Успехи биологической химии, т. 55, 2015, с. 123-144

РОЛЬ СТРУКТУРНО-ЭКВИВАЛЕНТНОГО ОСТАТКА Рhe В КАТАЛИЗЕ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

©2015 г. В. И. ТИШКОВ^{1,2,3}*, К. В. ГОНЧАРЕНКО^{1,3}, А. А. АЛЕКСЕЕВА^{2,3}, С. Ю. КЛЕЙМЕНОВ^{2,4}, С. С. САВИН^{2,3}

 ¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва,
²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Москва,
³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва,
⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

I. Введение. II. Анализ положения структурно-эквивалентного остатка Phe в формиатдегидрогеназах. III. Влияние замены структурно-эквивалентного остатка Phe на каталитические свойства. IV. Исследование температурной стабильности по кинетике инактивации. V. Изучение температурной стабильности с помощью ДСК. VI. Анализ влияния замен структурно-эквивалентного остатка на свойства формиатдегидрогеназ. VII. Заключение.

введение

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, FDH) катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа при сопряжённом восстановлении NAD⁺ до NADH. Формиатдегидрогеназа является модельным ферментом для выяснения основных закономерностей механизма переноса гидрид-иона от субстрата к C4-атому никотинамидного кольца NAD⁺ в активном центре. На практике

Принятые сокращения: FDH – формиатдегидрогеназа; PseFDH, CboFDH, SoyFDH – рекомбинантные формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp.101, дрожжей *Candida boidinii* и сои *Glycine max*.

^{*}Adpec для корреспонденции: vitishkov@gmail.com

Работа выполнена при финансовой поддержке Росийского фонда фундаментальных исследований (грант 14-04-001625).

этот фермент используется в системах регенерации кофактора. Превосходство формиатдегидрогеназы над другими ферментами при использовании в системе регенерации NADH обусловлено необратимостью катализируемой реакции, широким pH оптимумом активности, строгой специфичностью фермента, дешевизной второго субстрата – формиата и легкостью удаления второго продукта реакции CO₂. Гены, кодирующие FDH, найдены в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах, а также растениях [1–3].

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования структуры и механизма действия FDH из различных источников. Наиболее изученным ферментом среди формиатдегидрогеназ является FDH из бактерий Pseudomonas sp.101 (PseFDH). В базе трехмерных структур PDB для PseFDH имеются структуры как для свободного фермента (структуры 2NAC и 2GO1, разрешение 1,80 и 2,10 Å соответственно), так и для тройного комплекса с NAD⁺ и азид-ионом (холо-форма) (2NAD, разрешение 2,05 Å), а также в комплексе с формиатом (2GUG, разрешение 2,28 Å). Данные о структуре PseFDH были успешно использованы для выбора аминокислотных остатков в экспериментах по направленному мутагенезу для повышения как каталитических свойств, так и температурной и химической стабильности этого фермента [2, 4–7]. Оказалось, что объединение отдельных замен в многоточечные мутанты в ряде случаев имеет аддитивный эффект [5]. Например, объединение 7 лучших мутаций, повышающих термостабильность фермента, позволило получить мутантную PseFDH T7, у которой константа скорости термоинактивации была в 50 раз меньше, чем у PseFDH дикого типа [2]. Три аминокислотные замены, повышающие операционную и температурную стабильность, были объединены в мутанте PseFDH GAV [2, 8]. В результате такого объединения сродство к NAD⁺ увеличилось в 2 раза, температурная стабильность — в 2,5 раза, а операционная – более, чем в 1000 раз по сравнению с PseFDH дикого типа [2, 8]. PseFDH GAV была многократно успешно использована для регенерации NADH в процессах хирального синтеза [2, 9, 10]. Введение в PseFDH GAV еще одной замены - Cys145Ser позволило получить мутантную PseFDH SM4, в которой по сравнению с исходным мутантом были еще больше улучшены все три параметра: константа Михаэлиса по формиату уменьшилась в 1,9 раза, химическая стабильность возросла в 2 раза [4], а термостабильность – в 1,6 раза. Увеличение термостабильности позволило существенно упростить процесс очистки мутантных PseFDH путем введения стадии термообработки бесклеточного экстракта при 55 °C в течение 20-30

мин. В результате содержание целевого фермента повышалось с 50 до 80–90% без потери ферментативной активности [2, 11].

NAD+-зависимая формиатдегидрогеназа является высококонсервативным ферментом. Уровень гомологии между аминокислотными последовательностями эволюционно отдаленных FDH из бактерий и растений составляет более 50% [2]. Уровень структурной гомологии еще выше. Большое количество аминокислотных остатков, находящихся в кофермент-связывающем и каталитическом доменах формиатдегидрогеназ, имеют эквивалентное пространственное расположение. Ранее при анализе структуры тройного комплекса растительной формиатдегидрогеназы из сои (SoyFDH) с коферментом NAD+ и сильным конкурентным ингибитором азид-ионом был выявлен остаток Phe290, который находится на поверхности белковой глобулы в кофермент-связывающем домене и экранирует связанный в активном центре кофермент от растворителя. Были проведены эксперименты по направленному мутагенезу этого остатка, в результате которых было получено 8 мутантных ферментов, многие из которых обладали более высокими каталитическими параметрами и более высокой термостабильностью по сравнению с ферментом дикого типа [12, 13]. Анализ структуры 2NAD (тройной комплекс бактериальной PseFDH с NAD⁺ и азид-ионом) и апо-формы мутантной FDH из дрожжей Candida boidinii (CboFDH, структуры 2FSS и 2J6I) показал, что остатку Phe290 в SovFDH соответствуют остаток Phe311 в PseFDH и остаток Phe285 в CboFDH. В случае CboFDH было получено два мутанта с заменами на остатки Ser и Tyr [14]. В случае PseFDH было получено 4 мутанта, однако в этом случае замены остатка Phe311 проводили не в ферменте дикого типа, а в мутанте PseFDH SM4. В данной работе нами проведено сравнение результатов направленного мутагенеза структурно-эквивалентного остатка Phe в формиатдегидрогеназах из трех разных источников – бактерий, дрожжей и растений. Особое внимание уделено результатам по мутагенезу бактериальной PseFDH SM4.

