

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.Н. БАХА

*На правах рукописи*

КАРГОВ  
Иван Сергеевич

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ  
ХАРАКТЕРИСТИКА И БЕЛКОВАЯ  
ИНЖЕНЕРИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ И  
РАСТИТЕЛЬНОЙ ФОРМАТДЕГИДРОГЕНАЗ**

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

**Диссертация**  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:  
доктор химических наук,  
профессор В.И. Тишков  
кандидат химических наук,  
А.А. Пометун

Москва – 2017

# ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |    |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....  | 4  |
| I. ВВЕДЕНИЕ .....   | 5  |
| II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....  | 7  |
| 2.1. Общие сведения о формиатдегидрогеназе .....  | 7  |
| 2.2. Физиологическая роль формиатдегидрогеназы.....   | 8  |
| 2.3. Получение формиатдегидрогеназы.....  | 11 |
| 2.4. Анализ первичной структуры формиатдегидрогеназы.....   | 12 |
| 2.5. Пространственная структура формиатдегидрогеназ.....  | 28 |
| 2.6. Основные свойства формиатдегидрогеназ.....   | 32 |
| 2.6.1. Кинетические параметры формиатдегидрогеназ .....   | 32 |
| 2.6.2. Температурная стабильность и механизмы термоинактивации<br>формиатдегидрогеназ.....        | 35 |
| 2.6.3. Химическая стабильность формиатдегидрогеназ.....   | 36 |
| 2.7. Стабилизация ферментов методами белковой инженерии.....                                      | 37 |
| 2.7.1. Ненаправленный мутагенез.....  | 39 |
| 2.7.2. Направленный мутагенез.....  | 39 |
| 2.8. Использование сред, содержащих ионные жидкости в ферментативных реакциях<br>.....            | 48 |
| 2.9. Применение формиатдегидрогеназ.....  | 50 |
| III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....   | 54 |
| 3.1. Материалы .....  | 54 |
| 3.2. Методы исследования .....  | 55 |
| 3.2.1. Клонирование гена формиатдегидрогеназы из бактерий<br><i>Staphylococcus aureus</i> . ..... | 55 |
| 3.2.2. Рестрикция фрагментов ДНК.....   | 56 |
| 3.2.3. Лигирование .....  | 56 |
| 3.2.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле .....  | 56 |
| 3.2.5. Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля.....   | 57 |
| 3.2.6. Трансформация клеток <i>E.coli</i> .....   | 57 |
| 3.2.7. Выделение плазмидной ДНК .....   | 58 |
| 3.2.8. Секвенирование ДНК.....  | 59 |
| 3.2.9. Экспрессия SauFDH и ее мутантных форм в клетках <i>E.coli</i> .....                        | 59 |
| 3.2.10. Выделение и очистка SauFDH .....  | 62 |
| 3.2.11. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях.....                                      | 63 |
| 3.2.12. Определение активности фермента.....  | 64 |
| 3.2.13. Определение констант Михаэлиса .....  | 64 |
| 3.2.14. Определение констант ингибирования. ....  | 64 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.15. Определение активности фермента при различных температурах.....   | 64  |
| 3.2.16. Определение констант скорости термоинактивации.....   | 65  |
| 3.2.17. Определение активационных параметров процесса термоинактивации фермента.....                                  | 65  |
| 3.2.18. Изучение термостабильности с помощью ДСК.....   | 65  |
| 3.2.19. Получение кристаллов и определение трехмерной структуры апо-формы SauFDH.....                                 | 66  |
| 3.2.20. Моделирование трехмерной структуры апо-фермента.....  | 67  |
| 3.2.21. Направленный мутагенез гена формиатдегидрогеназы из бактерий <i>S. aureus</i> .....                           | 67  |
| IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....   | 69  |
| 4.1. Клонирование гена формиатдегидрогеназы из бактерий <i>S. aureus</i> .....  | 69  |
| 4.2. Экспрессия рекомбинантной формиатдегидрогеназы из <i>S. aureus</i> .....   | 72  |
| 4.3. Выделение и очистка SauFDH.....  | 75  |
| 4.4. Основные свойства рекомбинантной SauFDH.....   | 80  |
| 4.4.1. Кинетические параметры.....  | 80  |
| 4.4.2. Влияние pH на константу Михаэлиса.....   | 83  |
| 4.4.3. Температурная зависимость активности SauFDH.....   | 85  |
| 4.4.4. Ингибирование SauFDH неорганическими ионами.....   | 88  |
| 4.5. Температурная стабильность SauFDH.....   | 91  |
| 4.5.1. Стабильность SauFDH при повышенных температурах.....   | 91  |
| 4.5.2. Влияние pH и ионной силы на термоинактивацию SauFDH.....   | 94  |
| 4.5.3. Определение активационных параметров процесса термоинактивации с помощью теории активированного комплекса..... | 95  |
| 4.5.4. Изучение термостабильности SauFDH с помощью ДСК.....   | 99  |
| 4.6. Кристаллизация SauFDH и определение структуры апо-формы.....   | 102 |
| 4.7. Белковая инженерия SauFDH и SoyFDH.....  | 104 |
| 4.7.1. Изучение влияния структуры консервативного мотива GXGXXG на свойства и функции фермента.....                   | 106 |
| 4.7.2. Увеличение жесткости полипептидной цепи.....   | 110 |
| 4.7.3. Замена остатков тирозина и фенилаланина на поверхности белковой глобулы.....                                   | 113 |
| 4.8. Сравнение влияния аналогичных аминокислотных замен в ферментах SauFDH и SoyFDH.....                              | 127 |
| V. ВЫВОДЫ.....  | 129 |
| VI. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....   | 130 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|                   |   |
|-------------------|---|
| ФДГ               | – формиатдегидрогеназа  |
| SauFDH            | – формиатдегидрогеназа из бактерий <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| SoyFDH            | – формиатдегидрогеназа из сои <i>Glycine max</i>                  |
| SceFDH            | – формиатдегидрогеназа из дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| AthFDH            | – формиатдегидрогеназа из растения <i>Arabidopsis thaliana</i>    |
| PseFDH            | – формиатдегидрогеназа из бактерий <i>Pseudomonas sp.101</i>      |
| AS                | – сульфат аммония   |
| NAD <sup>+</sup>  | – никотинамидадениндинуклеотид, окисленный                        |
| NADH              | – никотинамидадениндинуклеотид, восстановленный                   |
| NADP <sup>+</sup> | – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленный                  |
| NADPH             | – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленный             |
| NaPB              | – натрий-фосфатный буфер  |
| dNTP              | – дезоксирибонуклеотид трифосфат                                  |
| АДГ               | – алкогольдегидрогеназа   |
| АТФ               | – аденозинтрифосфорная кислота                                    |
| ДСК               | – дифференциальная сканирующая калориметрия                       |
| ИПМДГ             | – изопропилмалатдегидрогеназа                                     |
| ИПТГ              | – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид                               |
| ПЦР               | – полимеразная цепная реакция                                     |
| РСА               | – рентгеноструктурный анализ                                      |
| ТАК               | – теория активированного комплекса                                |
| ТЕМЕД             | – тетраметилэтилендиамин  |
| Трис              | – трис(оксиметил)аминометан                                       |
| ЭДТА              | – этилендиаминотетраацетат  |

## I. ВВЕДЕНИЕ

$\text{NAD}^+$ -зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2) катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$ . ФДГ из различных источников представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц с массой от 35 до 50 кДа.

Данный фермент чрезвычайно широко распространен в природе: кодирующие его гены были найдены в разнообразных бактериях (в том числе, и патогенных), дрожжах, микроскопических грибах и растениях. Физиологическая роль этого фермента состоит в снабжении клетки энергией в виде  $\text{NADH}$ . Однако в зависимости от типа организма значение ФДГ в жизненном цикле и ее свойства различаются. Например, в метилотрофных бактериях ФДГ постоянно участвует в восстановлении  $\text{NADH}$ , однако существует целый ряд организмов, как простых, так и сложных, в которых этот фермент является ферментом стресса. В частности, у таких патогенных микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus*, *Legionella*, *Francisella tularensis* и *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, содержание ФДГ в неблагоприятных условиях многократно повышается. В растениях ФДГ также является белком стресса: ее синтез резко возрастает при резком изменении температуре, засухе, наличии вредных компонентов в почве и т.п.

На практике ФДГ находит применение в биокаталитических процессах. Наиболее ярким примером является процесс регенерации  $\text{NADH}$  в системах сопряженного синтеза оптически активных соединений. В настоящее время фирмой «Evonik Degussa» реализован промышленный процесс получения *L-tert*-лейцина, в котором ФДГ является катализатором реакции регенерации  $\text{NADH}$ , являющимся коферментом для второго фермента системы. Помимо этого, ФДГ активно применяется в биосенсорах определения формиата.

Растительные и бактериальные ФДГ имеют перспективу для применения на практике: первые имеют низкие константы Михаэлиса по коферменту и субстрату, вторые обладают выдающейся термостабильностью. Оба этих фактора чрезвычайно важны в процессах синтеза оптически активных соединений.

Наиболее изученными ФДГ являются ферменты из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH), растения *Arabidopsis thaliana* (AthFDH) и метилотрофных дрожжей *C. boidinii* (CboFDH). В нашей лаборатории проводится систематическое изучение свойств ФДГ из вышеупомянутых и других природных источников методом направленного мутагенеза. Среди них особое внимание привлекает фермент из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH). По литературным данным в этих бактериях в форме биопленок ФДГ занимает чрезвычайно важное место в их жизненном цикле. Возможное создание антисептика на основе ингибитора ФДГ также описано в литературе. Поэтому изучение свойств SauFDH, его структурно-функциональной характеристики, а также определение его трехмерной структуры, белковая инженерия SauFDH с целью получения мутантных форм фермента и выявления важных каталитических остатков является актуальной академической и практической задачей.

## II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Общие сведения о формиатдегидрогеназе

$\text{NAD}^+$ -зависимые формиатдегидрогеназы представляют группу ферментов, катализирующих окисление формиат-иона до углекислого газа, сопряженное с восстановлением  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$ :



Все известные ФДГ можно разбить на два основных типа. К первому типу относятся формиатдегидрогеназы из анаэробных микроорганизмов и археобактерий. Эти ферменты являются гетероолигомерами со сложной четвертичной структурой и высокой молекулярной массой. Как правило, такие формиатдегидрогеназы содержат в активном центре различные простетические группы (ими могут быть ионы молибдена, вольфрама, а также Fe-S-кластеры), из чего следует характерная для них высокая чувствительность к кислороду [1], [2].

Ко второму типу относятся  $\text{NAD}^+$ -зависимые формиатдегидрогеназы, состоящие из двух субъединиц, одинаковых по строению и функции – на одну молекулу фермента приходится два активных центра, они не содержат в белковой глобуле ни ионов металлов, ни простетических групп. ФДГ этой группы принадлежат к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот [3]. Простейшим примером дегидрирования карбонильных соединений является реакция с формиат-ионом. Она также служит и модельной реакцией, потому что в каталитическом механизме отсутствует стадия переноса протона, поэтому лимитирующим фактором является скорость переноса гидрид-иона от субстрата на атом С-4 никотинамидного кольца [4]. В силу простоты реакции, на примере данного фермента изучается механизм переноса гидрид-иона в активном центре дегидрогеназ, относящихся ко второму типу.

Формиатдегидрогеназы достаточно давно являются объектом различных экспериментов: начиная с третьей четверти XX-ого века, было проведено большое количество работ по клонированию и изучению свойств ФДГ. Поскольку процесс

регенерации кофактора, катализируемый ФДГ, универсален, этот фермент встречается в широком спектре природных источников: в литературе описаны исследования и белковая инженерия ФДГ из бактерий, дрожжей, микроскопических грибов и растений [5].

## **2.2. Физиологическая роль формиадегидрогеназы**

В метилотрофных микроорганизмах ФДГ играет ключевую роль, катализируя конечную стадию катаболизма C1-соединений, таким образом снабжая эти организмы энергией. Прокариоты и эукариоты используют различные биохимические пути для утилизации метанола [6]. Метилотрофные бактерии могут окислять метанол до диоксида углерода по циклическому механизму, который регулируется уровнем формальдегида, или по прямому дегидрогеназному пути. Например, все известные метилотрофные дрожжи окисляют метанол до углекислого газа через формальдегид [7].

В более сложных организмах, в которых присутствует ген формиадегидрогеназы, ее роль в метаболизме также заключается в восстановлении NADH, который является коферментом во многих ферментативных реакциях и активно участвует в реакциях катаболизма. Таким образом, формиадегидрогеназа является поставщиком энергии в виде универсального компонента.

Однако, несмотря на такую распространенность, условия, при которых проходит восстановление NADH, и, следовательно, физиологическая роль ФДГ варьируется в зависимости от семейства организма. Например, в дрожжах и некоторых бактериях этот фермент напрямую участвует в снабжении клетки энергией. В растениях, грибах и патогенных бактериях этот же фермент является ферментом стресса: его содержание возрастает при различных неблагоприятных воздействиях [8-10]. Для патогенных бактерий также стоит отметить факт, что содержание ФДГ значительно повышается при переходе в форму биопленок [11].

Значение формиадегидрогеназы в метаболизме растений изучается с середины XX века. Впервые выделение растительной ФДГ из зерен гороха и

фасоли описано в 1951 году в работе Дэвисона [12]. Однако ее роль в жизнедеятельности растений оставалась невыясненной до 1992 года, когда в тканях картофеля был обнаружен фермент с 78%-ной гомологией с ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 [13, 14]. Проверка на ферментативную активность показала, что этот фермент катализирует окисление формиата и восстановление  $\text{NAD}^+$ . Помимо этого, в митохондриях были обнаружены ферменты, гомологичные ФДГ и лишённые сигнального пептида. Изучение белкового состава митохондрий других растений показало, что в них тоже присутствует ФДГ [15]. Для растительных формиатдегидрогеназ (картофель, соя *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, etc.) характерно наличие сигнального пептида на N-конце, который отщепляется в митохондриях [13, 16].

Большинство авторов сходятся во мнении, что для растений ФДГ является ферментом стресса, в связи с чем ее синтез резко возрастает при различных неблагоприятных воздействиях на растения (таких как, например, резкое изменение температуры, засуха, гипоксия и др.) [17-19]. Предположительно, основная роль формиатдегидрогеназы в таких условиях – окисление формиата, образующегося в больших количествах вследствие повышенных энергозатрат. Это подтверждается исследованиями растений, в которых с помощью генной инженерии был снижен уровень экспрессии ФДГ, и в результате стрессовых воздействий наблюдалось накопление формиата [20]. Вероятно, ФДГ окисляет формиат, образующийся при переносе ацетильной группы с пирувата на кофермент А, процессе, катализируемом ферментом пируват-формиат-лиазой. Комбинация этих двух ферментов позволяет увеличивать приток ацетил-СоА в цикл трикарбоновых кислот при стрессовых условиях [21].

Тем не менее, несмотря на большое количество исследований, направленных на ~~изучение~~ физиологической роли растительных ФДГ, этот вопрос остается на данный момент открытым, а одним из наиболее вероятных предположений является именно функционирование ее в качестве фермента стресса.

В прокариотах формиатдегидрогеназная активность была обнаружена в большинстве метилотрофных микроорганизмов [22].

Одним из основных источников энергии в клетках этих микроорганизмов является реакция окисления формиата до  $\text{CO}_2$ . Метилотрофные бактерии могут окислять C1-соединения (в первую очередь, метанол) до диоксида углерода двумя способами: посредством рибулозимонофосфатного цикла, не требующего наличия формиатдегидрогеназы, а также используя ряд дегидрогеназ, в котором на последней стадии используется именно формиатдегидрогеназа [7]. Метилотрофные дрожжи используют только дегидрогеназный путь, а сама ФДГ контролируется количеством нуклеотидов: при избытке нуклеотидов формиатдегидрогеназа ингибируется; при недостатке энергии ФДГ активируется и начинает окислять формиат до диоксида углерода, обеспечивая клетку дополнительной энергией [22, 23].

Помимо  $\text{NAD}^+$ -зависимых формиатдегидрогеназ в бактериях обнаружен и другой тип формиатдегидрогеназ. Как уже было упомянуто, в активном центре таких формиатдегидрогеназ содержатся железосерные кластеры и ионы тяжелых металлов (вольфрама или молибдена [24]). Большинство этих ферментов являются чувствительными к кислороду, и как следствие, найдено в анаэробных организмах.

Кроме того, в различных бактериях ФДГ начинает активно синтезироваться в клетке в результате стрессовых воздействий, аналогично тому, как это происходит у растений [16].

Формиатдегидрогеназа у бактерий играет ключевую роль при их росте в виде биопленок. В биопленках уровень мРНК, кодирующей формиатдегидрогеназу, находится на третьем месте по сравнению с другими мРНК. Уровень экспрессии данного фермента в стафилококковых биопленках в 20 раз выше, чем при росте клеток в виде планктона. По-видимому, повышенная экспрессия формиатдегидрогеназы в условиях роста биопленок способствует их высокой выживаемости [11].

Отдельно стоит отметить различия между существованием патогенных бактерий в форме биопленок и в форме планктона. Биопленки представляют собой высокоорганизованные функциональные сообщества микроорганизмов, направленные на сохранение того вида бактерий, из которого они состоят. Микроорганизмы, существуя в виде биопленок, становятся намного более устойчивыми к воздействиям различного рода (изменению рН среды, температуры), и приобретают повышенную устойчивость к антибиотикам, другим антимикробным агентам и к иммунному ответу организма хозяина (в отличие от бактерий в форме планктона). Поэтому такая форма существования бактерий является наиболее распространенной.

Биопленки могут оказаться смертоносными. Так, бактерии, которые вызвали болезнь легионеров, унесшую жизни 29 человек в Филадельфии в 1976 г., существовали в виде биопленок в системе кондиционирования воздуха [25, 26]. За последние два десятилетия было опубликовано большое количество заявлений, что особую опасность представляют стафилококковые биопленки [27]. Заражение *Staphylococcus aureus* является одной из причин так называемых внутрибольничных инфекций [28]. Биопленки *S.aureus* и *S.epidermis* могут появляться практически на всех вживляемых медицинских приспособлениях и вызывать заболевания, которые принято называть хроническими полимер-ассоциированными инфекциями (*chronic polymer-associated infection*) [29].

Несмотря на то, что проблема биопленок известна уже более 50 лет, борьба с ними в условиях клиники является актуальной задачей, поскольку биопленки обладают повышенной устойчивостью к различным воздействиям. Этот факт определяет чрезвычайно высокую стоимость борьбы с ними: на борьбу с внутрибольничными инфекциями, вызванными биопленками, в США тратится ежегодно более одного миллиарда долларов [27].

### **2.3. Получение формиатдегидрогеназы**

В отличие от микроорганизмов, гены ФДГ высших эукариот (за исключением растений) не были описаны в литературе. Например, ген ФДГ не

был найден в геноме дрозофилы. Наличие гена ФДГ у человека, несмотря на предварительно найденные гомологичные последовательности в геноме, также не подтверждено.

Первый клонированный ген ФДГ принадлежал бактериям *Methanobacterium formicicum* [30], в 1990 г. был клонирован ген ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101. Затем были клонированы гены ФДГ из: *Moraxella* sp.C-2, *Mycobacterium vaccae*, *Paracoccus* sp. 12-A, *Ancylobacter aquaticus* и *Thiobacillus* sp. KNK65MA, *Candida methylica*, *C. boidinii* и *Pichia pastoris*. Анализ целых геномов различных организмов привел к нахождению генов с очень высокой гомологией к ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 (>80-85%) в хромосомах таких патогенов, как *Staphylococcus aureus* [31], *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* str. k10 [GenBank Accession AE017240], трех штаммов *Bordetella bronchiseptica* RB50 (*Alcaligenes bronchisepticus*), *B. parapertussis* strain 12822 и *B. pertussis* strain Tohama I [32], индустриального штамма *Streptomyces avermitilis* [33]. Ген ФДГ также имеется в штаммах *Pichia angusta*, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Candida tropicalis*, *P. farinosa* [34], а также бактерий клостридий [35].

Однако, несмотря на то, что исследования форматдегидрогеназы проводятся на протяжении долгого времени, клонирование генов, кодирующих ФДГ, из новых организмов остается популярной научной темой. Была разработана методика, позволяющая получить большое количество гомогенного препарата ФДГ, достаточное для изучения свойств фермента. Таким образом, были созданы все условия для проведения систематических исследований ФДГ, включая эксперименты по генетической инженерии и определению структуры с помощью рентгеноструктурного анализа. Благодаря этому совсем недавно были клонированы гены форматдегидрогеназы из ряда растений и проведено исследование их свойств [36], [37].

#### **2.4. Анализ первичной структуры форматдегидрогеназы**

На сегодняшний день главная проблематика современной науки состоит в следующем: при чрезвычайно развитых методах получения данных по геномам

различных организмов (такими методами секвенирования нового поколения, как, например, SOLiD и Illumina [19997069, *Nat Rev Genet*, 2010]) скоростью-лимитирующей стадией является именно обработка информации. Поиск по различным базам данных – GenBank (GB), EMBL, UniProt, а также KEGG (<http://www.genome.jp/>) – позволяет найти нуклеотидные последовательности генов ФДГ более чем из 200 источников, относящихся не только к разным классам организмов, но даже царствам. Таблица 2.1 содержит информацию о формиаатдегидрогеназах из бактерий, дрожжей, микроскопических и обычных грибов, а также растений; в ней также приведены краткие обозначения и источники.

Таблица 2.1

Формиатдегидрогеназы, рассмотренные в данной работе. Синим цветом отмечены сокращенные названия бактериальных ФДГ, фиолетовым – ФДГ из дрожжей и грибов, зеленым – ФДГ из растений. Красным выделены названия патогенных организмов.

| Латинское название организма   | Сокращение                         | Код базы данных          |
|--|------------------------------------|--------------------------|
| <i>Staphylococcus equorum</i>  | <b>SeqFDH</b>                      | WP_021339550.1           |
| <i>Staphylococcus simulans</i>   | <b>SsiFDH</b>                      | WP_023015869.1           |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i>  | <b>SluFDH</b>                      | WP_002492941.1           |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i>  | <b>SpaFDH</b>                      | WP_023374391.1           |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i>  | <b>SsaFDH</b>                      | WP_011303984.1           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | <b>SauFDH_1</b><br><b>SauFDH_2</b> | WP_001557559.1           |
| <i>Arthroderma gypseum</i><br>( <i>Microsporum gypseum</i> )               | <b>AgyFDH</b>                      | XM_003171894.1           |
| <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40  | <b>AorFDH</b>                      | XM_003190197.1           |
| <i>Coccidioides posadasii</i>  | <b>CpoFDH</b>                      | XM_003071102.1           |
| <i>Ajellomyces capsulatus</i>  | <b>AcaFDH</b>                      | XM_001539190.1           |
| <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>  | <b>PttFDH</b>                      | XM_001933718.1           |
| <i>Phaeosphaeria nodorum</i>   | <b>PnoFDH</b>                      | XM_001791765.1           |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>  | <b>SscFDH</b>                      | XM_001590223.1           |
| <i>Beauveria bassiana</i>  | <b>BbaFDH</b>                      | XM_008597831.1           |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> var.<br><i>neoformans</i>                   | <b>CneFDH</b>                      | XM_571419.1              |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | <b>SceFDH</b>                      | UniProt: P0CT22          |
| <i>Candida boidinii</i>  | <b>CboFDH</b>                      | UniProt: O13437          |
| <i>Ogataea parapolymorpha</i>  | <b>OpaFDH</b>                      | UniProt: W1Q801          |
| <i>Malassezia globosa</i>  | <b>MglFDH</b>                      | XM_001728659.1           |
| <i>Mycobacterium avium</i><br>subsp. <i>Paratuberculosis</i>               | <b>MavFDH</b>                      | AE017240.1<br>AAS06230.1 |
| <i>Burkholderia multivorans</i>  | <b>BmuFDH</b>                      | ACF35001.1               |
| <i>Burkholderia stabilis</i>   | <b>BstFDH</b>                      | ACF35003.1               |
| <i>Burkholderia pyrrocinia</i>   | <b>BpyFDH</b>                      | ACF35004.1               |
| <i>Burkholderia cenocepacia</i>  | <b>BceFDH</b>                      | ACA95142.1               |
| <i>Bordetella pertussis</i>  | <b>BpeFDH</b>                      | BX640415.1               |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i><br>( <i>Alcaligenes bronchisepticus</i> ) | <b>BbrFDH</b>                      | BX640441.1               |
| <i>Pseudomonas</i> sp. 101   | <b>PseFDH</b>                      | UniProt: P33160          |

|  |               |                      |
|--|---------------|----------------------|
| <i>Inquilingus limosus</i>   | <b>IliFDH</b> | WP_026871932.1       |
| <i>Legionella pneumophila</i><br><i>subsp. pneumophila str. Philadelphia</i> | <b>LegFDH</b> | AE017354; AAU26390.1 |
| <i>Legionella norrlandica</i>  | <b>LleFDH</b> | WP_035889837.1       |
| <i>Francisella tularensis</i><br><i>subsp. Novicida</i>                      | <b>FtuFDH</b> | WP_003041408.1       |
| <i>Physcomitrella patens</i> (мох)   | <b>PpaFDH</b> | GB XM001768721       |
| <i>Hordeum vulgare</i> (ячмень)  | <b>HvuFDH</b> | GB D88272            |
| <i>Triticum aestivum</i> (пшеница)   | <b>TaeFDH</b> | GB AK332605          |
| <i>Zea mays</i> (кукуруза)   | <b>ZmaFDH</b> | GB EU967680          |
| <i>Glycine max</i> (соя)   | <b>SoyFDH</b> | GB AK244764          |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> (томат)                                       | <b>LesFDH</b> | GB AJ849378          |
| <i>Solanum tuberosum</i> (картофель)   | <b>StuFDH</b> | GB Z21493            |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> (резуховидка)                                    | <b>AthFDH</b> | EMBL AF208029        |
| <i>Brassica napus</i> (рапс)   | <b>BnaFDH</b> | KEGG: EST 21261      |
| <i>Brassica oleracea</i> (капуста)   | <b>BolFDH</b> | A0A0D3EFG5           |
| <i>Malus domestica</i> (яблоко)  | <b>MdoFDH</b> | EMBL CN496368        |
| <i>Prunus persica</i> (персик)   | <b>PpeFDH</b> | KEGG: EST 4281       |
| <i>Citrus clementina</i> (клементин)   | <b>CclFDH</b> | GB XP_006446478.1    |
| <i>Picea sitchensis</i> (ель)  | <b>PsiFDH</b> | GB EF085163          |
| <i>Pinus pinaster</i> (сосна)  | <b>PpiFDH</b> | KEGG: EST 174        |
| <i>Populus tremula</i> (осина)   | <b>PtmFDH</b> | KEGG: EST 4757       |
| <i>Populus trichocarpa</i> (тополь)  | <b>PtrFDH</b> | GB XM002320465       |

Справедливость сравнения ФДГ из таких эволюционно удаленных источников подтверждается исследованием [16]: ФДГ является высококонсервативным ферментом, гомология внутри одной группы организмов достигает 80%, а степень идентичности при сравнении представителей разных групп обычно составляет не менее 50%. Сравнение аминокислотных последовательностей ФДГ внутри царств показало, что наибольшую гомологию проявляют растительные ФДГ (не менее 76%), затем – ФДГ из дрожжей и грибов (не менее 50%), а наименьшая степень идентичности характерна для бактериальных ФДГ (не менее 37%). Эти данные свидетельствуют о достаточно большой вариабельности первичной структуры этого фермента при сохранении главной функции.

```

LleFDH -----MLNQDKQKIVCVLYDDPKGGFPPKYARESIPKIQYPDGQSLPSP-AAIDFTP--GELLSVSGELGLREFLEKGYQFVVT
LegFDH -----FSQSQKIVCVLYDDPKGGFPPNYARESIPKIQYPDGQSLPNP-DSIDFIP--GEMLSVSGELGLRQFLESNGHQLVVTS
FtuFDH -----KILCVLYDDPKTGMPKDYPLAQIPKLSNYPDGSSLPPTP-QAIDFRP--GELLCVSGELGLRKFLEELGHVVT
IliFDH -----MAKIVCVLYDDPVTGYPTSYARDLPLKLERYPGGQTLPTP-KAIDFVP--GTLGVSVSGELGLRRLWLESLGHTLVVTS
PseFDH -----AKVLVLYDDPVDGYPKTYARDLPLKIDHYPGGQTLPTP-KAIDFTP--GQLLGSVSGELGLRKYLESNGHTLVVTS
BbrFDH -----AKILCVLYDDPVGMPATYARDSLPAIARYPGGATLPTP-LALDFTP--GHLLGCVSGELGLRPFQARGHTLVVTA
BpeFDH -----AKILCVLYDDPVGMPATYARDSLPAIARYPGGATLPTP-LALDFTP--GHLLGCVSGELGLRPFQARGHTLVVTA
BceFDH -----MATVLCVLYDDPVDGYPPRYVRDTIPVVTHYADGQTAPTPAGPPGFRP--GELVGSVSGALGLRGYMEAHGHTLVVTS
BstFDH -----MATVLCVLYDDPVDGYPPHYVRDTIPVITRYADGQTAPTPAGPPGFRP--GELVGSVSGALGLRGYLEAHGHTLVVTS
BpyFDH -----MATVLCVLYDDPVDGYPPRYVRDAIPVITQYADGQTAPTPAGPLGFRP--GELVGSVSGALGLRGYLEAHGHTLVVTS
BmuFDH -----MATVLCVLYDDPVDGYPPRYVRDTIPVITHYADGQLAPTPSGPPGFRP--GELVGSVSGALGLRDYLAHGHHTLVVTS
MavFDH -----EEEPVAKCV-MVLYDDPVDGYPPKYARDSIPVINSYDGSLLPTP-SKIDFTP--GELLCVSGALGLRKFFEDGGHVLVTS
StuFDH -----MAMSRVASTAARAITSPSSLVFTRELQASPGP--KKIVGVFYKANEYA-----EMNP--NFLGCAENALGIREWLESKGHQYIVTP
LesFDH -----MAMRRVASTAARAIASPSLVFTRELQASPGP--KKIVGVFYKANEYA-----EMNP--NFLGCAENALGIREWLESKGHQYIVTP
CclFDH -----MAMKRVAASSAINAFASSGYLRSSSRFSR-HYASSGS--KKIVGVFYKANEYA-----SMNP--NFLGCVVEGGCGLREWLESKGHQYIVTD
PtmFDH -----MAMKRAATSARAFSSSSPSSSLSSGSSTRLLHASAES--KKIVGVFYKANEYA-----SLNP--NFVGSLEGALGLRDWLESQGHQYIVTD
PtrFDH -----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSSTRLLHASAES--KKIVGVFYKANEYA-----SLNP--NFVGSLEGALGLRDWLESQGHQYIVTD
MdoFDH -----MASKGVIASAVRALASSGSSASSTFTTRHLHASGGS--KKIVGVFYKANEYA-----ELNP--NFLGSQVAGLGLRGYLEAHGHTLVVTS
PpeFDH -----MKGVIASAVRTLASSGSSASSTFTTRHLHASAGS--KKIVGVFYKANEYA-----ELNP--NFLGCEERALGIRKDWLESQGHQYIVTD
HvuFDH -----MAAMWRAAARQLVDRVGSRAAHTSAGS--KKIVGVFYQAGEYA-----DKNP--NFVGCVEGALGLRDWLESKGHQYIVTD
TaeFDH -----MAAMCRAAARQLVDRVGSRAAHTSAGS--KKIVGVFYQAGEYA-----DKNP--NFVGCVEGALGLRDWLESKGHQYIVTD
ZmaFDH -----MAAMWRAAARQLVDRALGSRRAAHTSTGS--KKIVGVFYKAGEYA-----DKNP--NFVGCVEGALGLRGWLESQGHQYIVTD
SoyFDH -----MLNFTLKMSDPTLAQPHLVKHTTLETVVTTHNHNHRPSINASGEK--KKIVGVFYKANEYA-----KLNK--NFVGCVEGALGLRDWLESQGHQYIVTD
BnaFDH -----MAMRRITGAIRASCVSSSSSGYFARQFHASSGD--SKKIVGVFYKANEYA-----SKNP--NFLGCVENALGIRNWLESQGHQYIVTD
BolFDH -----MAMRRVIRASCVSSSSTGYLARKFHASSGD--SKKIVGVFYKANEYA-----SKNP--NFLGCVENALGIRNWLESQGHQYIVTD
AthFDH -----MAMRQAAKATIRACSSSSSSGYFARRQFNASSGD--SKKIVGVFYKANEYA-----TKNP--NFLGCVENALGIRDWLESQGHQYIVTD
PsiFDH -----MASKRAVISTFRAASRKPIFSSVSPASSVRELHAPAGS--NKIVGVFYKANEYA-----SLNP--NFLGCVENALGIREWLESKGHQYIVTD
PpiFDH -----MASRRAVISAFRAASRRPICSPVSSIASSVRELHAPAGS--NKIVGVFYKANEYA-----SLNP--NFLGCVENALGIREWLESNGHQYIVTD
PpaFDH -----MASRRIGVLLAGSRALSRQHGLTGASADSQILQRHLQFSRFSYSSAAGGESKKILGVFFAAHEYA-----KNP--EFLGCVENALGIREWLESKGHQYIVTS
PnoFDH -----MVFLRSASRLARPSTSIISARAGPRLTSSLRQPNAPR#TLTASASQ--GKVLVLYDGGIHAEEQEPK-M-----LGTTENEGLRKWIEDQGHVVT
PttFDH -----MGKVLVLYDGGIHAEEQEPQ-L-----LGTTENEGLRKWIEEQGHVVT
SscFDH MVLRLRSLRILASRSPCARSIPTASAFARPTTLTRSAFRSQKLNHTFKIIMLTGDKRE--KVVLVLYDGGKHAEEVPE-L-----LGTTENEGLRKWLEDQGHVVT
CpoFDH -----MVIIRSLRGLRPLRSLLASRGLRSPSPFASWTSASSLPLNSV#TLTATSKLQ--KVLVMVYDGGHAKQPPG-L-----LGTTENEGLRKWLEERGHVVT
AorFDH -----MGKILMVLVYDGGHAKQPPG-L-----LGTTENEGLRKWLEEQGHVVT
AgyFDH -----MVKVLVLYDGGQHAHQDQPG-L-----LGTTENEGLRKWLEEKGHVVT
AcaFDH -----MGRTIKAHLSTGNLQLEL#-----NTPKGKVLVLYDGGQHAHQDQPA-L-----LGTTENEGLRKWLEEKGHVVT
BbaFDH MVSFRPLSRSLPLVAASRSALFHCAPSVLVRHAGAVGRRAAPVYTKLGGGAPAAASPGLVPSF#ALTARE--KVVLVLYDGGKHAHQVPE-L-----LGTTENEGLRKWLEDQGHVVT
CboFDH -----MKIVLVLYDAGKHADEEK-L-----YGCCTENLGLIANWLKQGHVVT
OpaFDH -----MGKVLVLYDAGKHAQDEER-L-----YGCCTENLGLRVDLEKQGHVVT
SceFDH -----MSKGKVLVLYEGGKHAEEQEK-L-----LGCITENLGLRNFIEEQGHVVT
MglFDH -----MLLFNSVAMRALQT#TFSVSARRSD--KVLVLYDGGHAKQPPG-L-----LGTTENEGLRKWLEEKGHVVT
CneFDH -----MVKVLVLYDGGHAKQDEER-L-----LGTVENLGLFADWLKQGHVVT
SauFDH_1 -----MSNGAVFVIFLQKATCNTYFKEVKIYHLGEMDMKIVA-LFPEAVEGQ--ENQL-----LNTKKA-IGLKTFLERGHVVT
SauFDH_2 -----MKIVA-LFPEAVEGQ--ENQL-----LNTKKA-IGLKTFLERGHVVT
SsaFDH -----MLFANYVLNDSFKEVVCANRIEYFFASKMHISVTLHSFKNKLLGEISMKIVA-LFPEAVAGE--DNQL-----LNTKKA-IGLKTFLERGHVVT
SpaFDH -----MKIVA-LFPEYVEGE--ENQL-----LNTKKA-IGLKTFLERGHVVT
SluFDH -----MKIVA-LFPEYVEGE--ENQL-----LNTKKA-IGLKTFLERGHVVT
SsiFDH -----MKIVA-LFPEATKGTENNVL-----LNTKKA-IGLKTFLERGHVVT
SeqFDH -----MKIVG-LFSPDPSGKS-ENQL-----LNDRYA-LGIESFLEDKDFVVT

```

Рис. 2.1. Сравнение последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – розовым. Красным и подчеркиванием отмечены остатки, консервативные для всех видов ФДГ. Голубым фоном отмечены остатки, образующие активный центр фермента, знаком # – каталитически важные остатки.

LleFDH DKDGP-NSVFARELKEAS IVTISQPFWPAYLTRDRIEGSPKLKLAITAGVSDHVDLQAAME--HDITVCEVTVCNSISVAEHTVMMILSLVRDYIPQYNIIVD-GGWNIADCVTRSYDLEGMHVGCVAAGRIG  
 LegFDH DKDGS-DSVFARELKEAT VVISQPFWPAYLTRDRIESAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAME--HNITVCEVTVCNSISVAEHTVMMILALVRDFIPQYNTVID-GGWNIADCVSRSYDLEGMVGCVAAGRIG  
 FtufDH DKDGD-GCKAEQELIDAD IVISQPFWPAYLTKERIQKAKLKLAITAGIGSDHVDLQAAKE--HKIDVVEVTVSNSISVSEHIVMMILSMVRDYLTQHEIAKS-GGWNIADAVKRSYDLEGMNVGTVAGRIG  
 IliFDH DKDGA-DSRLDRELPDAD IVISQPFWPAYLTAERIAKAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAID--RGLTVAEVTCNSISVAEHTVMMILGLVRNYIPSYQWVVK-GGWNIADCAARSYDLEGMHVGTVAGRIG=  
 PseFDH DKDGP-DSVFERELVDAD VVISQPFWPAYLTPERIAKAKNLKLAITAGIGSDHVDLQAAID--RNVTVAEVTCNSISVAEHTVMMILSLVRNYLPSEHWARK-GGWNIADCVSARSYDLEAMHVGTVAGRIG=  
 BbrFDH DKDGP-DSVFERELPDAD VVISQPFWPAYLTAARIAKAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAAQ--HGLTVAEVTSNSISVSEHIVMMVLALVRNYLPYQCVLD-GGWNIADCVARSYDLEGMHVGTVAGRIG  
 BpeFDH DKDGP-GSVFERELPDAD VVISQPFWPAYLTAARIAKAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAAQ--HGLTVAEVTSNSISVSEHIVMMVLALVRNYLPYQCVLD-GGWNIADCVARSYDLEGMV--GAGRIG  
 BceFDH DKDGP-DSEFERRLPEAD VVISQPFWPAYLSAERIAKAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAAR--AHITVAEVTSNSISVAEHTVMTTLALVRNYLPSEHAIQAQ-GGWNIADCVSRSYDVEGMHFGTVAGRIG  
 BstFDH DKDGP-DSEFERRLPDAD VVISQPFWPAYLTAERIAKAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAAR--AHITVAEVTSNSISVAEHTVMTTLALVRNYLPSEHAIQAQ-GGWNIADCVSRSYDVEGMHFGTVAGRIG  
 BpyFDH DKDGP-DSEFERRLPDAD VVISQPFWPAYLTAERIAKAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAAR--ARITVAEVTSNSISVAEHTVMTTLALVRNYLPSEHAIQAQ-GGWNIADCVSRSYDVEGMHFGTVAGRIG  
 BmuFDH DKDGP-DSEFERRLPEAD VVISQPFWPAYLTAEGIAKAPKLKLAITAGIGSDHVDLQAAAR--AGITVAEVTSNSISVAEHTVMTTLALVRNYLPSEHAIQAQ-GGWNIADCVSRSYDIEGMHFGTVAGRIG  
 MavFDH DKDGP-DSEFERRLPDAD IVISQPFWPAYITKERFAKARNLKLAITAGIGSDHVDLQAAQA--RGVTVAEETWSNSISVAEHTVMQILALVRNFVPSHQWIRD-GGWNIADCVQRSYDVEGMVGTVAGRIG  
 StufDH DKEGP-DCELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGHQVIN-GEWNVAIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 LesFDH DKEGP-DCELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGHQVIN-GEWNVAIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 CclFDH DKEGP-DCELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGHQVIN-GEWNVAIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 PtmFDH DKEGL-DSELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGHQVIN-GEWNVAIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 PtrFDH DKEGL-DSELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGHQVIN-GEWNVAIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 MdoFDH DKEGP-DSELEKHIEDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGHQVIN-GEWNVAIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 PpeFDH DKDGP-DCELDKHIQDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFVPGYQIVN-GEWKVAGIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 HvuFDH DKEGF-NSELEKHIEDMHVLITPFHPAYVTAERIKKAKTPELLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGYQVVK-GEWNVAGIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 TaeFDH DKEGL-NSELEKHIEDMHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGYQVVK-GEWNVAGIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 ZmaFDH DKEGP-NCELEKHIEDMHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGYQVVK-GEWNVAGIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 SoyFDH DKEGP-DSELEKHIPDAHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFLPGYQAVN-GEWNVAGIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 BnaFDH DKEGP-NCELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFVPGYNQVNV-GEWNVAGIAYRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 BolFDH DKEGP-DCELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFVPGYNQVNV-GEWNVAGIAYRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 AthFDH DKEGP-DCELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFVPGYNQVVK-GEWNVAGIAYRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 PsiFDH DKEGP-DCELEKHIPDLHVLITPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFVPGYQIVN-GDWKVAAISYRSYDLEKTVGTVAGRIG  
 PpiFDH DKEGP-DCELEKHIPDVHVLITPFHPAYVTAERIQEGKLKLLITAGIGSDHVDLQAAA--AGLTVAEVTSNSISVAEHTLMRILILVRNFVPGYQIVE-GDWKVAAISYRSYDLEKTVGTVAGRIG  
 PpaFDH DKDGP-DSELDKELADAHVLITPFHPAYVTKERLAKAKNLQLLITAGIGSDHVDLQAAA--KGLTVSEVTSNSVTVAEHTVLRILVLRNFVPAQVQVSE-GGWNVAAVHHAYDLIDRTVGTVGGGRIG  
 PnoFDH DKEGE-GSEFDKHLVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTSNSISVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQIQA-GEWNVAEVAKNEYDLENKVVGTVAVGRIG  
 PttFDH NKEGE-NSEFDKHLVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTSNSISVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQIVK-GEWNVAEVAKNEYDLENKVVGTVAVGRIG  
 SscFDH DKEGE-NSEFDKHLVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTSNSISVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQIQA-GEWDVAAAAKNEFDLEKVVGTVAVGRIG  
 CpoFDH DKEGS-NSTFERELVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTGCVSVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVAS-GEWDVAAAAKNEFDLEKVVGTVAVGRIG  
 AorFDH DKEGE-NSTFDKELVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTGCVSVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVITR-GEWDVAAAAKNEFDLEKVVGTVAVGRIG  
 AgyFDH DKEGE-NSVFERELVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTGCVSVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVST-GGWDVAAAAKNEFDLEKVVGTVAVGRIG  
 AcaFDH DKDGA-NSKFDQELVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTGCVSVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVAG-GDWDVAAAAKNEFDIEHKVVGTVAVGRIG  
 BbaFDH DKEGE-NSKFDQELVDAEVLITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTGCVSVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVAR-GDWDVAAAAKNEFDIEHKVVGTVAVGRIG  
 CboFDH DKEGE-TSELDKHIPDADVLITPFHPAYITKERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTGCVSVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVIIN-HDWEVAAAAKADYDIEKTVGTVAGRIG  
 OpaFDH DKEGE-NSVLEKNIPDADVLITPFHPAYITKERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAAANKTNGGITVAEVTGCVSVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVIIS-GGWNVAEIAHRAYDLEKTVGTVAGRIG  
 SceFDH DKDPEPTSTVDRELKDAEVLITPFHPAYISRNRIAEAPNLKLCVITAGIGSDHVDLQAAANE--RKITVEVTSNSVVAEHTVMTTLVLRNYNGGHQVAIN-GEWDIAGVAKNEYDLEKTVGTVAGRIG  
 MglFDH DKDGS-SSKFDELKDSIVITPFHPAYVTAERIDKAPKLKLAVTAGIGSDHVDLQAAANE--RKIGVEVTSNSVVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVYAEKNDWNVAEIAQNSYDLEKTVGTVGFRIG  
 CneFDH DKEGP-DSEFQKHLPDTELITPFHPGYLTAERLAKAKNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAANE--RKITVEVTSNSVVAEHTVMTTLVLRNFVPAHQVQVQIA-DDWNVAKIARNAFDLEKTVGTVGCRIG  
 SauFDH\_1 DNGED----LDKHLDMVIISAPFYAYMTRERIEKAPNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAASE--HNIGVEVTSNSVVAEHTVMDLLILVRNYEEGHRQVSE-GEWNLSQVGNHAHELQKTVGTVGFRIG  
 SauFDH\_2 DNGED----LDKHLDMVIISAPFYAYMTRERIEKAPNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAASE--HNIGVEVTSNSVVAEHTVMDLLILVRNYEEGHRQVSE-GEWNLSQVGNHAHELQKTVGTVGFRIG  
 SsaFDH DNEAD----LDKHLDMVIISAPFYAYMTRERIEKAPNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAASE--HNIGVEVTSNSVVAEHTVMDLLILVRNYEEGHRQVSE-GEWNLSQVGNHAHELQKTVGTVGFRIG  
 SpaFDH DNDGD----LEKHLDMVIISAPFYAYMTRERIEKAPNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAASE--HNIGVEVTSNSVVAEHTVMDLLILVRNYEEGHRQVSE-GEWNLSQVGNHAHELQKTVGTVGFRIG  
 SluFDH NGED----LDQHLSDADVIISAPFYAYMTRERIEKAPNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAASE--HDVAVEVTSNSVVAEHTVMDLLILVRNYEEGHRQVSE-GEWNLSQVGNHAHELQKTVGTVGFRIG  
 SsiFDH GEDD----LDQHLSDADVIISAPFYAYMTRERIEKAPNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAASE--HDISVEVTSNSVVAEHTVMTTLVLRNYEEGHRQVSE-GGWNLTVGNHAHELQKTVGTVGFRIG  
 SeqFDH SD-E-E----VDQHLSDADVIISAPFYAYMTRERIEKAPNLKLAVTAGIGSDHVDLQAAASE--NDLTVEVTSNSVVAEHTVMDLLILVRNFMEGHRQVSYN-GEWNLSQVGNHAHELQKTVGTVGFRIG  
 . . . \* : : : # # \* \* : \* : . \* . : : : # # \* : : \* \* \* : # # \* : : \* \* : : : : \* \* \* : : : # # \* : : : # # \* : : # # \* : #

