

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

На правах рукописи



ЮРЧЕНКО Татьяна Сергеевна

**РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН
ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *Staphylococcus aureus***

1.5.4. Биохимия
1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

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

Москва

2024

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Патогенные бактерии <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.1.1. Эпидемиология представителей рода <i>Staphylococcus</i>	13
1.1.2. Борьба с биопленками	14
1.2. NAD(P) ⁺ -зависимая формиатдегидрогеназа	15
1.2.1. Общие сведения о формиатдегидрогеназе	15
1.2.2. Физиологическая роль и применение формиатдегидрогеназ.....	16
1.2.3. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ	20
1.2.4. Трехмерная структура и механизм действия	32
1.3. Свойства формиатдегидрогеназ из различных источников	38
1.3.1. Каталитические параметры формиатдегидрогеназ	38
1.3.2. Термостабильность	39
1.3.3. Влияние реакционной среды на каталитические свойства формиатдегидрогеназ .	39
1.4. Белковая инженерия формиатдегидрогеназ.....	42
1.4.1. Увеличение термо- и химической стабильности.....	42
1.4.2. Изменение каталитических свойств и коферментной специфичности	47
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1. Материалы	51
2.2. Методы исследования	53
2.2.1. Поиск последовательностей в базах данных	53
2.2.2. Компьютерное моделирование трехмерных структур.....	53
2.2.3. Направленный мутагенез	53
2.2.4. ДНК-электрофорез в агарозном геле	54
2.2.5. Рестрикция фрагментов ДНК	55
2.2.6. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	55
2.2.7. Лигирование	55
2.2.8. Трансформация клеток <i>E. coli</i> и клонирование	56
2.2.9. Выделение плазмидной ДНК.....	56
2.2.10. Секвенирование ДНК.....	56

2.2.11. Экспрессия мутантных форм SauФДГ в клетках <i>E. coli</i>	57
2.2.12. Трансформация клеток <i>E. coli</i> BL21 (DE3)CodonPlus/pLysS для получения штамма-продуцента	57
2.2.13. Культивирование клеток <i>E. coli</i> и создание музейной культуры	57
2.2.14. Выделение и очистка SauФДГ	58
2.2.15. Хроматографическая очистка фермента	59
2.2.16. Диализ	60
2.2.17. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях	60
2.2.18. Определение активности ФДГ	61
2.2.19. Определение констант Михаэлиса	61
2.2.20. Определение концентрации белка по методу Бредфорда и определение каталитической константы	61
2.2.21. Определение констант скорости термоинактивации	62
2.2.22. Определение активационных параметров термоинактивации формиатдегидрогеназы	63
2.2.23. Измерение ЯМР спектров	63
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	64
3.1. Изучение влияния N-концевой последовательности на уровень экспрессии и свойства рекомбинантной SauФДГ	64
3.2. Исследование влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ	72
3.2.1. Определение каталитических параметров	73
3.3. Белковая инженерия формиатдегидрогеназы из <i>S. aureus</i>	76
3.3.1. Влияние консервативного мотива X ₁ G(A)X ₂ GRX ₃ G на свойства фермента	76
3.3.2. Изучение X ₁ DX ₂ , ответственного за коферментную специфичность	84
3.3.3. Изучение структуры активного центра методом направленного мутагенеза	89
3.3.4. Белковая инженерия C-концевой последовательности формиатдегидрогеназ	95
3.4. Исследование SauФДГ методом ЯМР	104
3.4.1. Оптимизация условий экспрессии SauФДГ	106
3.4.2. Получение изотопно-меченых образцов SauФДГ	109
3.4.3. Пробоподготовка образцов и измерение ЯМР спектров	111
3.4.4. Исследование структуры SauФДГ методом ЯМР	112
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116
----------------------------	-----

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФДГ	– формиатдегидрогеназа
SauФДГ	– формиатдегидрогеназа из бактерий <i>Staphylococcus aureus</i>
SoyФДГ	– формиатдегидрогеназа из сои <i>Glycine max</i>
SceФДГ	– формиатдегидрогеназа из дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AthФДГ	– формиатдегидрогеназа из растения <i>Arabidopsis thaliana</i>
PseФДГ	– формиатдегидрогеназа из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101
BstФДГ	– формиатдегидрогеназа из бактерий <i>Burkholderia stabilis</i>
NAD ⁺	– никотинамидадениндинуклеотид, окисленный
NADH	– никотинамидадениндинуклеотид, восстановленный
NADP ⁺	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленный
NADPH	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленный
NaPB	– натрий-фосфатный буфер
Cit	– лимонная кислота
Tris(Трис)	– трис(гидроксиметил)аминометан
Gly	– глицин
dNTP	– дезоксирибонуклеотид трифосфат
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РСА	– рентгеноструктурный анализ
ТАК	– теория активированного комплекса
ТЕМЕД	– тетраметилэтилендиамин
ЭДТА	– этилендиаминотетраацетат
AS	– сульфат аммония
БСА	– бычий сывороточный альбумин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. NAD(P)⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2) катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD(P)⁺ до NAD(P)H. Гены формиатдегидрогеназы обнаружены в организмах представителей царств бактерий, грибов и растений [1]. Это говорит о том, что данный фермент появился на ранних этапах эволюционного развития живых организмов и играет значимую физиологическую роль в их жизнедеятельности. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды показан рост количества мРНК и активности ФДГ у растений, бактерий, в частности – в биопленках *Staphylococcus aureus*[2]. Помимо этого, наблюдается рост экспрессии генов ферментов, ответственных за наработку формиата (пируватформиат-лиаза). Таким образом, клетки *S. aureus* в биопленках получают энергию преимущественно по формиатному пути.

S. aureus – это анаэробные грам-положительные бактерии из семейства *Staphylococcae*. Данный патоген является возбудителем заболеваний, протекающих с различной степенью тяжести: как опасные для жизни, так и протекающие бессимптомно. Сложность борьбы обусловлена широким спектром факторов вирулентности и быстро распространяющейся устойчивости к новым антибактериальным препаратам. Так как формиатдегидрогеназа – один из ключевых ферментов метаболизма *S. aureus* в состоянии биопленок, его можно рассматривать в качестве перспективной мишени для подбора конкурентных ингибиторов.

На данный момент применение формиатдегидрогеназы в качестве катализатора регенерации никотинамидных кофакторов NAD(P)H в ферментативных системах стало традиционным [3-6].

Согласно требованиям FDA (Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов), для успешного выхода на фармацевтический рынок оптическая чистота лекарственного препарата должна составлять не менее 99%. Разделение смесей энантиомеров, присутствующих в лекарственной форме при стандартных химических способах органического синтеза, является трудоемким процессом. Использование ферментативной стадии в органическом синтезе оптически активных соединений помогает решить проблему получения энантиомерно чистого вещества. Большой

интерес для технических процессов представляют NAD(P)^+ -зависимые оксидоредуктазы. Однако из-за высокой стоимости никотинамидных кофакторов их стехиометрическое использование экономически нецелесообразно. Вследствие этого, требуется эффективная регенерация кофакторов *in situ*. Наиболее перспективными стратегиями являются ферментативные способы регенерации никотинамидных кофакторов, так как их отличает высокая селективность и скорость реакции. Формиатдегидрогеназа выгодно выделяется среди других дегидрогеназ, так как основным субстратом является коммерчески доступный формиат, а продуктом реакции – диоксид углерода, не требующий дополнительных стадий очистки. Это существенно упрощает технологические процессы и позволяет избежать избыточных потерь целевого соединения.

Ген, кодирующий формиатдегидрогеназу из бактерий *S. aureus* (SauФДГ), был клонирован в нашей лаборатории несколько лет назад. SauФДГ имеет уникальную аминокислотную последовательность по сравнению с другими ФДГ. Ранее было показано, что SauФДГ имеет самую высокую k_{cat} среди описанных формиатдегидрогеназ, однако значения $K_M^{\text{NAD}^+}$, $K_M^{\text{HCOO}^-}$ также высоки [5]. Данный фермент обладает одной из самых высоких показателей термостабильности, по сравнению с ФДГ из других источников, исследованных на данный момент и сравнима по этому параметру только с ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.* 101. Также для этого фермента проведена кристаллизация и решена трехмерная структура (PDB: 6ТТВ) (PDB DOI: 10.2210/pdb6ТТВ/pdb) [6].

Таким образом, изучение формиатдегидрогеназ с уникальной последовательностью имеет, как практический интерес, так как среди данных ферментов могут быть обнаружены перспективные востребованные на данный момент биокатализаторы и охарактеризованы условия их работы, так и научный – исследование взаимосвязи структура-функция методом рационального дизайна и выявление перспективных стратегий направленного мутагенеза.

Степень разработанности темы. ФДГ – достаточно подробно изученный фермент: ежегодно выпускаются новые публикации с 90-х годов XX века, для некоторых ферментов решены структуры методом рентген-структурного анализа. В течение последних трех лет описаны не изученные ранее формиатдегидрогеназы из новых источников.

Работы посвящены исследованию NAD^+ -зависимых формиатдегидрогеназ из различных источников методом рационального дизайна. Большая часть этих данных была получена сотрудниками нашей лаборатории. За это время были определены каталитически значимые высококонсервативные последовательности в первичной структуре формиатдегидрогеназы, описаны успешные эксперименты по увеличению температурной стабильности и изменению коферментной специфичности. Однако в научной литературе представлено ограниченное количество свидетельств успешного увеличения каталитической эффективности формиатдегидрогеназы посредством снижения констант Михаэлиса методом рационального дизайна.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является изучение взаимосвязи структура-функция рекомбинантной формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий *S. aureus*.

Задачи:

- 1) Исследование влияния N-концевой последовательности на уровень экспрессии и каталитические свойства SauФДГ при использовании клеток *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/pLysS в качестве штамма-продуцента;
- 2) Исследование влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ;
- 3) Белковая инженерия рекомбинантной SauФДГ с целью снижения констант Михаэлиса по NAD^+ методом сайт-направленного мутагенеза;
- 4) Получение высоко изотопно-меченных ^2H , ^{15}N , ^{13}C образцов SauФДГ для поиска сайтов связывания потенциальных ингибиторов ФДГ методом ЯМР.

Объекты и методы исследования. Направленный мутагенез с введением точечной замены в ген формиатдегидрогеназы из бактерий *S. aureus* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции. Рекомбинантные белки нарабатывали в *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/pLysS. Очистку проводили с использованием дробной преципитации сульфатом аммония, гидрофобной хроматографии с последующим обессоливанием по принципу гель-фильтрации. Эффективность очистки определяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Идентификацию аминокислотной последовательности проводили с помощью тандемной MALDI TOF/TOF спектрометрии (ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН). Значения констант Михаэлиса и каталитические константы определяли

спектрофотометрически по поглощению накапливаемого NADH и NADPH. Значения константы скорости термоинактивации определяли как тангенс угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени инкубации методом линейной регрессии. Активационные параметры ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger определяли графическим методом из температурной зависимости константы скорости термоинактивации $\ln(k_{in}/T) - 1/T$, на основании уравнения теории активированного комплекса. Моделирование структур мутантных форм и фермента дикого типа проводили при помощи онлайн-сервера AlphaFold2, ColabFold.

Научная новизна. Изучено влияние N-концевой аминокислотной последовательности на уровень экспрессии и свойства SauФДГ. Впервые получена форма белка SauФДГ, содержащая полную аминокислотную последовательность. В рамках данного исследования была разработана комбинированная буферная система, приводящая к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ и увеличению каталитической константы SauФДГ. Выделено и охарактеризовано 25 новых мутантных форм формиатдегидрогеназы из *S. aureus* с использованием рационального дизайна, включающие замены в 17 каталитически значимых положениях. Показаны изменения в каталитических свойствах после введения выбранных замен, что подтверждает значимость данных положений для катализа. Для двух мутантных форм показано снижение константы Михаэлиса по NAD^+ вследствие введения меньших по объему боковых заместителей. Проведен дизайн C-концевой области SauФДГ и показано ее критическое значение в катализе.

Теоретическая и практическая значимость работы. На примере рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *S. aureus* была продемонстрирована значимость пост-трансляционной модификации отщеплением части N-концевой аминокислотной последовательности. Было показано, что только укороченная форма белка проявляет специфическую активность. Данный факт может быть полезен при исследовании дегидрогеназ из семейства стафилококковые.

Данные, полученные при изучении влияния структура-функция формиатдегидрогеназы из *S. aureus*, являются вкладом в систематическое исследование формиатдегидрогеназ из различных источников. На примере данного фермента были подтверждены или опровергнуты успешно используемые ранее

приемы рационального дизайна. А также, проведена апробация новых стратегических подходов.

Разработанная буферная система может быть использована как при исследовании зависимости каталитических свойств ферментов от pH, так и на практике: поставляться совместно с коммерческими системами ферментативной регенерации никотинамидных кофакторов. Мутантные формы с улучшенными каталитическими свойствами могут быть использованы в качестве компонента ферментативных систем с регенерацией NADH.

Полученные в ходе работы высоко изотопно-меченые образцы формиатдегидрогеназы из *S. aureus* могут быть использованы для поиска перспективных ингибиторов SauФДГ как потенциальной мишени для борьбы с данным патогеном.

Методология и методы исследования. В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: биоинформатика (конструирование праймеров), методы генетической инженерии (полимеразная цепная реакция, рестрикция, лигирование), микробиологические методы и методы молекулярной биологии (молекулярное клонирование, технология получения рекомбинантных белков в системе экспрессии *E. coli*), хроматографические методы (гидрофобная хроматография, гель-фильтрация), аналитические методы изучения физико-химических свойств ферментов (спектрофотометрия, MALDI/TOF/TOF).

Вклад автора в проведенное исследование. Все научные результаты, изложенные в диссертации, получены при личном участии Юрченко Татьяны Сергеевны под руководством д.х.н. Пометун Анастасии Александровны и проф., д.х.н. Тишкова Владимира Ивановича. Автор самостоятельно изучил актуальные литературные данные и на их основании составил обзор литературы. Соискатель с согласованием у руководителей определил цели и задачи исследования, самостоятельно составил план работ, принимал активное участие в проведении исследований и анализе полученных результатов. Автором была проведена значительная работа над текстом опубликованных статей.

Положения, выносимые на защиту.

1. В результате экспрессии как полноразмерного гена *Saufdh1*, так и укороченного *Saufdh2* конечный каталитически активный продукт имеет одну и ту

же аминокислотную последовательность. Это связано с протеолизом по остатку метионина в 34 положении в процессе пост-трансляционной модификации.

2. Использование четырехкомпонентного буферного раствора 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly приводит к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ в 1,5 раза по сравнению с со значением $K_M^{\text{NAD}^+}$ в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе за счет синергетического влияния органических компонентов, а также приводит к увеличению термостабильности.

3. Замена V119A приводит к снижению $K_M^{\text{NAD}^+}$ и $K_M^{\text{HCOO}^-}$ в 2,5 и 1,6 раз соответственно по сравнению с ферментом дикого типа. Введение замены F194V привело к снижению констант Михаэлиса по NAD^+ и формиату в 4 и 2 раза соответственно при незначительном снижении k_{cat} . С-концевой участок первичной последовательности играет ключевую роль в катализе SauФДГ.

4. Разработанная методика позволяет получить образцы SauФДГ, содержащие изотопные метки ^2H , ^{13}C , ^{15}N с высоким выходом по экспрессии. Содержание меток достаточно для дальнейших исследований и максимально возможно в условиях научно-исследовательской лаборатории.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов, полученных в ходе данной работы, подтверждается воспроизводимостью произведенных измерений и согласованностью результатов, полученных с использованием комбинации различных методов, адекватных поставленным задачам. Основные результаты работы были представлены на международных конгрессах и конференциях: XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021" (Москва, Россия, 2021), III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и Пептиды» VII съезд физиологов СНГ (Дагомыс, Россия, 2021), XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2020" (Москва, Россия, 2020), Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019) (Судак, Крым, Россия, 2019), The 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019), XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019» (Москва,

Россия, IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives» (Москва, Россия, 2017), VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2015).

Публикации. По материалам работы опубликовано 5 статей в международных журналах (индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus) и 11 тезисов докладов международных и всероссийских конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из шести глав: общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Материал работы изложен на 128 страницах, содержит 27 таблиц, 41 рисунок и 120 ссылок.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патогенные бактерии *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus – это анаэробные грамположительные бактерии из семейства *Staphylococcae*. Данный патоген является возбудителем заболеваний, протекающих с различной степенью тяжести: инфекции кожи или дыхательных путей с умеренными проявлениями, а также такие опасные для жизни заболевания как некротизирующий фасциит или некротизирующая пневмония [7]. Помимо этого заболевания могут протекать бессимптомно [8].

Сложность борьбы с данным патогеном обусловлена тем, что клетки *S. aureus* выделяют широкий спектр факторов вирулентности, разнообразных по природе: секретлируемые токсины, экзоферменты, кофакторы, активирующие зимогены клеток хозяина [9]. Также проблемой является появляющаяся устойчивость к новым антибактериальным препаратам. Все это объясняет увеличение количества исследований, направленных на борьбу с данным патогеном за последнее десятилетие.

1.1.1. Эпидемиология представителей рода *Staphylococcus*

Первым антибиотиком, применяющимся при лечении инфекций, вызванных *S. aureus* был пенициллин. Однако в 1942 г. был обнаружен устойчивый к пенициллину штамм *S. aureus* [10,11]. Устойчивость к пенициллину возникла в следствие мутаций гена *blaZ*, кодирующего фермент бета-лактамазу. Данный фермент инактивирует пенициллин путем гидролиза бета-лактамного кольца [12]. Ген *blaZ* является частью мобильного элемента, который может быть интегрирован в хромосому, что объясняет достаточно быстрое распространение гена устойчивости к пенициллину: менее чем через два десятилетия, около 80% всех штаммов приобрели резистентность к пенициллину.

Затем были разработаны полусинтетические аналоги пеницилина – устойчивые к действию пенициллиназы бета-лактамы, такие как метициллин в 1961 г, а затем оксациллин. Позже в Великобритании были идентифицированы первые клинические изоляты метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* (MRSA) [13,14]. В отличие от резистентности к пенициллину, механизм, лежащий в основе резистентности к метициллину, защищает бактерии от всего класса бета-лактамов

антибиотиков, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы [7]. Появление новых линий MRSA получило широкое распространение. Долгое время инфекции MRSA ограничивались госпитализированными пациентами (HA-MRSA), однако с середины-конца 1990-х годов, появились внебольничные штаммы MRSA (CA-MRSA), поражающие здоровых людей.

1.1.2. Борьба с биопленками

Исследования, направленные против биопленок *S. aureus*, представляют особый интерес, поскольку биопленки микроорганизмов проявляют повышенную устойчивость к антимикробным препаратам и неблагоприятным условиям внешней среды по сравнению с клетками в основном состоянии. В работе [15] было показано антибактериальное действие ингибиторов дигидрофолатредуктазы. Антифолаты, препараты антибактериального действия, нарушают процесс деления клеток, синтез и репарацию ДНК и РНК, синтез белка [16]. Одним из актуальных на данный момент подходов к борьбе с биопленками *S. aureus* является ингибирование уровня транскрипции гена альфа-гемолизина *hla*. Ученые обнаружили антибактериальную активность в присутствии гиспидулина. Данный препарат не влияет на кривую роста и, таким образом, не останавливает рост патогенных бактерий, воздействуя лишь на факторы вирулентности [17]. И, поскольку, вещества, оказывающие какое-либо влияние на рост клеток, могут вызывать в них процессы, направленные на выработку устойчивости, препарат гиспидулин может не приводить к появлению резистентности. Также в работе [18] авторы разработали технику литья нанокompозитов на основе наночастиц комплекса хитозана и дисульфида вольфрама, которые показали антибактериальную активность в отношении *S. aureus*.

Организм человека обладает некоторой защитой, так нейтрофилы крови человека проявляют фагоцитарную активность. Однако у людей со сниженным количеством нейтрофилов вследствие прохождения химиотерапии при лечении онкологии наблюдается более выраженная восприимчивость к данному патогену [19]. Согласно статистическим данным около 30% мирового населения являются носителями данного штамма, никак не проявляющего себя симптоматически [9]. В работе [20] были показаны случаи обнаружения метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* в грудном молоке в 2 из 8 здоровых пар мать-ребенок. Для организма

новорожденного ребенка, особенно в случае рождения раньше положенного срока, данный патоген может вызвать развитие сепсиса, некроза тканей, поражение кожи и менингита. Важным пунктом для борьбы с биопленками является также предотвращение заражения пациентов от лечащего персонала, защита от внутрибольничных инфекций, а также включает раннюю колонизацию новорожденных полезной микрофлорой матери [21].

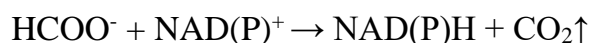
Примечательно, что галофильная молочнокислая бактерия *Tetragenococcus halophilus*, играющая важную роль в производстве ферментированных пищевых продуктов с высоким содержанием соли в состоянии биопленок способна оказывать подавляющее воздействие на рост биопленок патогена *S. aureus*. На данный момент механизм антибактериальной активности однозначно не выяснен, предполагается, что биопленки *T. halophilus* выделяют antimicrobные соединения, или повышают кислотность среды. Таким образом, *T. halophilus* может быть использован как потенциальный пребиотик в пищевых продуктах, а также для сдерживания роста патогенов [22].

Таким образом, борьба с данным патогеном включает в себя многоуровневый системный подход. Поиск новых перспективных средств для борьбы с биопленками *S. aureus* на данный момент остается открытым.

1.2. NAD(P)⁺-зависимая формиатдегидрогеназа

1.2.1. Общие сведения о формиатдегидрогеназе

Исследования структур ФДГ из различных источников выявили различия, на основе которых выделили две большие группы ФДГ. К первому типу относятся NAD(P)⁺-зависимые формиатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2, ФДГ), принадлежащие к группе ферментов из класса оксидоредуктаз, катализирующих перенос протонов от субстрата (органических веществ) и пары электронов — к акцептору и катализирующие окисление формиат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD(P)⁺ до NAD(P)H [1,23]:



Для отдельных представителей формиатдегидрогеназ может быть показана большая специфичность к NAD⁺ или NADP⁺. Данный фермент состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит свой активный центр, не содержит ионов металлов и других небелковых компонентов. Общая масса ФДГ

варьируется в диапазоне от 70 до 90 кДа в зависимости от источника фермента, каждая из субъединиц в среднем состоит из 300 – 400 аминокислотных остатков. Помимо NAD(P)⁺-зависимых ФДГ в природе существуют металл-зависимые формиатдегидрогеназы, наиболее распространенные в анаэробных прокариотах. Их отличает гетероолигомерный состав, сложная четвертичная структура, включающая, например, железосерные кластеры, катионы металлов [24] и высокая молекулярная масса. Металл-зависимые ФДГ имеют структурно схожие альфа-субъединицы, которые составляют основу филогенетического дерева. Обычно альфа-субъединицы имеют размер от 80 до 95 кДа и содержат катион металла, например, вольфрама или молибдена в активном центре. Дополнительные субъединицы обозначаются как «бета-субъединица» (20 – 35 кДа) и «гамма-субъединица» (12 – 18 кДа) соответственно [25]. В связи с содержанием в активном центре катионов металлов, формиатдегидрогеназы этой группы чувствительны к кислороду.

1.2.2. Физиологическая роль и применение формиатдегидрогеназ

1.2.2.1. Физиологическая роль

Формиатдегидрогеназа широко распространена в различных организмах: бактериях, дрожжах, грибах и растениях как высших, так и низших [1, 26 – 28]. Впервые ген ФДГ был клонирован и выделен из бактерий *Methanobacterium formicicum* [27] в 1986 году, позднее в 1990 году. был клонирован ген ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [29]. На данный момент в литературе не упоминается клонирование генов формиатдегидрогеназ у позвоночных и насекомых. У организмов, в геноме которых обнаружен ген формиатдегидрогеназы, при воздействии неблагоприятных условий среды наблюдалось резкое увеличение содержания мРНК, кодирующей формиатдегидрогеназу. В качестве примера можно привести увеличение содержания мРНК в 20 раз для бактерий *S. aureus* при переходе в состояние биопленок [2]. Этот же эффект был показан для растений, дрожжей и микроскопических грибов [30, 31]. Формиатдегидрогеназа не единственный представитель семейства дегидрогеназ, содержание которых в клетках резко возрастает при определенных условиях. В работе [17] авторы упоминают о выделении LDH поврежденными клетками базального эпителия ольвеол человека, которую используют в качестве маркера патогенной активности бактерий. Данные

факты говорят о том, что формиаатдегидрогеназа является важным компонентом метаболизма организмов, в которых она присутствует.

В метилотрофных микроорганизмах ФДГ катализирует конечную стадию катаболизма C1-соединений до диоксида углерода [30]. Метилотрофные дрожжи используют только дегидрогеназный путь метаболизма, при этом содержание ФДГ в клетках контролируется количеством нуклеотидов [32, 33]. Помимо этого, уровень ФДГ в клетках метилотрофных дрожжей определяется источником углерода в питательной среде. При использовании в качестве основного источника углерода метанол содержание ферментов окисления цепи метанол-формальдегид-формиат достигает максимума. В этом случае окисление метанол-формальдегид катализируется FAD-зависимой метанолоксидазой, локализованной в пероксисомах, а окисление формальдегида (в виде S- формиглутатиона) и формиата катализируют формальдегиддегидрогеназа и ФДГ соответственно. Поскольку промотор, отвечающий за синтез мРНК метанолоксидазы является очень сильным, такие метилотрофные дрожжи как *Ogataea parapolymorpha* и *Pichia pastoris* используются для наработки рекомбинантных белков при использовании метанола в качестве источника углерода. При росте в среде, обогащенной глюкозой или другим источником углерода данный цикл в метилотрофных дрожжах не активируется.

В случае формиаатдегидрогеназ из растений обнаруживается резкое увеличение синтеза ФДГ при различных неблагоприятных воздействиях окружающей среды таких как, например, резкое изменение температуры, низкая влажность, недостаток атмосферного кислорода и воздействие патогенных организмов или вирусов [34 – 36]. Это связано с основной функцией формиаатдегидрогеназы в таких условиях – снабжение клетки восстановленным NADH, который поставляет энергию для ликвидации последствий стресса (например, для синтеза АТФ при работе белков теплового шока). В работе [34,35] было показано, что при намеренном снижении уровня экспрессии ФДГ в клетках растений при воздействии стрессовых условий среды наблюдалось накопление формиата.

Важная физиологическая роль ФДГ может быть использована в качестве альтернативного способа борьбы с *S. aureus*. Потенциальными средствами борьбы с данным патогеном могут выступать ингибиторы ФДГ.

1.2.2.2. Применение формиатдегидрогеназ

Регенерация никотинамидных кофакторов

Согласно требованиям FDA (Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов), оптическая чистота лекарственного препарата должна составлять не менее 99%. Разделение смесей энантиомеров является трудоемким процессом. Проблему получения энантиомерно-чистого вещества помогает решить использование ферментативной стадии в органическом синтезе оптически-активных соединений. Большой интерес для технических процессов представляют NAD(P)⁺-зависимые оксидоредуктазы. Из-за высокой стоимости никотинамидных кофакторов их стехиометрическое использование нецелесообразно с экономической точки зрения. Вследствие этого требуется эффективная регенерация кофакторов *in situ* [1, 6].

Ферментативные способы регенерации никотинамидных кофакторов являются наиболее изученными и наиболее удобными стратегиями. Они проявляют высокую селективность в отношении образования активной формы кофактора [36]. Формиатдегидрогеназа выгодно выделяется среди других дегидрогеназ поскольку основным субстратом для ферментативных систем с участием ФДГ выступает недорогой и доступный формиат, а также продуктом реакции является углекислый газ, что позволяет не применять дополнительные стадии очистки для восстановленной формы кофермента [37]. ФДГ из *C. boidinii* имеет множество практических приложений. Впервые в 1980 году были опубликованы данные о применении ФДГ из *C. boidinii* в сочетании этого фермента с NADH-зависимой D-лактатдегидрогеназой для получения D-лактата из пирувата [38]. Помимо этого, ФДГ из *C. boidinii* используется для получения хиральных гидрофобных спиртов в сочетании с NAD⁺-зависимой алкогольдегидрогеназой (АДГ) из *Rhodococcus erythropolis* [39]. Упомянутые в данных работах многокомпонентные системы регенерации кофакторов подразумевают использование ферментов в виде смеси. Помимо этого, возможно проведение реакции регенерации внутри клеток-продуцентов с ко-экспрессированными ферментами [40, 41]. Для повышения степени конверсии целевого продукта более инновационным решением являются фьюжн-белки, о которых более подробно указано в п.1.4.2.

Помимо формиатдегидрогеназы для регенерации кофактора используются глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [42] и глюкозодегидрогеназа [43], способные восстанавливать как NAD^+ , так и NADP^+ , а также алкогольдегидрогеназа (АДГ). АДГ из печени лошади, является NAD^+ -зависимой [44], тогда как АДГ из штаммов *Lactobacillus* NADP^+ -зависима.

Другие способы использования формиатдегидрогеназы

Помимо традиционного использования формиатдегидрогеназ в качестве компонентов ферментативных для регенерации никотинамидных кофакторов, данный фермент можно использовать для получения спиртов из сложных эфиров муравьиной кислоты [45]. В данной работе использовалась ФДГ из *Candida boidinii* в реакциях с гомологичными алкилформиатами. Субстраты необратимо превращались в диоксид углерода и соответствующий спирт в течение 3 – 5 часов.

В работе [46] продемонстрировано возможное взаимодействие формиатдегидрогеназы из *Candida boidinii* с глицерином в качестве субстрата с помощью молекулярного докинна. В следствие чего совместно с NH_2 -ТЕМРО в качестве данный фермент использовался в ферментативной системе для окисления глицерина до диоксида углерода.

Помимо тонкого органического синтеза ФДГ используется в биоаналитических системах. Например, как одним из компонентов биосенсора для количественного определения цианидов [47]. Помимо этого, на основе формиатдегидрогеназы разработана система для обнаружения NADH [48, 49].

В клинической диагностике в связи со сложностью анализируемых образцов (биологические жидкости, биоптаты различных тканей) необходимы высокоспецифичные мультиплексные системы, когда одновременно можно анализировать большое количество образцов на различные показатели. Дегидрогеназы находят применение в флуориметрическом определении NAD^+ экстрактах ткани головного мозга крыс. В работе [50] упоминается об использовании формиатдегидрогеназ из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 для проведения данного анализа.

В работе [51] используется рекомбинантная формиатдегидрогеназа для анализа содержания NAD^+ в крови пациентов с сердечной или неврологической патологией и контрольной группы. Показано снижение содержания этого

метаболита в крови у пациентов с болезнями данных групп. Соответственно, рекомбинантные формиатдегидрогеназы могут быть использованы в клинической диагностике.

1.2.3. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ

Сведения об аминокислотных последовательностях ФДГ более чем из 200 видов содержатся в специальных базах данных, таких как GenBank (GB), EMBL, UniProt, KEGG. В таблице 1.2.3.1. представлены коды доступа к последовательностям ФДГ из бактерий, дрожжей, растений, в таблице 1.2.3.2. – детально для отдельных представителей семейства стафилококков. На рисунке 1.2.3.1. представлено выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из бактерий, дрожжей и растений. Аминокислотные остатки различной природы обозначены отдельными цветами. ФДГ – это высококонсервативный фермент, процент идентичности последовательностей внутри одного царства организмов достигает 80%, в то же время, при сравнении аминокислотных последовательностей из разных групп организмов этот показатель в среднем составляет не менее 50%. Наибольшую гомологию проявляют ФДГ из растений (с минимальным значением идентичности 76%), более низкий уровень гомологии (примерно 50%) встречается у ФДГ из одноклеточных эукариот. Не менее 37% составляет степень идентичности у формиатдегидрогеназ из бактерий. Внутри семейства *Staphylococcae* идентичность составила не менее 75%. Бактериальные формиатдегидрогеназы в отличие от ферментов из грибов и растений не имеют на N-конце сигнальных пептидов. Исключение составляют ФДГ из двух представителей семейства стафилококковых *Staphylococcus saprophyticus* и *Staphylococcus aureus_1*. Для отдельных представителей семейства стафилококковых были показаны укороченные N-концевые последовательности – *Staphylococcus haemolyticus* (WP_053018624.1), *Staphylococcus nepalensis* (WP_242693647.1) и *Staphylococcus carnosus* (WP_103211933.1). Также можно отметить, что для бактериальных ФДГ кроме ферментов из стафилококковых N-конец обогащен остатками пролина, обеспечивающих низкую подвижность неструктурированных элементов (петель). Вследствие этого предположительное значение данного участка аминокислотной последовательности заключается в

фиксации конформации молекулы белка, участие в формировании каталитического домена и повышение термостабильности. Это согласуется с в среднем более высокой термостабильностью бактериальных формиаатдегидрогеназ (см. п.1.3.2). На рисунке 1.2.3.2. представлено филогенетическое древо, в котором показано, что представители рода *Staphylococcus* образуют отдельную ветвь. Детальный анализ выравнивания аминокислотных последовательностей выявил ряд особенностей в последовательности ФДГ из стафилококков:

- В базе данных аннотировано две формы гена ФДГ из *S. aureus* длинная (Sau $fdh1$), и укороченная (Sau $fdh2$).

- в случае каталитически значимого аминокислотного остатка в 119 положении (см. п.1.2.4.) в *Staphylococcus aureus* (WP_001557559.1) располагается остаток изолейцина. Данный остаток характерен в основном для ФДГ из растений, также редко встречается среди дрожжей и бактерий.

- В области высококонсервативного мотива G(A)X₁GX₂X₃G присутствуют объемные остатки фенилаланина, тогда как в случае всех остальных ферментов, в данных положениях встречаются остатки валина/изолейцина для 194 положения и остатки аланина/валина/лейцина/тирозина и цитозина для 196 положения (нумерация для SauФДГ).

- Высококонсервативный остаток D221 для PseФДГ (UniProt: P33160) является интересным с точки зрения варибельности аминокислотных остатков, поскольку данный остаток отвечает за коферментную специфичность. Как известно, большинство формиаатдегидрогеназ имеют специфичность к NAD⁺. Однако, описаны NADP⁺-зависимые ферменты. Так, для формиаатдегидрогеназ из *Burkholderia cen^oCepacia* (ACF35003.1), *Burkholderia stabilis* (ACF35003.1), *Burkholderia pyr^roCinia* (ACF35004.1) *Burkholderia multivorans* (ACF35001.1) в данном положении располагается остаток глутамина. Интересным является и то, что среди представителей рода *Staphylococcus* встречаются ферменты с остатком аргинина вместо остатка аспарагиновой кислоты. Среди отдельных представителей рода *Staphylococcus* можно назвать *Staphylococcus piscifermentans* (WP_095104484.1), *Staphylococcus debuckii* (WP_123145037.1), *Staphylococcus simulans* (WP_119565931.1), *Staphylococcus equorum* (WP_065367331.1), *Staphylococcus carnosus* (WP_103211933.1), *Staphylococcus piscifermentans*

(WP_095103265.1). Помимо этого, к данной группе относятся *Staphylococcus sp.* HMSC061G12 (WP_070864364.1), *Staphylococcus sp.* HMSC057C08 (WP_070684380.1), *Staphylococcus sp.* KY49P (MRF34227.1). Таким образом, можно предполагать, что среди формиаатдегидрогеназ из данных организмов, некоторые могут обладать NADP⁺- специфичностью.

- В области консервативного мотива XPQP у *Pseudomonas sp.*101 в качестве примера, находится остаток Q313, он образует связь с H332 и играет важную роль в катализе. Перед данным мотивом с равной степенью частоты встречаются остатки Phe, Tyr, реже в ФДГ из растений обнаруживаются остатки Asn и Asp. Для всех представителей семейства *Staphylococcae* остаток Tyr встречается со 100% частотой. Также для *Staphylococcus sp.* HMSC057C08 (WP_070684380.1) вместо остатка Gln присутствует остаток His.

- Согласно выравниванию аминокислотных последовательностей из различных источников (Рис. 1.2.3.1.), ФДГ из бактерий имеют удлиненную область на С-конце. Однако, для представителей семейства *Staphylococcae* характерна более короткая С-концевая последовательность, как и для ФДГ из эукартиотических источников: дрожжей и растений. В данной области присутствуют каталитически значимые остатки H380, S381, Y382 (PseФДГ), которые вовлечены в связывание кофермента NAD⁺ и формирование активного центра в закрытой конформации. В данной области для бактериальных ФДГ как правило присутствует остаток His, однако для NADP⁺- зависимых ФДГ из бактерий рода *Burkholderia* располагается остаток Gln. Для ФДГ из дрожжей и стафилококков с наибольшей частотой представлен остаток Lys. Более детальный анализ данной области ФДГ из семейства *Staphylococcae* показал присутствие помимо остатка Lys с меньшей частотой остатков Ser, Gln, Ala. ФДГ из *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus carnosus*, у которых в данном положении находятся остатки Gln, имеют на 3 – 5 аминокислот больше на С-конце.

Таблица 1.2.3.1.

Условные обозначения форматдегидрогеназ из различных источников с указанием названия организма и кода последовательностей в базах данных. Бактериальные ФДГ отмечены синим цветом, фиолетовым – из дрожжей и грибов, зеленым – из растений. Жирным цветом отмечены организмы-патогены.