АНАЛИЗ ПОЛОЖЕНИЯ СТРУКТУРНО-ЭКВИВАЛЕНТНОГО ОСТАТКА Рhe В ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗАХ

В настоящее время в базах данных имеется более 100 аминокислотных последовательностей NAD⁺-зависимых формиатдегидрогеназ из бактерий, дрожжей, микроскопических грибов и растений. На рис. 1 представлены результаты сравнения аминокислотных последовательностей некоторых формиатдегидрогеназ из разных источников в районе остатка Phe311 (нумерация по последовательности PseFDH). Анализ выравнивания всех найденных последовательностей FDH показал, что частота нахождения остатка Phe в этом положении зависит

| βF | | αG | |
|---------|------------------------|--|-----------------------|
| • | <>. | · · · <>.< | |
| PseFDH | LAGYAG | DVW <mark>F</mark> PQPAPKDHPI | RTM PY |
| MorFDH | LA <mark>GY</mark> AGI | D VW <mark>F</mark> PQPAPNDHP I | RTM PH |
| ParFDH | LA <mark>GY</mark> GG | DVW <mark>F</mark> PQPAPQDHPI | RTM PH |
| HypFDH | LA <mark>GY</mark> AGI | DVW <mark>F</mark> PQPAPQDHPI | RKMPH |
| SmeFDH | LA <mark>GY</mark> AGI | DVW <mark>F</mark> PQPAPKDHPI | RSMPH |
| UncFDH | LS <mark>GYAG</mark> I | DVW <mark>F</mark> PQPAPNDHVI | RTMPN |
| SoyFDH2 | VA <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW F</mark> PQPAPKDHPI | WRYMPN |
| LesFDH1 | IA <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW Y</mark> PQPAPKDHLI | WRYMPN |
| StuFDH1 | IA <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW Y</mark> PQPAPKDHPI | WRYMPN |
| CcaFDH1 | IG <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW N</mark> PQPAPKDHPI | WRYMPN |
| RcoFDH1 | IG <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW Y</mark> PQPASKDHPI | WRYMPN |
| BnaFDH2 | IG <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW D</mark> PQPAPKDHPI | WRYMPN |
| BolFDH1 | IG <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW D</mark> PQPAPKDHPI | WRYMPN |
| MdoFDH | IA <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW N</mark> PQPAPKDHPI | WRYMPN |
| AthFDH | IG <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW D</mark> PQPAPKDHPI | WRYMPN |
| PtaFDH2 | IG <mark>GY</mark> SG | D <mark>VW S</mark> AQPAPKDHPI | RSMPN |
| SceFDH | LA <mark>GY</mark> GG | D VW <mark>D</mark> KQPAPKDHP I | WRTMDN |
| DhaFDH | LR <mark>GY</mark> GG | DVW <mark>Y</mark> PQPAPKDHPI | NRQMQN |
| CmeFDH | LR <mark>GY</mark> GG | DVW <mark>F</mark> PQPAPKDHPI | NRDMRN |
| CboFDH | LR <mark>GY</mark> GG | DVW <mark>F</mark> PQPAPKDHPI | NRDMRN |
| YliFDH | LR <mark>GY</mark> GG | DVW <mark>F</mark> PQPAPADHPI | NRSMRN |
| NefFDH | LR <mark>GY</mark> GG | D <mark>VW Y</mark> PQPAPKDHPI | L <mark>R</mark> YVQG |
| AjcFDH1 | LR <mark>GY</mark> GG | D <mark>VW F</mark> PQPAPKDHPI | L <mark>RYA</mark> QG |
| GzeFDH | LA <mark>GY</mark> GG | D <mark>VW D</mark> HQPAPKEHPI | L <mark>RNAKN</mark> |
| CneFDH | LL <mark>GY</mark> AG | D <mark>VW D</mark> VQPAPKDHPI | WRHMAN |

Рис. 1 Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей в районе остатка Phe311 (нумерация по последовательности PseFDH).

Синим выделены FDH из бактерий: PseFDH – из *Pseudomonas* sp. 101, MorFDH – из *Moraxella* sp., ParFDH – из *Paracoccus* sp. 12-A, HypFDH – из <u>Окончание подпси к рис. 1 см. сл. стр.</u>

Окончание подпси к рис. 1.

Hyphomicrobium strain JT-17, SmeFDH – из *Sinorhizobium meliloti*, SauFDH – из *Staphylococcus aureus*.

Зеленым выделены FDH из растений: SoyFDH2 – из сои *Glycine max*, LesFDH1 – из томатов *Lycopersicon esculentum*, StuFDH1 – из картофеля *Solanum tuberosum*, CcaFDH1 – из кофе *Coffea canephora*, RcoFDH1 – из клещевины *Ricinus communis*, BnaFDH2 – из рапса *Brassica napus*, BolFDH1 – из капусты *Brassica oleracea*, MdoFDH – из яблока *Malus domestica*, AthFDH – из *Arabidopsis thaliana*, PtaFDH2 – из сосны *Pinus taeda*.

Розовым выделены FDH из дрожжей: SceFDH – из пекарских дрожжей Saccharomyces cerevisiae, DhaFDH – из Debaryomyces hansenii, CmeFDH – из Candida methylica, CboFDH – из Candida boidinii, YliFDH – из Yarrowia lipolytica. Оранжевым выделены FDH из микроскопических грибов: NefFDH – из Neosartorya fischeri, AjcFDH1 – из Ajellomyces capsulatus, GzeFDH – из Gibberella zeae, CneFDH – из Cryptococcus neoformans.

от типа источника. Наиболее высокая консервативность наблюдается в случае бактериальных ферментов. Более, чем в 80% случаев в этом положении находится остаток Phe, а в остальных – остаток Туг. Других остатков в этом положении в известных аминокислотных последовательностях бактериальных FDH не найдено. В случае ферментов из растений в положении, эквивалентном положению остатка Phe290 в SoyFDH и Phe311 в PseFDH, остатки Phe и Tyr встречаются приблизительно с одинаковой частотой примерно в 70% случаев. Кроме того в этом положении также встречаются остатки Asn, Asp, Ser и His (указаны в порядке убывания частоты). В случае эволюционно близких FDH из дрожжей и микроскопических грибов остаток Phe в этом положении встречается в более, чем в 60% случаев, а вторым по встречаемости является не остаток Tyr, а остаток Asp (включая FDH из пекарских дрожжей).

Анализ положения остатка Phe290 в структуре тройного комплекса (SoyFDH–NAD⁺–азид) выполнен в работах [12,13]. Моделирование структур мутантных ферментов показало, что в случае замены остатка Phe на остаток Ala изменение структуры минимально и в мутанте не образуется новых водородных связей, а в случае замены на 7 других остатков – Asp, Asn, Glu, Gln, Tyr, Ser и Thr, дополнительно образуется от 2 до 4 новых водородных связей, причем во всех случаях возникает новая водородная связь между мутируемым остатком и остатком Gln292 (Gln313 в PseFDH), который в свою очередь находится в очень плотном контакте с остатком His309 (His332 в PseFDH). В случае PseFDH было показано, что остаток His332 участвует в связывании формиат-иона [15, 16].



Рис. 2. А. Структура тройного комплекса [PseFDH–NAD⁺–N₃] с выделенным остатком Phe311 (структура PDB 2NAD). Субъединицы фермента представлены голубым и зеленым цветом, оранжевым цветом – молекула NAD⁺ и фиолетовым – азид-ион.

Б. Увеличенная картинка положения остатка Phe311 в PseFDH в комплексе с NAD+ и азид-ионом.

Структура димерной холо-формы PseFDH и расположение в ней остатка Phe311 представлено на рис. 2. Хорошо видно, что этот остаток находится на поверхности в кофермент-связывающем домене активного центра. Как и в растительной SoyFDH, наиболее вероятной его функцией является экранирование молекулы NAD⁺ от растворителя. С точки зрения термодинамики, нахождение гидрофобного остатка на поверхности белковой глобулы не выгодно для его стабильности. В связи с этим остается непонятным почему природа в случае формиатдегидрогеназ отдала предпочтение именно остатку Phe.

Как уже отмечалось выше, в бактериальных ферментах в этом положении также может находиться остаток Tyr, а в формиатдегидрогеназах из других источников наиболее часто встречаются остатки Asp, Asn и Ser. Именно эти остатки и были введены в мутантную PseFDH SM4. Для этих замен было проведено компьютерное моделирование и наложение структур до и после мутации. Результаты компьютерного моделирования структуры мутантных PseFDH SM4 с заменами остатка Phe311 на остатки Ser, Asp, Asn и Tyr представлены на рис. ЗА-Г. Красным показаны остатки до введения замены, синим – после. Данные моделирования показали, что введение вышеперечисленных замен, как и в случае мутагенеза остатка Phe290 в SoyFDH, приводит к образованию новых водородных связей (табл. 1). В случае исходного фермента остаток Phe311 участвует в образовании одной водородной связи между кислородом карбонила основной цепи и азотом гуанидиновой группы остатка Arg290. Эта связь сохраняется при замене Phe311 на остатки Ser и Tyr и исчезает



129

Рис. З Моделирование структуры мутантных PseFDH при замене остатка Phe311 на остатки Asn (A), Asp (Б), Ser (В) и Туг (Г).

Красным и синим цветом показаны положения остатков, а серым и зеленым – ход основной цепи в исходной структуре и в мутантном ферменте, соответственно.

| Формонт | Наличие водородной связи с остатками: | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--|
| Фермент | Arg290 | Lys286 | Gln313 | Cys288 | Tyr102 | |
| PseFDH дикого типа | ٧ | _ | _ | _ | _ | |
| PseFDH Phe311Ser | ٧ | ٧ | ٧ | _ | _ | |
| PseFDH Phe311Asn | _ | _ | v | _ | ٧ | |
| PseFDH Phe311Asp | ٧٧ | _ | ٧ | _ | _ | |
| PseFDH Phe311Tyr | v | _ | v | v | _ | |

| Таблица | 1. | Образование водородных | свя | зей с | оста | атком |
|---------|----|------------------------|-----|-------|------|-------|
| | | в 311 положении PseF | FDH | | | |

В.И.Тишков и соавт.



Рис. 4. Положение структурно-эквивалентного остатка Phe285 в апо-форме формиатдегидрогеназы из дрожжей *С. boidinii* (структура 2J6I).

в мутантной PseFDH Phe311Asn. В случае замены на остаток Asp количество водородных связей между этим остатком и Arg290 увеличивается до двух (рис. 3A, табл. 1). Введение всех четырех замен также приводит к образованию водородной связи между остатком в 311 положении и остатком Gln313. В целом, в структуре мутантных PseFDH наблюдается на одну (замена на остаток Asn) или две (замены на остатки Ser, Asp и Tyr) водородные связи больше, чем в структуре исходного бактериального фермента, однако в целом по сравнению с заменами структурно-эквивалентного остатка Phe290 в SoyFDH [13] количество вновь образуемых связей в мутантных PseFDH SM4 при замене остатка Phe311 меньше. Поэтому можно было ожидать, что количественно изменение свойств бактериального фермента в результате мутагенеза будет меньше, чем в случае подобных замен в SoyFDH.

В случае FDH из дрожжей *C.boidinii* в банке данных трехмерных структур ферментов PDB есть только структуры для двух мутантных форм апо-фермента (2FSS и 2J6I). Поэтому провести сравнение положений остатка Phe в холо-формах невозможно, однако положение остатка Phe285 в апо-форме CboFDH (структура 2J6I, рис. 4) свидетельствует об эквивалентом положении этого остатка по отношению к остатку Phe311 в апо-форме PseFDH (на рис. не показано). Таким образом, можно полагать, что при образовании CboFDH тройного комплекса с субстратами положение остатка Phe285 будет

аналогичным положению остатков Phe290 и Phe311 в холо-формах SoyFDH и PseFDH соответственно.

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ СТРУКТУРНО-ЭКВИВАЛЕНТНОГО ОСТАТКА Рhe НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Влияние замены остатка Phe290 на свойства SoyFDH было изучено в работах [12, 13], а данные по мутагенезу структурно-эквивалентного Phe285 в CboFDH – в работе [14]. Результаты влияния замены остатка Phe311 в PseFDH представлены в данной работе. Кинетические параметры мутантных PseFDH SM4, CboFDH и SoyFDH с заменами структурно-эквивалентного остатка Phe представлены в таблице 2. Видно, что наибольший эффект оказывали замены остатка Phe290 в SoyFDH. Практически во всех случаях (за исключением замены Phe290Asn) увеличивалась каталитическая константа, причем в случае замены Phe290Asp величина k_{cat} возросла в 1,76 раза. В случае СboFDH каталитическая константа возросла в 1,65 раза при замене Phe285Ser, однако в случае мутации Phe285Thr этот параметр остался неизменным [14]. В бактериальной PseFDH SM4 три замены привели к уменьшению каталитической константы и только у мутантной PseFDH SM4 Phe311Tyr значение k_{cat} осталось прежним по сравнению с исходным ферментом.