Рис. 2.1. Сравнение последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – розовым. Красным и подчеркиванием отмечены остатки, консервативные для всех видов ФДГ. Голубым фоном отмечены остатки, образующие активный центр фермента, значком # – каталитически важные остатки.



```

LleFDH      WRTMPH-----HAMTPHTSGTTLSAQARYAAGVREILECWFDGK-PIREDYLIVHNGRLAGVGSHSYSKGNSTKGVEQLDLV---
LegFDH      WRSMPN-----HAMTPHTSGTTLSAQARYAAGVREILECWLGNK-PIREEYLIVSQGHLAGVGSHSYSAGNTTSGTEQAAELV---
FtuFDH      WRTMPY-----NGMTPHTSGTTLSAQARYAAGTREILECFFSGK-EIRDEYIVKNGELAGVGAHSYK-----
IliFDH      WRTMPH-----HGMTPHISGTSLSAQARYAAGVREILECWFEGR-PIREEYLIVDGGKLAGAGAHSYSAGNATGGSEAARFKKSV
PseFDH      WRTMPY-----NGMTPHISGTTLTAQARYAAGTREILECFFEGR-PIRDEYLIVQGGALAGTGAHSYSKGNATGGSEAAKFKKAV
BbrFDH      WRSMPH-----HGMTPHISGSSLPAQARYAAGTREILECWFDGR-AIRTEYLIVDQGRLAGAGAHAYTPGDTTAGSEAARFHP--
BpeFDH      WRSMPH-----HGMTPHISGSSLPAQARYAAGTREILECWLDGR-AIRTEYLIVDQGRLAGAGAHAYTPGDTTAGSENAARFHP--
BceFDH      WRTMPF-----NGMTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCWFDGK-PIRNEYLIVDGGTLAGTGAQSYRLT-----
BstFDH      WRAMPF-----NGMTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCWFDGR-PIRNEYLIVDGGTLAGTGAQSYRLT-----
BpyFDH      WRTMPF-----NGMTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCWFDGK-PIRNEYLIVDGGTLAGTGAQSYRLT-----
BmuFDH      WRAMPF-----NGMTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCWFFRR-PIREAYLIVDGGTLAGTGEQSYRLT-----
MavFDH      WRTMPN-----HAMTPHISGSSLSAQARYCAGTREILEDWFAGR-PIRSEYLIVEGGKFAGTGAKSYAQ-----
StuFDH      WRYMPN-----QAMTPHISGTIDAQLRYAAGTKDMLDRYFKGE-DFPAENYIVKDGELAPQYR-----
LesFDH      WRYMPN-----QAMTPHISGTIDAQLRYAAGTKDMLDRYFKGE-DFPAENYIVKDGELAPQYR-----
CclFDH      WRYMPN-----QAMTPHVSGTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-DFPVQNYIVKAGELAPQYR-----
PtmFDH      WRYMPN-----QAMTPHISGTIDGQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-EFPPQNYIVKEGKLASQYL-----
PtrFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTIDGQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-EFPPQNYIVKEGKLASQYL-----
MdoFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTIDAQLRYAAGTKDMLDRYFKGE-EFPAQNYIVKDGKLASQYL-----
PpeFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-DFPAQNYIVKDGKIASQYQ-----
HvuFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-EFPVENYIVKEGELASQYK-----
TaeFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-DFPAENYIVKEGELASQYK-----
ZmaFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTIDAQLRYADGVRDMLNRYFKGE-DFPVQNYIVKEGQLASQYQ-----
SoyFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTIDAQLRYAAGVKDMLDRHFKGE-DFPEQNYIVKEGQLASQYR-----
BnaFDH      WRYMPN-----QAMTPHISGTIDAQLRYAAGTKDMLEKYFKGE-DFPAQNYIVKDGELAPQYR-----
BolFDH      WRYMPN-----QAMTPHISGTIDAQLRYAAGTKDMLEKYFKGE-DFPAQNYIVKDGELAPQYR-----
AthFDH      WRYMPN-----QAMTPHTSGTIDAQLRYAAGTKDMLERYFKGE-DFPTENYIVKDGELAPQYR-----
PsiFDH      WRSMPN-----HAMTPHISGTIDAQIRYAAGTKDMLDRYFRGE-DFPQHYIVKEGKLASQYL-----
PpiFDH      WRSMPN-----HAMTPHISGTIDAQIRYAAGTKDMLDRYFKGE-DFPSQNYIVKEGKLASQYL-----
PpaFDH      WRYMPN-----HAMTPHISGTTLDAQKRFAAGTKDMIDRWLKHE-AFPEQNYIVREGKLASQYL-----
PnoFDH      LRYAQNPW---GGGNAMVPHMSGTSIDAQQRYAAGTKAILDSYFSGRHDYKAEDLIVYNGDYATKSYGLRK---
PttFDH      LRYAQNPW---GGGNAMVPHMSGTSIDAQKRYADGTKAILDEYFSGRENYRPEDLIVHKGDYATKAYGQRK---
SscFDH      LRYAKNPF---GGGNAMVPHMSGTSLDAQKRYADGTKAILQSYLSGKHDYRPEDLIVIGGDYATKAYGERAKSSGTAGANKAFS---
CpoFDH      LRYVQGPW---GGGNAMVPHMSGTSIDAQIRYAQGTKDILESYFSGKFDYKQEDLIVHQGDYVTKAYGQRKIQEEQRN---
AorFDH      LRYVQGPW---GGGNAMVPHMSGTSIDAQIRYAQGTKAILESYFSGRHDYKNEDLIVRGGDYVTKAYGQRNKA---
AgyFDH      LRYVQGPW---GGGNAMVPHMSGTSIDAQIRYAEGTKAILESYLSGKHDYKPEDLIVYKGDYAN----
AcaFDH      LRYTQGPW---GGGNAMVPHMSGSSIDAQVRYAAGTKAILESYFSGKYDYRPEDLIVHAGDYATKSYGQRK---
BbaFDH      LRTAKNPF---GGGNAMVPHMSGTSLDAQKRYADGTKAILTSYFSGKHDYRPEDLIVHKGDYATKAYGQRK---
CboFDH      WRDMRNKY---GAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILNGEYVTKAYGKHDKK---
OpaFDH      WRSMANKY---GAGNAMTPHYSGSVIDAQVRYAQGTKNILESFFTQKFDYRPQDIILNGKYKTKSYG-ADK-----
SceFDH      WRTMDNKD---HVGNAMTVHISGTSLHAQKRYAQGVKNILNSYFSKKFDYRPQDIIVQNGSYATRAYG-QKK-----
MglFDH      WRGMRNIWNPTLGGGNAMTSHISGTSLDAQARYLAGTKEILENLWSGK-PQKQVNVIVENGKVSPAYGQH-----
CneFDH      WRHMANPL---GGGNGMVPHYSGTTLDAQTRYAEGTKEIIRRYFAGE-EQNPVNLIVTNGDYASKSYGNRDEKKKEQSVNAAK-----
SauFDH_1    WRTMPR-----NAMTVHYSGMTLEAQKRIEDGVKDILERFFNHE-PFQDKDIIVASGRIASKSYTAK-----
SauFDH_2    WRTMPR-----NAMTVHYSGMTLEAQKRIEDGVKDILERFFNHE-PFQDKDIIVASGRIASKSYTAK-----
SsaFDH      WRTMPR-----NGMTVHYSGMTLEAQARIEEGVKDILTRFFNHE-PFQDKDIIVDAGKISSKSYTAK-----
SpaFDH      WRNMPR-----NAMTVHYSGMTLEAQVRIEEGVKDILNRFFNHE-PFQSKDVIVDGGQITSASYNAK-----
SluFDH      WRTMPR-----NGMTIHYSGMTLESQRIEDGVKDILTRFFNHE-PFQKDIIVDSGRIASSYTAK-----
SsiFDH      WRTMPR-----NAMTIHYSGMVIEAQLRIEKGVKDLLTHFFDET-PFPKEDVIVNGGQITSQSYAKHDDSNN-----
SeqFDH      WRTMPR-----NAMTIHYSGMTLEAQKRIEKGVKGFLTNFFNEE-AYDEKDVVVSGGTITNSSYKSK-----
: * * * :      : * * * # : * * * : * * * : * * * :      : * * * :

```

Рис. 2.1. Сравнение последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – розовым. Красным и подчеркиванием отмечены остатки, консервативные для всех видов ФДГ. Голубым фоном отмечены остатки, образующие активный центр фермента, значком # – каталитически важные остатки.

На рисунке 2.1 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из различных организмов: для сравнения в нем приведены наиболее интересные представители бактериальных (в том числе и патогенных), растительных, а также ферментов из дрожжей и микроскопических грибов. Тем не менее, как видно из рисунка 2.1, все рассмотренные ферменты разделились на 4 группы: помимо бактериальных, растительных и дрожжевых формиадегидрогеназ, появилась еще одна группа, состоящая из ФДГ из различных видов стафилококков. Последние ожидаемо обладают признаками бактериальных ферментов, однако включают и некоторые последовательности, характерные для ФДГ из других типов источников.

Первое, чем обращает на себя внимание данное выравнивание, это существенное различие в строении N-концевых участков рассмотренных ферментов. Главной отличительной особенностью растительных ФДГ является наличие сигнального пептида на N-конце синтезируемого профермента, который отвечает за транспортировку ФДГ в митохондрии, где он впоследствии отщепляется [13]. У большинства бактериальных и дрожжевых ФДГ сигнальные пептиды отсутствуют, однако ряд ФДГ из патогенных микроскопических грибов также обладают N-концевой последовательностью, подобной растительному сигнальному пептиду, который может также подвергаться процессированию в зависимости от условий [38]. По-видимому, развитие сигнального пептида происходило постепенно с течением эволюции и по мере усложнения организма, с возникновением необходимости транспортировки фермента сначала в разные компартменты и органеллы клетки, а затем и в разные части организма. Остаток аргинина, после которого происходит отщепление сигнального пептида у растительных и грибных ФДГ на рис. 2.1 отмечен желтым фоном.

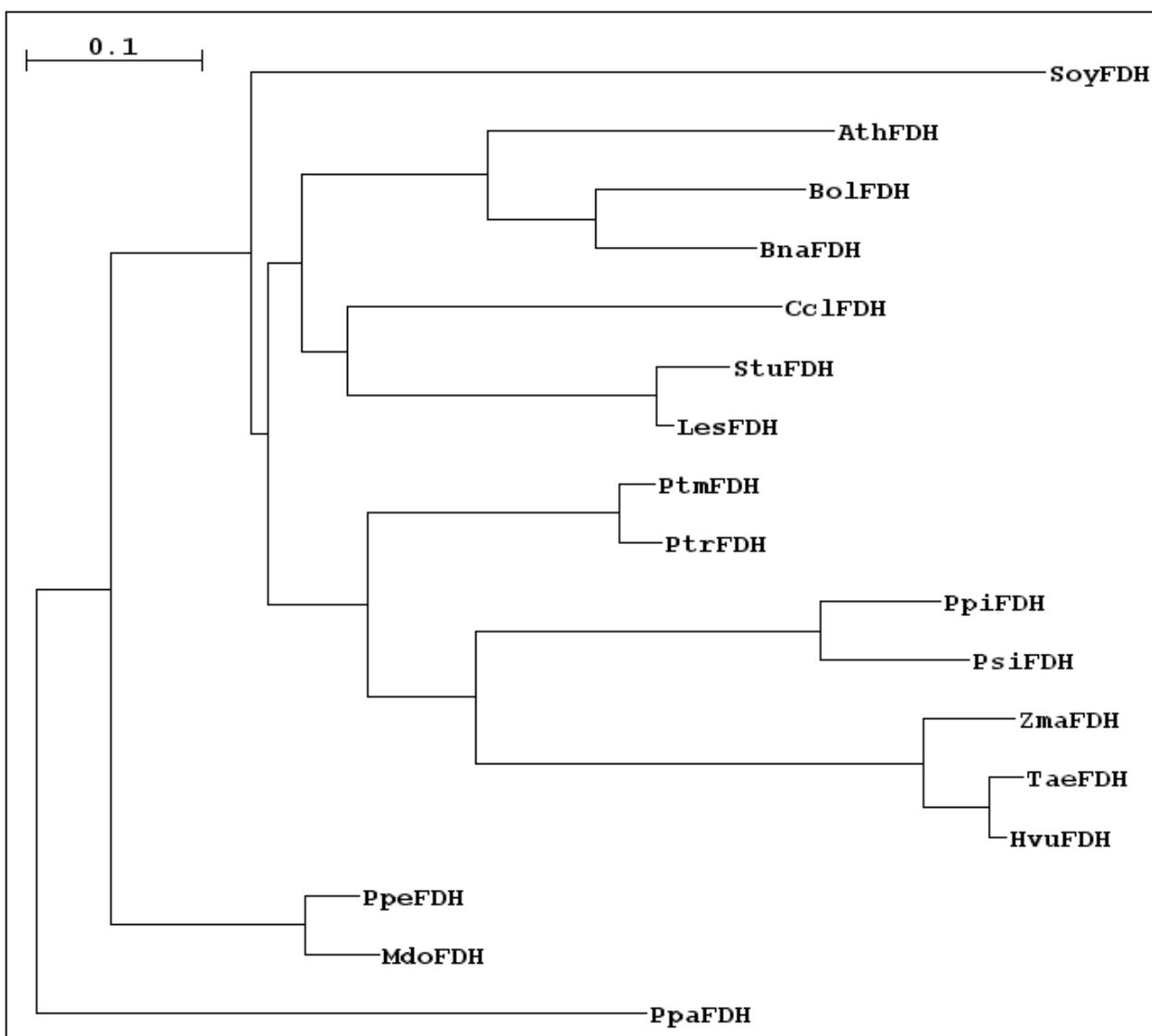


Рис. 2.2. Филогенетическое дерево N-концевых последовательностей (сигнальных пептидов) ФДГ растений. Расшифровку обозначений ферментов см. в табл. 2.1.

На рис. 2.2 представлено филогенетическое дерево сигнальных пептидов растительных ФДГ, приведенных в таблице 2.1. Из приведенного дерева видно, что растительные ферменты хорошо поддаются классификации именно по N-концевому участку. На данной схеме видно, что ферменты из сои *Glycine max* (SoyFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PpaFDH) образовали отдельные эволюционные группы. Это связано с тем, что сигнальные пептиды ФДГ из данных растений являются наиболее длинными среди описанных ферментов (см. рис. 2.1) и сильно отличаются по аминокислотному составу от сигнальных пептидов ФДГ из других растений. Остальные растительные ФДГ ожидаемо разделяются по семействам: хорошо видны капустоцветные *Brassicaceae*

(AthFDH, BolFDH, BnaFDH), пасленовые *Solanaceae* (LesFDH и StuFDH), ивовые *Salicaceae* (PtmFDH и PtrFDH), хвойные *Pinaceae* (PsiFDH и PpiFDH), злаки *Poaceae* (ZmaFDH, TaeFDH, HvuFDH), а также розовые *Rosaceae* (PpeFDH и MdoFDH).

Такое разделение, по-видимому, связано с тем, что сигнальный пептид отвечает за транспортировку фермента в клетке, и можно предположить, что в сходных организмах механизм и сигнальные пути транспорта также похожи.

Для всех бактериальных формиаатдегидрогеназ, за исключением двух представителей стафилококковых (*Staphylococcus saprophyticus* и *Staphylococcus aureus\_2*), сигнальный пептид отсутствует, поскольку у бактерий отсутствует деление клетки на компартменты, и также отсутствует необходимость в транспорте ферментов. В то же время, наличие удлиненного N-конца у двух вышеупомянутых бактериальных ферментов может свидетельствовать об их своеобразном пути эволюции.

Для бактериальных ФДГ (за исключением стафилококковых) характерно наличие жесткой N-концевой петли, обогащенной остатками пролина, однако ее происхождение и назначение пока остается не до конца изученным. По всей видимости, взаимодействие этого достаточно большого участка полипептидной цепи с другими аминокислотными остатками поддерживает структуру белковой глобулы и определяет высокую термостабильность, характерную для данного вида ферментов.

Анализ выравнивания приведенных аминокислотных последовательностей с учетом типовой принадлежности организмов позволяет сделать важное заключение. Несмотря на видимое различие в большом количестве позиций, формиаатдегидрогеназы из бактерий, растений и грибов обладают большой гомологией не только внутри групп приведенных организмов, но и между группами. На рис. 2.1 фрагменты, сохраняющиеся во всех представленных ФДГ вне зависимости от типовой принадлежности, отмечены красным цветом и подчеркиванием. Ряд консервативных каталитически важных мотивов (например, так называемый *fingerprint* G(A)XGXXG или мотив PQP) отмечен голубым фоном

– из рисунка хорошо видно, что практически для всех ФДГ даже при сильно измененном окружении такие мотивы сохраняются, и, наоборот, их изменение в ходе эволюции сильно сказывается на свойствах фермента. Показательным является факт введения аминокислотной замены в формиатдегидрогеназе из мха *Physcomitrella patens*. В консервативном мотиве RQP, характерном для всех известных ФДГ, вместо первого остатка пролина у данного фермента находится остаток аланина (отмеченный знаком «<» на рис. 2.1). Замена данного остатка аланина на остаток пролина привела к увеличению температурной стабильности и ухудшению каталитических параметров PpaFDH [unpublished data].

Отдельно стоит отметить, что стафилококковые формиатдегидрогеназы, и в особенности SauFDH, обладают минимальной степенью идентичности с другими ФДГ. Однако если их различие с растительными и дрожжевыми ферментами было предсказуемо, то низкий процент гомологии с ФДГ из бактерий других родов стал неожиданным. Тем не менее, сравнение SauFDH с типичными представителями бактериальных (PseFDH), дрожжевых (CboFDH) и растительных (AthFDH) ФДГ показывает, что даже при такой низкой гомологии у первого сохранено большинство консервативных аминокислотных остатков.

Сравнение известных на данный момент аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников позволяет определить 71 консервативный остаток, что составляет в среднем около 20% от всех аминокислот, составляющих формиатдегидрогеназы. Анализ положения данных остатков на трехмерных структурах ФДГ (PseFDH, AthFDH, SoyFDH и т.д.) показал, что функции этих остатков сильно отличаются друг от друга. Некоторые остатки, например, Lys2 и Asp89 (здесь и далее – нумерация остатков по PseFDH), образующие ионную пару, обеспечивают стабильность структуры субъединицы, другие вовлечены в межсубъединичное взаимодействие (Arg163, Asn164, Trp177, Ala180, Asp188). Другие остатки являются ответственными за процесс катализа: это Pro97, Phe98, Ile122, Asn146, (Ala/Gly)198, Gly200, Gly203, Arg284, Gln313 и His332 (на рис. 2.1 отмечены знаком #), а также остаток Cys255, который отвечает за связывание адениновой группы  $NAD^+$ , и остаток Asp308, карбоксильная группа

которого образует водородную связь с амидной группой никотинамидной группы  $\text{NAD}^+$  [23, 39].

Подвижность некоторых остатков (Phe98, Cys255, Gln313 и His332), играющих ключевую роль в катализе, существенно ограничена вследствие того, что они расположены в соседстве с остатками пролина. Наиболее ярким примером является консервативный мотив PQP – Pro312-Gln313-Pro314.

В то же время для остатка Ile/Val122 наблюдается противоположная картина: в данном положении присутствуют разные остатки, поскольку водородная связь с молекулой субстрата образуется за счет взаимодействия с атомом кислорода карбонильной группы основной цепи, а не бокового радикала [39]. Поэтому более важным фактором в данном случае является не сохранение самого остатка в 122 положении, а поддержание гибкости полипептидной цепи вокруг этого положения, которую обеспечивают два остатка глицина, Gly121 и Gly123 (на рис. 2.1 расположены на строке, отмеченной знаком «= $\Rightarrow$ »). Остатки Gly200 и Gly203 (на той же строке рис. 2.1) выполняют такую же функцию: большая лабильность данного участка полипептидной цепи обеспечивает лучшее связывание молекулы  $\text{NAD}^+$  в активном центре [16].

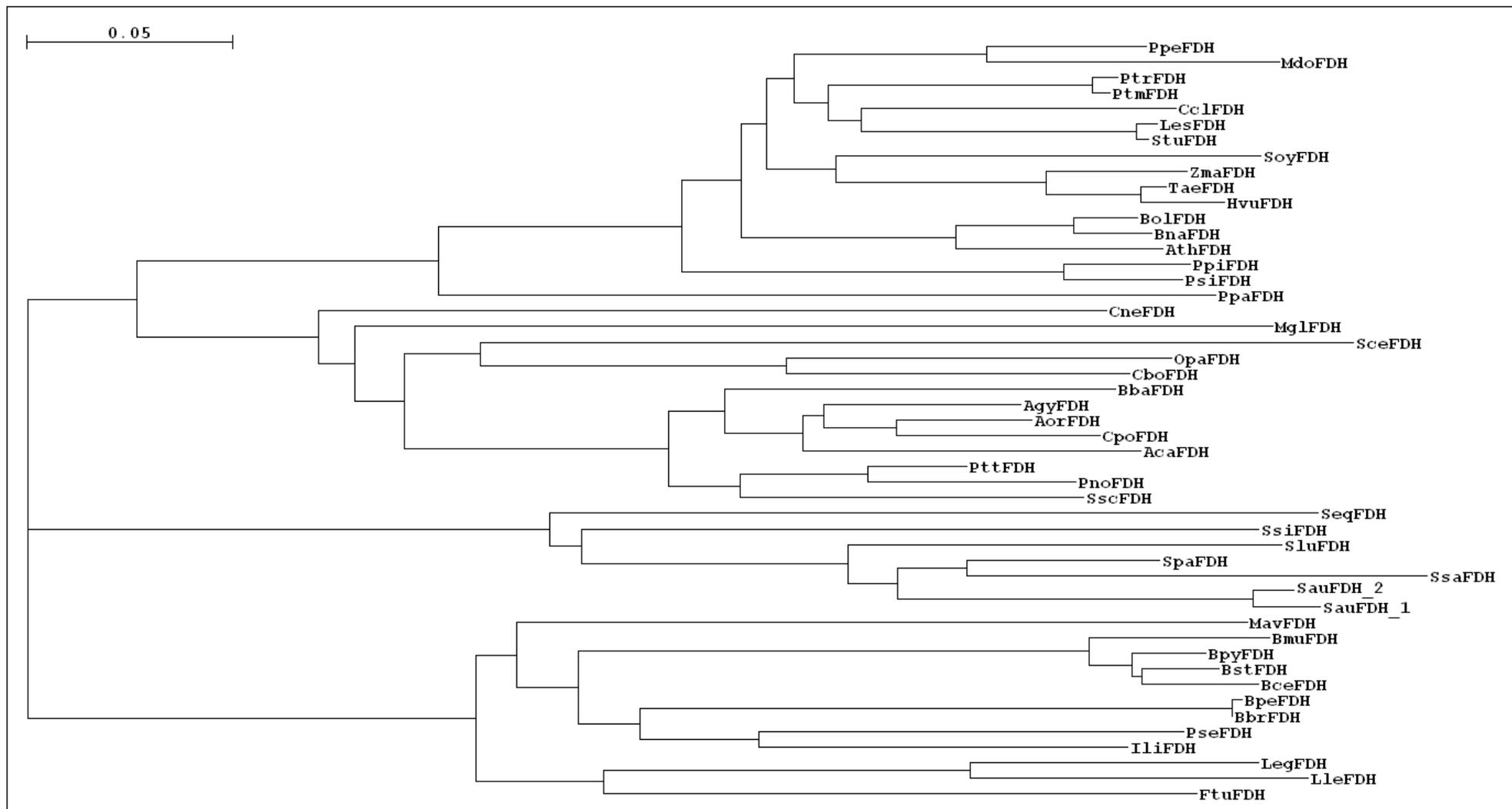


Рис. 2.3 Филогенетическое дерево форматдегидрогеназ из бактерий, растений, дрожжей и микроскопических грибов, рассмотренных в данной работе. Расшифровка обозначений ферментов представлена в табл. 2.1.

На рис. 2.3 представлено филогенетическое дерево форматдегидрогеназ, приведенных в таблице 2.1. Из него хорошо видно, что ФДГ из сходных типов источников образуют отдельные эволюционные ветви. Например, на ранних этапах эволюции произошло разделение между царствами организмов: на рисунке видны эволюционные ветви, образованные форматдегидрогеназами из бактерий, а затем, чуть позже, из растений и дрожжей (а также микроскопических грибов). Заметно, что ФДГ из грибов и дрожжей хорошо классифицируются: хорошо просматриваются отдельные классы *Eurotiomycetas*, *Onygenales*, *Pleosporales* и *Sacharomycetas*. Также и бактериальные ФДГ, указанные в таблице 2.1, делятся на несколько ветвей: отчетливо видно деление внутри типа протеобактерий: альфа-протеобактерии, представленные *Inquilingus*, бета-протеобактерии (*Burkholderia* и *Bordetella*) и гамма-протеобактерии (*Legionella* и *Pseudomonas*).

Как уже было указано выше, помимо основных трех царств, выделяется еще одна группа ферментов – ФДГ из стафилококков, в том числе и *Staphylococcus equorum* (SeqFDH), *Staphylococcus lugdunensis* (SluFDH), а также *Staphylococcus aureus* (SauFDH\_1 и SauFDH\_2). Стафилококковые ферменты не принадлежат ни к одной из вышеперечисленных групп, более того, отделившись еще на уровне доменов организмов, они формируют собственную эволюционную ветвь. Отсюда вытекает предположение о происхождении данного фермента: учитывая развитый механизм горизонтального переноса генов, а также недавно открытый перенос генетической информации от эукариот к прокариотам [40], вполне вероятно, что данный фермент является продуктом конвергентной эволюции.

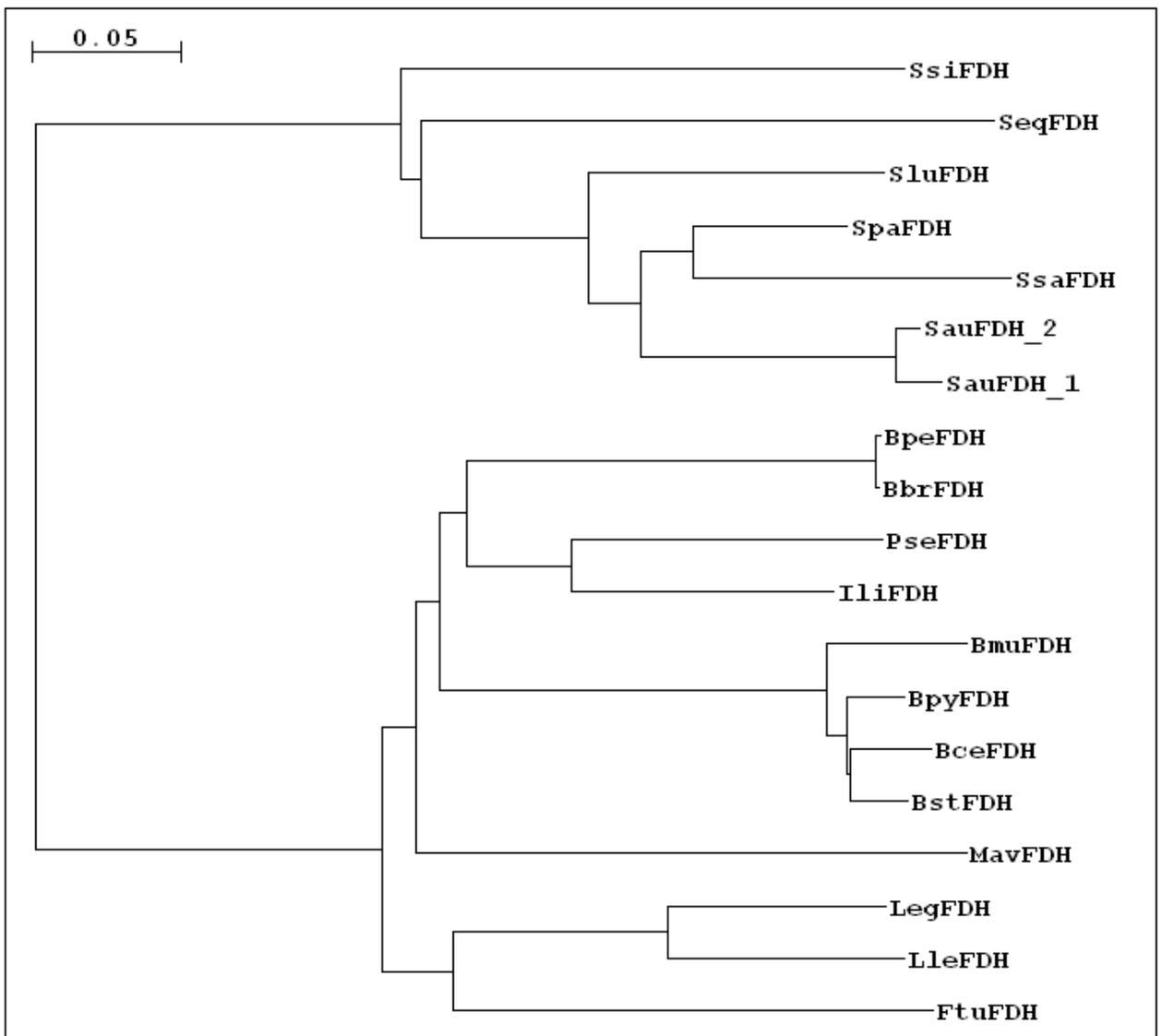


Рис. 2.4. Филогенетическое дерево ФДГ из патогенных бактерий. Расшифровка обозначений ферментов представлена в табл. 2.1.

На рис. 2.4 представлено филогенетическое дерево форматадегидрогеназ из различных бактерий, в том числе и патогенных: *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis*, различных представителей рода *Clostridiaceae* и *Staphylococcaceae*. На нем более наглядно показано, что стафилококковые ФДГ на самых ранних стадиях эволюционного разделения образуют собственную ветвь, проявляя высокий процент гомологии уже внутри своего собственного домена, что характерно для всех ФДГ. Форматадегидрогеназы из других же патогенов разделяются на отдельные классы уже внутри другой ветви: на рис 2.4. кроме отдельной ветви стафилококковых *Staphylococcaceae* видны семейства буркхолдерий *Burkholderiaceae* (BmuFDH, BstFDH, BpyFDH, BceFDH) и

бордетелл *Alcaligenaceae* (VpeFDH и VbrFDH), представляющих отряд *Burkholderiales*, а также отдельные представители семейства спиралевидных бактерий *Rhodospirillaceae* (PiFDH) и семейства палочковидных *Pseudomonadaceae* (PseFDH), и семейства легионелл *Legionellaceae* (LegFDH и LleFDH), возбудителя туляремии *Francisellaceae* (FtuFDH) и палочку Коха *Mycobacteriaceae* (MavFDH).

## 2.5. Пространственная структура формиатдегидрогеназ

За долгое время исследования ФДГ в литературных источниках накопилось достаточно большое количество данных о пространственных структурах. Тем не менее, достоверные данные по структуре в различных условиях (двойной и тройной комплексы с коферментом и ингибитором) имеются только для ряда ферментов: наиболее исследованными на сегодняшний день являются ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, дрожжей *C. boidinii* и растения *A. thaliana*.

Вне зависимости от источника, для всех  $\text{NAD}^+$ -зависимых формиатдегидрогеназ общей чертой является структуры димера, в каждой из субъединиц которого находятся кофермент- и субстрат-связывающий домены. Двойной и тройной комплексы, [ФДГ- $\text{NAD}^+$ ] и [ФДГ- $\text{NAD}^+$ -азид] соответственно, представляют собой структурные аналоги фермент-субстратного комплекса в переходном состоянии. В этом состоянии – холо-форме – белковая глобула становится более компактной, а фермент переходит в «закрытую» конформацию. В таблице 2.2 представлен список опубликованных трехмерных структур формиатдегидрогеназ на настоящий момент.

Таблица 2.2.

Решенные структуры формиадегидрогеназ из различных источников.

| 1. Описание структуры   | Разрешение | Код PDB |
|---|------------|---------|
| <b>ФДГ из бактерий</b>  |            |         |
| Тройной комплекс ФДГ-NAD <sup>+</sup> -азид (холо-форма) для фермента из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101 [39] | 2,05 Å     | 2NAD    |
| Открытая конформация (апо-форма) для фермента из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101 [39]                         | 1,80 Å     | 2NAC    |
| Апо-форма ФДГ из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101 [41]   | 2,10 Å     | 2GO1    |
| Тройной комплекс ФДГ-NAD-азид (холо-форма) для фермента из бактерий <i>Moraxella sp.</i> [42]                     | 1,95 Å     | 2GSD    |
| Двойной комплекс для фермента из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101 [ФДГ-НСОО <sup>-</sup> ] [41]                | 2,28 Å     | 2GUG    |
| Апо-форма формиадегидрогеназы из бактерий <i>Moraxella sp.</i> С-1 в закрытой конформации [42]                    | 1,96 Å     | 3FN4    |
| Апо-форма формиадегидрогеназы из бактерий <i>Granulicella mallensis</i> [43]                                      | 1,80 Å     | 4XYG    |
| Тройной комплекс ФДГ-NADP <sup>+</sup> -азид (холо-форма) для фермента из <i>Granulicella mallensis</i> [43]      | 1,38 Å     | 4XYB    |
| <b>ФДГ из дрожжей</b>   |            |         |
| Апо-форма мутантной ФДГ из <i>C. boidini</i> с заменой K47E [44]  | 1,70 Å     | 2FSS    |
| Апо-форма мутантной ФДГ из <i>C. boidini</i> с измененным С-концом [44]   | 1,55 Å     | 2J6I    |
| Апо-форма формиадегидрогеназы из <i>C. boidini</i> [45]   | 1,75 Å     | 5DNA    |
| Тройной комплекс ФДГ-NAD <sup>+</sup> -азид (холо-форма) для фермента из <i>C. boidini</i> [45]                   | 1,50 Å     | 5DN9    |
| <b>ФДГ из высших растений</b>   |            |         |
| Тройной комплекс ФДГ из <i>A. thaliana</i> [ФДГ-NAD <sup>+</sup> -азид] [46]                                      | 2,00 Å     | 3N7U    |
| Апо-форма ФДГ из <i>A. Thaliana</i> [47]  | 1,70 Å     | 3NAQ    |
| Апо-форма ФДГ из <i>A. thaliana</i> , кристаллизация в космосе [47]   | 1,30 Å     | 3JTM    |

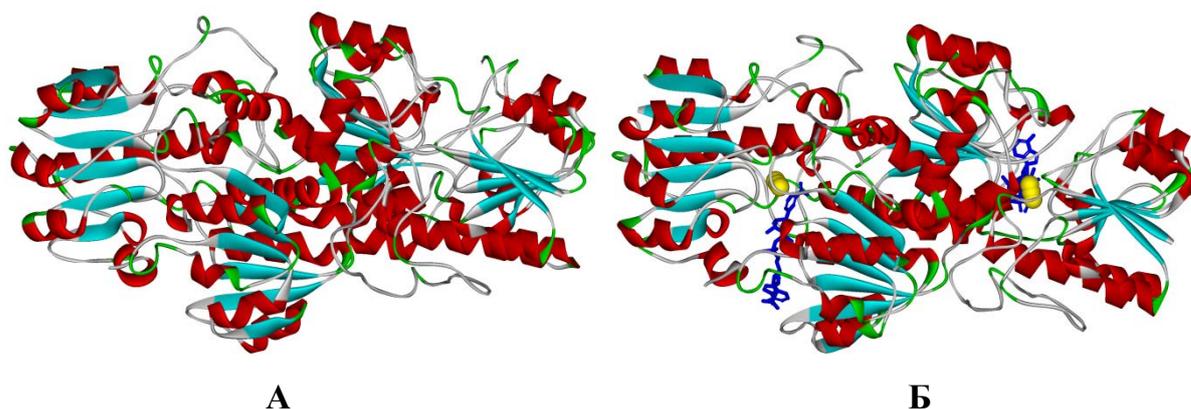
Пространственные структуры бактериальных ФДГ являются наиболее детально изученными. В 1994 году получены структуры апо- и холо- формы PseFDH с разрешением 1,8 и 2,05 Å соответственно [39]. Для фермента из бактерий *Moraxella sp.* С-2 также получены структуры свободного фермента и тройного комплекса с коферментом и ингибитором с атомным разрешением [42].

Кроме того недавно были получены апо- и холо-формы структуры ФДГ из бактерий *Granulicella mallensis* с разрешением 1,8 и 1,38 Å соответственно [43].

Кристаллические структуры дрожжевых ферментов представлены только ФДГ из *S. boidini*. До недавнего времени структура, полученная немецкими исследователями [44] при поддержке фирмы «Evonik», широко использующей этот фермент на практике для регенерации NADH, оставалась единственной. Помимо этого, эксперименты по кристаллизации и решению структуры проводились не для нативного фермента, а для мутантных форм. Однако в 2016 году были опубликованы данные о пространственной структуре нативной CboFDH: американский коллектив получил данные об апо- и холо-формах фермента с разрешением 1,75 и 1,50 Å соответственно [45]. Примечательно, что исследователи также планируют использовать фермент в промышленности, но уже не только в качестве средства регенерации NADH, но и для фиксации углекислого газа воздуха.

Структурные исследования растительных формиаатдегидрогеназ опубликованы только для ФДГ из модельного растения *A. thaliana*. Для данного фермента также были получены структуры апо- и холо-форм: для тройного комплекса – с разрешением 2,0 Å, а для апо-фермента – две структуры с разрешением 1,7 и 1,3 Å [47]. Для структуры апо-фермента с наиболее высоким разрешением (3JTM, 1,3Å) кристаллы фермента была получены в условиях невесомости.

На примере трехмерной структуры наиболее детально изученной формиаатдегидрогеназы – из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 – рассмотрим структурные изменения при функционировании ФДГ. На рисунке 2.5 представлена структуры апо- холо-формы данного фермента.



**Рис. 2.5.** Апо-форма (А) и холо-форма (Б) формиатдегидрогеназы из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 [42]. Синим цветом изображены молекулы  $\text{NAD}^+$ , желтым – молекулы азиды.

Фермент PseFDH, как типичный представитель формиатдегидрогеназ, описанных ранее в разделе 2.1, является димером, состоящим из двух идентичных субъединиц. Каждая субъединица образована двумя доменами: периферийным каталитическим (остатки 1-146 и 334-400) и кофермент-связывающим (остатки 147-333) [42]. Активный центр фермента расположен между двумя доменами и сформирован аминокислотными остатками только одной субъединицы. Для бактериальных ФДГ характерно наличие более длинной N-концевой части по сравнению с ФДГ из других источников (выравнивание 2.1). Этот участок полипептидной цепи представляет собой протяженную петлю, богатую остатками пролина, вследствие чего обладающую большой жесткостью. Взаимодействуя с другими остатками субъединицы и таким образом поддерживая структуру белковой глобулы, эта пролиновая петля обеспечивает более высокую температурную стабильность бактериальным ФДГ по сравнению с ферментами из других источников – нарушение связывания пролиновой петли с остальной глобулой в 6 раз увеличивает скорость температурной инактивации фермента [48].

Для растительных ФДГ, как было указано выше, характерно наличие на N-конце сигнального пептида. Однако его функция заключается в транспортировке фермента в нужные отделы, а отсутствие в его составе большого количества остатков пролина объясняет их низкую температурную стабильность.

Как видно из рисунка 2.5, переход от апо-формы к холо-форме приводит к значительным структурным изменениям фермента. На этом факте, характерном для всех ФДГ, в частности, основывается методика определения концентрации активного фермента [49].

## **2.6. Основные свойства формиатдегидрогеназ**

### **2.6.1. Кинетические параметры формиатдегидрогеназ**

В таблице 2.3 приведены суммарные данные по описанным в литературе ФДГ из бактерий, дрожжей, грибов и растений. Представленные данные позволяют сделать несколько выводов.

Бактериальные ферменты являются наиболее устойчивыми к тепловой денатурации. Как уже было описано в предыдущем разделе, их высокая термостабильность, по-видимому, объясняется наличием пролиновой петли на С-конце, обеспечивающей жесткость и стабильность белковой глобулы. Однако существенным недостатком ФДГ из бактерий являются большие показатели констант Михаэлиса как по  $\text{NAD}^+$ , так и по формиату.

Растительные формиатдегидрогеназы обладают более низкими значениями констант Михаэлиса по сравнению с ферментами из других источников, что делает эти ферменты перспективным для регенерации кофактора в системах синтеза оптически активных соединений. В то же время главным недостатком ФДГ из растений является их невысокая температурная стабильность. В настоящее время достаточно актуальны работы, направленные на улучшение этого параметра методом направленного мутагенеза [36, 50].

Бактериальные ферменты являются лучшими по значениям удельной активности по сравнению с растительными и дрожжевыми формиатдегидрогеназами.

Практически все изученные ФДГ, растительные и бактериальные, обладают высокой специфичностью к коферменту  $\text{NAD}^+$ . Исключением являются описанная в 2010 году ФДГ из патогенных бактерий *Burkholderia stabilis*, которая в 26 раз более эффективна в реакции с  $\text{NADP}^+$ , чем с  $\text{NAD}^+$  [51], а также

бифункциональная формиатдегидрогеназа из бактерий *Granulicella mallensis*, катализирующая реакцию как с  $\text{NAD}^+$ , так и с  $\text{NADP}^+$  [43]. Работы по изменению  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  специфичности регулярно проводятся с ФДГ из различных источников [37], [52-55], поскольку такое изменение свойств является очень выгодным с точки зрения регенерации  $\text{NADPH}$ , используемого многими дегидрогеназами в качестве кофактора. Мутантная PseFDH с измененной коферментной специфичностью была получена в нашей лаборатории в 1993 г., и такой фермент успешно использовали для регенерации  $\text{NADPH}$  [56, 57].

Таблица 2.3.

