

*На правах рукописи*



**ЗАРУБИНА**  
**София Александровна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ  
МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ И БАКТЕРИЙ**

03.01.04 – биохимия

03.01.06 – биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

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

Москва – 2018

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

**Научные руководители:**

профессор, доктор химических наук  
**Тишков Владимир Иванович**

кандидат химических наук  
**Пометун Анастасия Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Готтих Марина Борисовна**  
профессор, доктор химических наук,  
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Б. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,  
главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот

**Мирошников Константин Анатольевич**  
доктор химических наук,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, руководитель лаборатории молекулярной биоинженерии

**Яненко Александр Степанович**  
профессор, доктор биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», и.о. директора института, заведующий лабораторией генетических систем биодegradации

Защита диссертации состоится **«16» октября 2018 года в 15 часов** на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/141880839/>

Автореферат разослан **«13» сентября 2018 г.**

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Формиатдегидрогеназа (FDH<sup>1</sup>, КФ 1.2.1.2.) катализирует реакцию восстановления кофермента NAD(P)<sup>+</sup> до NAD(P)H. FDH найдена как в прокариотических, так и эукариотических организмах (растениях, дрожжах и микроскопических грибах), где играет важную физиологическую роль в обеспечении клетки энергией [Tishkov V. I. et al. 2004, Alekseeva A. A. et al. 2011]. Кроме того, FDH является ферментом стресса в растениях и патогенных бактериях. Особо стоит отметить, метилотрофные бактерии и дрожжи, в которых FDH катализирует последнюю стадию процесса окисления метанола до углекислого газа, которая позволяет получить до трех молекул NADH.

С фундаментальной точки зрения FDH интересна как модельный фермент для изучения механизма переноса гидрид-иона в активном центре дегидрогеназ. В биотехнологическом процессе фермент используется при синтезе оптически активных соединений в качестве биокатализатора для регенерации кофермента NADH или NADPH. Преимуществами FDH являются: практически полная необратимость реакции за счет образования летучего соединения CO<sub>2</sub>, который не загрязняет целевой продукт, невысокая стоимость субстрата, а также широкий pH оптимум работы фермента. Например, компания Evonik (Degussa) разработала процесс получения *L-трет*-лейцина — прекурсора при получении пептидов, которые используются в качестве ингибиторов протеазы ВИЧ и антираковых агентов [Kragl U. et al. 1996]. Известно, что данный процесс является самым крупномасштабным процессом синтеза оптически активных соединений с применением очищенных ферментов с использованием FDH из дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH).

Формиатдегидрогеназы из эукариот являются биокатализаторами с хорошим потенциалом для применения на практике, поскольку они обладают низкими значениями константы Михаэлиса по обоим субстратам. Так, в настоящее время широко используется CboFDH в различных биотехнологических процессах, однако, рекомбинантный фермент дикого типа имеет довольно высокие значения констант Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиат-иону по сравнению с другими эукариотическими FDHs, а также невысокую стабильность по сравнению с бактериальными FDHs. В связи с этим были проведены работы по белковой инженерии CboFDH, в результате которых были улучшены свойства фермента [Tishkov V. I. et al. 2006, Slusarczyk H. et al. 2000]. Однако проблема высоких значений констант Михаэлиса, так и не была решена.

В данной работе основное внимание уделено получению и исследованию NAD<sup>+</sup>-зависимой FDH из метилотрофных термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* (OpaFDH), которая до настоящего момента не была подробно изучена. Поскольку источником является термотолерантный микроорганизм, можно было полагать, что данный фермент изначально будет обладать высокой температурной стабильностью. Геном *Ogataea parapolyomorpha* полностью отсекувенирован. В настоящее время этот организм является модельным.

---

<sup>1</sup>В настоящей работе приняты следующие сокращения: FDH – формиатдегидрогеназа, FDHs – формиатдегидрогеназы, OpaFDH – формиатдегидрогеназа из метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha*, wt-OpaFDH – рекомбинантная формиатдегидрогеназа из *Ogataea parapolyomorpha* дикого типа, CboFDH – формиатдегидрогеназа из дрожжей *Candida boidinii*, PseFDH – формиатдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, SoyFDH – формиатдегидрогеназа из сои *Glycine max*, NAD(P)<sup>+</sup> – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида(фосфата).