Латинское название организма	Сокращение	Код базы данных
<i>Staphylococcus equorum</i>	SeqФДГ	WP_021339550.1
<i>Staphylococcus simulans</i>	SsiФДГ	WP_023015869.1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	SluФДГ	WP_002492941.1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	SpaФДГ	WP_023374391.1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SsaФДГ	WP_011303984.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	SauФДГ1 SauФДГ2	WP_001557559.1
<i>Arthroderma gypseum</i> (<i>Microsporum gypseum</i>)	AgyФДГ	XM_003171894.1
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	AorФДГ	XM_003190197.1
<i>Coccidioides posadasii</i>	CpoФДГ	XM_003071102.1
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	AcaФДГ	XM_001539190.1
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	PttФДГ	XM_001933718.1
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	PnoФДГ	XM_001791765.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SscФДГ	XM_001590223.1
<i>Beauveria bassiana</i>	BbaФДГ	XM_008597831.1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Neoformans</i>	CneФДГ	XM_571419.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SceФДГ	UniProt: P0CT22
<i>Candida boidinii</i>	CboФДГ	UniProt: O13437
<i>Ogataea parapolymorpha</i>	OpaФДГ	UniProt:W1Q801
<i>Malassezia globosa</i>	MglФДГ	XM_001728659.1
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i>	MavФДГ	AE017240.1 AAS06230.1
<i>Burkholderia multivorans</i>	BmuФДГ	ACF35001.1
<i>Burkholderia stabilis</i>	BstФДГ	ACF35003.1
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	BpyФДГ	ACF35004.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	BceФДГ	ACA95142.1
<i>Bordetella pertussis</i>	BpeФДГ	BX640415.1

Латинское название организма	Сокращение	Код базы данных
<i>Bordetella bronchiseptica</i> (<i>Alcaligenes bronchisepticus</i>)	BbrФДГ	BX640441.1
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	PseФДГ	UniProt: P33160
<i>Inquilinus limosus</i>	IliФДГ	WP_026871932.1
<i>Legionella pneumophila</i> <i>subsp. pneumophila str.</i> <i>Philadelphia</i>	LegФДГ	AE017354; AAU26390.1
<i>Legionella norrlandica</i>	LleФДГ	WP_035889837.1
<i>Francisella tularensis</i> <i>subsp. Novicida</i>	FtuФДГ	WP_003041408.1
<i>Physcomitrella patens</i> (мох)	PpaФДГ	GB XM001768721
<i>Hordeum vulgare</i> (ячмень)	HvuФДГ	GB D88272
<i>Triticum aestivum</i> (пшеница)	TaeФДГ	GB AK332605
<i>Glycine max</i> (соя)	SoyФДГ	GB AK244764
<i>Lycopersicon esculentum</i> (томат)	LesФДГ	GB AJ849378
<i>Solanum tuberosum</i> (картофель)	StuФДГ	GB Z21493
<i>Arabidopsis thaliana</i> (резуховидка)	AthФДГ	EMBL AF208029
<i>Brassica napus</i> (рапс)	BnaФДГ	KEGG: EST 21261
<i>Malus domestica</i> (яблоко)	MdoФДГ	EMBL CN496368
<i>Prunus persica</i> (персик)	PpeФДГ	KEGG: EST 4281
<i>Citrus clementina</i> (клементин)	CclФДГ	GB XP_006446478.1
<i>Picea sitchensis</i> (ель)	PsiФДГ	GB EF085163
<i>Pinus pinaster</i> (сосна)	PpiФДГ	KEGG: EST 174
<i>Populus tremula</i> (осина)	PtmФДГ	KEGG: EST 4757
<i>Populus trichocarpa</i> (тополь)	PtrФДГ	GB XM002320465


```

LleФДГ 1 -----MLNQDKQKIVCVLYDDPKGGFPPKYARESIPEIGQYPDGQSLPSP-AAIDFTP--GELLGSVS
LegФДГ 1 -----FSQSQQKIVCVLYDDPKGGFPPNYARESIPELKQYPDGQSLPNP-DSIDFTP--GEMLGSVS
FtuФДГ 1 -----KILCVLYDDPKTGMPKDYPLAQIPKLSNYPDGSSLPPTP-QAIDFRP--GELLGCVS
IliФДГ 1 -----MAKIVCVLYDDFVTGYPTSYARDLPLKLERYPGGQTLPTP-KAIDFVP--GTLGGSVS
PseФДГ 1 -----AKVLCVLYDDFVDGYPKTYARDLPLKIDHYPGGQTLPTP-KAIDFTP--GQLGGSVS
BbrФДГ 1 -----AKILCVLYDDFVGGMPTATYARDSLPAIARYPGGATLPTP-LALDFTP--GHLLGCVS
BpeФДГ 1 -----AKILCVLYDDFVGGMPTATYARDSLPAIARYPGGATLPTP-LALDFTP--GHLLGCVS
BceФДГ 1 -----MATVLCVLYDPVDGYPPRYVRDTPVVTTHYADGQTAPTPAGPPGFRP--GELVGSVS
BstФДГ 1 -----MATVLCVLYDPVDGYPPHYVRDTPVITRYADGQTAPTPAGPPGFRP--GELVGSVS
BpyФДГ 1 -----MATVLCVLYDPVDGYPPRYVRDAIPVITQYADGQTAPTPAGPLGFRP--GELVGSVS
BmuФДГ 1 -----MATVLCVLYDPVDGYPPRYVRDTPVITHYADGQLAPTPSGPPGFRP--GELVGSVS
MavФДГ 1 -----EEEPVAKVMVLYDPVDGYPPKYARDSIPVINSYPDGSSLPPTP-SKIDFTP--GELLGCVS
StuФДГ 1 -----MAMSRVASTAARAITS-----SSLVF-TRELQASPGPKKIVGVFYKANEYAE MNPNFLGCAE
LesФДГ 1 -----MAMRRVASTAARAIASP-----SSLVF-TRELQASPGPKKIVGVFYKANEYAE MNPNFLGCAE
CclФДГ 1 -----MAMKRVASSAINAFASSGYLR--SSSRF-SRHYASS-GSKKIVGVFYKANEYAS MNPNFLGCV
PtmФДГ 1 -----MAMKRAATSARAFSSSSPSSLSGSS-TRLLHASAESK KIVGVFYKANEYASLNPNFVGSLE
PtrФДГ 1 -----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSS-TRLLHASAESK KIVGVFYKANEYASLNPNFVGSLE
MdoФДГ 1 -----MASKGVIASAVRALASSG--SSASSTF-TRHLHASAGSK KIVGVFYKANEYAE LNPNFLGSQE
PpeФДГ 1 -----MKGVIASAVRTLASSG--SSASSTF-TRHLHASAGSK KIVGVFYKANEYAE LNPNFLGCEE
HvuФДГ 1 -----MAAMWRAAARQLVDRAVGSRAAH-----TSAGSKKIVGVFYQAGEYADKNPNFVGCVE
TaeФДГ 1 -----MAAMCRAAARQLVDRAVGSRAAH-----TSAGSKKIVGVFYQAGEYADKNPNFVGCVE
SoyФДГ 1 -----MSNFTLKMSDPTLAQQHLVKVHTTHTHE TVVTTHNHNQ--TPSINASGEKKKIVGVFYKANEYAKLNPNFVGCVE
BnaФДГ 1 -----MAMRRITGAIRASCVSSSSSGYFAR----QFHASSGDSK KIVGVFYKANEYASKNPNFLGCV
AthФДГ 1 -----MAMRQAAKATIRACSSSSSGYFARR----QFNASSGDSK KIVGVFYKANEYATKNPNFLGCV
PsiФДГ 1 -----MASKRAVISTFRAASRKPIFSSVSPASSVRELHAPAGSNKIVGVFYKANEYASLNPNFLGCV
PpiФДГ1 1 -----MASRRAVISAFRAASRRPICSPVSSIASSVRELHAPAGSNKIVGVFYKANEYASLNPNFLGCV
PpaФДГ 1 -----MASRRIGGVLLAGSRALSQRHGLTGASAADSQILQRHLQFSRFSYSSAAGGESK KILGVFAAHEYAK-NPEFLGCV
PnoФДГ 1 -----MVFLRSASRLRAPRTSSII SARAGPRLTSSLRQPNAFRT-----LTASASQQGKVLVLYDGGIHAEQEPKMLGTTE
PttФДГ 1 -----MGKVVLLVLYDGGIHAEQEPQLLGTTE-----MGKVVLLVLYDGGIHAEQEPQLLGTTE
SscФДГ 1 -----MVLTRSLIRLASRSPFCARSIFTASAFARPTTLTTRSAFRSQKLNHTFKIIRMLTGDKREKVKVLLVLYDGGIHAEEVPELLGTTE
CpoФДГ 1 MVIIRSLRGLRPLRSLLSLLASRGLRSPPFASSWTASSSLPLNSVRLT-----ATSKLQGKVLMMVYDGGIHAQKQPGLLGTTE
AorФДГ 1 -----MGKILMVLYDGGIHAQKQPGLLGTTE-----MGKILMVLYDGGIHAQKQPGLLGTTE
AgyФДГ 1 -----MVKVLLVLYDGGIHAQKQPGLLGTTE-----MVKVLLVLYDGGIHAQKQPGLLGTTE
AcaФДГ 1 -----MGRTIKAHLSTG-NLQLE-----LRNTPKGVLLVLYDGGIHAQKQPALLGASE
BbaФДГ 1 MVSFRPLSRSLPLVAASRSALFHS CAPSPVLRHAGAVRGRAAAVPVYTKLGGGAPAAASPGLVPSSFRALTAREKVKVLLVLYDGGIHAQKQPGLLGTTE
CboФДГ 1 -----MKIVLVLYDAGKHADEKLYGCTE-----MKIVLVLYDAGKHADEKLYGCTE
OpaФДГ 1 -----MGKVVLLVLYDAGKHAQDEERLYGCTE-----MGKVVLLVLYDAGKHAQDEERLYGCTE
SceФДГ 1 -----MSKGVLLVLYEGGKHAEEQEKLLGCTE-----MSKGVLLVLYEGGKHAEEQEKLLGCTE
MglФДГ 1 -----MLLFNSSVAMRALQTRTFS-----VSARRSDKVLAAALYRGGEASKRQPKLLATVE
CneФДГ 1 -----MVKVLAVLYSGGKAAEDESRLLGTV-----MVKVLAVLYSGGKAAEDESRLLGTV
SauФДГ_1 1 -----MSGAVVFFVIFLKQATCNTYFKEVKIYHLGEMDMKIVALFPEAVEGQ-ENQLLN-TK
SauФДГ_2 1 -----MKIVALFPEAVEGQ-ENQLLN-TK-----MKIVALFPEAVEGQ-ENQLLN-TK
SsaФДГ 1 -----MLFANYVLNDSFKEVVCANRIEYFFASKMHISSVTLHSFKNKLLGEISMKIVALFPESVAGE-DNQLLN-TE
SpaФДГ 1 -----MKIVALFPEYVEGE-ENQILN-TK-----MKIVALFPEYVEGE-ENQILN-TK
SluФДГ 1 -----MKIVALFPETEQGL-DNQLLN-TT-----MKIVALFPETEQGL-DNQLLN-TT
SsiФДГ 1 -----MKIVALFPEATKQGTENNVLN-DY-----MKIVALFPEATKQGTENNVLN-DY
SeqФДГ 1 -----MKIVGLFPSPDPSGKSENQLLN-DR-----MKIVGLFPSPDPSGKSENQLLN-DR

```

Рис. 1.2.3.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – фиолетовым. Цвет аминокислотных остатков определяется природой бокового заместителя: гидрофобные (серый, зеленый и желтый), положительно (синий) или отрицательно (красный) заряженные и т.д. Код последовательности представлен в таблице 1.2.3.1.

```

LleФДГ 61 GELGLREFLEGGKYQFVVTSDKDG-NSVFARELKEASIVISQFFWPAYLTRDRIEGSPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAE--HDITVCEVTYCNSISVA
LegФДГ 60 GELGLRQFLESNGHQLVVTSDKDG-DSVFARELKEATVVISQFFWPAYLTRDRIEAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAE--HNITVCEVTYCNSISVA
FtuФДГ 54 GELGLRKFLLEELGHELVTSDKDG-DCKAEQELIDADIVISQFFWPFYLTKERIQAKKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAE--HKIDVVEVTVNSISVS
IliФДГ 56 GELGLRRWLESNGHTLVVTSDKDG-DSRLDRELPDADIVISQFFWPAYLTAERIAKAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAID--RGLTVAEVTYCNSISVA
PseФДГ 55 GELGLRKYLEAHGHTLVVTSDKDG-DSVFERELVDADVVISQFFWPAYLTPERIAKAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQSAID--RNVTVAEVTVNSISVA
BbrФДГ 55 GELGLRPFLOARGHTLVVTADKDG-GSVFERELPDADVVISQFFWPAYLTAARIAKAPRLLKLAITAGVSDHVLDLQAAAQ--HGLTVAEVTYNSISVS
BpeФДГ 55 GELGLRPFLOARGHTLVVTADKDG-GSVFERELPDADVVISQFFWPAYLTAARIAKAPRLLKLAITAGVSDHVLDLQAAAQ--HGLTVAEVTYNSISVS
BceФДГ 57 GELGLRGYMEAHGHTLVVTSDKDG-DSEFERELPEADVVISQFFWPAYLTAERIAKAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--AHITVAEVTGNSISVA
BstФДГ 57 GELGLRGYLEAHGHTLVVTSDKDG-DSEFERELPDADVVISQFFWPAYLTAERIAKAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--AHITVAEVTGNSISVA
BpyФДГ 57 GELGLRGYLEAHGHTLVVTSDKDG-DSEFERELPDADVVISQFFWPAYLTAERIAKAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--ARITVAEVTGNSISVA
BmuФДГ 57 GELGLRDYLAAHGHTLVVTSDKDG-DSEFERELPEADVVISQFFWPAYLTAERIAKAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--AGITVAEVTGNSISVA
MavФДГ 60 GELGLRKFFEDGGHELVTSDKDG-DSEFERELPDADIVISQFFWPAYLTKERFAKARNKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--RGVTVAEETWNSISVA
StuФДГ 58 NALGIREWLESKHQYIVTPDKEG-DCELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
LesФДГ 58 NALGIREWLESKHQYIVTPDKEG-DCELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
CclФДГ 61 GCGCLREWLESKHQYIVTDDKEG-DCELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
PtmФДГ 64 GELGIRDWLESQGHQYIVTDDKEG-DSELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
PtrФДГ 64 NALGIRDWLESQGHQYIVTDDKEG-DSELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
MdoФДГ 62 RALGIRDWLESQGHQYIVTDDKEG-NCELEKHIEDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
PpeФДГ 60 RALGIKWLESQGHQYIVTDDKEG-DCELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
HvuФДГ 54 GELGIRDWLESKHQYIVTDDKEG-NSELEKHIEDMHLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
TaeФДГ 54 NALGIREWLESKHQYIVTDDKEG-DSELEKHIEDMHLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
SoyФДГ 73 GELGIREWLESQGHQYIVTDDKEG-DSELEKHIPDAHVIITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
BnaФДГ 60 NALGIRNWLESQGHQYIVTDDKEG-NCELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
AthФДГ 61 NALGIRDWLESQGHQYIVTDDKEG-DCELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGLTVAEVTGNSISVA
PsiФДГ 65 NALGIREWLESQGHQYIVTDDKEG-DSELEKHIPDLHVLITPFFHPAYVTAERIKKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGVTVAEVTGNSISVA
PpiФДГ1 65 NALGIREWLESNGHQYIVTDDKEG-DCELEKHIPDVHVLITPFFHPAYVTAERIQEKELKLLTAGVSDHVLDLQAAA--AGVTVAEVTGNSISVA
PpaФДГ 78 NALGIREWLESKHQYIVTSDKDG-DSELDKELADAHILITPFFHPAYMTKERLAKAKNQLLLTAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
PnoФДГ 72 NELGIRKWIEDQGHVLTSDKEG-GSEFDKHLVDAEVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
PttФДГ 27 NELGIRKWIEEQGHVLTSDKEG-NSEFDKHLVDAEVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SscФДГ 89 NELGIRKWLEDQGHVLTSDKEG-NSEFDKHLVDAEVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
CpoФДГ 82 NELGLRKWLEERGHVLTSDKEG-NSTFERELVDADVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
AorФДГ 27 NELGLRKWLEEQGHVLTSDKEG-NSTFDKELVDAEVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
AgyФДГ 27 NELGLRKVLEEDGHVLTSDKEG-NSVFERELVDADVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
AcaФДГ 49 NELGLRKWLEEKGHVLTSDKDG-NSKFDQELVDAEVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
BbaФДГ 101 NELGLRKWLEDQGHVLTSDKEG-NSKFDQELVDAEVIITPFFHPGYLTAERLAKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
CboФДГ 26 NKLGIANWLKQGHVLTSDKEG-TSELDKHIPDADVIITPFFHPAYITKERLDKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
OpaФДГ 27 NALGIRDWLEKQGHVLTSDKEG-NSVLEKNIPDADVIITPFFHPAYITKERLDKAKNQLIAVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SceФДГ 29 NELGIRNFIEEQGYELVTTIDKPEPTSTVDRELKDAEIVITPFFFPAYISRNRIAEAPNKLKCVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
MglФДГ 51 NELGLRKWLESKGHVLTSDKDG-SSKFDTELDKSDIVITPFFHPAYVTAERIDKAPKLLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
CneФДГ 27 NRGFADWLKKEGHEFIVTADKEG-DSEFQKHLPTDEILITPFFHPGYLTAELMEKASKLKLKCVTVAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SauФДГ_1 56 KAIGLKTFLERGHFIIADNGED----LDKHLPMDDVIISAPFPAYMTRERIEKAPNKLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SauФДГ_2 23 KAIGLKTFLERGHFIIADNGED----LDKHLPMDDVIISAPFPAYMTRERIEKAPNKLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SsaФДГ 71 RAIGLKPFLERGHFVILTNDNED----LDKHLADMDIVISAPFPAYMTRERIEKAPNKLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SpaФДГ 23 KAIGLKPFLERGHVLTNDNED----LEKHLADMDIVISAPFPAYMTRERIEKAPNKLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SluФДГ 23 KAIGLDPFLERGHVILKNGED----LDQHLKMDVIISAPFPAYMTRERIEKAPNKLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SsiФДГ 24 TALNLRPFLEERGHVVLKGDGDD----LDQHLKMDVIISAPFPAYMTRERIEKAPNKLKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA
SeqФДГ 24 YALGIESFLEDKHEFVINSDE-E----VDQHLKMDVIISAPFPAYMTRERIRKASQKLAITAGVSDHVLDLQAAA--KGLTVSEVTGNSISVA

```

Рис. 1.2.3.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – фиолетовым. Цвет аминокислотных остатков определяется природой бокового заместителя: гидрофобные (серый и зеленый), положительно (синий) или отрицательно (красный) заряженные и т.д. Код последовательности представлен в таблице 1.2.3.1.

```

LleФДГ 158 EHTVMMILSLVRDYIPQYNIVVD-GGWNADCVTRSYDLEGMHVGCVAAGRIGLAVLRRLLKPFDDVK-LHYTDRHRLPVQLENELNLT-----Y
LegФДГ 157 EHTVMMILALVRDFIPQYNTVID-GGWNADCVSRSYDLEGMQVGCVAAGRIGLAVLRRLLKPFDAVK-LHYTDRHRLPVQLEQELNLT-----Y
FtuФДГ 151 EHTVMMILSMVRDYLTQHEIAKS-GGWNADAVKRSYDLEGMNVGTVAAAGRIGLSVLRRLKPFDDTK-LHYFDKYRLPKNVQEELNLT-----Y
IliФДГ 153 EHVMMILGLVRNYIPSYQWVVK-GGWNADCAARSYDLEGMHVGVTAAGRIGLAVLRRLLKPFDDHK-LHYTERHRLPEAVEQELNLT-----W
PseФДГ 152 EHVMMITLALVRNYLPSHEWARK-GGWNADCVSHAYDLEGMHFVGTVAAGRIGLAVLRRLLKPFDDVH-LHYTDRHRLPESEVEKELNLT-----W
BbrФДГ 152 EHVMMVVALVRNYLPSYQCULD-GGWNADCVARSYDLEGMQVGVVAGRIGSAVLRRLKPFDDVG-LHYTDQHRLPAATEQELGAR-----Y
BpeФДГ 152 EHVMMVVALVRNYLPSYQCULD-GGWNADCVARSYDLEGMQVGV---AGRIGSAVLRRLKPFDDVG-LHYTDQHRLPAATEQELGAR-----Y
BceФДГ 154 EHVMMTTLALVRNYLPSHAIAQQ-GGWNADCVSRSYDVEGMHFVGTVAAGRIGLAVLRRLLKPFGLQ-LHYTORHRLDASIEQALALT-----Y
BstФДГ 154 EHVMMTTLALVRNYLPSHAIAQQ-GGWNADCVSRSYDVEGMHFVGTVAAGRIGLAVLRRLLKPFGLH-LHYTORHRLDAAIEQELGLT-----Y
BpyФДГ 154 EHVMMTTLALVRNYLPSHAIAQQ-GGWNADCVSRSYDVEGMHFVGTVAAGRIGLAVLRRLLKPFGLH-LHYTORHRLDAPIEKELALT-----Y
BmuФДГ 154 EHVMMTTLALVRNYLPSHAIAQQ-GGWNADCVSRSYDIEGMHFVGTVAAGRIGLAVLRRLLKPFGLA-LHYTORHRLDPAIEHELALT-----Y
MavФДГ 157 EHTVMQILALVRNFVPSHQWIRD-GGWNADCVQRSYDVEGMVGVIAAGRIGRAVLERMKPFQVN-LHYFVHRLSPEYEQQLGVT-----Y
StuФДГ 155 EDELMRILILVRNFLPGHHQVIN-GEWNVAIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDSELENQIGAK-----F
LesФДГ 155 EDELMRILILVRNFLPGHHQVIN-GEWNVAIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDSELENQIGAK-----F
CclФДГ 158 EDELMRILILVRNFLPGHHQVIS-GEWNVAGVAYRAHDLEKGTVGTVCGGRIGKLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----F
PtmФДГ 161 EDELMRILILVRNFLPGYHQVIN-GEWNVAIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----F
PtrФДГ 161 EDELMRILILVRNFLPGYHQVIN-GEWNVAIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----F
MdoФДГ 159 EDELMKILNLVNFVPGYQQIVT-GEWNVAGIAHRAVDLERKTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFHCD-LLYHDLRLLKMDPEVEQHTGAK-----F
PpeФДГ 157 EDELMRILILVRNFLVPGYQIVN-GEWVAGIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGKLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEQOIGAK-----F
HvuФДГ 151 EDELMRILILVRNFLVPGYQQVVK-GEWNVAGIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----F
TaeФДГ 151 EDELMRILILVRNFLVPGYQQVVK-GEWNVAGIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----F
SoyФДГ 170 EDELMRILILVRNFLVPGYHQAVN-GEWNVAGIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGKLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----F
BnaФДГ 157 EDELMRILILVRNFLVPGYQVVK-GEWNVAGIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGKLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----Y
AthФДГ 158 EDELMRILILVRNFLVPGYQVVK-GEWNVAGIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGKLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAK-----F
PsiФДГ 162 EDELMRILILVRNFLVPGYQIVN-GEWNVAIAHRAVDLEKGTVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAT-----L
PpiФДГ1 162 EDELMRILILVRNFLVPGYQIVE-GDWKVAIASYRSYDLEKGTIGTIGAGRIGKLLLRLLKPFNCN-LLYHDLRLLKMDPELEKETGAT-----L
PpaФДГ 175 EDEVLRILVLRNLFVPAHGWKQVSE-GGWNVAIVVHAYDLIDRTVGTVGGGRIGQELMKRLKPFGLKEMLYYDRNSLGAEREKELGCK-----R
PnoФДГ 171 EHVMMTILTLVRNLFVPAHEQIAK-GEWNVAEVAKNEYDLENKVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLSAEKEKEIGCR-----R
PttФДГ 126 EHVMMTILTLVRNLFVPAHEQIVK-GEWNVAEVAKNEYDLENKVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLSPEKEKEIGCR-----R
SscФДГ 188 EHVMMTILTLVRNLFVPAHEQIIA-GEWVAAAANKNEFDLEKGVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLKPEIEKEIGCR-----R
CpoФДГ 181 EHVMMTILTLVRNLFVPAHQQVAS-GEWVAAAANKNEFDLEKGVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLSPEVEKEIGCR-----R
AorФДГ 126 EHVMMTILTLVRNLFVPAHEQITR-GEWVAAAANKNEFDLEKGVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLSPEVEKEIGCR-----R
AgyФДГ 126 EHVMMTILTLVRNLFVPAHEQVST-GEWVAAAANKNEFDLEKGVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLKPEVEKEIGCR-----R
AcaФДГ 148 EHVMMTILTLVRNLFVPAHEQVAG-GDWVAAAANKNEFDLEKGVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLPPAVEQEIGCR-----R
BbaФДГ 200 EHVMMTILTLVRNLFVPAHEQVAR-GDWVAAAANKNEFDLEKGVVGTVAAGRIGRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQPLSPAEEKEIGAR-----R
CboФДГ 125 EHVMMTMLVLRNLFVPAHEQIIN-HDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQALPKAEAEKVGAR-----R
OpaФДГ 126 EHVMMTMLVLRNLFVPAHEQIIS-GGWNVAEIAKDSFDIEGKVIATIGAGRIGYRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQSLSREAEKVGAR-----R
SceФДГ 127 EHVMMATILVLRNRYNGGHQQAIN-GEWVAAAANKNEFDLEKGIISTVAGRIGYRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQELPAEAINRLNEASKLFGNGRQIVQR-----H
MglФДГ 148 EHAVMTILTLVRNLFVPAHTQYAEKNDWNVAEIAQNSYDIEGKVVGTVAAGRIGRLLLRLLKPFDDCKELLYFDYQALPKAEAEKVGAR-----H
CneФДГ 124 EHVMSILLVLRNLFVPAHEQIIQA-DDWNVAKIARNAFDLEKGVVGTVCGGRIGYRVLRRLLKPFDDCKELLYFDYQALPKAEAEKVGAR-----R
SauФДГ_1 150 EHAVMDLILLRNRYEYEGHRQSV-GEWNLSQVGNHAEHLQHKTIIGIFGFRIGQLVAERLAPFNVTIQHY-DPINQDDHKLK-----
SauФДГ_2 117 EHAVMDLILLRNRYEYEGHRQSV-GEWNLSQVGNHAEHLQHKTIIGIFGFRIGQLVAERLAPFNVTIQHY-DPINQDDHKLK-----
SsaФДГ 165 EHAVMDLILLRNRYEYEGHRQAKD-GEWNLSKVGNDHAEHLQHKTIIGIFGFRIGQLVAERLAPFNVTIQHY-DPINQKDNESH-----
SpaФДГ 117 EHAVMDLILLRNRYEYEGHRQSV-GEWNLSKVGNDHAEHLQHKTIIGIFGFRIGQLVAERLAPFNVTIQHY-DPINQKDNESH-----
SluФДГ 117 EHAVMDLILLRNRYEYEGHRQAVE-GEWNLSKVGNDHAEHLQHKTIIGIFGFRIGQLVAERLAPFNVTIQHY-DPINQKDNESH-----
SsiФДГ 118 EHVMMTILTLVRNRYEYEGHRQSEE-GGWNLTQVTNHAEHLQHKTIIGIFGLGRIGRLVGERLKPFDVQHY-RRSSQEDTDFSK-----
SeqФДГ 117 EHTVMDVLILLRNFMEGHRQSYN-GEWNLSKVGNDHAEHLQHKTIIGIFGFRIGQLVAERLAPFNVTIQHY-RRSSQEDTDFSK-----

```

Рис. 1.2.3.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – фиолетовым. Цвет аминокислотных остатков определяется природой бокового заместителя: гидрофобные (серый и зеленый), положительно (синий) или отрицательно (красный) заряженные и т.д. Код последовательности представлен в таблице 1.2.3.1.

LleФДГ	244	HSSVESMVKVCDVVSIIHCPLHPETEYLFNDRLIKQMKQCGAYLINTARGKICDQHAIANALKTGHLAGYAGDVWFPPPPAPNHLWRTMPH-----HA
LegФДГ	243	HPSVESMVKVCDVVSIIHCPLHPETEYLFDERLIKQMKRGSYLINTARGRICDQHAVADALESGHLAGYAGDVWFPPPPAKNHPWRSMPN-----HA
FtuФДГ	237	HSDLDSMLKQCDVITINCPLEKTEENLFDEVIRINKMKRGAYLINTARGAICDQAIKALETGQLSGYAGDVWYPPQAPKDH IWRTMPY-----NG
IliФДГ	239	HPTAEDMVGVCDDVTINAPLHPETDNLFNKMKRGGAYLINTARGKICDRDAVAALLESGLLAGYAGDVWFPPPPVDHPWRTMPH-----HG
PseФДГ	238	HATREDMYPVCDVVTINCPLEHPETEHEMINDETLKLFRGAYLVNTARGKLCDRDAVAALLESGLLAGYAGDVWFPPQAPKDH PWRTMPY-----NG
BbrФДГ	238	HPDAAALAGACDVISLHCPLHPGTEHLFDAAMLARMKRGAYLINTARGKICDRDAVVQALASGQLAGYAGDVWFPPQAPRDHPWRSMPH-----HG
BpeФДГ	235	HPDAAALAGACDVISLHCPLHPGTEHLFDAAMLARMKRGAYLINTARGKICDRDAVVQALASGQLAGYAGDVWFPPQAPRDHPWRSMPH-----HG
BceФДГ	240	HADVASLASAVDIVNLQIPLYPSTEHLEFDAAIARMKRGAYLINTARAKLVDRDAVVNALTSGHLAGYGGDVWFPPQAPADHPWRTMPF-----NG
BstФДГ	240	HADPASLAAAVDIVNLQIPLYPSTEHLEFDAAIARMKRGAYLINTARAKLVDRDAVVRAVTSGLHAGYGGDVWFPPQAPADHPWRAMPF-----NG
BpyФДГ	240	HADAASLAGAVDIVNLQIPLYPSTEHLEFDAAIARMKRGAYLVNTARAKLVDRDAVVRAVTSGLHAGYGGDVWFPPQAPADHPWRTMPF-----NG
BmuФДГ	240	HADVASLASAVDIVNLQIPLYPSTEHLEFDAAIARMKRGAYLINTARAKLVDRDAVVRAVASGHLAGYGGDVWFPEPAPADHPWRAMPF-----NG
MavФДГ	243	HPDVESLARSVDVVSIIHSPLIAQTHHMFNEKLLKSMRGGSYIVNTARAEEETHKAIVAALLESGLLAGYAGDVWFPPPPPDHPWRTMPN-----HA
StuФДГ	241	EEDLDKMLSKCDIVVINTPLTEKTRGFMFKERIAKLLKGGVLI VNNARGAIMD TQAVVDACNSGHIAGYSGDVWYPPQAPKDH PWRYPN-----QA
LesФДГ	241	EEDLDKMLSKCDIVVINTPLTEKTRGFMFKERIAKLLKGGVLI VNNARGAIMD TQAVVDACNSGHIAGYSGDVWYPPQAPKDH LWRYMPN-----QA
CclФДГ	244	EEDLDTMLPKCDIVVINTPLTEKTRGFMFKERIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD TQAVVDACSSGHIAGYSGDVWNPQAPKDH PWRYPN-----QA
PtmФДГ	247	EEDLDSLLSKCDVVVINTPLTEKTRGFMFKERIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD TQAVVDACSSGQIGGYSGDVWNPQAPKDH PWRYPN-----QA
PtrФДГ	247	EEDLDSLLSKCDVVVINTPLTEKTRGFMFKERIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD TQAVVDACSSGQIGGYSGDVWNPQAPKDH PWRYPN-----HA
MdoФДГ	245	EDDLDAMLPRCDVIVVNTPLTEKTRGLFEDKERIAKCKKGGVLI VNNARGAIMD TQAVVDACSSGHIAGYSGDVWNPQAPKDH PWRYPN-----HA
PpeФДГ	243	EEDLDAMLPKCDVIVVINTPLTEKTRGLFEDKERIAKCKKGGVLI VNNARGAIMD TQAVVDASSGHIAGYSGDVWNPQAPKDH PWRYPN-----HA
HvuФДГ	237	EEDLDAMLPKCDVVVINTPLTEKTRGFMFNKEIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD TQAVDADACSSGHIAGYGGDVWFPPQAPKDH PWRYPN-----HA
TaeФДГ	237	EEDLDAMLPKCDVIVVINTPLTEKTRGFMFNKEIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD TQAVDADACSSGHIAGYGGDVWFPPQAPKDH PWRYPN-----HA
SoyФДГ	256	EEDLDAMLPKCDVIVVINTPLTEKTRGLFEDKNIKAKCKKGGVLI VNNARGAIMD TQAIADACSSGHVAGYGGDVWFPPQAPKDH PWRYPN-----HA
BnaФДГ	243	VESLDEMLPKCDVVVNTPLTEKTRGFMFNKEMIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD RQAVVEAMESGQIGGYSGDVWDPPQAPKDH PWRYPN-----QA
AthФДГ	244	VEDLNEMLPKCDVIVVINTPLTEKTRGFMFNKELIGKLLKGGVLI VNNARGAIMERQAVVDAVESEGHIGGYSGDVWDPPQAPKDH PWRYPN-----QA
PsiФДГ	248	ETNLDLMLPKCDVVVINTPLSDKTRGFMFNKEIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD AQAVDADASASGQIGGYSGDVWFPPQAPKDH PWRSMN-----HA
PpiФДГ1	248	ETKLEMLPKCDVVVINTPLSDKTRGFMFNKEIAKMKKGGVLI VNNARGAIMD AQAVDADASASGQIGGYSGDVWFPPQAPKDH PWRSMN-----HA
PpaФДГ	262	ETDLDTMLSKCDVVVNTPLTDQTRGLFNKERIAKMKKGGAYLVNNARGAIADTEAVKEACESEGLHGGYGGDVWNAQAPAGKDH PWRYPN-----HA
PnoФДГ	258	VENLEEMLAQCDVVTINCPLEKTRGLFNKDLLSKMKKGSWLVNTARGAIVVKEDVADALKSGLHRYGGDVWFPPQAPKDH PLYAQNPW---GGGNA
PttФДГ	213	VENLEEMLAQCDVVTINCPLEKTRGLFNKDLISKMKKGSWLVNTARGAIVVKEDVAQALKDGHRLRYGGDVWFPPQAPKDH PLYAQNPW---GGGNA
SscФДГ	275	VTDEEMLAQCDVVTINCPLEKTRGLFNKELISKMKKGSWLVNTARGAIVVKEDVADALKSGLHRYGGDVWFPPQAPKDH PLYAKNPF---GGGNA
CpoФДГ	268	VENLEEMLAQCDVVTINCPLEKTRGLFNKELISKMKKGSWLVNTARGAIVVKEDVAEAIKSGHLRYGGDVWFPPQAPKDH PLYVQGPW---GGGNA
AorФДГ	213	VTLEEMLAQCDVVTINCPLEKTRGLFNKDLISKMKKGSWLVNTARGAIVVKEDVAEAVKSGHLRYGGDVWFPPQAPKDH PLYVQGPW---GGGNA
AgyФДГ	213	VENLEEMLAQCDVVTINCPLEKTRGLFNKELISKMKKGSWLVNTARGAIVVKEDVAEAVKSGHLRYGGDVWFPPQAPKDH PLYVQGPW---GGGNA
AcaФДГ	235	VTLEEMLAQCDVVTINCPLEKTRGLFNKDLIAKMKKGSWLVNTARGAIVVKEDVADAIKSGHLRYGGDVWFPPQAPKDH PLYTQGPW---GGGNA
BbaФДГ	287	VSLEEMLAQCDIVTINCPLEKTRGLFNKELISKMKKGSYLINTARGAIVVKEDVAAALESGLHAGYGGDVWFPPQAPKDH PLRTAKNPF---GGGNA
CboФДГ	212	VENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGLLRGYGGDVWFPPQAPKDH PWRDMRKY---GAGNA
OpaФДГ	213	VHDIKELVAQADIVTINCPLEHAGSKGLVNAELLKHFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGLLRGYGGDVWFPPQAPKDH PWRSMANKY---GAGNA
SceФДГ	226	VEKLEDMVAQSDVVTINCPLEHDKSRGLFNKLLISHMKDGAYLVNTARGAICVAEDVAAEAVKSGKLAGYGGDVWDKQAPKDH PWRMDNND---HVGNA
MglФДГ	236	VPSVEELVSCDQDIVTINAPLHAGTKGLFNKELISKMKKGAWLVNTARGAICVKEDIAADALKSGQLNGYGGDVSFPPQAPKDH PWRGMRNIWNPTLGGGNA
CneФДГ	211	VEKLEDMVAQCDIVTINCPLEKTRGLFNEELISKMKKGSWLVNTARGAICDRNAVKKALESGLHLLGYAGDVWDVQAPKDH PWRHMANPL---GGGNG
SauФДГ_1	231	FVSFDELVSSSDAITIHAPLTPETDNLFDKDVL SRMKKHSYLNTARGKIVNRDALVEALASEHLLQGYAGDVWYPPQAPADHPWRTMPR-----NA
SauФДГ_2	198	FVSFDELVSSSDAITIHAPLTPETDNLFDKDVL SRMKKHSYLNTARGKIVNRDALVEALASEHLLQGYAGDVWYPPQAPADHPWRTMPR-----NA
SsaФДГ	246	FVNFDELVSTSDAVTIHAPLTPETDNLFDDYVLSRMKVGSYLVNTARGKIVNTNDVLELLNAKHIIQGYAGDVWYPPQAPADHPWRTMPR-----NG
SpaФДГ	198	FVDFDTLVSTSDAITIHAPLTPD TDFDNVLSRMKEGSYLVNTARGKIVDTEALVKQLESKHIQGYAGDVWFPPQAPKDH PWRNMPR-----NA
SluФДГ	198	FVEFDELVRTSDAITIHAPLTPSTDTDFDLVLSRMKGTGSYLVNTARGKIVDTEALVAAVNSGHIQGYAGDVWYPPQAPATHHPWRTMPR-----NG
SsiФДГ	199	YVNFDELVHKSVDLIITPTLPTD TDFDYNTISQMKDGSYIVNCARGKIVNKEEVVKMIEENHLQGYGGDVWFPPQAPSDHPWRTMPR-----NA
SeqФДГ	198	YVDFDELVSTSDVIVILSPLTSETD DLFNVDLSRMKEGSYLVNTARGKIVNKDDLIELVNNHIIQGYAGDVWYPPQAPQDHPWRTMPR-----NA

Рис. 1.2.3.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – фиолетовым. Цвет аминокислотных остатков определяется природой бокового заместителя: гидрофобные (серый и зеленый), положительно (синий) или отрицательно (красный) заряженные и т.д. Код последовательности представлен в таблице 1.2.3.1.


```

LleФДГ 335 MTPHTSGTTLSAQARYAAGVREILECWFDDGK-PIREDYLIVHNGRLAGVGSHSYSKGNSTKGVEQQLDLV---
LegФДГ 334 MTPHTSGTTLSAQARYAAGVREILECWLGNK-PIREYLVISQGHLAGVGSHSYSAGNNTTSGTEQAAELV---
FtuФДГ 328 MTPHTSGTTLSAQARYAAGTREILECFSSGK-EIRDEYIVKNGELAGVGAHSYK-----
IliФДГ 330 MTPHISGTSLSAQARYAAGVREILECFEGR-PIREYLVLDGGKLAGAGAHYSYAGNATGGSGEAAARFKKSV
PseФДГ 329 MTPHISGTTTDAQRYAAGTREILECFEGR-PIREYLVLDGGKLAGAGAHYSYAGNATGGSEAAAKFKKAV
BbrФДГ 329 MTPHISGSSSLPAQARYAAGTREILECWLDR-AIRTEYLVLDQGRLAGAGAHAYTPGDTTAGSEDAARFHP--
BpeФДГ 326 MTPHISGSSSLPAQARYAAGTREILECWLDR-AIRTEYLVLDQGRLAGAGAHAYTPGDTTAGSENAARFHP--
BceФДГ 331 MTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCFWFDGK-PIRNEYLVLDGGTLAGTGAQSYRLT-----
BstФДГ 331 MTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCFWFDGR-PIRNEYLVLDGGTLAGTGAQSYRLT-----
BpyФДГ 331 MTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCFWFDGK-PIRNEYLVLDGGTLAGTGAQSYRLT-----
BmuФДГ 331 MTPHISGTSLSAQARYAAGTLEILQCFWFERR-PIREAYLVLDGGTLAGTGEQSYRLT-----
MavФДГ 334 MTPHISGSSSLAQARYCAGTREILEDWFAGR-PIRSEYLVIEGGKFAKTGAKSYAQ-----
StuФДГ 332 MTPHISGTTIDAQLRYAAGTKDMLDRYFKGE-DFPAENYIVKDGELAPQYR-----
LesФДГ 332 MTPHISGTTIDAQLRYAAGTKDMLDRYFKGE-DFPAENYIVKDGELAPQYR-----
CclФДГ 335 MTPHVSGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-DFPVQNYIVKAGELAPQYR-----
PtmФДГ 338 MTPHISGTTIDGQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-EFPPQNYIVKEGKLASQYL-----
PtrФДГ 338 MTPHISGTTIDGQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-EFPPQNYIVKEGKLASQYL-----
MdoФДГ 336 MTPHISGTTIDAQLRYAAGTKDMLDRYFKGE-EFPAQNYIVKDGKLASQYQ-----
PpeФДГ 334 MTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-DFPAQNYIVKDGKLASQYQ-----
HvuФДГ 328 MTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-EFPVENYIVKEGELASQYK-----
TaeФДГ 328 MTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-DFPAENYIVKEGELASQYK-----
SoyФДГ 347 MTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE-DFPEQNYIVKEGQLASQYR-----
BnaФДГ 334 MTPHISGTTIDAQLRYAAGTKDMLERYFKGE-DFPAQNYIVKDGELAPQYR-----
AthФДГ 335 MTPHTSGTTIDAQLRYAAGTKDMLERYFKGE-DFPTEYLVLDGGKELAPQYR-----
PsiФДГ 339 MTPHISGTTIDAQIRYAAGTKDMLDRYFRGE-DFPPQHYIVKEGKLASQYL-----
PpiФДГ1 339 MTPHISGTTIDAQIRYAAGTKDMLDRYFKGE-DFPSQNYIVKEGKLASQYL-----
PpaФДГ 353 MTPHISGTTIDAQKRFAGTKDMIDRWLKH-EAFPEQNYIVREGKLASQYL-----
PnoФДГ 354 MVPHMSGTSIDAQQRYAAGTKAILDSYFSGRHDKAEDLIVYNGDYATKSYGLRK-----
PttФДГ 309 MVPHMSGTSIDAQKRYADGTKAILDEYFSGRENYRPEDLIVHKGDYATKAYGQRK-----
SscФДГ 371 MVPHMSGTSLDAQKRYADGTKAILSYFSGKHRYRPEDLIVIGGDYATKAYGERAKSSGTAGANKAFS----
CpoФДГ 364 MVPHMSGTSLDAQIRYAAGTKDILESYFSGKFDYKQEDLIVHQGDYVTKAYGQRKKIQEEQRN-----
AorФДГ 309 MVPHMSGTSLDAQIRYAAGTKAILESYFSGRHDKYKNEEDLIVRGGDYVTKAYGQRNKA-----
AgyФДГ 309 MVPHMSGTSLDAQIRYAAGTKAILESYFSGKHRYRPEDLIVYKGDYAN-----
AcaФДГ 331 MVPHMSGTSLDAQVRYAAGTKAILESYFSGKHRYRPEDLIVHAGDYATKSYGQRK-----
BbaФДГ 383 MVPHMSGTSLDAQKRYADGTKAILTSYFSGKHRYRPEDLIVHKGDYATKAYGQRK-----
CboФДГ 308 MTPHYSGTTIDAQTRYAAGTKNILESFFTKFDYRQDIIILLNGEYVTKAYGKHDKK-----
OpaФДГ 309 MTPHYSGSVIDAQVRYAAGTKNILESFFTKFDYRQDIIILLNGEYVTKAYGKHDKK-----
SceФДГ 322 MTVHISGTSLSHAQKRYAAGVKNILNSYFSKFDYRQDIIIVQNGSYATRAYS-QKK-----
MglФДГ 336 MTSHISGTSLSDAQRYLAGTKEILENLWSGK-PQKQVNVIVENGKYVSPAYGQH-----
CneФДГ 307 MVPHYSGTTIDAQTRYAAGTKIIRRYFAGE-EQNPNVNLIVTNGDYASKSYGNRDEKKKEQSQVNAAK----
SauФДГ_1 322 MTVHYSGMTLEAQKRIEDGVKDILERFFNHE-PFQDKDIIVASGRITASKSYTAK-----
SauФДГ_2 289 MTVHYSGMTLEAQKRIEDGVKDILERFFNHE-PFQDKDIIVASGRITASKSYTAK-----
SsaФДГ 337 MTVHYSGMTLEAQARIEEGVKDILTRFFNHE-PFQDKDIIVDAGKISSKSYTAK-----
SpaФДГ 289 MTVHYSGMTLEAQVRIEEGVKDILNRFFNHE-PFQSKDVIIVDGGQITSASYNK-----
SluФДГ 289 MTIHYSGMTLESQQRIEDGVKDILTRFFNHE-PFQKDIIVDSGRITASSSYTAK-----
SsiФДГ 290 MTIHYSGMVI EAQLRIEKGVKDLLTHFFDET-FFPKEDVIVNGGQITSYAKHDDSN-----
SeqФДГ 289 MTIHYSGMTLEAQKRIEKGVKGLFNFFNHE-AYDEKDVVVSGETITNSYSKSK-----

```

Рис. 1.2.3.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников. Названия бактериальных ферментов отмечены синим, растительных – зеленым, дрожжевых – фиолетовым. Цвет аминокислотных остатков определяется природой бокового заместителя: гидрофобные (серый и зеленый), положительно (синий) или отрицательно (красный) заряженные и т.д. Код последовательности представлен в таблице 1.2.3.1.