## Свойства формиаатдегидрогеназ из различных источников

|          | Источник рекомбинантного фермента         | краткое название | $k_{cat}^{NAD^+}$ , $c^{-1}$ | $k_{cat}^{NADP^+}$ , $c^{-1}$ | $K_M^{NAD^+}$ , мМ | $K_M^{HCOO^-}$ , мМ                                     | $K_M^{NADP^+}$ , мМ | $(k_{cat}^{NAD^+}/K_M^{NAD^+}) / (k_{cat}^{NADP^+}/K_M^{NADP^+})$ | Удельная активность, ед/мг                           | Ссылка             |
|----------|---|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------|---|---------------------|---|--|--------------------|
| грибы    | <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>        | CsuFDH1          | нд                           | нд                            | 0,074              | 4,1   | нд                  | нд  | нд   | [58]               |
|          |   | CsuFDH2          | нд                           | нд                            | 0,14               | 3,6   | нд                  | нд  | нд   |                    |
| дрожжи   | <i>Candida boidini</i>                    | CboFDH           | 5,6                          | нд                            | 0,03               | 4,0   | нд                  | нд  | нд   | [45]               |
|          | <i>Candida methylica</i>                  | CmeFDH           | 1,4                          | нд                            | 0,055              | нд  | нд                  | нд  | 2,1 (NAD <sup>+</sup> )                              | [16]               |
|          | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>           | SceFDH           | 6,5                          | нд                            | 0,036              | 5,5   | нд                  | >3 x 10 <sup>9</sup>  | 10 (NAD <sup>+</sup> )                               | [54]               |
|          | <i>Ogataea parapolymorpha</i>             | OpaFDH           | 4,6                          | нд                            | 0,013              | 2,0   | нд                  | нд  | нд   | [unpublished data] |
| бактерии | <i>Pseudomonas sp.101</i>                 | PseFDH           | 7,3                          | нд                            | 0,06               | 6,5   | >400                | $2,4 \times 10^3$<br>(0,3 М HCOO <sup>-</sup> )                   | 10 (NAD <sup>+</sup> )                               | [59]               |
|          | <i>Bacillus sp. F1</i>                    | BacFDH           | 6,67                         | 1,07                          | 0,091              | 19,6 (NAD <sup>+</sup> ),<br>39,1 (NADP <sup>+</sup> )  | 3,5                 | $2,4 \times 10^2$   | 6,0 (30°C);<br>13,1 (50°C)                           | [60]               |
|          | <i>Burkholderia stabilis</i> 15516        | BstFDH           | 1,66                         | 4,75                          | 1,43               | 55,5  | 0,16                | 0,04  | 5,3 (NADP <sup>+</sup> ),<br>2,0 (NAD <sup>+</sup> ) | [51]               |
|          | <i>Moraxella sp C1</i>                    | MorFDH           | 7,3                          | нд                            | 0,08               | 7,7   | нд                  | нд  | 10 (NAD <sup>+</sup> )                               | [61]               |
|          | <i>Mycobacterium vaccae</i> N 10          | MycFDH           | 7,3                          | нд                            | 0,089              | 6,0   | нд                  | нд  | 10 (NAD <sup>+</sup> )                               | [62]               |
|          | <i>Granulicella mallensis</i><br>MP5ACTX8 | GraFDH           | 5,8                          | 4,0                           | 6,50               | 80,0 (NAD <sup>+</sup> ),<br>200,0 (NADP <sup>+</sup> ) | 0,85                | 0,19  | нд   | [43]               |
| растения | <i>Lotus japonicus</i>                    | LjaFDH           | 1,2                          | 0,005                         | 0,026              | 6,1   | 29,5                | >2,5 x 10 <sup>5</sup>  | нд   | [18]               |
|          | <i>Arabidopsis thaliana</i>               | AthFDH           | нд                           | нд                            | 0,020              | 2,8   | 10                  | 2 x 10 <sup>4</sup>   | 6,5 (NAD <sup>+</sup> )                              | [50]               |
|          | <i>Glycine max</i>                        | SoyFDH           | 2,9                          | нд                            | 0,013              | 1,56  | 1                   | 1,1 x 10 <sup>3</sup>   | 4 (NAD <sup>+</sup> )                                | [63], [36]         |
|          | <i>Physcomitrella patens</i>              | PpaFDH           | 3,4                          | нд                            | 0,039              | 2,6   | нд                  | нд  | нд   | [unpublished data] |

### **2.6.2. Температурная стабильность и механизмы термоинактивации формиатдегидрогеназ**

Бактериальные и дрожжевые формиатдегидрогеназы активно используются в биотехнологии, поэтому механизмы их инактивации достаточно хорошо исследованы [64, 65]. В зависимости от свойств фермента, а именно – от его температурной стабильности, инактивация может быть связана с различными процессами. Например, для высокостабильной ФДГ из термофильных бактерий *Pseudomonas* sp.101 инактивация при 4-37°C связана не с разворачиванием глобулы, а с окислением сульфгидрильных групп остатков цистеина, в особенности остатка Cys255 [66]. Его окисление приводит к необратимой потере активности фермента. Данный процесс катализируется ионами двухвалентных переходных металлов, например,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ . В силу этого эффективными стабилизаторами фермента при хранении являются различные SH-соединения (например,  $\beta$ -меркаптоэтанол), блокирующие окисление сульфгидрильной группы остатков цистеина, а также хелатирующие эти металлы реагенты (например, ЭДТА), которые снижают концентрацию свободных ионов металлов в растворе, за счет чего скорость окисления SH-групп также резко падает, а время хранения увеличивается.

В случае менее термостабильной дрожжевой ФДГ кинетика процесса потери активности в том же диапазоне температур (4-37°C) описывается простой экспонентой. Поскольку данному процессу соответствуют рассчитанные из экспериментальных данных большие величины  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ , это свидетельствует о том, что в данном случае инактивация обусловлена разворачиванием белковой глобулы [67]. Помимо этого, так же, как и в случае с бактериальными ФДГ, в присутствии ионов тяжелых металлов также происходит частичное окисление сульфгидрильных групп молекулярным кислородом [68, 69]. Данные ферменты так же, как и PseFDH, стабилизируются восстановительными агентами, например, дитиотреитолом.

При повышении температуры выше 50 °C температурная инактивация как бактериальной, так и дрожжевых ФДГ уже объясняется исключительно

термоденатурацией и описывается кинетикой реакции первого порядка [65]. Аналогично протекает термоинактивация и у растительных ФДГ.

На настоящее время единственным исключением является ФДГ из пекарских дрожжей *S.cerevisiae*: при температуре до 42 °С инактивация фермента обратима, и только при более высоких температурах окончательно инактивируется [70].

Однако в целом зависимость падения формиатдегидрогеназной активности от времени описывается кинетикой реакции первого порядка, при этом величина константы скорости реакции не зависит от концентрации фермента.

Наиболее высокие значения температурной стабильности среди нативных ферментов характерны для ФДГ из термофильных бактерий *Pseudomonas* sp.101 (время полуинактивации при 63,0°С составляет 20 минут, самая стабильная ФДГ из известных), что значительно превосходит другие формиатдегидрогеназы [71]. Среди растительных ФДГ наиболее стабильной является фермент модельного растения *Arabidopsis thaliana* (см. табл. 4.9).

### **2.6.3. Химическая стабильность формиатдегидрогеназ**

Поскольку ФДГ активно используется в биотехнологических процессах, очень большую роль играет ее химическая стабильность, т.е. потенциальное время, которое фермент может функционировать. Инактивация ФДГ связана с окислением сульфогидрильных групп цистеина в составе фермента кислородом, содержащимся в растворе [68].

Одним из наиболее эффективных способов повышения химической стабильности ферментов является направленный мутагенез: в работах [64, 68] отмечается повышение операционной стабильности ферментов *SboFDH* и *PseFDH* в следствие проведения замены остатков цистеина на более стабильные.

Можно предположить, что в тех организмах, где ФДГ является ферментом стресса и его содержание увеличивается при различных неблагоприятных воздействиях (а зачастую это связано с резким повышением концентрации активных форм кислорода в клетке в виде радикалов или пероксида водорода),

эти форматдегидрогеназы должны быть более устойчивыми к окислению по сравнению с ферментами, функционирующими в обычных условиях. Эта гипотеза подтверждается работой [72]. В ней было проведено исследование кинетики инактивации пероксидом водорода различных ФДГ, в том числе нативных AthFDH и PseFDH, а также трех мутантных PseFDH, в которых были заменены один или два остатка цистеина. Оказалось, что скорость инактивации AthFDH под действием  $H_2O_2$  в 18 раз ниже, чем у PseFDH дикого типа. Такой же химической стабильности для PseFDH удалось добиться только после двойной замены Cys145Ser+Cys255/Ala. Эта работа свидетельствует о том, что ФДГ, синтезируемые при стрессовых воздействиях, обладают более высокой химической стабильностью (возможно, в силу меньшего количества остатков цистеина), чем форматдегидрогеназы, функционирующие в организмах постоянно.

## **2.7. Стабилизация ферментов методами белковой инженерии**

Многие ферменты широко применяются в различных биотехнологических процессах, поэтому вопрос о повышении их стабильности и активности всегда является актуальным. Методы повышения стабильности ферментов можно условно разделить на два типа: в первом применяются различные физико-химические методы без изменения аминокислотной последовательности белка, во втором используются методы белковой инженерии.

Физико-химические методы стабилизации ферментов основываются на двух типах реакций: иммобилизация, т.е. поддержание конформации структуры белковой глобулы, и химическая модификация белка (введение функциональных групп, способных образовывать дополнительные водородные или электростатические связи) [73].

Иммобилизация является достаточно популярным методом и при правильном подборе различных факторов приводит к хорошим результатам, например, в работе [74] описано повышение времени полуинактивации

форматдегидрогеназы из дрожжей *Candida methilica* при 50°C с 8 часов до 24 часов при использовании различных носителей.

С другой стороны, необходимость подбора оптимального носителя является одной из технических проблем метода иммобилизации ферментов: данная задача затрудняется не только чувствительностью самих ферментов к различным химическим воздействиям, но и возможной обратимостью процесса иммобилизации. Например, иммобилизация с помощью предварительной обработки глутаровым альдегидом является обратимой [75]. В настоящее время существует большое количество методик, позволяющих успешно проводить иммобилизацию ферментов. В различных исследованиях приводится информация о таких носителях, как октил-агароза [76], носителе Immobead 150, который также можно подвергать различным химическим модификациям [77], а также различных видах магнитных графеновых [78] и других модифицированных наночастиц [79]. Еще одним вариантом иммобилизации является инкапсуляция ферментов в липосомы, что приводит к увеличению стабильности, а также позволяет контролировать момент активации фермента [80].

Тем не менее, основным недостатком подхода иммобилизации ферментов является частая потеря ферментом каталитической активности в процессе иммобилизации [81]. Метод химической модификации также обладает различными недостатками: поскольку чаще всего модификации подвергается иммобилизованный фермент, это может привести к ухудшению его активности [82]. Кроме этого, реакция не идет со 100%-ным выходом, из-за чего продуктом ее является смесь, состоящая из немодифицированного и модифицированного ферментов, в связи с чем возникает проблема разделения фракций.

Напротив, методы белковой инженерии, заключающиеся в изменении самой аминокислотной последовательности фермента, лишены перечисленных недостатков и трудностей, характерных для физико-химических методов. Методы белковой инженерии включают в себя неупорядоченный [83] и направленный мутагенезы [84], [85]. Подход белковой инженерии существует около 50 лет, и, хотя одна из первых попыток стабилизации ферментов путем изменения

аминокислотной последовательности была предпринята в 1968 году [86], в настоящее время метод широко применяется в различных сферах, как в биологии, биохимии, так и в медицине [87].

### **2.7.1. Ненаправленный мутагенез**

Данный метод основан на внесении в последовательность ДНК изменений с определенной вероятностью путем воздействия разнообразных мутагенных факторов или веществ. Наиболее широко известным и употребляемым мутагеном является УФ-облучение, кроме него широко применяются и химические вещества, например, колхицин или нитрозогуанидин и другие. Введение неупорядоченных мутаций также достигается с помощью метода «направленной эволюции», при котором используется полимеразы с низкой специфичностью, производящая большое количество ошибок при полимеризации в присутствии высоких концентраций ионов  $Mg^{2+}$ , или его замене на ионы  $Mn^{2+}$  [88], увеличении концентрации dCTP и dTTP и самой полимеразы [89]. Главным недостатком метода ненаправленного мутагенеза является малый процент успешных замен. Например, стабилизирующий эффект при работе с формиатдегидрогеназой из *S. bovidini* достигался лишь в 2 случаях из 250 000 [90], при работе с липазой – в 1 из 12 000 случаев [91], а результат работы с уратоксидазой – 2 положительных случая из 6000 [92] – считается крайне успешным.

Метод ненаправленного мутагенеза является весьма трудоемким, для работы по нему необходима специальная методика скрининга стабильных мутантов, например, с использованием люциферазы – по изменению уровня флуоресценции или с помощью пероксидазы – по изменению цвета реакционной смеси.

### **2.7.2. Направленный мутагенез**

В отличие от описанного выше неупорядоченного мутагенеза, направленный мутагенез позволяет достичь успеха с несравнимо меньшими трудовыми затратами. Данный метод основывается на анализе аминокислотной

последовательности белка и выборе позиции для введения точечных мутаций в конкретное положение. Анализ последовательностей проводится путем наложения и сравнения последовательностей исследуемого фермента с его ортологами, обладающими искомыми свойствами. Например, для повышения температурной стабильности проводится сравнение с ферментами из термофильных источников, как, например, в работе по стабилизации алкогольдегидрогеназы из бактерий *Clostridium beijerinckii*. В результате сравнения с последовательностью алкогольдегидрогеназы из термофилов *Entamoeba histolytica*, в АДГ из *Clostridium beijerinckii* было выбрано положение для мутагенеза и проведена замена Gln100Pro. Температура полуинактивации за 60 мин выросла на 8 °С [93]. Однако выбор замены, основанный только на анализе аминокислотных последовательностей, не гарантирует положительный результат.

В функционировании и свойствах ферментов, в том числе и термостабильности, важнейшую роль играет третичная структура: все взаимодействия между аминокислотными остатками – гидрофобные и электростатические взаимодействия, ковалентные и водородные связи – все они определяют каталитические свойства фермента. Поэтому помимо аминокислотной последовательности необходимо знать окружение интересующего остатка, поскольку зачастую разные аминокислоты выполняют одну и ту же функцию в поддержании структуры. Такой подход дает положительный результат гораздо чаще, чем предыдущий.

Совмещение этих двух способов – анализа первичной, а затем третичной структур фермента, используя в качестве объекта сравнения фермент из термофильного источника, – значительно повышает вероятность успешного эксперимента. Помимо этого, при невозможности прямого сравнения, возможно и использование косвенных признаков, которые могут привести к увеличению термостабильности белков. Всего существует четыре основных метода увеличения термостабильности с помощью направленного мутагенеза:

- гидрофобизация белковой глобулы,
- создание дополнительных ковалентных и водородных связей,

- повышение жесткости полипептидной цепи,
- оптимизация электростатических взаимодействий.

### ***Гидрофобизация белковой глобулы***

Одним из основных факторов, влияющих на температурную стабильность ферментов, является гидрофобность внутри белковой глобулы. В работе [94] отмечается, что ферменты из термофильных организмов являются более гидрофобными по сравнению с мезофильными ферментами. Гидрофобный эффект может проявляться в двух формах: гидрофобность самой полипептидной цепи и гидрофобность, возникающая вследствие взаимодействия цепей.

По данным работы [95] из всех 20 аминокислот, остатки Asn, Gln, Met и Cys классифицируются как термолабильные из-за своего свойства подвергаться деаминарованию или окислению при высоких температурах. Напротив, остатки Arg и Tyr способствуют поддержанию внутренней структуры глобулы, повышая термостабильность белков. Этот факт объясняется способностью данных остатков образовывать длинные и короткие связи, а их содержание выше именно в термофильных ферментах.

Классификация аминокислотных остатков по принципу гидрофобности приводит к методике выбора замен, с большой вероятностью увеличивающих термостабильность. В шкале замен Роуза [96], направленных на повышение стабильности ферментов, замены Lys→Arg, Ser→Ala, Gly→Ala, Ser→Thr, Lys→Ala, Thr→Ala, Lys→Glu, Glu→Arg, Asp→Arg повышают гидрофобность, и только замена Ile→Val, приводит к относительному уменьшению гидрофобности.

В качестве частного примера увеличения термостабильности путем повышения гидрофобности можно рассмотреть работу [97]: замены остатков Leu7Asp/Asn, Leu376Asp/Asn и Ala380Ser в карбоксипептидазе из *Sulfolobus solfataricus* привели к повышению константа скорости термоинактивации при 75 °C в 3-20 раз относительно с фермента дикого типа.

Помимо создания новых гидрофобных взаимодействий в белковой глобуле, существует также метод повышения гидрофобности путем заполнения полостей

гидрофобными боковыми цепями аминокислотных остатков. Теоретические расчеты в работе [98] показывают справедливость такого подхода, а результаты экспериментов по белковой инженерии изопропилмалатдегидрогеназы (ИПМДГ) из *Thermus thermophilus* [99] подтверждают эти расчеты: в ходе данной работы были получены мутантные формы фермента с увеличенной термостабильностью, содержащие замены остатка Ala172 на остатки Val, Leu и Ile. Согласно трехмерной структуре ИПМДГ, метильная группа Ala172 окружена гидрофобными аминокислотными остатками, однако вокруг метильной группы аланина имелась небольшая полость, заполнение которой алильными боковыми группами Val, Leu и Ile привело к повышению термостабильности фермента.

Другим подтверждением эффективности данного метода является работа по повышению стабильности сериновой бета-лактамазы [100], в ходе которой остаток Ser70 был заменен на остаток глицина с целью освободить стерическое напряжение в активном центре, вызываемое боковой цепью остатка серина. Данная точечная замена привела к компактизации полости внутри фермента, и температура плавления мутантного фермента, измеренная с помощью ДСК, увеличилась на 13,3°C по сравнению с ферментом дикого типа.

### ***Создание дополнительных ковалентных и водородных связей***

Введение дополнительных связей, ковалентных или водородных, в частности солевых и дисульфидных мостиков, также является распространенным методом стабилизации структуры. Данный метод основывается на образовании или укреплении связи между двумя пространственно сближенными аминокислотными остатками, что препятствует разворачиванию белковой глобулы в ходе температурной денатурации. Во многих термофильных ферментах отмечено высокое содержание солевых мостиков и водородных связей, возникающих между радикалами аминокислот [101]. Солевые мостики в основном образованы остатками аргинина, поэтому введение полярных остатков может способствовать увеличению стабильности фермента, в то время как введение таких термолабильных остатков, как Cys и His, более вероятно приведет к снижению термостабильности [102]

В качестве примера стабилизации ферментов методом введения водородных связей можно привести исследование ксиланазы из грибов *Neocallimastix patriciarum* [103]. Путем сравнения ее аминокислотной последовательности с термофильной ксиланазой *Nonomuraea fexuosa*, в последней было найдено два участка полипептидной цепи 86-KQNSSN-91 и 207-SSGS-210. На месте первого участка у исследуемого фермента находится глп, а второй участок изменен относительно термостабильного фермента (207-NGGA-210). Анализ структуры более термостабильной ксиланазы показал, что данные участки наиболее часто встречаются в термостабильных ксиланазах. Остатки серина 208 и 210 образуют водородные связи между остатками Ser208-Asn205 и Ser210-Ala55, что обеспечивает повышенную температурную стабильность. С помощью метода направленного мутагенеза было внесено три аминокислотных замены (Asn207Ser, Gly208Ser и Ala210Ser), что привело к времени термоинактивации мутантной ксиланазы (при инкубировании в течение 1 часа при 95°C мутантная форма инактивируется на 50%, а нативная – на 60%).

Помимо образования водородных связей, широко распространено введение в структуру фермента дисульфидных мостиков. Так, например, в работе [104] в формиатдегидрогеназе из дрожжей *Candida boidinii* для стабилизации неспаренных остатков цистеина Cys23 и Cys262 были найдены пространственно близкие остатки Ala10 и Ile239, и введены точечные замены Ala10Cys и Ile239Cys, а также двойная замена Ala10Cys/Ile239Cys. Времена полуинактивации при 60°C полученных мутантных форм составили 21,6 минуты для Ala10Cys, 5,1 минуты для Ile239Cys, и 24,8 минуты для двойного мутанта по сравнению с ферментом дикого типа (3,2 минуты), т.е термостабильность возросла в 6,7, 1,6 и 7,8 раз, соответственно.

По тому же принципу в работе [105] при исследовании арилдиалкилгидролазы были сконструированы следующие мутантные формы: Gly74Cys/Ala78Cys, Ala204Cys/Thr234Cys и Thr128Cys/Glu153Cys. После инкубации при 65°C в течение 60 минут остаточная активность дикого типа составила 31%, а для мутантных форм – 28%, 33% и 47%, соответственно. Данная

работа является отличным свидетельством о том, что метод введения дисульфидных мостиков действительно является эффективным для увеличения термостабильности, но не обязательно дает успешные результаты.

Важность водородных и ковалентных связей в стабильности белковой глобулы также иллюстрируется результатами другой работы по изучению ксиланазы [106]: были специально выбраны мутации Asp83Asn и Asp30Asn, приводящие к разрыву солевых мостиков между остатками Asp83-Arg139 и Asp30-Lys308. Температурная стабильность мутантных форм резко упала по сравнению с ферментом дикого типа (0% остаточной активности после 20 минут при 50°C для Asp83Asn 18.6% остаточной активности после 60 минут при 50°C для Asp30Asn). Разрыв солевых мостиков привел к увеличению гибкости структуры, что, в свою очередь, сказалось на температурной стабильности мутантных форм.

#### ***Повышение жесткости полипептидной цепи***

Помимо введения дополнительных связей для поддержания структуры белковой глобулы, существует также метод повышения жесткости самой полипептидной цепи с целью снижения подвижности участков белковой глобулы [107]. Среди методов, описанных в литературе, наиболее часто встречающимися являются метод введения остатков Pro и, наоборот, удаления остатков Gly.

Стабилизирующий эффект при заменах других аминокислот на остатки Pro наблюдается в случае эндоглюканазы [108]. С помощью выравнивания аминокислотных последовательностей были выбраны остатки Lys94 и Ser365, находящиеся в полипептидной цепи между элементами третичной структуры, и введена двойная мутация Lys94Arg/Ser365Pro. Температурный оптимум фермента увеличился на 7,5 °C, а при инкубации при 70°C в течение 70 минут остаточная активность мутантной формы Lys94Arg/Ser365Pro составляла 78,3% , по сравнению с 5,8% для фермента дикого типа.

Аналогично, в работе [109] был проведен целый ряд замен различных аминокислотных остатков на остатки пролина в ксиланазе из *Aspergillus*

*sulphureus*: Asp32Pro, Gly33Pro, Ser35Pro, Thr45Pro, Thr46Pro, Tyr75Pro, Ser136Pro, Ser160Pro и Asp161Pro. Из полученных мутантных форм, три – Thr46Pro, Ser136Pro и двойной мутант Thr46Pro/Ser136Pro – обладали повышенной термостабильностью. Время полуинактивации при 60°C по сравнению с ферментом дикого типа выросло на 40%, 16% и 5%, соответственно.

В качестве наиболее удачного примера стабилизации путем замены остатка Gly можно привести работу [110]. В липоксигеназе из *Pseudomonas aeruginosa* присутствует два гибких участка полипептидной цепи, содержащих большое количество остатков глицина, образующих петлю, на которой держится домен, закрывающий активный центр. Оба этих участка были подвергнуты направленному мутагенезу: один фрагмент, длиной 49 аминокислотных остатков и обогащенный глицином, расположенный на N-конце пептидной цепи, был удален, а вместо другого участка 201-TQGGQG-206 были сконструированы две другие последовательности, в одном случае – с заменами Gly204Pro и Gly206Pro (201-TQGPQP-206), в другом – данная последовательность была полностью заменена на пролин-треониновый линкер (201-PTPPTT-206), с помощью которого планировалось сделать активный центр менее доступным для молекул растворителя, что является ключевым фактором в денаутрации ферментов. В результате температурная стабильность мутантных форм существенно возросла: для мутанта с удаленным N-концом время полуинактивации при 50°C составило 31 минуту, для мутанта с заменами Gly204Pro/Gly206Pro – 20,1 минуту, а для мутанта с пролиновым линкером – 44,5 минуты, в то время как для фермента дикого типа время полуинактивации при той же температуре составляло только 10 минут.

### ***Оптимизация электростатических взаимодействий***

Как уже было сказано выше, поддержание структуры белковой глобулы является ключевым фактором стабилизации ферментов [102]. Электростатические взаимодействия являются одними из наиболее сильных нековалентных взаимодействий, действующих внутри глобулы и поддерживающих ее

конформацию. Однако наличие нескомпенсированного заряда внутри белка является сильно дестабилизирующим фактором [111].

Литературные данные свидетельствуют о том, что ферменты из термофильных организмов гораздо более сбалансированы с точки зрения пространственного расположения аминокислотных остатков: в то время как внутри белковой глобулы термофильных ферментов находятся гидрофобные остатки, ее поверхность является более полярной, и электростатические взаимодействия в таких ферментах встречаются гораздо чаще по сравнению с мезофильными [101]. Поэтому модификация белковой структуры методом оптимизации электростатических взаимодействий в глобуле может быть эффективно использована с целью повышения термостабильности белков, используя в качестве образца термофильный фермент [112].

Важно заметить, что для получения наиболее оптимального результата направленного мутагенеза в данном случае недостаточно провести сравнение аминокислотных последовательностей, поскольку, как уже было сказано выше, остатки, пространственно разнесенные с точки зрения первичной структуры, могут оказаться близкими в доменах третичной структуры. Замена несовпадающих аминокислотных остатков у белков с изначально низкой гомологией не всегда является гарантией увеличения температурной стабильности. Поэтому для увеличения вероятности удачного мутагенеза желательно обладать также и трехмерной структурой белковой глобулы – экспериментальной, полученной путем кристаллизации фермента и решения структуры полученного кристалла, или теоретической, полученной методом наложения на уже имеющуюся структуру гомологичного фермента [112].

Существует несколько подходов к компактизации структуры фермента с целью повышения его температурной стабильности. Одним из них является удаление межсубъединичного электростатического отталкивания путем замены аминокислотных остатков, вызывающих напряжение структуры. Результаты исследования зависимости термостабильности кофактор-синтезирующего фермента MoaB из термофила *Pyrococcus furiosus* [113] свидетельствуют о

неоспоримой важности межсубъединичных контактов. Данный белок представляет собой сложную композицию из двух кластеров, каждый из которых состоит из трех субъединиц. Межсубъединичные связи в этом ферменте разделяются на поддерживающие структуры тримеров и на соединяющие тримерные кластеры. Направленный мутагенез трех гидрофобных аминокислотных остатков Leu59Arg/Leu63Arg/Phe66Arg, поддерживающих тримерную структуру внутри каждого кластера, привел к нарушению фолдинга фермента, и, как следствие, к падению термостабильности на 35% относительно фермента дикого типа (температура плавления глобулы, измеренная ДСК, понизилась со 108°C до 69°C). Другая мутация целого ряда аминокислотных остатков привела к нарушению связей, соединяющих два тримерных кластера, что также привело к падению температурной стабильности, но уже на менее ощутимые 15% (температура плавления глобулы понизилась со 108°C для фермента дикого типа до 93,5°C).

Помимо модификации межсубъединичных связей, существует метод модификации внешней поверхности белковой глобулы. Как правило, распределение аминокислотных остатков в ферменте происходит таким образом, что с растворителем контактируют более гидрофильные остатки, а гидрофобные, напротив, локализованы в глубине глобулы. Исходя из этого, справедливо предположение о том, что термостабильность белков увеличивается при замене гидрофобных остатков, находящихся на поверхности белковой глобулы, на более гидрофильные.

Так, замена только одного остатка в формиаатдегидрогеназы из термофильных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 приводила к увеличению термостабильности. Был проведен анализ трехмерной структуры фермента, в ходе которого был найден остаток фенилаланина, находящийся на поверхности белковой глобулы, а методом сравнения аминокислотных последовательностей были выбраны остатки для введения мутации – Phe311Asn, Phe311Ser и Phe311Asp. В результате этого время полуинактивации при 64°C двух мутантов Phe311Asn и Phe311Ser уменьшилось примерно в два раза по сравнению с

ферментом дикого типа, однако у мутантной формы Phe311Asp оно выросло в 2,5 раза [114].

## **2.8. Использование сред, содержащих ионные жидкости в ферментативных реакциях**

Ионные жидкости (ИЖ) в широком понимании представляют собой жидкость, содержащую только ионы. Однако в настоящее время под термином «ионные жидкости» чаще всего подразумевают соли, температура плавления которых ниже температуры кипения воды. В биотехнологии находят применение ионные жидкости, которые плавятся при комнатной температуре – в англоязычной литературе они носят название Room-Temperature Ionic Liquids (RTIL).

Как правило, такие ионные жидкости состоят из объёмных органических катионов (часто пиридин или имидазол) и неорганических (тетрафторборат, гексафторфосфат, бромид и т.д.) или реже органических анионов [115, 116]. Ионный характер жидкой фазы обуславливается несимметричностью строения и большим объемом ионов, что обеспечивает пространственную удаленность зарядов, из-за чего нарушается процесс организации кристаллической структуры. В силу своего строения ИЖ обладают рядом важных физико-химических свойств: электропроводимость, низкая температура плавления, высокая полярность и, как следствие, способность растворять многие соединения. Последнее является важным аспектом для биокатализа, вследствие чего RTIL являются частыми объектами исследования с точки зрения применения в биотехнологии [117, 118]. Также использование ионных жидкостей перспективно благодаря низкой токсичности по отношению как к человеку, так и к ферментам, и их высокой растворимости как в органических, так и неорганических средах [119].

Важным преимуществом RTIL является то, что их физико-химические свойства (полярность, плотность, растворимость в воде) могут быть заданы сочетанием различных катионов и анионов. Так, можно синтезировать растворимую и не растворимую в воде RTIL с разной полярностью и т.д. Различные исследования свидетельствуют о том, что использование растворов

RTIL в воде приводит к увеличению эффективности процесса. В частности, при работе с АДГ в водных растворах RTIL было отмечено существенное повышение эффективности фермента, поскольку ацетон, образующийся в ходе спаренной реакции и являющийся ингибитором, переходит из водной фазы в RTIL за счет лучшей растворимости [120]. Сходные результаты были получены и в исследовании [121], причем также был отмечен и рост стабильности фермента. Для функционирования ферментов в водных растворах RTIL крайне важна концентрация самой ионной жидкости. Исследование [122] свидетельствует о том, что при достижении концентрации 25% ИЖ в растворе перестала обнаруживаться активность пероксидазы хрена, в то время как в диапазоне концентраций от 0% до 20% активность и стабильность возрастала с повышением концентрации ИЖ. В то же время результаты работы [123] показали, что добавление даже небольшого количества воды в RTIL влияет на активность фермента: в 100% [Bmim][BF<sub>4</sub>] пероксидазная активность не была обнаружена, а уже в 95% фермент был активен.

Влияние RTIL на функционирование ферментов изучается достаточно недавно, а получаемые результаты являются достаточно противоречивыми: в исследованиях [124, 125] авторы отмечают повышение стабильности ферментов в различных RTIL, а в других работах [126, 127] – понижение активности и стабильности. Поэтому на данный момент какая-либо единая теория, позволяющая заранее предсказать поведение того или иного фермента в RTIL, отсутствует.

Было проведено большое количество исследований, направленных на более конкретное изучение поведения ферментов в RTIL. Ряд авторов отмечает, что за инактивацию ферментов могут быть ответственны как катионы ионной жидкости, связывающие активный центр [127], так и органические анионы [128]. В работе [126] отдельно отмечается отрицательное влияние длинных радикалов в составе RTIL на фермент. Тем не менее, исследования [129, 130] свидетельствуют о том, что ионные жидкости влияют на активность и стабильность, но не на третичную структуру исследуемых ферментов.

Таким образом, исходя из литературных данных, можно заключить, что влияние RTIL на стабильность ферментов складывается из комплекса различных взаимодействий между ферментом, ионной жидкостью, водой, субстратом, продуктом и буферной системой.

Тем не менее, несмотря на все исследования, точно предсказать эффект, оказываемый ионной жидкостью на какой-либо фермент, не представляется возможным. Причиной этого является очень малое суммарное количество экспериментов по данной тематике, а также плохая корреляция полученных данных между собой. В литературе с близкой частотой встречаются работы, в которых описывается как увеличение стабильности (например, у шаперона периплазматической альдегидоксидоредуктазы PaoD [131] и липазы [132], так и ухудшение свойств (у формиатдегидрогеназы [133], лактоферрина [134] и люциферазы [135]).

Несмотря на различающиеся результаты многих исследований, были определены некоторые RTIL, использование которых с ферментами наиболее часто приводило к увеличению стабильности и/или активности – [Bmim][BF<sub>4</sub>] и холин-хлорид [136, 137]. Ряд исследований подтверждает предположение, что RTIL могут быть успешно использованы в таких значимых биотехнологических процессах, как алкоголиз, трансэтерификация с помощью альфа-химотрипсина, а также в реакциях различных биорганических синтезов [138-140].

В заключение стоит отметить, что прогнозирование поведения различных ферментов в RTIL остается сложным и неточным, в следствие очень малого количества скоординированных экспериментов. Для подтверждения или опровержения идеи универсальности ионных жидкостей как растворителей необходимо большее количество систематических исследований.

## **2.9. Применение формиатдегидрогеназ**

На сегодняшний день существует большое количество лекарственных препаратов с хиральными центрами, для которых было показано, что искомый терапевтический эффект достигается при применении только одного из

энантиомеров, в то время как другой может оказывать сильный отрицательный эффект. Одним из ярчайших примеров, который непосредственно показал необходимость разделения стереоизомеров, является клинический препарат талидомид, открытый в 1960-ых [141] и использовавшийся в качестве седативного средства, побочным действием которого, как впоследствии оказалось, являлся тяжелейший тератогенный эффект [142]. Поскольку доля лекарств, выпускаемых на рынок и содержащих хиральные центры, на данный момент составляет около 2/3 от всех новых препаратов, синтез оптически активных соединений является одной из наиболее востребованных областей биотехнологии.

ФДГ широко используется в качестве средства регенерации NADH, который используется в ферментативных процессах синтеза оптически активных соединений с помощью дегидрогеназ [143, 144]. Главные достоинства этого фермента – практическая необратимость формиатдегидрогеназной реакции и широкий pH-оптимум активности – сделали его универсальным и эффективным биокатализатором, подходящим для условий, оптимальных для того или иного биотехнологического процесса. На данный момент имеется значительное количество патентов и методик, основанных на использовании ФДГ для регенерации NADH при получении L-аминокислот, хиральных спиртов [143, 145, 146]. На протяжении многих лет компания Evonik Degussa GmbH (компания, включившая в себя бывшую компанию Degussa) успешно применяет ФДГ в качестве катализатора регенерации NADH, с помощью которого была реализована промышленная технология получения терт-L-лейцина [147], являющаяся одним из наиболее крупнотоннажных процессов фармацевтической химии с использованием ферментов, а также регулярно появляются новые технологии, основанные на этом же процессе [148].

Формиатдегидрогеназа также успешно используется при изготовлении биосенсоров. В работе [149] описано применение ФДГ в паре с ферментом цианидазой, в сенсоре, позволяющем определить цианид-ион в диапазоне концентраций от 0,7 до 800 мкМ. Помимо этого ФДГ используется в биосенсорах на формиат- и оксалат-ионы [150]. Данная технология, например, позволяет

отслеживать микробную активность по количеству формиата [151], используется в разработке биотоплива [152, 153]. Принципиально другой подход с применением ФДГ используется в технологии получения формиата: результаты работ [154, 155] свидетельствуют об удачном проведении реакции, обратной приведенной в начале обзора в разделе 2.1.

В приведенной статье разработчикам удалось реализовать новый метод фоторегенерации NADH с помощью кремниевых нанопроводов. Несмотря на то, что сопряжение фото- и биокаталитического циклов в одnoreакторной системе с водой в качестве донора электронов считалось сложнореализуемым, использование фотоэлектрической ячейки позволило физически разделить процессы окисления воды и восстановления NAD<sup>+</sup>, существенно повысив выход реакции: скорость образования NADH без использования фотоэлектрической ячейки составляла 0,11 мМ/ч, а при ее использовании – 0,19 мМ/ч.

Помимо этого, на основе ФДГ разрабатываются вакцины против многих патогенных бактерий, например возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. Кроме того, ФДГ является ключевым ферментом в функционировании ряда патогенных микроорганизмов, таких как *Bordetella*, *Legionella*, *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*, а также *Vibrio harveyi* [156]. В настоящее время перспективным направлением является поиск низкомолекулярных ингибиторов формиатдегидрогеназы, на основе которых можно будет создать лекарства против патогенов [157-159].

Широкий спектр практических задач, в которых применяется ФДГ, требует функциональной гибкости фермента и его способности работать в определенных условиях. В зависимости от процесса, в который вовлечена ФДГ, от нее требуются низкие значения констант Михаэлиса, высокая каталитическая эффективность, а также высокая температурная и химическая стабильность. Также немаловажную роль играет простота получения фермента, поскольку фермент должен быть очищен от примесей и доступен в больших количествах. Поэтому исследование структурно-функциональной взаимосвязи различных ФДГ, их поведение в различных условиях, а также получение мутантных ферментов с

улучшенными свойствами методами белковой инженерии является актуальной биотехнологической задачей.

## III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Материалы

Для проведения направленного мутагенеза и клонирования фрагментов ДНК были использованы эндонуклеазы рестрикции HindIII, NdeI и EcoRI, ДНК-лигаза фага T4, Pfu и Taq ДНК-полимераза фирмы “Thermo Fisher Scientific” (США). Олигонуклеотиды для проведения ПЦР и секвенирования были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия). В микробиологических экспериментах использовали дрожжевой экстракт и агар (“Panreac”, Испания), глицерин (99,99%, “Panreac”, Испания), лактозу “analytical grade”, лизоцим (“Fluka/BioChemika”, Швейцария), хлорид кальция и хлорид натрия, гидрофосфат калия “ultra pure” (“Merck”, Швейцария), ампициллин, тетрациклин и хлорамфеникол (“Sigma”, США), дигидрофосфат натрия “ч.д.а.”, глюкозу (“РеаХим”, Россия).

Культивирование клеток *E.coli* проводили в среде 2YT с глицерином: (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1,5 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л хлорида натрия, 1 г/л гидрофосфата калия, pH 7,5, 10 мл/л глицерина).

Для трансформации и экспрессии плазмид использовали следующие штаммы *E.coli*:

*E.coli* DH5 $\alpha$ : *fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44*  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

*E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus /pLysS: В F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA* Hte [pLysS *argU ileY leuW* Cam<sup>r</sup>].

При очистке ферментов использовали сульфат аммония марки “х.ч.” (“ДиаМ”, Россия), мочевины марки “ч.д.а.” (“РеаХим”, Россия). Для электрофореза белков, использовали реактивы фирмы “Bio-Rad” (США). Для кинетических измерений использовали NAD<sup>+</sup> с чистотой не менее 99% фирмы “AppliChem” (Германия), ЭДТА фирмы “Merck” (Германия), формиат натрия и дигидрофосфат натрия “ч.д.а.” (“РеаХим”, Россия), азид натрия фирмы “Serva” (Германия). В экспериментах использовали воду, очищенную на установке MilliQ (“Millipore”, США). При проведении опытов по кристаллизации SauFDH использовали наборы «Intelli-Plate 96-3».

## 3.2. Методы исследования

### 3.2.1. Клонирование гена формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*.

Ген формиатдегидрогеназы *Staphylococcus aureus* (SauFDH) клонировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геномной ДНК *S. aureus*. Геномная ДНК *S. aureus* была предоставлена профессором Сидоренко С.В. из Государственного Научного Центра по Антибиотикам (ГНЦА). ПЦР проводили на амплификаторе «Т 100 Thermal Cycler», Bio-Rad, Америка. Для ПЦР использовали пары олигонуклеотидов SauFOR1/SauREV и SauFOR2/SauREV (см. «Результаты и их обсуждение»). К праймерам (20 пкмоль каждого) добавляли 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, поставляемого фирмой производителем вместе с ферментом, 1 мкл раствора MgCl<sub>2</sub> (25 мМ), 2 мкл раствора dNTP (2,5 мМ каждого), 1 мкл раствора геномной ДНК (50 нг/мкл), 0,5 мкл Taq ДНК полимеразы (5 ед./мкл) и 17 мкл деионизованной воды до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили в режиме Touchdown по следующей схеме: 4 цикла (1 мин при 95 °С, 1 мин при 54 °С и 2 мин при 72 °С), затем постепенно понижали температуру отжига на 2 градуса и проводили каждый раз с новой температурой отжига 4 цикла до тех пор, пока она не достигнет 37 °С. В общей сложности получали 36 циклов. Далее инкубировали реакционную смесь при 72 °С в течение 20 мин. Полученные ПЦР-продукты очищали, как описано выше, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI/EcoRI. (см. «Результаты и их обсуждение») и очищали электрофоретически в 1% агарозном геле. Рестрикционные фрагменты лигировали с обработанным теми же эндонуклеазами рестрикции вектором рЕТ23а (см. «Результаты и их обсуждение»). Лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* TG1 и высевали на чашки с агаром, содержащим ампициллин в концентрации 100 мкг/мкл. После инкубации при 37 °С в течение 12 часов на чашках выросло 8-15 колоний клеток с плазмидой рSau1 и 50-70 колоний с плазмидой рSau2. Затем с каждой чашки выбирали по 3 колонии и культивировали в течение ночи в 4 мл среды 2YT при концентрации ампициллина 300 мкг/мл (30 °С, 200 об./мин.). Из 4 мл ночной культуры выделяли плазмиды. Первичный скрининг выделенных после

трансформации плазмид осуществляли с помощью эндонуклеаз рестрикции NdeI/EcoRI. Затем отбирали плазмиды, содержащие сайты рестрикции, по которым проводилось клонирование, а также необходимую вставку. Эти плазмиды отдавали на секвенирование. Секвенирование проводилось по обеим цепям ДНК на автоматическом секвенаторе.

### **3.2.2. Рестрикция фрагментов ДНК**

Рестрикцию ПЦР-фрагментов и плазмидной ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции HindIII, NdeI и EcoRI (все – 10 ед/мкл) в буфере R (“Thermo Fisher Scientific”, США), поставляемом с ферментом, в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции в течение 1,5 часов при 37 °С. Инкубацию рестрикционной смеси осуществляли в термостате “Гном” (“ДНК-Технология”, Россия). Полноту протекания реакции рестрикции контролировали электрофорезом ДНК в 1% агарозном геле.

### **3.2.3. Лигирование**

Лигирование фрагментов ДНК проводили с использованием ДНК-лигазы фага T4 (5 Ед/мкл) в лигазном буфере (400 мМ Трис-НСl (рН 7,8 при 25 °С), 100 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ дитиотреитол, 5мМ АТФ), поставляемом с ферментом, согласно протоколу фирмы-производителя. В тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0,5 мл (“Eppendorf”, Германия) смешивали 2 мкл 10-кратного лигазного буфера, векторную ДНК и ДНК клонируемого фрагмента в соотношении 1:5 (масс). Объем лигирующей смеси доводили деионизованной водой до 20 мкл. Смесь инкубировали в течение 5 мин при температуре 37 °С, затем при 0 °С (5 мин), добавляли 1 мкл ДНК-лигазы фага T4 (500 Ед/мкл) и инкубировали в течение 1 ч при 22 °С. Реакционной смесью после лигирования трансформировали клетки *E.coli* DH5 $\alpha$ .

### **3.2.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Электрофорез ДНК проводили в Трис-ацетатном буфере (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, рН 8,5) в 1% агарозном геле при напряженности

электрического поля 2-3 В/см. В гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 1,6 мкг/мл. Визуализацию ДНК проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 254 нм.

### **3.2.5. Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля**

Фрагменты ДНК разделяли с помощью препаративного электрофореза в 1% агарозном геле. После визуализации требуемого фрагмента при освещении УФ-светом (312 нм) его вырезали из геля и помещали в предварительно взвешенную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл. Выделение ДНК проводили с использованием специального набора DNA Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). К вырезанному кусочку геля добавляли 2-кратный объем (из расчета 100 мг  $\approx$  100 мкл) буфера для связывания ДНК с носителем (Binding Buffer), содержащего перхлорат и ацетат натрия, затем инкубировали пробирку в течение 5 мин при 55 °С при перемешивании до полного растворения геля. Затем полученный раствор переносили в специальную пробирку с фильтром GeneJET™ и центрифугировали на настольной центрифуге Eppendorf 5415D (60 с, 13200 об/мин). Фильтрат удаляли, а в пробирку вносили 700 мкл буфера для промывки (Wash Buffer). Далее центрифугировали в тех же условиях и удаляли фильтрат (эту операцию затем повторяли с пустой пробиркой для полного удаления остатков раствора с фильтра). Для десорбции ДНК в пробирку добавляли 30 мкл воды, инкубировали в течение 1-2 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали на настольной центрифуге Eppendorf 5415D (1 мин., 13200 об/мин). Фильтрат, содержащий искомую ДНК, собирали в чистую пробирку и хранили при -20 °С.

### **3.2.6. Трансформация клеток *E.coli***

Для приготовления компетентных клеток *E.coli* разбавляли 40 мкл ночной культуры в 100 раз средой 2YT, пробирки помещали в качалку (37°С, 160-180 об/мин) и выращивали в течение 1,5-2,5 часов до достижения поглощения клеток на длине волны 600 нм  $A_{600} \approx 0,07-0,10$ . Затем 3 мл культуральной жидкости в два приема центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5804R” (5000 об/мин, 5 мин,

+4°C). После удаления культуральной жидкости осадок клеток ресуспендировали в 800 мкл стерильного охлаждённого 50 мМ раствора CaCl<sub>2</sub> и инкубировали в течение 30-40 мин во льду. Далее клетки осаждали в условиях, описанных выше, ресуспендировали в 100 мкл охлаждённого 50 мМ CaCl<sub>2</sub> и оставляли на 3-4 ч при 0°C. К суспензии клеток добавляли 0,5-1,0 мкл раствора плазмидной ДНК (концентрация ≈50 нг/мкл) или 5,0 мкл реакционной смеси после лигирования и инкубировали в течение 40 мин при 0°C. После этого клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в водном термостате (точность термостатирования ±0,1°C) в течение 1,5-2,0 мин и охлаждали до 0°C (1-2 мин). Затем в пробирку с клетками добавляли 900 мкл среды 2YT, трансформированные клетки подращивали в течение 1,5-2 ч при 37°C при периодическом перемешивании и высевали на чашки Петри с твердой агаризованной средой 2YT (содержание агара 1,2%), которая содержала необходимые антибиотики: хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (100 мкг/мл). Инкубировали в течение 12-14 часов при 37 °C.