Второй актуальной и важной задачей является исследование механизма коферментной специфичности FDH и получение NADP<sup>+</sup>-зависимых формиатдегидрогеназ, поскольку в природе известно лишь три NADP<sup>+</sup>-специфичные FDHs, в то время как существует большое количество систем с участием NADPH-специфичных дегидрогеназ. Более того, использование ферментов, способных выдерживать высокие температуры и действие различных химических реагентов, позволяют значительно упростить и удешевить биотехнологический процесс.

С точки зрения фундаментальной науки, интересным является изучение взаимосвязи между структурой и функцией фермента, что было реализовано в рамках данной работы благодаря методам рационального дизайна, направленного мутагенеза, а также с помощью определения его трехмерной структуры.

Данная работа посвящена решению важных и актуальных проблем — получению с помощью методов генетической инженерии рекомбинантной формиатдегидрогеназы из метилотрофных термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha*, определению трехмерной структуры, детальному исследованию свойств фермента дикого типа и белковой инженерии ОраFDH с целью получения мутантных форм фермента с повышенной температурной и химической стабильностью и измененной коферментной специфичностью.

**Цели и задачи исследования.** Основной целью данной диссертационной работы было изучение взаимосвязи структура-функция рекомбинантных формиатдегидрогеназ из метилотрофных дрожжей и бактерий.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Клонирование гена ОраFDH, его экспрессия в клетках *E.coli*, и получение рекомбинантной ОраFDH высокой степени чистоты;
2. Изучение кинетических параметров, температурной и химической стабильности рекомбинантной ОраFDH;
3. Структурные исследования – получение кристаллов и решение трехмерной структуры апо- и холо-форм ОраFDH;
4. Белковая инженерия рекомбинантной ОраFDH с целью увеличения температурной и химической стабильности фермента;
5. Инженерия коферментной специфичности с NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup> ОраFDH и формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) методом рационального дизайна.

**Научная новизна.** Впервые клонирован ген формиатдегидрогеназы из термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* с оптимизированной последовательностью (ОраFDH). Получена рекомбинантная ОраFDH, обладающая одними из самых низких значений констант Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиат-иону среди известных в настоящее время бактериальных и дрожжевых FDH и самой высокой температурной стабильностью среди эукариотических FDH. Получены кристаллы и определена структура апо- и холо-форм рекомбинантной ОраFDH. Получены новые мутантные формы ОраFDH с повышенной температурной и химической стабильностью. Выявлены ключевые остатки, ответственные за проявление коферментной специфичности, для ОраFDH и PseFDH и получены их мутантные формы с высокой активностью и специфичностью к NADP<sup>+</sup>.

**Практическая значимость работы.** Создана высокоэффективная система экспрессии новой FDH из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* в клетках *E.coli*, позволяющая

получить 1 г целевого фермента с литра среды. Полученные препараты рекомбинантной ОраFDH дикого типа и мутантных форм, обладающие одними из самых низких констант Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$  и формиат-иону среди известных в настоящее время бактериальных и дрожжевых FDHs и самой высокой температурной стабильностью среди эукариотических FDHs, создают основу для создания высокоэффективной системы регенерации NADH. Мутантные формы ОраFDH с повышенной температурной стабильностью в 15 раз и химической стабильностью более чем в 100 раз, превышающие таковые для фермента дикого типа, способны продлевать время работы биокатализатора и снижать стоимость процесса с участием FDH. Получены новые  $\text{NADP}^+$ -специфичные мутантные ОраFDH и PseFDH, последняя из которых обладает самой высокой удельной активностью в реакции с  $\text{NADP}^+$ .