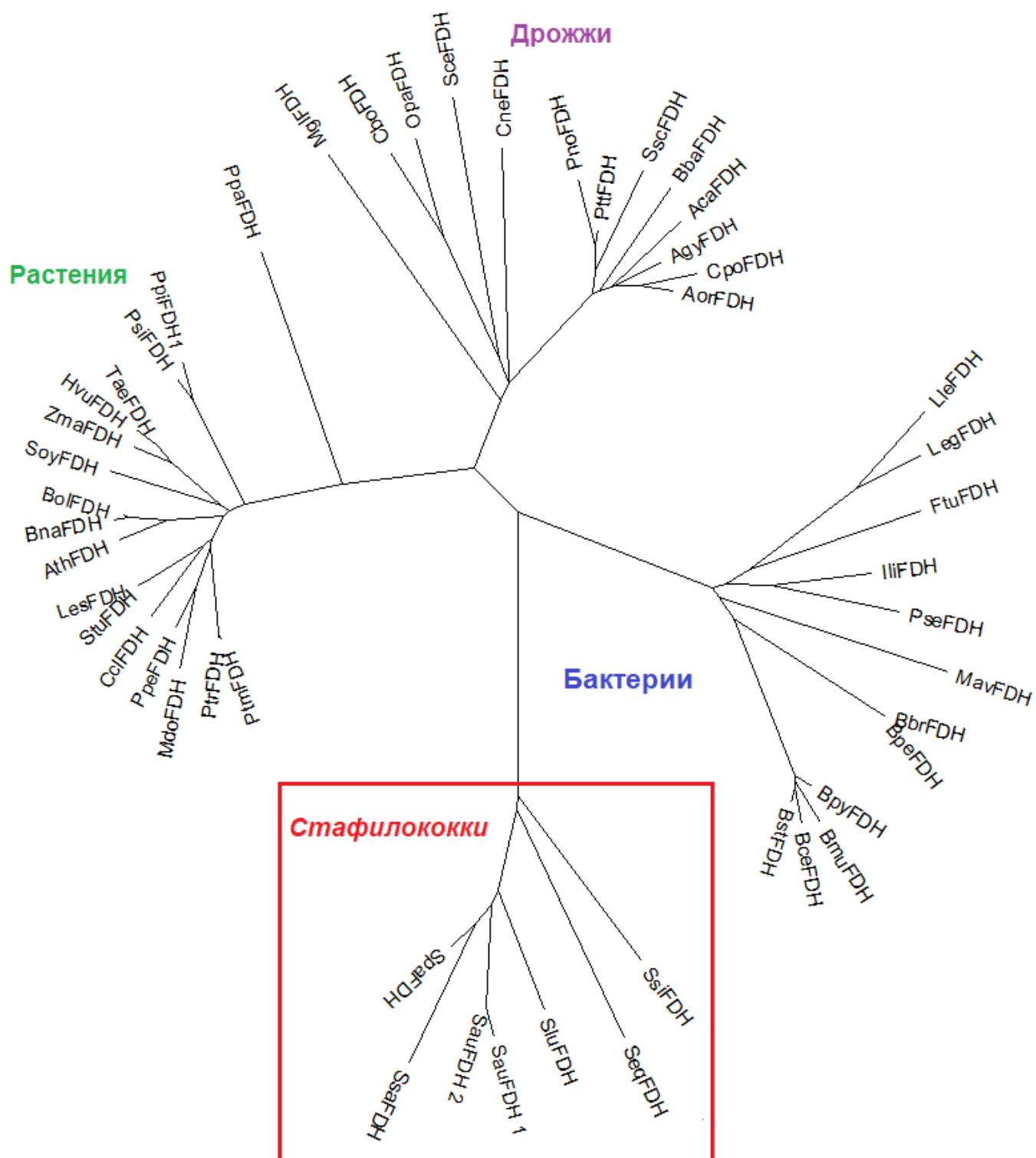


Рис. 1.2.3.2. Филогенетическое древо ФДГ из различных организмов. Расшифровка обозначений ферментов представлена в таблице 1.2.3.1.

Таблица 1.2.3.2.

ФДГ из различных представителей семейства *Staphylococcaceae*.

Организм	Код доступа
<i>Staphylococcus aureus</i> , PDB 6ТТВ, субъединица А	6ТТВ А
<i>Staphylococcus sp</i>	WP_000706135.1
<i>Staphylococcus argenteus</i>	BBD84998.1
<i>Staphylococcus schweitzeri</i>	WP_047553122.1
<i>Staphylococcus roterodami</i>	WP_240784869.1
<i>Staphylococcus simiae</i>	WP_002462484.1
<i>Mammaliococcus lentus</i>	WP_218707801.1
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	WP_002472575.1
<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i> ATCC 15305	BAE19538.1
<i>Staphylococcus argensis</i>	WP_103370728.1
<i>Staphylococcus succinus</i>	WP_069824422.1
<i>Mammaliococcus sciuri</i>	WP_084755238.1
<i>Staphylococcus sp.</i> EGD-HP3	WP_021459565.1
<i>Staphylococcus arlettae</i>	WP_232191137.1
<i>Staphylococcus cohnii</i>	WP_192947873.1
<i>Staphylococcus caeli</i>	WP_069995834.1
<i>Staphylococcus edaphicus</i>	WP_099091400.1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	WP_119615247.1
<i>Staphylococcus sp.</i> CH99b_3	WP_151508284.1
<i>Staphylococcus sp.</i> HMSC068H12	WP_070653823.1
<i>Staphylococcus lloydii</i>	WP_195718874.1
<i>Staphylococcus kloosii</i>	WP_195708809.1
<i>Staphylococcus durrellii</i>	WP_195721713.1

Организм	Код доступа
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	WP_107999831.1
<i>Staphylococcus warneri</i>	WP_237397321.1
<i>Staphylococcus petrasii</i>	WP_103298944.1
<i>Staphylococcus auricularis</i>	WP_150888005.1
<i>Staphylococcus croceilyticus</i>	WP_103329608.1
<i>Staphylococcus sp.</i> Marseille-Q1834	WP_226386038.1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	WP_052463691.1
<i>Staphylococcus caprae</i>	WP_213470211.1
<i>Staphylococcus sp.</i> HMSC62A08	WP_070873240.1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	WP_037544838.1
<i>Staphylococcus sp.</i> HMSC055A09	WP_070597729.1
<i>Staphylococcus sp.</i> TE8	WP_037548254.1
<i>Staphylococcaceae bacterium</i>	MBW4836714.1
<i>Staphylococcus sp.</i> HMSC064A01	WP_070838859.1
<i>Staphylococcus sp.</i> RIT622	WP_129795258.1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	WP_053018624.1
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	WP_242693647.1
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	WP_095104484.1
<i>Staphylococcus debuckii</i>	WP_123145037.1
<i>Staphylococcus simulans</i>	WP_119565931.1
<i>Staphylococcus sp.</i> HMSC061G12	WP_070864364.1
<i>Staphylococcus sp.</i> HMSC057C08	WP_070684380.1
<i>Staphylococcus equorum</i>	WP_065367331.1
<i>Staphylococcus sp.</i> KY49P	MRF34227.1
<i>Staphylococcus carnosus</i>	WP_103211933.1
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	WP_095103265.1

1.2.4. Трехмерная структура и механизм действия

В настоящий момент NAD⁺-зависимая формиаатдегидрогеназа детально изучена: получена информация о строении, механизме действия, потенциальном применении в биотехнологии на примере широкого спектра ферментов из различных источников. Однако, несмотря на это экспериментальные структуры были получены для ограниченного количества ферментов, данные о которых представлены в таблице 1.2.4.

Таблица 1.2.4.

Сводная таблица с описанием экспериментально полученных методом РСА структур формиаатдегидрогеназ из различных источников.

PDB ID	Описание структуры	Разрешение	ссылка
<i>Бактерии</i>			
2NAC	Открытая конформация (апо-форма) для фермента из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101	1,80 Å	[52]
2NAD	Тройной комплекс ФДГ-NAD ⁺ -азид (холо-форма) для фермента из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101	2,05 Å	
2GUG	Двойной комплекс для фермента из бактерий <i>Pseudomonas sp.</i> 101 ФДГ-формиаат-анион	2,28 Å	[53]
6JX1	Кристаллическая структура холо-формы мутантой формиаатдегидрогеназы с заменами V198I/C256I/P260S/E261P/S381N/S383F из <i>Pseudomonas sp.</i> 101 в присутствии глицерина	2.23 Å	[54]
6JWG	Кристаллическая структура мутантой формиаатдегидрогеназы C256I/E261P/S381I из <i>Pseudomonas sp.</i> 101 в комплексе с глицерином и 2-амино-2-гидроксиэтилпропан-1,3-диол	2.08 Å	
6JUK	Кристаллическая структура мутантой формиаатдегидрогеназы C256I/E261P/S381I из <i>Pseudomonas sp.</i> 101 в комплексе с не природным кофактором никотинамид-цитозин-динуклеотидом	2.29 Å	
6JUJ	Кристаллическая структура мутантой формиаатдегидрогеназы V198I/C256I/P260S/E261P/S381N/S383F из <i>Pseudomonas sp.</i> 101 в комплексе с не природным кофактором никотинамид-цитозин-динуклеотидом	2.18 Å	
2GSD	Кристаллическая структура холо-формы формиаатдегидрогеназы из бактерий <i>Moraxella sp.</i>	1,95 Å	[55]
3FN4	Кристаллическая структура апо-формы формиаатдегидрогеназы из бактерий <i>Moraxella sp.</i> C-1 в закрытой конформации	1,96 Å	
4XYG	Апо-форма формиаатдегидрогеназы из бактерий <i>Granulicella mallensis</i>	1,80 Å	[56]
4XYB	Кристаллическая структура холо-формы формиаатдегидрогеназы из <i>Granulicella mallensis</i>	1,38 Å	
4XYE	Структура комплекса [ФДГ-NAD ⁺] из <i>Granulicella mallensis</i>	1.8 Å	
6T9X	Структура мутантной формиаатдегидрогеназы D222Q/Q223R из <i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8 в комплексе с NADP ⁺ и азид-анионом	2.20 Å	[57]
6T9W	Структура мутантной формиаатдегидрогеназы D222A/Q223R из <i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8 в комплексе с NADP ⁺ и азид-анионом	2.15 Å	
6T8J	Холо-форма ФДГ из <i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8 в комплексе с NADP ⁺ и азид-анионом	1.97 Å	
6T8C	Апо-форма ФДГ из <i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8	1.97 Å	

PDB ID	Описание структуры	Разрешение	ссылка
6TTB	Холо-форма ФДГ из <i>Staphylococcus aureus</i>	2,70 Å	
<i>Дрожжи</i>			
5DNA	Апо-форма формиатдегидрогеназы из <i>C. boidini</i>	1,75 Å	[58]
5DN9	Кристаллическая структура холо-формы <i>C. boidini</i>	1,50 Å	
2FSS	Апо-форма ФДГ из <i>C. boidini</i> с заменой K47E	1,70 Å	[59]
2J6I	Апо-форма мутантной ФДГ из <i>C. boidini</i> с заменами K328V L128V, I227V и I354G	1,55 Å	
6D4C	Холо-форма мутантной ФДГ из <i>C. boidini</i> с заменой V123G в комплексе с NAD ⁺ и азидом	1,45 Å	[60]
6D4B	Холо-форма мутантной ФДГ из <i>C. boidini</i> с заменой V123A в комплексе с NAD ⁺ и азидом	1,45 Å	
6T8Z	Тройной комплекс ФГД-NAD ⁺ -азид в первичном и вторичном сайте связывания для ФДГ из <i>Chaetomium thermophilum</i>	1,21 Å	[61]
6T8Y	Тройной комплекс ФГД-NADH-азид во вторичном сайте связывания для ФДГ из <i>Chaetomium thermophilum</i>	1,26 Å	
6T92	Тройной комплекс ФГД-NADH-азид во вторичном сайте связывания для мутантной ФДГ N120C из <i>Chaetomium thermophilum</i>	1,12 Å	
6T94	Тройной комплекс ФГД-NADH для мутантной ФДГ N120C из <i>Chaetomium thermophilum</i>	1,15 Å	
<i>Растения</i>			
3NAQ	Апо-форма ФДГ из <i>A. thaliana</i>	1,70 Å	[62]
3JTM	Апо-форма ФДГ из <i>A. thaliana</i> , кристаллизация в космосе	1,30 Å	
3N7U	Холо-форма ФДГ из <i>A. thaliana</i>	2,00 Å	
7ARZ	Холо-форма ФДГ из <i>Physcomitrium patens</i>	2,15 Å	

Одной из наиболее хорошо изученных формиатдегидрогеназ является фермент из бактерий *Pseudomonas sp.* 101. Наиболее ранние исследования структур ФДГ были проведены ещё в 1994 г. [63], представленные на рисунках 1.2.4.1. – 1.2.4.2. Однако в 2020 году были опубликованы структуры тройных комплексов нескольких мутантных форм PseФДГ [PseФДГ-NAD⁺-N₃⁻], содержащие многоточечные замены, что подтверждает непрекращающийся интерес к данному ферменту [54]. Аналогичная ситуация наблюдается и для хорошо изученной ФДГ из дрожжей *C. boidini*, для которой к 2019 году помимо апо- и холо-форм фермента дикого типа были получены структуры ферментов, содержащие замены K47E (PDB 2FSS), K328V L128V, I227V и I354G (PDB 2J6I), V123G/A (PDB 6D4C и 6D4B соответственно). Помимо этого, наиболее актуальным исследованием в данной области является изучение взаимосвязи структура-функция для ФДГ с двойной кофакторной специфичностью из бактерий *Granulicella mallensis* и *G. mallensis* MP5ACTX8, согласно данным опубликованным за период с 2015 по 2020 годы [56,57]. Интерес к данным ферментам можно объяснить перспективностью их практического применения в качестве катализатора реакции

регенерации NAD(P)H в виду того, что бактериальные ферменты обладают большей термостабильностью нежели ферменты из других источников. Всё в том же 2020 году были опубликованы данные о структуре ФДГ из термофильных дрожжей *Chaetomium thermophilum* [61]. В меньшей степени представлена структурная информация о ФДГ из растений. В качестве примера можно привести структуру ФДГ из *A. thaliana* в открытой конформации с разрешением 1,3 Å (апо-форма) (PDB 3JTM). Кристаллизация данного белка проводилась на борту Международной Космической Станции [62]. На момент 2010 года структуры получались с меньшей степенью разрешения. Наиболее поздними исследованиями в области изучения структур формиаатдегидрогеназ являются изучение структур ФДГ из бактерий *S. aureus* и мха *Physcomitrella patens*.

NAD⁺-зависимая формиаатдегидрогеназа состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых состоит из двух доменов. Различают кофермент-связывающий домен, ответственный за распознавание и связывание NAD⁺ и каталитический домен. Кофермент-связывающий домен образован аминокислотными остатками, находящимися в середине полипептидной цепи (остатки с 147 по 333 для формиаатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101), тогда как каталитический – в начале (аминокислотные остатки с 1 по 146) и конце (аминокислотные остатки с 334 по 400) полипептидной цепи [29]. Каждая субъединица содержит свой активный центр, располагающийся между каталитическим и кофермент-связывающим доменом. Субстратный канал вытянутый, порядка 30 Å. Общий размер молекулы в среднем на примере PseФДГ 90x50x53Å. Также белковая глобула характеризуется осью симметрии второго порядка и большой площадью межсубъединичного контакта. В среднем, эта величина составляет 7500 Å².

Еще в 1994 году было установлено значение связывания формиаат-аниона, а также субстрато-подобного азид-аниона в формировании закрытой конформации активного центра, соответствующего каталитически активной форме белка. Поскольку структуре апо-PseФДГ соответствует открытая форма, тогда как для тройного комплекса [PseФДГ-NAD⁺-N₃⁻] [64] или холо-формы ФДГ характерна закрытая форма [62] Таким образом, при переходе от открытой конформации к закрытой формируется активный центр с оптимальной конформацией,

обеспечивающий высокую каталитическую эффективность [29]. Это может объясняться тем, что при присоединении отрицательно-заряженного субстрата возможно компенсирование взаимного отталкивания положительно-заряженных никотинамидного кольца молекулы NAD^+ и R284 в активном центре (рис. 1.2.4.3.). Во-вторых, азид взаимодействует как с аминокислотными остатками кофермент-связывающего домена, так и с аминокислотными остатками каталитического домена, что также может способствовать переходу к закрытой форме. Это также было подтверждено структурными исследованиями формиатдегидрогеназ из других источников.

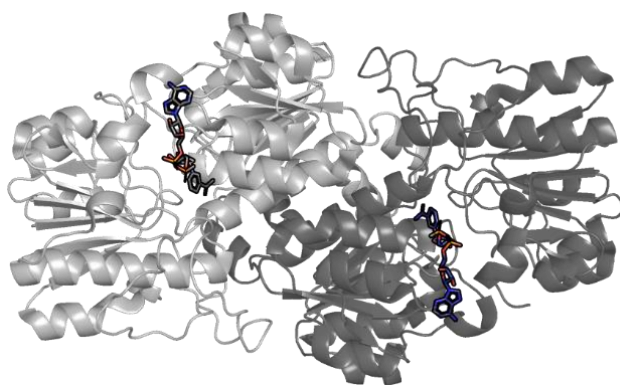


Рис. 1.2.4.1 Молекула ФДГ *Pseudomonas* sp.101, PDB:2NAD (холо-форма), 2,05 Å с двумя субъединицами.

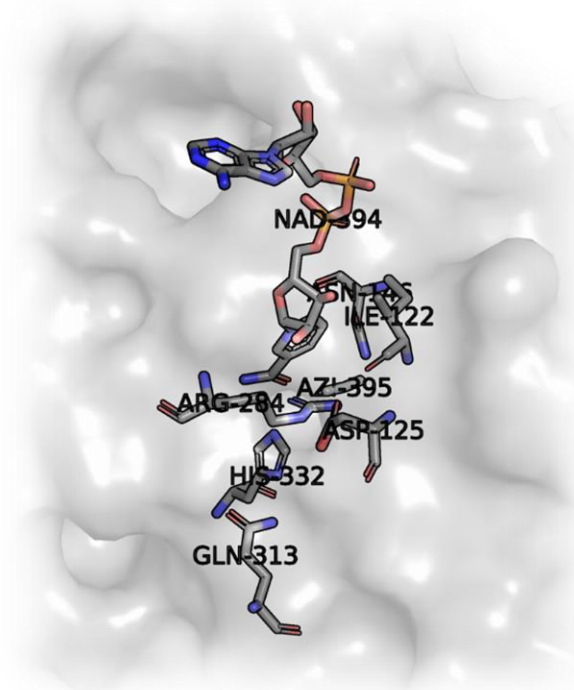


Рис. 1.2.4.3. Строение активного центра PseФДГ, PDB: 2NAD

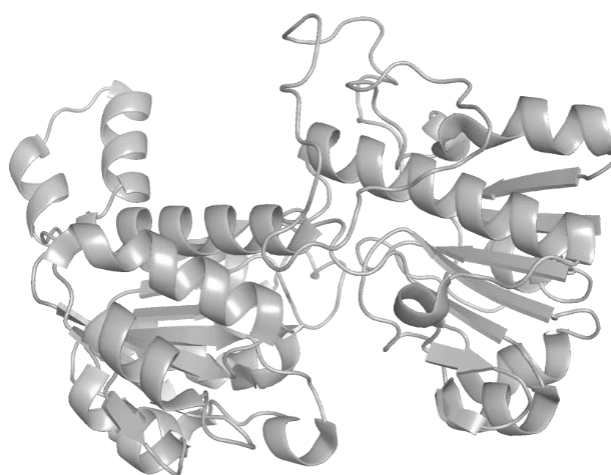


Рис. 1.2.4.2. Одна субъединица ФДГ из *Pseudomonas sp.* 101, PDB:2NAC (апо-форма), разрешение 1,80 Å

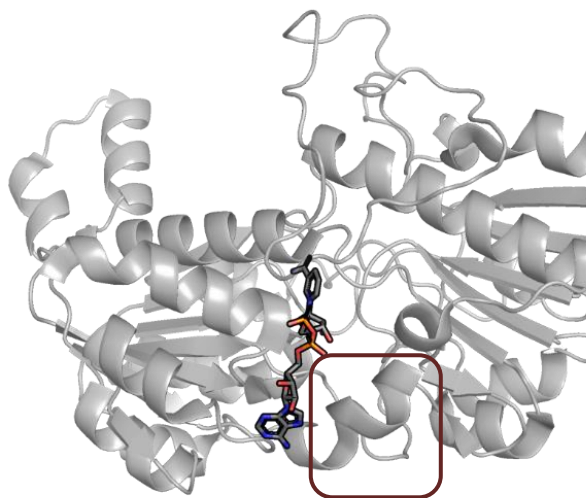


Рис. 1.2.4.4. Одна субъединица ФДГ *Pseudomonas sp.*101, PDB:2NAD (холо-форма), 2,05 Å с выделенной С-концевой областью.

Также детальный анализ данных, полученных методом РСА показал: в случае апо-формы ФДГ из *Pseudomonas sp.* 101 отмечается достаточно протяженный участок на С-конце с G375 до A393, не разрешенный на структуре для обеих субъединиц, тогда комплекс [ФДГ-NAD⁺-N₃⁻], соответствующий холо-форме показал отсутствие сигналов только E392, A393 в субъединице А и G384-A393 в субъединице В (1.2.4.4.). Отсутствие сигналов отдельных остатков на структуре означает достаточно быстрое и неупорядоченное движение этой области чтобы не иметь возможности накопить сигнал достаточной интенсивности. Таким образом, данные области весьма подвижны и исключены из активного центра. Также в случае структур апо-форм ФДГ из *Granulicella mallensis* и *C. boidini* и их тройных комплексов с азид-анионом наблюдались неразрешенные области в С-концевой последовательности.

Отличительной особенностью структуры [SauФДГ-NAD⁺-N₃⁻], представленной на рисунке 1.2.4.5. является протяженная область С-концевых аминокислотных остатков, неразрешенных на структуре (PDB: 6ТТВ).

Это может быть связано как с более низким разрешением, так и с большим объемом активного центра SauФДГ. На рисунке 1.2.4.5. представлен результат наложения SauФДГ и PseФДГ.

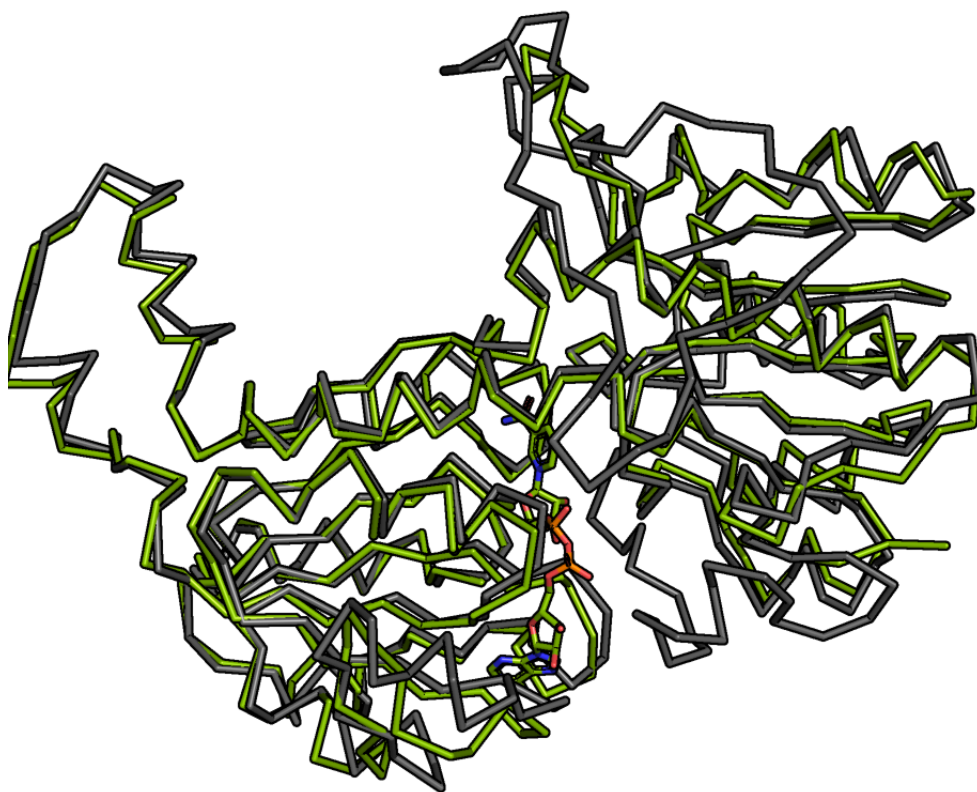


Рис. 1.2.4.5. Наложение структур PseФДГ (PDB:2NAD) (серый цвет), SauФДГ (PDB:6TTB) (зеленый цвет).

Экспериментальная структура SauФДГ, полученная из кристаллов SauФДГ1 не имеет первых 33 аминокислотных остатков. Таким образом, белок соответствует ферменту, экспрессированному из *Saufdh2* (см. п.1.2.3). Таким образом, и удлиненная и укороченная форма гена при экспрессии дают белок SauФДГ2. Более подробно объяснение этого факта приведено в экспериментальной части диссертационной работы в п. 3.1.

В работе [65] посредством молекулярной динамики была показана значимость аминокислотных остатков активного центра в правильной ориентации субстрата при прохождении через субстратный канал. На рисунке 1.2.4.6. отмечены каталитически значимые аминокислотные остатки V119, D122, N143, R276, Q305, H324 активного центра SauФДГ. Несмотря на низкий уровень гомологии ФДГ из *S. aureus*, различие в каталитически значимых остатках наблюдается только для 119 положения, где располагается остаток валина вместо I122 у *Pseudomonas* sp. 101.

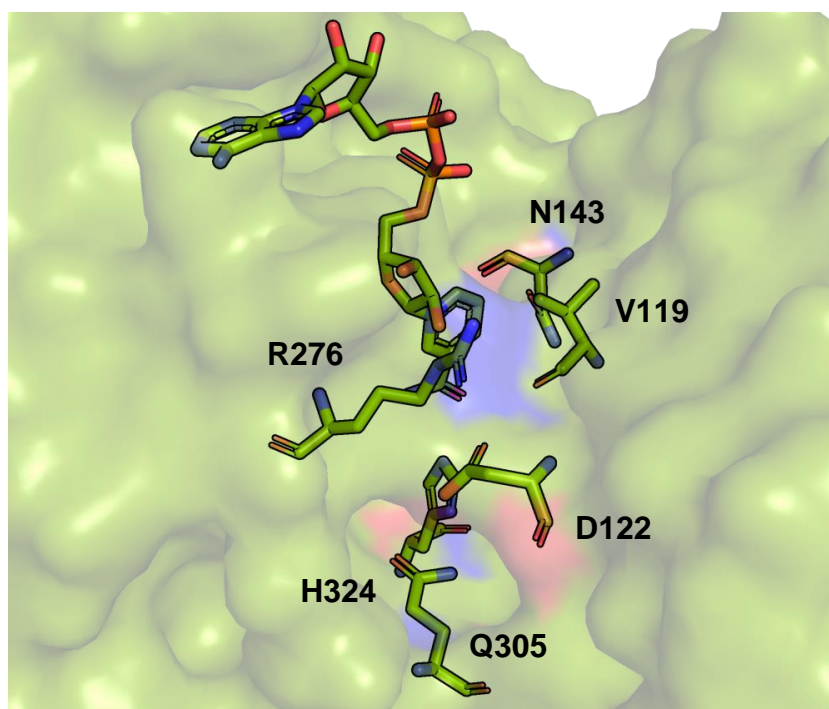


Рис. 1.2.4.6. Строение активного центра SauФДГ (PDB: 6TTV).

Отличительной особенностью каталитического механизма форматдегидрогеназ является отсутствие системы переноса протона в активном центре: гидрид-ион переносится на углерод никотинамидной части молекулы NAD^+ без каких либо стадий кислотно-основного катализа.

1.3. Свойства форматдегидрогеназ из различных источников

1.3.1. Каталитические параметры форматдегидрогеназ

Каталитические свойства изучены для большого количества форматдегидрогеназ из различных организмов. Кинетические параметры для некоторых из них представлены в таблице 1.3.1. Для бактериальных форматдегидрогеназ характерны более высокие значения констант Михаэлиса по обоим субстратам и каталитической константы относительно форматдегидрогеназ из дрожжей и растений. Бактериальные ФДГ имеют преимущественно специфичность к NAD^+ и лишь для некоторых из них, например, для ФДГ из *Granulicella mallensis* и *Burkholderia stabilis* 15516, наблюдается высокая специфичность к NADP^+ . Это может быть связано с особенностями метаболических путей данных организмов [25]. Среди описанных форматдегидрогеназ наибольшим значением каталитических параметров обладает фермент из *S. aureus*. При этом уровень каталитической эффективности сопоставим с остальными ФДГ.

1.3.2. Термостабильность

В настоящее время механизмы инактивации ФДГ изучены достаточно хорошо. При температурах выше 50°C инаktivация NAD^+ -зависимых формиадегидрогеназ объясняется термоденатурацией, при этом константа скорости реакции не зависит от концентрации фермента и соответствует кинетике реакций первого порядка [1]. При низких температурах (от +4 до +37°C) у бактериальных ФДГ, на примере PseФДГ, инаktivация обусловлена окислением сульфо-групп, в частности, остатка Cys255 [65, 66] а не разворачиванием белковой глобулы. В то же время в данном диапазоне температур дрожжевые ФДГ сохраняют экспоненциальный вид кривой зависимости $A/A_0 - t$ вследствие инаktivации за счет разворачивания белковой глобулы [67].

Наиболее устойчивыми к тепловой денатурации являются формиадегидрогеназы из бактерий. В частности, можно отметить формиадегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *S. aureus*. Согласно литературным данным, для них время полуинаktivации при 63 – 64°C составляет порядка 20 минут.

Для большинства ФДГ процесс термоинаktivации является необратимым, однако, существуют и исключения. Процесс инаktivации ФДГ из пекарских дрожжей *S. cerevisiae* обратим при температуре ниже 42°C, однако при повышении температуры фермент инаktivирован необратимо также как и другие формиадегидрогеназы [84].

1.3.3. Влияние реакционной среды на каталитические свойства формиадегидрогеназ

Согласно литературным данным формиадегидрогеназы из различных источников отличаются достаточно широким рН-оптимумом активности. Показаны сопоставимые значения констант Михаэлиса для PseФДГ, SoyФДГ в широком диапазоне рН 6,0 – 10,0 для NAD^+ и 6,0 – 8,0 для HCOO^- [85, 86]. В случае SauФДГ константа Михаэлиса по NAD^+ возрастает в 2,5 раза при рН 6,0 [87] по сравнению с практически неизменными показателями при рН 7,0 – 10,0. Для K_m по формиату наблюдается постепенный рост на всем диапазоне измерений (5,0 – 10,0).

Таблица 1.3.1.

Каталитические свойства рекомбинантных формиатдегидрогеназ при pH 7,0 и 30°C если не указаны иные условия, где н/д – нет данных.

	краткое название	Источник фермента	Удельная активность, ед/мг	$k_{cat}^{NAD^+}$, с ⁻¹	$k_{cat}^{NADP^+}$, с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, мМ	$K_M^{NADP^+}$, мМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$(k_{cat}^{NAD^+}/K_M^{NAD^+}) / (k_{cat}^{NADP^+}/K_M^{NADP^+})$	Ссылка
	SauФДГ	<i>Staphylococcus aureus</i>	н/д	20	н/д	220 ± 10	н/д	130 ± 10	н/д	[5]
Бактерии	PseФДГ	<i>Pseudomonas</i> sp. 101	10,0	7,3	н/д	0,06	>400	6,5	$2,4 \cdot 10^3$ (0,3 М HCOO ⁻)	[68]
	BacФДГ	<i>Bacillus</i> sp. F1	6,0	6,67	1,07	0,091	3,5	19,6(NAD ⁺), 39,1(NADP ⁺)	$2,4 \cdot 10^2$	[69]
	GraФДГ	<i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8	5,5 (NADP ⁺) pH 6.0 7,9 (NAD ⁺) pH 7.5	5,8	4,0	6,5	0,85	80 (NAD ⁺), 200 (NADP ⁺)	0,19	[56]
	BstФДГ	<i>Burkholderia stabilis</i> 15516	5,3 (NADP ⁺), 2,0 (NAD ⁺)	1,66	4,75	1,43	0,16	55,5	0,04	[70]
	MorФДГ	<i>Moraxella</i> sp C1	10,0	7,3	н/д	0,08	н/д	7,7	н/д	[71]
	MycФДГ	<i>Mycobacterium vaccae</i> N 10	10,0	7,3	н/д	0,089	н/д	6,0	н/д	[72]
	LbuФДГ	<i>Lactobacillus buchneri</i>	2,0 (NADP ⁺)	1,76	3,51	1,68 pH 6,4	0,12 pH 4,8	49,8 (NADP ⁺) 284,59 (NAD ⁺)	0,035	[73]

	краткое название	Источник фермента	Удельная активность, ед/мг	$k_{cat}^{NAD^+}$, с ⁻¹	$k_{cat}^{NADP^+}$, с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, мМ	$K_M^{NADP^+}$, мМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$(k_{cat}^{NAD^+}/K_M^{NAD^+}) / (k_{cat}^{NADP^+}/K_M^{NADP^+})$	Ссылка
Дрожжи	MthФДГ	<i>Myceliophthora thermophila</i>	н/д	0,32	н/д	1,2	н/д	7,2	н/д	[74]
	CthФДГ	<i>Chaetomium thermophilum</i>	н/д	0,65	н/д	1,79	н/д	5,2	н/д	[75]
	PicФДГ	<i>Pichia pastoris</i>	8,2	н/д	н/д	0,14 20°C	н/д	16,0, 20°C	н/д	[76]
	CboФДГ	<i>Candida boidinii</i>	6,3	3,7	$4 \cdot 10^{-5}$	0,037	>38	5,9	$2,3 \cdot 10^8$	[77, 78]
	CmeФДГ	<i>Candida methylica</i>	2,1 (NAD ⁺)	1,4	н/д	0,055	н/д	н/д	н/д	[76, 79, 80]
	SceФДГ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10,0 (NAD ⁺)	6,5	н/д	0,036	н/д	5,5	$>3 \cdot 10^9$	[81]
Растения	GhiФДГ	<i>Gossypium hirsutum L.</i>	н/д	0,76	0,0083	0,06	1,98	0,76	$3 \cdot 10^3$	[80]
	AthФДГ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,5 (NAD ⁺)	1,27	н/д	0,034	10	1,4	$2 \cdot 10^4$	[71, 82]
	SoyФДГ	<i>Glycine max</i> , нативная	н/д	н/д	н/д	0,006	н/д	0,6	н/д	[83]

Для ОраФДГ оптимальным диапазоном рН является 5,5 – 10, что соответствует другим изученным формиатдегидрогеназам [85].

1.4. Белковая инженерия формиатдегидрогеназ

Основные результаты экспериментов по генетической инженерии наиболее изученных металл-независимых формиатдегидрогеназ представлены в таблице 1.4.

1.4.1. Увеличение термо- и химической стабильности

Как видно из литературных данных, наибольшее количество исследований посвящено увеличению термостабильности формиатдегидрогеназ из различных источников методом рационального дизайна. Интерес в данном случае связан с возможностью использования ФДГ для реакций восстановления кофактора, где требуется не только наиболее активная формиатдегидрогеназа, но и ферменты со значительной термостабильностью.

Наиболее выдающиеся результаты в данной области были достигнуты путем введения многоточечных замен в серии мутантов PseФДГ SM4 F311Y/N/S/D [3]. Остаток Phe311 локализован на поверхности белковой глобулы в коферментсвязывающем домене и экранирует кофермент, связанный в активном центре, от растворителя. В случае указанных мутантных форм показано увеличение термостабильности не менее чем в 9 раз по сравнению с диким типом. PseФДГ SM4 F311N/S/D привели к заметному увеличению констант Михаэлиса по NAD⁺ и формиату. Наиболее перспективными с точки зрения применения в биотехнологии являются PseФДГ SM4 и PseФДГ SM4 F311Y.

Для менее устойчивой к действию высоких температур ФДГ из сои *Glycine max* также были получены мутантные формы с заменами F290S/N/D/A/Y/T/Q/E с повышенной термостабильностью. Наибольший эффект был достигнут путем введения отрицательно-заряженных остатков Asp и Glu. Однако если рассматривать введение замен с точки зрения улучшения каталитических параметров наилучший результат был показан для мутантной формы с заменой F290A [99].

Таблица 1.4.

Белковая инженерия формиадегидрогеназ с целью увеличения термостабильности и каталитической эффективности.

ФДГ	Мутации	Эффект		Ссылка
		Изменение термостабильности	Изменение каталитической эффективности и коферментной специфичности	
PseФДГ	A198G	Увеличение термостабильности в 2,5 раза.	Снижение константы Михаэлиса по NAD ⁺ в 2 раза	[86]
	S168A, S131L/A, S131A, S160A, S184A, S228A, S(131,160)A, S(184,228)A, S(131,160,184,228)A + PseФДГ T4	Увеличение термостабильности в среднем в 1,5 раза. Наилучший эффект для S131L увеличение термостабильности в 2,5 раза		[88]
	N136G, Y144G, Y144G + PseФДГ T4	Увеличение в среднем в 1,5 – 2 раза по сравнению с wt-PseФДГ		[89]
	PseФДГ SM4; PseФДГ SM4 P311Y/N/S/D	Замены SM4 привели к увеличению термостабильности до 4 раз по сравнению с диким типом; F311Y/D повысили до 2 раз по сравнению с PseФДГ SM4; F311S/N привели к уменьшению в 2 раза по сравнению с PseФДГ SM4		[90]
	V198I/C256I/P260S/E261P/S381N/S383F; C256I/E261P/S381I; C256I/E261P/S381I; V198I/C256I/P260S/E261P/S381N/S383F		Замена коферментной специфичности по отношению к NCD ⁺ .	[54]
SboФДГ	C23S	Снижение термостабильности в 6,7 раз относительно дикого типа		[91]

ФДГ	Мутации	Эффект		Ссылка
		Изменение термостабильности	Изменение каталитической эффективности и коферментной специфичности	
	C23S/R178S; C23S/R178G; C23S/D149E/R178S; C23S/E151D/R178S; C23S/E151D/R178S/K356E; C23S/E151D/R178S/K306R/T315N	Увеличение термостабильности в:3,1; 2,2; 6,7; 27,6; 18, 36 раз соответственно по сравнению с СвоФДГ C23S		[92]
	C23S/C262A	Уменьшение термостабильности в 35 раз по сравнению с СвоФДГ wt		[91]
	C23S/C262A/K306R/T315N/K356E, E18D/C23S/K35R/R187S/C262A; E18D/C23S/K35R/E151D/R187S/F285Y	Увеличение термостабильности в:3,8;3,8; 47 раз по сравнению с СвоФДГ C23S/C262A соответственно		[92]
	C23S+F285S		Увеличение $K_M^{\text{HCOO}^-}$ в 7,5 раз, $K_M^{\text{NAD}^+}$ в 5,3 раза. Увеличение специфической активности в 1,7 раза.	[93]
	N187S, T321S; N187S/T321S		Увеличение активности в 6 раз для N187S	[94]
	V120S; V120S/N187D	Увеличение термостабильности по сравнению с СвоФДГ wt	Увеличение k_{cat} и каталитической эффективности в 3,5 и 1,6 раз соответственно для V120S. Для двойной замены эффективность возросла в 1,5 раза.	[95]
	D195Q/S/A/N		Показана замена коферментной специфичности к NADP ⁺ . Наибольший эффект для замены D195Q. Каталитическая эффективность возросла в $5 \cdot 10^7$ раз в присутствии NADP ⁺ по сравнению с NAD ⁺ .	[77]
	D195Q /Y196H/P/S		Введение двойной замены D195Q/Y196H привело к увеличению каталитической эффективности к NADP ⁺ в 4 раза относительно точечной замены D195Q.	[70]

ФДГ	Мутации	Эффект		Ссылка
		Изменение термостабильности	Изменение каталитической эффективности и коферментной специфичности	
	D195Q /Y196R		Для данной двойной замены показано увеличение каталитической эффективности в присутствии NADP ⁺ относительно NAD ⁺ в 2 раза.	[96]
	D195S, D195S /Y196H; D195S/Y196H/K356T/K379T		Полученные мутантные формы примерно в 300 раз более активны с NADP ⁺ по сравнению с CboФДГ wt	[97]
SoyФДГ	A267M и A267/I272V	Увеличение в 3,6 и 11 раз, по сравнению с SoyФДГ wt при 52°C		[98]
	F290S/N/D	Увеличение в 4,8, 10 и 44 раза по сравнению с SoyФДГ wt при 56°C		[99]
	F290A/Y/T/Q/E	Увеличение в 1,3, 1,6, 5,4, 4,8 и 43 раза по сравнению с SoyFDH wt при 56°C	В случае F290A $k_{cat}/K_M^{NAD^+}$ увеличилась в 2 раза	[100]

ФДГ	Мутации	Эффект		Ссылка
		Изменение термостабильности	Изменение каталитической эффективности и коферментной специфичности	
	Тройные мутанты: A267M/I272V/F290N; A267M/I272V/F290D; A267M/I272V/F290S	Увеличение в 58, 300, 21 раза по сравнению с SoyFDH wt при 56°C		[101]
CmeFDH	D195S D195S/Q197T, D195S/Y196L		Увеличение специфичности к NADP ⁺	[102] [103]
SceFDH	D196A/Y197R		Уменьшение специфичности к NADP ⁺ с $3 \cdot 10^9$ до 0,43-0,67	[86]
MycFDH	A198G/D221Q; C145S/ D221Q/ C255V; C145S/A198G/D221Q/ C255V	Увеличение химической стабильности для A198G/D221Q и C145S/C255V.	Изменение коферментной специфичности. Наибольшая каталитическая эффективность с NADP ⁺ показана для двойного мутанта A198G/D221Q. Вследствие введения замены C145S/C255V произошло увеличение каталитической эффективности в 6 раз.	[104]
BstФДГ	I124V; G146M/H; S262A; A287G; I124V/G146M; I124V/A287G; G146M/A287G; G146H/S262A; I124V/G146M/A287G; I124V/G146H/A287G		Для двойного мутанта G146M/A287G значение $k_{cat}/K_M^{NADP^+}$ увеличилось в 1,6 раз по сравнению с BstФДГ wt. Наиболее эффективная NADP ⁺ - зависимая формилдегидрогеназа.	[105]
	Q223D		Обратная замена на остаток аспарагина показала снижение специфичности к NADP ⁺ примерно в 1000.	[70]

Для увеличения термостабильности использовался принцип гидрофобизации α -спиралей [88]. Гидрофильные остатки серина в α -спиралах заменяли на гидрофобный остаток аланина. В области контактов α -спиралей проводили замену остатков аланина на валин вследствие его большей гидрофобности. В данной работе отмечалось увеличение термостабильности до двух раз по сравнению с ферментом дикого типа.