### 3.2.7. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора “The GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США) по методике, указанной производителем. С чашек Петри колонию клеток *E.coli* DH5α, содержащих требуемые плазмиды с генами *saufdh1/2*, переносили в пробирки с 4 мл среды 2YT, содержащей антибиотик ампициллин (400 мкг/мл). и инкубировали 12-16 часов при 37 °C при 180 об/мин. Клетки осаждали в два приема по 1,5 мл в 2 мл пробирках на центрифуге “Eppendorf 5804R” (5000 об/мин, 5 мин, +4 °C), супернатант удаляли. Осадок клеток тщательно ресуспендировали пипетированием в 250 мкл раствора для ресуспендирования (“Resuspension Solution”). Затем добавляли 250 мкл лизирующего раствора (“Lysis Solution”) и аккуратно перемешивали, пока раствор не становился прозрачным и вязким. Далее к смеси добавляли 350 мкл нейтрализующего раствора (“Neutralization Solution”) и аккуратно перемешивали. Смесь центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5415D” (13000 об/мин, 5 мин), супернатант переносили в специальные

колонки для центрифугирования “GeneJET” и центрифугировали (13000 об/мин, 1 мин). Фильтрат удаляли, в колонки добавляли 500 мкл раствора для промывания (“Wash Solution”) и центрифугировали (13000 об/мин, 1 мин), процедуру повторяли еще один раз. Добавляя в колонки 40-50 мкл деионизованной воды или буфера для элюирования (“Elution Buffer”) и затем центрифугируя в течение 2 мин при 13000 об/мин, осуществляли десорбцию ДНК с колонок. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные образцы плазмидных ДНК хранили при -20оС.

### **3.2.8. Секвенирование ДНК**

Секвенирование плазмидной ДНК проводили в Центре коллективного пользования ЦКП «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (“Perkin Elmer Applied Biosystems”, США), основанном на дидезокситерминационном методе, с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК “ABI PRISM 3730 Applied Biosystems”. Для обработки результатов секвенирования использовали программу Chromas (версия 1.45), множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы Clustal X (версия 1.83).

### **3.2.9. Экспрессия SauFDH и ее мутантных форм в клетках *E.coli***

Экспрессию SauFDH дикого типа и ее мутантных форм проводили в клетках *E.coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS. Для получения штамма-продуцента клетки *E.coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS трансформировали соответствующей плазмидной ДНК и высевали на чашки Петри с агаризованной средой. Затем для получения посевного материала из колоний с чашки Петри создавали музейную культуру, которую в дальнейшем использовали для наработки необходимых количеств фермента.

*Трансформация клеток E. coli BL21 для получения штамма-продуцента.*

Трансформацию клеток *E.coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS плазмидной ДНК проводили по следующей методике. Клетки культивировали в течение 12-14 часов

при 37 °С, 180 об./мин. в 4 мл среды 2YT, содержащей антибиотика: тетрациклин (8 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Затем 40 мкл ночной культуры (разбавление в 100 раз) переносили в пробирку с 4 мл среды 2YT, содержащей антибиотика: тетрациклин (8 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Культивировали еще 2 часа при 37 °С, 180 об/мин. Затем клеточную суспензию переносили в пробирку объемом 1,5 мл, центрифугировали в два приема (2 × 1,5 мл) на центрифуге Eppendorf 5804R (5 мин 5000 об/мин, +4 °С). После удаления супернатанта осадок клеток ресуспендировали в 1 мл охлаждённого стерильного 50 мМ раствора CaCl<sub>2</sub> и инкубировали во льду в течение 30 мин. Далее клетки центрифугировали в условиях, описанных выше, ресуспендировали в 100 мкл охлаждённого стерильного 50 мМ раствора CaCl<sub>2</sub> и инкубировали во льду 4 ч. Затем к суспензии клеток добавляли 1 мкл раствора плазмидной ДНК и инкубировали 40 мин во льду. После этого клетки подвергали тепловому шоку при 42 °С в водном термостате в течение 1,5 мин, после чего охлаждали во льду в течение 3 мин. На заключительном этапе в пробирку добавляли 900 мкл среды 2YT без антибиотиков, инкубировали трансформированные клетки 1,5 часа при перемешивании при 37 °С. Затем высевали на чашки Петри (90 мм) со средой 2YT с агаром (1,2%), содержащей антибиотика хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (100 мкг/мл). Инкубировали в течение 12-14 часов при 37 °С.

#### *Создание музейной культуры*

Полученные клетки штамма-продуцента (единичная колония с чашки Петри) помещали в среду 2YT с глицерином, содержащую антибиотика: хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (400 мкг/мл). Культивировали на качалке (37 °С 180 об/мин) в течение 12 часов, 40 мкл ночной культуры (разбавление в 100 раз) переносили в пробирку с 4 мл среды 2YT с глицерином, содержащей антибиотика: ампициллин (400 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Затем инкубировали 2,5 часа при 37 °С, 180 об./мин., после чего 150 мкл клеточной суспензии добавляли в стерильные пробирки, содержащие 50 мкл 50% глицерина. Полученную музейную культуру хранили при -70 °С.

### *Экспрессия SauFDH*

Клеточную суспензию музейной культуры объемом 10 мкл помещали в пробирку с 4 мл среды 2YT с глицерином, содержащую антибиотики: хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (400 мкг/мл), и культивировали на качалке (37 °C 180 об/мин) в течение 12 часов. Ночную культуру пересевали в колбы с отбойниками (100 мл), разбавление в 1000 раз (15 мкл посевного материала, 15 мл среды 2YT с глицерином, с содержанием ампициллина 400 мкг/мл), и культивировали на качалке при температуре 37 °C, 120 об/мин. При достижении поглощения на 600 нм для культуральной среды значения 0,6-0,8 все содержимое 100-мл колбы переносили в большую колбу с отбойниками (1 л.), разбавляли средой 2YT с глицерином в 10 раз, без добавления антибиотиков, и культивировали на качалке (30°C 120-130 об/мин). По достижении величины поглощения на 600 нм,  $A_{600} = 0,6-0,8$ , проводили индукцию клеток, добавляя раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора 20 г/л, и снижали температуру культивирования до 20 °C. Через 2 часа после индукции в колбы добавляли раствор формиата натрия (20 г/л) до конечной концентрации 1 г/л и продолжали культивирование до утра (20 °C, 120 об/мин). Утром в колбы добавляли по 9 мл смеси, приготовленной из 40 мл раствора лактозы (300 г/л), 25 мл 50% глицерина и 12,5 мл 3М формиата натрия в 0,1 М NaPB, pH 7,0. Через 2-3 часа клетки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804R в течение 20 мин при 5000 об/мин, +4 °C. Полученный осадок ресуспендировали в 0,1 М NaPB, pH 8,0 (концентрация клеток 20 вес %) и подвергали заморозке (-20°C). После разморозки клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Ultrasonic (США). Полученную суспензию центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5804R в течение 30 мин при 10000 об/мин и +4 °C. Супернатант осторожно отделяли от осадка и использовали для дальнейшей работы.

Для контроля уровня экспрессии фермента утром и перед окончанием культивирования из колб отбирали пробы объемом 1 мл, определяли поглощение среды на 600 нм. Затем клетки осаждали центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5415D (2 мин, 12000 об/мин). Супернатант удаляли декантированием и

определяли в нем активность ФДГ. Осадок клеток ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера (0,1 мг/мл лизоцима; 0,2 об% тритона X-100; 0,1 М NaPB, pH 8,0), замораживали в течение 20 мин при -20 °С. Затем клетки размораживали и помещали в шейкер “Eppendorf 5432” на 40 мин. После этого пробу центрифугировали 30 сек при 12000 об/мин для удаления осадка и из супернатанта отбирали пробу для определения активности ФДГ.

### **3.2.10. Выделение и очистка SauFDH**

Очистка проводилась согласно следующей методике. К “бесклеточному экстракту” при постоянном перемешивании добавляли твердый сульфат аммония до 35% от насыщения (19,7 г. AS на 100 мл исходного раствора), оставляли при +4 °С на 2-2,5 часа, после чего нерастворившиеся белки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804R в течение 30 мин при 11000 об/мин, +4 °С. Отделяли супернатант и аккуратно при перемешивании добавляли к нему твердый сульфат аммония до 85% от насыщения (33,4 г. AS на 100 мл раствора с 35%-ным насыщением по AS), оставляли при +4 °С на 1,5-2 часа, после центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5804R в течение 30 мин. Супернатант удаляли, к осадку добавляли раствор сульфата аммония в 0,1 М NaPB, pH 7,0 (35% от насыщения) (раствор А) и оставляли при +4 °С на 1,5-2 часа. Нерастворившиеся белки удаляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804R в стаканах объемом 50 мл при 11000 об/мин, при +4 °С, а раствор фермента наносили на колонку 1,0x10 см с высокозамещенной фенил-сефарозой FastFlow (Pharmacia Biotech, Австрия), уравновешенной раствором А. После нанесения фермента колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. Фермент элюировали с колонки нисходящим линейным градиентом сульфата аммония (35-0% от насыщения) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0, общий объем 100 мл. Во время проведения хроматографии собирали фракции по 5 мл и измеряли поглощение на 280 и 260 нм ( $A_{280}$  и  $A_{260}$ ) и ферментативную активность (А). Фракции с максимальным соотношением ( $A/A_{280}$ ) объемом около 1 мл. наносили на колонку 1x10 см (объем 10 мл) с Sephadex G25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция).

Собирали фракции по 0,5 мл, для каждой фракции определяли ферментативную активность и поглощение на 280 нм. Чистоту полученного препарата фермента определяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях.

### **3.2.11. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях**

Электрофорез белков по методу Лэммли проводили на приборе Miniprotean II фирмы “BioRad” (США) по протоколам фирмы-изготовителя. Используемые растворы:

1. Буфер 1: 1,5 М Трис-НСl, рН 8,8.
2. Буфер 2: 0,5 М Трис-НСl, рН 6,8.
3. Смесь Акриламид/Бис-акриламид в соотношении 36,5:1.
4. 10%-ный раствор SDS Na.
5. Буфер для нанесения образцов: 1 мл буфера 2, 0,8 мл глицерина (100%), 1,6 мл 10%-го SDS, 0,4 мл 2-меркаптоэтанола, 0,4 мл 1%-ный бромфенолового синего, 3,8 мл деионизованной воды.
6. 5-кратный электродный буфер, рН 5,3: 15г/л Трис-НСl, 72 г/л глицин , 5 г/л SDS
7. Раствор для окраски геля: 0,1% Кумасси R-250, 40% этанол и 10% уксусной кислоты.

Состав разделяющего геля (12%): деионизованная вода - 3,35 мл, буфер 1 - 2,5 мл, 10%-ный SDS - 100 мкл, акриламид/бис-акриламид - 4 мл, 10%-ный  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  - 50 мкл, ТЕМЕД - 5 мкл.

Состав концентрирующего геля (4%): деионизованная вода - 6,1 мл, буфер 2 - 2,5 мл, 10%-ный SDS - 100 мкл, акриламид/бис-акриламид - 1,33 мл, 10%-ный  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  - 50 мкл, ТЕМЕД - 10 мкл.

К пробе фермента добавляли 10-50 мкл воды, 50 мкл буфера для нанесения образцов и кипятили в течение 10 мин. Сначала, при прохождении образца через концентрирующий гель электрофорез проводили при постоянном напряжении 70 В, затем после входа образца в разделяющий гель электрофорез проводили при постоянной величине тока (по 0,02 А на каждое стекло). Для визуализации полос

белка гель окрашивали с помощью Coomassie Brilliant Blue R-250. Отмывку геля проводили в растворе, содержащем этанол (30 об%) и уксусную кислоту (10 об%).

### **3.2.12. Определение активности фермента**

Активность формиатдегидрогеназы определяли на спектрофотометре UV-1800 фирмы "Shimadzu" при 30 °С на длине волны 340 нм по увеличению поглощения NADH ( $\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Измерения проводили в 0,1М NaPB, pH 7,0. Концентрации формиата натрия и NAD<sup>+</sup> в кювете спектрофотометра составляли 0,1М и 2,5 мг/мл соответственно. Точные концентрации исходных растворов NAD<sup>+</sup> определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ( $\epsilon_{260}=17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Точную концентрацию формиата натрия определяли ферментативно по образованию NADH с помощью формиатдегидрогеназы в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0 при 30°С и концентрации NAD<sup>+</sup> 2,5 мг/мл (3,7 мМ).

### **3.2.13. Определение констант Михаэлиса**

Определение констант Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиату проводили, изучая зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации одного из субстратов в условиях насыщения по второму субстрату. Измерения проводили при 30°С в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, на спектрофотометре фирмы Shimadzu UV-1800 (Япония). Значения констант Михаэлиса находили методом нелинейной регрессии, используя программу «Origin Pro 8.0».

### **3.2.14. Определение констант ингибирования.**

Константы ингибирования по формиату определяли, изучая зависимость скорости реакции от концентрации формиата в присутствии нескольких фиксированных концентраций ингибитора и концентрации NAD<sup>+</sup> 2,3 мМ. Результаты обсчитывали методом нелинейной регрессии с помощью программы «Origin Pro 8.0». Все измерения проводили в 0,1М натрий-фосфатном буфере.

### **3.2.15. Определение активности фермента при различных температурах**

Определение температурной зависимости проводилось аналогично измерению активности, термостатирование проводилось в диапазоне 20-48 °С,

каждую кювету инкубировали в термостате при заданной температуре в течение 20 минут.

### **3.2.16. Определение констант скорости термоинактивации**

Термостабильность фермента измеряли в 0,1 натрий-фосфатном буфере pH 7,0 содержащем 0,01 М ЭДТА. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0,5 мл по 100 мкл раствора фермента (0,05 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (46 – 68°C, точность термостатирования  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение на центрифуге Eppendorf 5415D (1 мин, 12000 об/мин). Остаточную активность ФДГ измеряли, как описано выше. Константу скорости термоинактивации  $k_{in}$  определяли как тангенс угла наклона прямой, (график зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени, полулогарифмические координаты ( $\ln(A/A_0) - t$ )) методом линейной регрессии, используя программу “Origin Pro 8.0”.

### **3.2.17. Определение активационных параметров процесса термоинактивации фермента**

Активационные параметры  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  определяли из температурной зависимости константы скорости термоинактивации, используя уравнение теории активированного комплекса.

### **3.2.18. Изучение термостабильности с помощью ДСК**

Измерения параметров тепловой денатурации белков:  $T_m$  – температуры денатурации (плавления) и  $\Delta H_{кал}$  – калориметрической энтальпии денатурации – проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре Nano DSC, TA Instruments, Америка, (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия). Рабочий объем капиллярных калориметрических ячеек из платины составлял 300 мкл. Для предотвращения образования пузырьков и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживалось избыточное давление 3 атм. Калибровка

прибора Nano DSC осуществлялась путём подачи на одну ячейку фиксированной мощности ( $\Delta W = 25$  мкВт). Перед проведением калориметрического эксперимента определяли инструментальную базовую линию. При измерениях в контрольную ячейку помещали буферный раствор, а в рабочую – раствор исследуемой SauFDH. Концентрация ферментов 1 мг/мл, а скорость прогрева – 1°С/мин.

Для проверки обратимости/необратимости процесса тепловой денатурации, после первого прогрева образца и записи зависимости теплоемкости раствора от температуры раствор фермента охлаждали и проводили повторный нагрев.

Обработку и анализ кривых плавления проводили, используя программу Matlab 8.0, с помощью специальных макросов. Сначала из экспериментальной кривой плавления фермента вычитали приборную базовую линию, чтобы учесть имеющийся разбаланс ячеек. Затем вычитали базовую линию буферного раствора и собственную химическую базовую линию, получая при этом функцию избыточной теплоёмкости, отличную от нуля лишь в области, где происходит плавление образца. После этого проводили анализ полученных кривых. Калориметрическую энтальпию денатурации ( $\Delta H_{\text{кал}}$ ) рассчитывали из площади под кривой зависимости избыточной теплоемкости белка от температуры, температуру плавления ( $T_m$ ) – как температуру максимума пика теплопоглощения. Погрешность при расчете  $\Delta H_{\text{кал}}$  составляла 5-8%. Экспериментальная ошибка измерения  $T_m$  не превышала 0,2 °С.

### **3.2.19. Получение кристаллов и определение трехмерной структуры апо-формы SauFDH**

Кристаллизация апо-формы SauFDH проводилась методом диффузии в парах в висячих каплях при различных температурах в термостатированном помещении. Раствор белка с концентрацией от 7,5 до 10,2 мг/мл в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,0 и в 0,1 М буфере Tris-HCl pH 7,0 перед кристаллизацией центрифугировался в течение 10 мин для удаления инородных частиц и агрегатов.

При проведении опытов по кристаллизации SauFDH использовали робот «Rigaku CrystalMation». Кристаллизация проводилась в пластиковых планшетах для сидящих капель Intelli-Plate 96-3 (Art Robbins Instruments), фирмы Hampton

Research. Проверка кристаллизационных проб производилась с использованием бинокулярный микроскоп Kruss (Германия).

Дифракционные данные с выращенных кристаллов были получены на синхротроне Spring8, на станции BL41XU, Япония. Фотографирование полученных кристаллов производилось с помощью тринокулярного поляризационного микроскопа Eclipse 50i POL (Nikon, Япония). Решение структуры было выполнено к.б.н. Бойко К.М. Анализ и визуализацию белковых структур осуществляли с помощью программы Accelrys Discovery Studio 2.1.

### **3.2.20. Моделирование трехмерной структуры апо-фермента**

Моделирование проводилось на станции Silicon Graphic с пакетом программ Insight II (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). Сначала было проведено выравнивание аминокислотных последовательностей SauFDH и PseFDH, SceFDH, SoyFDH, CboFDH и произведен поиск гомологичных участков. Позднее было проведено наложение экспериментальной структуры SauFDH на известную структуру PseFDH (PDB: 2NAD). Первичную оптимизацию структуры проводили методами молекулярной механики. Затем проводили релаксацию структуры методами молекулярной динамики. Повторную релаксацию структуры проводили методами молекулярной механики. Компьютерное моделирование проводили в сотрудничестве со с.н.с., к.ф.-м.н. И.В. Упоровым.

### **3.2.21. Направленный мутагенез гена формиатдегидрогеназы из бактерий *S. aureus***

Введение точечных мутаций в ген ФДГ из бактерий *S. aureus* методом направленного мутагенеза проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия). Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2,5 мкл 10-кратного буфера для *Pfu* ДНК-полимеразы (20 mM Трис-НСl (рН 8,8 при 25°C), 10 mM КСl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100), 2 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), концентрация 2,5 mM; 1 мкл ДНК-матрицы с концентрацией ≈ 10 нг/мкл; по 2 мкл праймеров 1 и 2, концентрация 10 пкмоль/мкл (“Синтол”, Россия); 0,5 мкл *Pfu*

ДНК-полимеразы (10 Ед/мкл) и 15 мкл деионизованной воды (общий объем смеси 25 мкл).

Реакцию ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0,5 мл (“Eppendorf”, Германия). Для предотвращения испарения реакционной смеси и ее конденсации на крышке в пробирку добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95 °С и затем проводили реакцию ПЦР с использованием следующей программы: 1-я стадия - 95 °С, 30 с; 2-стадия - 56 °С, 66 с и 3-я стадия - 72 °С, 2 мин, всего 25-35 циклов. После этого реакционную смесь выдерживали еще 10 мин при 72 °С. Температуру на второй стадии выбирали на 3-5 градусов ниже температуры плавления дуплексов ( $T_m$ ), образуемых праймерами с целевыми участками в гене *SauFDH*. Для определения  $T_m$  использовали эмпирическую формулу:

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C),$$

где  $n_x$  – количество нуклеотидов типа  $X$  в праймере. Для получения фрагментов, содержащих требуемую замену, проводили две ПЦР с использованием пар праймеров - 1) прямого праймера *SauFor*, содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы) и обратного стандартного праймера *T7rev* (фрагмент 1 и 2) стандартного прямого праймера *T7for* и обратного праймера *SauRev*, также содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы) (фрагмент 2). Продукты двух ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Затем проводили третью, объединяющую ПЦР с праймерами *T7for* и *T7rev*, где в качестве ДНК-матрицы использовали оба полученных ранее фрагмента. Продукт объединяющей ПЦР очищали аналогично и затем обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *XhoI* или *NdeI* и *KpnI*. Этими же рестриктазами обрабатывали плазмиду *saufdh1* для удаления из нее фрагмента гена, в который вводилась мутация. Обработанные рестриктазами продукт ПЦР и плазмиду очищали с помощью электрофореза и лигировали. Полученной после реакции лигирования смесью трансформировали клетки *E.coli* TG1. Для контроля введения требуемых мутаций проводили секвенирование плазмидной ДНК.

## IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

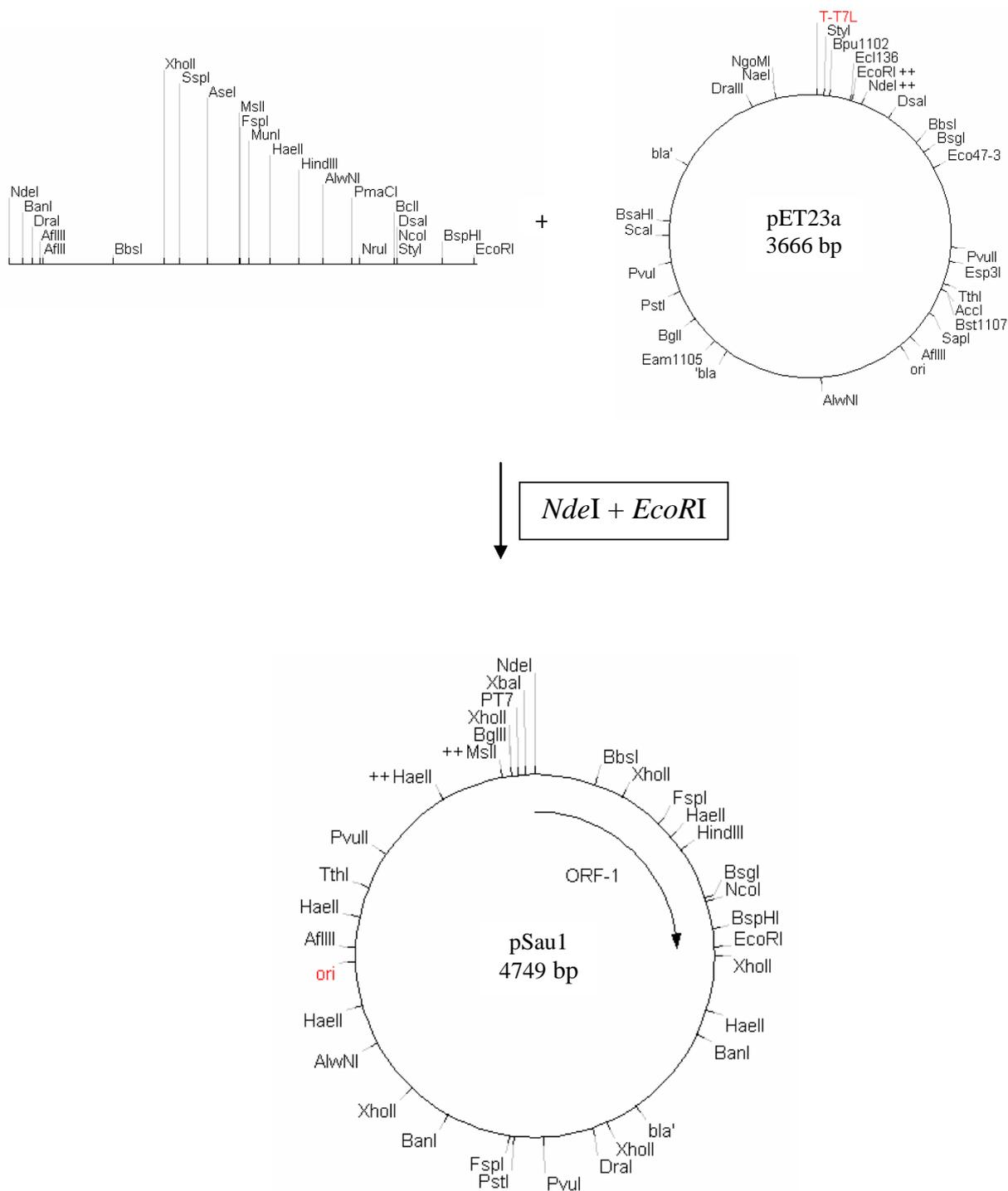
### 4.1. Клонирование гена формиатдегидрогеназы из бактерий

#### *Staphylococcus aureus*

Несмотря на то, что бактериальные формиатдегидрогеназы, их функции и роль в жизненном цикле организма достаточно хорошо изучены, в литературе ранее не встречалось описание клонирования, суперэкспрессии и свойств формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. Тем не менее, в работе [31] показано наличие в геноме данных бактерий открытой рамки считывания, кодирующей белок, гомологичный известным  $\text{NAD}^+$ -зависимым формиатдегидрогеназам. Поскольку полный геном находится в открытом доступе в различных генетических базах данных (Gene Bank Accession BA000017), была разработана стратегия клонирования гена SauFDH и его дальнейшей экспрессии в клетках *E.coli*. В результате анализа аннотированных вариантов генома в генетической базе данных GenBank было обнаружено более 20 полных нуклеотидных последовательностей, кодирующих ФДГ из различных штаммов *S.aureus*. Главной особенностью полученных результатов оказалось наличие двух возможных вариантов гена, существующего *in vivo* (см. рис. 4.1.1): в одном случае ряд авторов аннотируют ген SauFDH длиной 1125 нуклеотидов, а во втором варианте стартовый кодон SauFDH расположен на 99 нуклеотидов ниже по сравнению с первым, а суммарная его длина составляет 1026 оснований. Далее в данной работе «длинный» и «укороченный» варианты гена SauFDH обозначаются saufdh1 и saufdh2 соответственно. Также на рисунке 4.1 для сравнения приведены N-концевые участки аминокислотных последовательностей ФДГ из ряда непатогенных бактерий, растений, дрожжей и грибов.



считывания гена SauFDH. Заглавными буквами обозначены области, комплементарные началу и концу гена. Подчеркиванием отмечены участки, необходимые для введения в продукт ПЦР сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции NdeI (CATATG; SauFOR1 и 2) и EcoRI (GAATTC; SauREV). Нативный ген SauFDH не содержит данных сайтов узнавания, поэтому они могут быть использованы для клонирования продукта ПЦР в плазмидный вектор рЕТ23а, в котором из полилинкера дополнительно был удален ряд сайтов рестрикции. Праймеры также были сконструированы таким образом, чтобы в них отсутствовали любые вторичные структуры (шпильки и димеры), что является необходимым условием для проведения ПЦР. Кроме того, в обратном праймере вместо стоп-кодона TAG из исходного гена SauFDH вставлен более сильный для клеток *E.coli* стоп-кодон TAA. Схема клонирования для гена *saufdh1* представлена на рис.4.2. Для гена *saufdh2* клонирование проводилось аналогично. Клонированные фрагменты были секвенированы по обеим цепям, и было показано полное соответствие последовательностям генома штамма бактерий *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Mu50.



**Рис. 4.2.** Клонирование продукта ПЦР геномной ДНК *S.aureus*, полученного с праймерами SauFOR1/SauREV, в вектор pET23a (получение плазмиды pSau1).

#### 4.2. Экспрессия рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *S. aureus*

Для создания штамма продуцента использовались клетки *E.coli* BL21 CodonPlus DE3, трансформированные плазмидами, полученными на предыдущем этапе. Было проведено культивирование и измерена активность фермента, синтезированного в клетках. На основании последующего сравнения свойств

длинного и короткого вариантов, которое показало, что SauFDH1 (длинный вариант) обладает лучшими свойствами, все эксперименты также проводились только с SauFDH1.

Культивирование проводилось по модифицированной методике, разработанной в нашей лаборатории. При этом было изучено влияние двух основных факторов экспрессии – индуктора и температуры.

В отличие от стандартных параметров, культивирование проводили при двух температурах: до индукции температура составляла 30°C, а после индукции была снижена до 20°C. Эксперименты показали, что культивирование при пониженной температуре приводит к увеличению выхода (разница в выходах по суммарной активности примерно 1,25 раза). По всей видимости, такая температура обеспечивала более эффективный фолдинг фермента. Дальнейшее понижение температуры было неэффективно, так как приводило к сильному ограничению скорости роста клеток.

Сравнение двух индукторов – ИПТГ и лактозы – показало, что их использование обеспечивало 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.

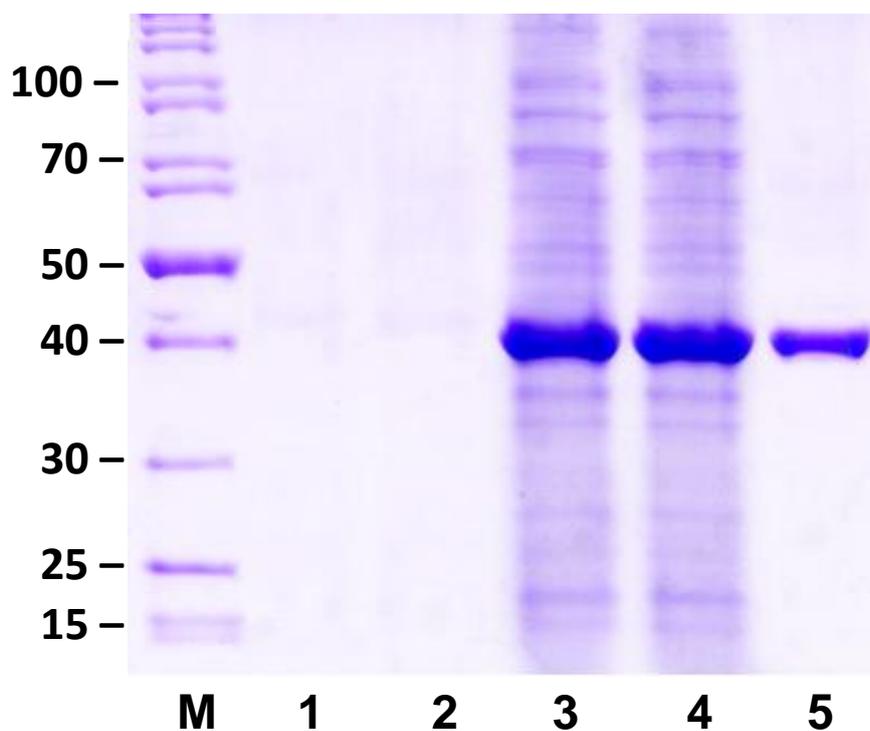
Результаты культивирования представлены в таблице 4.1. Как видно из полученных данных, полноразмерный вариант SauFDH синтезируется более чем в два раза эффективнее, что позволяет сделать косвенный вывод о том, какой фермент присутствует в бактериях *Staphylococcus aureus in vivo*.

Таблица 4.1.

Результаты культивирования полной и укороченной форм SauFDH1 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            |

На рисунке 4.3. представлены результаты белкового электрофореза для проб, взятых на различных стадиях культивирования штамма-продуцента рекомбинатной SauFDH1. Как видно из рисунка, до внесения индуктора (дорожка 1) целевой фермент практически не экспрессируется, однако через 12 и 14 часов после внесения индуктора (дорожки 3 и 4) в пробах преобладающим белком является формилатдегидрогеназа. Также на форец добавлен препарат очищенной SauFDH1 для сравнения. Из рисунка 4.3. видно, что по окончании культивирования (14 часов) содержится большое количество ФДГ, а уровень экспрессии SauFDH1 составляет не менее 30% от общего количества белков в клетке.



**Рис. 4.3.** Аналитический ПААГ SDS-На электрофорез препаратов SauFDH1 в процессе культивирования биомассы. М – маркер молекулярной массы, кДа, 1 – бесклеточный экстракт перед добавлением индуктора, 2, 3, 4 – бесклеточный экстракт через 1, 12 и 14 часов после добавления индуктора соответственно, 5 – очищенный препарат фермента SauFDH1.

Выход целевого фермента после культивирования более 1 г с литра среды является отличительной особенностью SauFDH. Он превышает выходы для всех изученных ФДГ (PseFDH, CboFDH, SoyFDH, SceFDH и т.д.) в 2-4 раза. Последующие эксперименты (см. раздел 4.4.1) показали, что удельная активность SauFDH более, чем в 3 раза превышает удельную активность PseFDH. Таким образом, получение 1 единицы активности для промышленного использования у SauFDH обходится по минимальной стоимости.

### 4.3. Выделение и очистка SauFDH

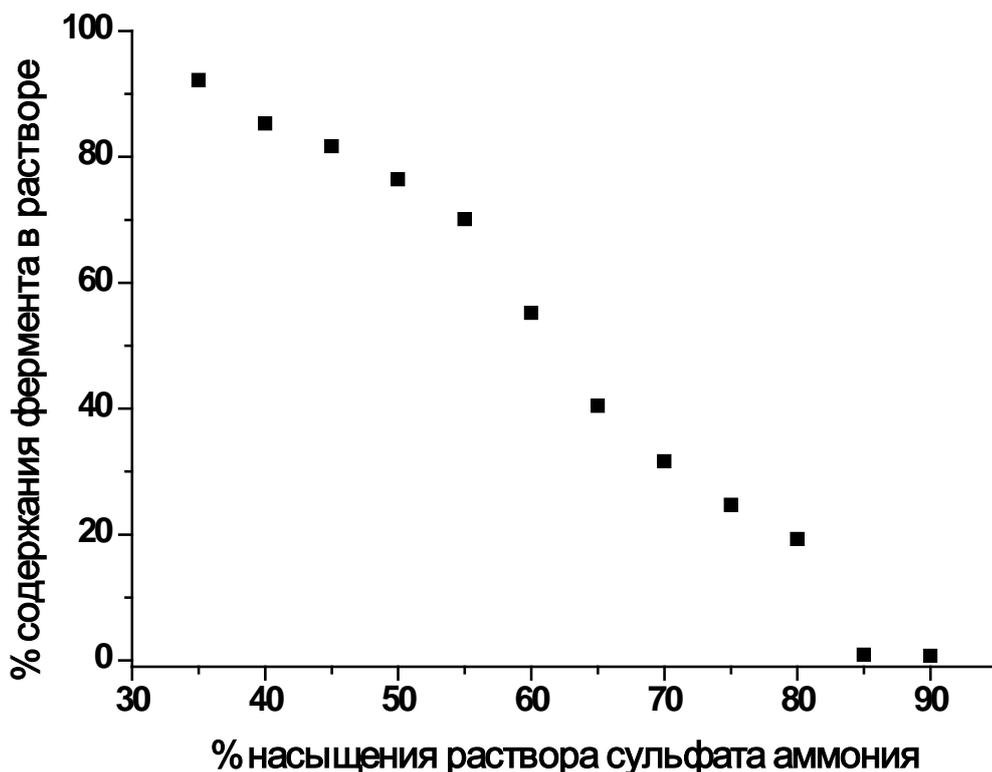
Выделение SauFDH проводилось по стандартной методике, разработанной в нашей лаборатории. Эта универсальная методика позволяет получить рекомбинантные ФДГ из различных природных источников (бактерии, дрожжи и растения) с помощью экспрессии в клетках *E.coli*. Данная методика включает в себя разрушение клеток ультразвуком, температурную обработку полученной суспензии (при достаточной термостабильности выделяемого фермента),

фракционирование сульфатом аммония, гидрофобную хроматографию с использованием фенил-Сефарозы и обессоливание через Сефадекс G25.

Высокая температурная стабильность SauFDH (см. далее раздел 4.5) позволила использовать стадию температурной обработки – инкубирование суспензии разрушенных клеток в течение 15 минут при 55 °С. Это привело к частичной денатурации примесных белков, что значительно способствовало повышению эффективности очистки целевого фермента. Кроме того, температурная обработка привела к образованию крупнодисперсного осадка, который более качественно осаждается центрифугированием.

Тем не менее, даже после проведения температурной обработки в растворе находится большое количество примесных белков, поэтому для улучшения эффективности очистки фракционирование проходило в два этапа. Сначала фермент осаждали концентрированным раствором сульфата аммония, а затем перерастворяли полученный осадок в растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в натрий-фосфатном буфере с концентрацией, оптимальной для проведения гидрофобной хроматографии, т.е. для удержания белка носителем. Такой двустадийный метод дает возможность очистить препарат фермента от нуклеиновых кислот, пигментов и других небелковых примесей, а также – что немаловажно с производственной точки зрения – сконцентрировать белок.

При подготовке к очистке была изучена зависимость растворимости рекомбинантной формиатдегидрогеназы из бактерий *S.aureus* от концентрации сульфата аммония. Результаты представлены на рисунке 4.4.



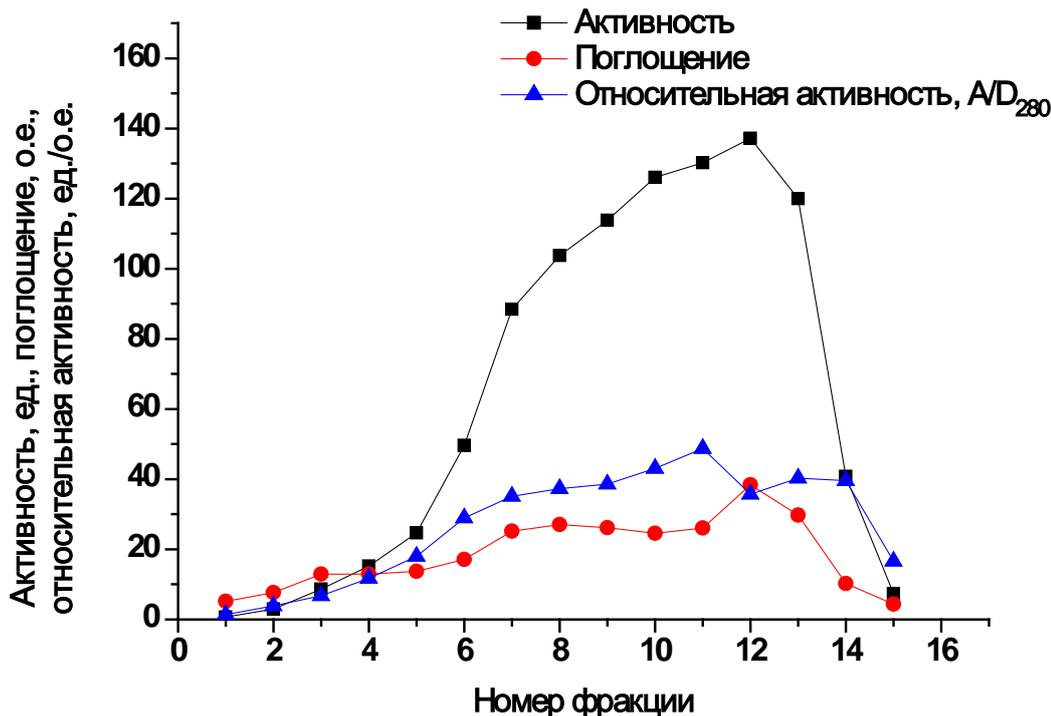
**Рис. 4.4.** Остаточная активность SauFDH при различном содержании сульфата аммония.

Из рисунка 4.4 видно, что при концентрации сульфата аммония выше 80% содержание фермента в растворе близко к нулю. Таким образом, было решено переводить фермент после ультразвуковой дезинтеграции и температурной обработки клеток в раствор с концентрацией сульфата аммония 80% от насыщения. После центрифугирования и отделения, осадок растворяли в растворе сульфата аммония с концентрацией 35% от насыщения. Данная концентрация была выбрана, исходя из результатов экспериментов по изучению оптимальной концентрации сульфата аммония в растворе для связывания с гидрофобным носителем (таблица 4.2).

**Таблица 4.2.**

Остаточная активность SauFDH в растворе с носителем при различных концентрациях сульфата аммония (0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0, 10 мМ ЭДТА).

| $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , % от насыщения | 0     | 15   | 20   | 25   | 30  | 35 |
|---|-------|------|------|------|-----|----|
| Остаточная активность, %                        | 100,0 | 88,1 | 34,2 | 23,7 | 8,4 | 0  |



**Рис. 4.5.** Гидрофобная хроматография SauFDH через фенил-сефарозу. Колонка 1x10 см, линейный градиент сульфата аммония (35% - 0% от насыщения, 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0). Скорость элюции 1 мл/мин.

Гидрофобную хроматографию проводили на колонке, содержащей фенил-сефарозу, предварительно уравновешенной раствором сульфата аммония с выбранной концентрацией в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0. Фермент в данном растворе наносили на колонку, после чего для максимального удаления несвязавшихся с носителем примесных белков колонку промывали тем же раствором. Выход примесных белков с колонки контролировался с помощью измерения поглощения элюата при 280 нм в проточном спектрофотометре. При достижении поглощения значения, близкого к нулю – т.е. к моменту выхода всех примесных белков с колонки – смывали фермент нисходящим линейным градиентом сульфата аммония от 35% до 0% от насыщения в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0.

На рисунке 4.5 представлены результаты очистки рекомбинантной SauFDH. Из него следует, что наиболее чистыми являются фракции 9-13 (с максимальной относительной активностью, рассчитанной, как отношение активности к общему поглощению на 280 нм), т.е. при значительно сниженном относительно начального

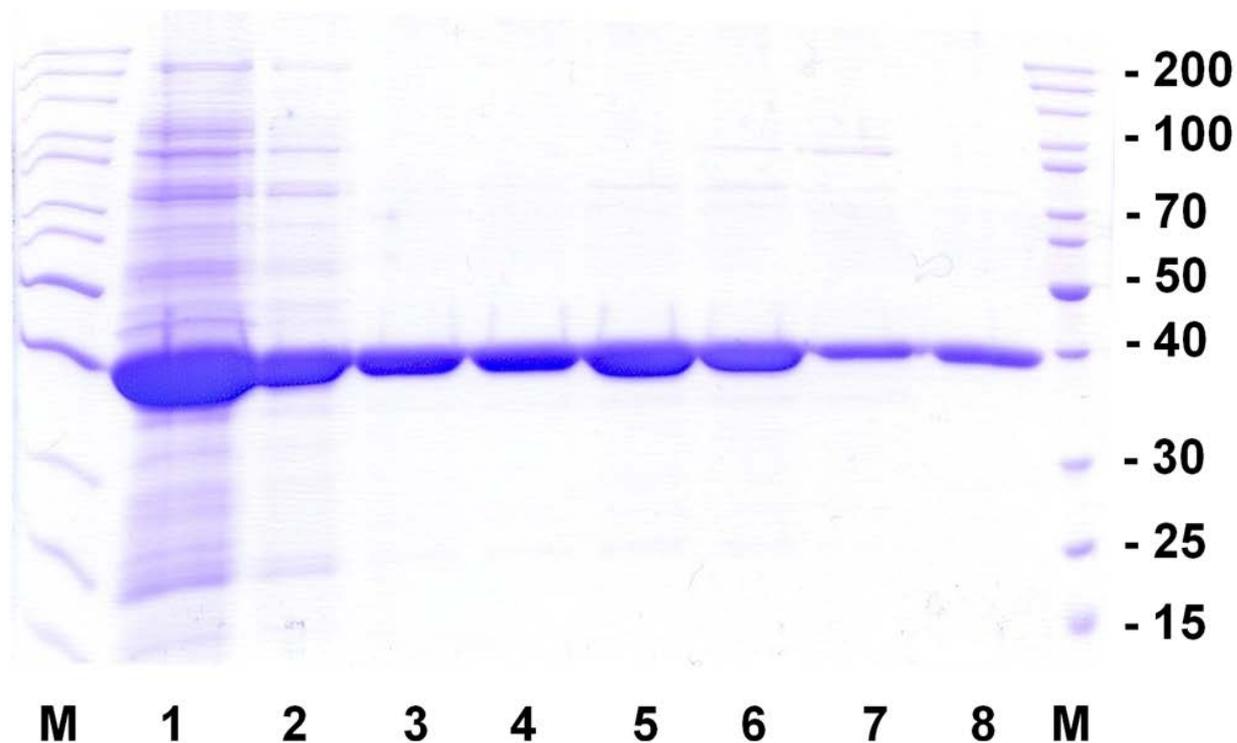
содержания сульфата аммония. Эти фракции были отобраны для дальнейшей очистки.

**Таблица 4.3.**

Очистка SauFDH, экспрессированного в клетках *E. coli*.

| Стадия  | Активность, ед. | Степень очистки, разы | Выход, % |
|---|-----------------|-----------------------|----------|
| Бесклеточный экстракт                                 | 12000           | 1                     | 100      |
| Фракционирование сульфатом аммония 80%                | 11500           | 1,04                  | 96       |
| Фракционирование сульфатом аммония 35%                | 10900           | 1,10                  | 91       |
| Гидрофобная хроматография на колонке Phenyl-Sepharose | 7300            | 1,64                  | 61       |
| Гель-фильтрация на колонке Sephadex G25               | 5800            | 2,1                   | 48       |

Результаты очистки SauFDH приведены в таблице 4.3. Степень очистки фермента по отношению к бесклеточному экстракту составила 2,1 раза с выходом 48%.