В случае констант Михаэлиса у бактериальной PseFDH замена остатка Phe311 на остатки Ser, Asn и Asp привела к заметному увеличению K_M как по NAD⁺, так и по формиату. В случае замены остатка Phe311 на остаток тирозина значение K_M по формиату в пределах ошибки эксперимента не изменилось, а K_M по NAD⁺ лишь немного ухудшилась. При замене остатка Phe285 в дрожжевой CboFDH [14] увеличение каталитической константы сопровождается сильным увеличением K_M по коферменту. У мутантных SoyFDH с заменами в 290-м положении наблюдается как увеличение, так и уменьшение величин констант Михаэлиса по формиату и NAD⁺, однако эти изменения не такие большие, как в случае бактериального и дрожжевого фермента.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПО КИНЕТИКЕ ИНАКТИВАЦИИ

Термостабильность мутантных SoyFDH с заменами остатка Phe290 была подробно изучена в широком диапазоне температур [12, 13]. Оказалось, что все точечные замены обеспечивали положительный стабилизирующий эффект, причем в случае мутаций Phe290Asp и Phe290Glu при температуре 54 °C эффект стабилизации составил 55 и 61 раз соответственно [12, 13]. К сожалению, данные по влиянию

Таблица 2. Кинетические параметры и относительная термостабильность исходных и мутантных формиатдегидрогеназ с заменами структурно-эквивалентного остатка Phe (0,1 М Натрий-фосфатный буфер, 0,01М ЭДТА, рН 7,0)

| | 1 | T · F / · / · | | - ,,,,, | | | | |
|---|-------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| Фермент | $k_{cat,} c^{-1}$ | K _M ^{NAD⁺} , мкМ | K _M ^{HCOO} , MM | Относитель- ная термо- стабильность* | | | | |
| FDH из бактерий | Pseudomon | as sp.101 | [данная раб | бота] | | | | |
| wt-PseFDH [1,2] | 7,3 | 60 | 7,7 | 0,27 | | | | |
| PseFDH GAV [2] | 7,3 | 35 | 6,0 | 0,66 | | | | |
| PseFDH SM4 | 7,3 | 41 | 3,2 | 1,00** | | | | |
| PseFDH SM4 Phe311Tyr | 7,3 | 55 | 3,7 | 1,59 | | | | |
| PseFDH SM4 Phe311Asn | 5,5 | 168 | 19,2 | 0,49 | | | | |
| PseFDH SM4 Phe311Ser | 5,4 | 170 | 22,7 | 0,52 | | | | |
| PseFDH SM4 Phe311Asp | 4,0 | 230 | 29,8 | 2,42 | | | | |
| FDH из сои <i>Glycine max</i> [12, 13] | | | | | | | | |
| wt-SoyFDH | 2.9 | 13.3 | 1.5 | 1,00*** | | | | |
| SoyFDH Phe290Ser | 4,1 | 9,1 | 4,1 | 4,8 | | | | |
| SoyFDH Phe290Asn | 2,8 | 14,0 | 4,5 | 12,3 | | | | |
| SoyFDH Phe290Asp | 5,1 | 12,8 | 5,0 | 61 | | | | |
| SoyFDH Phe290Ala | 3,8 | 8,6 | 1,1 | 1,3 | | | | |
| SoyFDH Phe290Tyr | 3,5 | 10,9 | 0,9 | 1,4 | | | | |
| SoyFDH Phe290Gln | 3,5 | 11,7 | 1,2 | 5,1 | | | | |
| SoyFDH Phe290Glu | 4,7 | 13,7 | 2,9 | 55 | | | | |
| SoyFDH Phe290Thr | 4,0 | 14,3 | 1,3 | 5,0 | | | | |
| FDH из дрожжей <i>Candida boidinii</i> [14] | | | | | | | | |
| wt-CboFDH | 4,2 | 45 | 5,9 | 6,69 | | | | |
| CboFDH Cys23Ser | 3,7 | 44 | 6 | 1,00**** | | | | |
| CboFDH Cys23Ser/Phe285Ser | 6,1 | 73 | 14 | 1,00 | | | | |
| CboFDH Cys23Ser/Phe285Tyr | 3,7 | н.д. | н.д. | 3,33 | | | | |

Относительная термостабильность выражена как отношение констант скорос-тей инактивации исходного фермента и его мутанта ($k_{in}^{\text{мех}}/k_{in}^{\text{мут}}$). Величины более и менее 1 означают соответственно стабилизацию и дестабилизацию фермента. Форма исходного фермента, относительно которого считалась термостабильность, выделена исходного фермента, относительно которого считалась термостаоильность, выделена полужирным шрифтом. ** Измерено при 64 °C. **** Измерено при 54 °C. **** Для первых трех ферментов измерено при 50 °C. Для мутанта CboFDH Cys23Ser/

Phe285Туг данные по кинетике инактивации отсутствуют. Оценка эффекта стабилизации выполнена на основе косвенных результатов. Подробнее см. [2].





Рис. 5 Зависимость остаточной активности мутантных PseFDH от времени в координатах ln(A/A0) - t. 64 °C,0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

замен в 285 положении CboFDH на термостабильность крайне ограничены. Фактически было проведено сравнение величин остаточной активности через 30 мин после инкубации только при одной температуре [14], однако мономолекулярный механизм термоинактивации [17] позволяет рассчитать константы скорости инактивации и стабилизирующий эффект. Более подробно о методике сравнения стабильности мутантных CboFDH можно узнать в работе [2]. Как уже отмечалось выше, замена Phe285Ser приводит к увеличению каталитической константы, но не стабилизирует фермент, а замена Phe285Tyr на каталитическую константу не влияет, но приводит к увеличению стабильности в 3,3 раза [2, 14].

Термостабильность мутантных PseFDH SM4 с заменами в 311 положении изучали в диапазоне температур (62–72 °C), в котором термоинактивация фермента дикого типа и мутанта PseFDH GAV протекает необратимо по мономолекулярному механизму [2]. На рисунке 5 в полулогарифмических координатах представлены зависимости остаточной активности от времени для исходной PseFDH SM4 и полученных на ее основе мутантов при 64 °C. Для наглядности оценки величины изменения стабильности за счет введенных замен также приведены данные для PseFDH GAV, которая широко используется на практике. Из рис. 5 видно, что для всех мутантных PseFDH зависимости остаточной активности от времени представляют собой

простые экспоненты, которые хорошо линеаризуются в координатах $\ln(A/A0) - t$. Из тангенса угла наклона прямых были определены величины константы скорости инактивации первого порядка k_{in} . Также было показано, что изменение концентрации фермента в широком диапазоне (0,1–2,5 мг/мл) не влияло на величину константы скорости инактивации k_{in} , т.е. инактивация исходной PseFDH SM4 и мутантных форм на ее основе при повышенных температурах является истинно мономолекулярным процессом. Эти данные свидетельствуют, что при введении аминокислотных замен в 311 положении механизм термо-инактивации фермента не изменяется.