В качестве альтернативного метода использовался поиск конформационных напряжений с помощью карты Рамачандрана. В результате была сделана замена A198G в области высококонсервативного мотива G(A)XGXXG для PseФДГ и MогФДГ, которая привела к росту термостабильности в 2,5 раза [86].

Аналогичные успехи были достигнуты для ФДГ из дрожжей *C. boidinii* для серии мутантных форм с многоточечными заменами C23S/E151D/R178S, C23S/E151D/R178S/K356E и C23S/E151D/R178S/K306R/T315N, введение которых привело к увеличению термостабильности в 185, 120 и 240 раз соответственно по сравнению с ферментом дикого типа. При этом отсутствуют данные относительно изменения каталитических параметров.

Химическая стабильность ферментов является не менее важной характеристикой ферментов при их использовании в качестве компонентов ферментативных систем. В присутствии некоторых химических реагентов таких как ионы переходных металлов, например двухвалентных меди и никеля, или пероксид водорода, возможна полная или частичная потеря активности [106]. Это может быть обусловлено как денатурацией белкой глобулы, так и окислением значимых аминокислотных остатков. В работе [91] было показано окисление остатков цистеина на примере SboФДГ. Для повышения химической стабильности были проведены замены цистеинов на остатки аланина, серина или валина [92].

1.4.2. Изменение каталитических свойств и коферментной специфичности

В научной литературе представлено ограниченное количество свидетельств успешного увеличения каталитической эффективности формиатдегидрогеназы посредством снижения констант Михаэлиса методом сайт-направленного мутагенеза. Данные эксперименты требуют детального изучения структуры

активного центра. Введение замен осуществляется, как правило, в кофермент-связывающем домене.

В литературе представлены случаи, когда наблюдалось увеличение сродства к NAD^+ , которое не являлось основной целью исследования. Так, введение замены A198G для ФДГ из *Pseudomonas sp.* 101 привело к снижению константы Михаэлиса в 2 раза по NAD^+ . Этот же эффект наблюдался и в случае МорФДГ A198G [86]. Для растительной СоуФДГ с заменами A267M, F290S [101, 102] было показано увеличение каталитической эффективности по NAD^+ в 2 раза.

Поскольку существует значительно меньшее количество ферментов, имеющих предпочтение к NADP^+ , большое количество работ посвящено изменению коферментной специфичности NAD^+ -зависимых формиаатдегидрогеназ и увеличения сродства к NADP^+ природных формиаатдегидрогеназ.

Например, в работе [107] проведена замена коферментной специфичности бактериальной PseФДГ путем введения замены D221S. Помимо появившейся активности в присутствии NADP^+ было показано что активность мутантного фермента с NAD^+ снизилась в 3 раза [86]. Однако встречается и более раннее упоминание использования мутантных PseФДГ при регенерации кофактора [108].

В этом же структурно-эквивалентном положении были проведены замены методом сайт-направленного мутагенеза для других NAD^+ -зависимых формиаатдегидрогеназ поскольку, как предполагается, отрицательно заряженный остаток аспарагина и его замена на электронейтральный или заряженный положительно аминокислотный остаток играет ключевую роль в коферментной специфичности [70]. Для NAD^+ -зависимой формиаатдегидрогеназы из *C. boidinii* были достигнуты результаты по замене коферментной специфичности для серии мутантов на основе замен D195Q/N/S/A [77]. Также были получены серии мутантных форм СтеФДГ D195S [102], SceФДГ D196A/Y197R [81] и МусФДГ [104]. Данные эксперименты также не привели к желаемым результатам. Каждый из них приводил к ухудшению каталитической эффективности по отношению к никотинамидному кофактору. И PseФДГ с заменой D221S по-прежнему оставалась наиболее эффективной NADP^+ зависимой формиаатдегидрогеназой.

Как было показано в п. 1.3.1. примером природной NADP^+ -зависимой формиаатдегидрогеназы является ФДГ из бактерий *Burkholderia stabilis* 15516,

обнаруженной в 2010 году [70]. Однако сродство BstФДГ к субстрату и кофактору ниже, чем у других ФДГ, что затрудняет ее практическое применение. Для увеличения каталитической эффективности были получены мутантные формы с заменами I124V, G146M, G146H, S262A, A287G, I124V/G146M, I124V/A287G, G146M/A287G, G146H/S262A, I124V/G146M/A287G, I124V/G146H/A287G. В результате введения двойной замены G146M/A287G произошло увеличение каталитической эффективности по NADP⁺ в 1,6 раз [105]. Данная работа является одним из немногих примеров успешного увеличения каталитической эффективности формиаатдегидрогеназ посредством рационального дизайна. На текущий момент BstФДГ G146M/A287G является наиболее каталитически эффективной формиаатдегидрогеназой среди NADP⁺-зависимых ферментов.

Расширить спектр потенциальных кофакторов для ферментативных систем с участием формиаатдегидрогеназ позволили исследования ученых в работе [54] путем замены коферментной специфичности формиаатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 с NAD⁺ к NCD⁺ на основании анализа структур (PDB: 2NAD и 2NAC) и скрининге библиотек мутантов. Для этого определялись потенциальные замены в положениях, удаленных от адениновой части NAD⁺ не более чем на 4Å. Самый активный мутант достиг изменения предпочтения кофактора с NAD⁺ на NCD⁺ в 3700 раз.

Увеличение эффективности регенерации при помощи фьюжн-белков на основе формиаатдегидрогеназ

Одним из перспективных способов повышения эффективности регенерации никотинамидных кофакторов является получение фьюжн-белков [36]. При совместной экспрессии получают оба компонента ферментативной системы, соединенные линкером. Это обеспечивает увеличение скорости прямого переноса промежуточного продукта метаболизма между активными центрами двух ферментов, катализирующих последовательные реакции [108]. Первая фьюжн-система с участием NADP⁺-зависимой формиаатдегидрогеназы из *Mycobacterium vaccae* N10 и 3-кетоацилредуктазы из цианобактерий *Synechococcus* sp. PCC 7942 была получена в 2010 году [109]. Успешный пример регенерации NADH был показан на примере фьюжн-системы с участием формиаатдегидрогеназы из *C. boidinii* и фенилаланиндегидрогеназы [95]. Наиболее

актуальные исследования в данной области свидетельствуют о получении фьюжн-систем на основе NAD^+ -зависимой PseФДГ, NADP^+ -зависимой PseФДГ D221Q, PseФДГ SM4 D221Q и NADP^+ -зависимой монооксигеназы CYP102A1 из *Bacillus megaterium* (цитохром P450 BM3), катализирующей ω -гидроксилирование жирных кислот [110].

Таким образом, ФДГ – достаточно подробно изученный фермент. Работы посвящены исследованию NAD^+ -зависимых формиаатдегидрогеназ из различных источников методом рационального дизайна. Для описанных формиаатдегидрогеназ определены каталитически значимые высококонсервативные последовательности в первичной структуре, каталитические и термодинамические параметры, определены оптимальные условия для работы с ферментом *in vitro*. Проведены успешные эксперименты по увеличению термостабильности и изменению коферментной специфичности. Однако в научной литературе представлено ограниченное количество свидетельств успешного увеличения каталитической эффективности формиаатдегидрогеназы посредством снижения констант Михаэлиса методом рационального дизайна.

Данный фермент широко применяется в биоаналитических сенсорах, в биотехнологии в качестве одного из компонентов ферментативных систем при хиральных соединений.

На данный момент, обострена ситуацию с распространяющейся резистентностью патогенных микроорганизмов, в частности бактерий *Staphylococcus aureus* к известным антимикробным препаратам. Недостаточно изученным является использование формиаатдегидрогеназы в качестве перспективной мишени для борьбы с патогенными микроорганизмами. Следовательно, несмотря на большое количество исследований, посвященных формиаатдегидрогеназе, данный объект не теряет своей актуальности и обнаруживаются новые области для научного развития.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

Для направленного мутагенеза и клонирования фрагментов ДНК использовали следующие реагенты: ДНК-полимераза из термостабильных организмов *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-ДНК-полимераза) («Thermo Scientific», США), *Pfu* буфер для ПЦР 10X с MgSO₄ («Thermo Scientific», США), эндонуклеазы рестрикции NdeI, EcoRI, HindIII («Thermo Scientific», США), 10x буфер R («Thermo Scientific», США), лигаза фага T4 («Thermo Scientific», США), T4 буфер для лигирования 10x («Thermo Scientific», США), ДНК-праймеры T7 for, T7 rev и праймеры, содержащие нужную замену («Синтол» Россия), агароза («Thermo Scientific», США):

S2 for 5'-GATATACATATGAGCAACGGTGCCGTTTTTTTTGTC-3'
S2 rev 5'-CGGCTCCGTTGCTCATATGTATATCTCCTTCTAAAG-3'
M34A for 5'-GAGATGGATGCGAAAATCGTAGCATTATTTTC-3'
M34A rev 5'-CTACGATTTTTCGCATCCATCTCTCCATC-3'
K35A for 5'-GAGATGGATATGGCGATCGTAGCATTATTTCCA G-3'
K35A rev 5'-GCTACGATCGCCATATCCATCTCTCCTAAATG-3'
D33N+M34A for 5'-CATTTAGGAGAGATGAATGCGAAAATCGTAGCATTATTTCCAGAAGC-3'
D33N+M34A rev 5'-AAATAATGCTACGATTTTTCGCATTCATCTCTCCTAAATGATAAATTTTG-3'
M34G+ K35Q for 5'-GAGATGGATGGCCAGATCGTAGCATTATTTCCAG-3'
M34G+ K35Q rev 5'-GCTACGATCTGGCCATCCATCTCTCCTAAATG-3'
noRBS1 for 5'-GTTTAACTTTAAGATATACATATGTCAAAC-3'
noRBS1 rev 5'-CATATGTATACTTAAAGTTAAACAAAATTATTTTC-3'
noRBS2 (K22) for1 5'-GTACTTTAAAGAAGTCAAAAATTTATC-3'
noRBS2 (K22) rev1 5'-GACTTCTTTAAAGTACGTGTTG-3'
noRBS2 (L29+G30) for2 5'-CAAAAATTTATCATCTTGGCGAGATGGATATGAAAATC-3'
noRBS2 (L29+G30) rev2 5'-CATATCCATCTCGCCAAGATGATAAATTTTGACG-3'
I193T for 5`- CAATTGGTACSTTTGGATTTGGTTCGAATTG -3`
I193T rev 5`- GACCAAATCCAAAGGTACCAATTGTTTTGTGTTG -3`
F194V for 5`- CAATTGGTATTGTTGGATTTGGTTCGAATTGG-3`
F194V rev 5`- GACCAAATCCAACAATACCAATTGTTTTGTGTTG-3`
I193T+F194V for 5`- CAATTGGTACCGTGGGATTTGGTTCGAATTG -3`
I193T+F194V rev 5`- GACCAAATCCCACGGTACCAATTGTTTTGTG -3`
F194V+F196A for 5`-CAATTGGTATTGTTGGAGCGGGTTCGAATTGGACAAC-3`
F194V+F196A rev 5`- CCAATTGACCCGCTCCAACAATACCAATTGTTTTGTG-3`
V119I for 5`-CAGCAGGTATAGGATCTGACCATGTAGATTTAG-3`
V119I rev 5`-GTCAGATCCTATACCTGCTGTAATTGCTAATTTTC-3`
V119A for 5`- CAGCAGGTGCGGGATCTGACCATG -3`
V119A rev 5`- CAGATCCCGCACCTGCTGTAATTG -3`
V119G for 5`- CAGCAGGTGGCGGATCTGACCATG -3`
V119G rev 5`- GTCAGATCCGCCACCTGCTGTAATTG -3`
H246N for 5`- GATTACAATTAACGCACCATTAACACCAGAAAC-3`
H246N rev 5`- GTTAATGGTGCCTTAATTGTAATCGCATCAC-3`
Y217T for 5`-САТТАСААСАСАССГАТССААТСААТСААСААГ-3`
Y217T rev 5`- GATTGGATCGGTGTGTTGTAATGTTACATTAATG-3`
D218Q for 5`- САТТАСААСАСТАТСАГССААТСААТСААСААГ-3`
D218Q rev 5`- GATTGATTGGCTGATAGTGTGTAATGTTAC-3`

P219R for 5`-СТАТГАТССГАТСААТСААСААГАССАТАААТТГ-3`
P219R rev 5`- ГТТГАТТГАТССГАТСАТАГТГТТГТААТГТТАС-3`
I220H for 5`-СТАТГАТССАТААТСААСААГАССАТАААТТГТС-3`
I220H rev 5`-СТТГТТГАТТАТГТГГАТСАТАГТГТТГТААТГТТАС-3`
T250H for 5`-САТГАССАТТАСАТССАГАААСТГАТААСТТАТТТГ
T250H rev 5`-САГТТТСТГГАТГТААТГГТГСАТГААТТГТААТС-3`
K368H for 5`-ГТССГАТТГСТАГТСАТАГТТАТАСАГСТАААТААТАГ-3`
K368H rev 5`-СТГТААСТАТАГСТАГСААТАСАГССАСТТГ-3`
TGA+K368H for 5`-ГТССГАТТГСТАГТАССГГССГСАТАГТТАТАСАГСТАААТААТАГ-3`
TGA+K368H rev 5`-СТГТААСТАТАГССГССГГТАСТАГСААТАСАГССАС-3`
AGA+K368H for 5`-ГТГГТССГАТТГСТАГТССГГССГСАТАГТТАТАСАГСТАААТААТАГ-3`
AGA+K368H rev 5`-СТГТААСТАТАГССГССГССГСАСТАГСААТАСАГССАС-3`

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific» Литва)

В микробиологических экспериментах использовали: бактотриптон («Difco», США), дрожжевой экстракт («Difco», США), агар («Difco», США), глицерин (99,9%, «ultra pure») («Panreac», Испания), лизоцим («Fluka/Biochemika», Швейцария), хлорид кальция и хлорид натрия, гидрофосфат калия «ultra pure» («Merck», Германия), антибиотики ампициллин («Синтез», Россия) и хлорамфеникол («Sigma», США), дигидрофосфат натрия «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), питательная среда 2YT с глицерином: (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1,5 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л гидрофосфата калия, рН 7,5, 10 мл/л глицерина), MgSO₄ «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), CaCl₂ «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), тиамин (B1) («Fluka/Biochemika», Швейцария), холин («Fluka/Biochemika», Швейцария), рибофлавин («Fluka/Biochemika», Швейцария), биотин («Fluka/Biochemika», Швейцария), штаммы бактерий *E. coli*: *E. coli* DH5α: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR1* и *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus /pLysS: В F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal λ*(DE3) *endA Hte* [pLysS *argU ileY leuW Cam*^r].

Для очистки белков были использованы следующие реагенты:

Сульфат аммония «х.ч.» («Диаэм», Россия), мочевиная «ч.д.а.» («РеаХим», Россия).

Для диализа: мембрана диализная («Merck», США, MWCO 14 кДа); вода категории milliQ; клипсы диализные, Россия

Электрофорез белков:

Трис («Диаэм», Россия), акриламид («Диаэм», Россия), бис-акриламид («Диаэм», Россия), SDS («Panreac», Испания), глицин («Merck», Германия),

бромфеноловый синий («Sigma», Япония), меркаптоэтанол («Merck», Германия), персульфат аммония («IBI Scientific», США), TEMED («IBI Scientific», США).

Кинетические измерения проводили с использованием:

NAD⁺ с чистотой не менее 99% («AppliChem», Германия), NaЭДТА («Merck», Германия), формиат натрия и дигидрофосфат натрия «ч.д.а.» («РеаХим», Россия).

Для измерения спектров ЯМР: тяжёлая вода 99% D, ос.ч. («Sigma Aldrich», США); ампулы Shigemi («Sigma Aldrich», США), плёнка вспомогательная лабораторная Parafilm M, Bemis, США.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Поиск последовательностей в базах данных

Поиск новых аминокислотных последовательностей производили в базах данных GeneBank (GB), UniProt, поиск по гомологичным последовательностям проводили с использованием The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе BioEdit 7.0.5.3 с использованием алгоритма ClustalW Multiple alignment.

2.2.2. Компьютерное моделирование трехмерных структур

Структуры мутантных форм и фермента дикого типа смоделированы при помощи онлайн-сервера AlphaFold2 [111], ColabFold [112].

Для множественного выравнивания использовали MMseqs2 с 3 циклами уточнения предсказания для каждой из 5 моделей. Наиболее точную модель выбирали по значению pLDDT (тест предсказанной точности на локальном расстоянии, predicted l^oCal distance difference test). Для встраивания молекулы NAD⁺ с последующей оптимизацией пространственного расположения использовали программу Coot [113]. Для визуализации использовали программу PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC).

2.2.3. Направленный мутагенез

Направленный мутагенез с введением точечной замены в ген ФДГ из бактерий *S. aureus* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Для получения фрагментов ДНК с нужной мутацией проводили две последовательные ПЦР. Для проведения первой

ПЦР использовали прямой праймер ФДГ с нужной мутацией (Праймер 1) и обратный стандартный праймер T7 rev (Праймер 2) или обратный праймер ФДГ и прямой стандартный праймер T7 for. В состав реакционной смеси входит: 2,5 мкл ПЦР *Pfu*-буфера с MgSO₄ (20 mM Трис-НCl (рН 8,8 при 25°C), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100), 2 мкл dNTP (2,5 mM), 2 мкл Праймера 1 (10 пкмоль/мкл), 2 мкл Праймера 2 (10 пкмоль/мкл), 1 мкл плазмиды (10 нг/мкл), 15 мкл бидистиллированной воды, 0,15 мкл *Pfu*-полимеразы (10 Ед/мкл). Таким образом, общий объем реакционной смеси составил 25 мкл.

ПЦР проводили в тонкостенных пробирках объемом 200 мкл («Scientific Specialties», США). Инкубировали реакционную смесь при 95°C 5 минут, далее следовало 20 циклов следующей программы: 1-я стадия - 95 °C, 30 с; 2-стадия – температура отжига соответствующего праймера, 1 мин и 3-я стадия - 72 °C, 2 мин, всего 20 циклов. По окончании 20 циклов инкубировали реакционную смесь при 72°C 10 минут. На второй стадии использовали по 2 температуры для каждого праймера (на 1-2 градуса выше и ниже теоретической температуры плавления дуплексов). Для определения T_m использовали эмпирическую формулу (1):

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C) \quad (1)$$

Далее объединяли полученные в результате первой ПЦР фрагменты ДНК гена ФДГ, содержащие нужную замену. Реакционная смесь объединяющей ПЦР имеет следующий состав: 2,5 мкл ПЦР *Pfu*-буфера с MgSO₄, 2 мкл dNTP (2,5 mM), 3 мкл Праймера 1 (10 пкмоль/мкл), 3 мкл Праймера 2 (10 пкмоль/мкл), 2 мкл Праймера T7 for (10 пкмоль/мкл), 2 мкл праймера T7 rev (10 пкмоль/мкл), 10 мкл бидистиллированной воды, 0,15 мкл *Pfu*-полимеразы (10 Ед/мкл). Таким образом, общий объем реакционной смеси составил 25 мкл. Фрагменты после проведения ПЦР были выделены из 1%-ого агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific» Литва) согласно инструкции производителя.

2.2.4. ДНК-электрофорез в агарозном геле

ДНК-электрофорез проводили в Трис-ацетатном буфере (ТАЕ) (40 mM Трис, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА, рН 8,5) в 1% агарозном геле на приборе Microdrive 5 со следующими параметрами: 100 В, 100 Вт, 10 мА. В гель добавляли раствор этидийбромида до конечной концентрации 1,6 мкг/мл. Визуализация ДНК осуществлялась с помощью контактной УФ-лампы при длине волны 302 нм.

2.2.5. Рестрикция фрагментов ДНК

Рестрикцию фрагментов ДНК проводили эндонуклеазами рестрикции EcoRI (10 ед/мкл), HindIII (10 ед/мкл), NdeI (10 ед/мкл). Использовали 10-кратный буфер Red. Инкубировали реакционную смесь с эндонуклеазами рестрикции в течение 1 часа при 37°C в термостате «Гном» («ДНК-Технология», Россия).

Полноту протекания рестрикции анализировали с помощью ДНК-электрофореза в 1% агарозном геле. Отдельные фрагменты ДНК выделяли из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific» Литва) согласно инструкции производителя.

2.2.6. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

В 5 мл питательной среды LB внесли 5 мкл суспензии клеток DH5α или BL(DE3) Codon Plus (разведение 1:1000). Проводили инкубацию в течение ночи при 37°C, 180 об/мин. 1 мл ночной культуры перенесли в 100 мл свежей питательной среды LB (10 г/л бактотриптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl, pH 7,0). Продолжали инкубацию при 37°C, 180 об/мин до поглощения при 600 нм 0,45 – 0,55 ОЕ. Центрифугировали суспензию клеток при 4000 об/мин, +4°C в течение 10 минут. Супернатант удалили, осадок ресуспендировали в 16 мл охлажденного буфера TFB1 (30 mM CH₃COOK, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 15% глицерин, pH 5,8). Повторно центрифугировали, после чего супернатант удалили, осадок клеток ресуспендировали в 4 мл буфера TFB2 (10 mM MOPS free acid, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15% глицерин, pH 6,5). Полученную суспензию аликвотировали по 100 мкл в криовials. Хранили при -80°C.

2.2.7. Лигирование

Для лигирования фрагментов ДНК использовали лигазу фага T4 (1000 Ед/мкл) в 10-кратном лигазном буфере (50 mM Трис-НСl (pH 7,8 при 25°C), 10 mM MgCl₂, 10 mM дитиотреитол, 1 mM АТФ, 25 мкг/мл БСА). В состав лигазной смеси входит: 2 мкл 10х лигазного буфера, 5 мкл ДНК-вектора, 12 мкл ДНК-фрагмента. Реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при температуре 37°C, затем при 0°C (5 мин). После внесения 1 мкл ДНК лигазы фага T4 (1000 Ед/мкл), смесь перемешали пипетированием и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма DH5α.

2.2.8. Трансформация клеток *E. coli* и клонирование

Внесли 10 мкл лигазной смеси или 1 мкл очищенной плазмидной ДНК в 50 мкл компетентных клеток *E. coli* DH5 α . Инкубировали при 0°C в течение 40 минут. После этого клетки подвергли тепловой обработке при 42°C в течение 45 секунд с последующей инкубацией во льду в течение 1 – 2 минут для остановки теплового шока. К суспензии клеток добавили 950 мкл питательной среды 2YT (16 г/л бактотриптон, 10 г/л дрожжевой экстракт, рН 7,0) без антибиотиков. Инкубировали при 37°C в течение часа при периодическом перемешивании в течение 15 с (300 об/мин) каждые 15 минут. Для получения отдельных колоний высевали при помощи стерильного шпателя на твердую питательную среду 2YT (1,2% агар), содержащей антибиотики с концентрациями ампициллина (100 мкг/мл) или канамицина (30 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл) (для штамма BL21(DE3)CodonPlus/pLysS) с использованием двух разведений: 150 и 850 мкл суспензии клеток. Данные действия выполняли в ламинарном шкафу (Safe 2020 1.2, Thermo Scientific, Германия). Чашки Петри термостатировали не более 14 часов при 37°C.

2.2.9. Выделение плазмидной ДНК

Отбирали единичные колонии с чашек Петри с последующим переносом в 4 мл питательной среды 2YT, содержащей антибиотик ампициллин (200 мкг/мл) или канамицин (30 мкг/мл). Пробирки проходили предварительную стерилизацию в сухожарном шкафу (ШС 80-01 СПУ, Россия) при 180°C в течение 2 часов. Пробирки термостатировали при 30°C и постоянном перемешивании со скоростью 180 об/мин. 1,5 мл ночной клеточной культуры переносили в пробирки и центрифугировали со скоростью 5000 об/мин при 4°C в течение 5 минут. Супернатант отделяли и повторяли операцию. Далее выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора «The GeneJET Plasmid Miniprep Kit» («Thermo Scientific», США) согласно инструкции производителя. Полученные образцы ДНК хранили при -20°C.

2.2.10. Секвенирование ДНК

Секвенирование плазмидной ДНК осуществлялось с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 («Perkin Elmer Applied Biosystems», США) дидезокситерминационным методом [114] с последующим

анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК «ABI PRISM 3100-Avant» сотрудниками ЦКП «Геном». Анализ результатов секвенирования и выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы BioEdit.

2.2.11. Экспрессия мутантных форм SauФДГ в клетках *E. coli*

Для экспрессии мутантных форм SauФДГ и фермента дикого типа использовали штамм клеток *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS. Компетентные клетки BL21(DE3)CodonPlus/pLysS трансформировали соответствующей плазмидной ДНК и высевали на чашки Петри с 1,2% агаризованной питательной средой. Затем производили наработку биомассы по стандартной методике.

2.2.12. Трансформация клеток *E. coli* BL21 (DE3)CodonPlus/pLysS для получения штамма-продуцента

Трансформацию клеток *E. coli* BL21 (DE3)CodonPlus/pLysS для получения штамма-продуцента осуществляли по методике, указанной в п.2.2.8.

2.2.13. Культивирование клеток *E. coli* и создание музейной культуры

Отбирали единичные колонии с чашек Петри с последующим переносом в 4 мл питательной среды 2YT, содержащей антибиотика ампициллин (400 мкг/мл) или канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл) в стерильных пробирках. Термостатировали суспензию клеток при 30°C и постоянном перемешивании со скоростью 180 об/мин в течение 12-14 часов. После этого проводили пересев ночной культуры в 25 мл питательной среды 2YT, содержащей антибиотик ампициллин (400 мкг/мл), в соотношении 1:1000. Для этого использовали специальные колбы на 250 мл с отбойниками, обеспечивающими аэрацию культуры клеток. Инкубировали при 37°C и перемешивании со скоростью 120 об/мин. Через 2 часа делали музейную культуру по следующей методике: в криопробирку на 1,5 мл добавили по 150 мкл 100% глицерина и 850 мкл суспензии клеток. Тщательно перемешали. Музейные культуры хранили при -70°C.

Измерение оптической плотности проводили при 600 нм. После достижения оптической плотности 0,5 – 0,8 ОЕ содержимое колбы объемом 25 мл количественно переносили в колбы с отбойниками на 1000 мл, содержащие 225 мл питательной среды без антибиотиков (разведение 1:10). После внесения посевного материала добавляли *antifoam* для предотвращения вспенивания. Инкубировали при 30°C и

перемешивании со скоростью 80 – 90 об/мин до достижения поглощения 0,6 – 0,8 ОЕ.

При достижении необходимого поглощения проводили индукцию лактозой (300 г/л) с конечной концентрации индуктора 20 г/л. Температуру снизили до 20°C и увеличили скорость перемешивания до 100 об/мин. Через 2 часа после добавления лактозы, в каждую колбу внесли раствор формиата (20 г/л) до конечной концентрации 1 г/л. После этого увеличили скорость перемешивания до 120 – 150 об/мин и термостатировали суспензию клеток в течение 12-14 часов. На следующее утро добавили по 9,7 мл смеси, имеющей состав: 40 мл лактозы (300 г/л), 25 мл 50% глицерина, 12,5 мл формиата натрия 3М. Через 2 часа после внесения смеси переместили колбы с культурой клеток в лед.

Для оценки эффективности экспрессии целевого белка отбирали пробы по 500 мкл. Центрифугировали содержимое пробирок в течение 5 минут при 5000 об/мин при +4°C. Супернатант удалили, осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера с лизоцимом (0,1 М натрий-фосфатный буфер, 0,01 М ЭДТА, тритон X-100 0,3% при рН 8,0, лизоцим на конце шпателя). Подвергли однократной процедуре замораживание – оттаивание для разрушения клеточных стенок. Инкубировали при комнатной температуре и постоянном помешивании в течение 40 минут. Отделяли клеточные стенки центрифугированием при максимальной скорости. Измеряли активность ФДГ в надосадочной жидкости. Помимо этого, анализировали полученные бесклеточные экстракты при помощи электрофореза.

Основное содержимое колб центрифугировали при +4°C со скоростью 6000 об/мин в течение 30 минут, центрифуга Eppendorf 5804 R. Удаляли супернатант, остаток ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере с рН 8,0 из расчета 20% клеток по массе. Результат культивирования и экспрессии хранили при -20°C.

2.2.14. Выделение и очистка SauФДГ

Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Ultrasonic (США) с периодическим отбором проб каждые 1 - 2 минуты. Содержимое пробирок центрифугировали в течение 1 минуты при 10 000 об/мин. Супернатант собирали. Для измерения активности ФДГ полученный раствор разводили в 10 – 40 раз натрий-фосфатным буферным раствором. После того, как изменение активности стало

незначительным, прекратили обработку ультразвуком. После этого образец подвергли тепловой обработке при 55°C в течение 10 минут. Центрифугировали с максимальной скоростью при +4°C в течение 30 минут. Супернатант аккуратно переливали в чистую пластиковую пробирку на 50 мл, избегая попадания осадка. К полученному бесклеточному экстракту порционно добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 45% от насыщения (26,2 г на 100 мл раствора [115]). После добавления новой порции аккуратно перемешивали содержимое фалькона. Пробирки переносили в холодильник на несколько часов для формирования осадка. Центрифугировали при тех же условиях, после чего супернатант переносили в чистую пробирку. Доводили концентрацию сульфата аммония до 90% от насыщения (30,6 г на 100 мл раствора с 45% от насыщения [115]) растворением твердой соли. Содержимое пробирки инкубировали при +4°C в течение 2 часов. После этого центрифугировали при тех же условиях. Декантировали супернатант, а осадок растворяли в минимально возможном объеме 45% раствора сульфата аммония. Центрифугировали при тех же условиях до полного осаждения нерастворимых компонентов. На каждой стадии отбирали пробы по 50 мкл для проведения белкового РААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

2.2.15. Хроматографическая очистка фермента

В качестве носителя для колонки Tricorn10/100 Column (GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция) использовали высокозамещенную фенил-сефарозу FastFlow (Amersham Biosciences, Швеция). Перед использованием колонку промывали 0,1 М натрий-фосфатным буферным раствором с 0,01 М NaЭДТА pH 7,0, после чего заполняли колонку раствором 45% сульфата аммония в натрий-фосфатном буфере. Наносили раствор белка на колонку и промывали 45% раствором сульфата аммония до выхода показаний датчиков проводимости и UV хроматографа (GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция) на базовую линию. Белок элюировали в нисходящем градиенте концентрации сульфата аммония от 45% до 0%. Объем градиента 100 мл, скорость элюирования 1 мл/мин. Фракции по 5 мл собирали в автоматическом режиме. Измеряли поглощение при 280 нм (D_{280}) и ферментативную активность (A) каждой фракции. Фракцию с максимальным значением A/D_{280} по 1 мл наносили на колонку Sephadex G25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) со скоростью 0,5 мл/мин.

Белок элюировали 0,1 М натрий-фосфатным буферным раствором с рН 7.0 со скоростью 1 мл/мин.

2.2.16. Диализ

Диализ проводили в буферном растворе (50 мМ натрий-фосфатный буферный раствор, рН 6,9) при температуре 5°C в течение суток и перемешивании буферного раствора при помощи магнитной мешалки.

2.2.17. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях

Электрофорез белков в денатурирующих условиях проводили в полиакриламидном геле на приборе Miniprotean II фирмы «Bio-Rad» (США). В эксперименте использовались растворы, представленные в таблице 2.2.17.

Таблица 2.2.17.

Основные компоненты полиакриламидного геля.

Раствор	Состав
Нижний буфер, рН 8,8	Трис 81,2 г/л, 4,0 г/л SDS
Верхний буфер, рН 6,8	Трис 60,4 г/л, 4,0 г/л SDS
Электродный буфер	Трис 12,1 г/л, глицин 7,5 г/л, SDS 1,0г/л
Смесь АА/БАА	30% акриламид и 0,8% бис-акриламид
Буфер для нанесения образцов	Верхний буфер 2,5 мл, глицерин 2,0 мл, 10% SDS 3,0 мл, бромфеноловый синий 0,2 г, меркаптоэтанол 0,3 мл, деионизованная вода 2,2 мл
Концентрирующий гель (5%)	Верхний буфер 625 мкл, акриламид/ бис-акриламид 375 мкл, 25% персульфат аммония 7,5 мкл, ТЕМЕД 7,5 мкл, деионизованная вода 1,5 мл
Разделяющий гель (12%)	Нижний буфер 1,25 мл, акриламид/бис-акриламид 2,0 мл, 25% персульфат аммония 10 мкл, ТЕМЕД 10 мкл, деионизованная вода 1,75 мл

Перед проведением белкового РААГ-электрофореза в денатурирующих условиях пробы разбавляли 4х-кратным буфером для нанесения образцов с конечной концентрацией ФДГ 1 Ед/мл. Смесь инкубировали при 95°C в течение 15 минут в термостате «Гном» («ДНК-Технология», Россия).

Проводили белковый электрофорез при напряжении 60 В до захода фронта в нижний гель, после чего напряжение увеличили до 150 В. Визуализировали белки окрашиванием Кумасси R-250 (2,5 г/л краситель Кумасси R-250, 45% метанол, 10%

уксусная кислота) при постоянном помешивании в течение 40 минут. Окрашенный гель отмывали смесью (45% метанол, 10% уксусная кислота).

2.2.18. Определение активности ФДГ

Активность формиаатдегидрогеназы определяли на спектрофотометре UV-1800 фирмы «Shimadzu» при 30°C и длине волны 340 нм по увеличению поглощения NADH ($\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Измерения проводили в 0,1 М NaPB, pH 7,0. Концентрации формиата натрия и NAD⁺ в кювете спектрофотометра составляли 2 мМ и 3,77 мМ соответственно.

2.2.19. Определение констант Михаэлиса

Определение констант Михаэлиса по NAD⁺ и формиату проводили, изучая зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации одного из субстратов в условиях насыщения по второму субстрату. Точные концентрации исходных растворов NAD⁺ определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм ($\epsilon_{260}=17800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Точную концентрацию формиата натрия определяли по навеске. Насыщающие концентрации различались для отдельных мутантных форм. Измерения проводили при 30°C 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».

2.2.20. Определение концентрации белка по методу Бредфорда и определение каталитической константы

Для расчета каталитической константы определяли концентрацию ФДГ по методу Бредфорда [116]. Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы БСА в соответствии с таблицей 2.2.20.

Таблица 2.2.20.

Стандартные растворы БСА для построения калибровочного графика.

№ п/п	Объем 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7.0, мкл	Объем и концентрация добавляемого раствора БСА, мкл	Конечная концентрация БСА, мкг/мл
1	1800	200 мкл, р-р БСА 10 мг/мл	1000
2	1800	200 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	100
3	1900	100 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	50

№ п/п	Объем 0,1 М натрий-фосфатного буфера, рН 7.0, мкл	Объем и концентрация добавляемого раствора БСА, мкл	Конечная концентрация БСА, мкг/мл
4	1950	50 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	25
5	1800	200 мкл, р-р БСА 100 мкг/мл из пробирки 2	10
6	1900	100 мкл, р-р БСА 100 мкг/мл из пробирки 2	5
7	1950	50 мкл, р-р БСА 100 мкг/мл из пробирки 2	2,5

В кювету помещали 500 мкл реагента Бредфорда и 500 мкл стандартных и испытуемых образцов. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 – 30 минут. Измеряли поглощение при 595 нм. Построили градуировочный график и с его помощью рассчитали концентрацию ФДГ в неизвестном образце. Проводили нормирование по буферному раствору без внесения БСА.

Значения каталитических констант определяли как тангенс угла наклона прямой на графике зависимости активности от концентрации белка методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.0.

2.2.21. Определение констант скорости термоинактивации

Термостабильность фермента измеряли в 0,1 М натрий-фосфатном буфере рН 7,0 с 0,01 М ЭДТА. Для каждого эксперимента готовили серию из 10 пластиковых пробирок объемом 0,5 мл по 70 мкл раствора фермента (приблизительно 1 Ед/мл). Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат. Через определенные промежутки времени отбирали пробы и переносили в лед на 20 с, после чего пробирку центрифугировали с максимальной скоростью в течение 1 минуты. Остаточную активность ФДГ измеряли согласно методике, описанной в п.2.2.18. Константу скорости термоинактивации k_{in} определяли как тангенс угла наклона прямой (график зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени) методом линейной регрессии, используя программу «Origin Pro 8.0».

2.2.22. Определение активационных параметров термоинактивации формиатдегидрогеназы

Активационные параметры ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger определяли графическим методом из температурной зависимости константы скорости термоинактивации $\ln(k_{in}/T) - 1/T$, на основании уравнения теории активированного комплекса:

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

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

2.2.23. Измерение ЯМР спектров

2D-спектры $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC и $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ SOFAST-HMQC измеряли на приборе Bruker Avance с рабочей частотой 700 МГц, оборудованном датчиком Prodigy, расположенном в Российском университете дружбы народов (Москва).

3D-спектры измерены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой 700 МГц, 45°C, оборудованном крио-датчиком, расположенном в Институте Физики Казанского Федерального Университета.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Изучение влияния N-концевой последовательности на уровень экспрессии и свойства рекомбинантной SauФДГ

В работе [87] было показано, что аннотация генома *S. aureus* предполагает существование гена ФДГ в двух вариантах, для которых белок начинается с разных остатков метионина. Методом сайт-направленного мутагенеза были сконструированы плазмидные вектора, содержащие последовательности, кодирующие как удлиненную форму *Saufdh1*, так и укороченную *Saufdh2*. Согласно данным MALDI TOF TOF спектрометрии, образцы, полученные при экспрессии обеих форм, имели одинаковую аминокислотную последовательность и содержали укороченный на 33 аминокислоты N-конец. Причина данного явления может заключаться как в пост-трансляционной модификации, так и в особенностях трансляции гена *Saufdh1* в штамме продуценте BL21(DE3)CodonPlus/pLysS.

Согласно представленным в таблице 3.1.1. данным выход фермента по активности при экспрессии укороченной формы *Saufdh2* превышает данный показатель для удлиненной формы *Saufdh1* примерно в 2 раза в связи с большим выходом целевого белка по массе (рис. 3.1.3., дорожки 1–4). Это может быть обусловлено меньшей длиной последовательности *Saufdh2* и косвенно указывать на пост-трансляционную модификацию.

Поскольку в SauФДГ отсутствуют первые 33 аминокислоты, пост-трансляционная модификация может заключаться в протеолизе по 33-35 положениям. На основании выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников было предложено несколько вариантов модификации в данной области (рис. 3.1.1.). Рамками выделены области, содержащие Met1 и Met34. Подчеркиванием отмечены вводимые замены. Таким образом, было предложено ввести замены M34A, K35A, D33N+M34A и M34G+K35Q.

Помимо основного предположения о пост-трансляционной модификации, провели исследование влияния N-концевой последовательности на экспрессию формиаатдегидрогеназы в *E. coli*.

Во-первых, штамм-продуцент и организм, являющийся источником гена формиаатдегидрогеназы могут значительно различаться метаболическими

процессами и, как следствие этого, частотой встречаемости кодонов. Таким образом, может не оказаться достаточного количества т-РНК из-за чего экспрессия пройдет с более низким выходом. В последовательности *Saufdh1* следующим после стартового Met1 является кодон ТСА у серина. Однако, для штамма продуцента *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS наиболее распространен кодон АGC. Молчащая замена кодона ТСА на другой (Рис. 3.1.2.), как мы ожидаем, может привести к увеличению уровня экспрессии ФДГ.

Во-вторых, проанализировав нуклеотидную последовательность данного фрагмента гена, было обнаружено, что в гене ФДГ присутствует нуклеотидная последовательность схожая с последовательностью RBS (рибосом-связывающий сайт) в векторе pET24a(+), выделенная на рис. 3.1.2. серым цветом. Было сделано предположение, что при экспрессии удлиненной формы гена, рибосома могла ошибочно связываться с аналогичной последовательностью в гене и, таким образом, получается укороченная форма гена. Для того чтобы проверить данное предположение произвели делецию сайта RBS в векторе (noRBS1).

Во втором случае провели молчащие замены, не влияющие на аминокислотную последовательность белка, и при этом, не допускающие наличие нуклеотидной последовательности, похожей на RBS. Чтобы исключить проблему неоптимальности кодонов, мутантная форма была получена на основе плазмиды с молчащей заменой S2 – noRBS2 (S2+K22+L29+G30).

Плазмидные ДНК с заменами в гене *Sau*ФДГ трансформировали в клетки *E. coli* BL21 (DE3 Codon Plus/pLysS). Нарработку биомассы и экспрессию проводили по ранее указанным в пп.3.2.12. – 3.2.13. методикам. Результаты экспрессии мутантных форм и фермента дикого типа представлены в табл. 3.1.1.

Из рис. 3.1.3.А (дорожки под номерами 7 – 8), 3.1.3.Б (3 – 4) и 3.1.3.В (3 – 4) видно, что замены в 34 положении у мутантных форм M34A, D33N+M34A, а также M34G+K35Q привели к отсутствию целевого белка в растворимой фракции. Данные мутантные формы экспрессируются в нерастворимой фракции (рис. 3.1.4.).

		1			32 33 34 35
SauФДГ 1	DNA:	atg	caaacggtgcc // t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatg GATATGAAA atcgtagca
	enz:	M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·E·M·D·M·K·I·V·A·		
SauФДГ M34A	DNA:	atg	caaacggtgcc // t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatggat GCG aaaatcgtagca
	enz:	M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·E·M·D·A·K·I·V·A·		
SauФДГ D33N+M34A	DNA:	atg	caaacggtgcc // t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatg AATGCG aaaatcgtagca
	enz:	M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·E·M·N·A·K·I·V·A·		
SauФДГ K35A	DNA:	atg	caaacggtgcc // t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatggatg GCG atcgtagca
	enz:	M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·E·M·D·M·A·I·V·A·		
SauФДГ M34G+K35Q	DNA:	atg	caaacggtgcc // t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatggat GGCCAG atcgtagca
	enz:	M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·E·M·D·G·Q·I·V·A·		

Рис. 3.1.1. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ дикого типа и предполагаемых мутантных форм с модификацией предполагаемого сайта расщепления на N-конце.

		RBS фага T7		1 2		22		29 30
SauФДГ 1	DNA:	t	ttaag AAGGAG atatacatatggctagc atgTCA aacggtgcc // t	t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatg TTAGGA		
	enz:		делекция	M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·			
SauФДГ noRBS1	DNA:	t	ttaag-----atatacatatggctagc atg tcaaacggtgcc // t	t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatg		
	enz:			M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·			
SauФДГ noRBS2	DNA:	t	ttaag AGC aacggtgcc // t	t	ttaaggaagtcaaaat	ttatcatttaggagagatg CTTGGC		
	enz:			M	S·N·G·A // F·K·E·V·K·I·Y·H·L·G·			

Рис. 3.1.2. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ дикого типа и предполагаемых мутантных форм с удалением сайта RBS в векторе и изменением аналогичной последовательности в гене.

Таблица 3.1.1.

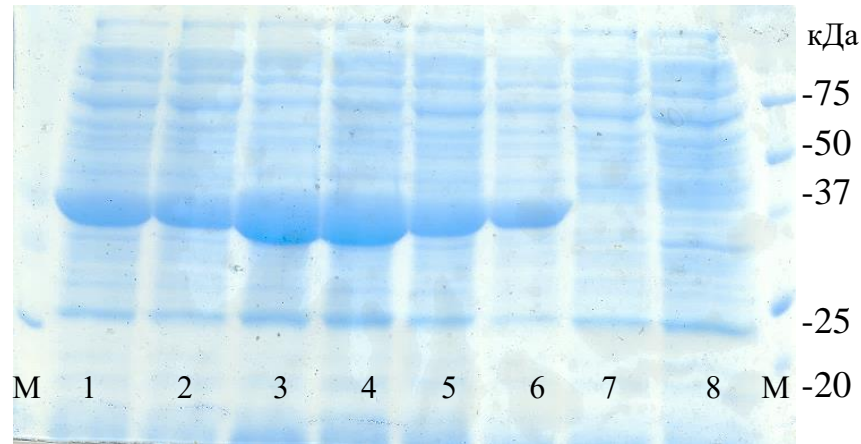
Результаты экспрессии мутантных форм и фермента дикого типа.

Фермент	Выход фермента по активности, Ед./л среды	Выход биомассы, г/л среды
SauФДГ1	3000	20
SauФДГ2	5866	17
SauФДГ S2	2808	16
SauФДГ M34A	-	-
SauФДГ1	1543	16
noRBS1	-	-
D33N+M34A	-	-
SauФДГ1	2997	23
K35A	1996	20
M34G+K35Q	-	-
SauФДГ1	3048	19
noRBS2	1564	39,8

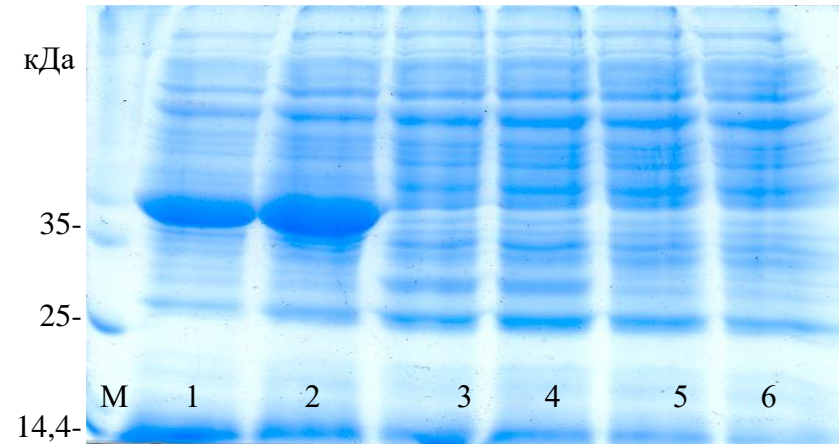
По результатам MALDI TOF TOF спектрометрии ферменты содержат недостающие 33 аминокислотных остатка на N-конце. Таким образом, при экспрессии мутантных форм с заменами в 34 положении получается полноразмерный вариант SauФДГ1.

Индивидуальная замена K35A приводит к снижению уровня экспрессии по сравнению с SauФДГ1 (рис. 3.1.3.В., 5 – 6) однако не препятствует модификации белка так как образец не имеет удлиненной N-концевой области. Соответственно именно 34 положение играет ключевую роль в данном явлении.

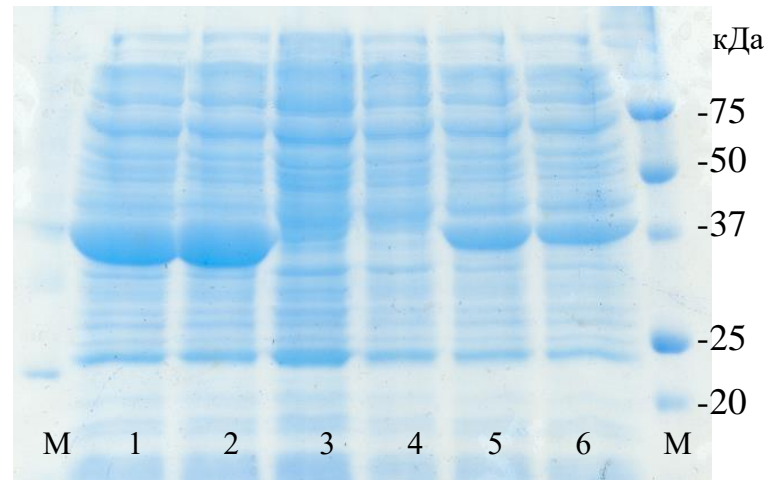
В случае делеции RBS в векторе pET24a(+) (рис. 3.1.3.Б, дорожки 5 – 6) экспрессии целевого продукта не наблюдается. Таким образом, было опровергнуто предположение, что экспрессия начинается в области ложного RBS.



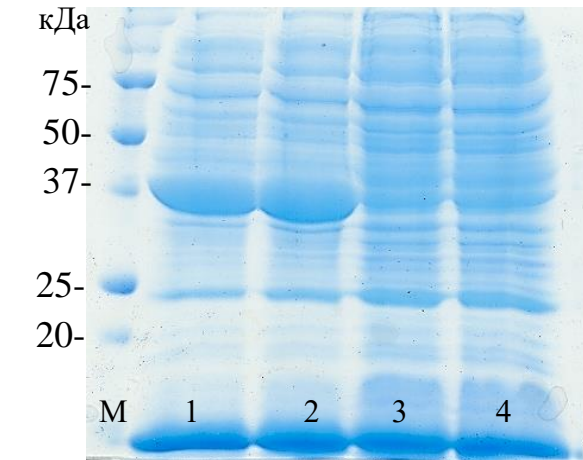
А



Б



В



Г

Рис. 3.1.3. ПААГ-электрофорез клеточного лизата после культивирования, М – маркер молекулярной массы, кДа, (А) 1,2 – SauФДГ1; 3,4 – SauФДГ2, 5,6 – SauФДГ S2, 7,8 – SauФДГ M34A; (Б) 1,2 – SauФДГ1; 3,4 – SauФДГ D33N+M34A; 5,6 – SauФДГ noRBS1; (В) 1,2 – SauФДГ1, 3,4 – SauФДГ M34G+K35Q, 5,6 – SauФДГ K35A; (Г) 1,2 – SauФДГ1, 3,4 – noRBS2.

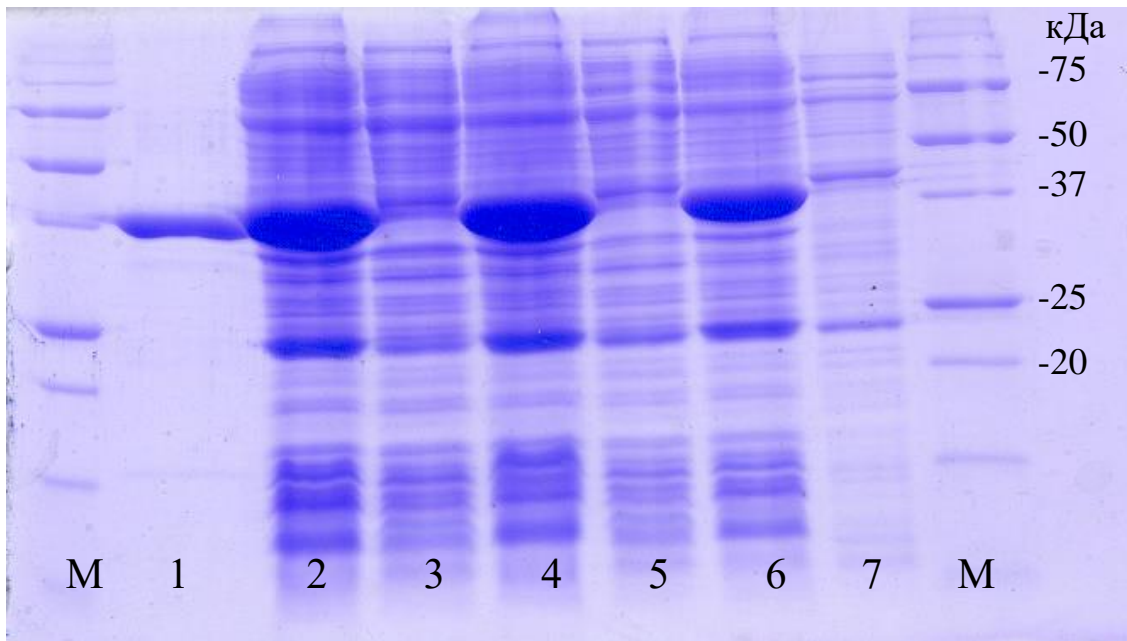


Рис. 3.1.4. Экспрессия мутантных форм, содержащих замену в 34 положении, где М – маркер молекулярной массы, кДа, 1 – SauФДГ2, 2,3 – SauФДГ М34А клеточный лизат с нерастворимой фракцией, только растворимая фракция соответственно, 4,5 – D33N+M34А клеточный лизат с нерастворимой фракцией, растворимая фракция, 6,7 – М34G+K35Q клеточный лизат с нерастворимой фракцией, растворимая фракция.

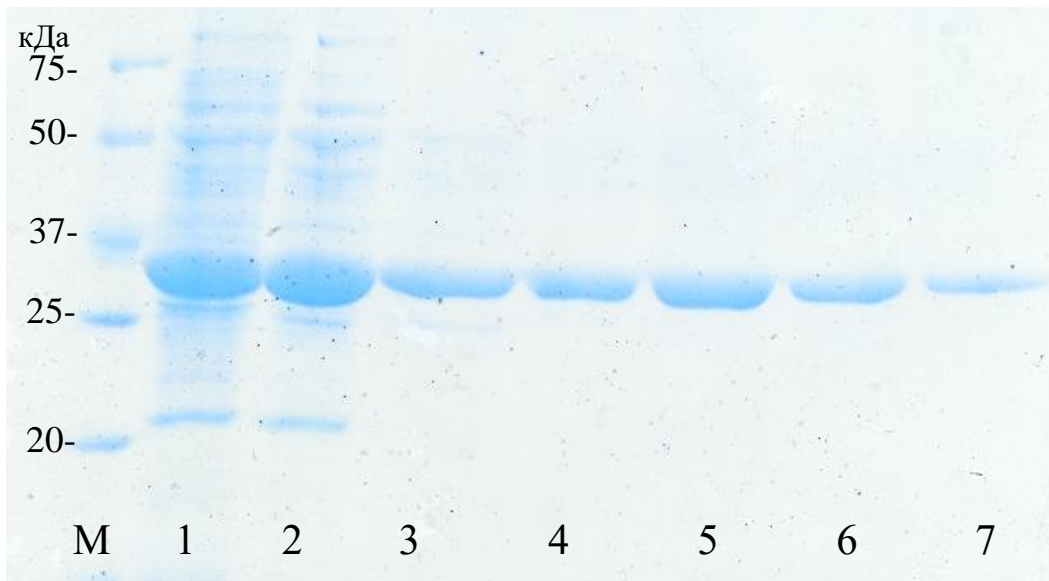


Рис. 3.1.5. Последовательные стадии очистки мутантной формы SauФДГ K35A, М – маркер молекулярной массы, кДа, 1 – лизат клеток после экспрессии (растворимая фракция), 2 – термообработка при 55°C в течение 15 мин, 3 – осаждение в 45% сульфате аммония, 4-6 – отдельные фракции, собранные в процессе гидрофобной хроматографии, 7 – образец белка после гель-фильтрации.

При экспрессии SauФДГ S2 и noRBS2 (S2+K22+L29+G30), наблюдается снижение общего выхода целевого белка (рис. 3.1.3.В., дорожки 3 – 4, таблица

3.1.1.). Мутантные формы SauФДГ S2, noRBS2, согласно результатам MALDI TOF TOF не содержат удлиненного N-концевого фрагмента.

Очистку мутантной ФДГ с заменой K35A, а также SauФДГ2 из бактерий *S. aureus* осуществляли по стандартной методике, описанной в п.2.2.14. и контролировали методом РААГ-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 3.1.5.). Хроматографическая чистота полученных образцов белка составила не менее 95%. Полученные образцы использовались для характеристики каталитических свойств. Численные значения констант Михаэлиса и k_{cat} представлены в таблице 3.1.2.

Таблица 3.1.2.

Кинетические свойства полученных мутантных формиатдегидрогеназ (0,1 М NaPB, 0,01 М ЭДТА, pH 7,0).

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, μМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
SauФДГ1	20,0±1,0	220±10	130±10	500±20	1180±80
SauФДГ2	19,0±1,0	224±20	126±10	540±30	1290±80
SauФДГ K35A	27,1±1,3	340±20	42±5	680±40	1750±90
SauФДГ S2	17,9±0,9	230±20	75±4	н/д	н/д

Как видно из таблицы 3.1.2., каталитические свойства SauФДГ1 и SauФДГ2 идентичны. Это коррелирует с данными тандемной MALDI/TOF/TOF спектроскопии. Однако, в случае мутантной формы SauФДГ S2, основная суть которой – было введение молчащей замены, привела к снижению константы Михаэлиса по формиату примерно в 2 раза. Достоверную причину данного явления можно было бы установить при получении экспериментальной структуры методом РСА, однако этого не проводилось поскольку $K_M^{NAD^+}$ идентична ферменту дикого типа.

На рис. 3.1.6. показан фрагмент экспериментальной структуры (6ТТВ) в области K35. Как видно, данный остаток участвует в образовании как электростатических взаимодействий с остатками E69 и D86, так и водородной связи с остатком H83.

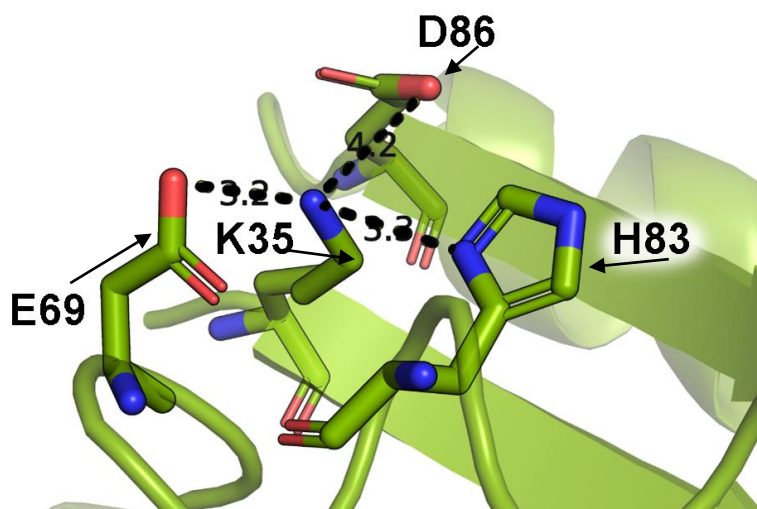


Рис. 3.1.6. Фрагмент структуры SauФДГ (PDB 6TTV) в N-концевой области.

Замена в 35 положении приводит к уменьшению константы Михаэлиса по формиату, а также к увеличению k_{cat} в 1,36 раза. Однако при этом, константа Михаэлиса по NAD^+ возросла в 1,5 раза. Вероятно, замена положительно заряженного остатка лизина на незаряженный остаток аланина, приводит к нарушению упомянутых ранее взаимодействий и изменению конформации в каталитическом домене.

Исследование термостабильности SauФДГ1, SauФДГ2 и SauФДГ K35A осуществляли при пяти различных температурах в диапазоне 62 – 70°C согласно пп. 3.2.21. – 3.2.22. На рисунке 3.1.7. представлены температурные зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации для всех полученных мутантных форм и фермента дикого типа в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$ для 64°C. Используя теорию активированного комплекса, рассчитали значения термодинамических параметров (рис. 3.1.8., таблица 3.1.2.).

Как видно, тангенсы угла наклона для кривых SauФДГ1, SauФДГ2 на рис. 3.1.7. близки, тогда как замена K35A вызывает заметное снижение термостабильности. При этом, в таблице 3.1.2. показаны термодинамические параметры для SauФДГ1, SauФДГ2, совпадающие в пределах погрешностей, таким образом, некоторые отличия в значениях k_{in} , измеренных при одной температуре не являются критичными.

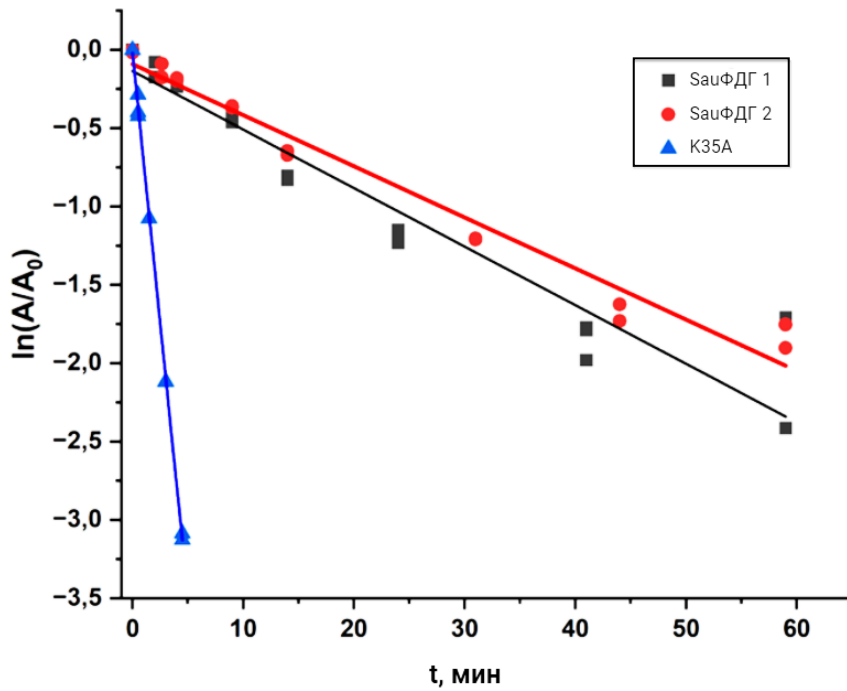


Рис. 3.1.7. Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для фермента дикого типа и мутантной формы при 64°C, 0,1 М NaPB, 0,01 М NaЭДТА, pH 7,0.

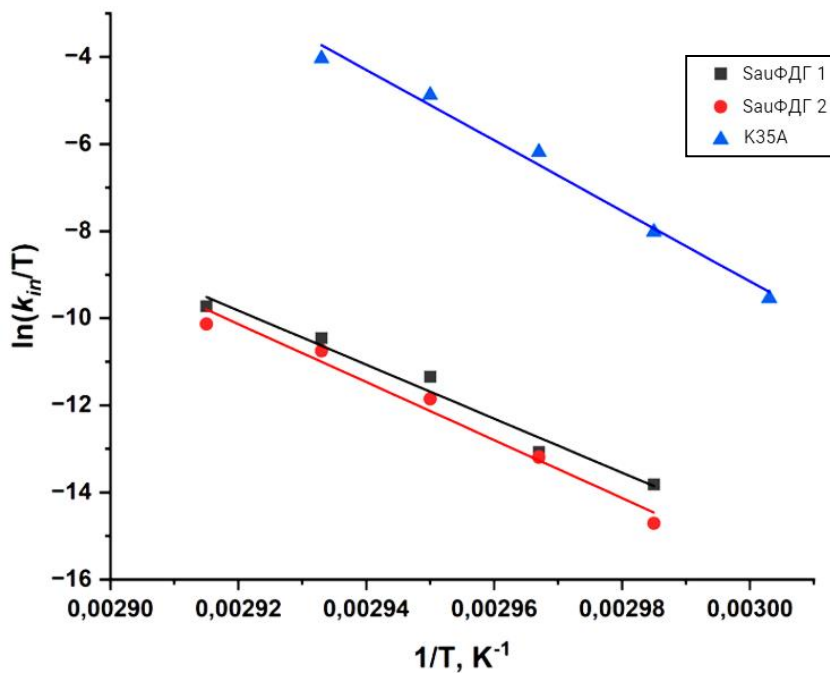


Рис. 3.1.8. Зависимость констант скорости термоинактивации SauФДГ от температуры в координатах $[\ln(k_{in}/T)] - 1/T$ для фермента дикого типа и мутантных форм.

3.2. Исследование влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ

Отличительной особенностью формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* являются высокая k_{cat} и выдающиеся показатели

термостабильности. Однако высокое значение константы Михаэлиса по дорогостоящему никотинамидному кофактору (в данном случае NAD^+) ограничивает возможное использование ФДГ в качестве важного компонента регенерации никотинамидных кофакторов в тонком органическом синтезе. В связи с этим, возникает необходимость исследования влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ.

3.2.1. Определение каталитических параметров

Фосфатный буфер является стандартным при определении каталитических параметров формиатдегидрогеназ из различных источников [1]. В таблице 3.2.1.1. представлены значения каталитических констант и констант Михаэлиса по NAD^+ ($K_M^{\text{NAD}^+}$) для wt-SauФДГ (здесь и далее фермент соответствует белку, полученному при экспрессии *Saufdh1*) в различных буферных системах, полученных на основе NaPB с добавлением органических компонентов. Величина константы Михаэлиса по формиату в исследованных буферах не изменялась, поэтому значения $K_M^{\text{HCOO}^-}$ в таблице не приведены. Из таблицы 3.2.1.1. видно, что как состав буфера, так и его концентрация (общая и отдельных компонентов) оказывают заметное влияние на k_{cat} и $K_M^{\text{NAD}^+}$. В случае натрий-фосфатного буфера увеличение концентрации раствора от 0,05 до 0,1 М приводит к увеличению k_{cat} на 25% при неизменном значении $K_M^{\text{NAD}^+}$. Дальнейшее увеличение концентрации буфера до 0,4 М оказывает противоположный эффект – каталитическая константа остается постоянной, а величина константы Михаэлиса по NAD^+ возрастает более, чем на 35%. В целом, введение в буфер дополнительных компонентов, таких как Gly, цитрат и Tris приводит к изменению каталитических параметров, однако четких закономерностей не наблюдается. В двойных буферах 0,1 М NaPB+0,5 М Gly и 0,1 М NaPB+0,5 М Tris, наблюдается самое большое увеличение значения константы Михаэлиса по NAD^+ , причем в случае двойного буферного раствора с Gly эффект наиболее сильный. В то же время в тройном буфере 0,1 М NaPB-Tris-Gly величина $K_M^{\text{NAD}^+}$ на 10% меньше таковой в 0,1 М NaPB буфере. Наличие цитрат-иона в двойных и тройных буферах приводит к уменьшению каталитической константы. Наиболее интересные результаты были получены при использовании четырехкомпонентных буферов. В случае 0,05 М NaPB-Cit-Tris-Gly значение каталитической константы возросло до 37 с^{-1} (увеличение на 85% по сравнению с 0,1 М NaPB). Дальнейшее

повышение концентрации всех компонентов четверного сложного буфера до 0,1 М улучшает константу Михаэлиса по NAD^+ в 1,5 раза и, хотя каталитическая константа по сравнению с предыдущим буфером 0,05 М NaPB-Cit-Tris-Gly уменьшается с 34 до 27 с^{-1} , эта величина все равно остается более высокой по сравнению со значением для стандартной системы 20 с^{-1} (таблица 3.2.1.1.).

Таблица 3.2.1.1.

Каталитические параметры рекомбинантной SauФДГ 1 в различных буферных системах, (рН 7,0, 30°C).

Буферный раствор	$k_{\text{cat}},^*$ с^{-1}	$K_M^{\text{NAD}^+}$, μM
0,05 М NaPB	15	223±15
0,1 М NaPB	20	220±17
0,4 М NaPB	21	300±50
0,1 М NaPB+0,5 М Gly	20	604±72
0,1 М NaPB+0,5 М Tris	18	397±50
0,1 М NaPB-Tris-Cit	15	242±23
0,1 М NaPB-Tris-Gly	20	194±13
0,1 М NaPB+0,25М Tris-Gly	20	225±15
0,1 М NaPB-Cit-Gly	16	332±29
0,025 М NaPB-Cit-Tris-Gly	14	285±30
0,05 М NaPB-Cit-Tris-Gly	34	210±20
0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly	27	143±6

**Примечание:* Среднее значение из трех экспериментов. Ошибка определения не более 10%

В обоих случаях термоинактивация фермента протекает по мономолекулярному механизму, поэтому в качестве меры термостабильности фермента при данных условиях можно использовать значение наблюдаемой константы скорости термоинактивации первого порядка. Использование комбинированной буферной системы не только улучшает кинетические параметры фермента, но и приводит к повышению термостабильности (снижению константы скорости термоинактивации) в 3,8 раза. Однако следует отметить, что более высокая стабильность SauФДГ в 0,1 М комплексном буфере NaPB-Cit-Tris-Gly по сравнению с 0,1 М NaPB не является специфическим эффектом присутствия органических соединений, а связано с увеличением концентрации солей. В работе [87] было показано увеличение термостабильности при увеличении концентрации натрий-фосфатного буферного раствора.

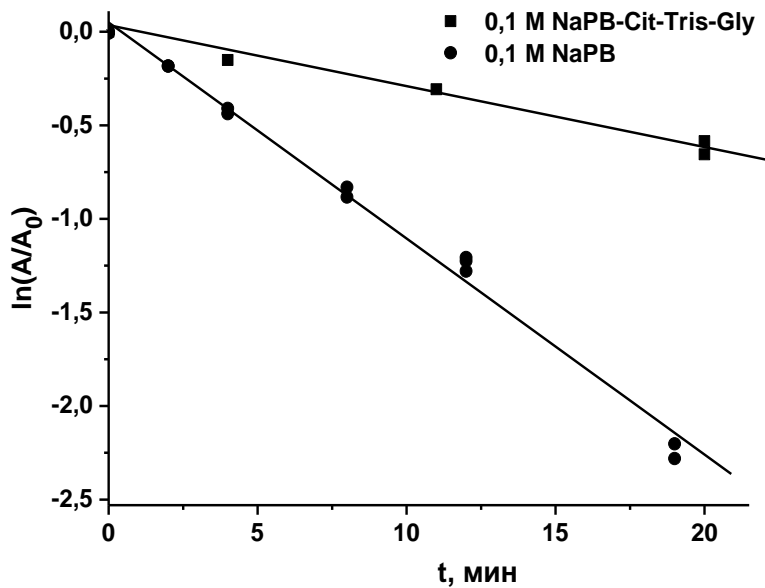


Рис. 3.2.1.1. Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для фермента дикого типа в 0,1 М натрий-фосфатном и 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly буферных растворах, pH 7,0, 64°C. В дополнение к кинетическим исследованиям мы сравнили термостабильность в стандартном 0,1 М фосфатном буфере и в 0,1 М комплексном буфере NaPB-Cit-Tris-Gly при 64°C и pH 7,0 (Рис.3.2.1.1.).

Результаты проведенных экспериментов однозначно свидетельствуют о влиянии концентрации и состава используемого буферного раствора на каталитические параметры SauФДГ. Однако каких-либо закономерностей выявить не представляется возможным. Тем не менее, использование комплексного буферного раствора, в который входят фосфат натрия, цитрат, трис и глицин позволяют снизить константу Михаэлиса по NAD^+ (таблица 3.2.1.1.).

Улучшение каталитических параметров SauФДГ в комбинированном буфере NaPB-Cit-Tris-Gly может быть связано как с взаимодействием компонентов буфера с определенными участками всей белковой глобулы, так и со специфическим взаимодействием с аминокислотными остатками в активном центре. Наиболее перспективной представляется вторая гипотеза, поскольку при взаимодействии отдельных компонентов буфера с участками белковой глобулы должна меняться термостабильность. Однако данные по термоинактивации свидетельствуют, что повышение термостабильности связано с повышением ионной силы раствора. В пользу специфических взаимодействий в активном центре свидетельствуют результаты сравнения структуры SauФДГ в комплексе с NAD^+ (PDB: 6ТТВ) и холо-

формы PseФДГ (PDB: 2NAD) (Рис. 1.2.4.5.). В известных ФДГ в свободной форме активный центр фермента представляет большую полость, в которой находятся молекулы воды и компоненты буфера. При образовании комплекса с субстратами (переход в холо-форму) активный центр фермента закрывается с удалением из него молекул растворителя и компонентов буфера. Закрытая конформация активного центра хорошо видна в структуре холо-формы ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 (рисунки 1.2.4.2. – 1.2.4.4.). Из рисунка 2.2.4.4. следует, что молекула кофермента находится внутри «закрытого» активного центра. Доступной растворителю остается только аминогруппа при С6 атоме углерода аденозина. В структуре PDB: 6TTV (получена при кристаллизации SauФДГ с NAD^+) левая субъединица соответствует апо-форме – в ней нет связанного кофермента и активный центр находится в открытой конформации, а правая субъединица соответствует холо-форме, поскольку в ее активном центре находится молекула NAD^+ (Рис. 1.2.4.5.) однако этот активный центр не является полностью закрытым как это реализовано в холо-форме PseФДГ (Рис. 1.2.4.4.). «Неполное закрытие» активного центра SauФДГ при связывании с NAD^+ означает, что молекулы растворителя и компоненты буфера могут находиться в активном центре и холо-формы, и, таким образом, оказывать влияние на эффективность связывания кофермента. Отсутствие влияния использованных в комплексных буферах соединений на константу Михаэлиса по формиату, по-видимому, связано с тем, что их размеры намного больше размеров формиат-иона и поэтому они просто не могут проникать к участку связывания этого субстрата.

3.3. Белковая инженерия формиатдегидрогеназы из *S. aureus*

3.3.1. Влияние консервативного мотива $\text{X}_1\text{G}(\text{A})\text{X}_2\text{GRX}_3\text{G}$ на свойства фермента

Последовательность $\text{X}_1\text{G}(\text{A})\text{X}_2\text{GRX}_3\text{G}$, высококонсервативный мотив «finger print» характерен для широкого круга дегидрогеназ, имеющих специфичность к никотинамидным кофакторам [29]. Он располагается в кофермент-связывающем домене и играет ключевую роль в каталитической функции формиатдегидрогеназы. Поэтому, он был проанализирован нами в первую очередь. На рисунке 3.3.1.1. показан фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из различных источников в области этого мотива.

193 194 196

PseФДГ	HEWARKGGWNIADCVSHAYDLEAMHVG	TVAAG RI	GLAVLRRLAPFDVH-LHYTDRHRLPES	229
SauФДГ	HRQSVEGEWNLQVGNHAHELQHKTI	IFGF RI	QQLVAERLAPFNVTLQHY-DPIN----	189
SsiФДГ	HRQSEEGGWNLQVTNHAFAFELQNKTI	IFGL RI	GRLVGERLKPFDVNDIIHY-RRSS----	190
SsaФДГ	HRQSYDGEWHLSKVGGEHAHDIQHKKI	IFGY QI	GELVAQRLQPFQVQHF-RRSS----	189
SeqФДГ	HRQSYNGEWNLQVGNHAHDLQHKKI	IFGY QI	GELVAERLQPFQVQHY-RRSS----	189
BstФДГ	HAIAQQGGWNIADCVSRSYDVEGMHFG	TVGAG RI	GLAVLRRLKPFGLH-LHYTQRHRLDAA	230
BpeФДГ	YQCVLDGGWNIADCVARSYDLEGMQV	--- GAG RI	GSAVLRRLKPFQVQHF-LHYTDQHRLPAA	226
GmaФДГ	HKIAEEGGWNIADCVSRSYDLEGMHVG	TVAAG RI	GLAVLRRLKPFQVQHF-LHYTARHRSRA	229
LpnФДГ	YNTVIDGGWNIADCVSRSYDLEGMQV	CVAAG RI	GLAVLRRLKPFQVQHF-LHYTDRHRLPLH	234
MorФДГ	HDWARNGGWNIADCVARSYDVEGMHVG	TVAAG RI	GLRVLRLKPFQVQHF-LHYTDRHRLPEA	229

Рис. 3.3.1.1. Участок выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников с выделенным консервативным мотивом G(A)XGXXG, где PseФДГ – *Pseudomonas* sp.101 (P33160), SauФДГ – *Staphylococcus aureus* (A0A266CVV8), SsiФДГ – *Staphylococcus simulans* (A0A418J355), SsaФДГ – *Staphylococcus saprophyticus* (A0A4Y9KMF1), SeqФДГ – *Staphylococcus equorum* (A0A7T9NCC7), BstФДГ – *Burkholderia stabilis* (B5A8W5), BpeФДГ – *Bordetella pertussis* (A0A171JVB9), GmaФДГ – *Granulicella mallensis* (G8NVB5), LpnФДГ – *Legionella pneumophila* (A0A3A6W2S5), MorФДГ – *Moraxella* sp. (O08375). Сверху отмечены номера значимых для SauФДГ остатков.

Ранее в нашей лаборатории было проведено исследование влияния замены F196A на каталитические свойства, где 196 положение – X₂. Практически все ФДГ в этом положении содержат Ala (бактерии, дрожжи и растения) и Val (грибы) (рис. 3.3.1.1.). Поэтому было решено сделать мутант с заменой F196A, чтобы данный мотив приблизился к канонической последовательности. При этом значение $K_M^{NAD^+}$ увеличилось с 220 μ M до 1300 μ M, тогда как величина $K_M^{HCOO^-}$ изменилась незначительно. Данная замена привела к снижению каталитической константы в 2 раза (таблица 3.3.1.1.). В то же время, при 64°C было показано незначительное увеличение термостабильности. Это может быть связано с образованием дополнительных водородных связей внутри белковой глобулы вследствие заметных конформационных изменений в активном центре поскольку данный остаток располагается на стыке двух элементов вторичных структур (рис. 3.3.1.3. Б) – α -спирали и β A-листа.

В данной работе мы продолжили исследование фрагмента X₁G(A)X₂GRX₃G. В аминокислотной последовательности SauФДГ в положении 193 находится остаток изолейцина. Наиболее характерным для формиатдегидрогеназ из других источников в данном структурно-эквивалентном положении является остаток Thr. С целью увеличения идентичности последовательности с бактериальными формиатдегидрогеназами предложили замену I193T.

Для SauФДГ X₂ — это остаток Phe194, в то время как для других ФДГ в этом положении в основном, находится остаток Val и с меньшей степенью частоты — остаток Ile (рис. 3.3.1.1.). Поэтому мы решили сделать мутант с заменой F194V.

Также было решено ввести двойные замены: I193T+F194V и F194V+F196A для того, чтобы изучить синергетический эффект данных замен.

Получение генно-инженерных конструкций осуществляли по методикам, изложенным в пп.2.2.3 – 2.2.10. Экспрессию осуществляли по методике, представленной в пп. 2.2.11. – 2.2.13.

Таблица 3.3.1.1.

Результаты экспрессии мутантных SauФДГ и фермента дикого типа wt-SauФДГ.

Фермент	Выход фермента по активности, Ед./л среды	Выход биомассы, г/л среды	Содержание фермента в клетках, Ед./г
wt-SauФДГ	3800	15	250
F196A	2500	18	140
wt-SauФДГ	2066	16	129
F194V	2268	7	324
F194V+F196A	2026	9	225
wt-SauФДГ*	8890	11	808
I193T*	1075	17	63
I193T+F194V*	570	11	52

**Примечание:* мутантные формы с заменами I193T, I193T+F194V, а также фермент дикого типа в данном эксперименте экспрессировался при скорости 200 об/мин. Этим обусловлен больший выход wt-SauФДГ по сравнению с другими экспериментами.

Выделение и очистку мутантных форм проводили согласно методике, описанной в п.2.2.14. (рис. 3.3.1.2., дорожки 5 – 9).

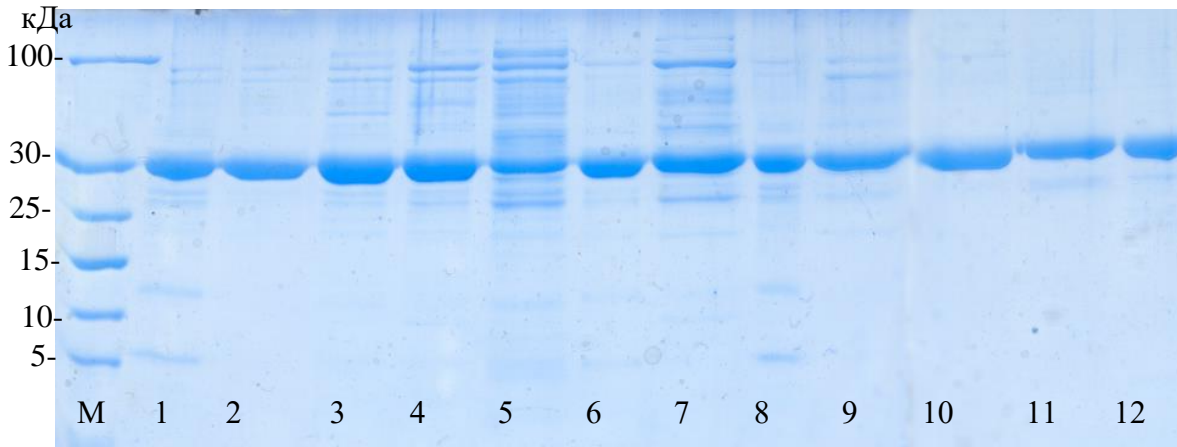


Рис. 3.3.1.2. PAAG SDS-электрофорез, М – маркер молекулярной массы, кДа, 1 – Wt-SauФДГ, 2 – V119I, 3 – V119A, 4 – V119G, 5 – I193T, 6 – F194V, 7 – I193T+F194V, 8 – F196A, 9 – F194V+F196A, 10 – Y217T, 11 – P219R, 12 – H246N.

Полученные препараты ферментов использовали для исследования каталитических свойств, представленных в таблице 3.3.1.2.

Таблица 3.3.1.2.

Каталитические параметры мутантных форм SauФДГ и фермента дикого типа.

Ферменты	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, μМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	Ссылка
SoyФДГ	2,9	13,3	1,5	[99]
CboФДГ	3,7	45	5,9	[91]
PseФДГ	7,3	65	6,5	[1]
wt-SauФДГ	20,0±1,0	220±10	130±10	[5]
I193T	20±1	463±38	107±9	Данная работа
F194V	16,0±0,7	57±3	67±7	Данная работа
F194V*	17,0 ± 0,5	31 ± 2	50 ± 3	Данная работа
F196A	10,0±0,8	1300±50	156±6	Данная работа
I193T+F194V	19±1	78±4	116±11	Данная работа
F194V+F196A	20,2±1,5	460±20	52±3	Данная работа

*Измерение в 0,1 М NaPB-Cit- Tris-Gly комбинированном буфере при pH 7,0 30°C.

Введение более гидрофильного и менее объемного аминокислотного остатка в положение 193 (замена Ile на Thr) привело к увеличению K_M и практически не повлияло на каталитическую константу SauФДГ. Вероятно, введение полярной OH-группы Thr вместо CH_3-CH_2 части Ile193 негативно влияет на гидрофобные взаимодействия этого остатка с неполярными боковыми радикалами Ile191, Phe194,

Ala204, находящимися рядом с этим остатком (193) в коферментсвязывающем домене.

Замена F194V снизила константу Михаэлиса по NAD^+ и формиат-аниону в 3,9 и 1,9 раза соответственно по сравнению с wt-SauФДГ, k_{cat} несколько снижается – в 1,25 раза. Таким образом, значение каталитической эффективности (величина k_{cat}/K_M) возросло в 3 и 1,6 раза для NAD^+ и формиата соответственно. Поскольку остаток Phe194 находится в окружении объемных остатков Phe233, Phe257, Leu256 и Phe257 (рис. 3.3.1.3. А) замена на Val может снижать стерические затруднения в активном центре.

