

УДК 548.73

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА УПАКОВКУ И КОНФОРМАЦИЮ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КРИСТАЛЛЕ

© 2025 г. Л. А. Варфоломеева^{1,*}, А. Ю. Соловьева¹, Н. С. Шипков¹, Н. И. Дергоусова¹, М. Е. Миняев², К. М. Бойко¹, Т. В. Тихонова¹, В. О. Попов¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

*E-mail: l.varfolomeeva@fbras.ru

Поступила в редакцию 03.10.2024 г.

После доработки 03.10.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Медьсодержащий фермент тиоцианатдегидрогеназа (ТсДН) катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементной серы. Сегодня известны пространственные структуры двух бактериальных ТсДН (trТсДН и pmТсДН). Оба фермента представляют собой димеры и содержат в активном центре трехъядерный медный центр. Важным отличием между этими ферментами является то, что в кристалле субъединицы димера trТсДН принимают идентичные конформации, а субъединицы димера pmТсДН находятся в разных конформациях — закрытой и открытой. Для выяснения роли ионов меди в изменении конформации ТсДН установлена структура апоформы pmТсДН, в которой обе субъединицы димера имели закрытую конформацию. Наставание кристаллов апоформы медью приводило к восстановлению трехъядерного центра и конформационным перестройкам субъединиц.

DOI: 10.31857/S0023476125010027, EDN: IUBQXT

ВВЕДЕНИЕ

Медьсодержащий фермент тиоцианатдегидрогеназа (ТсДН) участвует в азотном или/и энергетическом обмене у ряда сероокисляющих микроорганизмов [1, 2], катализируя реакцию окисления тиоцианата с образованием цианата и элементной серы и переносом двух электронов на внешний акцептор [3]. Впервые пространственная структура была установлена для фермента из галокалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (trТсДН) [3]. Недавно структуры свободного фермента и его комплекса с тиомочевинной были установлены с атомным разрешением для другого представителя класса из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum* (pmТсДН), что позволило точно охарактеризовать детали строения активного центра в различных состояниях и уточнить первые этапы каталитической реакции [4].

Оба охарактеризованных фермента обладают сходной структурой и являются димерами в растворе и кристалле [3, 4]. Субъединица ТсДН представляет собой семилопастной β-пропеллер, сформированный антипараллельными β-слоями. Субстратный канал ведет с поверхности фермента в центральную полость пропеллера, где располагается активный центр ТсДН, содержащий в качестве кофакторов три иона меди Cu1–3. Согласно

имеющимся структурным данным [4] субъединица ТсДН может принимать открытую конформацию, где активный центр доступен для растворителя, и закрытую конформацию, в которой субстратный канал закрыт от растворителя консервативным остатком пролина. Механизм перехода между конформациями остается не до конца выясненным.

Несмотря на сходство общей структуры, димеры trТсДН и pmТсДН обладают одним заметным и интересным отличием. Конформация субъединиц в димере trТсДН одинакова во всех установленных структурах, включая варианты с точечными заменами [3, 5, 6]. Обе субъединицы всегда находятся либо в закрытой, либо в открытой конформации. Закрытая конформация субъединиц trТсДН наблюдалась только в одной структуре (PDB ID: 6UWE), где в активном центре фермента был обнаружен неидентифицируемый лиганд [3]. В случае pmТсДН в организации димера наблюдается асимметрия: одна субъединица находится в закрытой конформации, а другая — в открытой [4]. При этом эффекта кооперативного взаимодействия между субъединицами pmТсДН в кинетических экспериментах не отмечалось.

Рост белковых кристаллов и, как следствие, упаковка в нем молекул зависят от ряда различных факторов, включая параметры кристаллизационного

эксперимента [7–10] и свойства кристаллизуемой молекулы [11]. На конформацию фермента может оказывать влияние и связывание лигандов (кофактора, субстрата и др.). Так, в случае сокристаллизации мРНК-кэпирующего фермента в комплексе с гуанозинтрифосфатом одна молекула из независимой части принимает закрытую конформацию, а другая – открытую [11]. В то же время кристаллизация формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas sp.* в комплексе с никотинамидадениндинуклеотидом и азидом привела к тому, что кристаллы комплекса имели другую пространственную группу, в которой молекулы фермента принимали закрытую конформацию по сравнению с открытой конформацией в апоформе фермента [12].