Из таблицы 2 видно, что при 64 °С введение в 311 положение остатков Ser и Asn приводит к дестабилизации фермента примерно в 2 раза, а замена на остатки Туг и Asp улучшает термостабильность в 1,6 и 2,4 раза соответственно. Таким образом, было получено 2 мутантных фермента с повышенной термостабильностью.

Истинно мономолекулярный характер процесса термоинактивации мутантных PseFDH и исходного фермента во всем диапазоне исследованных температур позволил применить теорию активированного комплекса для анализа этого процесса. Уравнение теории активированного комплекса для зависимости константы скорости первого порядка от температуры можно представить в линейном виде:

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

где $const = ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^{\neq}}{R}$, k_B и h – это константы Больцмана и

Планка, соответственно, R – универсальная газовая постоянная, а ΔH^{\neq} и ΔS^{\neq} активационные параметры.

На рисунке 6 представлены зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры для полученных мутантных PseFDH в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$. Из рисунка видно, что в таких координатах эти зависимости представляют собой прямые т.е. они действительно могут быть описаны с помощью уравнения теории активированного комплекса. Из тангенса угла наклона прямых была рассчитана энтальпия активации ΔH^{\ddagger} , а из отсекаемого на оси ординат отрезка– энтропия ΔS^{\ddagger} (табл. 3). В этой же таблице для сравнения приведены аналогичные параметры и для других формиатдегидрогеназ.





Рис. 6. Зависимость констант скорости термоинактивации мутантных форм PseFDH от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ДСК

Термостабильность мутантных SoyFDH и PseFDH SM4 с заменами структурно-эквивалентного остатка Phe была также изучена методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Результаты для SoyFDH подробно рассмотрены в работах [12, 13]. Кривые плавления для исходного фермента PseFDH SM4 и его мутанта с заменой Phe311Tyr, а также для ряда других формиатдегидрогеназ приведены на рис 6. Численные значения температуры плавления представлены в таблице 3. Полученные данные хорошо согласуются с данными по кинетике термоинактивации. В случае замен Phe311Asn и Phe311Ser стабильность полученных мутантов по сравнению с исходной PseFDH SM4 уменьшается, а в случае замен Phe311Tyr и Phe311Asp—возрастает. В обоих случаях совпадает и порядок, в котором можно расположить полученные ферменты по их термостабильности PseFDH SM4 F311N < PseFDH SM4 F311S < PseFDH GAV < PseFDH SM4 < PseFDH SM4 F311D.

| | Кинетика те ван | ермоинакти- ции | Дифференциальная сканирующая калориметрия | | |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|---|--|--|
| Фермент | ∆ <i>Н</i> ≠, кДж/моль | <i>∆S</i> ≠, Дж/моль/К | Температура фазового перехода, Т _m , °С | Показатель коопера- тивности, Т _{1/2} , °С | |
| wt-PseFDH | 570 ± 20 | 1390 ± 70 | 67,6 | 5,4 | |
| PseFDH GAV | 590 ± 20 | 1420 ± 50 | 68,8 | 5,08 | |
| PseFDH SM4 | 580 ± 10 | 1400 ± 50 | 69,0 | 5,17 | |
| PseFDH SM4 F311S | 580 ± 30 | 1280 ± 80 | 67,8 | 4,52 | |
| PseFDH SM4 F311N | 530 ± 20 | 1250 ± 50 | 68,3 | 4,57 | |
| PseFDH SM4 F311Y | 600 ± 40 | 1450 ± 80 | 69,7 | 4,70 | |
| PseFDH SM4 F311D | 600 ± 20 | 1450 ± 60 | 70,3 | 3,92 | |
| wt-MorFDH [2,18] | н.д.*** | Н.Д. | 63.4 | 6.4 | |
| wt-SoyFDH [12, 13] | 370 | 830 | 57,0 | 7,1 | |
| SoyFDH F290A [13] | 370 | 820 | 57.1 | 9.0 | |
| SoyFDH F290Y [13] | 320 | 660 | 57.6 | 9.7 | |
| SoyFDH F290T [13] | 470 | 1100 | 59.2 | 7.7 | |
| SoyFDH F290S [12] | 440 | 1020 | 59.9 | 6.4 | |
| SoyFDH F290Q [13] | 340 | 720 | 61.2 | 9.0 | |
| SoyFDH F290N [12] | 450 | 1050 | 61.3 | 6.6 | |
| SoyFDH F290D [12] | 520 | 1240 | 64.8 | 5.0 | |
| SoyFDH F290E [13] | 480 | 1180 | 63.6 | 8.7 | |
| wt-AthFDH [2] | 490 | 1200 | 64.9 | 5.9 | |
| wt-CboFDH [17] | 500 | 1360 | 64,4 | 5.3 | |
| | | | | | |

Таблица 3. Параметры процесса термоинактивации мутантных FDH и ферментов дикого типа из разных источников*

* 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0.

** wt-PseFDH, wt-MorFDH, wt-CboFDH и wt-AthFDH - рекомбинантные формиатдегидрогеназы дикого типа из бактерий *Pseudomonas* sp.101, *Moraxella* sp.C-1, дрожжей *Candida boidinii* и растений *Arabidopsis thaliana* соответственно. *** нет данных

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЗАМЕН СТРУКТУРНО-ЭКВИВАЛЕНТНОГО ОСТАТКА РНЕ НА СВОЙСТВА ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

Полученные данные свидетельствуют о важной роли структурноэквивалентного остатка Phe в стабильности и катализе формиатдегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (Phe311), сои *Glycine max* (Phe290) и в ферменте из метилотрофных дрожжей *Candida boidinii* (Phe285). Однако результаты, полученные для мутантных PseFDH, SoyFDH [12, 13] и CboFDH [14] с заменами соответственно по остаткам Phe311, Phe290 и Phe285, сильно отличаются по направленности эффекта (повышение или снижение) и строго индивидуальны для каждого фермента.

Каталитическая константа. Сравнение значений k_{cat}, в табл. 2 однозначно свидетельствует, что величина эффекта увеличения каталитической константы за счет мутагенеза зависит от исходной активности фермента. В случае бактериальной PseFDH SM4, обладающей намного более высокой активностью по сравнению с ферментами из дрожжей и растений, ни одна из замен не приводит к увеличению каталитической константы (табл. 2). Мутации Phe290Asn в SoyFDH и Phe285Tyr в CboFDH Cys23Ser также не влияют на величину k_{cat} , но в случае мутантных SoyFDH с заменами Phe290Ser, SoyFDH Phe290Asp, Phe290Ala, Phe290Tyr, Phe290Gln, Phe290Glu и Phe290Thr значение каталитической константы по сравнению с исходной SoyFDH дикого типа возрастает от 20 до 76%, а в случае мутанта CboFDH Cys23Ser/ Phe285Ser - на 65% по сравнению с исходным мутантом CboFDH Cys23Ser. Однако, при сравнении с CboFDH дикого типа величина достигаемого эффекта за счет замены Phe285Ser меньше – 42%, и она одинакова, как и в случае мутации Phe290Ser в SoyFDH дикого типа (43%). Также отметим, что активность даже самого лучшего мутанта SoyFDH Phe290Asp ниже, чем у мутанта CboFDH Cys23Ser/ Phe285Ser.

Константы Михаэлиса. Замена Phe311Туг в PseFDH SM4 практически не влияет на величины K_M как по NAD⁺, так и по формиату (табл. 1). К сожалению, данные для мутанта CboFDH Cys23Ser/Phe285Tyr в литературе отсутствуют. Замена Phe285Ser в дрожжевом ферменте и замены Phe311 на Ser, Asn и Asp в PseFDH SM4 приводят к многократному увеличению констант Михаэлиса по обоим субстратам. Особенно сильно этот эффект проявляется на бактериальном ферменте. Иная картина наблюдается для мутантов SoyFDH (табл. 2). K_M по формиату как возрастает от 2 до 3,3 раз (4 замены из восьми – Phe290Asp , Phe290Ser, Phe290Asn, Phe290Glu), так и уменьшается в 1,4 раза (замена Phe290Tyr). В случае NAD⁺ величина K_M в пределах

ошибки эксперимента или не изменяется (Phe290Glu, Phe290Asn, Phe290Gln, Phe290Glu, Phe290Thr и Phe290Asp) или даже улучшается (замены Phe290Ser и особенно Phe290Ala).

Структурные аспекты изменения кинетических параметров. Различные эффекты на кинетические параметры бактериальной и растительной формиатдегидрогеназ хорошо согласуются с результатами моделирования структур мутантных ферментов. Как уже отмечалось выше, в результате всех изученных замен происходит образование новой водородной связи между введенным остатком и остатком Gln313 (табл. 1). Этот остаток не является каталитическим, однако он имеет очень плотный контакт с остатком His332, участвующим в связывании формиат-иона в активном центре фермента [15, 16]. Как видно из рис. 3А-Г, образование водородной связи с Gln313 приводит к изменению его конформации. Такое изменение в первую очередь должно оказывать влияние на связывание формиата в активном центре и, как следствие, к изменению каталитических свойств. В то же время результаты моделирования структуры мутантных SoyFDH, выполненных на основе кристаллической структуры тройного комплекса [SoyFDH-NAD⁺-N₂] [12, 13], показали, что положение остатка Gln292 (эквивалентен остатку Gln313 в PseFDH) при введении замен практически не меняется, причем за исключением замены Phe290Ala во всех остальных семи случаях при введении замен образуется дополнительно от 2 до 4 новых водородных связей и одна из этих связей обязательно с остатком Gln292. Таким образом, увеличение значений К_м по формиату в растительном ферменте не связано с конформационными изменениями в формиат-связывающем участке активного центра. По-видимому, этот эффект связан с изменением микродиэлектрической проницаемости в активном центре за счет замены гидрофобного остатка Phe на более полярные остатки. То же самое должно быть справедливо и для бактериальной и дрожжевой формиатдегидрогеназ. В случае PseFDH SM4 и SoyFDH наибольшее увеличение К_м по формиату происходит при введении отрицательно заряженного остатка Asp, а при введении в PseFDH SM4 наименее полярного из изученных остатков Туг эффект самый низкий. Остатки с промежуточной полярностью - Ser и Asn, дают промежуточный эффект.

Увеличение каталитической константы в случае растительной и дрожжевой формиатдегидрогеназ и отсутствие такого эффекта у бактериального фермента, по-видимому, связаны с различиями в каталитическом и кинетическом механизмах этих ферментов. PseFDH имеет неупорядоченный квазиравновесный кинетический механизм

[19, 20]. Данные предстационарной кинетики и эксперименты по определению величины первичного дейтериевого кинетического изотопного эффекта (^HV_{max}/^DV_{max} 3,0 и ^H(V_{max}/K_M)/^D(V_{max}/K_M) 2,5) при различных рН свидетельствуют, что лимитирующей стадией в кинетическом механизме PseFDH является перенос гидрид-иона в тройном комплексе [20], в то время как для дрожжевых и растительных ферментов характерно упорядоченное связывание субстрата [21, 22]. Значения первичного дейтериевого кинетического изотопного эффекта для максимальной скорости реакции ${}^{\rm H}V_{max}/{}^{\rm D}V_{max}$ в случае FDH из дрожжей С. boidinii – 2,13 [22], и С. methylica – 2,10 [23], значительно ниже, чем в случае PseFDH (3,0) [20]. В случае FDH из *C. boidinii* отношение ${}^{\rm H}(V_{max}/K_M)/{}^{\rm D}(V_{max}/K_M)$ в пределах ошибки эксперимента (2,27) совпадает с величиной для отношения ${}^{\rm H}V_{max}/{}^{\rm D}V_{max}$ [22], в то время как в случае PseFDH величина ${}^{\rm H}(V_{max}/K_M)/{}^{\rm D}(V_{max}/K_M)$ достоверно меньше (2,20) [20]. Это свидетельствует о том, что у PseFDH величина эффективной каталитической константы может зависеть и от стадии связывания формиата (или от скорости диссоциации продукта СО₂). Несколько иной характер связывания формиат-иона в активном центре бактериальных и дрожжевых формиатдегидрогеназ приводит к тому, что PseFDH не способна катализировать окисление ближайшего структурного аналога тиоформиата, в то время как фермент из метилотрофных дрожжей Hansenula polymorpha (Ogataea parapolymorpha) такую реакцию катализирует [2, 24]. По-видимому, небольшое ухудшение связывания в активном центре формиат-иона и продукта его окисления углекислого газа при замене гидрофобного остатка Phe на полярные Ser и Asp как раз связано с увеличением скорости их диссоциации из активного центра, в результате чего возрастет и максимальная скорость реакции. Тем не менее, бактериальные формиатдегидрогеназы являются более совершенными с точки зрения катализа ферментами, чем их аналоги из дрожжей и растений, поскольку даже в самом лучшем случае (замена Phe285Ser в CboFDH) величина каталитической константы 6,1 с⁻¹ [17] все равно меньше таковой для бактериального фермента дикого типа $(7,3 c^{-1}) [2].$

