

Получение мутантных форм рекомбинантной тиоцианатдегидрогеназы из *Thioalkalivibrio paradoxus* для изучения роли лизина 103 в функционировании активного центра.

Научный руководитель – Ракитина Татьяна Владимировна

Комолов А.С.¹, Варфоломеева Л.А.²

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: askomolov@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия, *E-mail: ahahahlala@mail.ru*

Тиоцианатдегидрогеназа (ТсДН) - ключевой фермент в метаболизме бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* при росте ее на тиоцианате как основном источнике энергии. ТсДН катализирует реакцию окислительного разложения тиоцианата на цианат и элементарную серу. При этом образуются два протона и два электрона, которые переходят в электрон-транспортную сеть. В растворе ТсДН существует в виде димера. Масса одного мономера 54 кДа. Активный центр ТсДН содержит 3 иона меди Cu^{2+} , необходимых для катализа.

Методом рентгеноструктурного анализа были получены две пространственные структуры рекомбинантной формы ТсДН. В одной из структур аминокислота лизин 103 участвует в координации одного из ионов меди активного центра. Во второй структуре Lys103 не входит в координационную сферу иона меди, но участвует в образовании водородной связи с молекулой воды, которая в свою очередь взаимодействует с каталитически значимым остатком Glu288 активного центра. Для верификации роли остатка Lys103 в каталитическом процессе было решено заменить его на остатки глутамина и аргинина. Для проведения мутагенеза был применён метод Quick change. Мутантные белки, слитые с полигистидиновым тагом, были экспрессированы в клетках *E. coli*. Для выделения рекомбинантных белков использовали металл-аффинную хроматографию, а для финальной очистки - гель-фильтрационную хроматографию на колонке Superdex200 10/300. Полученные белки были насыщены ионами меди. После удаления избытка ионов меди диализов, была измерена активность мутантов Lys103Gln и Lys103Arg в реакции окисления тиоцианата и определено содержание ионов меди методом icp-ms.

Для характеристики участия остатков Gln и Arg, введенных вместо Lys103, в координации иона меди или в активации каталитического остатка Glu288 проведена кристаллизация полученных белков с целью получения пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа.