

**КАРГОВ**  
**Иван Сергеевич**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ  
ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ И  
РАСТИТЕЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ**

03.01.04 – биохимия  
03.01.06 – биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва - 2017

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

**Научные руководители:**

доктор химических наук, профессор

**Тишков Владимир Иванович**

кандидат химических наук

**Пометун Анастасия Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Тевяшова Анна Николаевна**

доктор химических наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" ведущий научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков

**Мирошников Константин Анатольевич**

доктор химических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук руководитель лаборатории молекулярной биоинженерии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_\_» декабря 2017 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 002.247.01,  
кандидат биологических наук

Орловский А.Ф.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** NAD<sup>+</sup>-зависимая формиаатдегидрогеназа (FDH, КФ 1.2.1.2) относится к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот и катализирует реакцию окисления формиаат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD<sup>+</sup> до NADH. Интерес к данному ферменту с точки зрения фундаментальной науки обусловлен тем, что на его примере изучается механизм переноса гидрид-иона в активном центре различных дегидрогеназ, поскольку в каталитическом механизме отсутствует стадия переноса протона, а лимитирующим фактором является скорость переноса гидрид-иона от субстрата на атом С-4 никотинамидного кольца. Также FDH является чрезвычайно важным ферментом в различных живых организмах (бактериях, микроскопических грибах и дрожжах, растениях) и активно применяется в биотехнологии в процессах регенерации кофактора. Исследования FDH в настоящее время можно условно разделить на два направления. Первое направление исследования FDH сосредоточено на изучении физиологической роли данного фермента в различных организмах. Известно, что этот фермент является ферментом стресса у многих патогенных бактерий, и его содержание резко возрастает при образовании ими биопленок, которые, несмотря на более многолетнюю историю изучения все еще представляют собой острую и актуальную проблему в современной медицине. Одним из перспективных направлений исследования представляется поиск эффективных ингибиторов FDH, которые могут быть использованы для борьбы с биопленками. В литературе имеется информация о применении общих ингибиторов ферментов (таких, как, например, азид- или тетраборат-ионы) в качестве противомикробных и антисептических препаратов, однако проблема разработки специфических препаратов, направленных на ингибирование именно FDH, пока остается открытой. В частности, одной из самых распространенных целей данного направления являются стафилококковые биопленки, являющиеся самыми распространенными в медицинской практике, на борьбу с которыми ежегодно тратится более 5 миллиардов долларов.

Второе направление исследований заключается в изучении свойств различных FDH с точки зрения их применения в биотехнологии. Одним из продуктов реакции, катализируемой данным ферментом, является NADH, который в свою очередь является коферментом многих дегидрогеназ. Поэтому FDH широко применяется в процессах, использующих NADH-зависимые дегидрогеназы, в качестве катализатора для регенерации восстановленной формы кофактора. Такие ферментативные процессы синтеза оптически активных соединений на сегодняшний день чрезвычайно распространены, существует значительное количество патентов и методик, основанных на использовании ФДГ для регенерации NADH при получении неприродных L-аминокислот, хиральных спиртов и т.д. Также FDH используется в аналитической биотехнологии при создании биосенсоров на формиаат. Помимо этого последние работы о применении FDH свидетельствуют об успешном использовании этого фермента для получения формиаата с использованием фотоэлектрической ячейки.

В литературе описана возможность применения в качестве биокатализатора более двух десятков FDH из различных природных источников. Такое обилие ферментов, а также разнообразие их свойств (как кинетических параметров, так и температурной стабильности) позволяет выбирать фермент, более подходящий под условия и цели поставленной задачи. Например, наилучшими кинетическими параметрами обладают растительные FDH, а наибольшей термостабильностью – бактериальные. Наиболее

крупномасштабный процесс производства L-терт-лейцина осуществлен компанией Evonik, Германия, с использованием FDH из дрожжей *Candida boidinii*. В то же время существует другой путь получения фермента с необходимыми свойствами – оптимизация с помощью средств белковой инженерии. Как показывает практика, наиболее мощным является метод рационального дизайна. Он включает в себя анализ трехмерной структуры исследуемого фермента и анализ выравнивания аминокислотных последовательностей ферментов из различных источников, который позволяет найти потенциальные положения для введения аминокислотных замен. Компьютерное моделирование будущей замены позволяет предсказать эффект, который она может оказать в реальности. Выбранные замены вводятся в ген фермента с помощью направленного мутагенеза. Главным требованием при использовании данного подхода является наличие экспериментальной или модельной трехмерной структуры фермента, поскольку, несмотря на высокий процент гомологии внутри семейства FDH, периодически наблюдается существенная разница результатов при замене схожих аминокислотных остатков. Также метод рационального дизайна позволяет прояснить взаимосвязь структуры и функции конкретной FDH. Существует ряд работ, которые свидетельствуют о кардинальном изменении свойств фермента при внесении единичной замены.

**Цели исследования.** Целью данной работы является проведение исследований, направленных на изучение взаимосвязи структуры и функции в бактериальной и растительной формиаатдегидрогеназах, а также получение мутантных форм ферментов с помощью рационального дизайна.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- клонирование двух вариантов гена формиаатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* и оптимизация условий культивирования штамма-продуцента рекомбинантной SauFDH
- разработка эффективной системы очистки для получения больших количеств SauFDH высокой чистоты
- определение кинетических параметров и изучение температурной стабильности двух вариантов SauFDH и выбор лучшего
- проведение кристаллизации и решение структуры SauFDH
- исследование роли аминокислотных остатков SauFDH, входящих в состав консервативных мотивов в структуре формиаатдегидрогеназ
- исследование роли структурно эквивалентного аминокислотного остатка в кофермент-связывающем домене формиаатдегидрогеназ из бактерий *S. aureus* и сои *Glycine max* (soя)

**Научная новизна.** В ходе выполнения данной работы проведено клонирование двух вариантов гена формиаатдегидрогеназы из бактерий *S. aureus*, разработана и оптимизирована система получения рекомбинантных ферментов в клетках *E. coli*, наработано большое количество высокоочищенного фермента, использованное для получения его кристаллов и решения трехмерной структуры. Показано, что природной формой скорее всего является полноразмерный вариант в силу лучших кинетических параметров. Проведен подробный сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных формиаатдегидрогеназ. В результате был найден ряд остатков, которые могут обеспечивать столь резкое различие каталитических параметров SauFDH и SoyFDH от других формиаатдегидрогеназ. На основании анализа структурных данных были выбраны наиболее перспективные положения для введения аминокислотных замен. Методом направленного мутагенеза получены 5 мутантных

SauFDH и 5 мутантных SoyFDH в различных положениях. При введении ряда точечных аминокислотных замен удалось повысить температурную стабильность и каталитическую активность SoyFDH, а также в некоторых случаях повысить термостабильность SauFDH.

**Практическая значимость работы.** Полученная рекомбинантная SauFDH имеет самую высокую каталитическую константу (минимум в 2,7 раза) по сравнению со всеми описанными ФДГ, что позволяет удешевить стоимость получения одной единицы активности и снизить общую стоимость процесса регенерации восстановленного кофермента. Высокий уровень экспрессии рекомбинантной SauFDH в клетках *E.coli* (более 1 г с литра среды) также позволяет снизить себестоимость получения фермента. Проведенные систематические исследования взаимосвязи структуры и функции SauFDH на основе полученной в данной работе структуры кристаллов данного фермента, а также изучение свойств мутантных форм этого фермента, предоставляют новую информацию относительно его функционирования. Кроме того, полученные в данной работе мутантные формы SoyFDH с повышенной температурной стабильностью и улучшенной каталитической эффективностью являются перспективными для применения в биотехнологических процессах регенерации NADH.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Согласно аннотации генома бактерий *Staphylococcus aureus* возможно существование двух вариантов аминокислотных последовательностей формиадегидрогеназы. Клонирование, экспрессия и изучение свойств этих вариантов позволяет сделать вывод, что в природе функционирует полноразмерный вариант фермента.
2. Разработана эффективная система получения и очистки активной рекомбинантной формиадегидрогеназы из бактерий *S. aureus* (SauFDH).
3. Впервые показано, что SauFDH обладает самой высокой каталитической константой и температурной стабильностью среди всех описанных ФДГ.
4. Впервые получены кристаллы апо- и холо-форм SauFDH и решена их структура.
5. Изучена роль остатка F196A и показана его роль в поддержании структуры активного центра.
6. Изучена роль остатка V323, показана важность данного остатка в температурной стабильности SauFDH.
7. Изучена роль структурно эквивалентного остатка F290/Y303 в функции формиадегидрогеназ из сои и бактерий *S.aureus*

**Личный вклад диссертанта.** Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

**Степень достоверности.** Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов определяется использованием современных физико-химических методов исследования и выполнением экспериментов на сертифицированном оборудовании.

**Апробация результатов.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных конгрессах, конференциях и школах: XIX–XXIII международная молодежная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2012-2016), XII и VX Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии» (Беларусь-Литва, 2012 и Барнаул, Россия, 2015),

Международная конференция «Ломоносов и Гумбольдт: научное сотрудничество России и Германии – от истоков до наших дней» (Москва, Россия, 2011), 9th International Conference on Protein Stabilization - ProStab2012 "From Molecular Level to market applications" (Lisbon, Portugal, 2012), International Conference "Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications" (Moscow, Russia, 2013), Congress of Federation of European Biochemical Societies FEBS-2013 "Mechanisms in Biology" (St.Petersburg, Russia, 2013), International BioForum-2014 (Pushchino, Russia, 2014), 10th International Conference on Protein Stabilization (Stresa, Italy, 2014), International Conference OxiZymes (Vienna, Austria, 2014), XVI International Conference INPEC-2014 (International Network of Protein Engineering Centers) (St.Petersburg, Russia, 2014), International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications" (Istra, Russia, 2015), VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2015), 29th Annual Symposium of the Protein Society (Spain, Barcelona, 2015), 8th European Meeting on OxiZymes (Wageningen, The Netherlands, 2016), 3rd International Conference on the Pathophysiology of Staphylococci (Tübingen, Germany, 2016), V Съезд Биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back", (Jerusalem, Israel, 2017), 11th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications", (Istra, Russia, 2017), Третий Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике -2017 (МОБИ-ХимФарма2017), (Севастополь, Россия, 2017), International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology 2017 (ICONAN2017), (Barcelona, Spain, 2017).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы имеется 6 публикаций в журналах из списка Web of Science и Scopus, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ, а также 46 тезисов докладов конференций и 2 патента.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 140 страницах и содержит 45 рисунков, 19 таблиц и 169 ссылок.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

В данной работе представлены результаты экспериментов по повышению стабильности и улучшению кинетических параметров рекомбинантных формиадегидрогеназ из бактерий *Staphylococcus aureus* и сои *Glycine max* в клетках *E. coli* методом направленного мутагенеза.

### Клонирование гена формиадегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*

Геном бактерий *Staphylococcus aureus* на настоящий момент полностью отсекуен и находится в открытом доступе в общих генетических базах данных. Однако, ген SauFDH аннотируется разными авторами по-разному: в литературных данных существует два варианта этого фермента. Первый вариант гена SauFDH содержит 1125 нуклеотидов, а во втором варианте стартовый кодон SauFDH расположен на 99 нуклеотидов ниже по сравнению с первым, т.е. его суммарная длина составляет 1026 оснований. Далее в данной работе «длинный» и «укороченный» варианты гена SauFDH обозначаются saufdh1 и saufdh2 соответственно. Такое противоречие связано с особенностью аминокислотной последовательности SauFDH: участок первого варианта фермента, содержащий 33 аминокислотных остатка, проявляет гомологию с сигнальными пептидами формиадегидрогеназ из растений и дрожжей, в то время как второй вариант



одинаковые выходы целевого продукта в ходе культивирования. Однако предпочтительнее применять в качестве индуктора именно лактозу, поскольку она дешевле ИПТГ, а также её использование, как номинально более слабого индуктора, допускает одновременный рост клеток и экспрессию фермента.

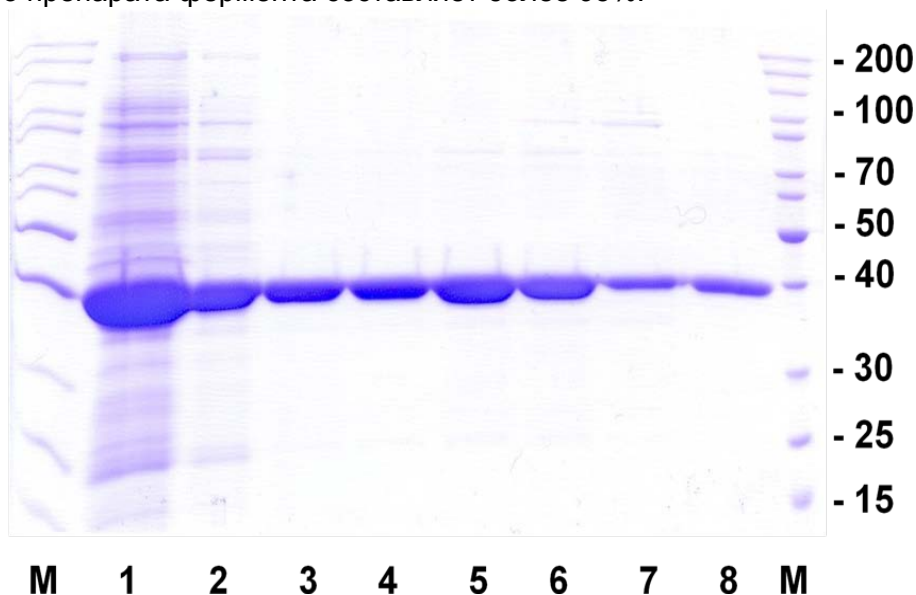
Результаты культивирования представлены в таблице 1. Как видно из полученных данных, полноразмерный вариант SauFDH синтезируется более чем в два раза эффективнее, что позволяет сделать косвенный вывод о том, какой фермент присутствует в бактериях *Staphylococcus aureus in vivo*.

**Таблица 1.**

Результаты культивирования полной и укороченной форм SauFDH при температуре 20°C

	<b>SauFDH1</b>	<b>SauFDH2</b>
<b>Активность, ед/л</b>	24000	11000
<b>Выход биомассы, г</b>	12	12
<b>Содержание фермента в клетках, ед/г</b>	2000	900
<b>Общий выход фермента, мг</b>	1200	550

Очистку SauFDH проводили по методике, ранее разработанной в нашей лаборатории и модифицированной с учетом свойств данного фермента. Эффективность очистки рекомбинантной формиатдегидрогеназы из бактерий *S. aureus* была проанализирована методом электрофореза. На рисунке 2 представлены результаты аналитического электрофореза препаратов SauFDH в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Из данного рисунка видно, что чистота полученного препарата фермента составляет более 95%.



**Рис. 2.** Аналитический электрофорез в ПААГ в присутствии SDS-На препаратов SauFDH1 после различных стадий очистки. 1 – суспензия клеток после ультразвуковой дезинтеграции, 2 – препарат после термообработки и фракционирования сульфатом аммония, 3, 4, 5, 6, 7 – стадии гидрофобной хроматографии, 8 – препарат SauFDH1 после обессоливания, М – маркер молекулярной массы, кДа.

### **Изучение свойств формиатдегидрогеназы из *S.aureus*.**



Для двух вариантов фермента (SauFDH1 и SauFDH2) были определены константы Михаэлиса в стандартных условиях (0,1 М NaPB, pH 7,0). Для длинного варианта полученные значения  $K_M$  составили  $220 \pm 10$  мкМ и  $130 \pm 10$  мМ по  $NAD^+$  и формиату соответственно. Для укороченного варианта аналогичные значения составили  $510 \pm 20$  мкМ и  $320 \pm 20$  мМ. Это самые высокие значения констант Михаэлиса как по  $NAD^+$ , так и по формиату среди всех известных на данный момент формиатдегидрогеназ.

Также была определена удельная активность (количество единиц активности на один мг белка) обоих вариантов фермента. Концентрацию фермента определяли методом Брэдфорда, при этом в качестве стандарта был использован гомогенный препарат фермента PseFDH, для которого известен коэффициент поглощения: поглощение раствора с концентрацией 1 мг/мл равно 1,6 ед. Величину каталитической константы определяли по формуле  $k_{cat} = A/c$ .

В таблице 2 представлены данные по  $K_M$  и  $k_{cat}$  для формиатдегидрогеназ из различных источников.

**Таблица 2.**

Сравнение величин  $K_M$ ,  $k_{cat}$ , а также каталитической эффективности для FDH из различных источников

Фермент	$K_M^{NAD^+}$ , мкМ	$K_M^{HCOO^-}$ , мМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	Каталитическая эффективность по $NAD^+$ , (мкМ*с) <sup>-1</sup>	Каталитическая эффективность по $HCOO^-$ , (мм*с) <sup>-1</sup>
SauFDH1	220 ± 10	130 ± 10	20	0,10	0,19
SauFDH2	510 ± 20	320 ± 20	12	0,025	0,038
AthFDH	50	2,8	3,8	0,08	1,36
SoyFDH	13,3	1,5	2,9	0,2	1,93
PseFDH	65	6,5	7,3	0,11	1,12
CboFDH	45	5,9	3,7	0,08	0,63
SceFDH	36	5,5	6,5	0,18	1,18
OpaFDH]	14	2	4,1	0,29	2,1

\* – каталитическая эффективность рассчитывалась по формуле  $k_{cat}/K_M$

Анализ представленных данных позволяет сделать несколько выводов. Во-первых, можно заключить, что «длинная» форма SauFDH1 более эффективна, чем «короткая» форма SauFDH2, поскольку для первой каталитическая константа выше, а константы Михаэлиса ниже. Кроме этого, сравнение данных свидетельствует о том, что SauFDH – не лучший фермент с точки зрения кинетических параметров. Его каталитические свойства очень сильно отличаются от свойств других ФДГ: константа Михаэлиса по  $NAD^+$  для SauFDH превышает данный показатель для ФДГ из других источников от 5 до 20 раз, а константа Михаэлиса по формиату – в 20 раз.

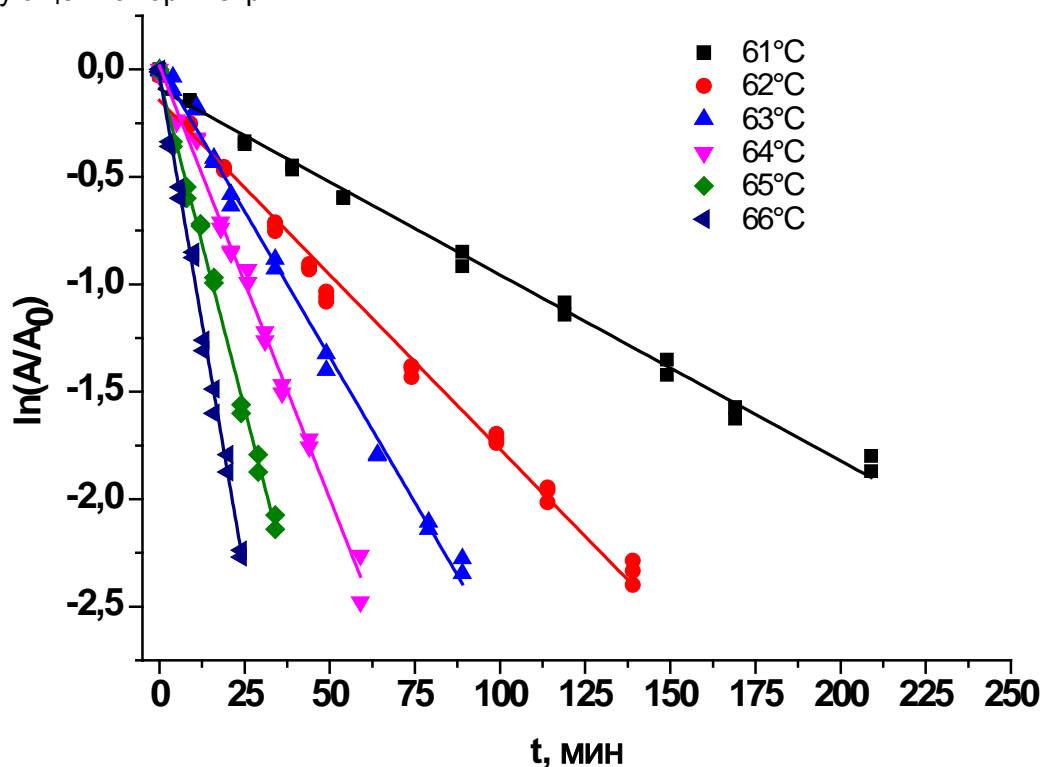
Однако каталитическая константа у SauFDH является максимальной среди известных ФДГ. С начала исследований данного фермента не было найдено более активной ФДГ: она превосходит  $k_{cat}$  PseFDH почти в 4 раза. Благодаря этому факту, каталитическая эффективность SauFDH по  $NAD^+$  находится на одном уровне с используемыми в производстве ферментами, в то время как каталитическая эффективность по формиату не является решающим фактором, поскольку в промышленных процессах используются насыщающие концентрации субстрата для смещения термодинамического равновесия реакции.

Такое большое значение  $k_{cat}$  также подтверждает теорию о том, что данный фермент в бактериях *S. aureus* является ключевым поставщиком энергии в условиях биопленок. Поскольку формиатдегидрогеназный путь регенерации NADH является

максимально эффективным среди путей метаболизма сахаров, он активируется только при условии истощения остальных субстратов, кроме формиата. В таком случае, поскольку клетка накопила большие количества формиата и  $\text{NAD}^+$ , ей необходимо быстро окислить формиат до конечного продукта любого пути метаболизма – углекислого газа, тем самым приобретая новую свободную энергию в виде  $\text{NADH}$ . Этим объясняются и высокие значения констант Михаэлиса – данный энергетический путь не должен функционировать до истощения других путей метаболизма.

Одной из главных отличительных черт исследуемого фермента SauFDH является его высокая температурная стабильность. Обладая информацией относительно данного параметра, возможно сделать какие-либо выводы о роли этого фермента в жизнедеятельности клетки, а также о его применимости в биотехнологии. Ярким примером такого использования ФДГ является фермент из дрожжей *C. boidini*, который применяется фирмой Evonik Degussa в процессе промышленного синтеза *tert*-L-лейцина. Повышение термостабильности SboFDH относительно природного фермента производства. Кроме того, как уже было указано в разделе 4.3, данные о термостабильности фермента помогают оптимизировать его очистку.

Исходя из всего вышесказанного, логичным продолжением исследования свойств фермента стало изучение температурной стабильности SauFDH. Исследование проводилось с помощью двух методов: кинетики инактивации и дифференциальной сканирующей калориметрии.



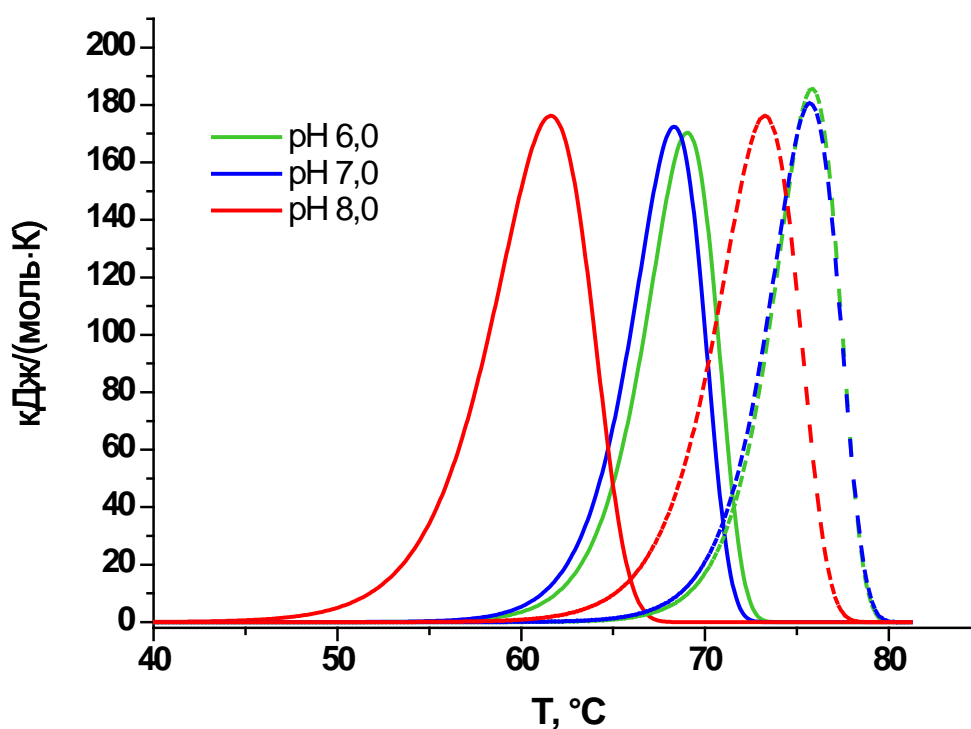
**Рис. 3.** График зависимости остаточной активности от температуры при различных температурах в полулогарифмических координатах. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0

Полученные данные необходимо сравнивать с уже имеющимися литературными сведениями о других ферментах. Поэтому измерения было решено проводить в стандартных для этого эксперимента условиях – при pH 7,0. На рисунке 3 представлены зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени при различных температурах в таких условиях.

Из рисунка 3 видно, что зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени, полученные при различных температурах были линейны в полулогарифмических координатах ( $\ln(A/A_0) - t$ ), т.е. сам процесс температурной инактивации описывается кинетикой реакций первого порядка. Из тангенса угла наклона прямых рассчитывается константа скорости инактивации  $k_{in}$ . Было показано, что изменение концентрации фермента в диапазоне 0,1-2 мг/мл не влияет на величину  $k_{in}$ , что подтверждает тот факт, что температурная инактивация SauFDH является истинно мономолекулярным процессом. Это свидетельствует, о том, что разворачивание белковой глобулы при температурном воздействии происходит без предварительной диссоциации димерной молекулы фермента на отдельные субъединицы.

Характерно, что такой результат был получен и для всех других изученных формиадегидрогеназ, за исключением формиадегидрогеназы из пекарских дрожжей *S.cerevisiae*.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии была исследована зависимость температурной зависимости SauFDH от pH и от добавления кофермента и конкурентного ингибитора по субстрату азида: данные свидетельствуют о том, что тройной комплекс  $[FDH+NAD^++N_3^-]$  обладает большей стабильностью при нагревании по сравнению с чистым ферментом. Кривые плавления представлены на рис 4.

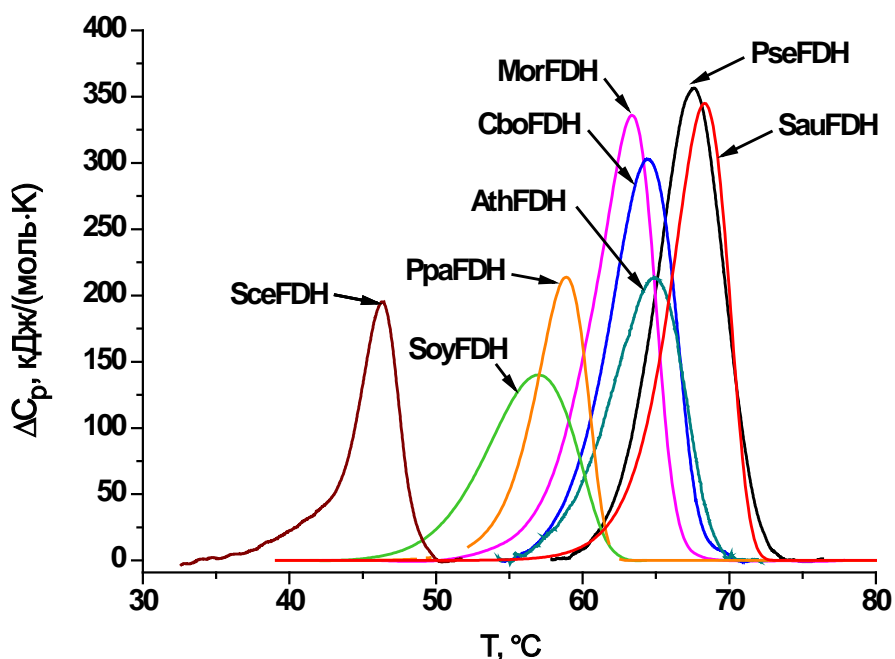


**Рис. 4.** Кривые плавления апо-SauFDH (непрерывная линия) и тройного комплекса  $[SauFDH+NAD^++N_3^-]$  (пунктирная линия), полученные с помощью ДСК. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 6,0; 7,0; 0,1 М Tris-HCl, pH8,0. Концентрация ферментов 1 мг/мл.

Результаты эксперимента показали, что при повышении pH от 6,0 до 8,0 происходит уменьшение стабильности данного фермента. Кроме того, было изучено влияние связывания фермента с коферментом и ингибитором на температурную стабильность. Как видно из рис. 4, во всех изученных pH тройной комплекс  $[SauFDH+NAD^++N_3^-]$  является более стабильным, чем апо-фермент, что, по-видимому, объясняется переходом белковой глобулы в «закрытую» конформацию и последующей компактизацией структуры. Наибольший эффект стабилизации достигается при pH 8,0, поскольку при таком pH апо-фермент наименее стабилен, а добавление  $NAD^+$  и азида

приводит к максимальному увеличению стабильности, в то время как при pH 6,0 и 7,0 показатели  $T_{max}$  практически не различаются.

На рисунке 5 для сравнения приведены данные ДСК для ферментов из различных природных источников, в том числе – и наиболее температурно-стабильной ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH). Из графика видно, что фермент SauFDH даже немного превосходит PseFDH по температурной стабильности и является одной из наиболее термостабильных ФДГ.



**Рис. 5.** Кривые плавления формиатдегидрогеназ из различных источников. Натрий-фосфатный буфер 0,1 М, pH 7,0. Концентрация ферментов 1 мг/мл.

В таблице 3 представлены значения температуры максимума кривых плавления для различных FDH. Эти данные также подтверждают тот факт, что по термостабильности SauFDH превышает большинство изученных формиатдегидрогеназ.

**Таблица 3.** Значения температуры плавления для формиатдегидрогеназ из различных источников.

Фермент	$T_{max}$
PseFDH GAV	68,9
SauFDH	68,3
PseFDH	67,6
CboFDH	64,4
AthFDH	64,9
MorFDH	63,4
PpaFDH	59,3
SceFDH	46,4
SoyFDH	57,0
OpaFDH	65,4

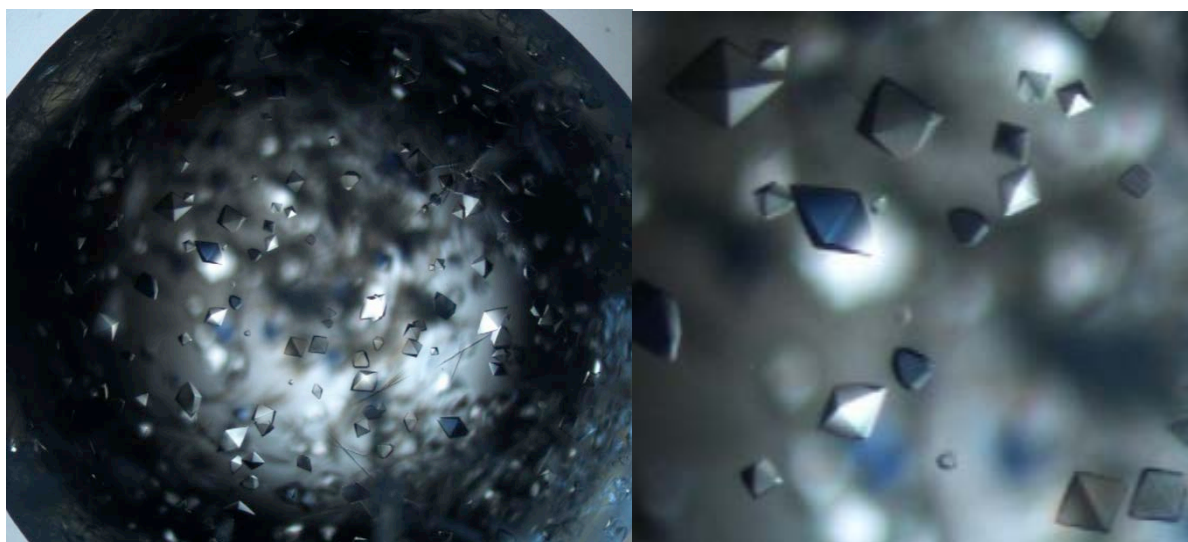
### Кристаллизация формиатдегидрогеназы из *S.aureus*.

С точки зрения биотехнологии SauFDH обладает выдающимися параметрами: самое высокое значение каталитической константы среди всех известных на настоящее время формиатдегидрогеназ и высокая температурная и химическая стабильность

делают этот фермент перспективным для разработки биокаталитических систем, направленных на регенерацию NADH. Однако, принимая во внимание его высокие значения констант Михаэлиса, необходимо улучшить эти параметры. В нашей лаборатории для этих целей применяется метод рационального дизайна, основанный на введении аминокислотных замен в определенных положениях белковой глобулы. Для выбора таких положений необходимо обладать данными о трехмерной структуре фермента. Поэтому, следующим этапом данной работы стали эксперименты по кристаллизации SauFDH, решению трехмерной структуры фермента и ее анализу.

Для получения кристаллов использовался метод висячей капли. При подборе условий варьировали такие параметры, как концентрация и тип осаждающего агента, температура и время кристаллизации. Работы по кристаллизации и решению структуры кристаллов проводились в НИЦ «Курчатовский институт» совместно с к.б.н. К.М. Бойко.

В результате были получены кристаллы фермента SauFDH, размером (0,2x0,2x0,3) мм соответственно (рисунок 6). Условия кристаллизации, при которых был получен кристалл: 16°C, состав буфера – 200 мМ ацетат кальция, pH 7,0 + 25% ПЭГ 3350. В таблице 4 приведены характеристики структуры полученного кристалла SauFDH.



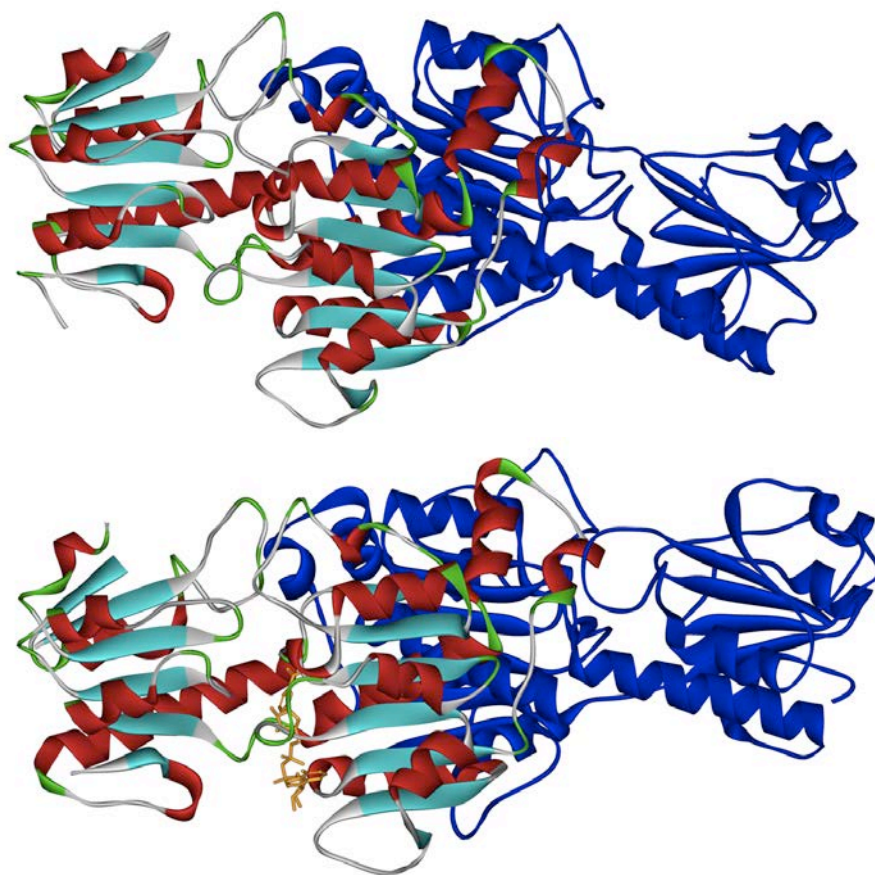
**Рис. 6.** Фотография кристаллов SauFDH

**Таблица 4.**

Характеристики структуры кристалла SauFDH.

Пространственная группа	P 43 21 2
Параметры ячейки, Å	
a	116,910
b	116,910
c	186,770
$\alpha, \beta, \gamma$	90
Разрешение	1,8 Å
$R_f$	16,3%
$R_{free}$	20,7%

На рис. 7 приведены трехмерные структуры апо- и холо- форм SauFDH, соответственно. По этим структурам было проведено моделирование мутантных форм, описанное в следующей главе.



**Рис. 7.** Структура апо-формы SauFDH (сверху), разрешение 1,8Å, и структура холо-формы SauFDH (снизу), разрешение 2,5 Å.

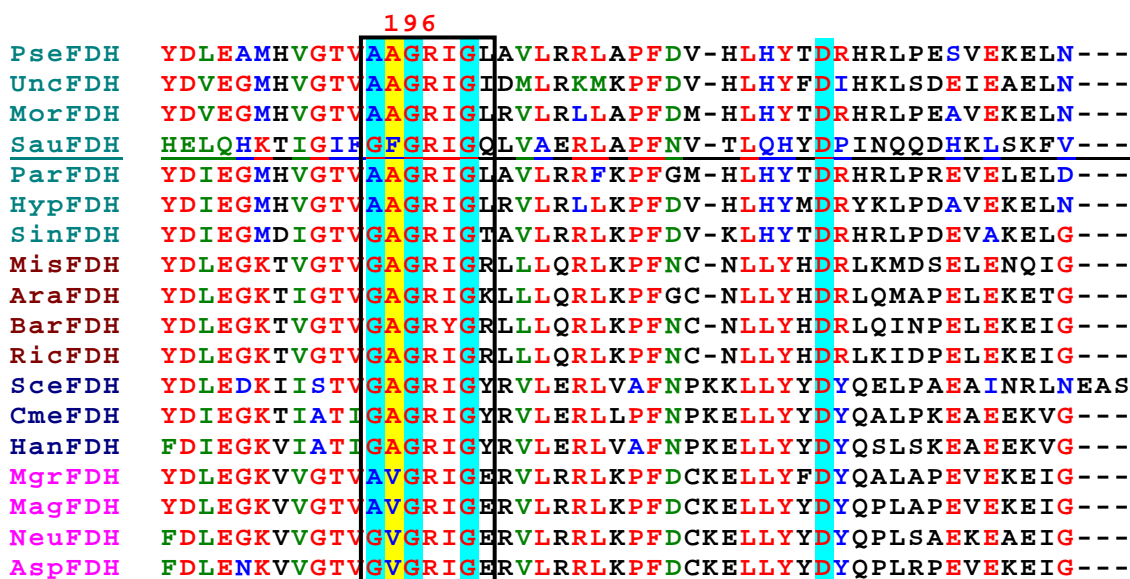
### **Направленный мутагенез ФДГ из бактерий *S.aureus* и сои *G.max*.**

Формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* и сои *Glycine max* привлекли наше внимание, поскольку первая обладает чрезвычайно высокой температурной стабильностью и наибольшей каталитической константой среди всех описанных FDH, а вторая обладает минимальными значениями констант Михаэлиса как по коферменту, так и по формиату. С точки зрения применения в качестве биокатализаторов оба этих фермента крайне перспективны, однако также обладают значительными недостатками. В случае бактериальной FDH – это максимальные известные значения обеих констант Михаэлиса, а у растительной FDH – низкая температурная стабильность.

Для получения систематических данных о взаимосвязи структуры, стабильности и активности различных FDH нами был проведен подробный анализ известных на данный момент трехмерных структур, а также сравнительный анализ большого количества аминокислотных последовательностей FDH из различных организмов. Такой перекрестный анализ показал, что с точки зрения третичной структуры ферменты проявляют высокую степень гомологии с другими известными FDH, однако при более детальном анализе аминокислотных последовательностей оказалось, что в ферменте из бактерий *Staphylococcus aureus* в некоторых каталитически важных положениях аминокислотные остатки отличаются по сравнению с другими FDH.

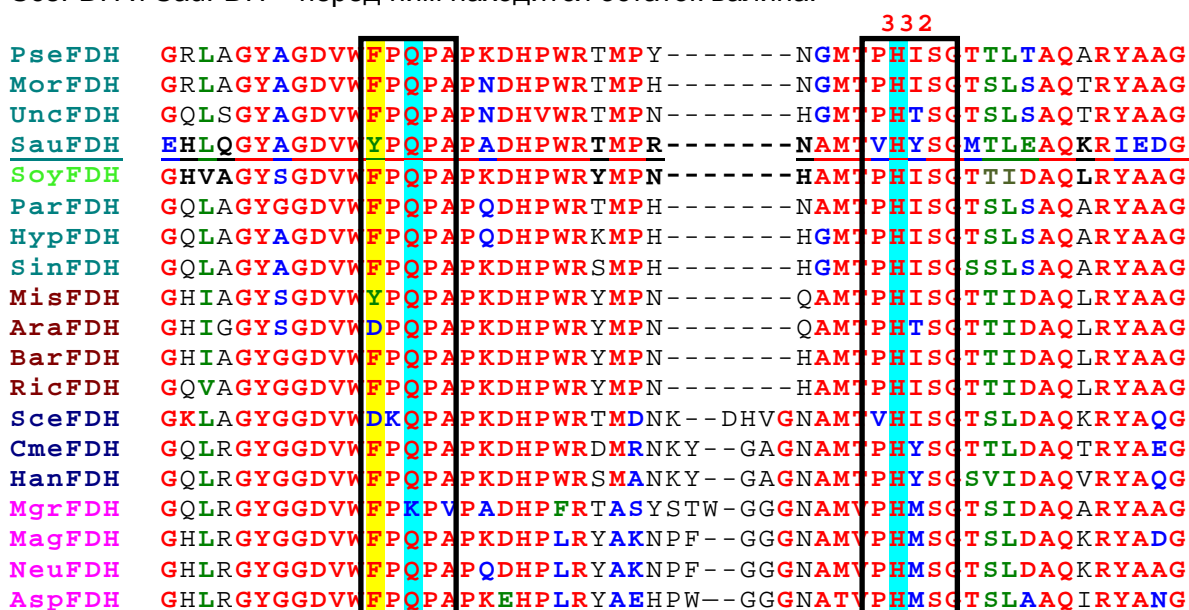
На основании выравнивания аминокислотных последовательностей FDH из различных источников и компьютерного моделирования для замены было выбрано несколько остатков. На рис. 8.1. показан фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей FDH из различных источников, а также выделен консервативный

для всех оксидаз мотив GXGXXG. Из данного рисунка видно, что в положении 196 (выделено желтым цветом) у всех ферментов, кроме SauFDH, присутствуют остатки малого объема – аланин или валин, в то время как у SauFDH в данном положении находится объемный гидрофобный остаток фенилаланина.



**Рис. 8.1.** Участок выравнивания аминокислотных последовательностей FDH из различных источников с выделенным консервативным мотивом GXGXXG

На рис. 8.2. также показан фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей FDH, на котором выделены два фрагмента: первый – это консервативный фрагмент PQP, а второй – консервативный остаток гистидина His332 (нумерация по FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101). В случае последнего из рисунка видно, что в подавляющем большинстве случаев перед ним расположен остаток пролина, поддерживающий ориентацию остатка гистидина в пространстве. Только в двух случаях – SceFDH и SauFDH – перед ним находится остаток валина.



**Рис. 8.2.** Участок выравнивания аминокислотных последовательностей FDH из различных источников с выделенными консервативными участками XPQP и участком в районе консервативного остатка His332 (нумерация по SauFDH, соответствует PseFDH His332).

В случае консервативного мотива PQP, интерес вызывает остаток, предшествующий данному фрагменту: на рисунках 8.2 и 9 видно, что в различных ферментах на этой позиции встречаются такие остатки, как фенилаланин, тирозин, аспарагин и аспарагиновая кислота. Данный остаток находится на поверхности белковой глобулы у входа в активный центр, что дает основания полагать, что он может частично экранировать активный центр и затруднять вход в него кофермента.

	290
StuFDH	IAGYSGDVWY <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
LesFDH	IAGYSGDVWY <b>PQP</b> APKDHLWRYMPN
CclFDH	IAGYSGDVWNP <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
PtmFDH	IGGYSGDVWNP <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
PtrFDH	IGGYSGDVWNP <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
MdoFDH	IAGYSGDVWNP <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
PpeFDH	IAGYSGDVWNP <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
HvuFDH	IAGYGGDVWF <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
TaeFDH	IAGYGGDVWF <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
ZmaFDH	IAGYGGDVWF <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
SoyFDH	VAGYGGDVWF <b>PQP</b> APKDHPWRYMPN
BnaFDH	IGGYSGDVW <b>DPQP</b> APKDHPWRYMPN
BolFDH	IGGYSGDVW <b>DPQP</b> APKDHPWRYMPN
AthFDH	IGGYSGDVW <b>DPQP</b> APKDHPWRYMPN
PsiFDH	IGGYSGDVWF <b>PQP</b> APKDHPWRSMPN
PpiFDH	IGGYSGDVWF <b>PQP</b> APKDHPWRSMPN
PpaFDH	LGGYGGDVW <b>NAQP</b> AGKDHPWRYMPN

**Рис. 9.** Выравнивание аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из растений: StuFDH – из картофеля *Solanum tuberosum*, LesFDH – из томатов *Lycopersicon esculentum*, CclFDH – из клементина *Citrus clementina*, PtmFDH – из осины *Populus tremula*, PtrFDH – из тополя *Populus trichocarpa*, MdoFDH – из яблока *Malus domestica*, PpeFDH – из персика *Prunus persica*, HvuFDH – из ячменя *Hordeum vulgare*, TaeFDH – из пшеницы *Triticum aestivum*, ZmaFDH – из кукурузы *Zea mays*, AthFDH – из резуховидки *Arabidopsis thaliana*, SoyFDH – из сои *Glycine max*, BnaFDH – из рапса *Brassica napus*, BolFDH – из капусты *Brassica oleracea*, из ели *Picea sitchensis*, из сосны *Pinus pinaster*, PpaFDH – из мха *Physcomitrella patens*.

Таким образом, было выбрано несколько позиций для проведения направленного мутагенеза и запланировано введение следующих аминокислотных замен: для SauFDH это Phe196Ala, Val323Pro, а также Tyr303Ala, Tyr303Phe и Tyr 303Gln (во всех случаях нумерация по SauFDH); для SoyFDH это Phe290Ala, Phe290Tyr, Phe290Gln, Phe290Glu и Phe290Thr (во всех случаях нумерация по SoyFDH).

**Таблица 5.**

Кинетические параметры полученных мутантных форм в сравнении с ферментом дикого типа, 0,1 М Натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

	$K_M^{NAD^+}$ , мкМ	$K_M^{formate}$ , мМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$	$k_{cat}/K_M^{formate}$
wt-SauFDH	252 ± 7	130 ± 10	20	0,08	0,15
SauFDH V323P	211 ± 9	107 ± 6	18	0,09	0,17
SauFDH Y303F	244 ± 8	109 ± 8	20	0,08	0,18
SauFDH Y303A	245 ± 10	160 ± 9	18	0,07	0,11
SauFDH Y303Q	1152 ± 26	434 ± 15	10	0,009	0,02
SauFDH F196A	1300 ± 49	156 ± 6	10	0,008	0,06

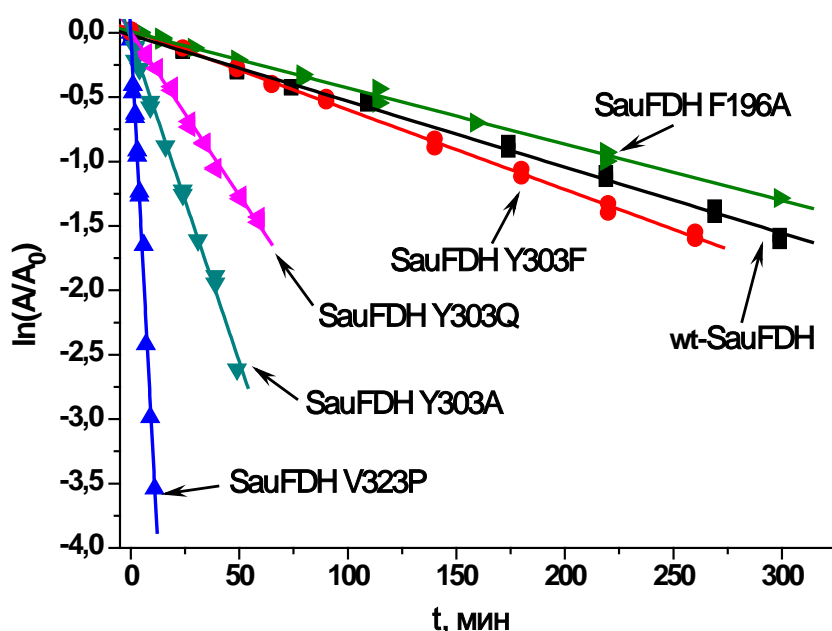
Все мутантные FDH и фермент дикого типа были экспрессированы в клетках *E.coli* и получены в активной и растворимой форме. При культивировании всех ферментов



наблюдался близкий выход биомассы, однако в среднем уровень экспрессии мутантных белков был несколько ниже, чем FDH дикого типа.

Данные о кинетических параметрах полученных мутантных форм SauFDH представлены в таблице 5. Как видно из таблицы, во всех случаях, кроме замены SauFDH V323P не наблюдается заметного улучшения  $K_M$  как по коферменту, так и по субстрату. Резкое увеличение значения  $K_M$  по  $NAD^+$  в случае SauFDH F196A предположительно объясняется слишком большим структурным различием в кофермент-связывающем домене при замене остатка фенилаланина на остаток аланина.

Температурная стабильность мутантных форм SauFDH изучалась по кинетике термоинактивации и представлена на рис. 10. Как видно из него, замена SauFDH V323P привела к критическому ухудшению стабильности, что связано со слишком сильными структурными изменениями, вызванными введением остатка пролина. В то же время температурная стабильность самого неблагоприятного с точки зрения кинетических параметров мутанта SauFDH F196A даже превосходит термостабильность фермента дикого типа.



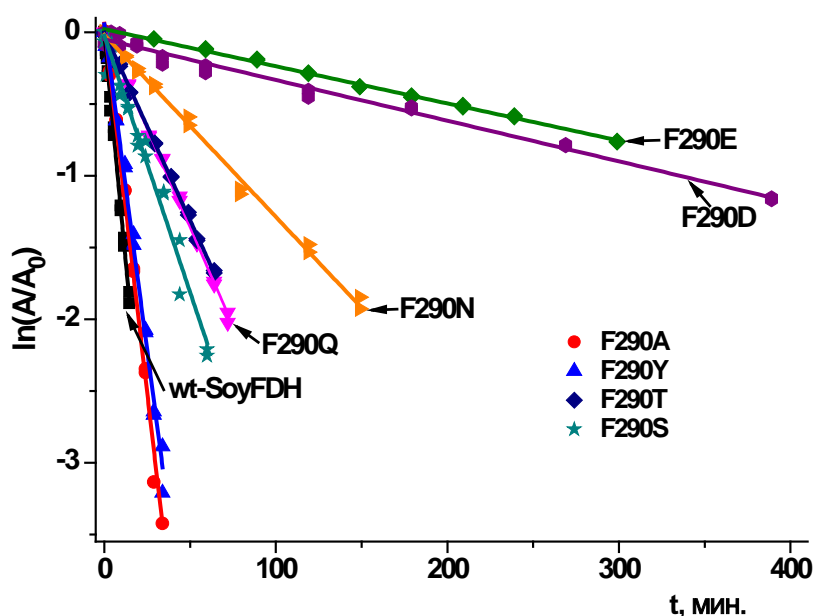
**Рис. 10.** Зависимость остаточной активности мутантов и дикого типа SauFDH от времени в координатах  $\ln(A/A_0) - t$ , 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60°C.

**Таблица 7.**

Кинетические свойства полученных мутантных форм иатдегидрогеназ. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, 0,01М ЭДТА, pH 7,0

	$K_M^{NAD^+}$ , мкМ	$K_M^{formate}$ , мМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$	$k_{cat}/K_M^{formate}$
wt-SoyFDH	13,3±0,8	1,5±0,1	2,9±0,1	0,22	1,93
SoyFDH F290A	8,6±0,6	1,1±0,1	3,8±0,1	0,44	3,45
SoyFDH F290Y	10,9±0,3	0,9±0,1	3,5±0,1	0,32	3,89
SoyFDH F290Q	11,7±0,6	1,2±0,1	3,5±0,2	0,29	2,92
SoyFDH F290E	13,7±0,7	2,9±0,1	4,7±0,4	0,34	1,62
SoyFDH F290T	14,3±0,9	1,3±0,1	4,0±0,4	0,28	3,08
SoyFDH F290N*	14,0±1,0	4,5±0,3	2,8±0,1	0,20	0,62
SoyFDH F290D*	12,8±0,8	5,0±0,2	5,1±0,3	0,40	1,02
SoyFDH F290S*	9,1±0,7	4,1±0,3	4,1±0,2	0,45	1,00

Кинетические параметры полученных мутантных форм SoyFDH представлены в таблице 7. Из нее видно, что все замены, кроме F290E, F290T и F290N, привели к уменьшению значения константы Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$ . Также ни одна замена, за исключением F290E и трех мутантов из предыдущих работ нашей лаборатории (в таблице выделены серым), не привела к заметному ухудшению  $K_m^{\text{HCOO}^-}$ , а в некоторых случаях отмечалось даже уменьшение этого параметра. В то же время каталитическая константа во всех случаях выросла – от 20% до 60%. Таким образом, ухудшение констант Михаэлиса не существенно, поскольку каталитическая эффективность по коферменту улучшилась во всех случаях, а по ухудшению ее по формиату не влияет на перспективу использования фермента в биотехнологических процессах, поскольку используемые в них концентрации формиата (около 2-3М) значительно больше полученных значений.



**Рис. 11.** Зависимость остаточной активности мутантов SoyFDH и дикого типа при 56°C, 0,1М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

Как видно из рис. 11, все полученные мутантные формы продемонстрировали более высокую температурную стабильность, чем фермент дикого типа. Для мутантной формы F290E отмечено максимальное из всех описанных улучшение – это подтверждает теорию о том, что введение в 290 положение гидрофильного остатка положительно влияет на свойства SoyFDH.

В заключении данного раздела хочется отметить, что данная работа продемонстрировала, что рациональный дизайн является эффективным методом как для изучения структурно-функциональных взаимосвязей в белках, так и для получения мутантных форм ферментов с улучшенными и оптимизированными свойствами для целей биотехнологии.

## ВЫВОДЫ

1. Проведено клонирование двух вариантов гена форматдегидрогеназы из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и получены рекомбинантные ферменты в активной и растворимой форме. Проведена оптимизация культивирования и очистки. Выход фермента составил более 1 г с литра среды.
2. Определены каталитические параметры рекомбинантных SauFDH –  $K_M$  по субстрату и коферменту при нескольких значениях pH, каталитическая константа. Показано, что наилучшими параметрами обладает "длинный" вариант SauFDH, которая по сравнению с "укороченным" вариантом имеет как лучшие значения обеих констант Михаэлиса, так и в два раза более высокую каталитическую константу. Величин  $k_{cat}$   $20 \text{ c}^{-1}$  выделенной SauFDH является самой высокой (минимум в 2,7 раза) по сравнению со всеми описанными ФДГ. Изучено ингибирование SauFDH неорганическими ионами и установлено, что наилучшим конкурентным по формату ингибитором является азид-ион.
3. Подобраны условия кристаллизации фермента, получены кристаллы апо-фермента и тройного комплекса  $[\text{SauFDH-NAD}^+\text{-N}_3^-]$ , для которых решена структура с разрешением 1,8 Å и 2,5 Å соответственно. Создана основа для направленного поиска новых препаратов для борьбы с биопленками *S.aureus*.
4. Изучена роль остатка F196A в консервативном мотиве ФДГ GXGXXG, показано, что нахождение у SauFDH в данном положении нехарактерного остатка фенилаланина оправдано поддержанием структуры активного центра, а его изменение приводит к ухудшению связывания  $\text{NAD}^+$ . Изучена роль остатка V323, показана важность данного остатка в температурной стабильности SauFDH. Различие полученных данными с результатами той же замены V323P в ФДГ из пекарских дрожжей SceFDH подчеркивает наличие различий в структуре активного центра SauFDH по сравнению с другими ФДГ.
5. Изучена роль структурно эквивалентного остатка F290/Y303 в функции форматдегидрогеназ из сои и бактерий *S.aureus*. Показано, что, несмотря на структурное сходство и большую гомологию, направленный мутагенез в данном положении приводит к кардинально разным результатам.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Alekseeva A.A., **Kargov I.S.**, Kleimenov S.Yu, Savin S.S., Tishkov V.I. Additivity of the Stabilization Effect of Single Amino Acid Substitutions in Triple Mutants of Recombinant Formate Dehydrogenase from the Soybean *Glycine max*. *Acta Naturae*, 2015, т. 7, № 3(26), с. 55-64.
2. **Kargov I.S.**, Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2015, т. 28, № 6, с. 171-178.
3. Alekseeva A.A., Serenko A.A., **Kargov I.S.**, Savin S.S., Kleymenov S.Yu, Tishkov V.I. Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2012, т. 25, № 11, с. 781-788.
4. Alekseeva A., Dolina I., **Kargov I.**, Savin S., Tishkov V. Genetic engineering of new formate dehydrogenases for cofactor regeneration. *Protein Science*, 2015, т. 24, № S1, с. 174-175.
5. Пометун А.А., Зарубина С.А., Паршин П.А., **Каргов И.С.**, Савин С.С., Тишков В.И. Новые форматдегидрогеназы: взаимосвязь структура-функция. *Acta Naturae*, 2016, т. S2, с. 33-34.
6. Тишков В.И., Пометун А.А., Зарубина С.А., **Каргов И.С.**, Виролайнен Т.С., Атрошенко Д.Л., Комарова Н.В., Голубев И.В., Хушпульян Д.М., Захарова Г.С., Чубарь Т.А., Газарян И.Г.,

- D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Савин С.С. Структурно-функциональные исследования оксидоредуктаз. *Acta Naturae*, 2016, т. S2, с. 34.
7. Alekseeva A.A., **Kargov I.S.**, Zarubina S.A., Savin S.S., Pometun E.V., Kleimenov S.Y., Tishkov V.I. Management of properties and stability of recombinant formate dehydrogenase from soya *Glycine max* by single-point mutation. *FEBS Journal*, 2013, т. 280, № S1, с. 172-173.
  8. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Serov A.E., **Kargov I.S.**, Skirgello O.E., Zarubina S.A., Kuranova I.P., Polyakov K.M., Shabalin I.G., Popov V.O., Savin S.S. Plant formate dehydrogenase: structure – function studies. *FEBS Journal*, 2013, т. 280, № S1, с. 192.
  9. Pometun A., Zarubina S.A., **Kargov I.S.**, Serov A.E., Parshin P.D., Savin S.S., Tishkov V.I. Role of residues in conserved sequence region in formate dehydrogenases from different sources. *FEBS Journal*, 2017, v. 284, № S1, p. 213.
  10. Veselov M., Efremova M., Majouga A., Uporov I., **Kargov I.**, Tishkov V., Golovin Yu., Klyachko N. Changing enzyme kinetic parameters of chymotrypsin and NAD-depended formate dehydrogenase under low-frequency magnetic field. Book of abstracts of the International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology 2017 (ICONAN2017), Barcelona, Spain
  11. Pometun A., Zarubina S.A., Kargov I.S., Serov A.E., Parshin P.D., Savin S.S., Tishkov V.I. Role of residues in conserved sequence region in formate dehydrogenases from different sources. *FEBS Journal*, 2017, v.284, N S1, p. 213-213
  12. **Kargov I.S.**, Pometun A.A., Zarubina S.A., Parshin P.D., Kovalevski R.P., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S., Tishkov V.I. Activity and stability of formate dehydrogenases in ionic liquids. Abstracts of 11th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra, June 25-30, 2017. – Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd, 2017, ISBN 978-5-9500292-3-3, p. 164
  13. Pometun A.A., Zarubina S.A., **Kargov I.S.**, Parshin P.D., Savin S.S., Tishkov V.I. New Formate Dehydrogenases. Abstracts of 11th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra, June 25-30, 2017. – Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd, 2017, ISBN 978-5-9500292-3-3, p. 59
  14. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., **Kargov I.S.**, Atroshenko D.L., Parshin P.D., Kovalevski R.P., Fedorchuk E.A., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Urlacher V.B., Savin S.S. Rational design of practically important enzymes. Abstracts of 11-th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra, June 25-30, 2017. – Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd, 2017, ISBN 978-5-9500292-3-3, p. 27
  15. Virolainen T., **Kargov I.S.**, Pometun A.A., Tishkov V.I. Study of catalytic properties of mutant formate dehydrogenases from the bacterium *Staphylococcus aureus*. Abstracts of 11th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra, June 25-30, 2017. – Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd, 2017, ISBN 978-5-9500292-3-3, p. 21
  16. Тишков В.И., Пометун А.А., Степашкина А.В., **Каргов И.С.**, Зарубина С.А., Атрошенко Д.Л., Паршин П.Д., Ковалевский Р.П., Виrolайнен Т.С., Авданина Д.А., Лобанова Е.А., Жгун А.А., Эльдаров М.А., Чубарь Т.А., Бойко К., Федорчук Е.А., Федорчук В.В., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Савин С.С. “Новые и улучшенные биокатализаторы для синтеза лекарств и медицинской диагностики”. Сборник тезисов докладов Третьего Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2017 под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. – М. : «Перо», 2017, с. 68. ISBN 978-5-906961-26-6
  17. Veselov M.M., Efremova M.V., Majouga A.G., Uporov I.V., **Kargov I.S.**, Tishkov V.I., Golovin Yu.I., Klyachko N.L. Nanomechanical approach for changing activity and properties of chymotrypsin and formate dehydrogenase, immobilized on single-domain magnetite@gold nanoparticles via low-frequency magnetic field. Book of abstracts of the 8th International conference "Biomaterials and nanobiomaterials: recent advances safety-toxicology and ecology issues" including Russian-Hellenic workshop and school of young scientists, 2017, Ираклион, Греция
  18. Tishkov V., Pometun A., Zarubina S., **Kargov I.**, Virolinen T., Parshin P., Savin S. New formate dehydrogenases with increased activity and stability for coenzyme regeneration.

- Program and Abstract of 22nd International Conference "IINPEC-2016" (International Network of Protein Engineering Centers). Daejeon, Republic of Korea, 2016, November 6-10, p. 15.
19. Зарубина С.А., **Каргов И.С.**, Виролайнен Т.С., Паршин П.Д., Тишков В.И., Савин С.С., Пометун А.А. Структурные исследования растительных форматдегидрогеназ. Материалы XVI Международной конференции молодых учёных "Леса Евразии – 2016. Жемчужина Тянь-Шаня". 2016, Бишкек, Кыргызстан
  20. Пометун (Алексеева) А.А., Зарубина С.А., Паршин П.А., **Каргов И.С.**, Савин С.С., Тишков В.И. Новые форматдегидрогеназы: взаимосвязь структура-функция. Материалы конференции V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, 2016, Сочи, Россия
  21. Тишков В.И., Пометун (Алексеева) А.А., Зарубина С.А., **Каргов И.С.**, Виролайнен Т.С., Атрошенко Д.Л., Комарова Н.В., Голубев И.В., Хушпульян Д.М., Захарова Г.С., Чубарь Т.А., Газарян И.Г., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Савин С.С. Структурно-функциональные исследования оксидоредуктаз. Материалы конференции V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, 2016, Сочи, Россия
  22. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Atroshenko D.L., Zarubina S.A., Savina L.I., Fedorchuk V.V., **Kargov I.S.**, Fedorchuk E.A., Chubar T.A., Secundo F., Savin S.S. New and improved biocatalysts for synthesis of drugs and chiral compounds. Book of abstracts of the XX Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, 2016, Екатеринбург, Россия
  23. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Atroshenko D.L., Zarubina S.A., **Kargov I.S.**, Fedorchuk V.V., Chubar T.A., Savin S.S. Properties and rational design of oxidoreductases. Book of abstracts of the XX Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, 2016, Екатеринбург, Россия
  24. **Каргов И.С.**, Алексеева А.А., Тишков В.И. Рациональный дизайн форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. Материалы XXIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», 2016, Москва, Россия
  25. **Kargov I.**, Alekseeva A., Tishkov V. *Staphylococcus aureus* biofilm starring formate dehydrogenase. Book of abstracts of the 3rd International Conference on the Pathophysiology of Staphylococci. 2016. Tübingen, Germany
  26. **Kargov I.S.**, Alekseeva A.A., Boiko K.M., Savin S.S., Tishkov V.I. New highly stable and active recombinant formate dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. Book of abstracts of the 8th European Meeting on OxiZymes, 2016, Wageningen, The Netherlands
  27. Veselov M.M., Efremova M.V., Majouga A.G., Uporov I.V., **Kargov I.S.**, Tishkov V.I., Golovin Yu.I., Klyachko N.L. Nanomechanical Approach For Changing Coenzymatic Specificity Of Nad-Depended Formatedehydrogenase, Immobilized On Magnetite@Gold Nanoparticles, Under Low-Frequency Magnetic Field. Book of abstracts of the 7th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues" Including Russian-Hellenic Workshop and School of Young Scientists, 2016, Ираклион, Греция
  28. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., **Kargov I.S.**, Dolina I.A., Virolainen T.S., Savin S.S. Formate dehydrogenase is a key enzyme of plant stress. Book of abstracts of the XV International Conference of Young Scientists "Forests of Eurasia – Great Altai", 2015, Барнаул, Горно-Алтайск, Россия
  29. Alekseeva A.A., Dolina I.A., **Kargov I.S.**, Savin S.S., Tishkov V.I. Genetic engineering of new formate dehydrogenases for cofactor regeneration. Book of abstracts of the 29th Annual Symposium of the Protein Society. 2015, Barselona, Spain
  30. **Kargov I.S.**, Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. Formate dehydrogenase from *Staphylococcus aureus* – unusual enzyme in FDH family. Book of abstracts of the International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", 2015, Moscow region, Istra, Russia
  31. Alekseeva A.A., Dolina I.A., **Kargov I.S.**, Savin S.S., Tishkov V.I. Formate dehydrogenases from eukaryotes. Book of abstracts of the International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", 2015, Moscow region, Istra, Russia
  32. Тишков В.И., Алексеева А.А., Голубев И.В., Федорчук В.В., **Каргов И.С.**, Зарубина С.А., Долина И.А., Атрошенко Д.Л., Захарова Г.С., Полозников А.А., Виролайнен Т.С., Ковалевский Р.П., Степашкина А.В., Чубарь Т.А., Упоров И.В., Скляренко А.В., Яроцкий С.В., Савин С.С. Рациональный дизайн ферментов для биотехнологии. Материалы VIII

Московского международного конгресса «Биотехнология: Состояние и перспективы развития», 2015, Москва, Россия

33. **Каргов И.С.**, Алексеева А.А., Тишков В.И. Изучение каталитических свойств мутантных форматдегидрогеназ из бактерий *Staphylococcus aureus*. Материалы XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», 2015, Москва, Россия
34. **Kargov I.S.**, Voinova N.S., Alekseeva A.A., Tishkov V.I. Inhibition analysis of formate dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. Book of abstracts of the International Conference "OxiZymes", 2014, Vienna, Austria
35. **Kargov I.S.**, Alekseeva A.A., Tishkov V.I. New biocatalysts for biotechnologies: high thermally stable formate dehydrogenase from bacterium *Staphylococcus aureus*. Book of abstracts of the International BioPhorum 2014, Pushino on Oka, Moscow region, Russian Federation
36. Alekseeva A.A., Kovalevsky R.P., Savin S.S., **Kargov I.S.**, Tishkov V.I. New insights into formate dehydrogenase structure-function relationship and application. Book of abstracts of the International BioPhorum 2014, Pushino on Oka, Moscow region, Russian Federation
37. **Kargov I.S.**, Voinova N.S., Kovalevsky R.P., Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. New stable formate dehydrogenase from bacterium *Staphylococcus aureus*. Book of abstracts of the 10th International Conference on Protein Stability "ProStab2014", 2014, Stresa, Italy
38. Tishkov V.I., Voinova N.S., **Kargov I.S.**, Kovalevsky R.P., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Polyakov K.M., Boiko K., Popov V.O., Alekseeva A.A. Plant formate dehydrogenases: expression, characterization, structure and protein engineering. Book of abstracts of the International Conference "OxiZymes", 2014, Vienna, Austria
39. **Kargov I.S.**, Alekseeva A.A., Tishkov V.I. Residue Phe290 – role in stability and catalytic activity of soya formate dehydrogenase. Book of abstracts of the International Conference "INPEC-2014", 2014, Zelenogorsk, St.Petersburg region, Russia
40. Alekseeva A.A., Kovalevsky R.P., **Kargov I.S.**, Savin S.S., Kleimenov S.Yu, Pometun E.V., Tishkov V.I. Synergetic effect of several single point mutations on stability and kinetic properties of plant formate dehydrogenase. Book of abstracts of the 10th International Conference on Protein Stability "ProStab2014", 2014, Stresa, Italy
41. Савин С.С., Алексеева А.А., **Каргов И.С.**, Ковалевский Р.П., Упоров И.В., Тишков В.И. Форматдегидрогеназа - новая мишень для борьбы с патогенными микроорганизмами и биокатализатор для синтеза лекарственных препаратов. Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии (МОБИ-Хим2014). 2014, Крым, Новый Свет, Россия
42. **Каргов И.С.** Изучение каталитических свойств форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», 2014, Москва, Россия
43. Тишков В.И., Алексеева А.А., Зарубина С.А., **Каргов И.С.**, Stepashkina A.V., Федорчук В.В., Федорчук Е.А., Захарова Г.С., Упоров И.В., Комарова Н.В., Полозников А.А., Савин С.С. Protein engineering of enzymes for fine organic synthesis, pharmaceutical industry and medicine diagnostics. Book of abstracts of the VII Moscow International Congress «Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development» and XI International Specialized Exhibition «Biotech World' 2013», 2013, Moscow, Russia
44. Алексеева А.А., Савин С.С., **Каргов И.С.**, Pometun E.V., Тишков В.И. Rational design of enzymes for improvement of plant stress resistance. Book of abstracts of the VII Moscow International Congress «Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development» and XI International Specialized Exhibition «Biotech World' 2013», 2013, Moscow, Russia
45. **Каргов И.С.**, Алексеева А.А., Тишков В.И. Влияние остатка Phe290 на каталитические свойства и термостабильность форматдегидрогеназы из сои *Glycine max*. XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2013», 2013, Москва, Россия
46. Alekseeva A.A., **Kargov I.S.**, Zarubina S.A., Savin S.S., Pometun E.V., Kleimenov S.Yu., Tishkov V.I. Management of properties and stability of recombinant formate dehydrogenase

- from soya Glycine max by single-point mutation. Book of abstracts of the 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), 2013, Saint Petersburg, Russia
47. Тишков В.И., Алексеева А.А., Серов А.Е., **Каргов И.С.**, Skirgello O.E., Зарубина С.А., Куранова И.П., Polyakov M., Shabalin I.G., Попов В.О., Савин С.С. Plant formate dehydrogenase: structure – function studies. Book of abstracts of the 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), 2013, Saint Petersburg, Russia
  48. Alekseeva A.A., Savin S.S., **Kargov I.S.**, Zarubina S.A., Kleimenov S.Yu, Pometun E.V., Tishkov V.I. Protein engineering of formate dehydrogenase: from bacteria to plants. 9th International Conference "Biocatalysis -2013: Fundamentals & Applications", 2013, Moscow, Russia
  49. Alekseeva A., Goncharenko K., **Kargov I.**, Savina L., Savin S., Tishkov V. Formate dehydrogenase from soya Glycine max: structure – function relationship and protein design. Book of abstracts of the 20th INPEC Conference "Engineering Protein-Systems, Functions and Applications", 2012, Taipei, Taiwan
  50. Алексеева А.А., Goncharenko K.V., **Kargov I.S.**, Савин С.С., Kleimenov S.Y., Pometun E.V., Тишков В.И. Rational design of thermal stability of plant formate dehydrogenase. Book of abstracts of the 9th International Conference on Protein Stabilization - ProStab2012 "From Molecular Level to market applications", 2012, Lisbon, Portugal
  51. **Каргов И.С.**, Алексеева А.А., Тишков В.И. Изучение термостабильности мутантной формиатдегидрогеназы из сои Glycine max. XIX Молодежная научная конференция «Ломоносов», 2012, Москва, Россия
  52. Alekseeva A.A., **Kargov I.S.**, Pometun E.V., Tishkov V.I. Different approaches for enzyme stabilization in the case of plant formate dehydrogenase. Book of abstracts of the XII International conference of young scientists "Forests of Eurasia – Belarusian lake district (Belorusskoye Poozerie)" dedicated to 145th anniversary from the date of Prof. G.F. Morozov's birth. Braslav (Belorussia), 2012, Ignalina (Lithuania)
  53. Тишков В.И., Алексеева А.А., Савин С.С., Савина Л.И., **Каргов И.С.** Мутантная формиатдегидрогеназа (варианты). Патент RU 2 522 819, приоритет от 05.10.2012 , опубл. Бюллетень "Изобретения. Полезные модели", 2014, N 20, 20.07.2014.
  54. Тишков В.И., Алексеева А.А., Савин С.С., Савина Л.И., **Каргов И.С.** Мутантная формиатдегидрогеназа (варианты). Патент RU 2545966 , приоритет от 08.10.2013. опубл. Бюллетень "Изобретения. Полезные модели", 2015, N 10, 10.04.2015