Данные по температурной стабильности формиатдегидрогеназ из различных источников с заменами остатка Phe также следуют правилу – чем менее совершенен фермент, тем выше эффект. SoyFDH является одним из наименее стабильным ферментом среди известных формиатдегидрогеназ (рис. 6). По этому параметру ей уступает только фермент из пекарских дрожжей [18, 25]. Поэтому не удивительно, что самый высокий эффект стабилизации – в 61 раз,

наблюдался в случае мутанта SoyFDH Phe290Asp (табл. 2), причем эта единичная замена позволила сравняться с другой растительной формиатдегидрогеназой из *A. thaliana*, которая по термостабильности уступает только PseFDH (рис. 7). В случае такой замены в PseFDH SM4 эффект существенно меньше – в 2,4 раза, однако по сравнению с ферментом дикого типа этот параметр намного выше – в 9 раз. Если учесть, что PseFDH является наиболее стабильной среди изученных формиатдегидрогеназ, то такой результат следует признать также очень успешным.

Полученные данные свидетельствуют, что введение замен в Phe311 в PseFDH и в Phe290 в SoyFDH по-разному влияет на зависимость константы скорости инактивации мутантных ферментов от температуры. В случае замен в PseFDH SM4 все прямые зависимости константы скорости инактивации в линеаризованной форме уравнения активированного комплекса имеют одинаковый наклон. Это означает, что для исходной PseFDH SM4 и полученных мутантов энтальпия активации в пределах ошибки эксперимента одинакова (табл. 3) и изменение термостабильности обусловлено только изменением энтропии активации. Эти результаты кардинально отличаются от данных для мутантных SoyFDH (табл. 3) [12, 13]. В случае SoyFDH для мутантов с заменами в 290-м положении величины энтальпии и энтропии активации для процесса термоденатурации могут быть как меньше (замены Phe290Tyr и Phe290Gln), так и больше, чем у фермента дикого типа. В случае замены Phe290Ala, когда не образуются дополнительные водородные связи, активационные параметры для этого мутанта и фермента дикого типа одинаковы. Однако, независимо от характера изменения активационных параметров, во всех случаях полученные мутанты более стабильны, чем исходный фермент. При этом у ряда мутантов SoyFDH каталитические параметры также лучше, чем у исходного фермента. Разная величина энтальпии активации у SoyFDH дикого типа и ее мутантов с заменами в 290-м положении приводит к тому, что при большем значении ΔH^{\ddagger} , величина стабилизирующего эффекта при понижении температуры увеличивается, а при меньшем значении ΔH^{\ddagger} , чем у фермента дикого типа, разница в стабильности исчезает и более того, при температурах ниже 45 °C мутанты SoyFDH Phe290Tyr и SoyFDH Phe290Gln имеют более низкую стабильность, чем исходный фермент. Только в случае мутанта SoyFDH Phe290Ala, имеющего такое же значение ΔH^{\ddagger} , что и нативный фермент, величина эффекта стабилизации не зависит от температуры.





Рис. 7. Кривые плавления, полученные методом ДСК, для формиатдегидрогеназ дикого типа из сои (wt-SoyFDH), растений *Arabidopsis thaliana* (wt-AthFDH), дрожжей *C. boidinii* (wt-CboFDH), бактерий *Moraxella* sp.C1 (wt-MorFDH) и *Pseudomonas* sp.101 (wt-PseFDH) и мутантных PseFDH SM4 и PseFDH SM4 F311Y. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0. Скорость нагрева 1 град/мин.

Одна и та же замена по-разному влияет на стабильность формиатдегидрогеназ. В случае ФДГ из дрожжей *С. boidinii* замена Phe285Ser улучшает каталитическую константу с ухудшением констант Михаэлиса по обоим субстратам и никак не влияет на термостабильность, в то время как в бактериальной ФДГ в результате такой замены термостабильность падает почти в два раза. Замена Phe285Tyr в CboFDH не влияет на каталитическую константу, но приводит к стабилизации в 3,3 раза (табл. 2) В то же время в PseFDH такая замена приводит к меньшей стабилизации (всего в 1,5 раза). В случае фермента из сои при замене Phe290Ser происходит улучшение большинства параметров – увеличивается каталитическая константа, уменьшается К по коферменту и термостабильность становится выше в 4,8 раза. Отдельно также стоит отметить замену Phe/Asp. Эта замена приводит к повышению стабильности как бактериальной PseFDH, так и растительной SoyFDH и в то же время наблюдается совершенно противоположный эффект на значения каталитической константы и К_м по коферменту.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ результатов по мутагенезу структурноэквивалентного остатка Phe в формиатдегидрогеназах из трех типов источников – бактерий, дрожжей и растений, свидетельствует о важной роли этого остатка как в катализе, так и стабильности. Для SoyFDH все восемь аминокислотных замен привели к получению мутантов с повышенной термостабильностью, причем в двух случаях величина стабилизирующего эффекта является аномально высокой, по сравнению с обычными эффектами, наблюдаемыми при точечных заменах. При объединении с двумя другими положительными заменами [26] были получены тройные мутанты, лучший из которых практически не уступал по стабильности PseFDH дикого типа [27]. Для семи мутантов SoyFDH в 290-м положении увеличилась каталитическая константа. Наиболее перспективным для биотехнологии следует признать мутанты SoyFDH с заменами Phe290Asp и Phe290Glu. В случае дрожжевого фермента практический интерес представляет только замена Phe285Tyr, обеспечивающая увеличение термостабильности. При замене Phe285Ser увеличение каталитической константы в 1,65 раза нивелируется почти двукратным ухудшением К_м по коферменту. В результате каталитическая эффективность не возросла, а концентрация NAD⁺ в системе регенерации NADH должна быть увеличена также в два раза. В случае PseFDH помощью одной аминокислотной замены были получены два мутантных фермента, обладающих более высокой термостабильностью, чем исходный мутант PseFDH SM4. При этом, для фермента, содержащего замену Phe311Tyr, не произошло существенного изменения каталитических свойств. Сравнение влияния замены остатка Phe на свойства формиатдегидрогеназ из бактерий, дрожжей и растений свидетельствуют, что структура фермента играет очень важную роль при введении одних и тех же аминокислотных замен в структурно-эквивалентных положениях в разных формиатдегидрогеназах.