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Рекомбинантная формиатдегидрогеназа из метилотрофных термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* обладает самой высокой каталитической эффективностью в реакции с коферментом  $\text{NAD}^+$  среди всех известных в настоящее время формиатдегидрогеназ и самой высокой температурной стабильностью среди эукариотических FDH.
2. Получение кристаллов апо- и холо-форм рекомбинантной ОраFDH позволило решить их трехмерную структуру.
3. Замены остатка Туг, находящегося в 286 положении, на остатки Glu и Asp повышают температурную стабильность фермента. Замена аминокислотного остатка Cys230 на Ala повышает химическую стабильность ОраFDH в присутствии пероксида водорода.
4. Структурно-эквивалентный остаток Asp221/Asp198 играет ключевую роль в формировании  $\text{NAD(P)}^+$ -специфичности фермента для PseFDH и ОраFDH.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных конгрессах и конференциях: FEBS Congress -2013 (Санкт-Петербург, Россия), - 2017 (Иерусалим, Израиль) и - 2018 (Прага, Чехия), International Conference on Protein Stability «ProStab-2014» (Стреза, Италия, 2014), International Bioforum (Пущино, Россия, 2014), European Meeting OxiZymes-2016/2014 (Вагенинген, Нидерланды, 2016, Вена, Австрия, 2014), International Conference International Network of Protein Engineering Centers «INPEC» (Тэджон, Республика Корея, 2016, Зеленогорск, Россия, 2014), V Съезд Биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry (Екатеринбург, Россия, 2016), Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, Россия, 2017), International conference «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (Московская область, Россия, 2017, 2015, Москва, Россия, 2013), Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике «МОБИ-ХимФарма2017» (Севастополь, Россия, 2017), International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives» (Москва, Россия, 2017), Международная конференция молодых учёных по химии «Менделеев» (Санкт-Петербург, Россия, 2017),

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 28 печатных работ, в том числе 8 публикаций в журналах, индексируемых в Web of Science, 20 тезисов конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения,

выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 132 страницах и содержит 50 рисунков, 33 таблицы и 136 ссылок.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

### Клонирование гена *OraFDH*

Анализ генома термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (идентификатор в базе данных GenBank: GCA\_000187245.3) показал наличие гена NAD<sup>+</sup>-зависимой формиатдегидрогеназы (*OraFDH*). Клонирование гена было решено провести с помощью полимеразной цепной реакции с соответствующими праймерами на начало и конец гена без добавления His-tag. Для клонирования гена *OraFDH* прямой праймер сконструирован таким образом, что синтез фермента начинается с остатка глицина с целью повышения стабильности фермента при синтезе в клетках *E.coli*. Такой выбор связан с тем, что последовательность N-конца гена начинается с заряженного остатка Lys, что может негативно сказываться на стабильности белковой глобулы. Обратный праймер был комплементарен 3'-концу гена, кроме того, на C-конец гена вместо стоп-кодона TGA было вставлено два стоп-кодона (TAATAA) для более эффективной терминации синтеза белка.

Прямой праймер *OraFDH\_FOR*:

5'-CATCAATCACCATATGGGCAAGGTTGTACTAGTTCTC-3'

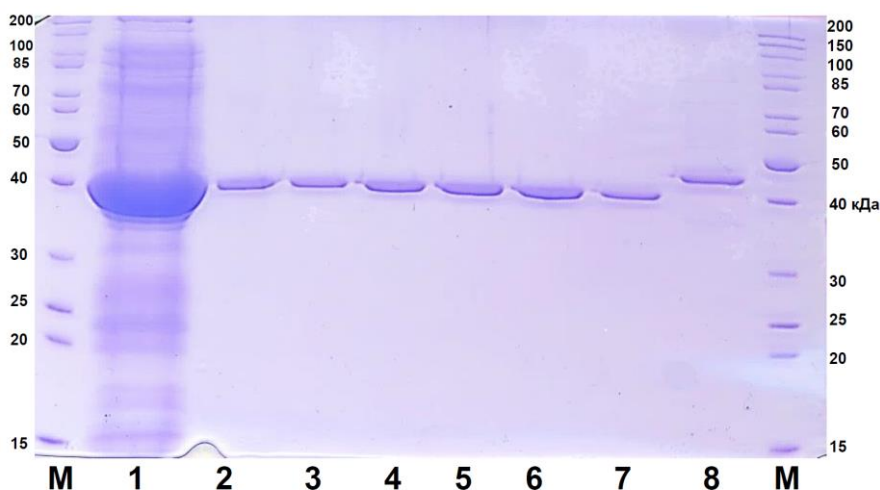
Обратный праймер *OraFDH\_REV*:

5'- GCTCCTTCAAAGCTTTTTATTTGTCGGCACCGTACG-3'.

Также в праймеры были дополнительно введены сайты рестрикции – *NdeI* (CATATG; *OraFDH\_FOR*) и *HindIII* (AAGCTT; *OraFDH\_REV*). Анализ последовательностей показал, что клонированные фрагменты содержат открытые рамки считывания, соответствующие последовательности гена формиатдегидрогеназы из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1, и содержит 1089 пар нуклеотидов, кодируемых 363 аминокислотных остатка с молекулярной массой 40051 Да. Для клонирования в качестве вектора была использована плаزمид рЕТ-24a(+), содержащая ген устойчивости к канамицину.