В данной работе проведена проверка влияния кофакторов (ионов меди) на упаковку молекул рmTcDH в кристалле и конформацию субъединиц димера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка рmTcDH. Экспрессию рекомбинантного препарата рmTcDH в клетках *Escherichia coli*, выделение и очистку проводили согласно методике, описанной в [4]. Полученный гомогенный препарат рmTcDH не содержал ионов меди (апоформа) и не обладал ферментативной активностью.

Кристаллизация. Для кристаллизации использовали препарат апоформы рmTcDH с концентрацией 11.5 мг/мл в 25 мМ MOPS, pH 7.5, содержащем 150 мМ NaCl.

Кристаллизацию осуществляли методом диффузии паров (вариант “висячая капля”) в 24-луночных планшетах (VDX, Hampton Research, США) при температуре 15°C. Для этой цели смешивали 1 мкл раствора белка и 1 мкл раствора осадителя, в лунку планшета вносили 500 мкл раствора осадителя. Кристаллы апоформы рmTcDH были получены в следующих условиях: 0.1 М HEPES, pH 7.5, 21% PEG 8000, 8% этилен гликоля.

Восстановление трехъядерного центра ионами меди в кристалле. Встраивание ионов меди в активный центр апоформы рmTcDH в кристалле проводили настаиванием с ионами меди (2+) и ионами меди (+). Для настаивания ионами меди (2+) кристаллы апоформы рmTcDH помещали на ~24 ч и более в кристаллизационный раствор, содержащий 1 мМ CuCl₂. Для настаивания с ионами меди (+) кристаллы апоформы рmTcDH помещали на 12 ч в кристаллизационный раствор, содержащий 1 мМ CuCl₂ и 1 мМ аскорбата натрия.

Сбор дифракционных данных. Наборы дифракционных данных для кристаллов апоформы рmTcDH и рmTcDH, настоянных с ионами меди (2+) (рmTcDH^{Cu2+}), собирали на станции BL17UM (SSRF, Китай), а для кристалла рmTcDH, настоянного с

ионами меди (+) (рmTcDH^{Cu+}) – на дифрактометре XtaLAB Synergy-S (Rigaku, Япония) в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Перед сбором дифракционных данных кристаллы помещали на 5–10 с в кристаллизационный раствор с добавлением 20% этиленгликоля в качестве криопротектирующего агента. Сбор дифракционных данных проводили при температуре 100 К.

Обработку данных для структур апоформы рmTcDH и рmTcDH^{Cu2+} проводили с помощью программ XDS и XSCALE [13], а для рmTcDH^{Cu+} – с помощью программы CrysAlis^{Pro} 1.0.43 (Rigaku, Japan). Статистика сбора данных представлена в табл. 1.

Решение и уточнение структур проводили с использованием комплекса программ CCP4 [14]. Все структуры были решены методом молекулярного замещения с помощью программы MOLREP [15] с использованием субъединицы холоформы рmTcDH (PDB ID: 8Q9X) в качестве исходной модели [4]. Уточнение проводили в программах REFMAC5 [16] и COOT [17]. Для структур фермента рmTcDH^{Cu2+} и рmTcDH^{Cu+} B-факторы ионов меди уточняли в анизотропном приближении на последних циклах уточнения. Статистика уточнения структур представлена в табл. 1. Анализ кристаллических контактов проводили с помощью сервиса PDBePISA [18]. Совмещение структур по всем сходным Ca-атомам проводили с помощью программы LSQKAB [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Субъединицы димера апоформы белка имеют одинаковую конформацию

Кристаллы апоформы рmTcDH были получены в условиях кристаллизации, в которых ранее росли кристаллы холоформы фермента. Однако пространственная группа и состав независимой части элементарной ячейки данных кристаллов различались. Пространственная группа кристаллов апоформы соответствует центрированной группе C22₁ (табл. 1) в отличие от примитивной P2₁2₁2₁ для кристаллов холоформы [4]. Кроме того, в первом случае в независимой части элементарной ячейки обнаружен не димер, а три молекулы фермента (рис. 1а): димер (субъединицы А и В) и одна субъединица (субъединица С) второго димера с осью симметрии, совпадающей с кристаллографической.

Все молекулы апоформы фермента из независимой части элементарной ячейки имеют одинаковую закрытую конформацию (табл. 2). Остаток P256, расположенный на подвижной петле 251–266, ограничивает доступ растворителя в активный центр всех трех субъединиц (рис. 1б), что соответствует закрытой конформации в структуре холоформы рmTcDH (табл. 2). В последнем случае при переходе в открытую конформацию остаток P256 в составе петли смещается и открывает активный центр для внешнего растворителя и субстрата (рис. 1в).