ЛИТЕРАТУРА

- Тишков В.И., Попов В.О. (2004) Механизм действия формиатдегидрогеназы и ее практическое применение, Биохимия, 69, 1537–1554.
- Tishkov, V.I., Popov, V.O. (2006) Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular Engineering*, 23, 89–110.
- Алексеева А.А., Савин С.С., Тишков В.И. (2011) NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа растений. *Acta Naturae*, 3(4), 40–56.
- Савин С.С., Тишков В.И. (2010) Инактивация пероксидом водорода как метод оценки стрессовой стабильности формиатдегидрогеназы *in vivo, Acta Naturae*, 2, 80–84.
- Rojkova, A.M., Galkin, A.G., Kulakova, L.B., Serov, A.E., Savitsky, P.A., Fedorchuk, V.V., Tishkov, V.I. (1999) Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha helices, *FEBS Letters*, 1999, **445**, 183–188.
- Федорчук В.В., Галкин А.Г., Ясный И.Е., Кулакова Л.Б., Рожкова А.М., Филиппова А.А., Тишков В.И. (2002) Влияние взаимодействий между аминокислотными остатками 43 и 61 на термостабильность бактериальных формиатдегидрогеназ, Биохимия, 67, 1385–1393.
- Серов А.Е., Одинцева Е.Р., Упоров И.В., Тишков В.И. (2005) Использование карты Рамачандрана для повышения термостабильности бактериальной формиатдегидрогеназы, Биохимия, 70, 974–979.
- Алексеева А.А., Федорчук В.В., Зарубина С.А., Садыхов Э.Г., Маторин А.Д, Савин С.С., Тишков В.И. (2015) Роль остатка Ala198 в стабильности и коферментной специфичности бактериальных формиатдегидрогеназ, Acta Naturae, 7(1), 64–73.

- Hofstetter, K., Lutz, J., Lang, I., Witholt, B., Schmid, A. (2004) Coupling of biocatalytic asymmetric epoxidation with NADH regeneration in organic–aqueous emulsions, *Angewandte Chemie International Edition*, 43, 2163–2166.
- Maurer, S.C., Kuehnel, K., Kaysser, L.A., Eiben, S., Schmid, R.D., Urlacher, V.B. (2005) Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 347, 1090–1098.
- Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Fedorchuk, V.V., Savitsky, P.A., Rojkova, A.M., Gieren, H., Kula, M.-R. (1999) Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺- and NADP⁺specific formate dehydrogenase, *Biotechnology & Bioengineering*, 64, 187–193.
- Alekseeva, A.A., Serenko, A.A., Kargov, I.S., Savin, S.S., Kleymenov, S.Yu., Tishkov, V.I. (2012) Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations, *Protein Engineering, Design and Selection*, 25, 781–788.
- Kargov, I.S., Kleymenov, S.Y., Savin, S.S., Tishkov, V.I., Alekseeva, A.A. (2015) Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design, *Protein Engineering*, *Design and Selection*, 28, 171–178.
- 14. Felber, S. Optimierung der NAD⁺abhaengigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* fuer den Einsatz in der Biokatalyse. Ph.D. Thesis. Heinrich-Heine University of Duesseldorf. 2001. URL: http:// diss.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/ file?dissid=78.
- Tishkov, V.I., Matorin, A.D., Rojkova, A.M., Fedorchuk, V.V. Savitsky, A.P., Dementieva, L.A., Lamzin, V.S., Mezentzev, A.V., Popov, V.O. (1996) Site-directed mutagenesis

of formate dehydrogenase active centre: role of the His³³²-Gln³¹³ pair in enzyme catalysis, *FEBS Letters*, **390**, 104–108.

- 16. Шабалин И.Г., Поляков К. М., Тишков В.И., Попов В.О. (2009) Пространственная структура НАД⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из бактерий *Moraxella* sp. C-1 при атомном разрешении, *Acta Naturae*, 1(3), 98–102.
- Тишков В.И., Угланова С.В., Федорчук В.В., Савин С.С. (2010) Влияние ионной силы и рН среды на термостабильность дрожжевой формиатдегидрогеназы, *Acta Naturae*, 2(2), 86–92.
- Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Войнова Н.С., Угланова С.В., Петров А.С., Алексеева А.А., Клейменов С.Ю., Попов В.О., Тишков В.И. (2006) Сравнительное исследование термостабильности формиатдегидрогеназ из микроорганизмов и растений, Прикладная биохимия и микробиология, 42, 269–273.
- Тишков В.И., Егоров А.М., Попов В.О. (1983) Бактериальная формиатдегидрогеназа. Субстратная специфичность и кинетический механизм окисления S-формилглутатиона, Биохимия, 48, 1172–1180.
- Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Egorov, A.M. (1989) Kinetic isotope effect and pre-steady state kinetics of the reaction catalyzed by bacterial formate dehydrogenase, *Biochimie*, 71, 551–557.
- 21. Закс А.М., Авилова Т.В., Егорова О.А., Попов В.О., Егоров А.М. (1982) Кинетический механизм действия NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных дрожжей *Candida methylica*, *Биохимия*, **47**, 546–551.

- Hermes, J.D., Morrical, S.W., O'Leary, M.H., Cleland, W.W. (1984) Variation of transition-state structure as a function of the nucleotide in reactions catalyzed by dehydrogenases. 2. Formate dehydrogenase, *Biochemistry*, 23, 5479–5488.
- Тишков В.И., Галкин А.Г., Егоров А.М. (1989) NAD-зависимая формиатдегидрогеназа метилотрофных дрожжей: выделение и физико-химические свойства, Биохимия, 54, 299–305.
- Мезенцев А.В., Устинникова Т.Б., Тихонова Т.В., Попов В.О. (1996). Выделение и кинетический механизм действия НАД-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных дрожжей Hansenula polymorpha, Прикладная биохимия и микробиология, 32, 589–595.
- 25. Серов А.Е., Тишков В.И. (2006) Формиатдегидрогеназа пекарских дрожжей: необычный механизм термоинактивации и стабилизация ионной силой и кофактором, Вестник Московского Университета. Серия 2 Химия, 47, 79–82.
- Алексеева А.А., Савин С.С., Клейменов С.Ю., Упоров И.В., Пометун Е.В., Тишков В.И. (2012) Стабилизация рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max* методом рационального дизайна, *Биохимия*, 77, 1443–1456.
- Алексеева А.А., Каргов И.С., Клейменов С.Ю., Савин С.С. Тишков В.И. 2015) Аддитивность стабилизирующего эффекта единичных аминокислотных замен в тройных мутантах рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max, Acta Naturae*, 7(3), 113–123.