Для экспрессии эукариотического фермента использовали штамм-продуцент *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS и лактозу в качестве индуктора. Выход целевого белка в качалочных колбах составил 1 г целевого фермента с одного литра среды, что является исключительно высоким показателем, поскольку стандартные выходы фермента не превосходят 100–600 мг.

Очистку фермента проводили по методике, разработанной в нашей лаборатории, куда входила термообработка биомассы, осаждение примесных белков сульфатом аммония, гидрофобная хроматография и гель-фильтрация. В результате выход фермента после всех стадий очистки составил ~62%. Эффективность очистки проверялась методом электрофореза в денатурирующих условиях, представленным на рисунке 1. Результаты подтверждают, что полученный рекомбинантный белок имеет молекулярную массу около 40 кДа в денатурированном состоянии и чистота препарата составляет не менее 95%.



**Рис. 1.** Аналитический электрофорез препаратов ОраFDH в 12% полиакриламидном геле в присутствии SDS-Na. М – маркеры молекулярной массы, 1 — бесклеточный экстракт, 2—6 — фракции ОраFDH, собранные после гидрофобной хроматографии, 7 — препарат ОраFDH после обессоливания, 8 — препарат мутантной PseFDH SM4 после обессоливания.

### Изучение основных свойств рекомбинантной ОраFDH

Для рекомбинантного фермента дикого типа были определены кинетические параметры в стандартных условиях (0,1 М натрий-фосфатный буфер с добавлением 0,01 М ЭДТА, pH 7,0). Константы Михаэлиса ( $K_M$ ) были рассчитаны из зависимости скорости реакции от концентрации варьируемого субстрата при насыщающей концентрации второго субстрата. Каталитическую константу рассчитывали, как отношение максимальной скорости реакции к концентрации белка. Концентрацию белка рассчитывали двумя способами: методом Бредфорд, используя в качестве стандарта БСА, и с помощью программы ProtCalc, позволяющей определить концентрацию белка, исходя из поглощения на 280 нм и рассчитанному коэффициенту молярного поглощения. Все кинетические параметры FDHs из различных источников представлены в таблице 1.

Было показано, что ОраFDH имеет значения констант Михаэлиса близким к растительной SoyFDH по  $NAD^+$  и по формиат-иону. Однако за счет высокой каталитической константы ОраFDH, каталитическая эффективность по  $NAD^+$  принимает максимальное значение. В тоже время ОраFDH имеет почти в 3 раза меньшие значения  $K_M$  по сравнению с дрожжевой wt-CboFDH по обоим субстратам.

Сравнение полученных нами данных и ранее полученных результатов Yu S. и соавторов для ОраFDH с His-tag показало, что наличие остатков гистидина на С-конце ОраFDH (His-ОраFDH) приводит к увеличению  $K_M$  по  $NAD^+$  в 6,5 раз, уменьшению величины  $k_{cat}$  в 2 раза и  $K_M$  по формиату — в 2 раза [Yu S. et al. 2014]. Поскольку наиболее важными параметрами для практического использования FDH являются  $k_{cat}$  и  $K_M$  по  $NAD^+$ , то ОраFDH с His-tag по своим свойствам значительно уступает рекомбинантному ферменту без него.

Таким образом, в данной работе была получена FDH из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* с низкими значениями  $K_M$  и самой высокой каталитической эффективностью с  $NAD^+$  среди всех известных в настоящее время FDHs.

Таблица 1.

Кинетические параметры wt-OpaFDH и FDHs из различных источников.

FDHs		$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M^{NAD^+}, \mu M$	$K_M^{HCOO^-}, mM$	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}, (c \cdot \mu M)^{-1}$	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}, (c \cdot mM)^{-1}$
Дрожжи	wt-OpaFDH	4,5±0,4	12,7±0,6	2,0±0,1	0,33	2,9
	His-OpaFDH (pH 6,5)	2,3	83	0,8	0,03	2,8
	wt-CboFDH	3,7	37	5,9	0,10	0,63
	wt-SceFDH	6,5	36	5,5	0,18	1,18
Растения	wt-AthFDH	3,8	20	2,8	0,19	1,36
	wt-SoyFDH	2,9	13,3	1,5	0,22	1,93
	wt-LjaFDH	1,2	29	29,5	0,04	0,04
Бактерии	wt-PseFDH	7,3	65	6,5	0,11	1,12
	wt-SauFDH	20	218	121	0,09	0,19
	wt-MorFDH	7,3	80	7,5	0,09	0,97
	wt-MycFDH	7,3	89	6,0	0,08	1,22
	wt-BstFDH	1,7	1430	55,5	0,001	0,03
	wt-BacFDH	6,7	91	19,6	0,07	0,34

Далее было изучено влияние кислотности среды на кинетические свойства фермента. Было показано, что для рекомбинантной OpaFDH характерны постоянные значения  $K_M$  по обоим субстратам в диапазоне pH от 5,5 до 10, что позволяет говорить о возможности эффективного использования этого фермента на практике.