Таблица 1. Статистика сбора данных и уточнения структур апоформы pmTcDH, pmTcDH^{Cu2+} и pmTcDH^{Cu+}

	Апоформа pmTcDH	pmTcDH ^{Cu2+}	pmTcDH ^{Cu+}
Станция	BL17UM, SSRF, Китай	BL17UM, SSRF, Китай	XtaLAB Synergy-S, Rigaku
Пр. гр.	C222 ₁	C222 ₁	C222 ₁
<i>a, b, c</i> , Å	97.99, 101.95, 276.17	97.80, 101.75, 276.35	98.09, 101.99, 276.80
Длина волны, Å	0.9792	0.9792	1.5418
Разрешение, Å	50.00–1.45 (1.50–1.45)	50.00–1.80 (1.85–1.80)	23.71–2.00 (2.03–2.00)
Число независимых рефлексов	243938 (23220)	125833 (9819)	93349 (4421)
Повторяемость	13.1 (12.6)	6.7 (6.9)	13.0 (10.3)
<i>I/σ</i> (<i>I</i>)	20.3 (2.6)	12.7 (2.0)	14.2 (4.3)
Полнота данных, %	99.5 (98.8)	98.8 (98.2)	99.6 (96.5)
<i>R</i> _{meas} , %	7.1 (105.5)	11.0 (121.7)	15.6 (58.9)
<i>CC</i> _{1/2} , %	99.9 (82.8)	99.8 (67.9)	99.7 (82.7)
<i>R</i> _{crys} , %	16.7	16.8	17.5
<i>R</i> _{free} , %	19.6	21.7	22.2
Среднеквадратичные отклонения			
Длины связей, Å	0.016	0.014	0.018
Валентные углы, град	2.259	2.261	2.319
Число неводородных атомов			
Белок	10914	10858	10826
Растворитель	1315	699	652
Ионы меди	3	10	9
Общий средний <i>B</i> -фактор			
Средний <i>B</i> -фактор по белку	19.1	29.5	18.2
Средний <i>B</i> -фактор по растворителю	28.1	34.4	19.0
Средний <i>B</i> -фактор по ионам меди	17.9	26.7	14.8
Код PDB	8Z75	8Z76	8Z77

Примечание. В скобках приведены значения для данных высокого разрешения.

Таблица 2. Сравнение субъединиц апоформы pmTcDH, pmTcDH^{Cu2+} и pmTcDH^{Cu+} с закрытой субъединицей апоформы и с закрытой и открытой субъединицами холоформы (PDB ID: 8Q9X)

Структура	Субъединицы	Среднеквадратичное отклонение, Å		
		Закрытая субъединица апоформы	Закрытая субъединица холоформы	Открытая субъединица холоформы
Апоформа pmTcDH	<i>A</i>		0.26	0.59
	<i>B</i>	0.22	0.23	0.62
	<i>C</i>	0.17	0.25	0.61
pmTcDH ^{Cu2+}	<i>A</i>	0.21	0.29	0.52
	<i>B</i>	0.25	0.21	0.61
	<i>C</i>	0.29	0.26	0.43
pmTcDH ^{Cu+}	<i>A</i>	0.39	0.41	0.38
	<i>B</i>	0.26	0.20	0.57
	<i>C</i>	0.42	0.39	0.42

Примечание. Приведены значения среднеквадратичного отклонения (Å) при совмещении по α -атомам. Название субъединиц, принимающих закрытую конформацию, обозначены курсивом.