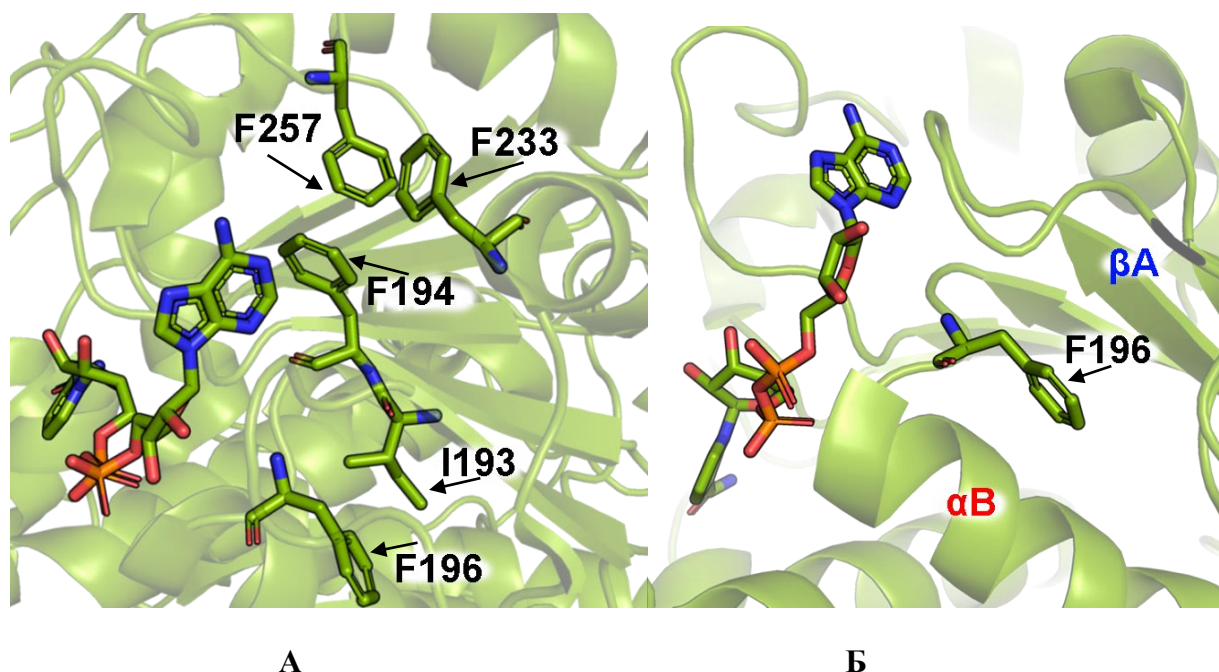


Рис. 3.3.1.3. (А) Компьютерное моделирование активного центра в области консервативного мотива G(A)XGXXG. Выделены остатки I193, F194, F196, F233, F257, (Б) Остаток F196 располагается на стыке двух элементов вторичной структуры: αB и βA .

Для двойной мутантной формы I193T+F194V наблюдается синергетический эффект – значение $K_M^{\text{HCOO}^-}$ ниже, чем у фермента дикого типа за счет мутации F194V, но выше, чем у фермента с точечной мутацией в положении 194. Для двойной мутантной формы I193T+F194V константа Михаэлиса по NAD^+ в 2,8 раза ниже, чем у фермента дикого типа, и может быть объяснена мутацией 194, эффект которой, вероятно, сильнее, чем у мутации в положении 193.

У двойного мутанта F194V+F196V также наблюдается синергетический эффект. Для 196 мутации K_M увеличивается по NAD^+ и формиату. Причем у двойного мутанта значение $K_M^{\text{NAD}^+}$ располагается между соответствующими

значениями для ферментов с точечными заменами в 194 и 196 положениях. Значение $K_M^{\text{HCOO}^-}$ у двойного мутанта практически такое же, как при введении точечной замены в 194 положении.

Исследование термостабильности осуществляли согласно пп. 3.2.21. - 3.2.22. На рисунке 4.3.1.4. представлены зависимости A/A_0 -t для мутантных SauФДГ с точечными заменами I193T, F194V, а также изученной ранее F196A и двойными заменами I193T+F194V и F194V+F196A и фермента дикого типа в полулогарифмических координатах.

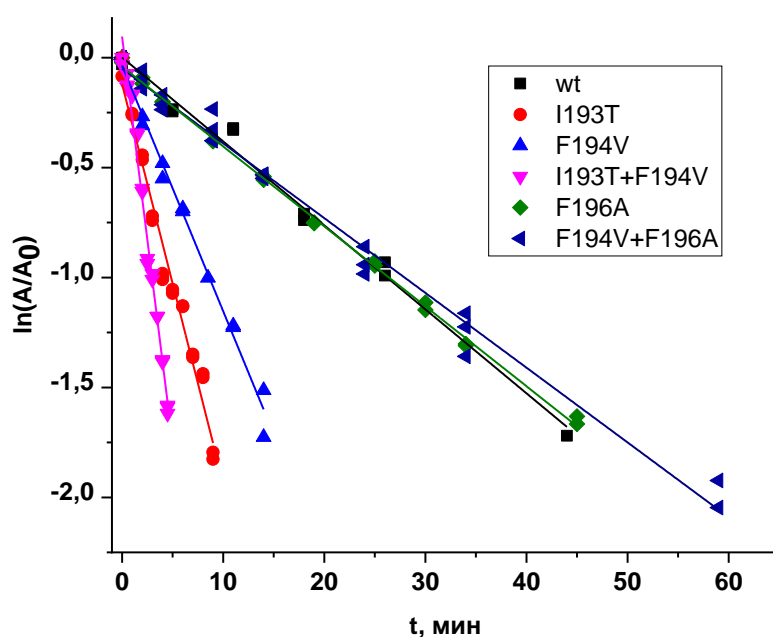


Рис. 3.3.1.4. Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для мутантных форм и фермента дикого типа при 64°C, 0,1 М NaPB, 0,01 М NaЭДТА, pH 7,0.

Зависимости в полулогарифмических координатах, $\ln(A/A_0) - t$ имеют линейный характер, следовательно, инактивация мутантных SauФДГ, как и фермента дикого типа, соответствует кинетике процессов первого порядка. Константы скорости термоинактивации k_{in} во всех случаях не зависели от концентрации фермента [117]. Замены I193T, F194V и I193T+F194V привели к снижению термостабильности при 64°C примерно в 2–3 раза. Исследование термостабильности мутантных форм с заменами F196A и F194V+F196A показало незначительную стабилизацию по сравнению с ферментом дикого типа.

На рисунке 3.3.1.5. представлены температурные зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации для всех полученных мутантных форм и фермента дикого типа в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$.

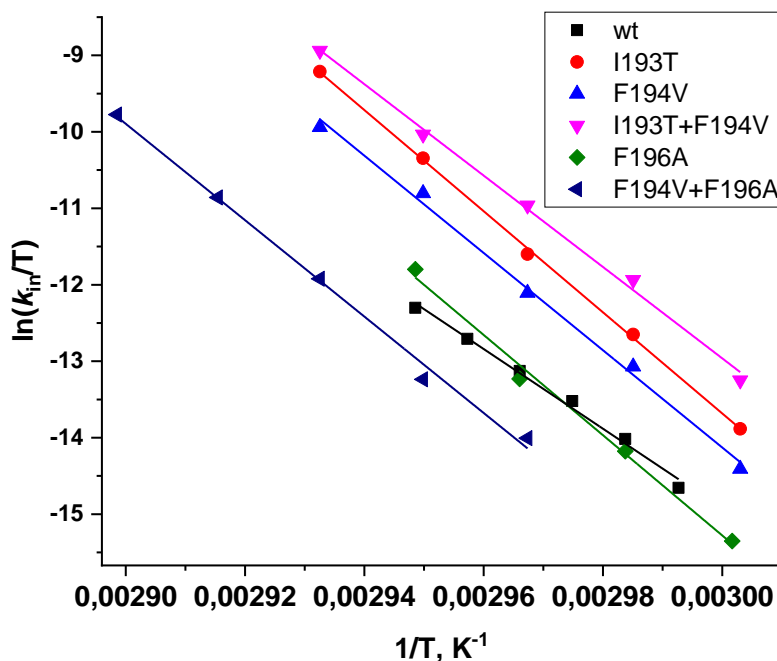


Рис. 3.3.1.5. Зависимость констант скорости термоинактивации SauФДГ от температуры в координатах $[\ln(k_{in}/T)] - 1/T$ для фермента дикого типа и мутантных форм.

Рассчитали термодинамические параметры, значения которых представлены в таблице 3.3.2.3. Как видно, величины активационных параметров характерны для процессов термоинактивации фермента вследствие разворачивания белковой глобулы. Наибольшим значением периода полуинактивации $\tau_{1/2}$ (период, за который происходит потеря остаточной активности на 50%) при 60°C обладает мутантная форма с двойной заменой F194V+F196A, что может быть связано с заменой в 196 положении. Это согласуется с эффектами стабилизации, представленными в таблице 3.3.1.4.: в области низких температур наибольший эффект стабилизации наблюдается для мутантной формы с точечной заменой F196A. В связи с меньшим объемом остатков в F194V+F196A структура может быть более компактной и гибкой, и, как следствие, более стабильной, однако, в то же время, высокая подвижность основной цепи в данной области может стать причиной худших кинетических параметров.

Таблица 3.3.1.3.

Параметры активации мутантных форм SauФДГ.

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)	$\tau_{1/2}(60^\circ\text{C})$, мин
wt-SauФДГ	430±20	1010±60	136
I193T	550±10	1370±20	1
F194V	530±20	1300±60	63
F196A	545±30	1350±90	161
I193T+F194V	495±15	1185±50	16
F194V+F196A	520±20	1275±60	365

Таблица 3.3.1.4.

Эффект стабилизации мутантных форм по сравнению с ферментом дикого типа*.

t, °C	I193T	F194V	F196A	F194V+F196A	I193T+F194V
4	3,78E+02	1,28E+02	1,31E+03	6,17E+02	3,83E+00
20	3,61E+01	2,00E+01	1,41E+02	1,09E+02	1,28E+00
25	1,82E+01	1,17E+01	7,34E+01	6,56E+01	9,33E-01
30	9,43E+00	6,95E+00	3,92E+01	4,03E+01	6,86E-01
35	4,98E+00	4,20E+00	2,13E+01	2,51E+01	5,09E-01
40	2,69E+00	2,58E+00	1,19E+01	1,59E+01	3,82E-01
50	8,26E-01	1,02E+00	3,86E+00	6,66E+00	2,20E-01
60	5,78E-03	4,61E-01	1,19E+00	2,68E+00	1,20E-01
61	2,33E-01	3,70E-01	1,15E+00	2,58E+00	1,19E-01
62	5,67E-03	3,88E-01	1,17E+00	2,78E+00	1,32E-01
63	2,23E-01	3,71E-01	1,12E+00	2,61E+00	1,28E-01
64	4,28E-03	3,60E-01	1,11E+00	2,41E+00	1,11E-01
65	1,57E-01	2,73E-01	7,94E-01	1,94E+00	1,00E-01
66	3,07E-03	2,24E-01	6,05E-01	2,55E+00	8,96E-02
68	2,73E-03	2,63E-01	6,05E-01	1,91E+00	8,88E-02
70	9,61E-02	1,86E-01	4,98E-01	1,66E+00	8,08E-02
75	5,84E-02	1,26E-01	3,10E-01	9,39E-01	6,40E-02

*Примечание: Эффект стабилизации рассчитывался как отношение констант скорости инактивации SauФДГ дикого типа к константе скорости инактивации мутантного фермента при данной температуре, k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut} . Полужирным шрифтом выделены величины эффектов стабилизации, рассчитанные из экспериментальных данных.

Как видно из результатов работы, замены в данной области практически во всех случаях привели к заметным изменениям в каталитических свойствах: как в лучшую, так и в худшую сторону. Таким образом, последовательность «finger print» является особенно перспективной с точки зрения увеличения каталитической эффективности с помощью метода рационального дизайна.

Одним из двух значимых результатов является мутация F194V, которая вызывает снижение обеих K_m . Помимо этого, для SauФДГ F194V были определены каталитические свойства в комбинированном буферном растворе 0,1 М Cit-NaPB-

Tris-Gly (таблица 3.3.1.2.), информация о котором была подробно представлена в п.3.2. Показано, что значение $K_M^{NAD^+}$ снижается также в 2 раза как и для фермента дикого типа при использовании данной буферной системы.

3.3.2. Изучение X₁DX₂, ответственного за коферментную специфичность

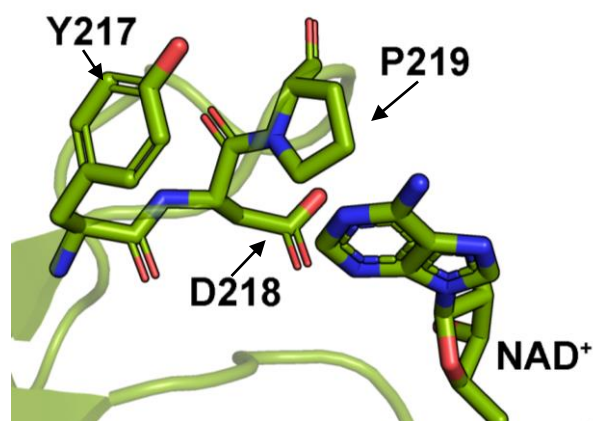
В положении 218 у NAD⁺-зависимой SauФДГ располагается высококонсервативный остаток аспарагиновой кислоты, ответственный за коферментную специфичность (рис. 3.3.2.1.).

		217	218	219	
PseФДГ	HEWARKGGWNIADCVSHAYDLEAMHVGTVAAGRIGLAVLRRLAPFDVH-LHY	TDR			HRLPES 229
SauФДГ	HRQSVGEWNLQVGNHANELQHKTIIGIFGFGRIQGLVAERLAPFNVTLQH	Y	DP		IN---- 222
SsiФДГ	HRQSEEGGWNLTVTNHAFELQNKTIIGIFGLGRIGRLVGERLKPFDVVDI	Y	RR		SS---- 190
SsaФДГ	HRQSYDGEWNLKSVGENAHDIQHKKIGIFGYGQIGELVAQRLQPFVDVQVH	F	RR		SS---- 189
SeqФДГ	HRQSYNGEWNLKSVGNHNDLQHKTIIGIFGYGQIGELVAERLQPFVDVKVQH	Y	RR		SS---- 189
BstФДГ	HAIAQQGGWNIADCVSRSDVEGMHFGTVGAGRIGLAVLRRLKPFGLH-LHY	TQR			HRLDAA 230
BpeФДГ	YQCVLDGGWNIADCVARSDLEGMQV---GAGRIGSAVLRRLKPFVDVG-LHY	TDQ			HRLPAA 226
GmaФДГ	HKIAEEGGWNIADCVSRSDLEGMHVGTVAAAGRIGLAVLRRLKPFVDVK-LHY	TAR			HRSPPA 229
LpnФДГ	YNTVIDGGWNIADCVSRSDLEGMQVGCVAAGRIGLAVLRRLKPFVAVK-LHY	TDR			HRLPLH 234
MorФДГ	HDWARNGGWNIADCVARSDVEGMHVGTVAAAGRIGLRVLRLLAPFDMH-LHY	TDR			HRLPEA 229

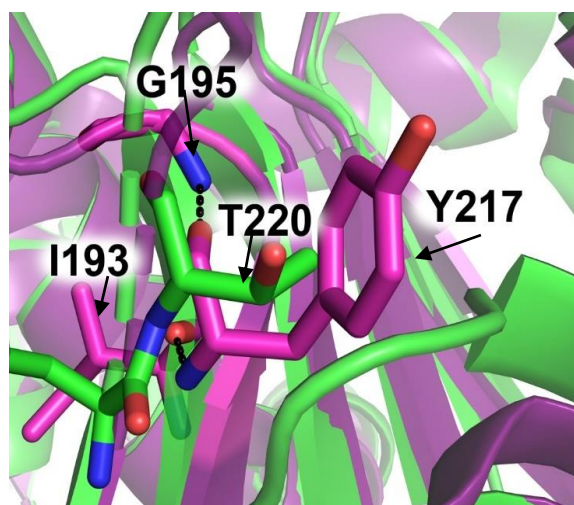
Рис. 3.3.2.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из разных источников. Сверху отмечены номера остатков SauФДГ.

Как упоминалось ранее в п.1.4.2. на примере PseФДГ было показано, что замены D221S и D221Q (221 аминокислотный остаток является структурно эквивалентным остатком D218 в PseФДГ) приводят к образованию NADP⁺-зависимого фермента [86, 119]. Вследствие этого мы решили выполнить замену D218Q в SauФДГ для качественной оценки, приведет ли данная замена к изменению коферментной специфичности.

Также было решено изучить роль ближайших аминокислотных остатков к Asp218 – в 217 и 219 положениях в связывании кофермента и катализе. В данных позициях располагаются остаток Тур, что характерно для большинства ФДГ, и остаток Pro, уникальный для SauФДГ (рис. 3.3.2.1. и 3.3.2.2. А) соответственно.



А



Б

Рис. 3.3.2.2. (А) – Остатки Y217, D218 и P219 располагаются на поверхности субстратного канала., (Б) – Наложение структуры PseФДГ (2NAD) (зеленый) и SauФДГ (6TTB) (фиолетовый), RMSD 1,21 Å.

Посредством образования водородных связей между атомами кислорода основной цепи Tyr217 и азота основной цепи остатка Gly195 а также атомом азота Tyr217 и атомом кислорода основной цепи остатка I193 (рис. 3.3.2.2.Б). Однако после 217 положения, согласно выравниванию (рис. 3.3.2.1.) в первичной структуре SauФДГ имеется делеция, характерная для ФДГ из семейства стафилококковые. У других бактериальных ФДГ на месте этой делеции находятся различные аминокислотные остатки, но преимущественно, в этом положении локализован остаток треонина (PseФДГ, BstФДГ, ThiФДГ и др.). Детальный анализ структуры в данной области и наложение PseФДГ (PDB 2NAD) и SauФДГ (PDB 6TTB) показали, что дополнительный остаток Thr220 в случае PseФДГ выполняет ту же функцию, что и Tyr217 в SauФДГ, тогда как остаток Tyr219 PseФДГ – образует систему

водородных связей с более удаленными от активного центра элементами вторичной структуры (рис. 3.3.2.2. Б)

В положении, эквивалентном 219 в SauФДГ у большинства ФДГ находится остаток аргинина, поэтому также было предложено сделать замену R219R. Предположительно, объемный остаток пролина, располагающийся на поверхности белковой глобулы может препятствовать проникновению молекулы кофермента внутрь активного центра.

Плазмидные ДНК с заменами в гене SauФДГ получали согласно методике, описанной в пп.2.2.3. – 2.2.7. Нарработку биомассы и экспрессию проводили по ранее указанным в пп.2.2.11. – 2.2.13. методикам. В таблице 3.3.2.1. показаны результаты экспрессии. После этого полученные образцы подвергли стандартной процедуре очистки. Результат ПААГ-электрофореза представлен на рисунке 3.3.1.2. (дорожки 10-11). Для данных образцов определили каталитические свойства.

Таблица 3.3.2.1.
Результаты экспрессии мутантных SauФДГ и фермента дикого типа wt-SauФДГ.

Фермент	Выход фермента по активности, Ед./л среды	Выход биомассы, г/л среды	Содержание фермента в клетках, Ед/г
wt-SauФДГ	2066	16	129
R219R	2432	12	204
wt-SauФДГ	1922	25	77
Y217T	5034	23	215
D218Q	н/д	н/д	н/д

Замена D218Q привела к увеличению $K_M^{NAD^+}$ в 14 раз, тогда как $K_M^{HCOO^-}$ выросла до 1,5 раз (таблица 3.3.2.2.). Помимо этого, произошло двукратное снижение k_{cat} . При этом активность в присутствии $NADP^+$ не была обнаружена в диапазоне концентраций кофермента 0,025 – 10 мМ. Таким образом, данная замена в отличие от ФДГ из других источников, приводит к снижению специфичности к NAD^+ , но не к возникновению активности с $NADP^+$. Это можно объяснить низким уровнем гомологии SauФДГ.

Замена Y217T способствовала снижению константы Михаэлиса по формиату примерно в 2 раза. Причина, вероятно, в меньшем объеме Thr217 по сравнению Tug. Значение k_{cat} стало также в 2 раза ниже. При этом мы можем наблюдать небольшое улучшение термостабильности по сравнению с wt-SauФДГ.

Таблица 3.3.2.2.

Каталитические параметры мутантных форм SauФДГ и фермента дикого типа.

Фермент	$k_{cat}^{NAD^+}$, с ⁻¹	$k_{cat}^{NADP^+}$, с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, μМ	$K_M^{NADP^+}$, μМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	Ссылка
PseФДГ	7,3	н/д	65	>400	6,5	[1]
BstФДГ	1,66	4,75	1430	160	55,5	[62]
wt-SauФДГ	20,0±1,0	н/д	220±10	н/д	130±10	[5]
Y217T	11,2±0,9	н/д	210±20	н/д	68±7	Данная работа
P219R	16,1±1,1	н/д	670±60	н/д	100±6	Данная работа
D218Q	11±1,0	н/д	3170±130	н/д	н/д	Данная работа

Замена остатка Pro219 на Arg привела к 3х-кратному увеличению $K_M^{NAD^+}$. Таким образом, основной вывод заключается в том, что объемные остатки Trp и Pro, располагающиеся с обеих сторон от значимого Asp218 создают необходимую жесткость цепи и фиксируют данное положение относительно молекулы кофермента.

Более подробная информация об исследовании термостабильности представлена на рисунках 3.3.2.3. – 3.3.2.4. и таблицах 3.3.2.3. – 3.3.2.4. Исследование термостабильности D218Q не проводилось вследствие крайне низкой каталитической активности в широком диапазоне концентраций $NADP^+$.

Величины активационных параметров сопоставимы с данными для дикого типа. Для мутантной формы с заменой P219R наблюдается больший эффект стабилизации при низких температурах по сравнению с мутантной формой с заменой Y217T. Это можно объяснить значительным увеличением подвижности полипептидной цепи при замене пролина на остаток аргинина в 219 положении.

Таблица 3.3.2.3.

Параметры активации мутантных форм SauФДГ.

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)	$\tau_{1/2}(60^\circ\text{C})$, мин
wt-SauФДГ	430±20	1010±60	136
Y217T	520±20	1280±50	186
P219R	575±30	1450±100	138

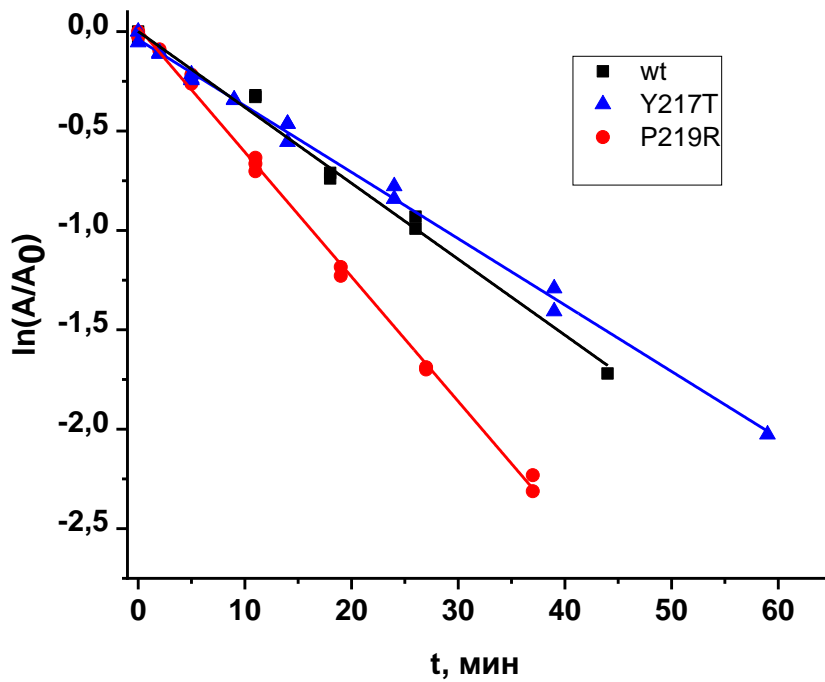


Рис. 3.3.2.3. Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для мутантных форм и фермента дикого типа при 64°C, 0,1 М NaPB, 0,01 М NaЭДТА, pH 7,0.

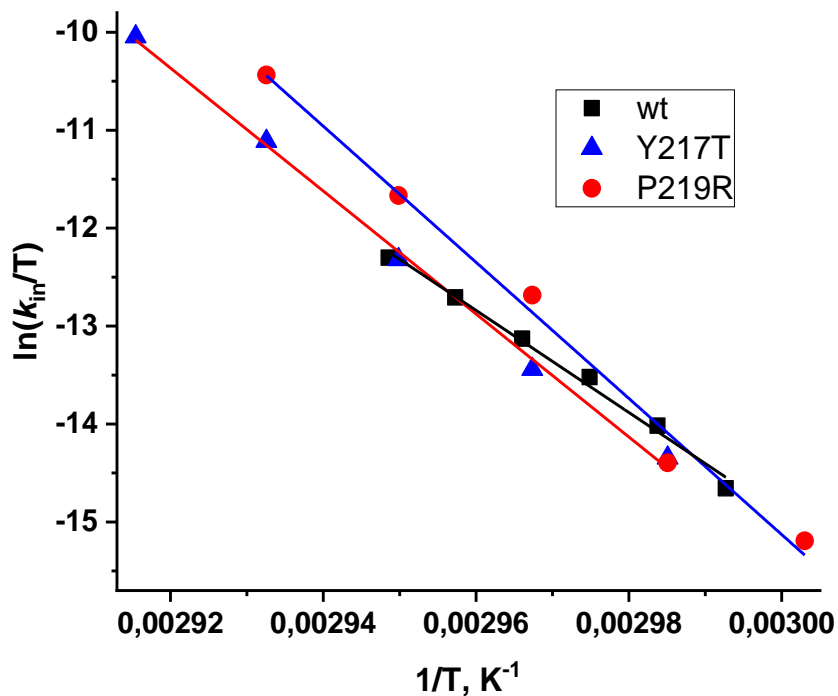


Рис. 3.3.2.4. Зависимость констант скорости термоинактивации SauФДГ от температуры в координатах $[\ln(k_{in}/T)] - 1/T$ для фермента дикого типа и мутантных форм.

Таблица 3.3.2.4.

Эффект стабилизации мутантных форм по сравнению с ферментом дикого типа, k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut} .

t, °C	P219R	Y217T
4	1,24E+04	2,73E+02
20	6,12E+02	5,03E+01
25	2,55E+02	3,08E+01
30	1,09E+02	1,91E+01
35	4,83E+01	1,21E+01
40	2,19E+01	7,75E+00
50	4,82E+00	3,32E+00
60	1,01E+00	1,37E+00
61	9,65E-01	1,31E+00
62	1,46E+00	1,39E+00
63	8,72E-01	1,34E+00
64	6,42E-01	1,37E+00
65	5,78E-01	9,98E-01
66	5,31E-01	1,02E+00
68	4,32E-01	8,49E-01
70	3,06E-01	7,05E-01
75	1,61E-01	4,92E-01

3.3.3. Изучение структуры активного центра методом направленного мутагенеза

Помимо высококонсервативных мотивов определили роль отдельных остатков в катализе. В первую очередь провели замены в остатке V119 (фрагмент выравнивания на рис. 3.3.3.1.). Как было показано в работе [65], данный аминокислотный остаток участвует в пространственной ориентации формиат-аниона. В аналогичном положении в других ФДГ мы видим преимущественно остаток изолейцина, кроме ФДГ из дрожжей и других ФДГ семейства стафилококков.

119

PseФДГ	AKAKNLKLALTAGI	GSDHVDLQSAIDRNVTVAEVTYCNSISVAEHVMMILSLVRNYLPS	169
SauФДГ	EKAPNLKLAITAGV	GSDHVDLAAASEHNIGVVEVTGSNTVSVAEHAVMDLLILLRNYEEG	133
SsiФДГ	EQAPNLKLAITAGV	GSDHVDLEAASEHDISVVEVTDSENTVSVAEHIVMTTLILVRNYEEG	134
SsaФДГ	NKAENLKLAITAGV	GSDHVDLEAASENELTVIEVTGCNTVSVAEHTVMDLLILMRNFMEG	133
SeqФДГ	RKASQLKLAITAGV	GSDHIDLNAASQNDLTVLEVTCNTISVAEHTVMDVLILLRNFMEG	133
BstФДГ	ARAPKRLRALTAGI	GSDHVDLDAARAANITVAEVTGSNSISVAEHVMTTLALVRNYLPS	170
BpeФДГ	AKAPRLKLAITAGI	GSDHVDLQAAAQHGLTVAEVTYSNSISVSEHVMMVLALVRNYLPS	169
GmaФДГ	AKAKKLKLALTAGI	GSDHVDLNAAIKAGITVAEETFSNGICVAEHAVMMILALVRNYLPS	169
LpnФДГ	ESAPKLKLAITAGI	GSDHVDLQAAEHNITVCEVTYCNSISVAEHTVMMILALVRDFIPQ	174
MorФДГ	AKAPKLKLALTAGI	GSDHVDLQAAIDNNITVAEVTYCNSNSVAEHVMMVLGLVRNYIPS	169

Рис. 3.3.3.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из разных источников. Сверху отмечен номер остатка для SauФДГ.

В соответствии с выравниванием мы решили заменить остаток Val в 119 положении на наиболее часто встречающийся остаток Ile. Чтобы детально оценить влияние бокового радикала, мы решили сделать также замены в позиции 119 на менее объемные остатки Ala и Gly. Согласно анализу пространственной структуры, аминокислотный остаток в 119 положении располагается глубоко внутри субстратного канала и замены на менее объемные остатки глицина и аланина могут привести к изменениям конформации активного центра (рис. 3.3.3.2.).

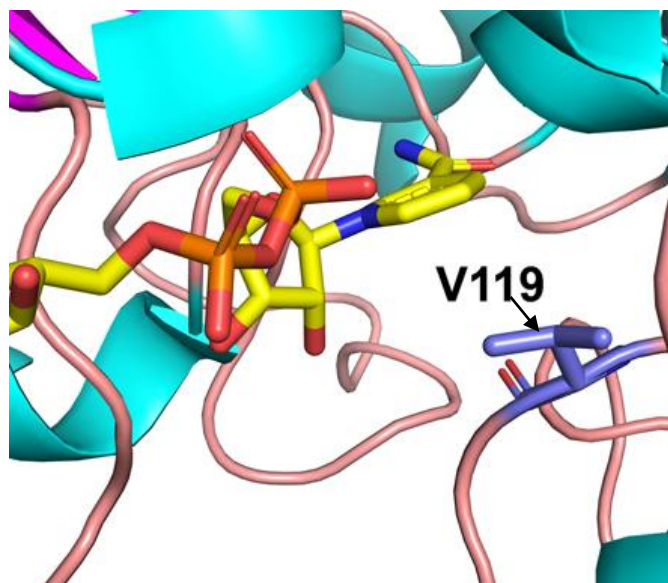


Рис. 3.3.3.2. Результат компьютерного моделирования активного центра в области субстратного канала. На рисунке в 119 положении отмечен остаток Val.

Получение генетических конструкций и экспрессии рекомбинантных белков выполняли по описанной ранее методике. В таблице 3.3.3.1. представлен результат экспрессии мутантных форм и фермента дикого типа. Выход культивирования мутантных форм и фермента дикого типа сравнимы.

Препараты ферментов были выделены, очищены и использованы для дальнейшего исследования каталитических свойств. Результат PAAG SDS-электрофореза представлен на рисунке 3.3.1.2. (дорожки 2-4,12).

Замена V119 на более распространенный в этой позиции остаток Ile приводит к увеличению $K_M^{\text{NAD}^+}$ и снижению k_{cat} . Так, при замене на Ala и Gly в 119 позиции мы наблюдаем уменьшение обеих K_M (таблица 3.3.3.2.).

Таблица 3.3.3.1.

Результаты экспрессии мутантных SauФДГ и фермента дикого типа wt-SauФДГ.

Фермент	Выход фермента по активности, Ед./л среды	Выход биомассы, г/л среды	Содержание фермента в клетках, Ед/г
wt-SauФДГ	2066	16	129
H246N	2152	8	257
wt-SauФДГ	1922	25	77
V119I	3968	22	177
wt-SauФДГ*	8890	11	808
V119A*	3550	17	209
V119G*	240	8	30

*Примечание: мутантные формы с заменами V119A, V119G а также фермент дикого типа в данном эксперименте экспрессировался при скорости 200 об/мин. Этим обусловлен больший выход wt-SauФДГ по сравнению с другими экспериментами.

Таблица 3.3.3.2.

Каталитические параметры мутантных форм SauФДГ и фермента дикого типа.

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, μ М	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	Ссылка
SoyФДГ	2,9	13,3	1,5	[93]
CboФДГ	3,7	45	5,9	[85]
PseФДГ	7,3	65	6,5	[1]
wt-SauФДГ	20,0±1,0	220±10	130±10	[5]
V119I	12,0±0,5	310±10	104±4	Данная работа
V119A	22±2	89±5	75±6	Данная работа
V119G	3,2±0,2	8,1±0,4	3,0±0,2	Данная работа
H246N	18,6±0,6	425±13	75±5	Данная работа

Наиболее выражен эффект у SauФДГ V119G – снижение $K_M^{NAD^+}$ в 27,5 раз и снижение $K_M^{HCOO^-}$ в 23,6 раза соответственно по сравнению с wt-SauФДГ. При этом k_{cat} для мутанта V119G снижается в 6,25 раза, а для мутанта V119A практически не изменяется. Мы наблюдаем в целом снижение K_M как для кофермента, так и для субстрата в цепи с уменьшением бокового радикала в положении 119 в ряду Ile-Val-Ala-Gly. Для SauФДГ наиболее интересным остатком в этом положении является Ala. В результате этой мутации обе K_M снижаются, и в то же время k_{cat} остается неизменным.

Значительные изменения в каталитических свойствах при введении замены V119G можно объяснить тем, что остаток глицина обеспечивает высокую

подвижность полипептидной цепи, что приводит к резкому изменению в структуре белка.

Таким образом, замена остатка V119 на менее объемные заместители в основании субстратного канала приводит к компактизации активного центра и более прочному связыванию молекулы кофермента.

Замены V119I и V119A привели к снижению термостабильности при 64°C примерно в 3 раза по сравнению с ферментом дикого типа как видно из рисунка 3.3.3.5. Рассчитали активационные параметры и эффект стабилизации в широком диапазоне температур (таблицы 3.3.3.3. – 3.3.3.4.).

На рисунке 3.3.3.3. представлен участок выравнивания аминокислотных последовательностей в районе высоко-консервативного остатка H246.

	246	
PseФДГ	VEKELNLTWHATREDMYPVCDVVTLN	CPLHPETEHEMINDETLLKLFKRGAYIVNTARGKLC 289
SauФДГ	-QQDHKLSKFVVSFDELVSTSDAITI	HAPLTPETDNLFDKDVL SRMKKHSYLVNTARGKIV 248
SsiФДГ	-QEDTDFSKYVNFDELVHKSDVLIIT	TPLTPETDDLFDYNTISQMKDGSYIVNCARGKIV 249
SsaФДГ	-QЭДТАYSKYVNFDELVSTSDALVI	LSPLTKETDDLFNYDVLSRMKQGSYLVNTARGKIV 248
SeqФДГ	-QENTPYSKYVDFDELVSTSDVIVI	LSPLTSETDDLFNYDVLSRMKEGSYLVNTARGKIV 248
BstФДГ	IEQELGLTYHADPASLAAAVDIVNLQ	IPLYPSTEHLFDAAMIARMKRGAYLINTARAKLV 290
BpeФДГ	TEQELGARYHPDAAALAGACDVISL	HCPHLPGETEHLFDAAMLARMKRGAYLINTARGKIC 286
GmaФДГ	IEDELGLTYHATAEEMAECVDVSI	HAPLYPATEHLFNAKVLNKMRRHGSYLVNTARAEIC 289
LpnФДГ	LEQELNLTYNHPSVESMVKCDVVSI	HCPHLPETEYLFDDRLIKQMKRGSYLINTARGKIC 294
MorФДГ	VEKELNLTWHATREDMYGACDVVTL	NCPHLPETEHEMINDETLLKLFKRGAYLVNTARGKLC 289

Рис. 3.3.3.3. Выравнивание аминокислотных последовательностей формиадегидрогеназ из различных источников в области His246 (номер отсатка SauФДГ отмечен над рисунком).

Анализ трехмерной структуры SauФДГ выявил также один из остатков гистидина в 246 положении, который важен для связывания кофермента посредством системы водородных связей (рис. 3.3.3.4.).

Остаток His246 образует водородную связь с молекулой NAD⁺ через молекулу воды с остатком рибозы никотинамидной части молекулы. Атом кислорода основной цепи через молекулу воды образует водородные связи с остатком фосфорной кислоты кофермента. Посредством водородной связи происходит взаимодействие основной цепи His246 и важного остатка F194, входящего в состав высококонсервативного мотива X₁G(A)X₂GRX₃G. Однако, в большинстве ФДГ в структурно-эквивалентном положении находится остаток аспарагина (рис. 3.3.3.3.).

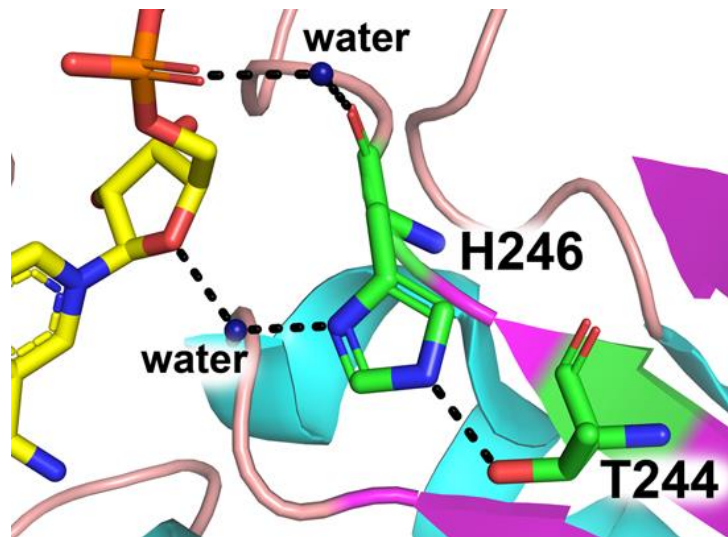


Рис. 3.3.3.4. Фрагмент структуры SauФДГ (код PDB: 6TTV) с отмеченными аминокислотными остатками H246 и T244. α -Спирали выделены синим цветом, β -листы – пурпурным, петли – светло-розовым. NAD⁺ окрашен элементами: С – желтый, N – синий, O – красный, P – оранжевый.

На основании выравнивания аминокислотных последовательностей было принято решение сделать мутацию H246N. Помимо этого, данная замена позволит выявить роль гидрофобных взаимодействий, возникающих между имидазольным кольцом и ближайшим аминокислотным окружением.

Мутация в положении 246 привела к снижению аффинности к NAD⁺ и увеличению этого параметра по отношению к формиату. Введение замены H246N привело к увеличению константы Михаэлиса по NAD⁺ примерно в 2 раза, тогда как константа Михаэлиса по формиату снизилась до 75 мМ. Причина, вероятно, заключается в частичной потере водородных связей и гидрофобных взаимодействий вследствие введения Asp. Более высокое сродство к формиату, вероятно, можно объяснить большим пространством в каталитическом домене фермента в результате мутации.

Исследование термостабильности SauФДГ H246N показало снижение периода полуинактивации при 60°C (таблица 3.3.3.3.). Тогда как при 25°C наблюдается его увеличение. Это коррелирует с эффектом стабилизации, представленным в таблице 3.3.3.4.

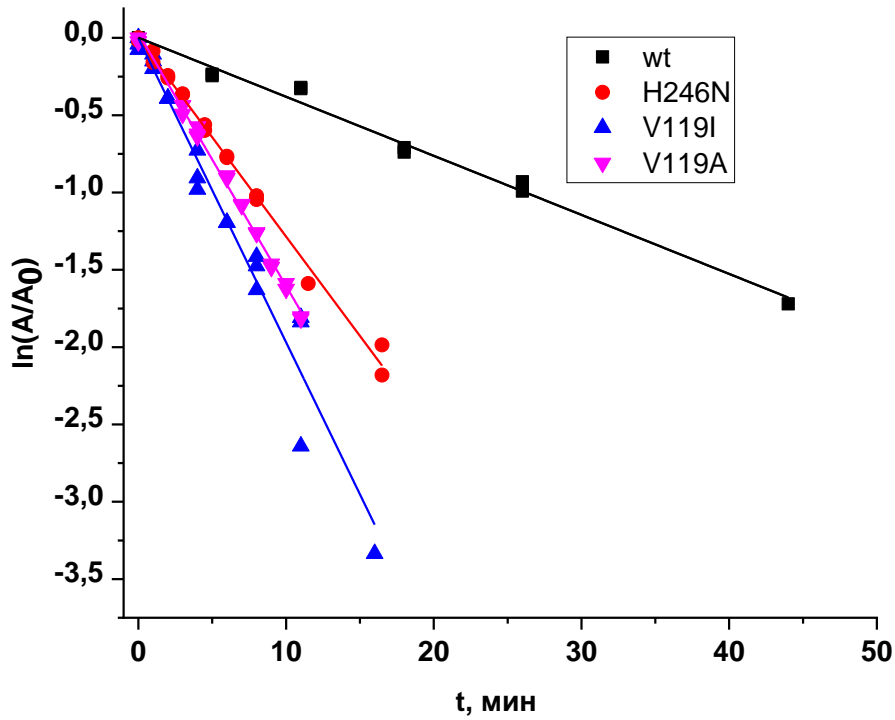


Рис. 3.3.3.5. Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для мутантных форм и фермента дикого типа при 64°C, 0,1 М NaPB, 0,01 М NaЭДТА, pH 7,0.