**Рис. 4.6.** Аналитический электрофорез в ПААГ в присутствии SDS-Na 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.

Эффективность очистки рекомбинантной формиатдегидрогеназы из бактерий *S.aureus* была проанализирована методом электрофореза. На рисунке 4.6 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%.

#### **4.4. Основные свойства рекомбинантной SauFDH**

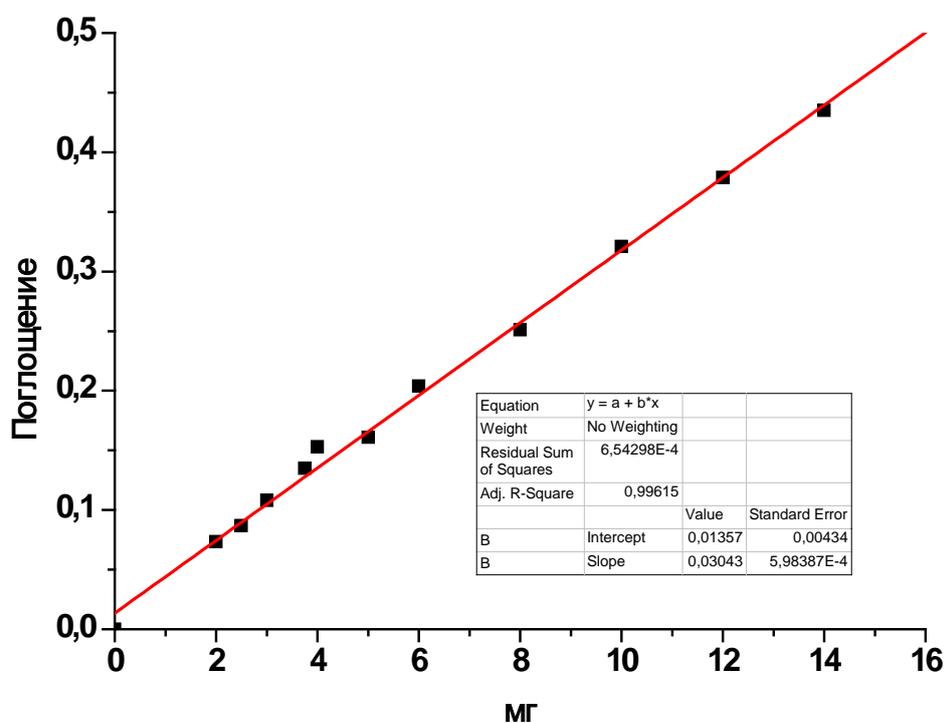
##### **4.4.1. Кинетические параметры**

Целью следующего этапа нашей работы было изучение основных свойств рекомбинантного фермента. Одним из главных параметров является константа Михаэлиса. Поэтому на нами были получены зависимости скорости реакции от концентрации кофермента и субстрата при насыщающих концентрациях второго компонента. Анализ этих зависимостей показал, что они описываются уравнением Михаэлиса-Ментен.

Были измерены константы Михаэлиса для обоих вариантов фермента (SauFDH1 и SauFDH2). 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 известных на данный момент формиатдегидрогеназ.

Кроме того, одним из важнейших параметров является удельная активность (количество единиц активности на один мг белка). Для её определения необходимо обладать действительно чистыми препаратами фермента, поскольку любые примеси могут отрицательно сказываться на точности определения концентрации белка. Однако, поскольку проведенная очистка фермента показала себя крайне эффективной, мы могли позволить с минимальной погрешностью определить эту величину и сравнить с другими формиатдегидрогеназами. Концентрацию фермента определяли методом Брэдфорда [160], 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. На рисунке 4.7 представлен калибровочный график, с помощью которого была определена концентрация SauFDH в растворе. Далее, по формуле  $k_{cat} = A/c$  была рассчитана величина каталитической константы.



**Рис. 4.7.** Калибровочный график для определения концентрации SauFDH: зависимость поглощения от концентрации белка сравнения (PseFDH) в кювете.

Таблица 4.3.

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

| Фермент                         | $K_M^{NAD^+}$ ,<br>мкМ | $K_M^{HCOO^-}$ ,<br>мМ | $k_{cat}$ ,<br>с <sup>-1</sup> | Каталитическая<br>эффективность<br>по $NAD^+$ ,<br>(мкМ·с) <sup>-1</sup> | Каталитическая<br>эффективность<br>по $HCOO^-$ ,<br>(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<br>[71]                  | 20                     | 2,8                    | 3,8                            | 0,08   | 1,36   |
| SoyFDH<br>[161]                 | 13,3                   | 1,5                    | 2,9                            | 0,2  | 1,93   |
| PseFDH<br>[16]                  | 65                     | 6,5                    | 7,3                            | 0,11   | 1,12   |
| CboFDH<br>[68]                  | 45                     | 5,9                    | 3,7                            | 0,08   | 0,63   |
| SceFDH<br>[70]                  | 36                     | 5,5                    | 6,5                            | 0,18   | 1,18   |
| OpaFDH<br>[unpublished<br>data] | 14                     | 2                      | 4,1                            | 0,29   | 2,1  |

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

В таблице 4.3. представлены кинетические параметры для ФДГ из различных природных источников. 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 [162] 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

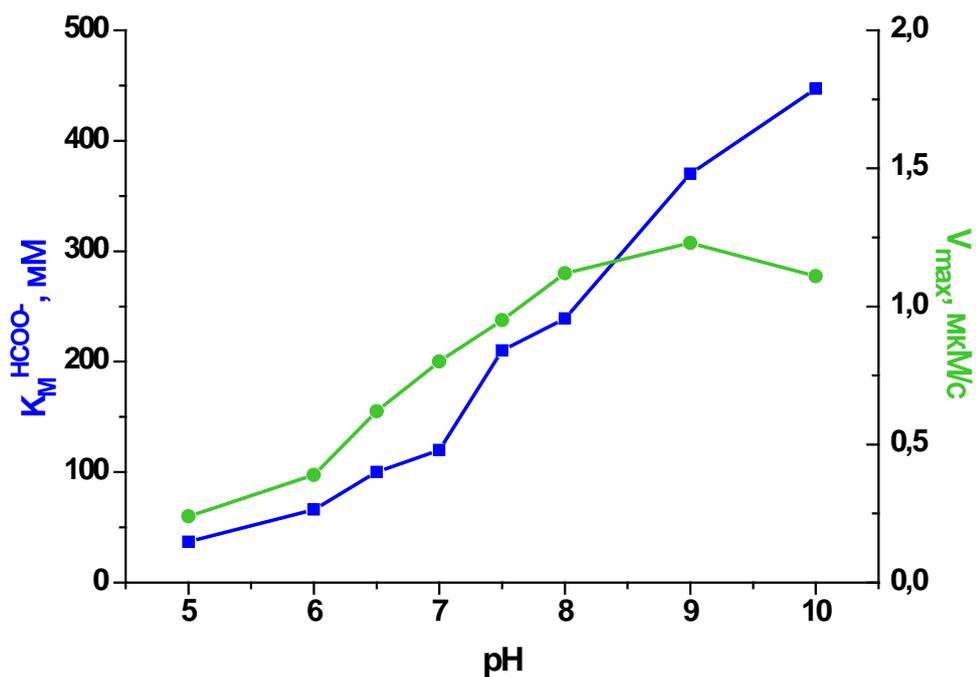
уровне с используемыми в производстве ферментами, в то время как каталитическая эффективность по формиату не является решающим фактором, поскольку в промышленных процессах используются насыщающие концентрации субстрата для смещения термодинамического равновесия реакции.

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  $NAD^+$ , ей необходимо быстро окислить формиат до конечного продукта любого пути метаболизма – углекислого газа, тем самым приобретая новую свободную энергию в виде NADH. Этим объясняются и высокие значения констант Михаэлиса – данный энергетический путь не должен функционировать до истощения других путей метаболизма.

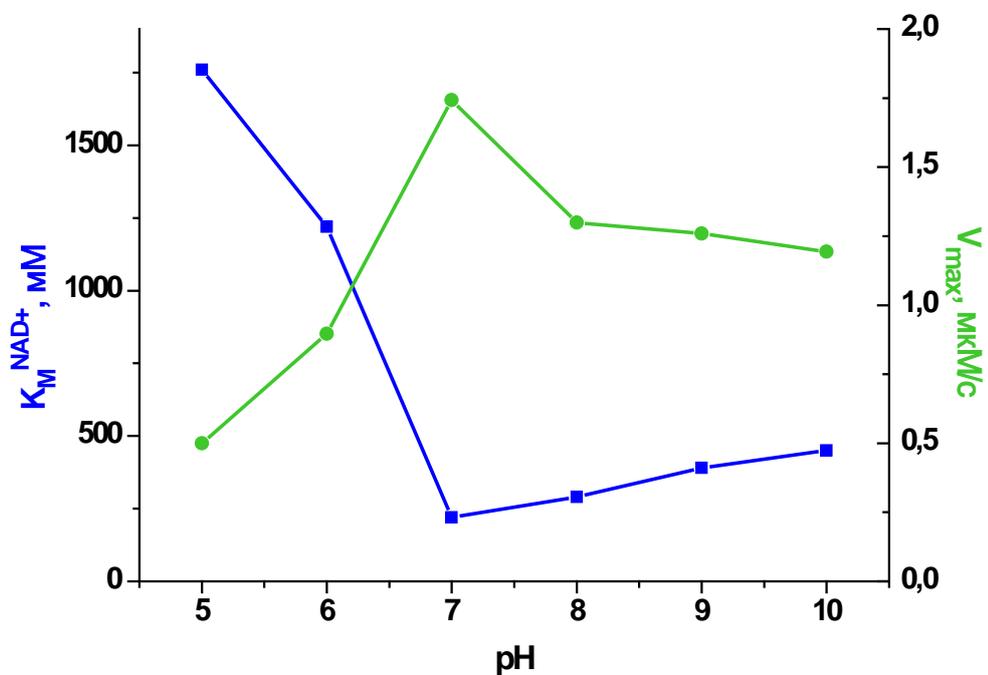
#### 4.4.2. Влияние pH на константу Михаэлиса

Для более точного определения роли формиатдегидрогеназы в жизнедеятельности бактерий *S.aureus* нами было изучено влияние кислотности среды на кинетические свойства данного фермента. Ранее эти данные исследовались для повышения эффективности использования ФДГ из различных источников в биотехнологии. Из литературы известно, что ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, а также ФДГ из сои, имеют широкий pH оптимум активности – примерно 6,0 – 10,0 [163].

На рисунках 4.8 и 4.9 представлены результаты исследования влияния pH на константы Михаэлиса  $SauFDH$  по  $NAD^+$  и формиату соответственно.



**Рис. 4.8.** Зависимость константы Михаэлиса по формиату для SauFDH 0,1М цитратно-фосфатный буфер (pH 5,0), натрий-фосфатный буфер (pH 6,0-7,0), 0,1М Tris-HCl (pH 7,5-10), 30°C.

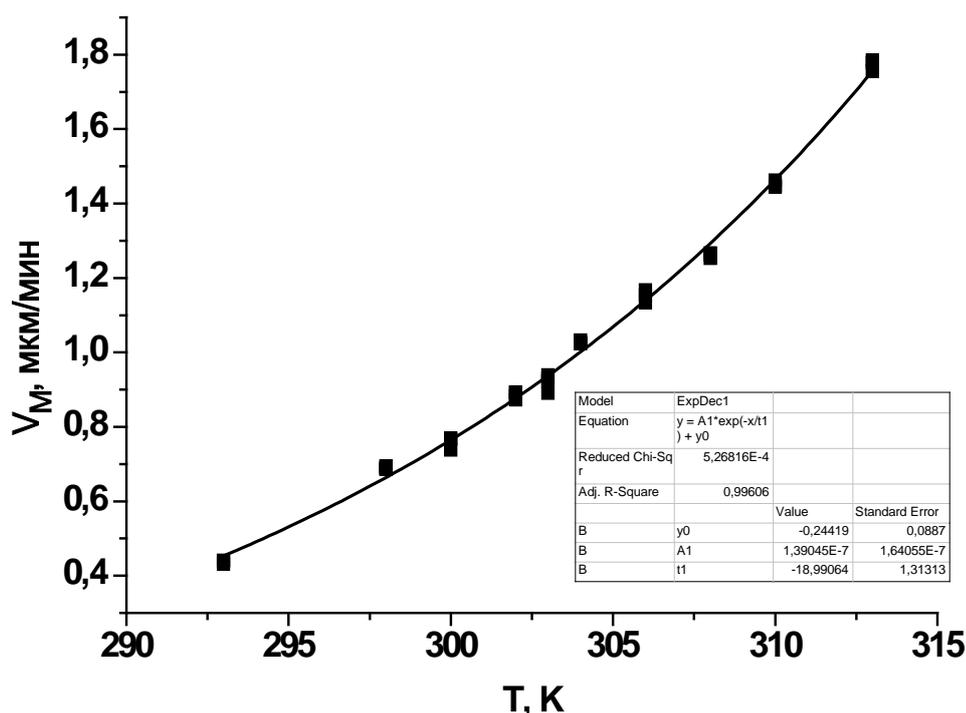


**Рис. 4.9.** Зависимость константы Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> для SauFDH. 0,1М цитратно-фосфатный буфер (pH 5,0), натрий-фосфатный буфер (pH 6,0-7,0), 0,1М Tris-HCl (pH 7,5-10), 30°C.

Как видно из рисунков, величина  $K_M$  по  $\text{NAD}^+$  при любом смещении от значения рН 7, увеличивается, однако это явление наиболее заметно в кислой области – увеличение более, чем в 5 раз, – в то время как в щелочной наблюдается плавное увеличение. Величина  $K_M$  по формиату уменьшается с переходом значения рН в кислую область на всем диапазоне от 10 до 5. Это может быть связано с тем, что при кислых рН активные центры двух субъединиц SauFDH перестают функционировать равноценно. Из-за этого связывание субстрата с одной субъединицей фермента ухудшает связывание субстрата во второй субъединице. В данном случае за  $K_M$  по формиату принималось значение  $K_M$  для первой субъединицы (получена обработкой участка наблюдаемой зависимости скорости от концентрации формиата до второго перегиба) по уравнению Михаэлиса-Ментен [70]. Как и в упомянутой работе, экспериментальные данные в координатах Лайнуивера-Берка ( $1/v$  от  $1/[S]$ ) аппроксимируются двумя прямыми с разными тангенсами угла наклона, что подтверждает неравнозначность работы субъединиц. С этим предположением также хорошо согласуется факт падения максимальной скорости  $V_{\max}$  на фоне резкого роста  $K_M$  по  $\text{NAD}^+$  при значениях рН ниже 7: по-видимому, в этом случае также наблюдается рассинхронизация субъединиц, преобладание одной субъединицы над другой, и, как следствие снижение эффективности фермента.

### 4.3.3. Температурная зависимость активности SauFDH

Для определения температурного оптимума активности SauFDH была изучена зависимость активности данного фермента от температуры. На рисунке 4.10 представлена зависимость максимальной скорости ферментативной реакции от температуры.



**Рис. 4.10.** Зависимость максимальной скорости реакции от температуры. Концентрация  $\text{NAD}^+$  0,3 мМ, концентрация формиата 1,1 М. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

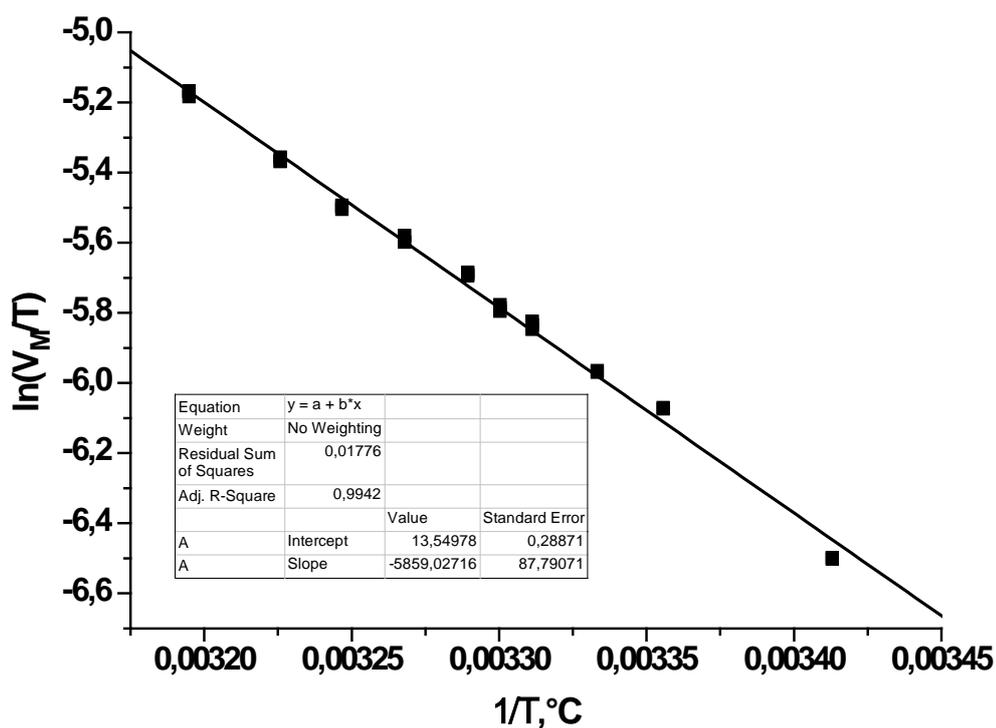
Данная зависимость описывается простой экспонентой. Поэтому полученные данные были обработаны в соответствии с теорией активированного комплекса. В соответствии с этой теорией зависимость наблюдаемой каталитической константы скорости  $k_{cat}$  от температуры  $T$  описывается следующим уравнением:

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} - \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)} \quad (1)$$

где  $k$  и  $h$  – постоянные Больцмана и Планка, соответственно,  $R$  – универсальная газовая постоянная, а  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  – активационные параметры. Так как  $k_{cat} = V_M/[E]$ , а концентрация фермента  $E$  в ходе реакции практически не изменяется, исходное уравнение может быть линеаризовано в координатах  $\ln(V_M/T)$  от  $1/T$ :

$$\ln\left(\frac{V_M}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B * [E]}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = const - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} \quad (2),$$

$$\text{где } const = \ln\left(\frac{k_B * [E]}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$$



**Рис. 4.11.** Линеаризация зависимости максимальной скорости реакции от температуры. Концентрация  $\text{NAD}^+$  300 мкМ, концентрация формиата 1100 мМ. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

Из рисунка 4.11 видно, что наблюдаемая зависимость максимальной скорости реакции от температуры действительно хорошо линеаризуется в координатах  $\ln(V_M/T)$  от  $1/T$ . В таблице 4.4 приведены данные для ферментов из других природных источников. Из представленных данных видно, что величина  $\Delta H^\ddagger$  для SauFDH является достаточно низкой по сравнению с аналогичными величинами из SoyFDH и PseFDH. Такое различие между величинами может быть свидетельством того, что для исследуемого фермента, как, например, и у AthFDH, наблюдаемая скорость реакции меняется с ростом температуры гораздо меньше, чем у указанных выше SoyFDH и PseFDH.

Таблица 4.4.

Сравнение величин  $\Delta H^\ddagger$  ФДГ из различных источников

| Фермент                   | $\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль |
|---------------------------|--------------------------------|
| SauFDH                    | $49,2 \pm 0,7$                 |
| PseFDH [16]               | $59,8 \pm 0,7$                 |
| AthFDH [16]               | $43,2 \pm 0,6$                 |
| OpaFDH [unpublished data] | $47,1 \pm 0,3$                 |
| SceFDH [70]               | $62,6 \pm 0,6$                 |
| SoyFDH [63]               | $54,5 \pm 0,6$                 |

#### 4.3.4. Ингибирование SauFDH неорганическими ионами

Изучение процесса ингибирования различными ионами особенно интересно как с научной, так и с прикладной точки зрения, поскольку необратимое ингибирование ФДГ в бактериях *S.aureus* может лишить клетку энергии, что может привести к её гибели. В качестве ингибиторов могут выступать различные аналоги кофермента и субстрата, однако нами был выбран именно аналог субстрата, поскольку неорганические ионы, аналогичные по структуре формиату и углекислому газу, являются наиболее эффективными ингибиторами ФДГ из бактерий [23] и дрожжей [[163]].

Было изучено ингибирование SauFDH тремя неорганическими ионами: азидом, роданидом и нитритом. На рисунках 4.12-4.14 (а) представлена зависимость начальной скорости реакции от концентрации формиата при различных концентрациях соответствующего ингибитора. Как видно из данных рисунков, все три выбранных иона являются конкурентными ингибиторами фермента по формиату.

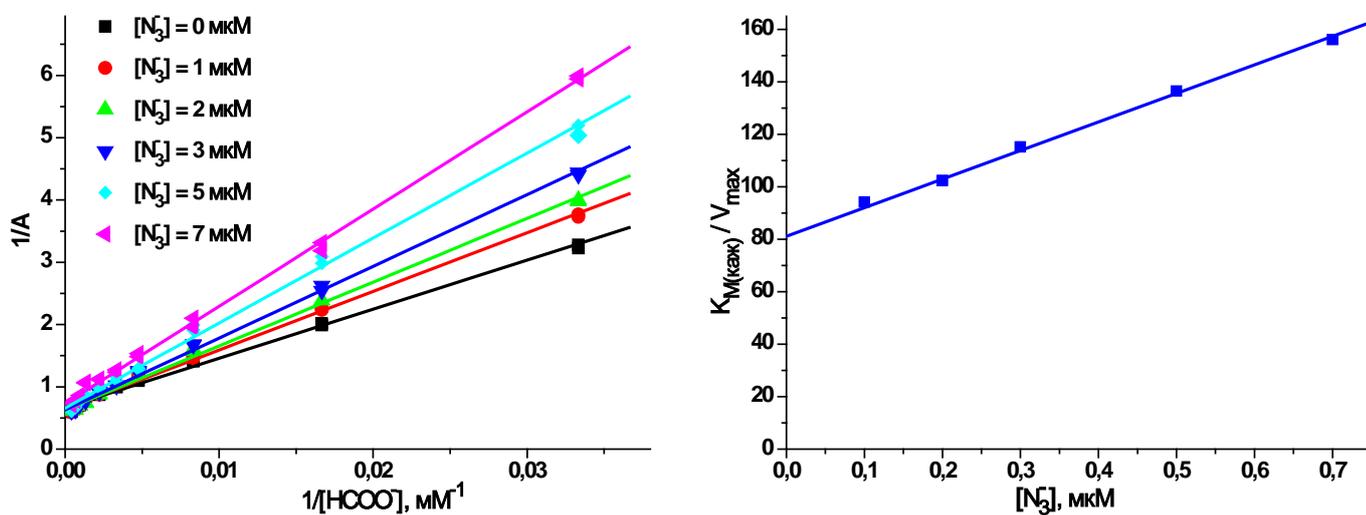
Для определения величины константы ингибирования были построены графики зависимостей тангенса угла наклона прямых от концентрации соответствующих ингибиторов, которые описываются уравнением:

$$\frac{K_{M(каж.)}}{V_M} = \frac{K_M}{V_M} + \frac{K_M}{K_I \cdot V_M} \cdot [I] \quad (3)$$

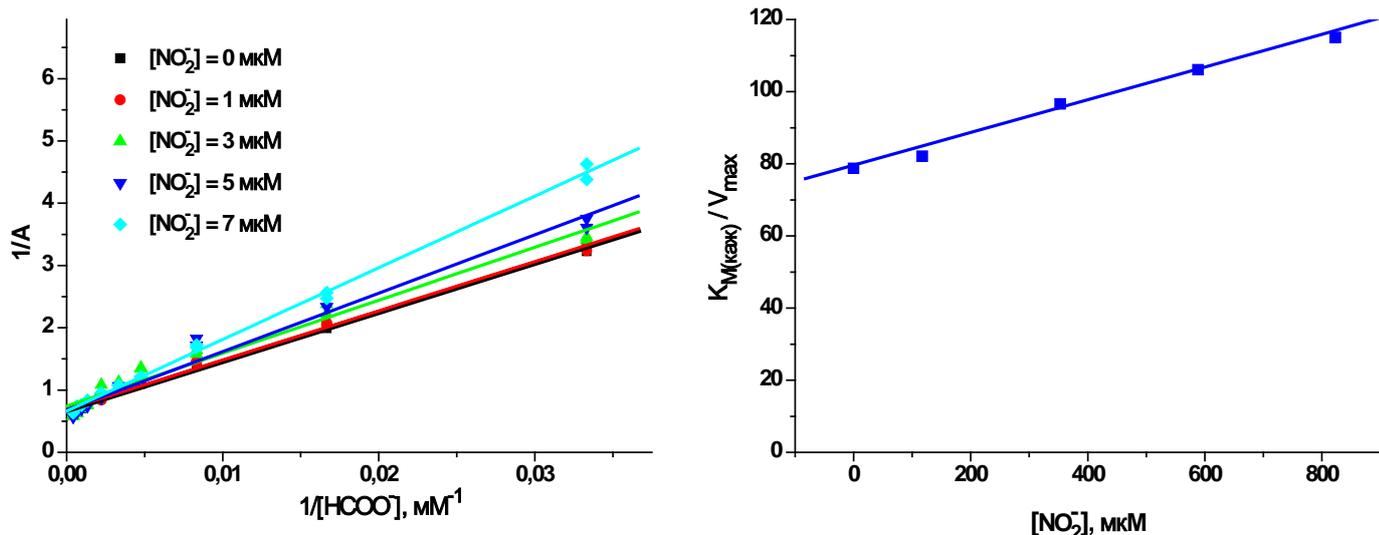
где  $V_M$  и  $K_M$  – максимальная скорость и константа Михаэлиса фермента по субстрату, и  $K_I$  – константа ингибирования. Данные зависимости приведены на рисунках 4.12-4.14 (б).

Согласно уравнению (3) тангенс угла наклона прямой равен  $\frac{K_M}{K_I \cdot V_M}$ , а величина отрезка, отсекаемого прямой на оси абсцисс –  $\frac{K_M}{V_M}$ . Константа ингибирования рассчитывается как отношение величины отсекаемого отрезка на величину тангенса угла наклона:

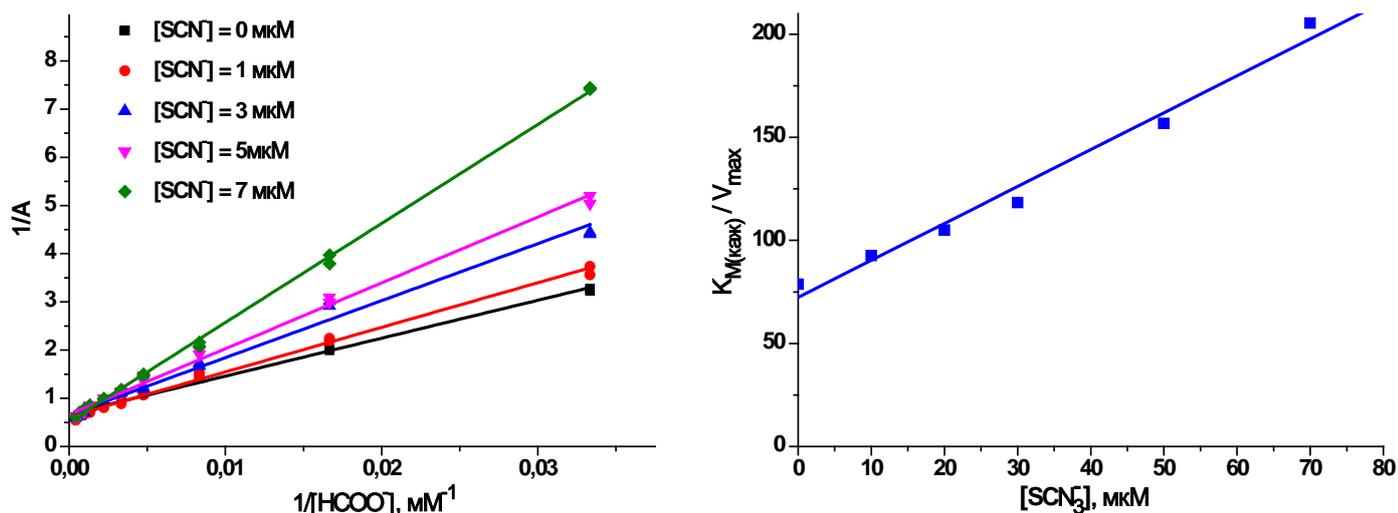
$$K_I = \frac{K_M}{V_M} / \frac{K_M}{K_I \cdot V_M} \quad (4)$$



**Рис. 4.12.** (а) Зависимость активности SauFDH от концентрации формиата при постоянной концентрации азид-иона в двойных обратных координатах.  
(б) Зависимость отношения  $K_{M(каж)}/V_{max}$  от концентрации азид-иона.



**Рис. 4.13.** (а) Зависимость активности SauFDH от концентрации формиата при постоянной концентрации нитрит-иона в двойных обратных координатах. (б) Зависимость отношения  $K_{M(каж)}/V_{max}$  от концентрации нитрита.



**Рис. 4.14.** (а) Зависимость активности SauFDH от концентрации формиата при постоянной концентрации роданид-иона в двойных обратных координатах. (б) Зависимость отношения  $K_{M(каж)}/V_{max}$  от концентрации роданида.

В таблице 4.5 представлены значения констант ингибирования различных формиатдегидрогеназ, в том числе – и рекомбинантной SauFDH для азид-, роданид- и нитрит- ионов. Из данной таблицы видно, что константы ингибирования имеют схожий порядок. При переходе от азид- к роданиду и нитрит-иону константа ингибирования увеличивается как для всех представленных ферментов, однако ФДГ из бактерий *S.aureus* этот переход наиболее резкий и

составляет более, чем два порядка в каждом случае. Тем не менее, SauFDH обладает самыми низкими значениями констант ингибирования азид-иона. Таким образом, исследование показало, что наилучшим конкурентным ингибитором по формиату для SauFDH является азид-ион, что может использоваться как в дальнейших опытах по кристаллизации тройного комплекса фермента и изучению температурной стабильности, так и в целях борьбы с бактериями.

**Таблица 4.5.**

Результаты изучения ингибирования ФДГ из различных источников

| Фермент      | Константа ингибирования, М    |                               |                               |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|              | Азид                          | Тиоцианат                     | Нитрит                        |
| SauFDH       | $(7,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$ | $(4,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ | $(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ |
| SoyFDH [63]  | $(3,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-7}$ | $(3,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$ | $(7,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ |
| AraFDH[164]  | $(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-7}$ | $(2,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$ | $(7,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$ |
| CboFDH [64]  | $(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$ | н/д                           | н/д                           |
| PseFDH [165] | $(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-7}$ | $10^{-5}$                     | $10^{-4}$                     |
| SceFDH [70]  | $2,0 \pm 0,5$                 | н/д                           | н/д                           |

## 4.5. Температурная стабильность SauFDH

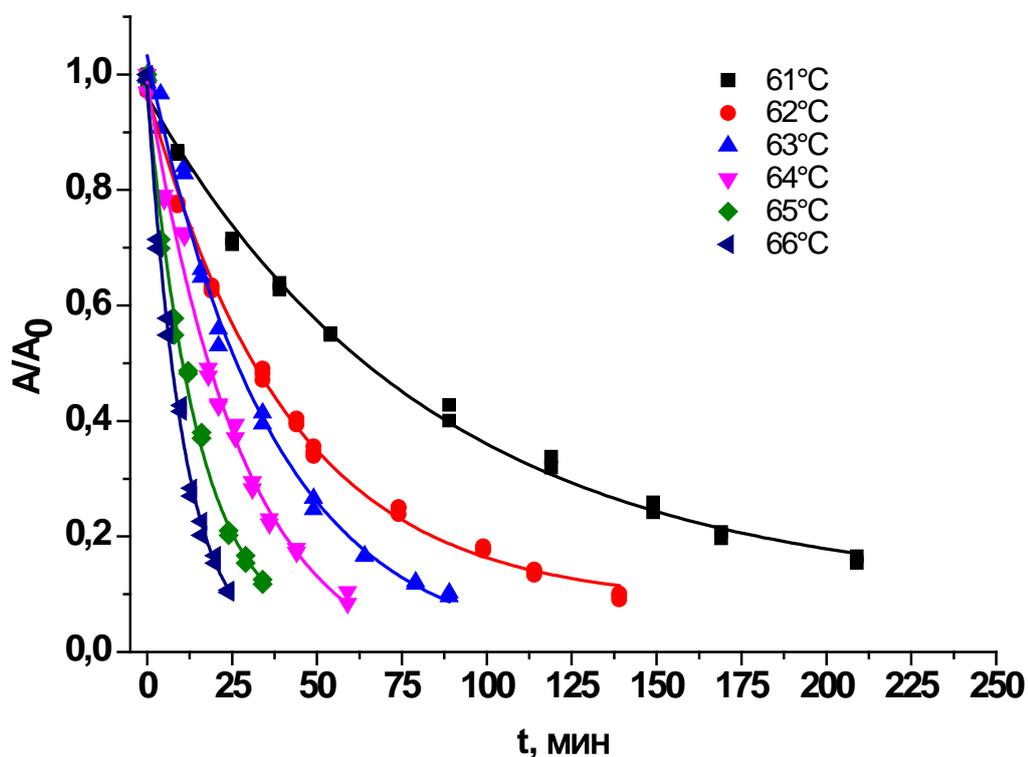
### 4.5.1. Стабильность SauFDH при повышенных температурах

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 [147]. Повышение термостабильности CboFDH относительно природного фермента [68, 166] позволило повысить температуру, тем самым увеличив скорость реакции и эффективность производства. Кроме того, как уже было указано в разделе 4.3, данные о термостабильности фермента помогают оптимизировать его очистку.

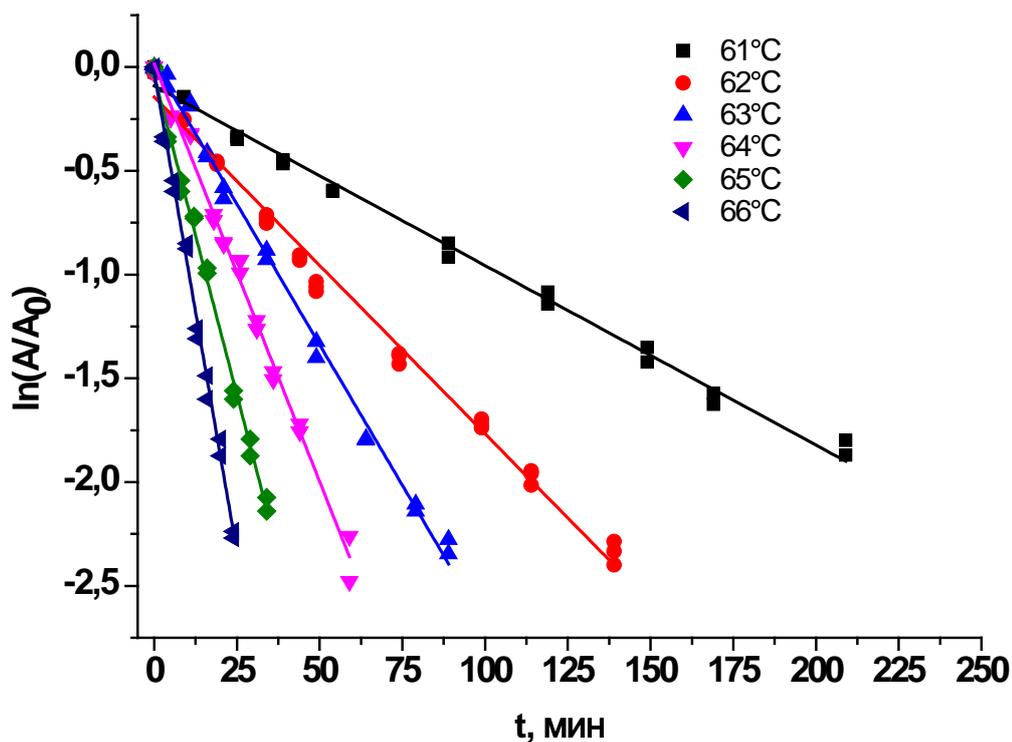
Исходя из всего вышесказанного, логичным продолжением исследования свойств фермента стало изучение температурной стабильности SauFDH.

Исследование проводилось с помощью двух методов: кинетики температурной инактивации и дифференциальной сканирующей калориметрии.

Полученные данные необходимо сравнивать с уже имеющимися литературными сведениями о других ферментах. Поэтому измерения было решено проводить в стандартных для этого эксперимента условиях – при рН 7,0. На рисунке 4.15 представлены зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени при различных температурах в таких условиях.



**Рис. 4.15.** График зависимости остаточной активности от температуры при различных температурах. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0

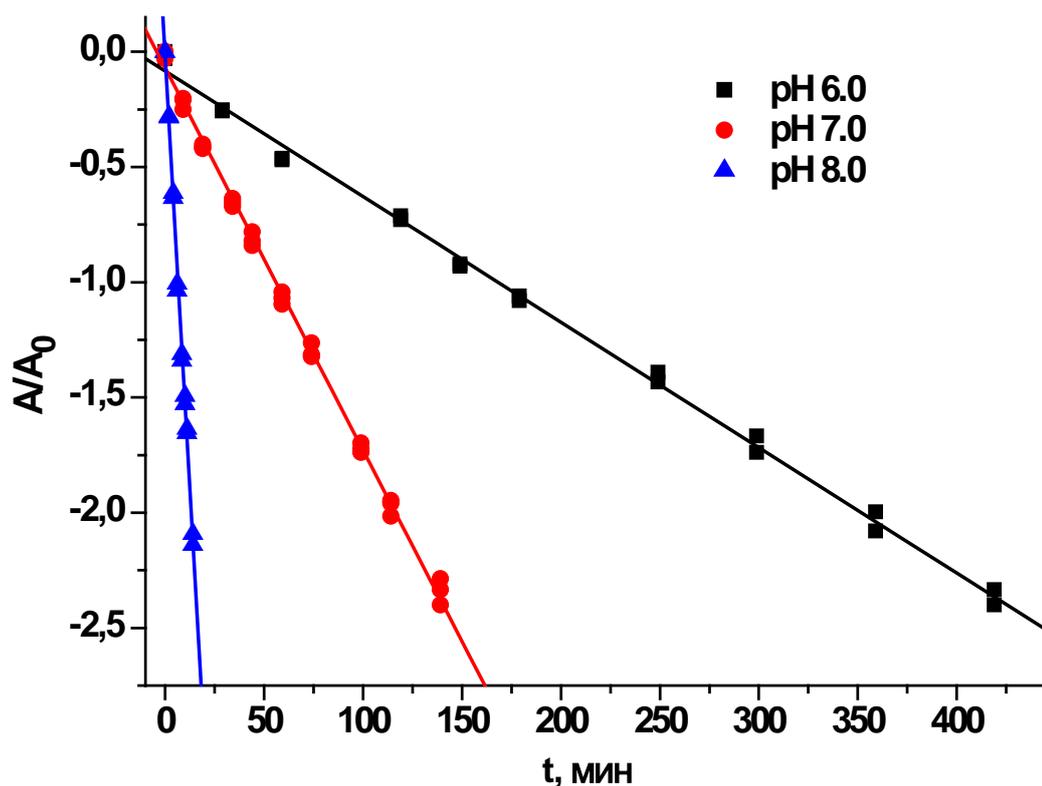


**Рис. 4.16.** График зависимости остаточной активности от температуры при различных температурах в полулогарифмических координатах. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0.

Из рисунка 4.16 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 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. Этот факт 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 формиатдегидрогеназ, за исключением формиатдегидрогеназы из пекарских дрожжей *S.cerevisiae* [70].

#### 4.5.2. Влияние pH и ионной силы на термоинактивацию SauFDH



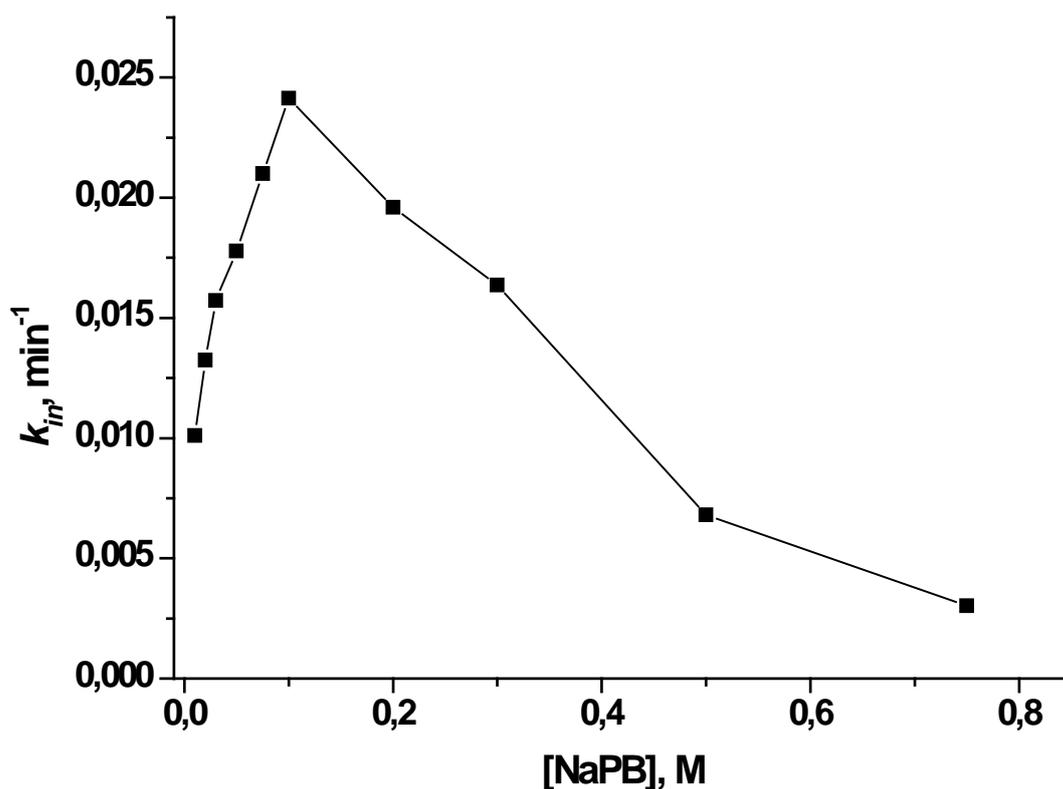
**Рис. 4.17.** Сравнение температурной стабильности SauFDH при различных pH, 0,1 М натрий-фосфатный буфер, 62°C.

На рисунке 4.17 представлена зависимость константы скорости термоинактивации SauFDH от pH буферного раствора, который менялся от 6,0 до 8,0. Из приведенного рисунка видно, что стабильность SauFDH при pH 6,0 гораздо выше, чем при pH 8,0. Стоит отметить, что для большинства других ФДГ характерна обратная картина: стабильность растет с повышением pH, хотя существуют и такие, у которых максимальный стабилизирующий эффект оказывает буфер с pH 7, в то время как при других pH наблюдается снижение активности.

**Таблица 4.6.**

Значения активационных параметров SauFDH при различных pH

| SauFDH | $\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль | $\Delta S^\ddagger$ , Дж/(моль·К) |
|--------|--------------------------------|-----------------------------------|
| pH 6,0 | 680 ± 20                       | 1740 ± 60                         |
| pH 7,0 | 430 ± 20                       | 1010 ± 60                         |
| pH 8,0 | 380 ± 20                       | 860 ± 60                          |



**Рис. 4.18.** Зависимость величины константы скорости инактивации SauFDH от концентрации фосфатного буфера. 0,01 М – 0,75 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0, 64 °С.

На рисунке 4.18 приведена зависимость константы скорости термоинактивации SauFDH от концентрации буфера при рН 7,0. Данный график свидетельствует о том, что ионная сила раствора существенно влияет на скорость инактивации фермента SauFDH. Наименьшая стабильность наблюдается при концентрации 0,1 М, а при сдвиге в большую или меньшую стороны происходит увеличение стабильности.

### 4.5.3. Определение активационных параметров процесса

#### термоинактивации с помощью теории активированного комплекса

Наиболее распространенным методом обработки зависимостей констант скорости от температуры является теория активированного комплекса [167]. Активационные параметры реакций, полученные с ее помощью, позволяют сравнивать между собой ферменты с разной температурной стабильностью, а также оценить вклад энтальпийного и энтропийного факторов в процесс инактивации.

Мономолекулярный характер процесса инактивации SauFDH на всем диапазоне исследованных температур позволяет применить теорию активированного комплекса для анализа этого процесса.

В разделе 4.3.3 было указано, что уравнение зависимости константы скорости первого порядка от температуры (Уравнение 1) при линейризации приобретает вид:

$$\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = const - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} \quad (5),$$

где  $const = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$ .

На рисунке 4.19. приведены данные, полученные при pH 7,0 и концентрации буфера 0,1 М. Величины  $\Delta H^\ddagger$  рассчитывается из тангенса угла наклона прямой согласно уравнению (5).