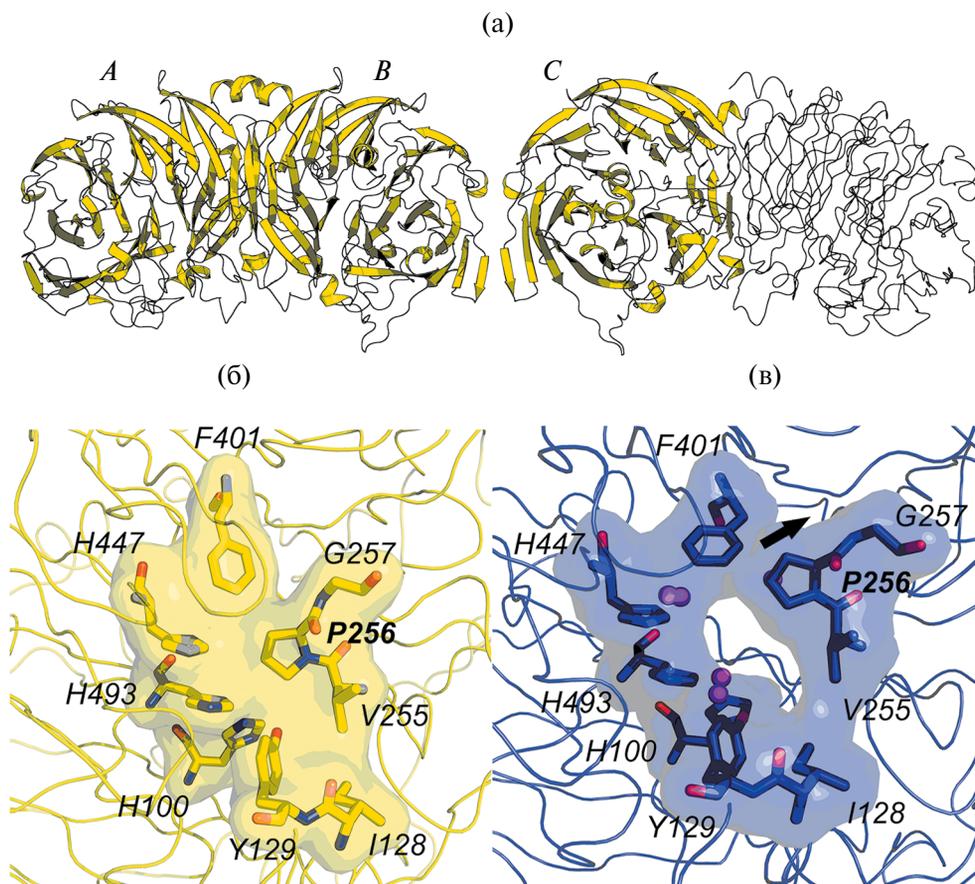


Рис. 1. Три субъединицы А, В, С из независимой части элементарной ячейки (показана вторичная структура) и симметричная субъединица С (вторичная структура не показана) апоформы рmTcDH (PDB ID: 8Z75) (а). Положение остатка P256 в закрытой конформации субъединицы апоформы рmTcDH (PDB ID: 8Z75) (б) и открытой конформации холоформы рmTcDH (PDB ID: 8Q9X) (в). Стрелка показывает направление движения остатка P256 при открытии субстратного канала. Поверхность показана для аминокислотных остатков, формирующих стенки субстратного канала. Ионы меди активного центра показаны сферами.

Подчеркнем, что в закрытой конформации апо- и холоформ подвижная петля 251–266 зафиксирована большим числом водородных связей с соседними участками полипептидной цепи (13 связей) по сравнению с открытой конформацией холоформы (9 связей). Водородные связи между парами остатков E253 и K68, E253 и Y129, G257 и Y397, E259 и H346 обнаружены только в закрытой конформации. Остатки Q347 и F401, важные для конформационных переходов между открытой и закрытой конформациями [5], в структуре апофермента упорядочены и принимают положение, соответствующее закрытой конформации холоформы.

Несмотря на отсутствие ионов меди, активный центр апоформы рmTcDH хорошо структурирован (рис. 2а): все остатки активного центра принимают одну конформацию и хорошо различимы на карте электронной плотности. Интересно отметить, что ионы меди Cu1 и Cu3 отсутствуют в активном центре. В то время как на месте иона Cu2 располагается максимум на карте электронной плотности

(рис. 2б), который не может быть описан растворителем из-за короткого расстояния до окружающих лигандов. Данный максимум был описан как ион меди с заселенностью 0.2. Присутствие иона Cu2 в активном центре, вероятно, связано с тем, что фермент способен связывать небольшое количество ионов меди в процессе экспрессии белка в клетках *E. coli*. При этом в апоформе конформация аминокислотных остатков, координирующих ионы Cu2 и Cu3, соответствует таковому для холоформы (рис. 2а), а отсутствие иона Cu1 приводит к смещению остатка H346 в альтернативное положение (рис. 2в). H346 прочно фиксируется в этом положении сетью водородных связей непосредственно с E259 из подвижной петли 251–266 и остатками N361, T400 посредством общей молекулы воды.

Анализ кристаллических контактов в структуре апо- и холоформ рmTcDH показал, что корреляции между числом кристаллических контактов и конформацией молекул из независимой части элементарной ячейки не наблюдается.

