуществить атаку углеродного атома в радикале SCN^\bullet по уравнению $\text{OH}^- + \text{SCN}^\bullet \rightarrow \text{NCOH} + \text{S}^\bullet$.

На четвертой стадии (стадия d) ион S^\bullet координирует ионы меди $\text{Cu}_2(\text{II})$ и $\text{Cu}_3(\text{I})$. Молекула продукта HOCN связана в активном центре. Атом азота этой молекулы координирует ион $\text{Cu}_1(\text{II})$ и ее атом кислорода образует водородную связь с H101 . Ион S^\bullet восстанавливает $\text{Cu}_2(\text{II})$ до $\text{Cu}_2(\text{I})$ и становится нейтральным атомом серы. Это возможно при наличии акцептора в электронно-транспортной цепи. Восстановленный $\text{Cu}_2(\text{I})$ возвращается в свою среднюю позицию (плоская тригональная координация: два остатка гистидина и молекула воды).

Пятая стадия (стадия e) включает сброс электрона с $\text{Cu}_2(\text{I})$ на электронно-транспортную цепь и смещение Cu_2 к боковой цепи K68. Связывание молекулы HOCN остается неизменным. Следует отметить, что локализация восстановленной $\text{Cu}_2(\text{I})$ в структурах возможна только при отсутствии акцептора электронов. При наличии акцептора электронов состояния в стадиях b и e становятся короткоживущими интермедиатами.

На шестой стадии (стадия f) ион $\text{Cu}_2(\text{II})$ возвращается к его начальному положению, где он координирован остатком K68. Изменение координации иона Cu_2 инициирует переход субъединицы в “открытую” конформацию. При восстановлении координационной связи между $\text{Cu}_2(\text{II})$ и NZ K68 высвобождается протон. Это первый протон, описанный в уравнении реакции. Позиция боковой цепи E253 изменяется. Разрывается водородная связь между E253 и K68. После ее разрыва E253 остается в депротонированном состоянии. После конформационного изменения субъединицы три молекулы из окружающего раствора замещают нейтральные продукты реакции (S и HOCN) в активном центре. Две из них входят в координационные сферы ионов Cu_1 и Cu_3 . Третья становится “атакующей” водой W. Она формирует две водородные связи с E253 и с H101. E253 формирует водородную связь с этой молекулой воды, находясь в депротонированном состоянии. Реакция заканчивается диссоциацией молекулы HOCN на NCO^- и протон H^+ (второй протон в реакции) вне активного центра в растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структуры свободного фермента и комплекса pmTcDH с ее ингибитором тиомочевинной были решены с атомным разрешением. В кристалле

димер фермента состоял из субъединиц в “закрытой” и “открытой” конформациях, отличающихся доступностью активного центра для растворителя. Атомное разрешение позволило точно установить координацию ионов меди уникального трехъядерного медного центра pmTcDH . Опираясь на теоретические положения и полученные структурные данные, удалось соотнести каждому иону меди его заряд, что позволило выделить ряд состояний медного кластера фермента. На основе этих состояний предложены основные этапы каталитического процесса pmTcDH . Данный механизм описывает электрохимическую реакцию, возможную только при наличии внешнего акцептора электронов. Детальный механизм переноса электронов и состояния протонирования кислородных лигандов в активном центре (за исключением лиганда W) требует дальнейших квантово-механических расчетов.

Авторы благодарят за материалы по структурам pmTcDH коллектив сотрудников Института биохимии им. А.Н. Баха РАН: Варфоломееву Л.А., Шипкова Н.С., Дергусову Н.И., Бойко К.М., Тихонову Т.В., Попова В.О.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124031800076-8 “Исследования взаимодействий клеток и их компонентов с низкомолекулярными биорегуляторами”).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. (2020) Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 5280–5290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922133117>
2. Varfolomeeva L.A., Polyakov K.M., Komolov A.S., Rakitina T.V., Dergousova N.I., Dorovatovskii P.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. (2023) Improvement of the diffraction properties of thiocyanate dehydrogenase crystals. *Crystallography Repts.* **68**, 886–891. <https://doi.org/10.1134/s1063774523600990>
3. Haltia T., Brown K., Tegoni M., Cambillau C., Saraste M., Mattila K., Djinovic-Carugo K. (2003) Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution. *Biochem. J.* **369**, 77–88. <https://doi.org/10.1042/BJ20020782>