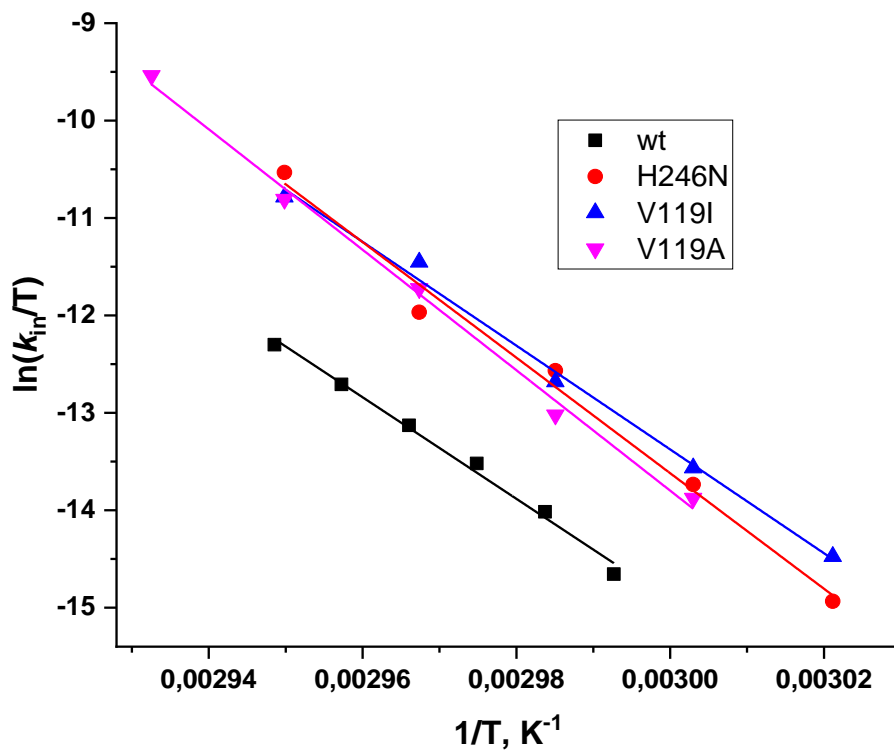


Рис. 3.3.3.6. Зависимость констант скорости термоинактивации SauФДГ от температуры в координатах $[\ln(k_{in}/T)] - 1/T$ для фермента дикого типа и мутантных форм.

Таблица 3.3.3.3.

Параметры активации мутантных форм SauФДГ.

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)	$\tau_{1/2}(60^\circ\text{C})$, мин
wt-SauФДГ	430±20	1010±60	136
V119I	440±20	1050±50	27
V119A	515±20	1230±60	38
H246N	580±30	1200±100	32

Таблица 3.3.3.4.

Эффект стабилизации мутантных форм по сравнению с ферментом дикого типа, k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut} .

t, °C	V119I	V119A	H246N
4	1,12E-01	3,09E+01	5,60E+00
20	1,34E-01	6,89E+00	2,05E+00
25	1,42E-01	4,46E+00	1,53E+00
30	1,49E-01	2,92E+00	1,15E+00
35	1,57E-01	1,94E+00	8,78E-01
40	1,64E-01	1,31E+00	6,74E-01
50	1,80E-01	6,17E-01	4,07E-01
60	1,99E-01	2,78E-01	2,35E-01
61	1,88E-01	2,70E-01	2,30E-01
62	2,63E-01	2,95E-01	2,35E-01
63	2,27E-01	2,79E-01	2,49E-01
64	1,87E-01	2,40E-01	3,13E-01
65	2,00E-01	2,12E-01	1,97E-01
66	2,19E-01	1,86E-01	1,71E-01
68	8,39E-02	1,78E-01	1,77E-01
70	2,26E-02	1,56E-01	1,62E-01
75	2,50E-02	1,14E-01	1,31E-01

3.3.4. Белковая инженерия С-концевой последовательности формиатдегидрогеназ

Большинство формиатдегидрогеназ имеет подвижный С-конец, который не визуализируется в структуре, определенной методом рентгеноструктурного анализа. В случае SauФДГ в структуре не разрешен С-концевой участок из 10 аминокислотных остатков RIASKSYТАК. В структуре холо-формы PDB: 2NAD, имеющей более протяженную С-концевую область по сравнению с SauФДГ, не разрешены только последние семь остатков. Анализ структуры 2NAD показал присутствие вовлеченных в формирование активного центра С-концевых остатков. Однако оценить роль структурно-эквивалентных положений в случае SauФДГ при помощи экспериментальной структуры бТТВ не представляется возможным. Для анализа возможных вариантов пространственного положения С-концевого пептида

RIASKSYТАК для SauФДГ была построена модельная структура, содержащая полную последовательность С-конца (рис. 3.3.4.1.).

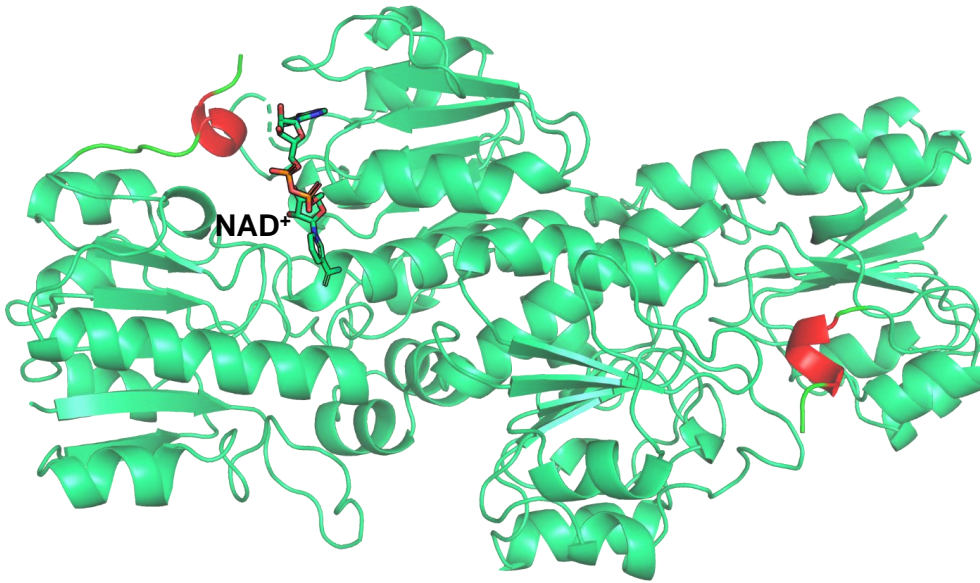


Рис. 3.3.4.1. Модельная структура SauФДГ, построенная с использованием открытого онлайн сервера AlphaFold2 – ColabFold, красным отмечена С-концевая последовательность, которая не видна в экспериментальной структуре PDB: 6ТТВ.

Сравнение модельной AlphaFold2 и экспериментальной структуры SauФДГ показало высокую точность построенной модели – среднеквадратичное отклонение между ними составило 0,849 Å.

Для выбора аминокислотных замен нами было проведено детальное сравнение трехмерных структур SauФДГ (PDB: 6ТТВ и модельная структура) и PseФДГ (PDB: 2NAD). Результаты сравнения приведены на рис. 3.3.4.2 и в таблице 3.3.4.1.

Таблица 3.3.4.1.

Взаимодействия, ответственные за связывание кофермента и формирование оптимальной конформации активного центра

	PseФДГ (PDB: 2NAD)		SauФДГ (PDB: 6ТТВ)		Тип взаимодействия
Эквивалентные остатки	H224	H380	I220	-	Стэкинг
	H380	H ₂ O	T250	NAD ⁺	Водородная связь
	H259	NAD ⁺	F347	F353	Гидрофобное
	S381	NAD ⁺	K356	R198/N143	Электростатическое
	Y382	H ₂ O	K368	-	Водородная связь
	H224	H380	S369	-	Водородная связь
	H380	H ₂ O	Y370	-	Водородная связь

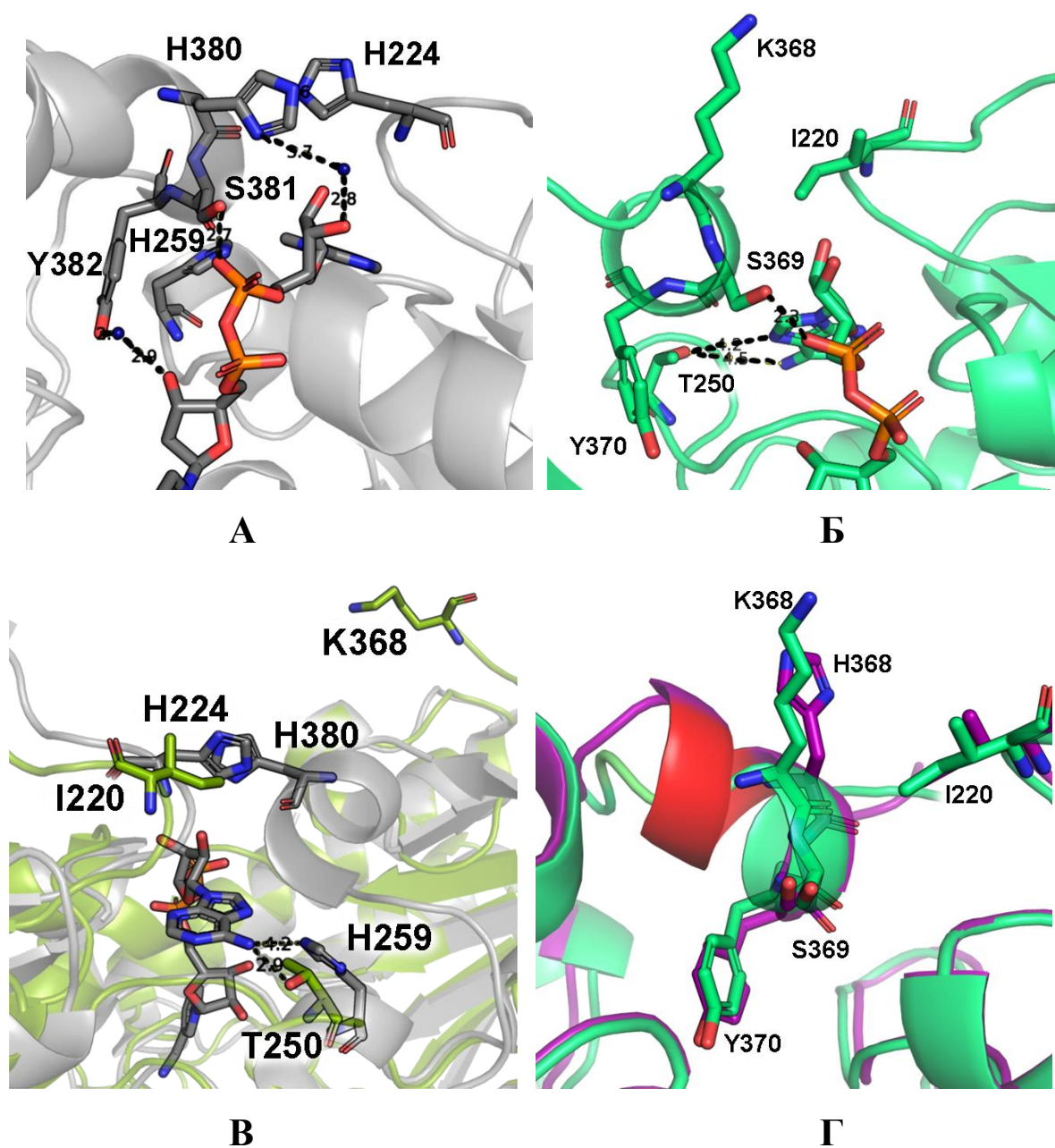


Рис. 3.3.4.2. (А) - активный центр PseФДГ (PDB: 2NAD); (Б) – фрагмент модельной структуры SauФДГ в области С-концевой последовательности; (В) – Наложение структур PseФДГ (PDB:2NAD) и модельной структуры SauФДГ, отмеченных серым и зеленым цветом соответственно; (Г) - пространственное наложение смоделированных при помощи AlphaFold2 структур фермента дикого типа (светло-зеленый) и мутантной SauФДГ TGA+K368H (фиолетовый).

На рис. 3.3.4.2. А показан фрагмент структуры активного центра PseФДГ (PDB: 2NAD) с изображенными каталитически значимыми остатками His в положениях 223, 259 и 379. Остаток His259 PseФДГ образует водородную связь с молекулой NAD⁺. В структурно-эквивалентном положении в SauФДГ находится

остаток треонина (Thr250) (рис. 3.3.4.2 Б и В, таблица 3.3.4.1.), ОН-группа которого располагается на расстоянии 4 Å от адениновой части NAD⁺ и, вероятно, не образует с ним водородной связи, однако полностью исключить данный факт достоверно нельзя. Для понимания, влияет ли это положение на связывание кофермента и субстрата, было предложено сделать замену T250H в SauФДГ.

Анализ структуры холо-формы PseФДГ (PDB: 2NAD) свидетельствует, что остаток His379, расположенный на С-конце белковой глобулы, и остаток His223 могут взаимодействовать друг с другом по принципу стекинг-взаимодействия (рис. 3.3.4.2. А) [56]. В SauФДГ в структурно-эквивалентных положениях находятся остатки Ile220 (рис. 3.3.4.2. В) и Lys368, которые не взаимодействуют друг с другом. Для образования стекинг-взаимодействия было решено сделать замены I220H и K368H.

Остатки Ser380 и Tyr381 в PseФДГ образуют водородные связи с NAD⁺ напрямую и через молекулу воды соответственно. В структурно-эквивалентных положениях в SauФДГ также находятся Ser369 и Tyr370 (рис. 3.3.4.2. А, Б).

Из рисунка 1.2.3.1. следует, что на С-конце в последовательности SauФДГ и других ФДГ из стафилококков имеется делеция из трех аминокислотных остатков. В PseФДГ остатки в этом положении являются частью спирали α_9 , непосредственно контактирующей с молекулой NAD⁺. Было выдвинуто предположение, что вставка трех аминокислотных остатков и замена K368H в SauФДГ может привести к образованию дополнительного витка альфа-спирали в данном участке структуры и приближению структуры активного центра к ФДГ из других источников. С наибольшей частотой встречается последовательность из остатков TGA, и с несколько меньшей частотой – из остатков AGA. На рис. 3.3.4.2. Г представлен результат наложения структуры мутантной формы со вставкой, смоделированной при помощи AlphaFold2 на модельную структуру ФДГ дикого типа. Как видно из данного рисунка, введение трех дополнительных аминокислотных остатков TGA + K368H приводит к незначительному смещению отдельных остатков (I220, H368, S369 и Y381). Однако, предположительно, создание более протяженной α -спирали может привести к стабилизации в пространстве данного фрагмента структуры.

Таким образом, на основании результатов по моделированию структуры SauФДГ с полноразмерным С-концом и сравнительного анализа этой структуры со

структурой холо-формы PseФДГ было предложено сделать точечные замены I220H, T250H, K368H, получить тройной мутант SauФДГ с заменами I220H +TGA+K368H, а также получить ферменты с различными комбинациями замен: TGA+K368H, AGA+K368H, I220H +TGA+K368H, I220H+T250H+TGA+K368H.

SauФДГ дикого типа и мутанты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS с выходом 400–500 мг целевого белка на 1 л культуры. Чистота препаратов фермента дикого типа и мутантных SauФДГ составила не менее 95%.

Полученные мутантные формы были выделены и охарактеризованы. На рисунке 3.3.4.3. показан PAAG SDS-электрофорез препаратов мутантных ферментов и фермента дикого типа.

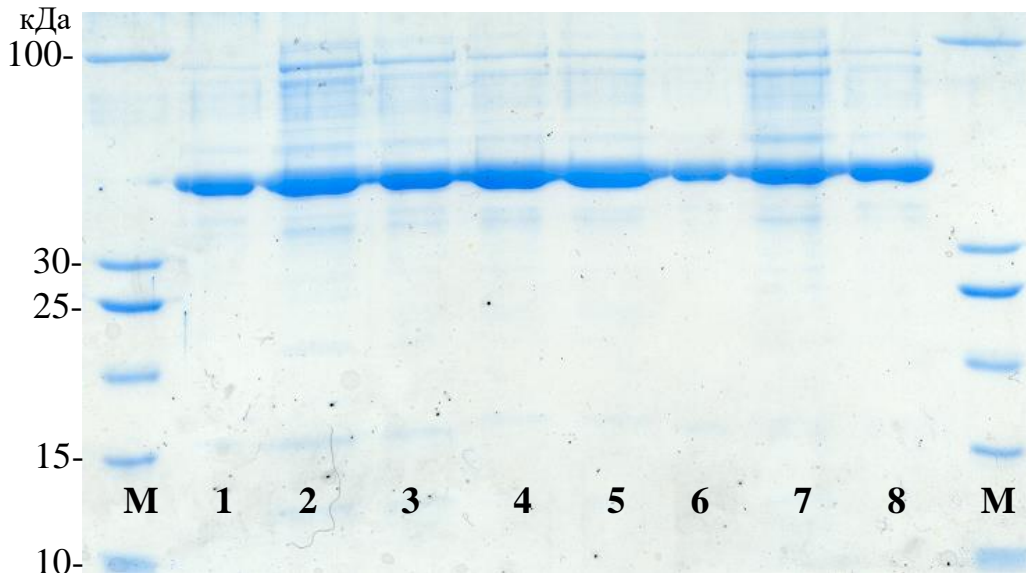


Рис. 3.3.4.3. PAAG-электрофорез, М –маркер молекулярной массы, кДа, 1 – wt-SauФДГ, 2 – I220H, 3 – T250H, 4 – TGA+K368H, 5 – AGA+K368H, 6 – K368H, 7 – I220H+T250H+TGA+K368H, 8 – I220H+TGA+K368H.

Кинетические параметры новых мутантных SauФДГ и фермента дикого типа представлены в таблице 3.3.4.2. Введение замены I220H приводило к увеличению $K_M^{NAD^+}$ с 220 до 330 мкМ, $K_M^{HCOO^-}$ с 130 до 150 мМ; k_{cat} не изменилась по сравнению со значением для SauФДГ дикого типа. При замене T250H наблюдается увеличение $K_M^{NAD^+}$ до 540 мкМ и снижение $K_M^{HCOO^-}$ до 100 мМ; k_{cat} снизился с 20 до 13 с⁻¹. Эти результаты можно объяснить тем, что введение более объемных остатков гистидина может привести к нарушению конформации активного центра.

Замена K368H привела к незначительному увеличению $K_M^{NAD^+}$ до 280 мМ и снижению $K_M^{HCOO^-}$ до 105 мМ, k_{cat} снизилась до 6 с⁻¹.

Таблица 3.3.4.2.

Каталитические свойства и активационные параметры процесса термоинактивации SauФДГ дикого типа и мутантных форм фермента.

Фермент	k_{cat} , c^{-1}	$K_M^{NAD^+}$, μM	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)	Ссылка
PseФДГ	7,3	65	6,5	540±20	1320±40	[1]
wt-SauФДГ	20,0±1,0	220±7	130±10	430±20	1010±60	[8]
I220H	21,0±1,0	330±20	150±10	450±20	1040±50	Данная работа
T250H	13,0±0,7	540±50	100±10	590±30	1450±100	Данная работа
K368H	6,0±0,3	280±20	105±10	650±50	1630±150	Данная работа
TGA+K368H	4,0±0,1	3360±200	420±50	580±30	1415±100	Данная работа
AGA+K368H	4,0±0,1	3300±300	230±20	580±20	1410±100	Данная работа
I220H+TGA+K368H	4,0±0,1	4980±600	185±20	580±20	1410±80	Данная работа
I220H+T250H+TGA+K368H	4,0±0,1	3350±200	300±50	560±20	1420±90	Данная работа

Введение трех дополнительных аминокислот приводит к резкому увеличению $K_M^{NAD^+}$, примерно до 3300 μM для вставок TGA и AGA, вставка TGA приводит к увеличению $K_M^{HCOO^-}$ до 480 мМ, а более гибкая вставка AGA практически не меняет этот параметр. Для обеих мутантных форм k_{cat} уменьшилась до 4 c^{-1} . Аналогичные результаты наблюдались для мутантных форм с заменами I220H+TGA+K368H и I220H+T250H+TGA+K368H. Таким образом, введение вставок на С-конце фермента приводит к увеличению констант Михаэлиса как по коферменту, так и по субстрату, а также к снижению каталитической константы SauФДГ.

На рис. 3.3.4.4 А представлены зависимости остаточной активности от времени для новых и ранее полученных мутантных SauФДГ. Зависимости линейны в полулогарифмических координатах, $\ln(A/A_0) - t$, т. е. инактивация мутантных SauФДГ, как и фермента дикого типа соответствует кинетике реакций первого порядка. Константы скорости термоинактивации k_{in} во всех случаях не зависели от концентрации фермента [118]. Это доказывает мономолекулярный механизм

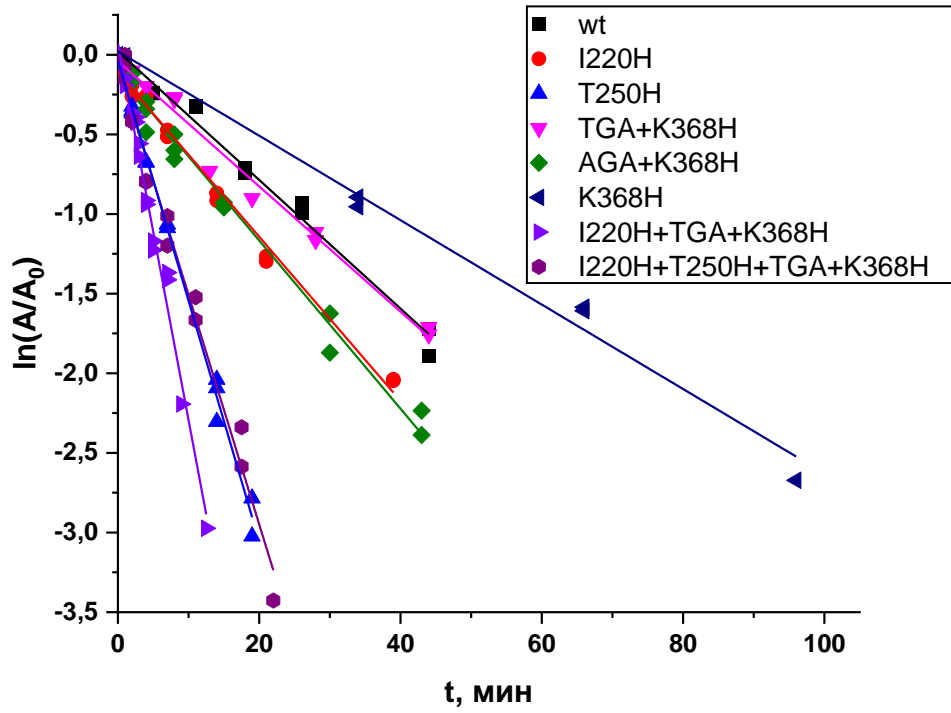
инактивации полученных мутантных ферментов. Исследование термостабильности проводили в широком диапазоне температур. Замена K368H приводит к стабилизации фермента при 60 – 64°C. По всей видимости, происходит образование новой связи. Введение вставок TGA и AGA вместе с заменой K368H привело к незначительному изменению термостабильности. Замены I220H, T250H приводят к снижению термостабильности примерно в 1,5 – 2 раза. Возможным объяснением этого может быть нарушение системы водородных связей и электростатических взаимодействий в белковой глобуле в области расположения этих остатков.

Зависимость константы скорости инактивации от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$ представляет собой прямую линию с наклоном, равным $\Delta H^\ddagger/R$. На рис. 3.3.4.4. Б представлены температурные зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации для всех полученных мутантных форм и фермента дикого типа в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$. Используя теорию активированного комплекса, были рассчитаны значения энтальпии (ΔH^\ddagger) и энтропии (ΔS^\ddagger) активации, представленные в таблице 3.3.4.2.

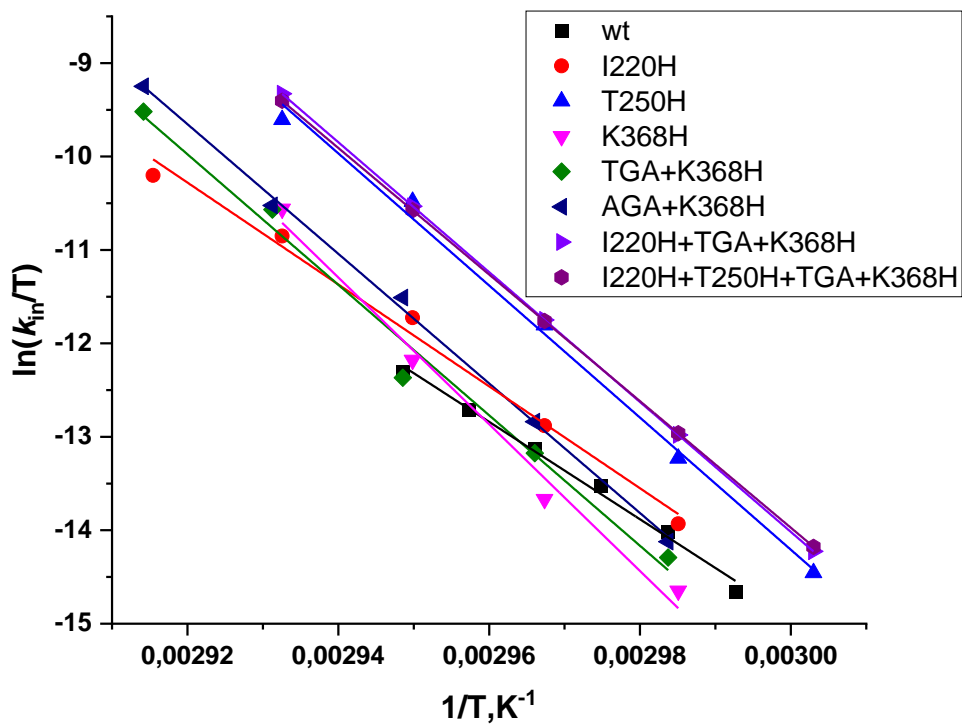
Высокие значения активационных параметров могут свидетельствовать о том, что процессы термоинактивации фермента обусловлены разворачиванием белковой глобулы. Особо следует отметить, что по сравнению с ферментом дикого типа мутантные SauФДГ имеют гораздо более высокие значения ΔH^\ddagger . Это означает, что у мутантных ферментов константа скорости термоинактивации с при снижении температуры уменьшается гораздо больше, чем фермент дикого типа. На основании полученных параметров активации были рассчитаны значения констант скорости термоинактивации в интервале температур от 4°C до 75°C и сравнили их с диким типом (таблица 3.3.4.3.).

Из данных таблицы следует, что при комнатной температуре мутантные SauФДГ превосходят по термостабильности фермент дикого типа на несколько порядков. Наиболее заметный эффект стабилизации при низких температурах наблюдается для SauФДГ K368H, TGA+K368H и AGA+K368H.

По результатам компьютерного моделирования можно предположить, что это может быть связано с формированием более компактной конформации активного центра в области С-концевой последовательности после введения замены.



А



Б

Рис. 3.3.4.4. (А) – Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для SauФДГ дикого типа (wt) и ее мутантных форм при 64°C, 0,1 М NaPB, 0,01 М NaЭДТА, pH 7,0; (Б) – Зависимости констант скорости термоинактивации для SauФДГ дикого типа (wt) и ее мутантных форм от температуры в координатах $[\ln(k_{in}/T)] - 1/T$ для фермента дикого типа и мутанта.

Таблица 3.3.4.3.

Эффект стабилизации мутантных форм по сравнению с ферментом дикого типа, k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut} .

t, °C	I220H	T250H	K368H	TGA+ K368H	AGA+ K368H	I220H+TGA+ K368H	I220H+ T250H+ TGA+ K368H
4	1,50E+03	2,30E+07	1,37E+10	4,41E+07	2,76E+07	8,96E+06	2,83E+06
20	1,41E+02	8,82E+04	1,13E+07	2,02E+05	1,32E+05	4,30E+04	1,94E+04
25	7,11E+01	1,75E+04	1,43E+06	4,22E+04	2,78E+04	9,11E+03	4,56E+03
30	3,66E+01	3,68E+03	1,95E+05	9,29E+03	6,20E+03	2,03E+03	1,13E+03
35	1,92E+01	8,10E+02	2,83E+04	2,15E+03	1,45E+03	4,76E+02	2,90E+02
40	1,03E+01	1,88E+02	4,37E+03	5,21E+02	3,55E+02	1,17E+02	7,83E+01
50	3,15E+00	1,15E+01	1,24E+02	3,49E+01	2,42E+01	8,01E+00	6,42E+00
60	1,03E+00	8,35E-01	4,35E+00	2,75E+00	1,95E+00	6,45E-01	6,12E-01
61	9,28E-01	6,48E-01	3,15E+00	2,15E+00	1,52E+00	5,05E-01	4,88E-01
62	8,34E-01	5,03E-01	2,10E+00	1,68E+00	1,20E+00	3,97E-01	3,89E-01
63	7,49E-01	3,92E-01	1,66E+00	1,32E+00	9,40E-01	3,12E-01	3,11E-01
64	6,74E-01	3,05E-01	1,67E+00	1,04E+00	7,40E-01	2,45E-01	2,49E-01
65	6,07E-01	2,38E-01	8,78E-01	8,16E-01	5,83E-01	1,94E-01	1,99E-01
66	5,46E-01	1,86E-01	7,93E-01	6,43E-01	4,60E-01	1,53E-01	1,60E-01
68	4,44E-01	1,14E-01	3,28E-01	4,01E-01	2,88E-01	9,56E-02	1,03E-01
70	3,62E-01	7,06E-02	1,86E-01	2,51E-01	1,81E-01	6,02E-02	6,70E-02
75	2,19E-01	2,16E-02	4,11E-02	8,00E-02	5,81E-02	1,93E-02	2,32E-02

Поскольку введение трех дополнительных аминокислотных остатков не привело к существенному изменению термостабильности в области температур 60 – 70°C, сопровождающееся критическим ухудшением каталитических свойств, было выдвинуто предположение, что введение дополнительного витка α -спирали приводит к закрытию входа в активный центр. Иными словами, изменение носит локальный характер, не затрагивающее белковую глобулу в целом. Дальнейший анализ С-концевой последовательности и сопоставление структур PseФДГ и SauФДГ выявил также ряд отличий в непосредственной близости к каталитически значимым С-концевым остаткам, описанным ранее. В таблице 3.3.4.1. представлены структурно-эквивалентные положения с типом их взаимодействия. В структуре SauФДГ обнаружено присутствие двух больших по объему остатков F347 на конце α -8 спирали и F353 в неструктурированной области (рис. 3.3.4.5.).

Примечательно, что в структурно эквивалентных положениях PseФДГ (таблица 3.3.4.1 и рис. 3.3.4.5 А) имеется меньший по объему остаток I361.

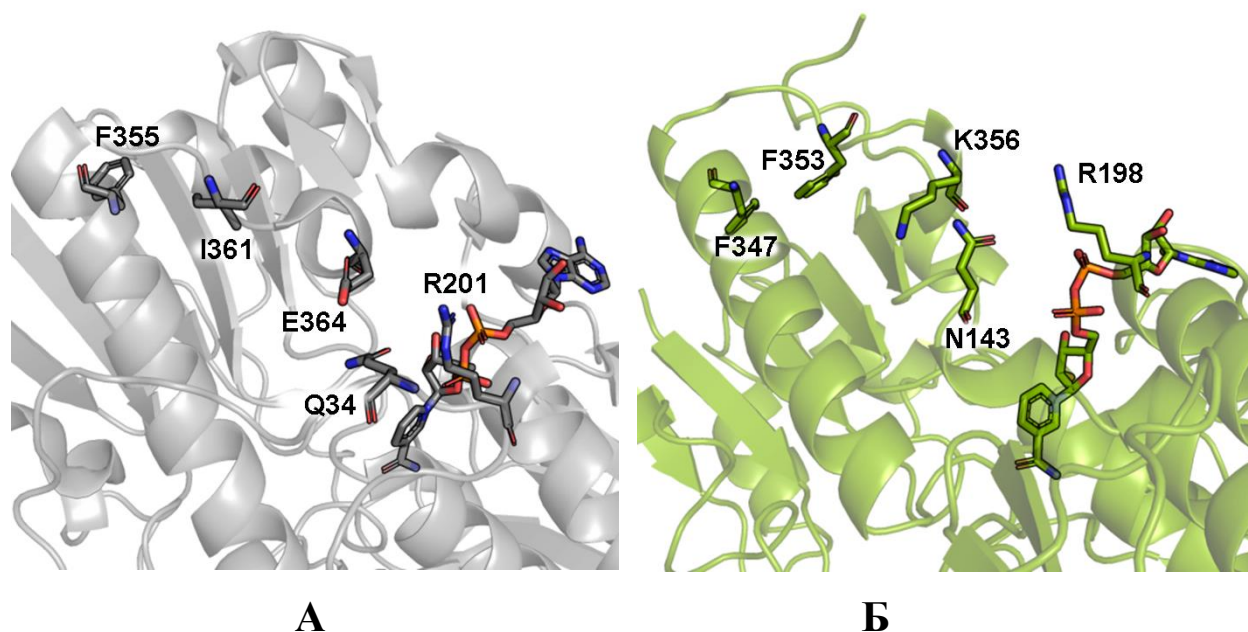


Рис. 3.3.4.5. (А) – Структура С-концевой области PseФДГ; (Б) – Структура С-концевой области SauФДГ.

Предположительно наличие двух объемных остатков фенилаланина может приводить к увеличению объема активного центра и также, могло бы объяснять подобную инертность структуры активного центра к введению дополнительных элементов вторичной структуры. Присутствие двух объемных остатков Phe может быть значимым также потому, что данная область структуры у SauФДГ содержит важный остаток K356, расположенный напротив одноименно заряженного остатка R198 (рис. 3.3.4.5 Б), который находится в высококонсервативном мотиве G(A)X₁GX₂X₃G [119]. Это может приводить к взаимному отталкиванию одноименных зарядов и увеличению объема активного центра. Вместо положительно заряженного K356 в структурно эквивалентном положении PseФДГ расположен остаток E364, противоположно заряженный относительно высококонсервативного R201. Таким образом, это электростатическое взаимодействие (притяжение) может играть важную роль в формировании оптимальной конформации активного центра и косвенно – вовлечение С-концевой области в связывание кофермента у PseФДГ.

3.4. Исследование SauФДГ методом ЯМР

Как уже упоминалось ранее, форматдегидрогеназа из бактерий *S. aureus* играет важную физиологическую роль при образовании клетками биопленок под

воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды (п.1.2.2.). Таким образом, данный фермент можно рассматривать в качестве перспективной мишени для разработки лекарственных препаратов на основе субстратоподобных ингибиторов. Данный подход основан на разработке химических соединений, способных достаточно прочно связываться с мишенью и приводить к изменению ее свойств, в том числе и функции.

Одним из основных экспериментальных методов, используемых в области рационального дизайна лекарств, является ядерно-магнитный резонанс (ЯМР).

Положительным качеством SauФДГ, делающим данный белок удобным объектом для изучения методом ЯМР, является выдающаяся термостабильность (п.1.3.2.). Для накопления сигнала достаточной интенсивности требуется выдерживать образцы до двух суток при температуре 40 – 50°C и концентрации белка более 1 мг/мл. Проверили остаточную активность SauФДГ в условиях высокой концентрации белка 15 мг/мл в 50 мМ натрий-фосфатном буферном растворе при 55°C. Было показано сохранение активности до 70% от исходной через 65 ч инкубации. Помимо того, что данный белок сохраняет свои свойства в течение одного измерения, это может означать «многообразие» препаратов SauФДГ, что существенно снижает расход белка и удешевляет исследования.

В связи с высокой молекулярной массой (общая масса белка составляет 74 кДа) и достаточно большой площадью межсубъединичного контакта изучение спектров ЯМР и выполнение отнесения является сложной научной задачей вследствие низкого разрешения сигналов. Значения молекулярных масс белков, для которых были получены структуры методом ЯМР не превышают 50 кДа. И, поскольку, на данный момент уже существует структура SauФДГ, полученная экспериментально методом РСА (PDB 6ТТВ) расшифровка структуры ЯМР не являлась первоочередной задачей в рамках проекта (грант РФФИ 19-14-00115), выполняемого коллективом Лаборатории Магнитной Томографии и Спектроскопии (ЛМТС), факультета Фундаментальной Медицины МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством в.н.с., д.х.н. Польшакова В. И.

В рамках данной работы была поставлена задача получить высокоизотопно меченные образцы формиатдегидрогеназы, содержащие метки из стабильных

изотопов ^2H , ^{15}N и ^{13}C . Используя данные образцы можно получить 2D-спектр HSQC (SauФДГ ^1H , ^{15}N , ^{12}C и SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{12}C), 3D-спектры HNCO, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCA, HNCACB (SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{13}C), позволяющие выполнить отнесение сигналов и отслеживать связывание потенциальных ингибиторов в отдельных участках молекулы.

Поскольку получение изотопно-меченных препаратов ферментов сопряжено с увеличением стоимости культивирования, была поставлена задача оптимизировать наработку клеточной биомассы и экспрессии ФДГ для достижения наибольшего выхода целевого белка с литра среды. Как упоминалось в п.3.1. при экспрессии укороченной формы гена SauФДГ2 в PET24a(+) выход активной формиатдегидрогеназы превышает выход SauФДГ1 примерно в 2 раза. Таким образом, в дальнейших экспериментах нами была использована укороченная форма гена, а наработку клеточной биомассы осуществляли в M9 (п.2.1.).

3.4.1. Оптимизация условий экспрессии SauФДГ

Посевной материал готовили по стандартной методике, представленной в пп.2.2.11. – 2.2.13. с использованием антибиотиков Amp 400 мкг/мл, Cm 25 мкг/мл. Утром пересеяли 25 мкл ночной культуры в 25 мл минимальной среды M9, содержащей Amp 400 мкг/мл. Суспензию клеток растили при 37°C, 200 об/мин до поглощения 0,6 – 0,8 после чего был добавлен индуктор до рабочей концентрации 2 г/л в колбе (в случае лактозы) или 0,1 мМ (в случае IPTG). Экспрессию белка проводили при 20°C, 210 об/мин в течение суток. Как показано в таблице 3.4.1.1. данный протокол культивирования характеризуется резким снижением выхода целевого белка более чем в 100 раз по сравнению со стандартной методикой (п.2.2.13.).

На рисунке 3.4.1.1. представлен аналитический РААГ-электрофорез клеточного лизата в денатурирующих условиях. Как видно, тип индуктора, а также время экспрессии не привели к увеличению выхода целевого белка. Поскольку в дальнейшем предстояло получать препараты белка, содержащие ^{13}C , в дальнейшем работали с IPTG в качестве индуктора.

Таблица 3.4.1.1.

Основные показатели экспрессии SauФДГ2 в различных условиях.

Основные параметры культивирования SauФДГ2	Выход фермента с литра среды, ед.	Масса клеток в литре среды, г	Содержание фермента в клетках, ед./г
M9, 2г/л глюкоза, 20°C, 210 об/мин	108	13	8
M9, 0,1 мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	103	10	10
M9, 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	863	12	70
M9/10% 2YT, 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	3724	6,8	548
M9/25% 2YT, 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	5515	4,4	1253
M9/50% 2YT, 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	12047	10,8	1115
M9/100% 2YT, 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	10440	11,2	932
M9 в 100% D ₂ O и 100% D-Glycerol/50% 2YT в 100% D ₂ O, 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	834,5	12,5	67

Так как он не может быть использован бактериями в качестве дополнительного источника углерода. Увеличение конечной концентрации IPTG до 1 мМ при одинаковых условиях культивирования и экспрессии привело к увеличению выхода белка в 8 раз (таблица 3.4.1.1.A).

Помимо этого, для увеличения выхода белка использовали «комбинированную» питательную среду. Для этого 2,5 мкл ночной суспензии пересеяли в 2,5 мл минимальной среды M9 с канамицином (30 мкг/мл) и добавками, инкубировали при 37°C, 200 об/мин до поглощения 0,6 – 0,8 ОЕ. Далее суспензию клеток центрифугировали при 6000 об/мин, +4°C в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удалили, осадок ресуспендировали в 25 мл богатой питательной среды 2YT с различным содержанием питательных веществ. При достижении поглощения

0,6 – 0,8 добавили индуктор. Экспрессию проводили при 20°C, 210 об/мин в течение 24 часов. На рис. 3.4.1.1.Б показан электрофорез клеточного лизата при различном содержании 2УТ в смеси, используемой при экспрессии. Согласно таблице 3.4.1.1.А наибольший выход целевого белка показан для 50% 2УТ. Таким образом, было показано, что при экспрессии ФДГ нет необходимости использовать концентрированную богатую питательную среду для достижения высокого уровня экспрессии. Соответственно, возможен более экономный расход коммерческих изотопно-обогащенных питательных сред.