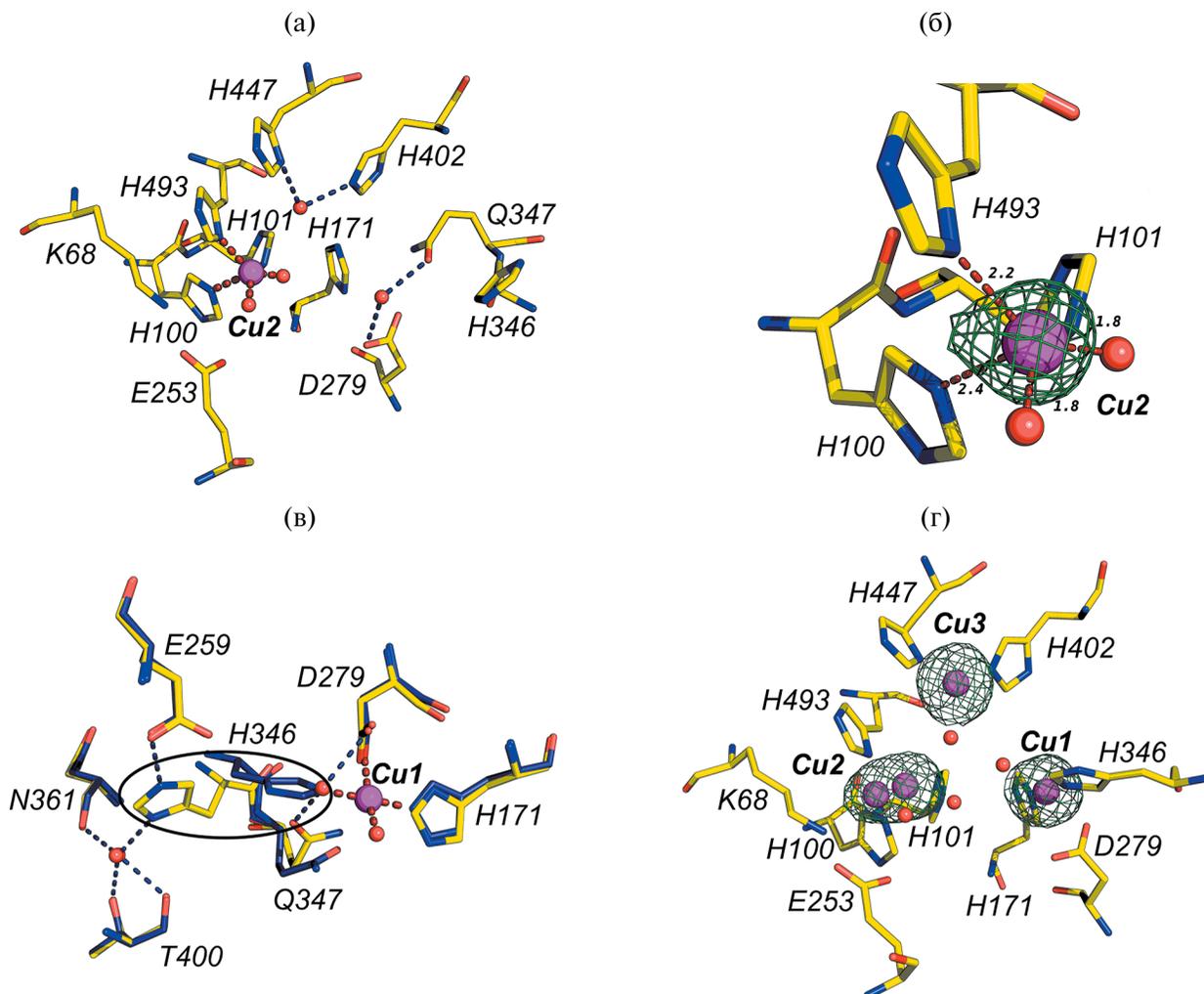


Рис. 2. Активный центр апоформы pmTcDH (PDB ID: 8Z75) (а) до настаивания кристаллов ионами меди. Максимум на разностной карте электронной плотности на уровне 3σ описан ионом меди Cu2 с заселенностью 0.2, соответствующие координационные расстояния указаны в Å (б). Совмещение структур апоформы (PDB ID: 8Z75) и холоформы (PDB ID: 8Q9X) показало (в), что в отсутствие иона Cu1 остаток H346 меняет свое положение и образует водородные связи с остатком E259 и молекулой воды. Восстановление трехъядерного медного центра pmTcDH^{Cu²⁺} после настаивания кристаллов ионами меди (2+) (PDB ID: 8Z76): показаны максимумы на разностной карте электронной плотности на уровне 3σ в положениях ионов Cu1, Cu2, Cu3 (г). Ионы меди и молекулы воды – большие и маленькие сферы соответственно, координационные и водородные связи – толстые и тонкие пунктирные линии соответственно.