4. Krissinel E., Henrick K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>
5. Solomon E.I., Heppner D.E., Johnston E.M., Ginsbach J.W., Cirera J., Qayyum M., Kieber-Emmons M.T., Kjaergaard C.H., Hadt R.G., Tian L. (2014) Copper active sites in biology. *Chem. Rev.* **114**, 3659–3853.
<https://doi.org/10.1021/cr400327t>
6. Rubino J.T., Frank K.J. (2012) Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.* **107**, 129–143.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024>
7. Cotton F.A., Wilkinson G. (1980) *Advanced Inorganic Chemistry*, 4th ed. New York: John Wiley and Sons, 798–821.
8. Balamurugan R., Palaniandavar M., Gopalan R.S. (2001) Trigonal planar copper(I) complex: synthesis, structure, and spectra of a redox pair of novel copper(II/I) complexes of tridentate bis(benzimidazol-2'-yl) ligand framework as models for electron-transfer copper proteins. *Inorg. Chem.* **40**, 2246–2255.
<https://doi.org/10.1021/ic0003372>
9. Reinen D., Friebe C. (1984) Copper(2+) in 5-coordination: a case of a second-order Jahn-Teller effect. 2. Pentachlorocuprate(3-) and other CuII L5 complexes: trigonal bipyramid or square pyramid? *Inorg. Chem.* **23**, 791–798.
<https://doi.org/10.1021/ic00175a001>
10. Wansapura C.M., Juyong C., Simpson J.L., Szymanski D., Eaton G.R., Eaton S.S., Fox S. (2003) From planar toward tetrahedral copper(II) complexes: structural and electron paramagnetic resonance studies of substituent steric effects in an extended class of pyrrolate-imine ligands. *J. Coord. Chem.* **56**, 975–993.
<https://doi.org/10.1080/00958970310001607752>
11. Hatfield W.E. (1997) *Handbook of Copper Compounds and Applications*. Ed. Richardson H.W. New York: Marcel Dekker, 13–30.
12. Raithby P.R., Shields G.P., Allen F.H., Motherwell W.D.S. (2000) Structure correlation study of four-coordinate copper(I) and (II) complexes. *Acta Cryst.* **B56**, 444–454.
<https://doi.org/10.1107/S0108768199016870>
13. Komori H., Sugiyama R., Kataoka K., Miyazaki K., Higuchi Y., Sakurai T. (2014) New insights into the catalytic active-site structure of multicopper oxidases. *Acta Cryst.* **D70**, 772–779.
<https://doi.org/10.1107/S1399004713033051>
14. Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova S., Fedorova T.V., Glazunova O.A., Popov A.N., Koroleva O.V. (2017) Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism. *Acta Cryst.* **D73**, 388–401.
<https://doi.org/10.1107/S2059798317003667>
15. Derewenda Z.S. (2010) Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties. *Acta Cryst.* **D66**, 604–615.
doi: 10.1107/S090744491000644X.
16. Vagin A., Teplyakov A. (1997) MOLREP: An automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **66**, 22–25.
<https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>
17. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst.* **D53**, 240–255.
<https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>
18. McNicholas S., Potterton E., Wilson K.S., Noble M.E.M. (2011) Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Cryst.* **D67**, 386–394.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>

Mechanism of Thiocyanate Dehydrogenase Functioning Based on Structural Data

© 2025 г. К. М. Polyakov*, S. Gavryushov

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: kmpolyakov@gmail.com*

Thiocyanate dehydrogenase is enzyme catalyzing transformation of a thiocyanate ion into a cyanate ion with outcome of two electrons, two protons and a neutral atom of sulphur. Earlier structures of thiocyanate dehydrogenase from *Thioalkalivibrio paradoxus* were solved. Despite not perfect quality of the structures (twinning and pronounced anisotropy of the crystals, incomplete occupancy of the copper ions, absence of data for complexes with analogues of the substrate), there was suggested a mechanism of the enzyme functioning based on those structures. Recently at atomic resolution there have been solved structures of a gene-modified copy of relative enzyme from *Pelomicrobium methylotrophicum* for free protein and its complex with thiourea. In the new structures copper ions of the active site possess complete occupancy. In these structures it is possible to reliably identify two conformations of the protein molecule with opened and closed active sites. The new structural high resolution data also allowed us to determine the presence of the superposition of different states of the copper ions for each of the two conformations. In each state the copper ions have different oxidation degrees, different corresponding ligands and partial occupancies. The ion charges were determined according to the ions coordination. In the protein molecule with the closed active site the complexes with inhibitor (thiourea ion) and molecular oxygen are observed. The complex with thiourea allows us to model binding of thiocyanate ion to the enzyme molecule. Taking into account the changes of the structures in the opened and closed conformations, a mechanism of the attacking oxygen ligand activation is suggested. A new scheme of the enzymatic reaction is discussed.

Keywords: X-ray analysis of proteins, conformational changes, multicopper enzymes, enzymatic reactions