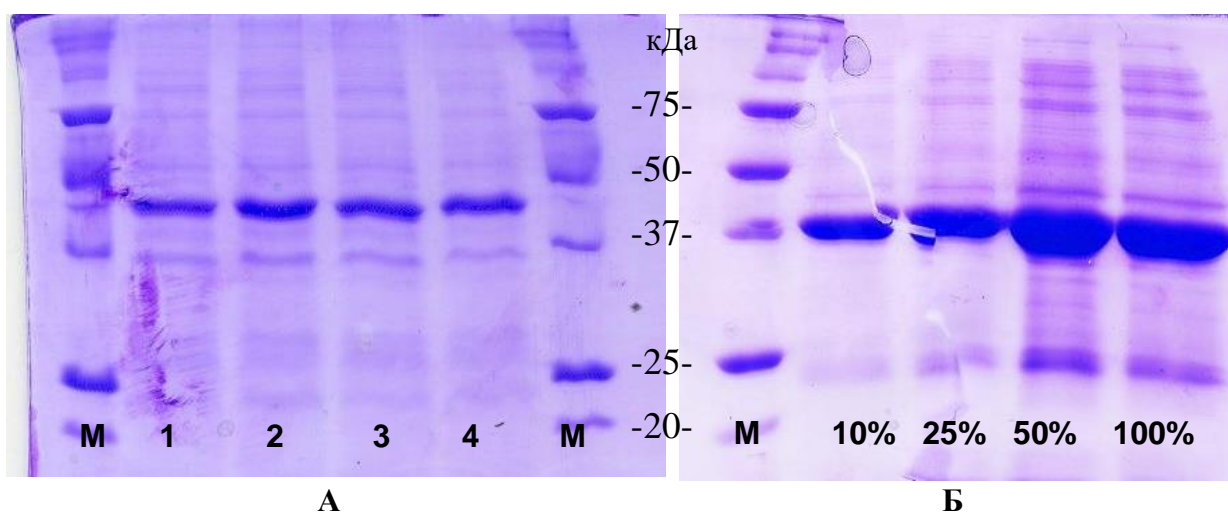


Рис. 3.4.1.1. Оптимизация условий экспрессии изотопно-меченных белков, М – маркер молекулярной массы, кДа. **(А)** 1,2 – 17,5 и 21,5 ч соответственно после добавления индуктора лактозы 2 г/л, 3,4 – 17,5 и 21,5 часов после добавления индуктора IPTG 0,1 мМ; **(Б)** Клеточный лизат в условиях 10% - 100% 2УТ при экспрессии соответственно.

Получение полностью дейтерированной ФДГ

Получение равномерно меченого дейтерием препарата белка может стать препятствием на пути получения ЯМР спектров и извлечения информации о структуре фермента, так как введение тяжелой воды и дейтерированного источника углерода приводит к резкому снижению уровня экспрессии целевого белка и снижению показателей роста клеточной культуры. В связи с этим, необходимо последовательно увеличивать содержание дейтерия в питательной среде.

Утром проводили пересев 2,5 мкл ночной суспензии в 2,5 мл минимальной среды М9 (1:1000) без обогащения дейтерием с содержанием канамицина до рабочей концентрации 30 мкг/мл и добавками. Культуру клеток инкубировали при 37°C, 200 об/мин до достижения поглощения 0,6 – 0,8. После этого осуществили серию последовательных пересевов в соотношении 1:10 в М9 во все более обогащенную дейтерием среду (80%, 90% и 100% D₂O с ¹H-глицерином). На каждой стадии

адаптации культуры клеток к определенному содержанию дейтерия в питательной среде клетки инкубировали при 250 об/мин, 37°C на протяжении 24 ч. После достижения 100% насыщения дейтерием осуществляли последовательную адаптацию культуры клеток к увеличению содержания дейтерированного источника углерода по аналогичной схеме (1:10 в М9 с 50%, 80%, 100% ^2H -глицерином). Поскольку увеличения содержания дейтерированного источника углерода приводила к снижению скорости роста, инкубация на каждой стадии увеличивалась и составила 24, 36, 48 часов соответственно. 2,5 мкл суспензии клеток, полученной на последнем этапе, перенесли в 2,5 мл минимальной среды М9, содержащей 100% D_2O , 100% ^2H -глицерин, канамицин 30 мкг/мл и добавки, описанные в п.3.1., растили при 30°C, 250 об/мин до поглощения 0,6-0,8 после чего осуществили количественный перенос в 22,5 мл питательной среды 50% 2YT в 100% D_2O . При достижении поглощения 0,6-0,8 добавили индуктор. Экспрессию проводили при 20°C, 210 об/мин в течение 24 часов. Как видно на рисунке использование дейтерированного источника углерода и тяжелой воды негативно сказывается на экспрессии ФДГ.

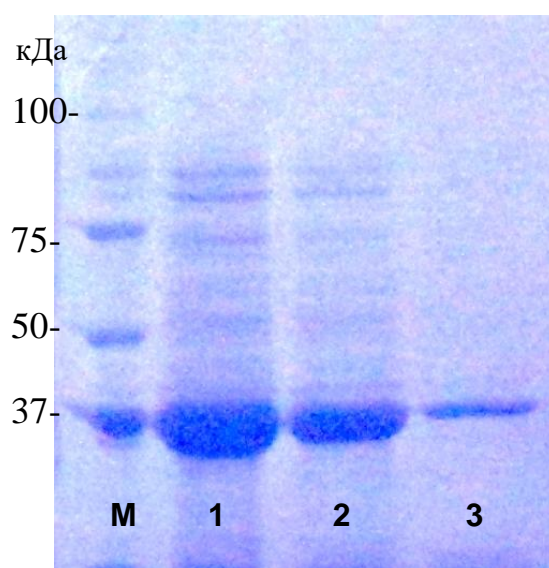


Рис. 3.4.1.2. М – маркер молекулярной массы, кДа, 1 – 50% 2YT в 100% H_2O , 2 – 50% 2YT в 100% D_2O , 3 – М9 2YT в 100% D_2O .

3.4.2. Получение изотопно-меченых образцов SauФДГ

На основании данных, полученных в предыдущем пункте, оптимизировали методики получения изотопно-меченных препаратов фермента. Для экспрессии использовали готовые питательные среды ISOGROW, обогащенные изотопами

^2H , ^{15}N , ^{13}C . Условия и основные показатели экспрессии представлены в таблице 3.4.2.1. Электрофорез клеточного лизата представлен на рисунке 3.4.2.1.

Таблица 3.4.2.1.

Основные показатели экспрессии SauФДГ2 в различных условиях с использованием изотопно-меченных источников ^2H , ^{15}N , ^{13}C . Образцы, выделенные серым, были использованы для снятия спектров.

Основные параметры культивирования SauФДГ2	Выход фермента с литра среды, ед.	Масса клеток в литре среды, г	Содержание фермента в клетках, ед./г	Получаемый образец
M9/10% ISOGROW ^1H , ^{15}N , 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	13135	6	2189	SauФДГ ^1H , ^{15}N , ^{12}C
M9/25% ISOGROW ^1H, ^{15}N 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	22138	15,6	1419	SauФДГ ^1H, ^{15}N, ^{12}C
M9/50% ISOGROW ^1H , ^{15}N 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	16074	15,2	1057	SauФДГ ^1H , ^{15}N , ^{12}C
M9 в 100% D ₂ O и 100% ^2H -глицерин/25% ISOGROW ^2H , ^{15}N в 100% D ₂ O, 1мМ IPTG, 20°C, 250 об/мин	13280	11	1206	SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{12}C
M9 в 50% D₂O и 100% ^2H-глицерин/25% ISOGROW ^2H, ^{15}N в 50% D₂O, 1мМ IPTG, 20°C, 250 об/мин	20403	17	1200	SauФДГ ^2H, ^{15}N, ^{12}C
M9 в 50% D₂O и 100% ^2H, ^{13}C-глюкоза/25% ISOGROW ^2H, ^{15}N, ^{13}C в 50% D₂O, 1мМ IPTG, 20°C, 250 об/мин	22318	20	1116	SauФДГ ^2H, ^{15}N, ^{13}C

MALDI масс-спектры пептидов после триптического гидролиза образцов SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{12}C и SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{13}C показали равномерное распределение указанных изотопов в молекуле белка со степенью обогащения не менее 95% по ^2H и не менее 98% по ^{13}C и ^{15}N . Данный уровень обогащения изотопами является максимально достижимым в условиях научно-исследовательской лаборатории и полностью достаточен для проведения ЯМР-экспериментов.

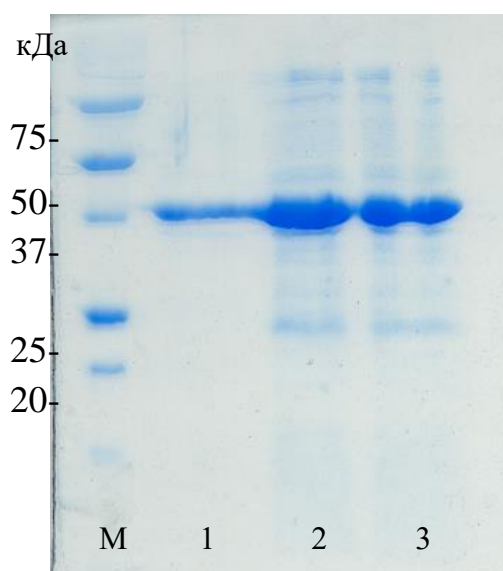


Рис. 3.4.2.1. М – маркер молекулярной массы, кДа, 1 – очищенный SauФДГ $^1\text{H}, ^{14}\text{N}, ^{12}\text{C}$, 2,3 – клеточный лизат SauФДГ $^2\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$.

3.4.3. Пробоподготовка образцов и измерение ЯМР спектров

Полученные препараты ферментов были очищены по стандартной методике, описанной в пп.2.2.14. – 2.2.15. Конечная концентрация препаратов ферментов, используемых для снятия спектра составила 0,25 мМ в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 6,9. Данный буфер является предпочтительным для снятия спектров подобных молекул. Данный уровень концентрации оказался достаточен для снятия спектров SauФДГ вследствие высокого качества пробы и уникальных релаксационных свойств белка, позволяющих получать высокую чувствительность и селективность детекции пиков в двумерных и трёхмерных спектрах.

С использованием полученных препаратов белка коллегами из Лаборатории Магнитой Томографии и Спектроскопии (ЛМТС), факультета Фундаментальной Медицины МГУ им. М.В. Ломоносова были детектированы два типа ЯМР-спектров:

1. 2D-спектры гетероядерной корреляции атомов ^{15}N с ^1H : $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC и $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ SOFAST-HMQC [120]. Эти эксперименты использовали для оценки чистоты образцов на всех этапах выполнения работы с белком. Мы убедились в отсутствии примесей низкомолекулярной природы, искажающих данные ЯМР-экспериментов.
2. 3D-спектры для выполнения отнесения резонансов основной цепи белка: HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)HN, HNCO, HN(CA)CO, HNHAHB, HBHA(CO)HN.

Все спектры, необходимые для выполнения отнесения резонансов в белке были измерены для белка в апо-форме. Данную форму выбрали для упрощения постановки эксперимента по снятию трёхмерных ЯМР-спектров. По итогам снятия спектров с данной формы белка удалось получить отнесение 85% аминокислотных остатков белка, что достаточно для использования отнесения в целевых ЯМР экспериментах (ЯМР-титрование).

3.4.4. Исследование структуры SauФДГ методом ЯМР

Отнесение сигналов, как и процесс снятия спектров, был выполнен коллегами из ЛМТС. На основании полученных спектров было выполнено отнесение сигналов, характеризующееся 85% покрытием. Снижение процента покрытия может происходить вследствие недостаточной разрешенности сигналов, высокой подвижностью отдельных неупорядоченных участков структуры, большой площадью межсубъединичного контакта.

Для полученных образцов коллегами из ЛМТС определены параметры релаксации ядер изотопа азота и вычислены параметры порядка S^2 для холо-формы формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus* (рис. 3.4.4.А).

Можно видеть, что подвижность цепи в апо-форме повышена в области 41-44, 73-79, 108-111, 186, 219-222, 264-267, 351-353, 355-360 аминокислотных остатков (нумерация соответствует структуре бТТВ). Данные аминокислотные остатки значительно удалены от активного центра и не влияют на связывание молекулы кофермента за исключением аминокислотных остатков в 219 – 222, располагающихся в окружении значимого остатка D218 и 364 – 369 положениях, соответствующих С-концевой области. Значение данных остатков детально было показано в п.3.3.2. и п.3.3.5. соответственно. Это полностью согласуется с результатом РСА. Остальные каталитически значимые области характеризуются высокой степенью упорядоченности. На рис. 3.4.4. Б показано расположение α -спиралей и β -листов SauФДГ в соответствии с аминокислотной последовательностью согласно данным ЯМР. Неструктурированные области не отображены.

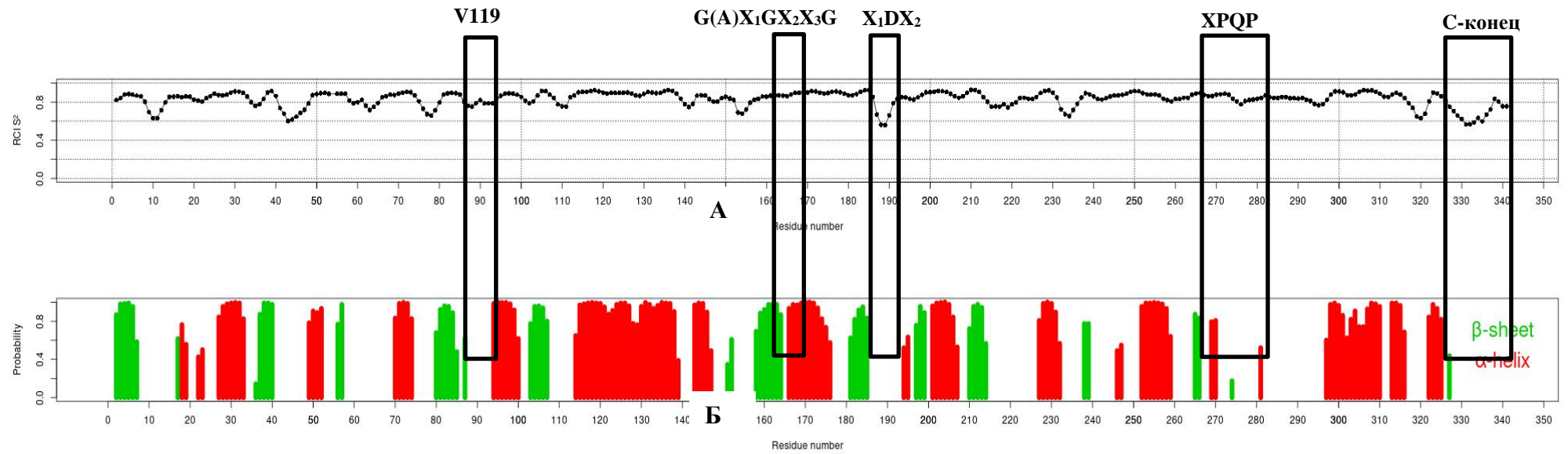


Рис. 3.4.4. (А) Предсказание параметра порядка; (Б) Данные об элементах вторичной структуры SauФДГ в апо-форме, полученные методом ЯМР.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований в соответствии с поставленной целью диссертационной работы было изучено влияние N-концевой последовательности на уровень экспрессии и каталитические свойства SauФДГ. Впервые была экспрессирована форма SauФДГ, содержащая полную аминокислотную последовательность. Было показано существенное влияние качественного и количественного состава реакционной среды на каталитические свойства. Проведено обширное исследование взаимосвязи структура-функция в 17 положениях аминокислотной последовательности SauФДГ с целью снижения константы Михаэлиса по NAD^+ . Формиатдегидрогеназа является ключевым ферментом в жизнедеятельности патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*, при образовании ими биопленок. Соответственно ее можно рассматривать в качестве перспективной мишени в борьбе с данным патогеном в условиях повышенной устойчивости к антибиотикам. Поскольку Ядерно Магнитный Резонанс является одним из наиболее эффективных методов поиска перспективных ингибиторов ферментов, в ходе данной работы проводились эксперименты по получению образцов SauФДГ, содержащие изотопные метки.

На основании полученных результатов были сформулированы следующие выводы:

1. Получаемая в результате экспрессии полноразмерного гена *Saufdh1* формиатдегидрогеназа идентична по структуре и каталитическим свойствам белку, экспрессируемому из укороченного гена *Saufdh2* вследствие пост-трансляционной модификации по остатку Met34.
2. Разработана эффективная четырех-компонентная буферная система, состоящая из 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly, приводящая к снижению $K_M^{\text{NAD}^+}$ для wt-SauФДГ в 1,5 раза по сравнению с 0,1 М NaPB.
3. Провели рациональный дизайн каталитически значимых остатков в различных частях аминокислотной последовательности SauФДГ. Замена V119A привела к снижению значений $K_M^{\text{NAD}^+}$ и $K_M^{\text{HCOO}^-}$ в 2,5 и 1,6 раз соответственно по сравнению с ферментом дикого типа. Замена объемного остатка Phe в 194 положении на менее объемный остаток Val привела к снижению констант Михаэлиса по NAD^+ и формиату в 4 и 2 раза соответственно при незначительном снижении k_{cat} .

4. Получены высоко-изотопно меченные ^2H , ^{15}N , ^{13}C образцы SauФДГ, которые могут использоваться в исследовании структуры и поиска перспективных ингибиторов методом ЯМР.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase // *Biochemistry(Moscow)*. – 2004. – Vol. 69. – № 11. – P. 1252–1267.
2. Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Götz F. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – № 5. – P. 2663–2676.
3. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. / Role of a Structurally Equivalent Phenylalanine Residue in Catalysis and Thermal Stability of Formate Dehydrogenases from Different Sources // *Biochemistry(Moscow)*. – 2015. – Vol. 80. – № 13. – P. 1690–1700.
4. Weckbecker A., Gröger H., Hummel W. / Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Germany*. – 2010. – Vol. 120. – P. 195–242.
5. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Shelomov M.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D’Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. / Rational Design of Practically Important Enzymes // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2018. – Vol. 73. – № 1. – P. 1–6.
6. Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. Highly-Active Recombinant Formate Dehydrogenase from Pathogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*: Preparation and Crystallization // *Biochemistry(Moscow)*. – 2020. – Vol. 85. – № 6. – P. 689–696.
7. Otto M. MRSA virulence and spread // *Cellular microbiology*. – 2012. – V. 14. – № 10. – P. 1513–1521.
9. Tam K., Torres V.J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes // *Microbiol. Spectr.* / ed. Fischetti V.A. et al. 2019. № 7(2).
8. Tong S.Y.P., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2015. – Vol. 28. – № 3. – P. 603–661.
10. Rammelkamp C.H., Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of

- penicillin. // Proc R Soc Exp Biol Med. – 1942. – Vol. 51. – P. 386–389.
11. Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. // Lancet. – 1948. – Vol. 2. – P. 641–644.
 12. Bondi A. J., Dietz C.C. Penicillin resistant *staphylococci*. // Proc Soc Exp Biol Med. – 1945. – Vol. 60. – P. 55–58.
 13. Boyle-Vavra S., Daum R.S. Molecular strategies of *Staphylococcus aureus* for resisting antibiotics. // Staphylococcus: Genetics and Physiology. Caister Academic Press. – 2016. – P. 249–300.
 14. Jevons M.P. “Celbenin”-resistant *staphylococci*. // BMJ. – 1961. – Vol. 1. – P. 124–125.
 15. Wang S., Reeve S.M., Holt Graham T., Ojewole A.A., Frenkel M.S., Gainza P., Keshipeddy S., Fowler V.G., Wright D.L., Donald B.R. Chiral evasion and stereospecific antifolate resistance in *Staphylococcus aureus* // PLOS Comput. Biol. / ed. Slusky J. – 2022. Vol. 18. – № 2. – P. e1009855.
 16. Kompis I.M., Islam K., Then R.L. DNA and RNA Synthesis: Antifolates // Chem. Rev. – 2005. – Vol. 105. – № 2. – P. 593–620.
 17. Ren X. Guo X., Liu C., Jing S., Wang T., Wang L., Guan J., Song W., Zhao Y., Shi Y. Natural flavone hispidulin protects mice from *Staphylococcus aureus pneumonia* by inhibition of α -hemolysin production via targeting AgrAC // Microbiol. Res. – 2022. – Vol. 261. – P. 127071.
 18. Mukheem A., Shahabuddin S., Akbar N., Ahmad I., Sudesh K., Sridewi N. Development of Biocompatible Polyhydroxyalkanoate/Chitosan-Tungsten Disulphide Nanocomposite for Antibacterial and Biological Applications // Polymers (Basel). – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2224.
 19. Bogomolski-Yahalom V., Matzner Y. Disorders of neutrophil function // Blood Rev. – 1995. – Vol. 9. – № 3. – P. 183–190.
 20. Kawada M., Okuzumi K., Hitomi S., Sugishita C. Transmission of *Staphylococcus aureus* Between Healthy, Lactating Mothers and their Infants by Breastfeeding // J. Hum. Lact. – 2003. – Vol. 19. – № 4. – P. 411–417.
 21. Kitajima H. Prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in neonates // Pediatr. Int. – 2003. – Vol. 45. – № 2. – P. 238–245.
 22. Yao S., Hao L., Zhou R., Jin Y., Huang J., Wu C. Formation of Biofilm by

- Tetragenococcus halophilus* Benefited Stress Tolerance and Anti-biofilm Activity Against *S. aureus* and *S. typhimurium* // Front. Microbiol. – 2022. – Vol. 13. – P. 819302.
23. Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. Prediction of Structurally Conserved Regions of D-Specific Hydroxy Acid Dehydrogenases by Multiple Alignment with Formate Dehydrogenase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. Vol. 192. – № 1. – P. 182–188.
 24. Niks D., Duvvuru J., Escalona M., Hille R. Spectroscopic and Kinetic Properties of the Molybdenum-containing, NAD⁺-dependent Formate Dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. 291. – № 3. – P. 1162–1174.
 25. Xia W., Duvvuru J., Escalona M., Hille R. / Roles of NAD⁺ / NADH and NADP⁺ / NADPH in Cell Death // Curr. Pharm. Des. – 2009. – Vol. 15. – № 1. – P. 12–19.
 26. Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. NAD⁺ -dependent Formate Dehydrogenase from Plants. // Acta Naturae. – 2011. – Vol. 3. – № 4. – P. 38–54.
 27. Shuber A.P., Orr E., C. Recny M.A., Schendel P.F., May H.D., Schauer N.L., Ferry J.G. / Cloning, expression, and nucleotide sequence of the formate dehydrogenase genes from *Methanobacterium formicicum*. // J. Biol. Chem. – 1986. – Vol. 261. – № 28. – P. 12942–12947.
 28. Thomas S.P., Alhasawi A., Auger C., Omri A., Appanna V.D. The role of formate in combatting oxidative stress // Antonie van Leeuwenhoek. – 2016. – Vol. 109. – № 2. – P. 263–271.
 29. Popov V.O., Lamzin V.S. NAD⁺-dependent formate dehydrogenase // Biochem. J. – 1994. – Vol. 301. – № 3. – P. 625–643.
 30. Baerends R.J.S., De Hulster E., Geertman J.M.A., Daran J.M., Van Maris A.J.A., Veenhuis M., Van Der Klei I.J., Pronk J.T. Engineering and Analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Uses Formaldehyde as an Auxiliary Substrate // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – № 10. – P. 3182–3188.
 31. Chistoserdova L., Laukel M., Portais J.C., Vorholt J.A., Lidstrom M.E. Multiple Formate Dehydrogenase Enzymes in the Facultative Methylophilic *Methylobacterium extorquens* AM1 Are Dispensable for Growth on Methanol // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – № 1. – P. 22–28.
 32. Hourton-Cabassa P., Ambard-Bretteville F., Moreau F., De Virville J.D., Rémy R.,

- Colas Des Francs-Small C. Stress Induction of Mitochondrial Formate Dehydrogenase in Potato Leaves // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 116. – № 2. – P. 627–635.
33. Thompson P., Bowsher C.G., Tobin A.K. Heterogeneity of Mitochondrial Protein Biogenesis during Primary Leaf Development in Barley // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 118. – № 3. – P. 1089–1099.
34. Ambard-Bretteville F., Sorin C., Rébeillé F., Hourton-Cabassa C., 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. – Vol. 52. – № 6. – P. 1153–1168.
35. Bykova N.V., Stensballe A., Egsgaard H., Jensen O.N., Møller I.M. Phosphorylation of Formate Dehydrogenase in Potato Tuber Mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 28. – P. 26021–26030.
36. Chenault H.K., Whitesides G.M. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1987. – Vol. 14. – № 2. – P. 147–197.
37. Bolivar J.M., Ferrarotti S.A., Mateo C., Wilson L., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. Stabilization of a Formate Dehydrogenase by Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose Supports // *Biomacromolecules.* – 2006. – P. 669–673.
38. Shaked Z., Whitesides G.M. Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase // *J. Am. Chem. SoP.* – 1980. – Vol. 102. – № 23. – P. 7104–7105.
39. Kruse W., Hummel W., Kragl U. Alcohol-dehydrogenase-catalyzed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process // *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas.* – 1996. – Vol. 115. – № 4. – P. 239–243.
40. Ernst M. et al. Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2005. – Vol. 66. – № 6. – P. 629–634.
41. Liu Q. et al. Efficient biosynthesis of l-phenylglycine by an engineered *Escherichia coli* with a tunable multi-enzyme-coordinate expression system. // *Appl Microbiol Biotechnol, Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2018. – Vol. 102. – № 5. –

- P. 2129–2141.
42. Cosgrove M.S. Naylor C., Paludan S., Adams M.J., Levy H.R. On the Mechanism of the Reaction Catalyzed by Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – № 9. – P. 2759–2767.
 43. Bright J.R. Byrom D., Danson M.J., Hough D.W., and Towner P. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding glucose dehydrogenase from the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum* // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – Vol. 211. – № 3. – P. 549–554.
 44. Adolph H.W., Maurer P., Schneider-bernlöhr H., Sartorius C., Zeppezauer M. / Substrate specificity and stereoselectivity of horse liver alcohol dehydrogenase. Kinetic evaluation of binding and activation parameters controlling the catalytic cycles of unbranched, acyclic secondary alcohols and ketones as substrates of the native an // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – Vol. 201. – № 3. – P. 615–625.
 45. Fröhlich P., Albert K., Bertau M. Formate dehydrogenase-a biocatalyst with novel applications in organic chemistry. // *Org. Biomol. Chem. England.* – 2011. – Vol. 9. – № 22. – P. 7941–7950.
 46. Abdellaoui S., Seow C.M., Matanovic I., Stephens A.R. Atanassov P., Minter S.D. Hybrid molecular/enzymatic catalytic cascade for complete electro-oxidation of glycerol using a promiscuous NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* // *Chem. Commun.* – 2017. – Vol. 53. – № 39. – P. 5368–5371.
 47. Ketterer L., Keusgen M. Amperometric sensor for cyanide utilizing cyanidase and formate dehydrogenase // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 673. – № 1. – P. 54–59.
 48. Gai P.-P., Zhao C.E., Wang Y., Abdel-Halim E.S., Zhang J.R., Zhu J.J. NADH dehydrogenase-like behavior of nitrogen-doped graphene and its application in NAD⁺-dependent dehydrogenase biosensing // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – Vol. 62. – P. 170–176.
 49. Gai P., Ji Y., Chen Y., Zhu C., Zhang J., Zhu J. J. A nitrogen-doped graphene/gold nanoparticle/formate dehydrogenase bioanode for high power output membrane-less formic acid/O₂ biofuel cells // *Analyst.* – 2015. – Vol. 140. – № 6. – P. 1822–1826.
 50. Artiukhov A.V., Pometun A.A., Zubanova S.A., Tishkov V.I., Bunik V.I. Advantages of formate dehydrogenase reaction for efficient NAD⁺ quantification in biological samples. // *Analytical biochemistry.* – 2020. – Vol. 603. – P. 113797.

51. Balashova N.V., Zavileyskiy L.G., Artiukhov A.V., Shaposhnikov L.A., Sidorova O.P., Tishkov V.I., Tramonti A., Pometun A.A., Bunik V.I. Efficient Assay and Marker Significance of NAD⁺ in Human Blood. // *Frontiers in medicine*. – 2022. – Vol. 9. – P. 886485.
52. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase // *J. Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 236. – № 3. – P. 759–785.
53. Filippova E.V., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Stekhanova T.N., Boiko K.M., Sadykhov I.G., Tishkov V.I., Popov V.O., Labru N. Crystal structures of complexes of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas sp.* 101 with formate // *Crystallogr. Reports*. – 2006. – Vol. 51. – № 4. – P. 627–631.
54. Guo X., Wang X., Liu Y., Li Q., Wang J., Liu W., Zhao Z.K. Structure-Guided Design of Formate Dehydrogenase for Regeneration of a Non-Natural Redox Cofactor // *Chem. – A Eur. J.* – 2020. – Vol. 26. – № 70. – P. 16611–16615.
55. Shabalin I.G., Filippova E.V., Polyakov K.M., Sadykhov E.G., Safonova T.N., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., 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 research papers // *Acta crystallogr. D Biol crystallogr.* – 2009. – Vol. 65. – P. 1315–1325.
56. Fogal S., Beneventi E., Cendron L., Bergantino E. Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the acidobacterium *Granulicella mallensis* MP5ACTX8 // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2015. – Vol. 99. – № 22. – P. 9541–9554.
57. Robescu M.S., Rubini R., Beneventi E., Tavanti M., Lonigro C., Zito F., Filippini F., Cendron L., Bergantino E. From the Amelioration of a NADP⁺ -dependent Formate Dehydrogenase to the Discovery of a New Enzyme: Round Trip from Theory to Practice // *ChemCatChem*. – 2020. – Vol. 12. – № 9. – P. 2478–2487.
58. Guo Q., Gakhar L., Wickersham K., Francis K., Vardi-Kilshtain A., Major D.T., Cheatum C.M., Kohen A. Structural and Kinetic Studies of Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii* // *Biochemistry*. – 2016. – Vol. 55. – № 19. – P. 2760–2771.
59. Schirwitz K., Schmidt A., Lamzin V.S. High-resolution structures of formate

- dehydrogenase from *Candida boidinii* // Protein Sci. – 2007. – Vol. 16. – № 6. – P. 1146–1156.
60. Pagano P., Guo Q., Ranasinghe C., Schroeder E., Robben K., Häse F., Ye H., Wickersham K., Aspuru-Guzik A., Major D.T., Gakhar L., Kohen A., Cheatum C.M. Oscillatory Active-Site Motions Correlate with Kinetic Isotope Effects in Formate Dehydrogenase // ACS Catal. – 2019. – Vol. 9. – № 12. – P. 11199–11206.
61. Yilmazer B., Isupov M.N., De Rose S.A., Bulut H., Benninghoff J.C., Binay B., Littlechild J.A. Structural insights into the NAD⁺-dependent formate dehydrogenase mechanism revealed from the NADH complex and the formate NAD⁺ ternary complex of the *Chaetomium thermophilum* enzyme // J. Struct. Biol. – 2020. – Vol. 212. – № 3. – P. 107657.
62. Shabalin I.G., Serov A.E., Skirgello O.E., Timofeev V.I., Samygina V.R., Popov V.O., Tishkov V.I., Kuranova I.P. Recombinant formate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: Preparation, crystal growth in microgravity, and preliminary X-ray diffraction study // Crystallogr. Reports. – 2010. – V. 55. – № 5. – P. 806–810.
63. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase // J. Mol. Biol. – 1994. – Vol. 236. – № 3. – P. 759–785.
64. Lamzin V.S., Aleshin A.E., Strokopytov B.V., Yukhnevich M.G., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. Crystal structure of NAD-dependent formate dehydrogenase // Eur. J. Biochem. – 1992. – Vol. 452. – P. 441–452.
65. Nilov D.K., Shabalin I.G., Popov V.O., Švedas, V.K. Molecular modeling of formate dehydrogenase: the formation of the Michaelis complex // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2012. – Vol. 30. – № 2. – P. 170–179.
66. Mesentev A.V., Lamzin V.S., Tishkov V.I., Ustinnikova T.B., Popov V.O. Effect of pH on kinetic parameters of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase // Biochem. J. – 1997. – Vol. 321. – № 2. – P. 475–480.
67. Labrou N.E., Rigden D.J., Clonis Y.D. Characterization of the NAD⁺ binding site of *Candida boidinii* formate dehydrogenase by affinity labelling and site-directed mutagenesis // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267. – № 22. – P. 6657–6664.
68. ТИШКОВ В.И., ГАЛКИН А.Г., ЕГОРОВ А.М. NAD-зависимая

- формиатдегидрогеназа метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.* 101: клонирование, экспрессия и изучение структуры гена. // Докл. Акад. Наук СССР. – 1991. – № 317. – P. 345–348.
69. Ding H.-T., Liu D.F., Li Z.L., Du Y.Q., Xu X.H., Zhao Y.H. Characterization of a thermally stable and organic solvent-adaptative NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Bacillus sp.* F1 // J. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 111. – № 5. – P. 1075–1085.
70. Hatrongjit R., Packdibamrung K. A novel NADP⁺-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: Screening, purification and characterization // Enzyme Microb. Technol. – 2010. – Vol. 46. – № 7. – P. 557–561.
71. Садыхов Э.Г. Получение, термостабильность и структурные исследования формиатдегидрогеназ из различных источников // Дис.канд.хим.наук. М. ИНБИ РАН. 2007. 122 с.
72. Galkin A., Kulakova L., Tishkov V., Esaki N., Soda K. / Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10 // Appl Microbiol Biotechnol. – 1995. – Vol. 44. – № 3–4. – P. 479–483.
73. Alpdağtaş S., Yücel S., Kapkaç H.A., Liu S., Binay B. Discovery of an acidic, thermostable and highly NADP⁺ dependent formate dehydrogenase from *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 // Biotechnol Lett. – 2018. – Vol. 40. – № 7. – P. 1135–1147.
74. Altaş N., Yücel S., Kapkaç H.A., Liu S., Binay B. / Heterologous production of extreme alkaline thermostable NAD⁺-dependent formate dehydrogenase with wide-range pH activity from *Myceliophthora thermophila* // Process Biochem. – 2017. – Vol. 61. – № 7. – P. 110–118.
75. Özgün G. et al. Characterization of a new acidic NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* // J Mol Cat B Enz. – 2015. – Vol. 122. – P. 212–217.
76. Hou C.T., Patel R.N., Laskin A.I., Barnabe N. NAD-Linked Formate Dehydrogenase from Methanol-Grown *Pichia pastoris* NRRL-Y-7556 // Arch Biochem Biophys. – 1982. – Vol. 216. – № 1. – P. 296–305.
77. Andreadeli A., Platis D., Tishkov V., Popov V., Labrou N.E. Structure-guided

- alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺. // FEBS J. England. – 2008. – V. 275. – № 15. – P. 3859–3869.
78. Allen S.J., Holbrook J.J. Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylica* // Gene. – 1995. – Vol. 162. – № 1. – P. 99–104.
79. Ordu E.B., Karagüler N.G. Improving the purification of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Candida methylica* // Prep Biochem Biotechnol. – 2007. – Vol. 37. – № 4. – P. 333–341.
80. Kurt-Gür G., Ordu E. Characterization of a novel thermotolerant NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from hot climate plant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // 3 Biotech. Springer Berlin Heidelberg. – 2018. – Vol. 8. – № 3. – P. 1–11.
81. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem. J. – 2002. – Vol. 367. – № 3. – P. 841–847.
82. Li R., Ziola B., King J. Purification and characterization of formate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* // J Plant Physiol. – 2000. – V. 157. – № 2. – P. 161–167.
83. Farinelli M.P., Fry D.W., Richardson K.E. Isolation, purification, and partial characterization of Formate Dehydrogenase from Soybean Seed // Plant Physiol. – 1983. – V.73. – № 3. – P. 858–859.
84. Серов А.Е. Взаимосвязь структуры и свойств рекомбинантных форматдегидрогеназ из пекарских дрожжей и метилотрофных бактерий// Дис.канд.хим.наук. М. МГУ. 2002. 153 с.
85. Зарубина С.А. Структурно-функциональные исследования рекомбинантной форматдегидрогеназы из метилотрофных дрожжей и бактерий// Дис.канд.хим.наук. М. МГУ. 2018. 132 с.
86. Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. / The Role of Ala198 in the Stability and Coenzyme Specificity of Bacterial Formate Dehydrogenases // Acta naturae. – 2015. – Vol. 7. – № 24. – P. 60–69.
87. Каргов И.С. Структурно-функциональная характеристика и белковая инженерия бактериальной и растительной форматдегидрогеназ//

- Дис.канд.хим.наук. М. ИНБИ РАН. 2017. 140 с.
88. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. / Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha-helices // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 445. – № 1. – P. 183–188.
 89. Serov A.E., Odintzeva E.R., Uporov I.V., Tishkov V.I. Use of Ramachandran Plot for Increasing Thermal Stability of Bacterial Formate Dehydrogenase // Biochemistry (Moscow). – 2005. – V. 70. – № 7. – P. 804–808.
 90. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Y., Savin S.S. Role of a Structurally Equivalent Phenylalanine Residue in Catalysis and Thermal Stability of Formate Dehydrogenases from Different Sources // Biochemistry (Moscow). – 2015. – Vol. 80. – № 13. – P. 1690–1700.
 91. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., 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.
 92. Tishkov V.I., Popov V.O. Protein engineering of formate dehydrogenase // Biomol Eng. – 2006. – Vol. 23. – P. 89–110.
 93. Felber S. Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse. 2001. 176 p.
 94. Carter J.L.L., Bekhouche M., Noiriel A., Blum L.J., Doumèche B. / Directed Evolution of a Formate Dehydrogenase for Increased Tolerance to Ionic Liquids Reveals a New Site for Increasing the Stability // ChemBiochem. – 2014. – Vol. 15. – № 18. – P. 2710–2718.
 95. Jiang W., 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. – Vol. 43. – № 5. – P. 577–584.
 96. Wu W., Zhu D., Hua L. Site-saturation mutagenesis of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* creating effective NADP⁺-dependent FDH enzymes // J. Mol. Catal. B Enzym. – 2009. – Vol. 61. – № 3–4. – P. 157–161.
 97. Rozzell J.D., Hua L. M. N.S. Mutants of enzymes and methods for their use. US Patent Application Publication. 2014. US2004/0115691.

98. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S.Y., Uporov I.V., Pometun E.V., Tishkov V.I. Stabilization of plant formate dehydrogenase by rational design // *Biochem.* – 2012. – Vol. 77. – № 10. – P. 1199–1209.
99. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleymenov S.Y., Tishkov V.I. Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2012. – Vol. 25. – № 11. – P. 781–788.
100. Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2015. – Vol. 28. – № 6. – P. 171–178.
101. Alekseeva A.A., Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I. Additivity of the Stabilization Effect of Single Amino Acid Substitutions in Triple Mutants of Recombinant Formate Dehydrogenase from the Soybean *Glycine max* // *Acta Naturae.* – 2015. – Vol. 7. – № 3. – P. 55–64.
102. Gul-Karaguler N., Sessions R.B., Clarke A.R., Holbrook J.J. A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylica* allows the enzyme to use NADP. // *Biotechnol. Lett.* – 2001. – Vol. 23. – P. 283–287.
103. Özgün G.G.P., Ordu E.B., Tütüncü H.E., Yelboğa E., Sessions R.B., Karagüler N.G. Site Saturation Mutagenesis Applications on *Candida methylica* Formate Dehydrogenase // *Scientifica (Cairo).* – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-7.
104. Hoelsch K., Sührer I., Heusel M., Weuster-Botz D. Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97. – № 6. – P. 2473–2481.
105. Jiang H.W., Chen Q., Pan J., Zheng G.W., Xu J.H. Rational Engineering of Formate Dehydrogenase Substrate/Cofactor Affinity for Better Performance in NADPH Regeneration. // *Appl. Biochem. Biotechnol. United States.* – 2020. – Vol. 192. – № 2. – P. 530–543.
106. Savin S.S., Tishkov V.I. Assessment of Formate Dehydrogenase Stress Stability in vivo using Inactivation by Hydrogen Peroxide // *Acta Naturae.* – 2010. – Vol. 2. – № 1. – P. 97–101.
107. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.R., Tishkov V.I., Egorov A.M.,

- Wandrey C., Kragl U. A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – Vol. 37. – № 9. – P. 1377–1380.
108. Srere P.A. Complexes of metabolic enzymes. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1987. – Vol. 56. – № 1. – P. 89–124.
109. Hölsch K., Weuster-Botz D. Enantioselective reduction of prochiral ketones by engineered bifunctional fusion proteins // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2010. – Vol. 56. – № 4. – P. 131–140.
110. Паршин П.Д. Гибридные биокатализаторы с регенерацией NADPH на основе форматдегидрогеназы и монооксигеназы // Дис.канд.хим.наук. М. МГУ. 2021. 147 с.
111. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S, Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A. W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature.* – 2021. – Vol. 596. – № 7873. – P. 583–589.
112. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all // *Nature methods.* – 2022. – Vol. 19. – № 6. – P. 679–682.
113. Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., Cowtan K. / Features and development of Coot // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography.* – 2010. – Vol. 66. – № 4. – P. 486–501.
114. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1977. – Vol. 74. – № 12. – P. 5463–5467.
115. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. Д.К. / Справочник биохимика. // М. 1991. 351–353 с.
116. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
117. Sadykhov E.G., Serov A.E., Voinova N.S., Uglanova S.V., Petrov A.S., Alekseeva

- A.A., Kleimenov S.Y., Popov V.O., Tishkov V.I. A comparative study of the thermal stability of formate dehydrogenases from microorganisms and plants // *Appl. Biochem. Microbiol.* Pleiades Publishing Ltd. – 2006. – Vol. 42. – № 3. – P. 236–240.
118. Sadykhov E.G., Serov A.E., Voinova N.S., Uglanova S.V., Petrov A.S., Alekseeva A.A., Kleimenov S.Y., Popov V.O., Tishkov V.I. A comparative study of the thermal stability of formate dehydrogenases from microorganisms and plants. // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2006. – Vol. 42. – № 3. – P. 236–240.
119. Baker P.J., Britton K.L., Rice D.W., Rob A., Stillman T.J. Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. Implications for nucleotide specificity. // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 228. – P. 662–671.
120. Schanda P., Kupče E., Brutscher B. / SOFAST-HMQC experiments for recording twodimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds // *J. Biomol. NMR.* – 2005. – Vol. 33. – № 4. – P. 199–211.