Проведены эксперименты по ингибированию рекомбинантной OpaFDH тремя неорганическими ионами (азид, нитрит и роданит) и показано, что наиболее эффективным конкурентным ингибитором по формиат-иону является азид-ион, где значение  $K_i$  составило  $(5,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-8} M$ , что в два раза меньше, чем для wt-PseFDH, имеющего одно из самых низких значений констант ингибирования.

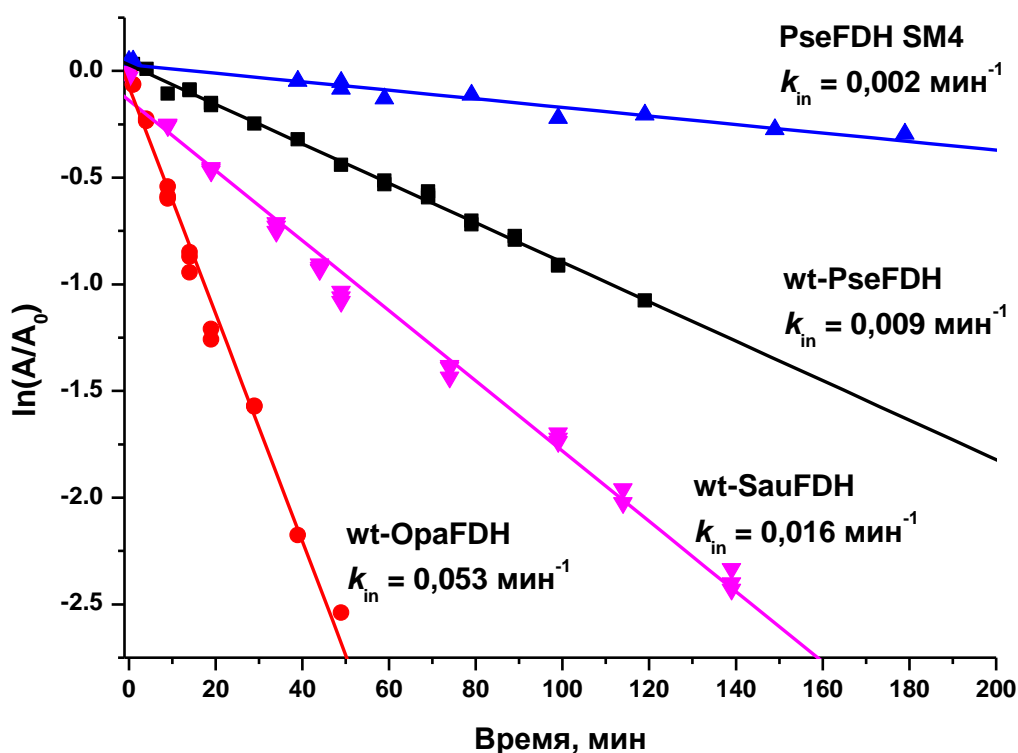
Также было проведено изоэлектрофокусирование wt-OpaFDH в результате чего было продемонстрировано, что препарат имеет микрогетерогенную структуру и представлен набором полос в диапазоне в районе pI 5,2–5,5. Наличие нескольких полос связано с тем, что после выделения может происходить модификация фермента, связанная, например, с гидролизом остатков аспарагина и глутамина или окислением остатков цистеина, не существенных для катализа, что характерно для FDHs.

### Температурная стабильность OpaFDH

Температурная стабильность была изучена двумя методами: с помощью кинетики термоинактивации и методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Было показано, что исследуемый фермент инактивируется в течение часа лишь при 62°C, что делает возможным сравнивать температурную стабильность с самыми стабильными бактериальными FDHs из *Pseudomonas* sp. 101 (дикого типа и мутантной PseFDH SM4) и *Staphylococcus aureus* (рис. 2). Константа инактивации для OpaFDH почти в 3, 6 и 24 раза выше, чем для FDH из *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. 101 и термостабильного PseFDH SM4, соответственно.