Встраивание ионов меди в активный центр сопровождается конформационными изменениями

Для восстановления полного трехъядерного медного центра кристаллы апоформы pmTcDH настаивали ионами меди. Полный трехъядерный медный центр, где ионы меди Cu1, Cu2 и Cu3 обладают полной заселенностью, был получен при настаивании кристаллов как ионами меди (2+) pmTcDH^{Cu²⁺} (PDB ID: 8Z76, рис. 2г), так и ионами меди (+) pmTcDH^{Cu⁺} (PDB ID: 8Z77). Однако в первом случае требуется большее время настаивания, что связано, вероятно, с большими энергетическими затратами при удалении гидратной оболочки иона меди (2+) в процессе связывания в активном центре фермента. Отметим, что медные белки часто

проявляют избирательность к степени окисления ионов меди при их активации в кристалле [20, 21]. Например, в случае trTcDH полный медный центр в структуре можно получить только при обработке кристаллов ионами меди (+) [3], что часто сопровождается возникновением артефактов в структуре.

Далее каждую их трех субъединиц из независимой части элементарной ячейки структур pmTcDH^{Cu²⁺} и pmTcDH^{Cu⁺} совмещали со структурами субъединицы апоформы и закрытой и открытой субъединицами холоформы (табл. 2). Полученные результаты показали, что встраивание ионов меди в активный центр в кристалле приводит к конформационным изменениям молекул апофермента.

При настаивании кристаллов ионами меди (2+) подвижная петля 251–266 принимает закрытую конформацию у субъединиц димера А и В, а в субъединице С наблюдаются два положения для данной петли (рис. 3а). При настаивании кристаллов ионами меди (+) петля 251–266 у субъединицы В остается в закрытом положении, а у субъединиц А и С данная петля изменяет свою конформацию на открытую. Отметим, что остатки Q347 и F401, также влияющие на переход между открытой и закрытой

конформациями, в обеих структурах, настоянных с медью, плохо проявляются на карте электронной плотности.

Полученные структурные данные позволили охарактеризовать набор состояний димера рmTcDH с полным трехъядерным медным центром, где обе субъединицы димера могут быть закрыты (субъединицы А и В в структуре рmTcDH^{Cu2+}, рис. 3б), могут принимать разные конформации (А и В в структуре рmTcDH^{Cu+}, рис. 3в) и могут быть