Величина  $\Delta S^\ddagger$ , полученная аппроксимацией прямой на нулевое значение оси ординат, приводит к возникновению большой погрешности, в силу величины диапазона, на котором проводится аппроксимация. Однако расчетная величина  $\Delta S^\ddagger$ , получаемая из тангенса угла наклона зависимости  $\Delta G^\ddagger$  от T с помощью уравнения:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger,$$

обладает гораздо меньшей погрешностью.

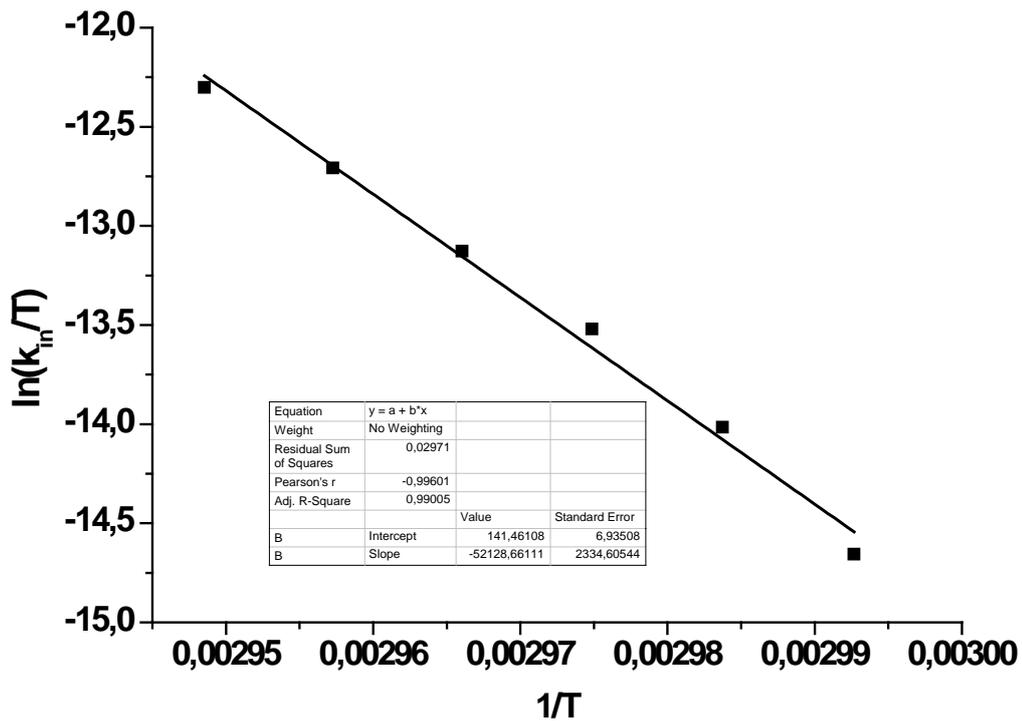


Рис. 4.19. Зависимость константы скорости инактивации  $k_{in}$  от температуры в координатах  $[\ln(k_{in}/T)] - 1/T$

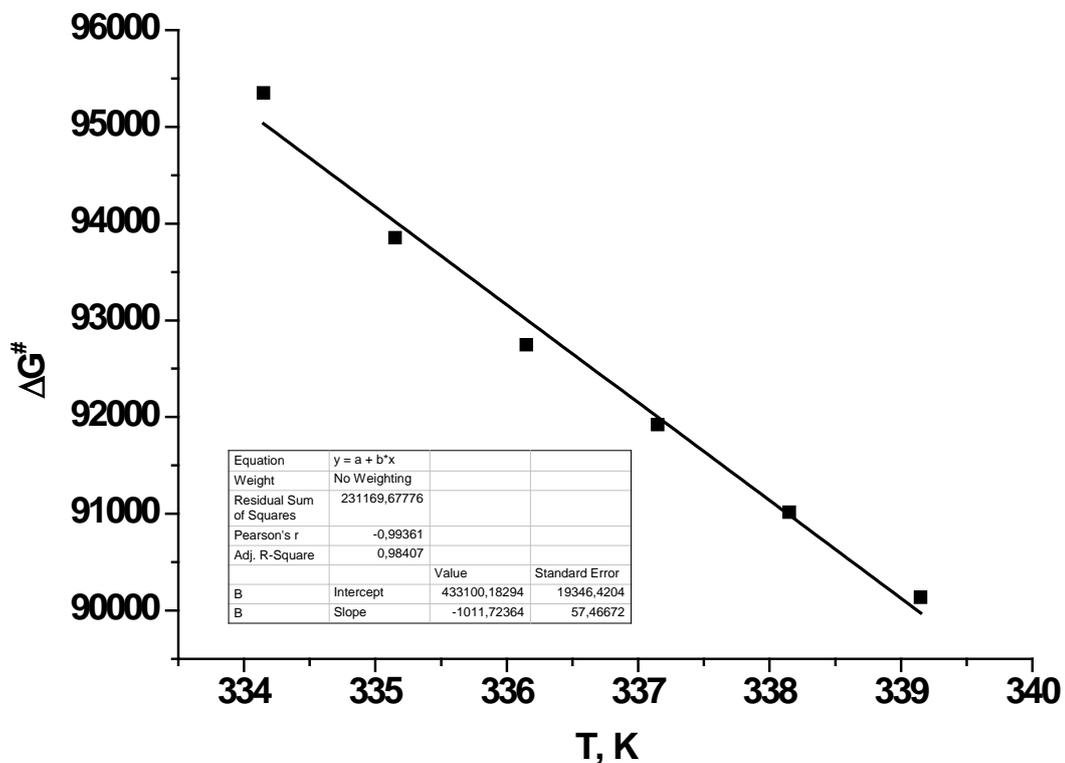


Рис. 4.20. Зависимость энергии активации  $\Delta G^\ddagger$  от температуры

Для определения энергии активации  $\Delta G^\ddagger$  используется следующее выражение:

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[ \ln \left( \frac{k_B}{h} \right) - \ln \left( \frac{k_{in}}{T} \right) \right] = RT \ln \left( \frac{k_B T}{kh} \right) \quad (7)$$

На рисунке 4.20 показана зависимость энергии активации  $\Delta G^\ddagger$  от температуры для pH 7,0 и концентрации буфера 0,1 М.

Из полученных зависимостей были определены значения энтальпии ( $\Delta H^\ddagger$ ) и энтропии ( $\Delta S^\ddagger$ ) активации, и проведено их сравнение с соответствующими показателями ФДГ из других источников (таблица 4.7).

**Таблица 4.7.**

Значения активационных параметров ФДГ из различных источников.  $T_{20}$  – температура, при которой фермент теряет половину начальной активности за 20 минут;  $k_{in}^{55}$  – теоретическая константа скорости инактивации при 55°C.

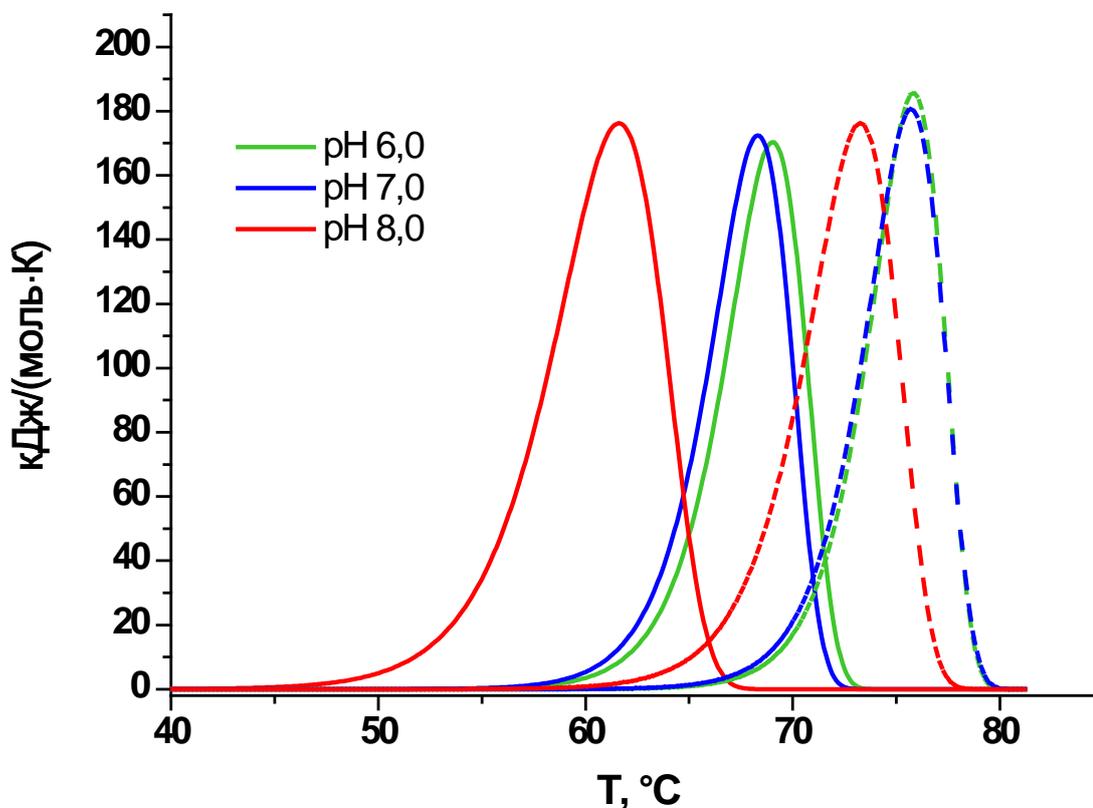
| Фермент                      | $\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль | $\Delta S^\ddagger$ , Дж/(моль*К) | $k_{in}^{55}$ , с <sup>-1</sup> | $T_{20}$ , °С |
|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------|
| <b>SauFDH</b>                | 430±20                         | 1010±60                           | $8,2 \cdot 10^{-6}$             | 64,0          |
| PseFDH [168]                 | 540 ± 20                       | 1320 ± 40                         | $4,8 \cdot 10^{-6}$             | 63,0          |
| OpaFDH<br>[unpublished data] | 670                            | 1690                              | $5,2 \cdot 10^{-6}$             | 61,2          |
| AthFDH                       | 490 ± 30                       | 1200 ± 70                         | н/д                             | 59,5          |
| MorFDH [64]                  | н/д                            | н/д                               | $1,2 \cdot 10^{-4}$             | 58,0          |
| CboFDH [64]                  | 310 ± 20                       | 680 ± 55                          | $1,8 \cdot 10^{-4}$             | 56,8          |
| SoyFDH                       | 370±20                         | 830±60                            | $1,1 \cdot 10^{-3}$             | 52,8          |
| PpaFDH<br>[unpublished data] | 640                            | 1660                              | $1,2 \cdot 10^{-3}$             | 52,3          |
| SceFDH [70]                  | 420 ± 40                       | н/д                               | н/д                             | 47,8          |

Значения активационных параметров можно использовать для расчета теоретических величин констант скорости инактивации фермента в том случае, если, в силу различных факторов, невозможно определить их экспериментально. В таблице 4.7 приведена константа скорости инактивации при 55°C ( $k_{in}^{55}$ ), рассчитанная с помощью активационных параметров каждого фермента. Также в таблице представлены данные по такому параметру, как  $T_{20}$ , т.е. температуре, при которой время полуинактивации фермента составляет 20 минут. С помощью данного параметра определяется относительная термостабильность ферментов. Как

видно из таблицы 4.7, теоретический показатель  $k_{in}^{55}$  хорошо согласуется с экспериментальным  $T_{20}$ . Результаты исследования термоинактивации SauFDH свидетельствуют о том, что этот фермент имеет чрезвычайно высокую стабильность среди описанных на настоящий момент форматдегидрогеназ, сравнимую только с PseFDH, лидером среди ФДГ по данному параметру.

#### 4.5.4 Изучение термостабильности SauFDH с помощью ДСК

Термостабильность SauFDH была также изучена методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Была исследована зависимость температурной зависимости SauFDH от pH и от добавления кофермента и конкурентного ингибитора по субстрату азида: данные работы [71] 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 4.21.



**Рис. 4.21.** 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.

Из данного рисунка можно сделать несколько выводов: данные о зависимости температурной стабильности от pH раствора хорошо согласуются с данными, полученными по методу кинетики инактивации (раздел 4.5.2). Действительно, эксперимент показал, 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. 4.21, во всех изученных pH тройной комплекс [SauFDH+NAD<sup>+</sup>+N<sub>3</sub><sup>-</sup>] является более стабильным, чем апо-фермент, что, по-видимому, объясняется переходом белковой глобулы в «закрытую» конформацию и последующей компактизацией структуры. В таблице 4.8 приведены численные параметры данного эффекта, из которых видно, что наибольший эффект стабилизации достигается при pH 8,0, поскольку при таком pH апо-фермент наименее стабилен, а добавление NAD<sup>+</sup> и азида приводит к максимальному увеличению стабильности, в то время как при pH 6,0 и 7,0 показатели T<sub>max</sub> практически не различаются.

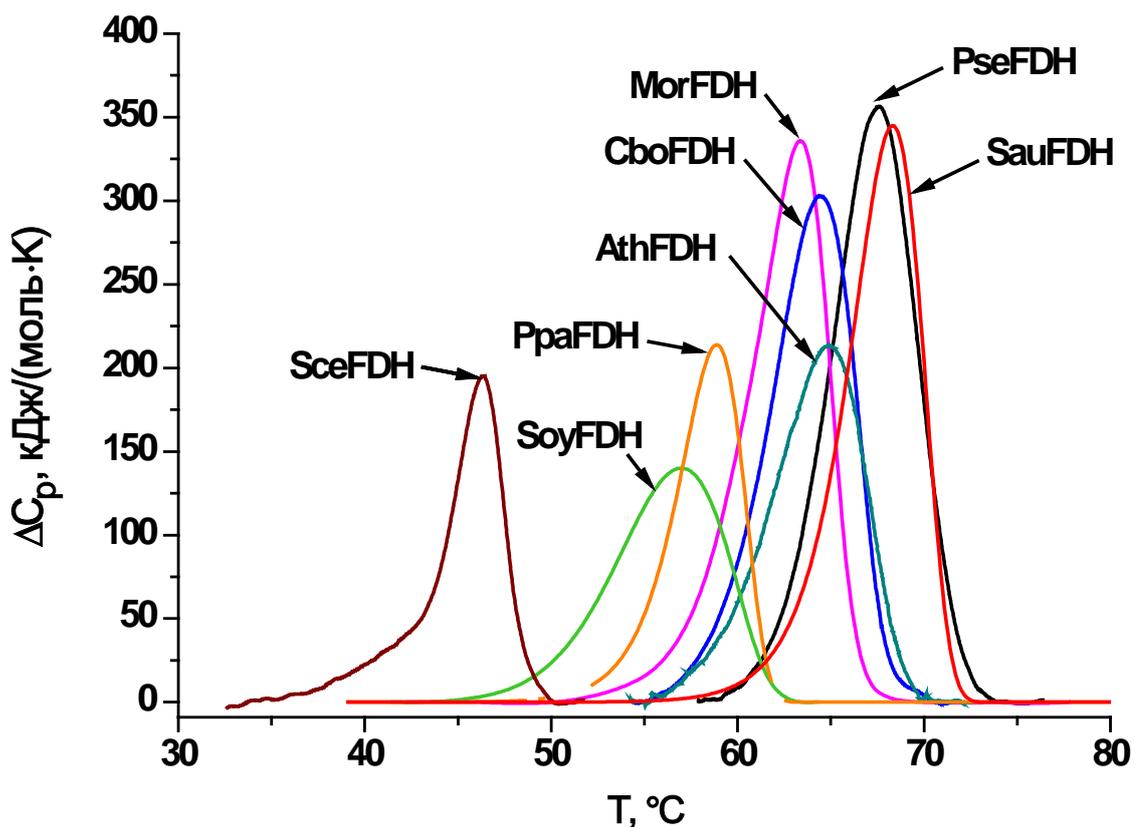
**Таблица 4.8.**

Значения температуры плавления SauFDH в различных условиях (0,1М натрий-фосфатный буфер). Концентрации NAD<sup>+</sup> и N<sub>3</sub><sup>-</sup> – 50 мМ и 15 мМ, соответственно.

| Фермент  | T <sub>max</sub> | ΔT <sub>max</sub> * |
|--|------------------|---------------------|
| SauFDH, pH 6,0   | 69               | 6,8                 |
| SauFDH, pH 7,0   | 68,3             | 7,4                 |
| SauFDH, pH 8,0   | 61,6             | 11,7                |
| [SauFDH+NAD <sup>+</sup> +N <sub>3</sub> <sup>-</sup> ],<br>pH 6,0 | 75,8             | –                   |
| [SauFDH+NAD <sup>+</sup> +N <sub>3</sub> <sup>-</sup> ],<br>pH 7,0 | 75,7             | –                   |
| [SauFDH+NAD <sup>+</sup> +N <sub>3</sub> <sup>-</sup> ],<br>pH 8,0 | 73,3             | –                   |

\* - T<sub>max</sub><sup>SauFDH</sup> – T<sub>max</sub><sup>[SauFDH+NAD<sup>+</sup>+N<sub>3</sub><sup>-</sup>]</sup>

На рисунке 4.22 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 превышает ее в плане температурной стабильности и является одной из наиболее термостабильных ФДГ.



**Рис. 4.22.** График ДСК – сравнение температурной стабильности SauFDH и других формиатдегидрогеназ. Натрий-фосфатный буфер 0,1 М, pH 7,0.

Данные таблицы 4.9, в которой приведены показатели  $T_{\max}$  для различных нативных и мутантных ФДГ, также подтверждают тот факт, что по термостабильности SauFDH превышает большинство изученных формиатдегидрогеназ.

**Таблица 4.9.**

Значения температуры плавления для формиатдегидрогеназ из различных источников.

| <b>Фермент</b> | <b>T<sub>max</sub></b>  |
|----------------|-------------------------|
| PseFDH GAV     | 68,9 [114]              |
| SauFDH         | 68,3                    |
| PseFDH         | 67,6 [71]               |
| CboFDH         | 64,4 [71]               |
| AthFDH         | 64,9[61]                |
| MorFDH         | 63,4[61]                |
| PpaFDH         | 59,3 [unpublished data] |
| SceFDH         | 46,4 [70]               |
| SoyFDH         | 57,0 [71]               |
| OpaFDH         | 65,4 [unpublished data] |

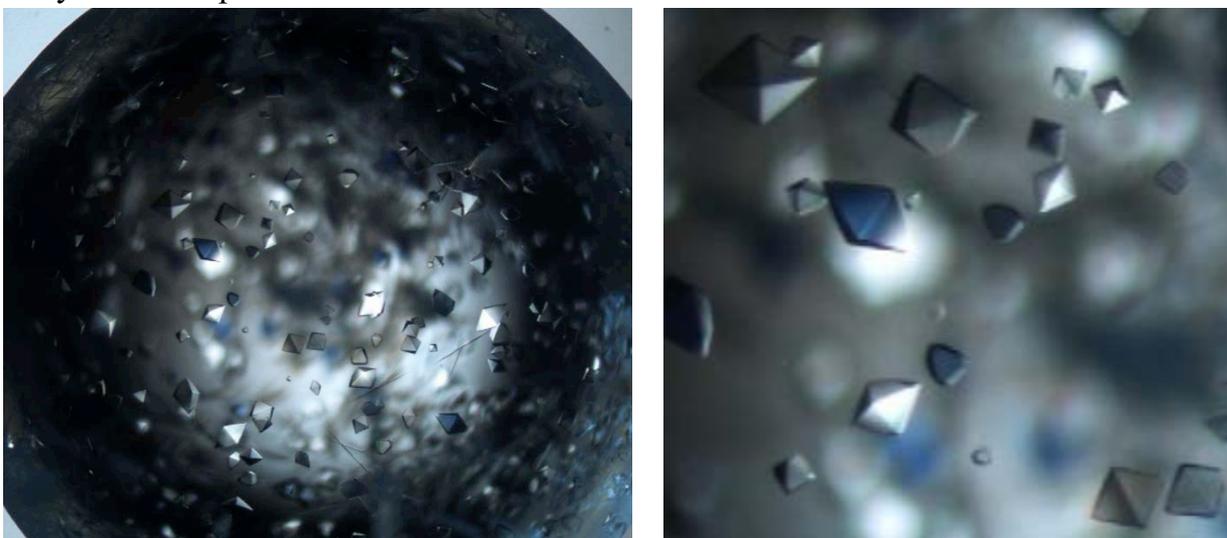
#### **4.6. Кристаллизация SauFDH и определение структуры апо-формы**

Как уже упоминалось выше, 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. Наша лаборатория применяет для этого 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 SoyFDH, решению трехмерной структуры фермента и ее анализу.

Для получения кристаллов использовался метод висячей капли (см. Материалы и методы). 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 (0,2×0,2×0,3) мм соответственно (рисунок 4.23). Условия кристаллизации, при которых был получен кристалл: 16°C, состав буфера – 200 мМ ацетат кальция, рН 7,0 + 25% ПЭГ 3350. В таблице 4.10 приведены характеристики структуры полученного кристалла SauFDH.



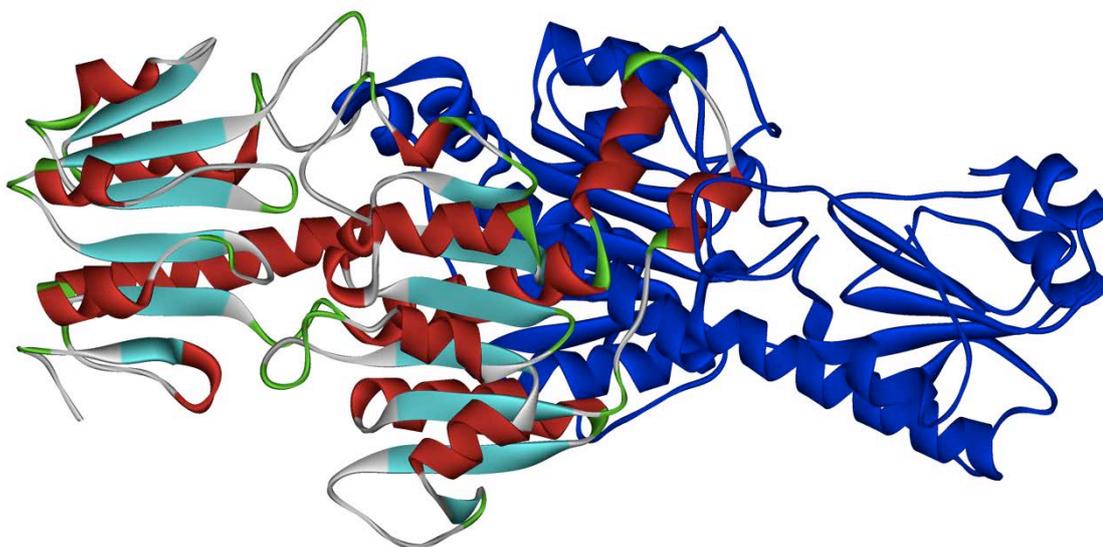
**Рис. 4.23.** Фотография кристаллов SauFDH

**Таблица 4.10.**

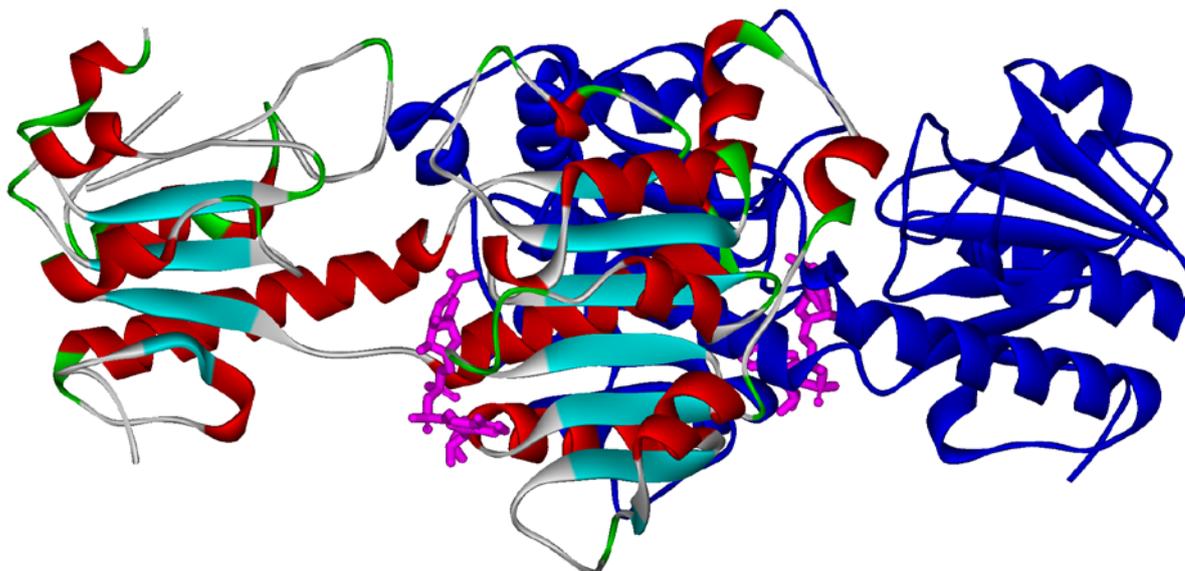
Характеристики структуры кристалла SauFDH.

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| 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. 4.24 и 4.25 приведены трехмерные структуры апо- и холо- форм SauFDH, соответственно. По этим структурам было проведено моделирование мутантных форм, описанное в следующей главе.



**Рис. 4.24.** Структура апо-формы SauFDH, разрешение 1,8Å.

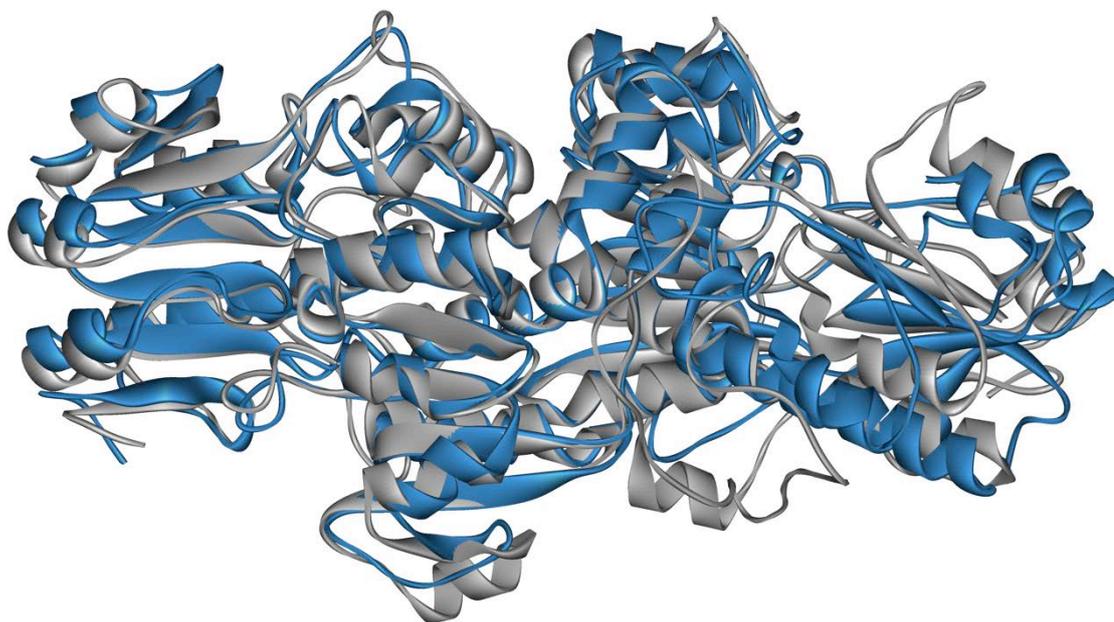


**Рис. 4.25.** Структура холо-формы SauFDH, разрешение 2,5Å.

#### **4.7. Белковая инженерия SauFDH и SoyFDH**

Ранее в нашей лаборатории для стабилизации ФДГ из сои *Glycine Max* [161] были использованы подходы, основанные на введении в белковую глобулу дополнительных ионных пар, заполнении полостей внутри глобулы и повышение жесткости цепи за счет введения остатков пролина. Данные подходы были использованы и в этой работе.

Поскольку для успешного проведения направленного мутагенеза требуется выбрать оптимальное положение для введения аминокислотной замены, необходимо тщательно проанализировать трехмерную структуру исследуемого фермента. На момент начала работы мы еще не располагали экспериментальной структурой SauFDH, поэтому для выбора положений пользовались модельной структурой, построенной на базе структуры фермента PseFDH. Для формиаатдегидрогеназ характерна высокая гомология: даже между достаточно эволюционно отдаленными источниками наблюдается большое совпадение структуры (несмотря на зачастую встречающиеся различия в аминокислотных последовательностях), а структура активного центра остается практически неизменной от фермента к ферменту. На рисунке 4.26 изображено наложение двух экспериментальных структур – PseFDH (код PDB: 2NAC) и полученной позднее SauFDH. Как видно из рисунка, предположение о высокой структурной гомологии между этими двумя ферментами полностью оправдано.



**Рис. 4.26.** Наложение структур формиаатдегидрогеназ SauFDH (голубым цветом) и PseFDH (серым цветом) (код PDB: 2NAC).

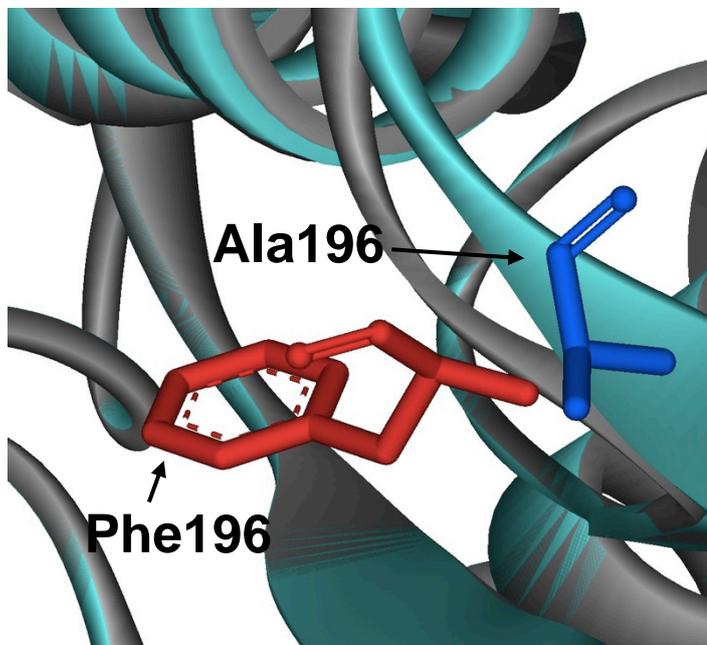
#### 4.7.1. Изучение влияния структуры консервативного мотива GXGXXG на свойства и функции фермента

Выбор аминокислотной замены в данном положении проводился посредством анализа выравнивания аминокислотных последовательностей. В высоко консервативном мотиве был найден остаток фенилаланина в 196 положении, отличающийся от аминокислотных остатков в соответствующем положении у ферментов из других источников. На рисунке 4.27 показан фрагмент выравнивания с выделенным мотивом GXGXXG, характерным для всех дегидрогеназ. Было решено провести замену данного аминокислотного остатка на более характерный для этого положения остаток аланина.

|        |              |          |          |          |          |          |          |          |                                     |          |                                      |
|--------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------------------------|----------|--------------------------------------|
| PseFDH | YDLEAMHVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | LAVLRRLAPFDV-HLHYTDRHRLPESVEKELN--- |          |                                      |
| UncFDH | YDVEGMHVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | IDMLRKMKPFDV-HLHYFDIHKLSDEIEAELN--- |          |                                      |
| MorFDH | YDVEGMHVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | LRVLRLLAPFDM-HLHYTDRHRLPEAVEKELN--- |          |                                      |
| SauFDH | HELQHKTI     | <b>G</b> | <b>I</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b>                            | <b>G</b> | QLVLAERLAPFNV-TLQHYDPINQQDHKLSKFV--- |
| ParFDH | YDIEGMHVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | LAVLRRLKPFGM-HLHYTDRHRLPREVELELD--- |          |                                      |
| HypFDH | YDIEGMHVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | LRVLRLLKPFDV-HLHYMDRYKLPDAVEKELN--- |          |                                      |
| SinFDH | YDIEGMDIGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | TAVLRRLKPFDV-KLHYTDRHRLPDEVAKELG--- |          |                                      |
| MisFDH | YDLEGKTVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RLLLQRLKPFNC-NLLYHDRLKMDSELENQIG--- |          |                                      |
| AraFDH | YDLEGKTIGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RLLLQRLKPFNC-NLLYHDRLQMAPELEKETG--- |          |                                      |
| BarFDH | YDLEGKTVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RLLLQRLKPFNC-NLLYHDRLQINPELEKEIG--- |          |                                      |
| RicFDH | YDLEGKTVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RLLLQRLKPFNC-NLLYHDRLKIDPELEKEIG--- |          |                                      |
| SceFDH | YDLEDKIIISTV | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | <b>I</b> | RVLERLVAFNPKKLLYDYQELPAEAINRLNEAS   |          |                                      |
| CmeFDH | YDIEGKTIATV  | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | <b>I</b> | RVLERLLPFNPKELLYDYQALPKEAEKVG---    |          |                                      |
| HanFDH | FDIEGKVIATV  | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | <b>I</b> | RVLERLVAFNPKELLYDYQSLSKAEAEKVG---   |          |                                      |
| MgrFDH | YDLEGKVVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>V</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RVLRRLKPFDCKELLYDYQALAPEVEKEIG---   |          |                                      |
| MagFDH | YDLEGKVVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>V</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RVLRRLKPFDCKELLYDYQPLAPEVEKEIG---   |          |                                      |
| NeuFDH | FDLEGKVVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>V</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RVLRRLKPFDCKELLYDYQPLSAEKEAEIG---   |          |                                      |
| AspFDH | FDLENKVVGTV  | <b>V</b> | <b>A</b> | <b>V</b> | <b>G</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>G</b> | RVLRRLKPFDCKELLYDYQPLRPEVEKEIG---   |          |                                      |

Рис. 4.27. Участок выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников с выделенным консервативным мотивом GXGXXG

На рисунке 4.28 изображен результат моделирования планируемой замены. Как видно из представленного моделирования, при проведении такой замены планировалась компактизация белковой глобулы за счет уменьшения объема бокового радикала аминокислотного остатка и заполнения полости внутри глобулы.



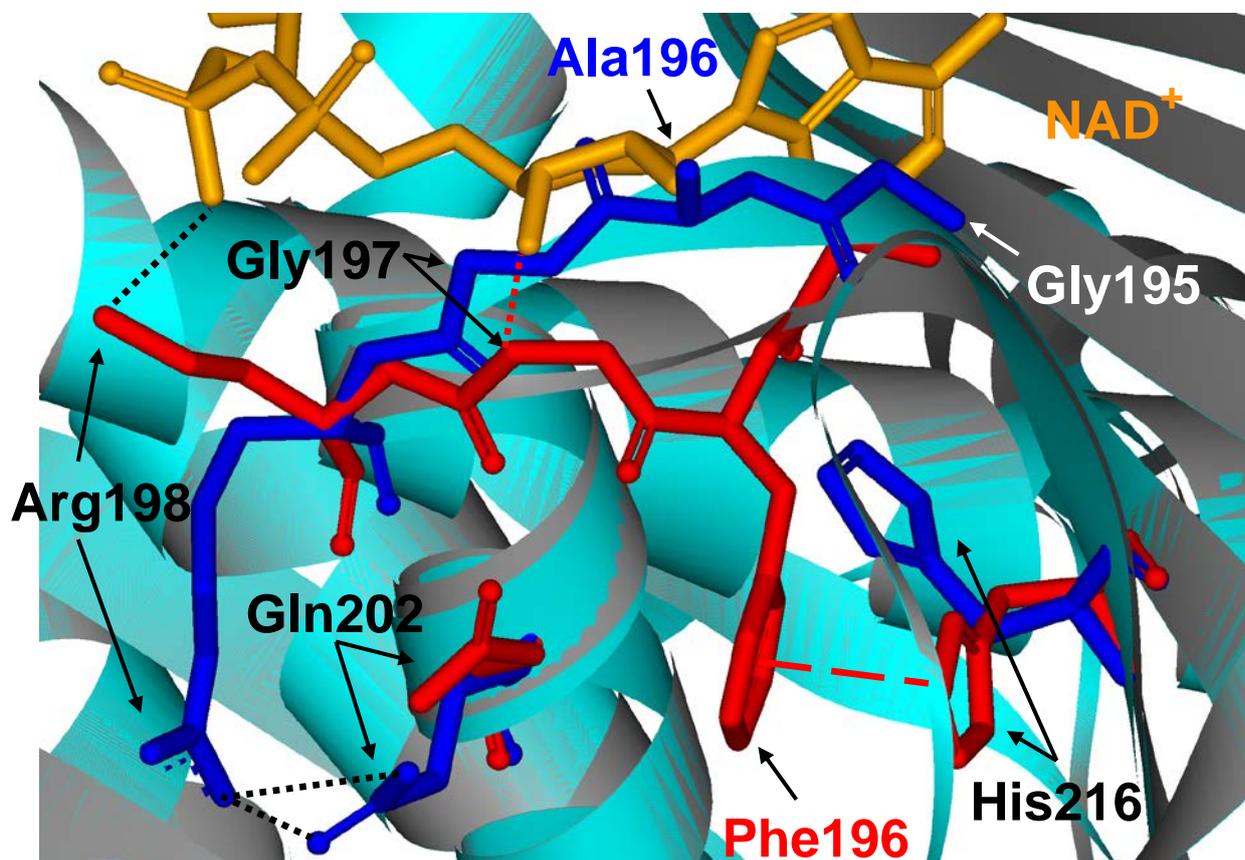
**Рис. 4.28.** Моделирование структуры мутантной формы SauFDH F196A. Красным отмечен остаток фенилаланина, замененный на остаток аланина (отмечен синим).

Культивирование мутантной формы SauFDH F196A проводили согласно методике для получения фермента дикого типа. Плазмиды с заменами в гене *saufdh* трансформировали в клетки *E.coli* BL 21(DE3) CodonPlus/pLysS и высевали на чашки с агаризованной средой. Результаты экспрессии подробно описаны в разделе 4.7.3.

После очистки мутантной формы SauFDH F196A мы приступили к изучению свойств данного фермента. Исследования проводились аналогично изучению свойств фермента дикого типа. Анализ экспериментально полученных значений констант Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$  и  $\text{HCOO}^-$  показал, что введение данной мутации приводит к увеличению  $K_M$  по  $\text{NAD}^+$  в 5 раз: 1300 мкМ по сравнению с 250 мкМ для фермента дикого типа. При этом значение константы Михаэлиса по формиату различается не так сильно: 160 мМ для SauFDH F196A и 130 мМ для фермента дикого типа. Каталитическая константа по сравнению с ферментом дикого типа

уменьшилась в 2 раза:  $10 \text{ с}^{-1}$  для SauFDH F196A по сравнению с  $20 \text{ с}^{-1}$  для фермента дикого типа (см. таблицу 4.11 в разделе 4.7.3).

Факт такого роста значений константы Михаэлиса по коферменту объясняется изменением структуры кофермент-связывающего домена, показанным на рисунке 4.29.

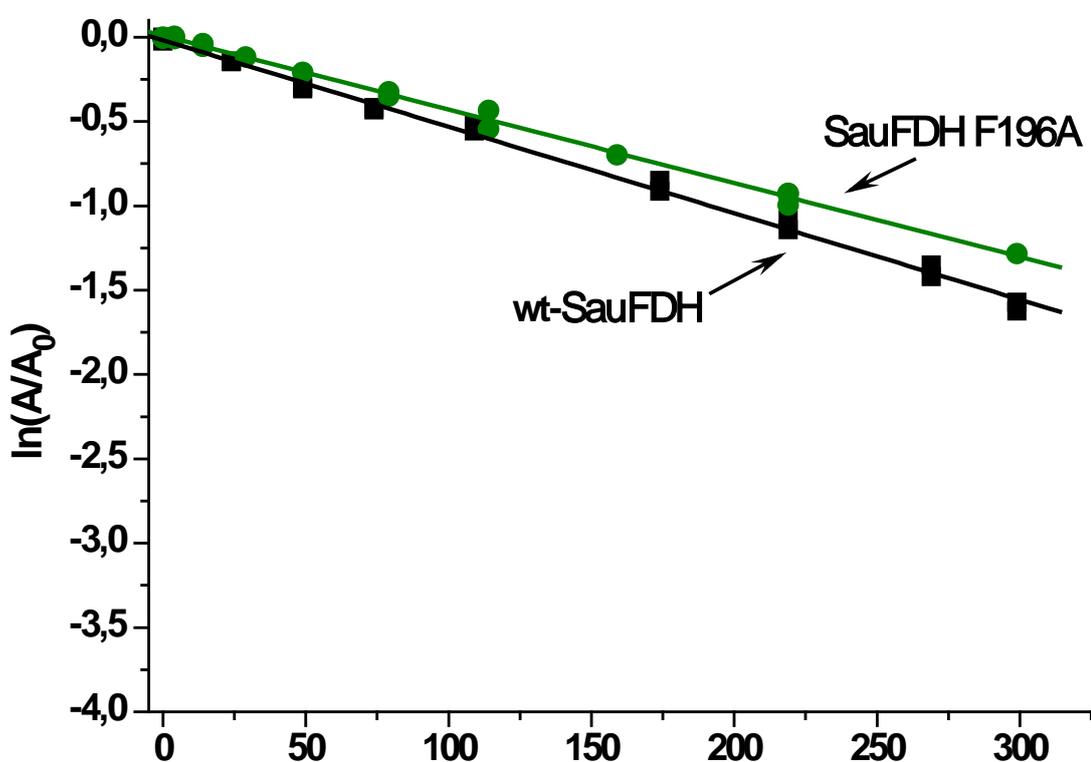


**Рис. 4.29.** Моделирование структуры мутантной формы SauFDH F196A. Красным цветом отмечены остатки, формирующие кофермент-связывающий домен активного центра SauFDH дикого типа, синим – для SauFDH F196A. Желтым цветом отмечена молекула  $\text{NAD}^+$  в активном центре фермента.

Из рисунка 4.29 хорошо видно, что при замене остатка фенилаланина в 196ом положении на остаток аланина элиминируется стекинг-взаимодействие Phe196–His216 (длинный красный пунктир на рисунке). При этом остаток His216 сильно отклоняется от своего предыдущего положения (на рисунке положения «до» и «после введения мутации» отмечены красным и синим цветами соответственно). Из-за этого меняется изгиб полипептидной цепи в районе связывания молекулы  $\text{NAD}^+$  в районе остатка Gly197 (красный пунктир на рисунке). Также вследствие этого изгиба меняется и расположение остатка Arg198, а вместо водородной связи  $\text{NAD}$ –Arg198 возникают две новые водородные связи

Arg198–Gln202 (на рисунке отмечены черным пунктиром), которые фиксируют пептидную цепь в новом положении. В силу всех описанных структурных изменений фиксация молекулы  $\text{NAD}^+$  стерически затруднена, из-за чего повышается ее дестабилизация в активном центре фермента, за счет чего и наблюдается такой серьезный рост значения  $K_M$  по  $\text{NAD}^+$ .

Изучение температурной стабильности мутантной формы SauFDH F196A показало, что данная замена приводит к некоторому увеличению температурной стабильности. На рисунке 4.30 приведено сравнение температурной инактивации фермента дикого типа и мутантной формы SauFDH F196A.

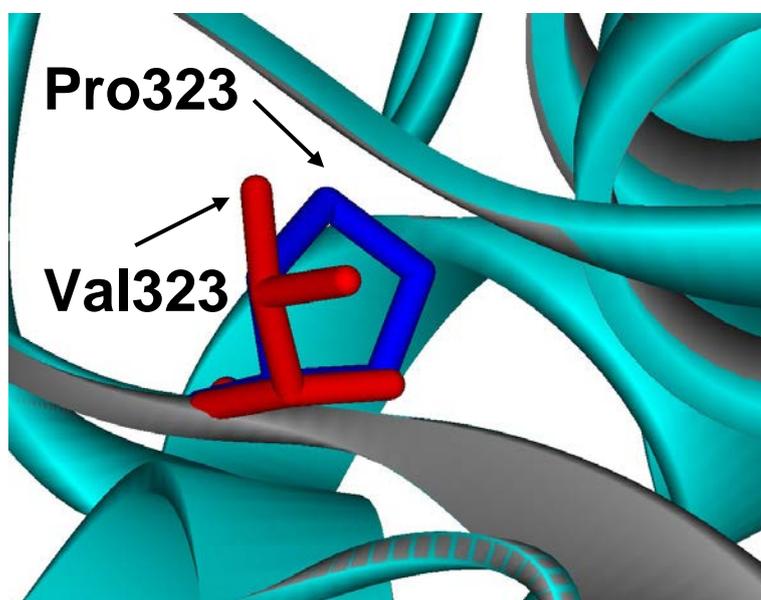


**Рис. 4.30.** Зависимость остаточной активности мутантной SauFDH F196A и SauFDH дикого типа от времени в координатах  $\ln(A/A_0) - t$ , 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60°C

Как видно из рис. 4.30, введение мутации F196A привело к увеличению температурной стабильности, что объясняется уменьшением полости вокруг этого положения и, как следствие, увеличением плотности укладки пептидной цепи. Таким образом, метод увеличения температурной стабильности путем компактизации белковой глобулы показал себя эффективным, несмотря на ухудшение каталитической эффективности.

