

**Структуры мутантных форм тиоцианатдегидрогеназы из бактерии
*Thioalkalivibrio paradoxus***

Научный руководитель – Поляков Константин Михайлович

Варфоломеева Лариса Александровна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия

E-mail: ahahlala@mail.ru

Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* - периплазматический фермент, катализирующий реакцию разложения иона тиоцианата с образованием иона цианата и элементарной серы и высвобождением двух протонов и двух электронов. Фермент содержит в активном центре уникальный медный кластер. Пространственная структура фермента была решена методом аномального рассеяния для платиновой тяжелоатомной производной кристалла. Все исследованные кристаллы фермента образуют двойники. Возникновению двойникования способствует слоистая упаковка в кристалле тетрамерных молекул фермента, сформированных двумя димерами. Хотя в настоящее время есть возможность кристаллографического уточнения двойникованных структур, точность определения структуры двойникованных кристаллов недостаточно высокая. Для устранения двойникования в кристаллах TcDH была поставлена задача - разрушить слабые взаимодействия между димерами за счет использования рекомбинантных форм с заменами K264A, K267A и K281A в области междимерных контактов.

Рекомбинантные формы TcDH, содержащие гистидиновые таги, одиночную K281A или двойную (K264A, K267A) замены, были сконструированы и экспрессированы в клетках *E. coli*. Ферменты были очищены в три стадии с использованием металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации. Перед кристаллизацией гистидиновые таги удалялись, и препараты активировались ионами меди. Поиск условий кристаллизации был проведен с помощью кристаллизационного робота. Для каждого из мутантов найденные условия кристаллизации были оптимизированы. Наборы дифракционных данных были собраны с кристаллов TcDH на синхротронных источниках. Структуры были решены методом молекулярного замещения и уточнены.

Кристаллы TcDH с двумя заменами K264A, K267A были несовершенны и давали дифракционную картину низкого разрешения (хуже 4Å). Для TcDH с заменой K281A кристаллы были получены в двух разных условиях кристаллизации. Для этих кристаллов были собраны дифракционные данные с разрешением 1.95 Å. Для условий кристаллизации, аналогичных условиям кристаллизации нативного фермента, структура не изменилась. Кристалл белка представлял собой слоистую двойникованную структуру. Во вторых условиях кристаллизации (0.25 M (NH₄)₂SO₄, 1 M Li₂SO₄, 0.1 M цитрат Na, pH 5.6) были получены недвойникованные монокристаллы TcDH. Кристаллы принадлежат к пространственной группе P2₁2₁2₁. В независимой части элементарной ячейки этой структуры обнаружены четыре димерные молекулы фермента, образующие два тетрамера с ослабленными связями между димерами.