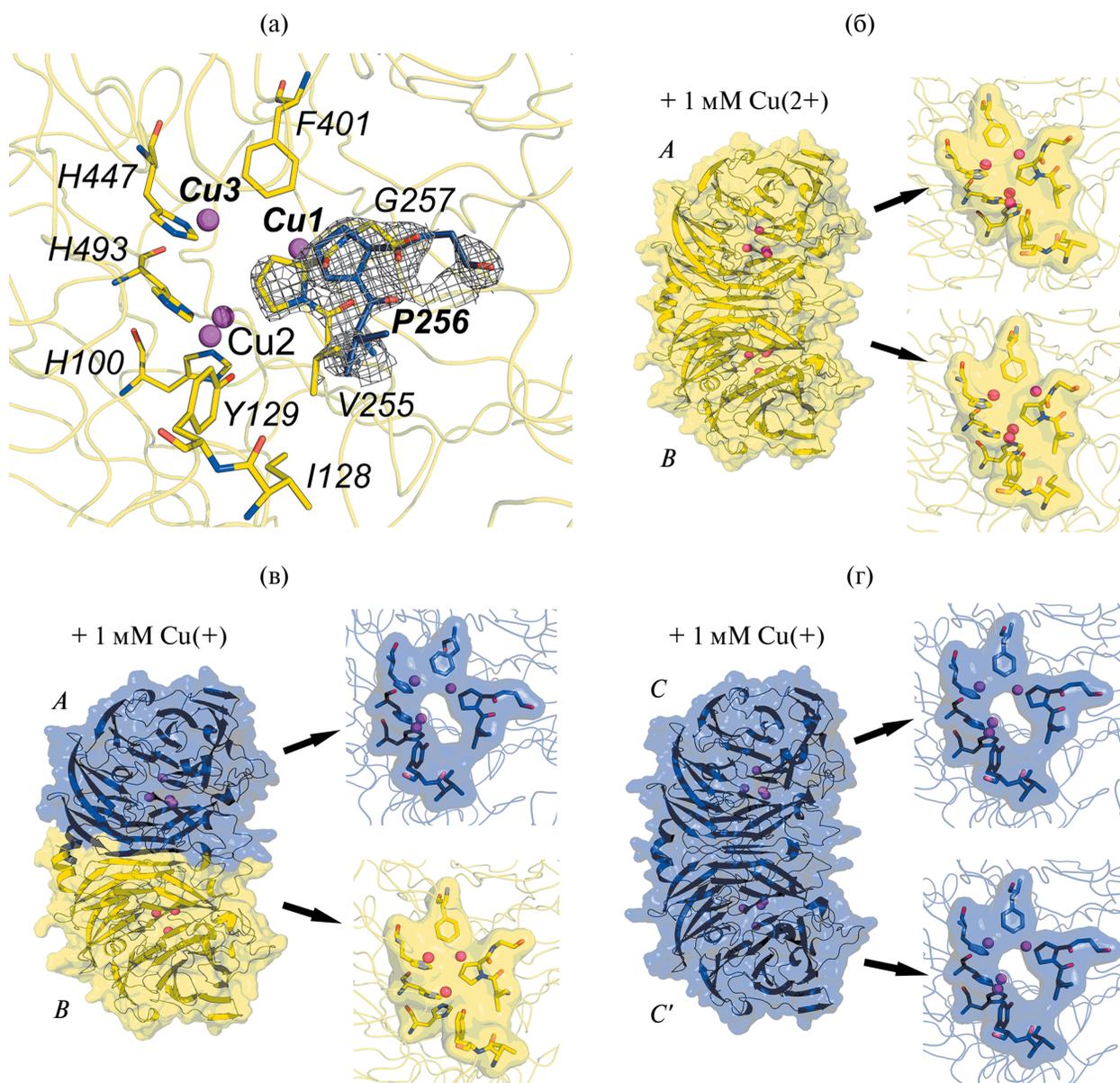


Рис. 3. Два положения остатка P256 на карте электронной плотности ($2F_o - F_c$), соответствующие закрытой и открытой конформации, в активном центре субъединицы С структуры рmTcDH^{Cu2+} после настаивания кристаллов ионами меди (2+) (PDB ID: 8Z76) (а). Конформации субъединиц димера рmTcDH после настаивания кристаллов ионами меди: две закрытые субъединицы А и В в структуре рmTcDH^{Cu2+} (PDB ID: 8Z76) (б), открытая А (сверху) и закрытая В (внизу) субъединицы в структуре рmTcDH^{Cu+} (PDB ID: 8Z77) (в), две открытые субъединицы С и симметричная С в структуре рmTcDH^{Cu+} (PDB ID: 8Z77) (г). На панелях б–г приведены врезки с изображением остатков, формирующих субстратный канал.

открыты (С в структуре $\text{rmTcDH}^{\text{Cu}^+}$, рис. 3г). Исходя из полученных данных можно заключить, что кристаллические контакты не ограничивают возможность конформационных переходов субъединиц rmTcDH , поскольку субъединицы А и С, образующие большее число контактов, демонстрируют большую подвижность петли 251–266 и остатков Q347 и F401 в сравнении с субъединицей В в обеих структурах $\text{rmTcDH}^{\text{Cu}^{2+}}$ и $\text{rmTcDH}^{\text{Cu}^+}$.