**Рис. 2.** Зависимость константы скорости инактивации от температуры в координатах  $\ln(k_{in}/T)-1/T$  для всех ферментов дикого типа. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0 при 62°C.

Изучение температурной стабильности ОраFDH проводили при пяти температурах в диапазоне 60–64°C в 0,1 М натрий-фосфатном буфере при значениях pH 6, 7 и 8. Зависимости величин остаточной активности от времени представляют собой прямые в полулогарифмических координатах ( $\ln A/A_0 - t$ ), т.е. процесс потери активности протекает в соответствии с кинетикой реакции первого порядка. Отдельно было показано, что значения константы скорости инактивации  $k_{in}$  (величины тангенса угла наклона прямых) не зависят от концентрации фермента, что свидетельствует о мономолекулярном механизме процесса. Поэтому для анализа зависимости константы скорости инактивации от температуры можно использовать уравнение теории активированного комплекса:

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

Используя это уравнение, были определены активационные параметры процесса  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ , которые составили  $670 \pm 20$  кДж/моль и  $1690 \pm 50$  Дж/(моль\*К), соответственно (табл. 2). Как видно из таблицы 2, ОраFDH обладает самым большим значением  $\Delta H^\ddagger$ , что свидетельствует о более быстром изменении величины констант скорости инактивации, по сравнению с таковыми для ферментов с меньшими значениями. Таким образом, процесс термоинактивации ОраFDH при снижении температуры протекает медленнее. Этот факт был также подтвержден расчетом теоретических констант при температурах 25 и 60°C. Как видно из таблицы 3, при 60°C ОраFDH, по-прежнему, стабильнее эукариотических FDHs, и уступает самым стабильным бактериальным FDHs. Однако при 25°C наблюдается повышение стабилизации ОраFDH в 15 и 4500 раз, по сравнению с самыми термостабильными PseFDH и SauFDH, соответственно.

Таблица 2.

Значения активационных параметров формиадегидрогеназ из различных источников.  $T_{20}$  – температура, при которой фермент теряет половину начальной активности за 20 минут.

FDHs	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/(моль·К)	$T_{20}$ , °С
<b>OpaFDH</b>	<b>670±20</b>	<b>1690±50</b>	<b>61,4</b>
CboFDH	310	680	56,8
SceFDH	420	н/д	47,8
PseFDH	540	1320	63,0
SauFDH	430	1100	64,0
MorFDH	н/д	н/д	58,0
AthFDH	490	1200	59,5
SoyFDH	370	830	52,8

Таблица 3.

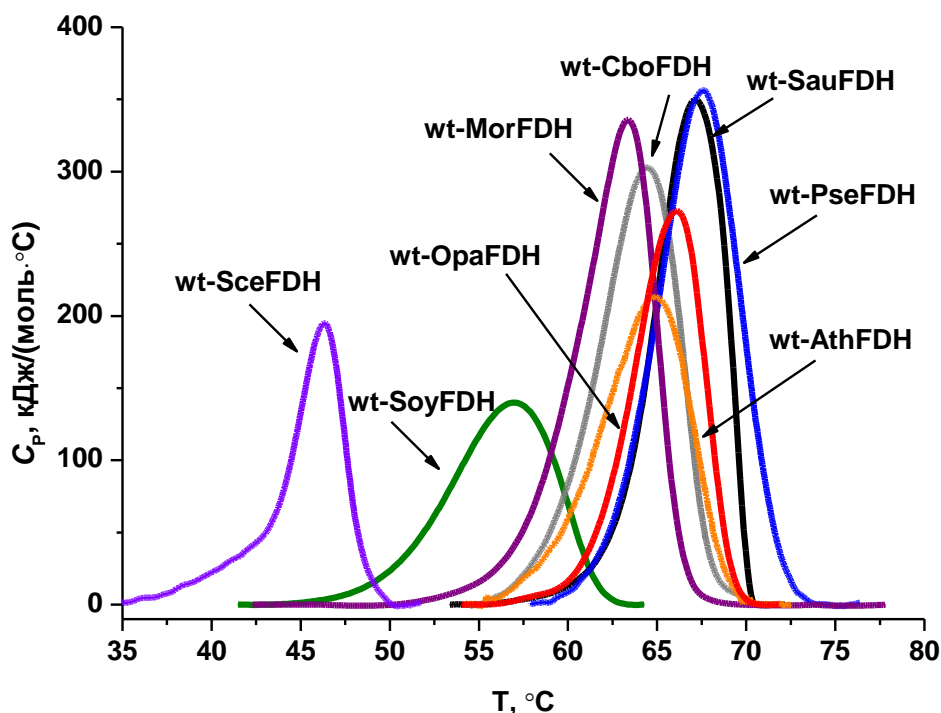
Значения констант скорости термоинактивации для формиадегидрогеназ дикого типа.