#### 4.7.2. Увеличение жесткости полипептидной цепи

Помимо описанных выше аминокислотных замен, было решено провести эксперимент по принципу увеличения жесткости структуры фермента, т.е. введения в его состав остатка пролина. На рис. 4.33 отмечен остаток Val323, стоящий перед каталитически важным остатком His324 (соответствует остатку His332 в PseFDH [16]). Согласно так называемому «пролиновому правилу», в ФДГ каждому каталитически важному остатку гистидина предшествует стабилизирующий его остаток пролина. Однако в двух случаях – ФДГ из бактерий *S.aureus* и дрожжей *S.cerevisiae* – в этом положении остаток пролина заменен на остаток валина. Было решено провести обратную замену данного остатка на характерный для этого положения остаток пролина. Данные работы [70] свидетельствуют о том, что подобная замена привела к улучшению температурной стабильности, однако кинетические свойства, как по коферменту, так и по субстрату, сильно ухудшились. На рис. 4.31 приведен результат моделирования планируемой замены.

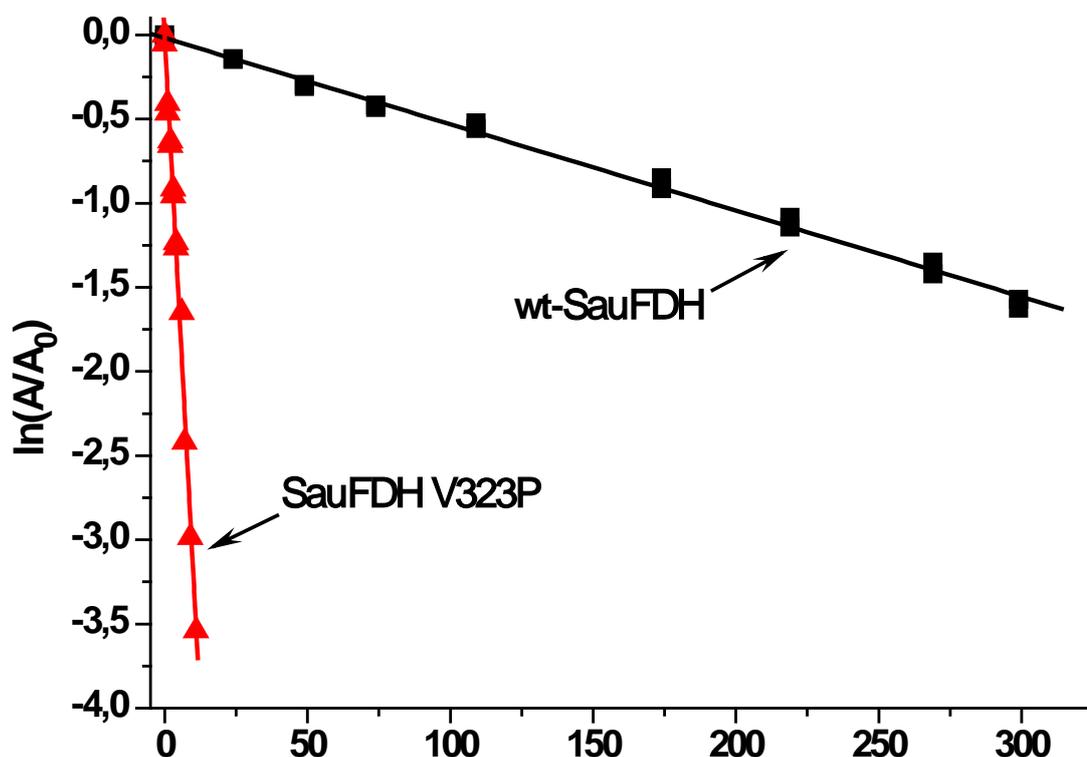


**Рис. 4.31.** Моделирование структуры мутантной формы SauFDH V323P. Красным отмечен остаток валина, замененный на остаток пролина (отмечен синим).

Прогнозировать влияние замены какого-либо аминокислотного остатка на остаток пролина крайне сложно: обладая конформационно жесткой структурой, пролин очень резко изгибает пептидную цепь. Вследствие этого метод компьютерного моделирования не в состоянии точно предсказать изменения в

структуре. Тем не менее, во избежание нарушения функционирования фермента, данная замена вводится в участок пептидной цепи, находящийся между двумя вторичными структурными единицами.

Как и в предыдущем случае, культивирование мутантной формы SauFDH V323P проводили согласно методике для получения фермента дикого типа. Результаты экспрессии и очистки подробно описаны в разделе 4.7.3.



**Рис. 4.32.** Зависимость остаточной активности мутантной SauFDH F196A и SauFDH дикого типа от времени в координатах  $\ln(A/A_0) - t$ , 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60°C

На рисунке 4.32 представлено сравнение температурной инактивации фермента дикого типа и мутантной формы SauFDH V323P, и, очевидно, что температурная стабильность мутантной ФДГ резко снизилась. Дальнейшее изучение свойств мутантной формы SauFDH V323P показало, что данная замена приводит к наибольшему снижению температурной стабильности среди всех полученных мутантных SauFDH (см. рисунок 4.40 в разделе 4.7.3). Такой эффект, вызванный единичной мутацией, можно объяснить крайне сильным влиянием пролина на структуру фермента. По-видимому, после введения данной замены

сделало доступным растворителю аминокислотные остатки, ответственные за стабильность фермента.

В то же время, аминокислотная замена V323P является единственной из проведенных, в результате введения которой улучшились константы Михаэлиса для SauFDH. Значения  $K_M$  по  $\text{NAD}^+$  и  $K_M$  по  $\text{HCOO}^-$  по сравнению с ферментом дикого типа уменьшились на 16% : 210 мкМ для SauFDH V323P и 250 мкМ для wt-SauFDH по  $\text{NAD}^+$ , и 110 мМ для SauFDH V323P и 130 мМ для wt-SauFDH по формиату. Каталитическая константа по сравнению с ферментом дикого типа практически не изменилась:  $18 \text{ с}^{-1}$  для SauFDH V323P по сравнению с  $20 \text{ с}^{-1}$  для фермента дикого типа. Подробные данные представлены в таблице 4.15 в разделе 4.7.3.

Стоит отметить, что данная замена предсказуемо сильно влияет на свойства фермента, т.к. остаток Val323 находится в полипептидной цепи на участке, связывающем два домена, образующих активный центр. Как уже было указано выше, за счет этого увеличивается доступность активного центра для растворителя, что облегчает проникновение как кофермента, так и субстрата, а значит, и уменьшает константы Михаэлиса. При этом введение остатка пролина в структуру фермента в этом положении вносит слишком большие изменения, из-за чего существенно уменьшается температурная стабильность мутантной формы фермента. Такие результаты являются полной противоположностью работы [70], что можно объяснить значительным различием аминокислотного состава двух исследованных ферментов SauFDH и SceFDH.

### 4.7.3. Замена остатков тирозина и фенилаланина на поверхности белковой глобулы

На рисунке 4.33 показан фрагмент выравнивания с выделенными консервативным мотивом PQR (в районе остатка Q305) и окружением консервативного остатка гистидина His324, описанного в предыдущем разделе (нумерация по SauFDH, соответствует PseFDH His332).

|        | 305  | 324 |
|--------|--|-----|
| PseFDH | GRLAGYAGDVVFPQAPKDHPTMPY-----NGMTPHISCTTLTAQARYAAG         |     |
| MorFDH | GRLAGYAGDVVFPQAPNDHPTMPH-----NGMTPHISCTSLSAQTRYAAG         |     |
| UncFDH | GQLSGYAGDVVFPQAPNDHPTMPN-----HGMTPHISCTSLSAQTRYAAG         |     |
| SauFDH | <u>EHLQGYAGDVVYFPQAPADHPTMPR-----NAMTVHYSCTMLEAQKRIEDG</u> |     |
| SoyFDH | GHVAGYSGDVVFPQAPKDHPTMPN-----HAMTPHISCTTIDAQLRYAAG         |     |
| ParFDH | GQLAGYGGDVVFPQAPQDHPPTMPH-----NAMTPHISCTSLSAQARYAAG        |     |
| HypFDH | GQLAGYAGDVVFPQAPQDHPKMPH-----HGMTPHISCTSLSAQARYAAG         |     |
| SinFDH | GQLAGYAGDVVFPQAPKDHPTSMH-----HGMTPHISCTSLSAQARYAAG         |     |
| MisFDH | GHIAGYSGDVVYFPQAPKDHPTMPN-----QAMTPHISCTTIDAQLRYAAG        |     |
| AraFDH | GHIAGYSGDVVDPQAPKDHPTMPN-----QAMTPHTSCTTIDAQLRYAAG         |     |
| BarFDH | GHIAGYGGDVVFPQAPKDHPTMPN-----HAMTPHISCTTIDAQLRYAAG         |     |
| RicFDH | GQVAGYGGDVVFPQAPKDHPTMPN-----HAMTPHISCTTIDAQLRYAAG         |     |
| SceFDH | GKLAGYGGDVVDPQAPKDHPTMDNK--DHVGNAMTVHISCTSLDAQKRYAQQ       |     |
| CmeFDH | GQLRGYGGDVVFPQAPKDHPTMRNKY--GAGNAMTPHISCTTLDAQTRYAEG       |     |
| HanFDH | GQLRGYGGDVVFPQAPKDHPTSMANKY--GAGNAMTPHISCTSVIDAQVRYAQQ     |     |
| MgrFDH | GQLRGYGGDVVFPKVPADHPTASYSTW--GGGNAMVPHMSCTSLIDAQARYAAG     |     |
| MagFDH | GHLRGYGGDVVFPQAPKDHPLRYAKNPF--GGGNAMVPHMSCTSLDAQKRYADG     |     |
| NeuFDH | GHLRGYGGDVVFPQAPQDHPRLRYAKNPF--GGGNAMVPHMSCTSLDAQKRYAAG    |     |
| AspFDH | GHLRGYGGDVVFPQAPKENPLRYAENHPW--GGGNATVPHMSCTSLAAQIRYANG    |     |

**Рис. 4.33.** Участок выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников с выделенными консервативными участками XPQR и участком в районе консервативного остатка His324 (нумерация по SauFDH, соответствует PseFDH His332).

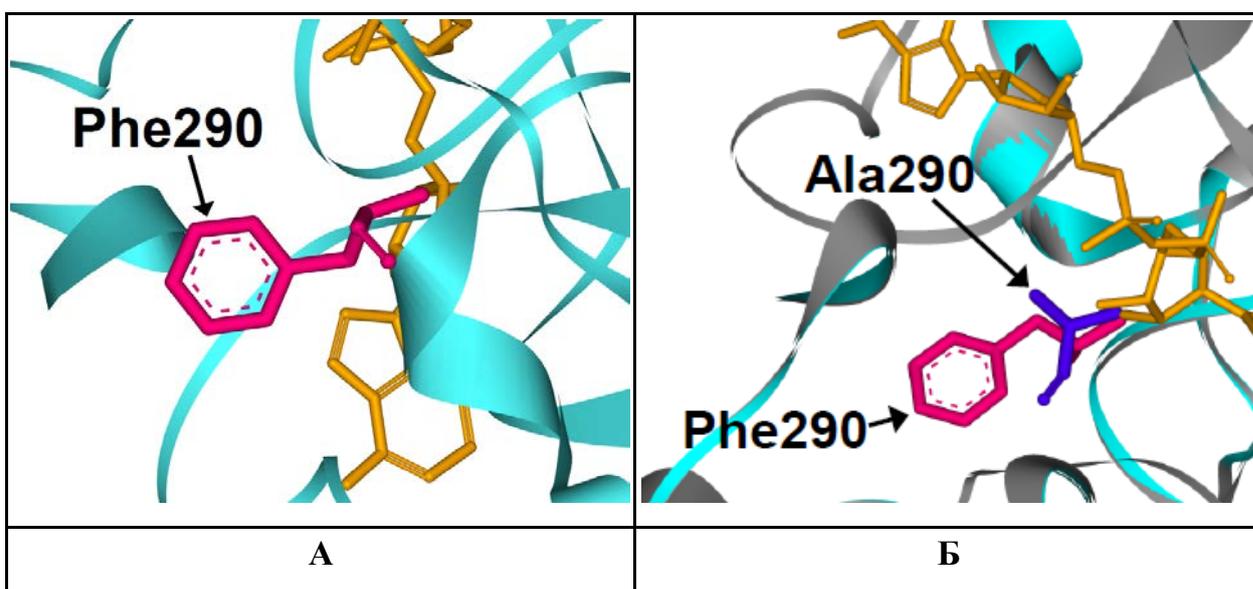
Аминокислотный остаток, предшествующий консервативному мотиву PQR в разных ФДГ, является хорошо изученным и описанным [статья про мутагенез PseFDH]. Он находится на поверхности белковой глобулы в гидрофильном окружении и «экранирует» активный центр фермента от растворителя. Поэтому этот остаток привлек наше внимание и при изучении ферментов SoyFDH и SauFDH. В первом случае было решено продолжить исследование, описанное в [161], и ввести еще несколько замен в положение Phe290. В случае SauFDH, вместо аминокислотного остатка Tyr303, аналогичного остатку Phe290 в SoyFDH, было решено ввести остатки, приведшие к максимальному улучшению свойств.

Как видно из рисунка 4.34, в ФДГ из различных растений в 311 положении (нумерация по PseFDH, соответствует 303 положению в SauFDH и 290 положению в SoyFDH) возможно наличие остатков фенилаланина, тирозина, аспарагина и аспарагиновой кислоты. В работе [161] было показано, что замена остатка фенилаланина на остатки серина, аспарагина и аспарагиновой кислоты приводит к улучшению как температурной стабильности, так и кинетических параметров SoyFDH. Также о положительном влиянии замен в данном положении в ФДГ из дрожжей *C. boidinii* свидетельствует работа [68, 166].

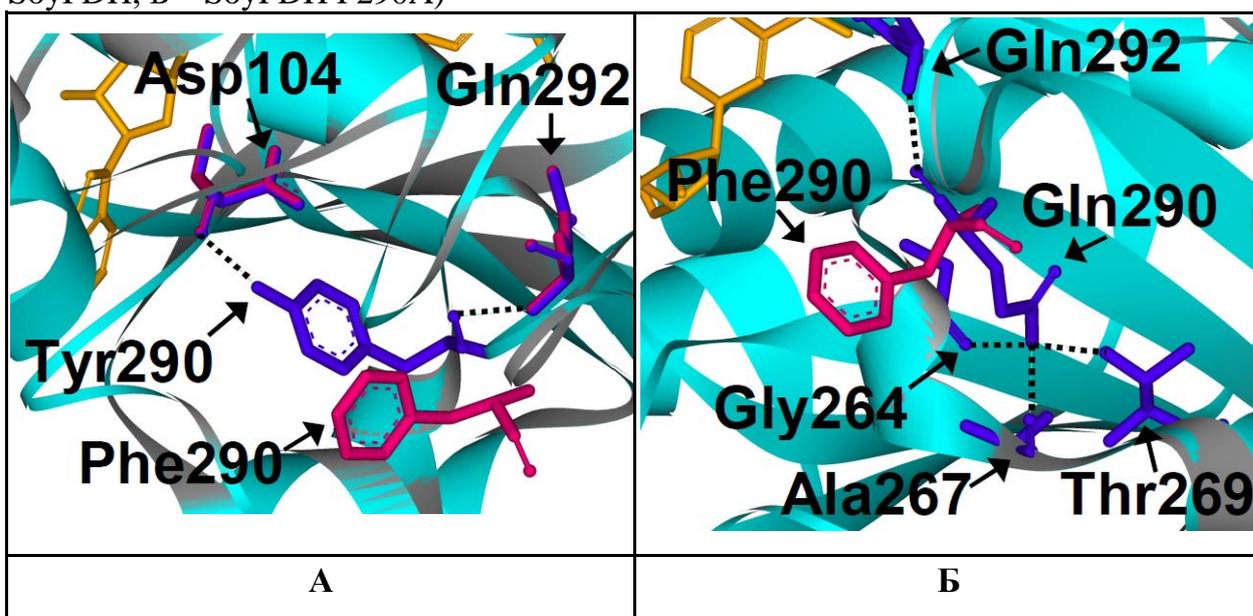
|        | 311                                |
|--------|------------------------------------|
| StuFDH | IAGYSGDVW <b>Y</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| LesFDH | IAGYSGDVW <b>Y</b> PQPAPKDHLWRYMPN |
| CclFDH | IAGYSGDVW <b>N</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| PtmFDH | IGGYSGDVW <b>N</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| PtrFDH | IGGYSGDVW <b>N</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| MdoFDH | IAGYSGDVW <b>N</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| PpeFDH | IAGYSGDVW <b>N</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| HvuFDH | IAGYGGDVW <b>F</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| TaeFDH | IAGYGGDVW <b>F</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| ZmaFDH | IAGYGGDVW <b>F</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| SoyFDH | VAGYGGDVW <b>F</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| BnaFDH | IGGYSGDVW <b>D</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| BolFDH | IGGYSGDVW <b>D</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| AthFDH | IGGYSGDVW <b>D</b> PQPAPKDHPWRYMPN |
| PsiFDH | IGGYSGDVW <b>F</b> PQPAPKDHPWRSMPN |
| PpiFDH | IGGYSGDVW <b>F</b> PQPAPKDHPWRSMPN |
| PpaFDH | LGGYGGDVW <b>N</b> AQPAGKDHPWRYMPN |

**Рис. 4.34.** Выравнивание аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из растений: StuFDH – из картофеля *Solanum tuberosum*, LesFDH – из томатов *Lycopersicon esculentum*, CclFDH – из клеменитна *Citrus clementina*, PtmFDH – из осины *Populus tremula*, PtrFDH – из тополя *Populus trichocarpa*, MdoFDH – из яблока *Malus domestica*, PpeFDH – из персика *Prunus persica*, HvuFDH – *Hordeum vulgare* из ячменя, TaeFDH – *Triticum aestivum* из пшеницы, 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*.

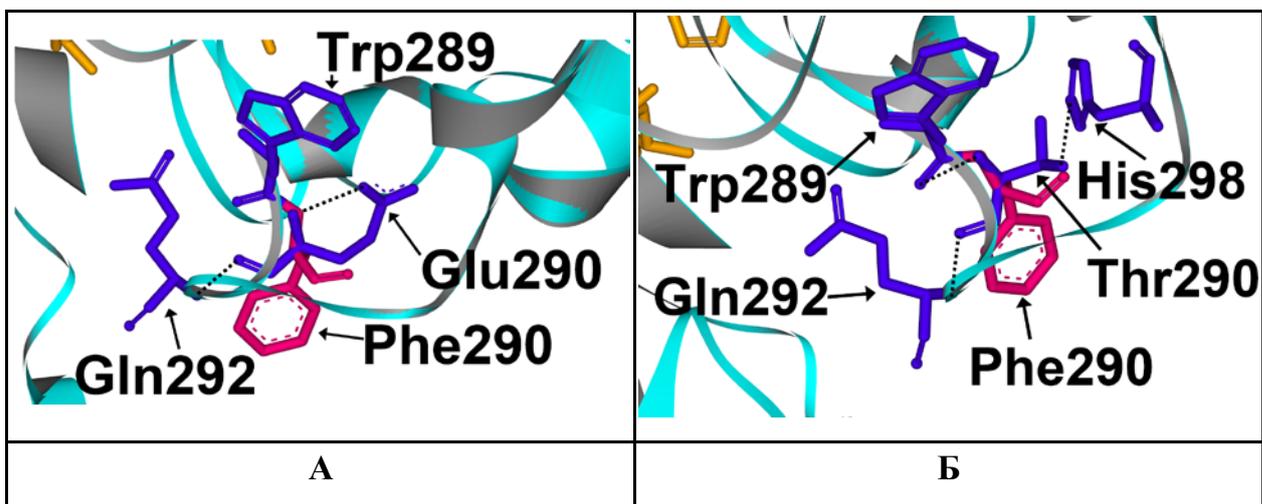
Было решено провести дальнейший анализ положения Phe290 в SoyFDH (рис. 4.35.1А). Для выяснения роли этого остатка в стабильности и катализе SoyFDH были предложены следующие аминокислотные замены: Phe290Ala – для выяснения роли данного остатка в функционировании фермента, Phe290Tyr – для снижения гидрофобности периферического аминокислотного остатка, Phe290Gln и Phe290Glu – в качестве замен на остатки, гомологичные остаткам аспарагина и аспарагиновой кислоты, а также Phe290Thr. Результаты компьютерного моделирования этих замен представлены на рисунках 4.35.1Б, 4.35.2 и 4.35.3.



**Рис. 4.35.1.** Моделирование структуры мутантных форм SoyFDH (А – wild type SoyFDH, Б – SoyFDH F290A)



**Рис. 4.35.2.** Моделирование структуры мутантных форм SoyFDH (А – SoyFDH F290Y, Б – SoyFDH F290Q).



**Рис. 4.35.3.** Моделирование структуры мутантных форм SoyFDH (А – SoyFDH F290E, Б – SoyFDH F290T)

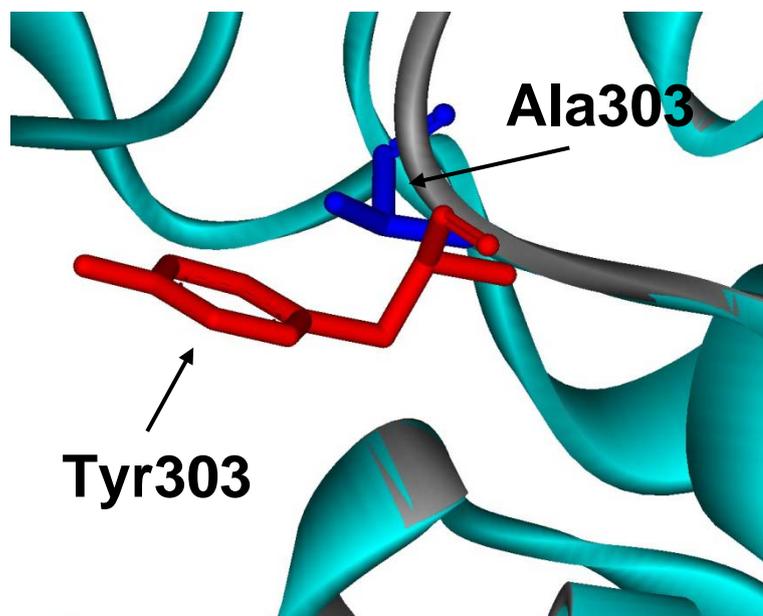
В таблице 4.10 представлены водородные связи, с высокой вероятностью возникающие в результате мутаций между вводимыми аминокислотными остатками и их окружением. Из приведенных данных видно, что во всех мутантных ферментах, кроме SoyFDH F290A, образуются дополнительные водородные связи. Учитывая этот факт, можно предположить, что планируемые аминокислотные замены в данном положении действительно могут оказывать влияние как на температурную стабильность, так и на кинетические свойства SoyFDH.

**Таблица 4.10.**

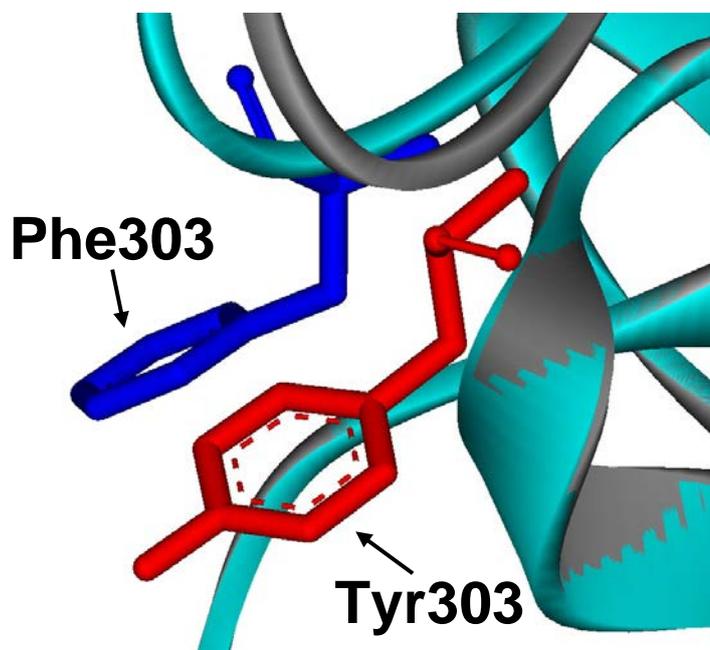
Образование водородных связей с остатком в 290 положении SoyFDH

|                  | Asp104 | Gly264 | Ala265 | Ala267 | Thr269 | Trp289 | Gln292 | His298 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| wild type SoyFDH |        |        |        |        |        |        |        |        |
| SoyFDH F290A     |        |        |        |        |        |        |        |        |
| SoyFDH F290Y     | +      |        |        |        |        |        | +      |        |
| SoyFDH F290Q     |        | +      |        | +      | +      |        | +      |        |
| SoyFDH F290E     |        |        |        |        |        | +      | +      |        |
| SoyFDH F290T     |        |        |        |        |        | +      | +      | +      |
| SoyFDH F290N     |        |        |        |        | +      |        | +      |        |
| SoyFDH F290D     |        | +      | +      |        |        |        | +      |        |
| SoyFDH F290S     |        |        |        |        |        |        | +      | +      |

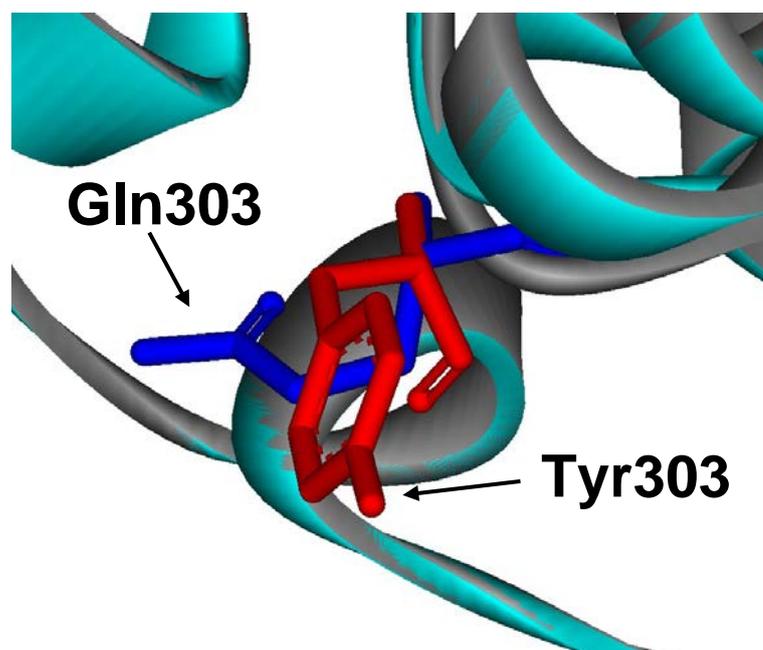
Помимо этого в ходе анализа аминокислотной последовательности SauFDH был найден аминокислотный остаток Tyr303, аналогичный остатку Phe290 в SoyFDH. Было также решено изучить и его роль в функционировании фермента SauFDH и сравнить полученные результаты с SoyFDH. Результаты компьютерного моделирования этих замен представлены на рисунках 4.36, 4.37 и 4.38.



**Рис. 4.36.** Моделирование структуры мутантной формы SauFDH Y303A. Красным отмечен остаток тирозина, замененный на остаток аланина (отмечен синим).



**Рис. 4.37.** Моделирование структуры мутантной формы SauFDH Y303F. Красным отмечен остаток тирозина, замененный на остаток фенилаланина (отмечен синим).



**Рис. 4.38.** Моделирование структуры мутантной формы SauFDH Y303Q. Красным отмечен остаток тирозина, замененный на остаток глутамина (отмечен синим).

Введение всех упомянутых в этом и других разделах точечных замен в SauFDH и SoyFDH проводили с помощью ПЦР, при этом использовали фланкирующие праймеры: прямой (T7for) – на начало гена и обратный (T7rev) – на конец гена:

T7for            5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'  
T7rev            5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'

а также прямой (Pr1 for) и обратный (Pr2 rev) праймеры, содержащие требуемые мутации в гене saufdh. В таблице 4.11 приведены праймеры для введения соответствующих аминокислотных замен.

**Таблица 4.11.**

Олигонуклеотиды для направленного мутагенеза SauFDH.

| Замена    |         | Олигонуклеотид                                 |
|-----------|---------|--|
| Phe196Ala | Pr1 for | 5'-GTATTTTTGGAGCGGGTTCGAATTGGACAACCTGTTGC-3'   |
|           | Pr2 rev | 5'-CAATTCGACCCGCTCCAAAAATACCAATTGTTTTGTGTTG-3' |
| Tyr303Ala | Pr1 for | 5'-GATGTTTGGGCGCCACAACCTGCACCTGC-3'            |
|           | Pr2 rev | 5'-CAGGTTGTGGCGCCCAAACATCACCAGCATATC -3'       |
| Tyr303Phe | Pr1 for | 5'-GATGTTTGGTTTCCACAACCTGCACCTGC-3'            |
|           | Pr2 rev | 5'-CAGGTTGTGGAAACCAAACATCACCAGCATATC-3'        |
| Tyr303Gln | Pr1 for | 5'-GATGTTTGGCAGCCACAACCTGCACCTGC-3'            |
|           | Pr2 rev | 5'-CAGGTTGTGGCTGCCAAACATCACCAGCATATC-3'        |
| Val323Pro | Pr1 for | 5'-GCTATGACGCCGCACTATTCAGGTATGACTTTAG -3'      |
|           | Pr2 rev | 5'-CCTGAATAGTGCGGCGTCATAGCATTTCTAGGC-3'        |

Продукты ПЦР отделяли, обрабатывали рестриктазами и проводили лигирование в вектор pSauFDH1, откуда предварительно был вырезан соответствующий участок, не содержащий мутации. После лигирования всю реакционную смесь использовали для трансформации в клетки *E.coli* DH5 $\alpha$ , которые высевались на агаризованную среду. С каждой чашки брали по три отдельных колонии, из них выделяли плазмиды и с помощью секвенирования подтверждали наличие в них лишь требуемых мутаций в гене *saufdh1*. Помимо этого результаты секвенирования показали, что в полученных плаزمиде присутствует только нужная мутация, а другие нуклеотидные замены и делеции отсутствуют.

Культивирование мутантных форм SauFDH проводили согласно методике для получения фермента дикого типа. Плазмиды с заменами в гене *saufdh* трансформировали в клетки *E.coli* BL 21(DE3) Codon plus /pLysS и высевали на чашки с агаризованной средой. Результаты экспрессии представлены в таблице 4.12. Для сравнения приведены также данные по экспрессии фермента дикого типа.

**Таблица 4.12.**  
Результаты экспрессии мутантных SauFDH и фермента дикого типа wt-SauFDH

| Фермент      | Выход фермента по активности, Ед./л среды | Выход биомассы, г/л среды | Выход фермента по массе, мг/л среды | Содержание фермента в клетках, Ед/г |
|--------------|---|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| wt-SauFDH    | 3800                                      | 15                        | 190                                 | 250                                 |
| SauFDH F196A | 2500                                      | 18                        | 125                                 | 140                                 |
| SauFDH Y303A | 3600                                      | 17                        | 180                                 | 210                                 |
| SauFDH Y303F | 2800                                      | 20                        | 150                                 | 140                                 |
| SauFDH Y303Q | 2600                                      | 20                        | 140                                 | 130                                 |
| SauFDH V323P | 1000                                      | 8                         | 63                                  | 125                                 |

Из таблицы видно, что выходы большинства целевых мутантных ферментов сопоставимы с таковым для фермента дикого типа. Таким образом, имеющаяся методика получения SauFDH дикого типа также применима для получения мутантных форм фермента. Низкие выходы мутанта SauFDH V323P, вероятно, связаны с большой разницей в структуре из-за наличия остатка пролина в участке полипептидной цепи, связывающем два домена белковой глобулы.

Для выделения мутантных SauFDH была использована методика, разработанная для получения фермента дикого типа. Она также включала в себя ультразвуковую дезинтеграцию клеток, фракционирование сульфатом аммония (35% от насыщения, 85% от насыщения и перерастворение в 35% от насыщения), во всех случаях, кроме SauFDH V323P, – температурную обработку, затем – гидрофобную хроматографию на фенил-Сефарозе и гель-фильтрацию (обессоливание на Sephadex G25).

Введение точечных замен в SoyFDH, как и в случае SauFDH, проводили с помощью ПЦР. Для введения мутации в ген *soyfdh* с помощью ПЦР также использовали фланкирующие праймеры T7 (см. раздел 4.7.4) и прямой (Pr1) и обратный (Pr2) праймеры, содержащие требуемые мутации в гене *soyfdh*. В таблице 4.13 приведены праймеры для введения выбранных аминокислотных замен.

**Таблица 4.13.**

Олигонуклеотиды для направленного мутагенеза SoyFDH

| Мутация   |         | Олигонуклеотид                            |
|-----------|---------|---|
| Phe290Ala | Pr1 for | 5'- GATGTTTGGGCCCCACAGCCAGCTCCAA-3'       |
|           | Pr2 rev | 5'- GCTGTGGGGCCCAAACATCACCACTATAACCT-3'   |
| Phe290Tyr | Pr1 for | 5'- GATGTTTGGTATCCACAGCCAGCTCCAAAG-3'     |
|           | Pr2 rev | 5'- GGCTGTGGATAACCAAACATCACCACTATAACCT-3' |
| Phe290Gln | Pr1 for | 5'- GATGTTTGGCAGCCACAGCCAGCTCCAAAG-3'     |
|           | Pr2 rev | 5'- GCTGTGGCTGCCAAACATCACCACTATAACCT-3'   |
| Phe290Glu | Pr1 for | 5'- GATGTTTGGGAACCACAGCCAGCTCCAAAG-3'     |
|           | Pr2 rev | 5'- GCTGTGGTTCCCAAACATCACCACTATAACCT-3'   |
| Phe290Thr | Pr1 for | 5'- GATGTTTGGACCCCACAGCCAGCTCCAA-3'       |
|           | Pr2 rev | 5'- GCTGTGGGGTCCCAAACATCACCACTATAACCT-3'  |

Продукты ПЦР подвергали очистке, обработке рестриктазами и затем лигировали в вектор p2SoyFDH2, из которого предварительно был удален соответствующий фрагмент ДНК, подлежащий замене. Затем, после

трансформации в клетки *E.coli* DH5 $\alpha$ , выделяли плазмиды и отбирали те, в которых секвенирование показало наличие только требуемых мутаций.

Получение мутантных форм SoyFDH и, для сравнения, фермента дикого типа проводили согласно методике, приведенной в разделе 3.2.9. главы Материалы и методы, аналогично получению мутантных форм SauFDH. Колонии клеток *E.coli* BL 21(DE3) Codon plus /pLysS, трансформированных полученными плазмидами, высевали на агаризованную среду, после чего использовали для наработки фермента. Результаты экспрессии фермента дикого типа и его мутантных форм представлены в таблице 4.14.

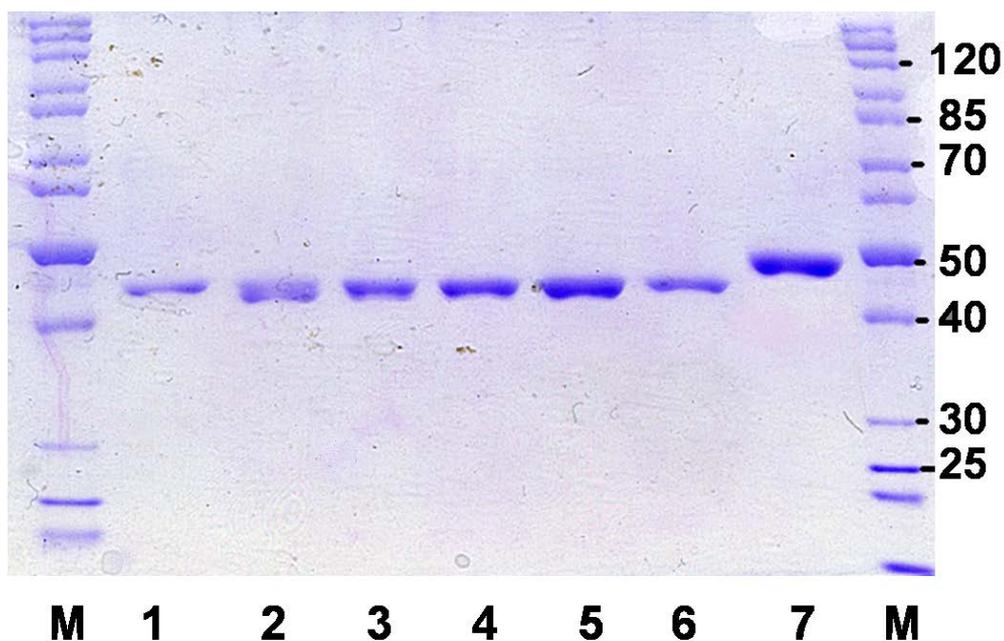
**Таблица 4.14.**

Результаты экспрессии мутантных форм и дикого типа SoyFDH

| Фермент      | Выход фермента по активности, Ед./л среды | Выход биомассы, г/л среды | Выход фермента по массе, мг/л среды | Содержание фермента в клетках, Ед/г |
|--------------|---|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| wt-SoyFDH    | 2100                                      | 16                        | 525                                 | 135                                 |
| SoyFDH F290A | 1600                                      | 14                        | 490                                 | 115                                 |
| SoyFDH F290Y | 1700                                      | 16                        | 425                                 | 110                                 |
| SoyFDH F290Q | 1600                                      | 13                        | 405                                 | 105                                 |
| SoyFDH F290E | 1700                                      | 14                        | 495                                 | 115                                 |
| SoyFDH F290T | 1500                                      | 12                        | 415                                 | 100                                 |

Из таблицы видно, что выходы целевого фермента для большинства мутантных SoyFDH незначительно отличаются от таковых для wt-SoyFDH. Исходя из этого, можно сделать вывод, что данная методика применима для получения как для фермента дикого типа, так и для мутантных форм фермента.

Очистку проводили также по методике, использовавшейся для очистки фермента SoyFDH дикого типа. На рис. 4.39 представлены результаты аналитического электрофореза очищенных препаратов мутантных SoyFDH. Из приведенного рисунка видно, что чистота полученных ферментов составляет не менее 95%.



**Рис. 4.39.** Аналитический электрофорез в ПААГ в присутствии SDS-Na препаратов мутантных форм и нативной SoyFDH. 1 – нативная SoyFDH, 2 – SoyFDH Phe290Ala, 3 - SoyFDH Phe290Tyr, 4 - SoyFDH Phe290Gln, 5 - SoyFDH Phe290Glu, 6 - SoyFDH Phe290Thr, 7 – приведенный для сравнения препарат очищенной нативной PseFDH, М – маркер молекулярной массы, кДа.

Полученные очищенные препараты ферментов были использованы для определения кинетических параметров мутантных SauFDH. Для всех мутантных SauFDH исследования проводились аналогично изучению свойств фермента дикого типа. Суммарные экспериментально полученные значения констант Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$  и  $\text{HCOO}^-$  приведены в таблице 4.15.

**Таблица 4.15.**

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

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

В случае замены Y303A наблюдали некоторое увеличение значения  $K_M$  по формиату, что предположительно объясняется слишком большим структурным различием между остатками тирозина и аланина, из-за которого ухудшается связывание формиата в активном центре. В остальных случаях значения  $K_M$ , как по коферменту, так и по субстрату, либо не уменьшались, либо даже увеличивались.

Очищенные ферментные препараты также использовались для определения кинетических параметров мутантных SoyFDH. Для всех мутантных SoyFDH были экспериментально определены значения констант Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$  и  $\text{HCOO}^-$ , которые суммированы в таблице 4.16.

**Таблица 4.16.**

Кинетические свойства полученных мутантных формиатдегидрогеназ. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, 0,01М ЭДТА, рН 7,0

|               | $K_M^{\text{NAD}^+}$ ,<br>мкМ | $K_M^{\text{formate}}$ ,<br>мМ | $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup> | $k_{cat}/K_M^{\text{NAD}^+}$ | $k_{cat}/K_M^{\text{formate}}$ |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 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                           |

\*-результаты, полученные в работе [161]

Из данных, представленных в таблице 4.16 можно выделить следующее: все замены, кроме F290E и F290T (а также F290N из работы [161]), привели к уменьшению значения константы Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$ . Также ни одна замена, за исключением F290E и трех мутантов из работы [161], не привела к заметному ухудшению  $K_M^{\text{HCOO}^-}$ , а в некоторых случаях отмечалось даже уменьшение этого параметра. Такое ухудшение несущественно в случае использования фермента в

биотехнологических процессах, поскольку используемые в них концентрации формиата (около 2-3М) значительно больше полученных значений.

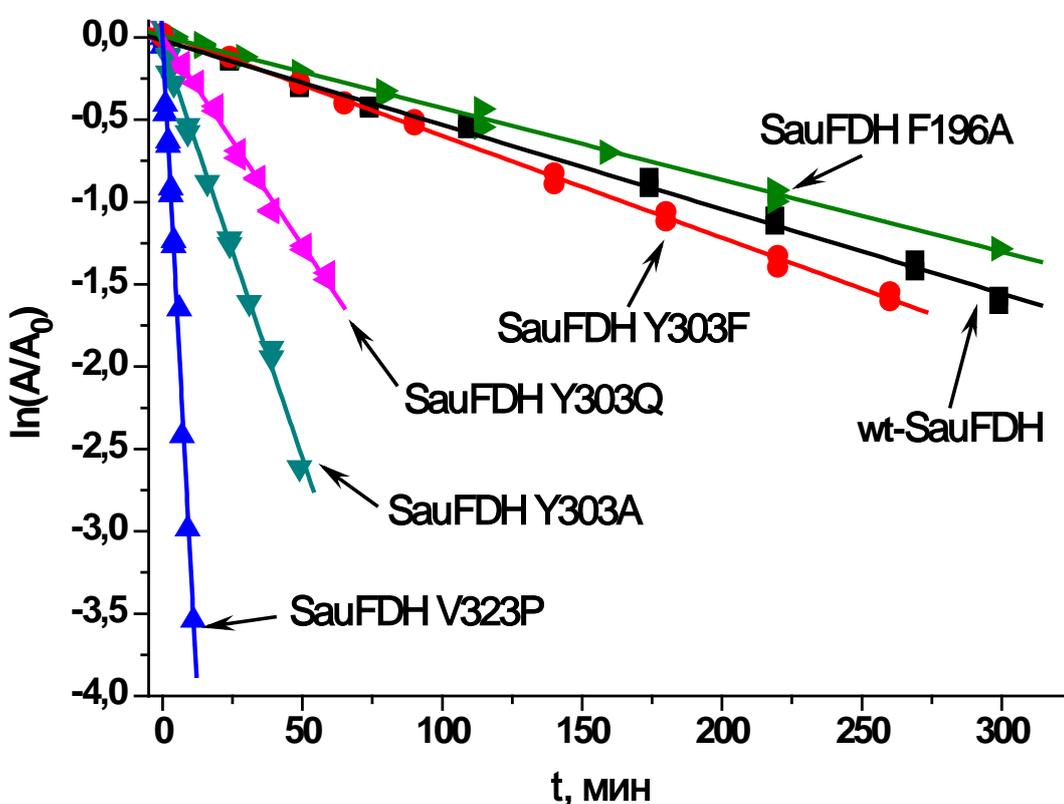
Что касается каталитической константы  $k_{cat}$ , то, как видно из таблицы, во всех случаях (кроме SoyFDH F290N, у которой данный параметр практически не изменился) произошло ее увеличение. Суммируя эти данные с данными об изменении констант Михаэлиса, можно отметить, что каталитическая эффективность для всех мутантных SoyFDH из данной работы (кроме F290E) возросла как с коферментом, так и с субстратом. Наибольшее улучшение всех параметров продемонстрировал фермент SoyFDH F290A, у которого данные параметры возросли относительно фермента дикого типа в 2 и 1,8 раз соответственно. Напротив, в работе улучшение кинетических параметров наблюдалось только у мутантных форм SoyFDH F290D и F290S, в которых выросла каталитическая эффективность только по коферменту, хотя в последнем случае улучшение этого параметра было максимальным среди всех изученных мутантов.

Таким образом, можно сделать вывод, что остаток F290 у ФДГ из сои также играет важную роль в эффективности катализа ферментативной реакции. Замена F290 на более гидрофильные аминокислотные остатки положительно влияет на  $K_M$  по  $NAD^+$  и каталитическую константу, однако в некоторых случаях происходит увеличение  $K_M$  по формиату.