Таким образом, результаты проведенного исследования структуры апоформы rmTcDH и восстановления полного медного центра фермента настаиванием кристаллов с ионами меди наряду с ранее полученными данными для холоформы [4] позволяют заключить, что ионы меди в активном центре влияют на упаковку молекул фермента в кристалле и их предпочтительную конформацию. При этом симметричные контакты не ограничивают переходы между закрытой и открытой конформациями фермента. В случае отсутствия кофакторов в активном центре молекулы rmTcDH принимают наиболее жесткую – закрытую конформацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что упаковка молекул rmTcDH в кристалле и конформация субъединиц фермента зависят от присутствия ионов меди в активном центре. В случае апоформы обе субъединицы димера принимают закрытую конформацию. Полный трехъядерный медный центр в структуре rmTcDH может быть восстановлен путем настаивания кристаллов с ионами меди (2+) или (+). Встраивание ионов меди в активный центр фермента в процессе настаивания вызывает конформационные переходы между закрытой и открытой конформациями субъединиц.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-74-30004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Lysenko A.M. et al. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. Pt 2. P. 657. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-2-657>
2. Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Novikov A.A. et al. // *Extremophiles.* 2020. V. 24. № 1. P. 177. <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-019-01145-0>
3. Tikhonova T.V., Sorokin D.Y., Hagen W.R. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 10. P. 5280. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1922133117>
4. Varfolomeeva L.A., Shipkov N.S., Dergousova N.I. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2024. P. 135058. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135058>
5. Varfolomeeva L.A., Solovieva A.Y., Shipkov N.S. et al. // *Crystals.* 2022. V. 12. P. 1787. <http://dx.doi.org/10.3390/cryst12121787>
6. Varfolomeeva L.A., Polyakov K.M., Komolov A.S. et al. // *Crystallography Reports.* 2023. V. 68. № 6. P. 886. <http://dx.doi.org/10.1134/s1063774523600990>
7. McPherson A. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1607. P. 17. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_2
8. Atakisi H., Moreau D.W., Thorne R.E. // *Acta Cryst. D.* 2018. V. 74. № 4. P. 264. <http://dx.doi.org/10.1107/S2059798318000207>
9. Kishan K.V., Zeelen J.P., Noble M.E. et al. // *Protein Sci.* 1994. V. 3. № 5. P. 779. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560030507>
10. Kovari Z., Vas M. // *Proteins.* 2004. V. 55. № 1. P. 198. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10469>
11. Hakansson K., Doherty A.J., Shuman S., Wigley D.B. // *Cell.* 1997. V. 89. № 4. P. 545. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80236-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80236-6)
12. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O. et al. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 236. № 3. P. 759. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1188>
13. Kabsch W. // *Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. № 2. P. 125. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909047337>
14. Agirre J., Atanasova M., Bagdonas H. et al. // *Acta Cryst. D.* 2023. V. 79. № 6. P. 449. <http://dx.doi.org/10.1107/S2059798323003595>
15. Vagin A., Teplyakov A. // *Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. № 1. P. 22. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909042589>
16. Murshudov G.N., Skubak P., Lebedev A.A. et al. // *Acta Cryst. D.* 2011. V. 67. № 4. P. 355. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444911001314>
17. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. № 4. P. 486. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910007493>
18. Krissinel E., Henrick K. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 372. № 3. P. 774. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>
19. Kabsch W. // *Acta Cryst. A.* 1976. V. 32. № 5. P. 922. <http://dx.doi.org/10.1107/S0567739476001873>
20. Appel M.J., Meier K.K., Lafrance-Vanasse J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2019. V. 116. № 12. P. 5370. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1818274116>
21. Osipov E.M., Polyakov K.M., Tikhonova T.V. et al. // *Acta Cryst. F.* 2015. V. 71. № 12. P. 1465. <http://dx.doi.org/10.1107/S2053230X1502052X>

COPPER IONS' INFLUENCE ON THIOCYANATE DEHYDROGENASE PACKING AND CONFORMATION IN A CRYSTAL

L. A. Varfolomeeva^{a,*}, A. Y. Solovieva^a, N. S. Shipkov^a, N. I. Dergousova^a,
M. E. Minyaev^b, K. M. Boyko^a, T. V. Tikhonova^a, V. O. Popov^a

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bN.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*E-mail: l.varfolomeeva@fbras.ru

Abstract. The copper-containing enzyme thiocyanate dehydrogenase (TcDH) catalyzes oxidation of thiocyanate to cyanate and elemental sulfur. To date, the spatial structures of two bacterial TcDHs (tpTcDH and pmTcDH) are known. Both enzymes are dimers and contain a trinuclear copper center in the active site. The important difference between these enzymes is that in a crystal, the subunits of the tpTcDH dimer are in identical conformations, while the subunits of the pmTcDH dimer are in different conformations: closed and open. To clarify the role of copper ions in changing the TcDH conformation, the structure of the apo-form of pmTcDH was established, in which both subunits of the dimer had the closed conformation. Soaking of apo-form crystals with copper led to the restoring of the trinuclear center and the conformational rearrangements of the subunits.