Исходя из полученных экспериментальных данных, можно сделать предположение, что при замене Phe290Ala фактически с поверхности белковой глобулы удаляется объёмный гидрофобный остаток, при этом не образуется новых водородных связей, то есть нивелируется гидрофобное влияние фенилаланина, что, по всей видимости, улучшает связывание активного центра с коферментом и субстратом. Отсутствие новых водородных связей в случае замены Phe290Ala также объясняет и небольшой эффект температурной стабилизации.

Замена Phe290Glu по своему характеру схожа с заменой Phe290Asp, исследованной в работе [161]. Эта замена также приводит к увеличению  $K_M$  по формиату, а также к значительному повышению температурной стабильности.

Термостабильность мутантных форм SauFDH и SoyFDH изучали при различных температурах и проводили сравнение с ферментом дикого типа. На рисунке 4.40 представлены зависимости остаточной активности всех полученных мутантных форм SauFDH от времени в полулогарифмических координатах. Видно, что все зависимости хорошо линейризуются, что свидетельствует о сохранении характера температурной инактивации: как и в случае фермента дикого типа, она протекает по мономолекулярному механизму в соответствии с кинетикой реакций первого порядка. Кроме того, было показано, что для изученных мутантных SauFDH константы скорости термоинактивации не зависят от концентрации фермента, что хорошо согласуется с данными для нативного фермента.



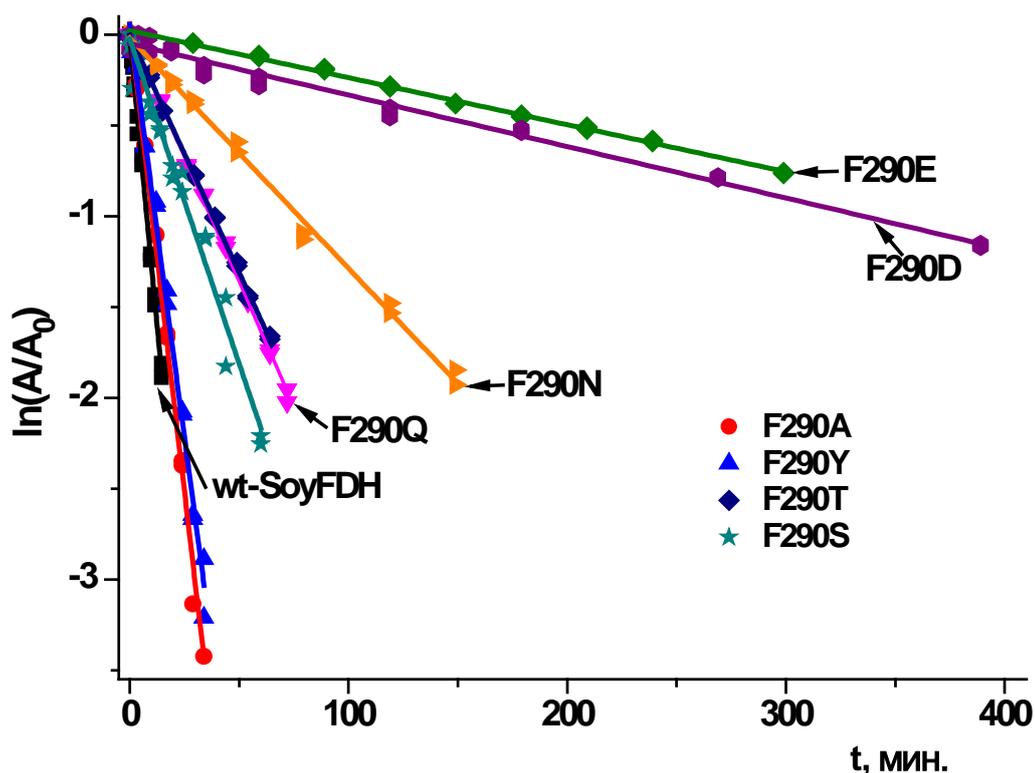
**Рис. 4.40.** Зависимость остаточной активности мутантов и дикого типа SauFDH от времени в координатах  $\ln(A/A_0) - t$ , 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60°C.

Как видно из рисунка 4.40, проведенные аминокислотные замены не привели к улучшению температурной стабильности в данном температурном диапазоне. Тем не менее, данные о том, что замена Y303F вносит значимый дестабилизирующий эффект при достаточно сильном структурном сходстве остатков тирозина и фенилаланина, согласуются с данными работ [[114, 169]. В

этих работах при введении обратной замены достигалось увеличение температурной стабильности за счет уменьшения гидрофобности аминокислотного остатка, расположенного на поверхности белковой глобулы.

Другие формы SauFDH с заменами по 303 положению не привели к увеличению термостабильности, что, как и в случае с мутантом SauFDH V323P, это объясняется слишком большим различием аминокислотных последовательностей.

Термостабильность мутантных форм SoyFDH изучали при различных температурах и проводили сравнение с ферментом дикого типа. На рисунке 4.41 представлены зависимости остаточной активности от времени в различных координатах для всех полученных ферментов, а также мутантных форм SoyFDH F290N, F290D и F290S, описанных в работе [161]. Из этого рисунка видно, что все зависимости в полулогарифмических координатах представляют собой прямые, что свидетельствует о характере температурной инактивации: она протекает по мономолекулярному механизму в соответствии с кинетикой первого порядка. Также было показано, что для всех исследованных форм SoyFDH константы скорости термоинактивации не зависят от концентрации фермента.



**Рис. 4.41.** Зависимость остаточной активности мутантов и дикого типа при 56°C, 0,1М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

Как видно из рис. 4.41, 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 ФДГ.

#### **4.8. Сравнение влияния аналогичных аминокислотных замен в ферментах SauFDH и SoyFDH**

Подводя итоги обсуждения генной инженерии ФДГ из различных источников, было решено сравнить, к каким эффектам приводит замена аминокислотного остатка, аналогичного F311 в *Pseudomonas* на примере SauFDH (остаток Y303) и SoyFDH (остаток F290).

В случае SauFDH все проведенные замены привели к ухудшению как кинетических параметров, так и температурной стабильности. В случае замены в данном ферменте остатка тирозина на остаток фенилаланина предсказуемо

наблюдалось снижение температурной стабильности, а кинетические параметры остались неизменными. Обратная замена в SoyFDH привела к улучшению всех параметров – как стабильности, так и кинетических параметров.

Замена данного остатка на остаток аланина в случае SauFDH привела к увеличению константы Михаэлиса по формиату, а также к снижению термостабильности. Однако в случае SoyFDH введение в данное положение остатка аланина наблюдалось небольшое улучшение стабильности, но максимальное снижение значений КМ как по коферменту, так и по субстрату. По всей видимости, несмотря на то, что для остальных ФДГ в этом положении характерно наличие именно аланина, в SauFDH остаток фенилаланина, по-видимому, стабилизирует структуру фермента, т.к. удаление гидрофобной группы из активного центра привело к значительному снижению температурной стабильности.

Введение в SauFDH аминокислотной замены Y303Q привело к значительному увеличению константы Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$  в 4,5 раза по сравнению с ферментом дикого типа (это подтверждает предположение о том, что гидрофильные радикалы дестабилизируют структуру фермента), к увеличению константы Михаэлиса по формиату в 3 раза, а также к значительному уменьшению температурной стабильности. В то же время введение замены F290Q в ферменте SoyFDH привело к уменьшению значений обеих констант Михаэлиса примерно в 1,2 раза, а также к увеличению термостабильности фермента.

Эти факты свидетельствуют о серьезном структурном различии двух рассматриваемых ферментов. Исходя из того факта, что выбранный остаток находится на периферии, логично предположить, что у этих ферментов различается канал, по которому кофермент и субстрат проникают в активный центр.

## V. ВЫВОДЫ

1. Проведено клонирование двух вариантов гена формиатдегидрогеназы 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, который по сравнению с «укороченным» вариантом имеет как лучшие значения обеих констант Михаэлиса, так и в два раза более высокую каталитическую константу. Величина  $k_{cat}$   $20 \text{ c}^{-1}$  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 формиату ингибитором является азид-ион.

3. Подобраны условия кристаллизации фермента, получены кристаллы апофермента и тройного комплекса [SauFDH-NAD<sup>+</sup>-N<sub>3</sub><sup>-</sup>], 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 NAD<sup>+</sup>. 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 формиатдегидрогеназ 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.

## VI. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khangulov, S.V., Gladyshev, V.N., Dismukes, G.C., and Stadtman, T.C. Selenium-containing formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*: a molybdopterin enzyme that catalyzes formate oxidation without oxygen transfer. *Biochemistry*, 1998. v.37 (10), p.3518-3528.
2. Родионов Ю.В. Метаболизм формиата у микроорганизмов. Успехи микробиологии. 1982, т.15, с.104-138
3. Vinals, C., Depiereux, E., and Feytmans, E. Prediction of structurally conserved regions of D-specific hydroxy acid dehydrogenases by multiple alignment with formate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. v.192 (1), p.182-188.
4. Tishkov, V.I., Galkin, A.G., and Egorov, A.M. Kinetic isotope effect and the presteady-state kinetics of the reaction catalyzed by the bacterial formate dehydrogenase. *Biochimie*, 1989. v.71 (4), p.551-557.
5. Jiang, W. and Fang, B.S. Construction and evaluation of a novel bifunctional phenylalanine-formate dehydrogenase fusion protein for bienzyme system with cofactor regeneration. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016. v.43 (5), p.577-584.
6. Leibig, M., Liebeke, M., Mader, D., Lalk, M., Peschel, A., and Gotz, F. Pyruvate formate lyase acts as a formate supplier for metabolic processes during anaerobiosis in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2011. v.193 (4), p.952-962.
7. Baerends, R.J., de Hulster, E., Geertman, J.M., Daran, J.M., van Maris, A.J., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., and Pronk, J.T. Engineering and analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain that uses formaldehyde as an auxiliary substrate. *Appl Environ Microbiol*, 2008. v.74 (10), p.3182-3188.
8. Suzuki, K., Itai, R., Suzuki, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., Yoshimura, E., and Mori, S. Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. *Plant Physiol*, 1998. v.116 (2), p.725-732.
9. Pinske, C. and Sawers, R.G. Anaerobic Formate and Hydrogen Metabolism. *EcoSal Plus*, 2016. v.7 (1).
10. Thomas, S.C., Alhasawi, A., Auger, C., Omri, A., and Appanna, V.D. The role of formate in combatting oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016. v.109 (2), p.263-271.
11. Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Gotz, F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2005. v.71 (5), p.2663-2676.
12. Davison, D.C. Studies on plant formic dehydrogenase. *Biochem J*, 1951. v.49 (4), p.520-526.
13. Colas des Francs-Small, C., Ambard-Bretteville, F., Small, I.D., and Remy, R. Identification of a major soluble protein in mitochondria from nonphotosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase. *Plant Physiol*, 1993. v.102 (4), p.1171-1177.
14. des Francs-Small, C.C., Ambard-Bretteville, F., Darpas, A., Sallantin, M., Huet, J.C., Pernollet, J.C., and Remy, R. Variation of the polypeptide composition of mitochondria isolated from different potato tissues. *Plant Physiol*, 1992. v.98 (1), p.273-278.
15. Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P. New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J*, 1996. v.9 (3), p.357-368.
16. Tishkov, V.I. and Popov, V.O. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry (Moscow)*, 2004. v.69 (11), p.1252-1267.

17. Hourton-Cabassa, C., Ambard-Bretteville, F., Moreau, F., Davy de Virville, J., Remy, R., and Francs-Small, C.C. Stress Induction of Mitochondrial Formate Dehydrogenase in Potato Leaves. *Plant Physiol*, 1998. v.116 (2), p.627-635.
18. Andreadeli, A., Flemetakis, E., Axarli, I., Dimou, M., Udvardi, M.K., Katinakis, P., and Labrou, N.E. Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia. *Biochim Biophys Acta*, 2009. v.1794 (6), p.976-984.
19. Thompson, P., Bowsher, C.G., and Tobin, A.K. Heterogeneity of mitochondrial protein biogenesis during primary leaf development in barley. *Plant Physiol*, 1998. v.118 (3), p.1089-1099.
20. Ambard-Bretteville, F., Sorin, C., Rebeille, F., Hourton-Cabassa, C., and Colas des Francs-Small, C. Repression of formate dehydrogenase in *Solanum tuberosum* increases steady-state levels of formate and accelerates the accumulation of proline in response to osmotic stress. *Plant Mol Biol*, 2003. v.52 (6), p.1153-1168.
21. Bykova, N.V., Stensballe, A., Egsgaard, H., Jensen, O.N., and Moller, I.M. Phosphorylation of formate dehydrogenase in potato tuber mitochondria. *J Biol Chem*, 2003. v.278 (28), p.26021-26030.
22. Chistoserdova, L., Laukel, M., Portais, J.C., Vorholt, J.A., and Lidstrom, M.E. Multiple formate dehydrogenase enzymes in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1 are dispensable for growth on methanol. *J Bacteriol*, 2004. v.186 (1), p.22-28.
23. Popov, V.O. and Lamzin, V.S. NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Biochem J*, 1994. v.301 ( Pt 3), p.625-643.
24. Niks, D., Duvvuru, J., Escalona, M., and Hille, R. Spectroscopic and Kinetic Properties of the Molybdenum-containing, NAD<sup>+</sup>-dependent Formate Dehydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *J Biol Chem*, 2016. v.291 (3), p.1162-1174.
25. Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., and Brachman, P.S. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*, 1977. v.297 (22), p.1189-1197.
26. Correia, A.M., Ferreira, J.S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., Goncalves, J., Antunes, D.M., Almeida, S., Mendes, A., Guerreiro, M., Sampaio, D.A., Vieira, L., Machado, J., Simoes, M.J., Goncalves, P., and Gomes, J.P. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med*, 2016. v.374 (5), p.497-498.
27. Bryers, J.D. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 2008. v.100 (1), p.1-18.
28. Li, Y., Gong, Z., Lu, Y., Hu, G., Cai, R., and Chen, Z. Impact of nosocomial infections surveillance on nosocomial infection rates: A systematic review. *Int J Surg*, 2017. v.42, p.164-169.
29. Cha, J.O., Yoo, J.I., Yoo, J.S., Chung, H.S., Park, S.H., Kim, H.S., Lee, Y.S., and Chung, G.T. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health Res Perspect*, 2013. v.4 (5), p.225-232.
30. Shuber, A.P., Orr, E.C., Recny, M.A., Schendel, P.F., May, H.D., Schauer, N.L., and Ferry, J.G. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the formate dehydrogenase genes from *Methanobacterium formicicum*. *J Biol Chem*, 1986. v.261 (28), p.12942-12947.
31. Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., and Hiramatsu, K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 2002. v.359 (9320), p.1819-1827.
32. Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., Cerdeno-Tarraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D.,

- Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabbinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G., and Maskell, D.J. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*, 2003. v.35 (1), p.32-40.
33. Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., and Hattori, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. v.98 (21), p.12215-12220.
  34. Souciet, J., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., de Montigny, J., Dujon, B., Durrens, P., Gaillardin, C., Lepingle, A., Llorente, B., Malpertuy, A., Neuveglise, C., Ozier-Kalogeropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaia, F., Toffano-Nioche, C., Wesolowski-Louvel, M., Wincker, P., and Weissenbach, J. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Lett*, 2000. v.487 (1), p.3-12.
  35. Alissandratos, A., Kim, H.K., Matthews, H., Hennessy, J.E., Philbrook, A., and Easton, C.J. *Clostridium carboxidivorans* strain P7T recombinant formate dehydrogenase catalyzes reduction of CO<sub>2</sub> to formate. *Appl Environ Microbiol*, 2013. v.79 (2), p.741-744.
  36. Alekseeva, A.A., Savin, S.S., and Tishkov, V.I. NAD<sup>+</sup>-dependent Formate Dehydrogenase from Plants. *Acta Naturae*, 2011. v.3 (4), p.38-54.
  37. Alekseeva A., Dolina I., Kargov I., Savin S., Tishkov V. Genetic engineering of new formate dehydrogenases for cofactor regeneration. *Protein Science*, 2015, v.24, No S1, p.174-175.
  38. Hwang, L., Hocking-Murray, D., Bahrami, A.K., Andersson, M., Rine, J., and Sil, A. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. *Mol Biol Cell*, 2003. v.14 (6), p.2314-2326.
  39. Lamzin, V.S., Dauter, Z., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H., and Wilson, K.S. High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. *J Mol Biol*, 1994. v.236 (3), p.759-785.
  40. Gilbert, C., Schaack, S., Pace, J.K., 2nd, Brindley, P.J., and Feschotte, C. A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. *Nature*, 2010. v.464 (7293), p.1347-1350.
  41. Filippova, E.V., Polyakov, K.M., Tikhonova, T.V., Stekhanova, T.N., Boiko, K.M., and Popov, V.O. Structure of a new crystal modification of the bacterial NAD-dependent formate dehydrogenase with a resolution of 2.1 Å. *Crystallography Reports*, 2005. v.50 (5), p.796-800.
  42. Shabalin, I.G., Filippova, E.V., Polyakov, K.M., Sadykhov, E.G., Safonova, T.N., Tikhonova, T.V., Tishkov, V.I., and Popov, V.O. Structures of the apo and holo forms of formate dehydrogenase from the bacterium *Moraxella* sp. C-1: towards understanding the mechanism of the closure of the interdomain cleft. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2009. v.65 (Pt 12), p.1315-1325.
  43. Fogal, S., Beneventi, E., Cendron, L., and Bergantino, E. Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the acidobacterium *Granulicella mallensis* MP5ACTX8. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015. v.99 (22), p.9541-9554.
  44. Schirwitz, K., Schmidt, A., and Lamzin, V.S. High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Protein Sci*, 2007. v.16 (6), p.1146-1156.

45. Guo, Q., Gakhar, L., Wickersham, K., Francis, K., Vardi-Kilshtain, A., Major, D.T., Cheatum, C.M., and Kohen, A. Structural and Kinetic Studies of Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Biochemistry*, 2016. v.55 (19), p.2760-2771.
46. Timofeev V.I., Shabalin I.G., Serov A.E., Polyakov K.M., Popov V.O., Tishkov V.I., Kuranova I.P., Samigina V.R. Structure of recombinant formate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica D*, 2018. in press
47. Shabalin, I.G., Serov, A.E., Skirgello, O.E., Timofeev, V.I., Samygina, V.R., Popov, V.O., Tishkov, V.I., and Kuranova, I.P. Recombinant formate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: Preparation, crystal growth in microgravity, and preliminary X-ray diffraction study. *Crystallography Reports*, 2010. v.55 (5), p.806-810.
48. Fedorchuk, V.V., Galkin, A.G., Yasny, I.E., Kulakova, L.B., Rojkova, A.M., Filippova, A.A., and Tishkov, V.I. Effect of interactions between amino acid residues 43 and 61 on thermal stability of bacterial formate dehydrogenases. *Biochemistry (Moscow)*, 2002. v.67 (10), p.1145-1151.
49. Romanova, E.G., Alekseeva, A.A., Pometun, E.V., and Tishkov, V.I. Determination of the concentration of active sites and the catalytic rate constant of recombinant formate dehydrogenase from *Glycine max*. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2010. v.65 (3), p.127-130.
50. Alekseeva, A.A., Savin, S.S., Kleimenov, S.Y., Uporov, I.V., Pometun, E.V., and Tishkov, V.I. Stabilization of plant formate dehydrogenase by rational design. *Biochemistry (Moscow)*, 2012. v.77 (10), p.1199-1209.
51. Hatrongjit, R. and Packdibamrung, K. A novel NADP<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: Screening, purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010. v.46 (7), p.557-561.
52. Gul-Karaguler, N., Sessions, R.B., Clarke, A.R., and Holbrook, J.J. A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylca* allows the enzyme to use NADP. *Biotechnology Letters*, 2001. v.23 (4), p.283-287.
53. Ozgun, G.P., Ordu, E.B., Tutuncu, H.E., Yelboga, E., Sessions, R.B., and Gul Karaguler, N. Site Saturation Mutagenesis Applications on *Candida methylca* Formate Dehydrogenase. *Scientifica (Cairo)*, 2016. v.2016, p.4902450.
54. Serov, A.E., Popova, A.S., Fedorchuk, V.V., and Tishkov, V.I. Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 2002. v.367 (Pt 3), p.841-847.
55. Andreadeli, A., Platis, D., Tishkov, V., Popov, V., and Labrou, N.E. Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP<sup>+</sup>. *FEBS J*, 2008. v.275 (15), p.3859-3869.
56. Seelbach, K., Riebel, B., Hummel, W., Kula, M.-R., Tishkov, V.I., Egorov, A.M., Wandrey, C., and Kragl, U. A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters*, 1996. v.37 (9), p.1377-1380.
57. Rissom, S., Schwarz-Linek, U., Vogel, M., Tishkov, V.I., and Kragl, U. Synthesis of chiral  $\epsilon$ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997. v.8 (15), p.2523-2526.
58. Watanabe, T., Fujiwara, T., Umezawa, T., Shimada, M., and Hattori, T. Cloning of a cDNA encoding a NAD-dependent formate dehydrogenase involved in oxalic acid metabolism from the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota* and its gene expression analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. v.279 (1), p.64-70.
59. Tishkov, V.I., Galkin, A.G., and Yegorov, A.M. NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp 101 - cloning, expression and study of gene structure. *Доклады Академии наук*, 1991. v.317 (3), p.745-748.

60. Ding, H.T., Liu, D.F., Li, Z.L., Du, Y.Q., Xu, X.H., and Zhao, Y.H. Characterization of a thermally stable and organic solvent-adaptative NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase from *Bacillus* sp. F1. *J Appl Microbiol*, 2011. v.111 (5), p.1075-1085.
61. Садыхов, Э.Г. Получение, термостабильность и структурные исследования формиатдегидрогеназ из различных источников. Диссертация кандидата химических наук. 2007. Москва, Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН.
62. Galkin, A., Kulakova, L., Tishkov, V., Esaki, N., and Soda, K. Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995. v.44 (3-4), p.479-483.
63. Пометун, А.А. Рекомбинантная формиатдегидрогеназа из сои *Glycine max*: белковая инженерия и структурные исследования. Диссертация кандидата химических наук. 2011. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова.
64. Tishkov, V.I. and Popov, V.O. Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol Eng*, 2006. v.23 (2-3), p.89-110.
65. Dikov, M., Karulin, A., Osipov, A., and Egorov, A. Analytical isotachopheresis study of structural-changes in formate dehydrogenase during inactivation. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 1979. v.5 (8), p.1217-1221.
66. Egorov, A.M., Avilova, T.V., Dikov, M.M., Popov, V.O., Rodionov, Y.V., and Berezin, I.V. NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium, strain 1. Purification and characterization. *Eur J Biochem*, 1979. v.99 (3), p.569-576.
67. Tishkov, V.I., Galkin, A.G., and Egorov, A.M. NAD-dependent formate dehydrogenase of methylotrophic yeasts - isolation and physicochemical properties. *Biochemistry (Moscow)*, 1989. v.54 (2), p.231-236.
68. Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.R., and Pohl, M. Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem*, 2000. v.267 (5), p.1280-1289.
69. Patel, R.N., Hou, C.T., and Derelanko, P. Microbial oxidation of methanol: purification and properties of formaldehyde dehydrogenase from a *Pichia* sp. NRRL-Y-11328. *Arch Biochem Biophys*, 1983. v.221 (1), p.135-142.
70. Серов, А.Е. Взаимосвязь структуры и свойств рекомбинантных формиатдегидрогеназ из пекарских дрожжей и метилотрофных бактерий. Диссертация кандидата химических наук. 2002. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова.
71. Sadykhov, E.G., Serov, A.E., Voinova, N.S., Uglanova, S.V., Petrov, A.S., Alekseeva, A.A., Kleimenov, S., Popov, V.I., and Tishkov, V.I. A comparative study of the thermal stability of formate dehydrogenases from microorganisms and plants. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2006. v.42 (3), p.269-273.
72. Savin, S.S. and Tishkov, V.I. Assessment of Formate Dehydrogenase Stress Stability In vivo using Inactivation by Hydrogen Peroxide. *Acta Naturae*, 2010. v.2 (1), p.97-102.
73. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можяев В.В. и Хмельницкий Л. Имобилизованные ферменты. *Биотехнология*, 1987, Москва, Высшая школа
74. Binay, B., Alagoz, D., Yildirim, D., Celik, A., and Tukel, S.S. Highly stable and reusable immobilized formate dehydrogenases: Promising biocatalysts for in situ regeneration of NADH. *Beilstein J Org Chem*, 2016. v.12, p.271-277.
75. Hernandez-Garcia, S., Garcia-Garcia, M.I., and Garcia-Carmona, F. Improving the production, activity, and stability of CLEAs with diepoxides. *Biotechnol Prog*, 2017.
76. Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S.G., Lopez-Carrobles, N., Gorines, B.C., Virgen-Ortiz, J.J., and Fernandez-Lafuente, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 2017. v.98, p.18-25.
77. Matte, C.R., Bussamara, R., Dupont, J., Rodrigues, R.C., Hertz, P.F., and Ayub, M.A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on

- Immobilized 150 support: characterization and applications. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014. v.172 (5), p.2507-2520.
78. Wang, H., Jiao, F., Gao, F., Zhao, X., Zhao, Y., Shen, Y., Zhang, Y., and Qian, X. Covalent organic framework-coated magnetic graphene as a novel support for trypsin immobilization. *Anal Bioanal Chem*, 2017. v.409 (8), p.2179-2187.
  79. Sun, J., Yang, L., Jiang, M., Shi, Y., Xu, B., and Ma, H.L. Stability and activity of immobilized trypsin on carboxymethyl chitosan-functionalized magnetic nanoparticles cross-linked with carbodiimide and glutaraldehyde. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017. v.1054, p.57-63.
  80. Yoshimoto, M. Stabilization of Enzymes Through Encapsulation in Liposomes. *Methods Mol Biol*, 2017. v.1504, p.9-18.
  81. Homaei, A.A., Sariri, R., Vianello, F., and Stevanato, R. Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol*, 2013. v.6 (4), p.185-205.
  82. Rueda, N., Dos Santos, J.C., Ortiz, C., Torres, R., Barbosa, O., Rodrigues, R.C., Berenguer-Murcia, A., and Fernandez-Lafuente, R. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *Chem Rec*, 2016. v.16 (3), p.1436-1455.
  83. Wells, J.A., Vasser, M., and Powers, D.B. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*, 1985. v.34 (2-3), p.315-323.
  84. debabov - biotechnologia
  85. Carter, P. Site-directed mutagenesis. *Biochem J*, 1986. v.237 (1), p.1-7.
  86. Langridge, J. Genetic and enzymatic experiments relating to the tertiary structure of beta-galactosidase. *J Bacteriol*, 1968. v.96 (5), p.1711-1717.
  87. Lienert, F., Lohmueller, J.J., Garg, A., and Silver, P.A. Synthetic biology in mammalian cells: next generation research tools and therapeutics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. v.15 (2), p.95-107.
  88. Lin-Goerke, J.L., Robbins, D.J., and Burczak, J.D. PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. *Biotechniques*, 1997. v.23 (3), p.409-412.
  89. Cadwell, R.C. and Joyce, G.F. Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl*, 1994. v.3 (6), p.S136-140.
  90. Ansorge-Schumacher, M.B., Slusarczyk, H., Schumers, J., and Hirtz, D. Directed evolution of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* for improved stability during entrapment in polyacrylamide. *FEBS J*, 2006. v.273 (17), p.3938-3945.
  91. Li, Y.X., Yi, P., Yan, Q.J., Qin, Z., Liu, X.Q., and Jiang, Z.Q. Directed evolution of a beta-mannanase from *Rhizomucor miehei* to improve catalytic activity in acidic and thermophilic conditions. *Biotechnol Biofuels*, 2017. v.10, p.143.
  92. Li, W., Xu, S., Zhang, B., Zhu, Y., Hua, Y., Kong, X., Sun, L., and Hong, J. Directed evolution to improve the catalytic efficiency of urate oxidase from *Bacillus subtilis*. *PLoS One*, 2017. v.12 (5), p.e0177877.
  93. Goihberg, E., Dym, O., Tel-Or, S., Levin, I., Peretz, M., and Burstein, Y. A single proline substitution is critical for the thermostabilization of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase. *Proteins*, 2007. v.66 (1), p.196-204.
  94. Haney, P., Konisky, J., Koretke, K.K., Luthey-Schulten, Z., and Wolynes, P.G. Structural basis for thermostability and identification of potential active site residues for adenylate kinases from the archaeal genus *Methanococcus*. *Proteins*, 1997. v.28 (1), p.117-130.
  95. Russell, R.J., Ferguson, J.M., Hough, D.W., Danson, M.J., and Taylor, G.L. The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 1997. v.36 (33), p.9983-9994.
  96. Rose, G.D., Geselowitz, A.R., Lesser, G.J., Lee, R.H., and Zehfus, M.H. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science*, 1985. v.229 (4716), p.834-838.
  97. Sommaruga, S., De Palma, A., Mauri, P.L., Trisciani, M., Basilico, F., Martelli, P.L., Casadio, R., Tortora, P., and Occhipinti, E. A combined approach of mass spectrometry,

- molecular modeling, and site-directed mutagenesis highlights key structural features responsible for the thermostability of *Sulfolobus solfataricus* carboxypeptidase. *Proteins*, 2008. v.71 (4), p.1843-1852.
98. Ghosh, K. and Dill, K.A. Computing protein stabilities from their chain lengths. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. v.106 (26), p.10649-10654.
  99. Akanuma, S., Qu, C., Yamagishi, A., Tanaka, N., and Oshima, T. Effect of polar side chains at position 172 on thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett*, 1997. v.410 (2-3), p.141-144.
  100. Stojanoski, V., Adamski, C.J., Hu, L., Mehta, S.C., Sankaran, B., Zwart, P., Prasad, B.V., and Palzkill, T. Removal of the Side Chain at the Active-Site Serine by a Glycine Substitution Increases the Stability of a Wide Range of Serine beta-Lactamases by Relieving Steric Strain. *Biochemistry*, 2016. v.55 (17), p.2479-2490.
  101. Vogt, G., Woell, S., and Argos, P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J Mol Biol*, 1997. v.269 (4), p.631-643.
  102. Kumar, S., Tsai, C.-J., and Nussinov, R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2000. v.13 (3), p.179-191.
  103. Han, N., Miao, H., Ding, J., Li, J., Mu, Y., Zhou, J., and Huang, Z. Improving the thermostability of a fungal GH11 xylanase via site-directed mutagenesis guided by sequence and structural analysis. *Biotechnol Biofuels*, 2017. v.10, p.133.
  104. Zheng, J., Yang, T., Zhou, J., Xu, M., Zhang, X., and Rao, Z. Elimination of a Free Cysteine by Creation of a Disulfide Bond Increases the Activity and Stability of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol*, 2017. v.83 (2).
  105. Farnoosh, G., Khajeh, K., Latifi, A.M., and Aghamollaei, H. Engineering and introduction of de novo disulphide bridges in organophosphorus hydrolase enzyme for thermostability improvement. *J Biosci*, 2016. v.41 (4), p.577-588.
  106. Wang, G., Wu, J., Lin, J., Ye, X., and Yao, B. The disruption of two salt bridges of the cold-active xylanase XynGR40 results in an increase in activity, but a decrease in thermostability. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. v.481 (1-2), p.139-145.
  107. Poon, D.K., Withers, S.G., and McIntosh, L.P. Direct demonstration of the flexibility of the glycosylated proline-threonine linker in the *Cellulomonas fimi* Xylanase Cex through NMR spectroscopic analysis. *J Biol Chem*, 2007. v.282 (3), p.2091-2100.
  108. Kim, S.J., Joo, J.E., Jeon, S.D., Hyeon, J.E., Kim, S.W., Um, Y.S., and Han, S.O. Enhanced thermostability of mesophilic endoglucanase Z with a high catalytic activity at active temperatures. *Int J Biol Macromol*, 2016. v.86, p.269-276.
  109. Yang, W., Yang, Y., Zhang, L., Xu, H., Guo, X., Yang, X., Dong, B., and Cao, Y. Improved thermostability of an acidic xylanase from *Aspergillus sulphureus* by combined disulphide bridge introduction and proline residue substitution. *Sci Rep*, 2017. v.7 (1), p.1587.
  110. Lu, X., Liu, S., Feng, Y., Rao, S., Zhou, X., Wang, M., Du, G., and Chen, J. Enhanced thermal stability of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxxygenase through modification of two highly flexible regions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014. v.98 (4), p.1663-1669.
  111. Tanaka, S., Igarashi, S., Ferri, S., and Sode, K. Increasing stability of water-soluble PQQ glucose dehydrogenase by increasing hydrophobic interaction at dimeric interface. *BMC Biochem*, 2005. v.6, p.1.
  112. Sammond, D.W., Kastelowitz, N., Himmel, M.E., Yin, H., Crowley, M.F., and Bomble, Y.J. Comparing Residue Clusters from Thermophilic and Mesophilic Enzymes Reveals Adaptive Mechanisms. *PLoS One*, 2016. v.11 (1), p.e0145848.
  113. Havarushka, N., Fischer-Schrader, K., Lamkemeyer, T., and Schwarz, G. Structural basis of thermal stability of the tungsten cofactor synthesis protein MoaB from *Pyrococcus furiosus*. *PLoS One*, 2014. v.9 (1), p.e86030.
  114. Tishkov, V.I., Goncharenko, K.V., Alekseeva, A.A., Klymenov, S.Y., and Savin, S.S. Role of a Structurally Equivalent Phenylalanine Residue in Catalysis and Thermal

- Stability of Formate Dehydrogenases from Different Sources. *Biochemistry (Moscow)*, 2015. v.80 (13), p.1690-1700.
115. Xu, X., Guo, Z., and Cheong, L.-Z., *Ionic liquids in lipid processing and analysis : opportunities and challenges*. 2016.
  116. Crosthwaite, J.M., Muldoon, M.J., Dixon, J.K., Anderson, J.L., and Brennecke, J.F. Phase transition and decomposition temperatures, heat capacities and viscosities of pyridinium ionic liquids. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 2005. v.37 (6), p.559-568.
  117. Moniruzzaman, M., Kamiya, N., and Goto, M. Biocatalysis in water-in-ionic liquid microemulsions: a case study with horseradish peroxidase. *Langmuir*, 2009. v.25 (2), p.977-982.
  118. Dai, C., Zhang, J., Huang, C., and Lei, Z. Ionic Liquids in Selective Oxidation: Catalysts and Solvents. *Chem Rev*, 2017. v.117 (10), p.6929-6983.
  119. Goswami, A. and Stewart, J.D., *Organic synthesis using biocatalysis*. 2016, Amsterdam: Elsevier.
  120. Eckstein, M., Villela Filho, M., Liese, A., and Kragl, U. Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction. *Chem Commun (Camb)*, 2004(9), p.1084-1085.
  121. Hussain W., Pollard D.J., Truppo M., Lye G.J. Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008. v. 55 (1–2), p. 19-29.
  122. Machado, M.F. and Saraiva, J.M. Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnol Lett*, 2005. v.27 (16), p.1233-1239.
  123. Wang, S.-F., Chen, T., Zhang, Z.-L., and Pang, D.-W. Activity and stability of horseradish peroxidase in hydrophilic room temperature ionic liquid and its application in non-aqueous biosensing. *Electrochemistry Communications*, 2007. v.9 (6), p.1337-1342.
  124. Shi, X.-A., Zong, M.-H., and Lou, W.-Y. Effect of Ionic Liquids on Catalytic Characteristics of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. *Chinese Journal of Chemistry*, 2006. v.24 (11), p.1643-1647.
  125. Das, D., Dasgupta, A., and Das, P.K. Improved activity of horseradish peroxidase (HRP) in 'specifically designed' ionic liquid. *Tetrahedron Letters*, 2007. v.48 (32), p.5635-5639.
  126. Machado, M.F., Queiros, R.P., Santos, M.D., Fidalgo, L.G., Delgadillo, I., and Saraiva, J.A. Effect of ionic liquids alkyl chain length on horseradish peroxidase thermal inactivation kinetics and activity recovery after inactivation. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014. v.30 (2), p.487-494.
  127. Zhang, Y., Huang, X., and Li, Y. Negative effect of [bmim][PF6] on the catalytic activity of alcohol dehydrogenase: mechanism and prevention. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008. v.83 (9), p.1230-1235.
  128. Weibels, S., Syguda, A., Herrmann, C., and Weingartner, H. Steering the enzymatic activity of proteins by ionic liquids. A case study of the enzyme kinetics of yeast alcohol dehydrogenase. *Phys Chem Chem Phys*, 2012. v.14 (13), p.4635-4639.
  129. Dabirmanesh, B., Khajeh, K., Akbari, J., Falahati, H., Daneshjoo, S., and Heydari, A. Mesophilic alcohol dehydrogenase behavior in imidazolium based ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 2011. v.161 (3), p.139-143.
  130. Dabirmanesh, B., Khajeh, K., Ranjbar, B., Ghazi, F., and Heydari, A. Inhibition mediated stabilization effect of imidazolium based ionic liquids on alcohol dehydrogenase. *Journal of Molecular Liquids*, 2012. v.170, p.66-71.
  131. Otrelo-Cardoso, A.R., Schwuchow, V., Rodrigues, D., Cabrita, E.J., Leimkuhler, S., Romao, M.J., and Santos-Silva, T. Biochemical, stabilization and crystallization studies on a molecular chaperone (PaoD) involved in the maturation of molybdoenzymes. *PLoS One*, 2014. v.9 (1), p.e87295.

132. Jia, R., Hu, Y., Liu, L., Jiang, L., Zou, B., and Huang, H. Enhancing Catalytic Performance of Porcine Pancreatic Lipase by Covalent Modification Using Functional Ionic Liquids. *ACS Catalysis*, 2013. v.3 (9), p.1976-1983.
133. Bekhouche, M., Blum, L.J., and Doumeche, B. Contribution of dynamic and static quenchers for the study of protein conformation in ionic liquids by steady-state fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B*, 2012. v.116 (1), p.413-423.
134. Alvarez-Guerra, E., Ventura, S.P.M., Coutinho, J.A.P., and Irabien, A. Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling. *Fluid Phase Equilibria*, 2014. v.371, p.67-74.
135. Ebrahimi, M., Hosseinkhani, S., Heydari, A., Khavari-Nejad, R.A., and Akbari, J. Controversial effect of two methylguanidine-based ionic liquids on firefly luciferase. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2012. v.11 (5), p.828-834.
136. Liu, Y., Wang, M., Li, J., Li, Z., He, P., Liu, H., and Li, J. Highly active horseradish peroxidase immobilized in 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate room-temperature ionic liquid based sol-gel host materials. *Chem Commun (Camb)*, 2005(13), p.1778-1780.
137. Wu, B.-P., Wen, Q., Xu, H., and Yang, Z. Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014. v.101, p.101-107.
138. Naushad, M., Alothman, Z.A., Khan, A.B., and Ali, M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: a review. *Int J Biol Macromol*, 2012. v.51 (4), p.555-560.
139. Sheldon, R.A., Lau, R.M., Sorgedraeger, M.J., van Rantwijk, F., and Seddon, K.R. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*, 2002. v.4 (2), p.147-151.
140. Erbedinger, M., Mesiano, A.J., and Russell, A.J. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol Prog*, 2000. v.16 (6), p.1129-1131.
141. Somers, G.F. Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug. *Br J Pharmacol Chemother*, 1960. v.15, p.111-116.
142. Vianna, F.S., Kowalski, T.W., Tovo-Rodrigues, L., Tagliani-Ribeiro, A., Godoy, B.A., Fraga, L.R., Sanseverino, M.T., Hutz, M.H., and Schuler-Faccini, L. Genomic and in silico analyses of CRBN gene and thalidomide embryopathy in humans. *Reprod Toxicol*, 2016. v.66, p.99-106.
143. Hummel, W. and Kula, M.R. Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem*, 1989. v.184 (1), p.1-13.
144. Zhao, H. and van der Donk, W.A. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. v.14 (6), p.583-589.
145. Spieler, V., Valldorf, B., Maass, F., Kleinschek, A., Huttenhain, S.H., and Kolmar, H. Coupled reactions on bioparticles: Stereoselective reduction with cofactor regeneration on PhaC inclusion bodies. *Biotechnol J*, 2016. v.11 (7), p.890-898.
146. Hummel, W.H., G., *Adh from rhodococcus erythropolis*.
147. Drauz K., B.A., Kottenhahn M. , *Method of producing (R)-tertiary leucine.* , 1998.
148. Haas, T., Pfeffer, J.C., Faber, K., Fuchs, M. , *Enzymatic Amination.*, 2016.
149. Ketterer, L. and Keusgen, M. Amperometric sensor for cyanide utilizing cyanidase and formate dehydrogenase. *Anal Chim Acta*, 2010. v.673 (1), p.54-59.
150. Triebig, G. and Schaller, K.H. A simple and reliable enzymatic assay for the determination of formic acid in urine. *Clin Chim Acta*, 1980. v.108 (3), p.355-360.
151. Chen, W. and Georgiou, G. Cell-Surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications. *Biotechnol Bioeng*, 2002. v.79 (5), p.496-503.

152. Xia, L., Liang, B., Li, L., Tang, X., Palchetti, I., Mascini, M., and Liu, A. Direct energy conversion from xylose using xylose dehydrogenase surface displayed bacteria based enzymatic biofuel cell. *Biosens Bioelectron*, 2013. v.44, p.160-163.
153. Feng, R., Liang, B., Hou, C., Han, D., Han, L., Lang, Q., Liu, A., and Han, L. Rational design of xylose dehydrogenase for improved thermostability and its application in development of efficient enzymatic biofuel cell. *Enzyme Microb Technol*, 2016. v.84, p.78-85.
154. Aslan, A.S., Valjakka, J., Ruuponen, J., Yildirim, D., Turner, N.J., Turunen, O., and Binay, B. *Chaetomium thermophilum* formate dehydrogenase has high activity in the reduction of hydrogen carbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) to formate. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2017. v.30 (1), p.47-55.
155. Son, E.J., Ko, J.W., Kuk, S.K., Choe, H., Lee, S., Kim, J.H., Nam, D.H., Ryu, G.M., Kim, Y.H., and Park, C.B. Sunlight-assisted, biocatalytic formate synthesis from  $\text{CO}_2$  and water using silicon-based photoelectrochemical cells. *Chem Commun (Camb)*, 2016. v.52 (62), p.9723-9726.
156. Zhu, K., Chi, Z., Li, J., Zhang, F., Li, M., Yasoda, H.N., and Wu, L. The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. *Vaccine*, 2006. v.24 (35-36), p.6046-52.
157. Poole, R.K., *Advances in microbial physiology*. 2014: Academic Pr.
158. Champney, W.S., *New Antibiotic Targets*. 2008, Totowa, NJ: Humana Press.
159. Dembowsky, K. and Stadler, P., *Novel Therapeutic Proteins Selected Case Studies*. 2008, Weinheim: Wiley-VCH.
160. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. v.72, p.248-254.
161. Alekseeva, A.A., Serenko, A.A., Kargov, I.S., Savin, S.S., Kleymenov, S.Y., and Tishkov, V.I. Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations. *Protein Eng Des Sel*, 2012. v.25 (11), p.781-788.
162. Andreesen, J.R. and Ljungdahl, L.G. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: purification and properties. *J Bacteriol*, 1974. v.120 (1), p.6-14.
163. Mesentsev, A.V., Lamzin, V.S., Tishkov, V.I., Ustinnikova, T.B., and Popov, V.O. Effect of pH on kinetic parameters of  $\text{NAD}^+$ -dependent formate dehydrogenase. *Biochem J*, 1997. v.321 ( Pt 2), p.475-480.
164. Voynova, N.S. and Tishkov, V.I. Kinetic mechanism of recombinant formate dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana*, expressed in *E.coli* cells. . Abstracts of the conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120-th anniversary of M.I.Vavilov, Kyiv, Ukraine, September 20-22, 2007, p. 150.
165. Рожкова, А.М. Повышение термостабильности бактериальной форматдегидрогеназы гидрофобизацией белковой глобулы. Диссертация кандидата химических наук. 1999. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова.
166. Felber, S. Optimierung der  $\text{NAD}^+$ -abhaengigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* fuer den Einsatz in der Biokatalyse. . Ph.D. Thesis. 2001. Duesseldorf, Germany, Heinrich-Heine University of Duesseldorf.
167. Rojkova, A.M., Galkin, A.G., Kulakova, L.B., Serov, A.E., Savitsky, P.A., Fedorchuk, V.V., and Tishkov, V.I. Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha-helices. *FEBS Lett*, 1999. v.445 (1), p.183-188.
168. Alekseeva, A.A., Fedorchuk, V.V., Zarubina, S.A., Sadykhov, E.G., Matorin, A.D., Savin, S.S., and Tishkov, V.I. The role of ala198 in the stability and coenzyme specificity of bacterial formate dehydrogenases. *Acta Naturae*, 2015. v.7 (1), p.60-69.

169. Kargov, I.S., Kleimenov, S.Y., Savin, S.S., Tishkov, V.I., and Alekseeva, A.A. Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design. *Protein Eng Des Sel*, 2015. v.28 (6), p.171-178.