FDHs	$k_{in}(25^\circ\text{C})$ , мин <sup>-1</sup>	$\frac{k_{in}(25^\circ\text{C})^{\text{FDH}}}{k_{in}(25^\circ\text{C})^{\text{OpaFDH}}}$	$k_{in}(60^\circ\text{C})$ , мин <sup>-1</sup>	$\frac{k_{in}(60^\circ\text{C})^{\text{FDH}}}{k_{in}(60^\circ\text{C})^{\text{OpaFDH}}}$
<b>OpaFDH</b>	<b><math>5,8 \cdot 10^{-15}</math></b>	<b>1</b>	<b><math>1,20 \cdot 10^{-2}</math></b>	<b>1</b>
<b>SoyFDH</b>	$9,4 \cdot 10^{-8}$	$1,7 \cdot 10^7$	$68,2 \cdot 10^{-2}$	57
<b>AthFDH</b>	$1,2 \cdot 10^{-11}$	$2,1 \cdot 10^3$	$23,4 \cdot 10^{-1}$	30
<b>PseFDH</b>	$8,8 \cdot 10^{-14}$	15,0	$0,33 \cdot 10^{-2}$	0,3
<b>SauFDH</b>	$2,6 \cdot 10^{-11}$	$4,5 \cdot 10^3$	$0,51 \cdot 10^{-2}$	0,4

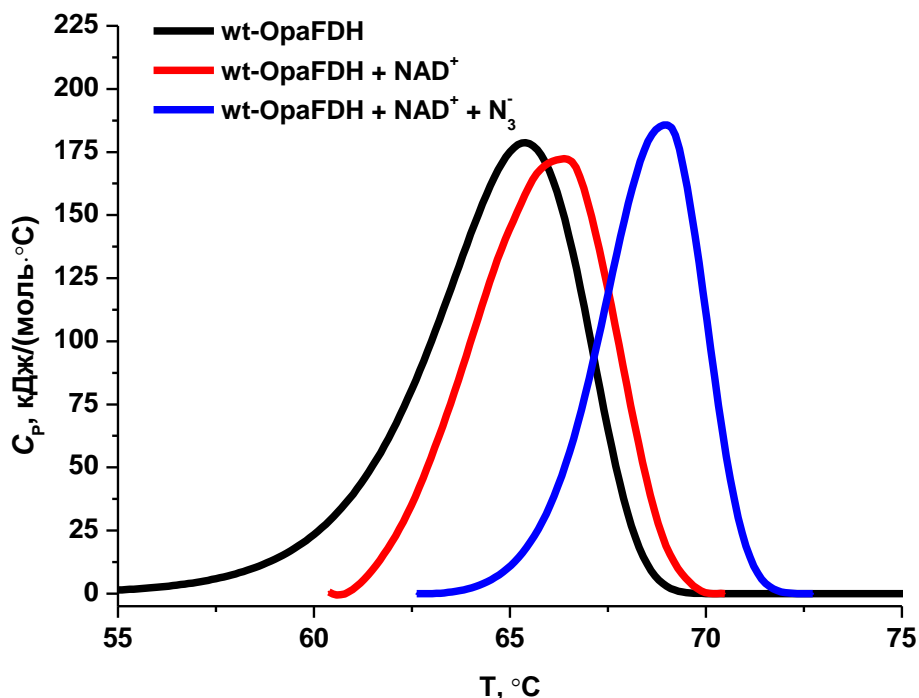
Изучение температурной стабильности при pH 6, 7 и 8 показало, что OpaFDH проявляет максимальную стабильность при нейтральном pH (при 60°C в 4 и 6 раз больше по сравнению с pH 6 и 8, соответственно). Более того, увеличение концентрации фосфатного буфера до 1 М приводит к увеличению эффекта стабилизации белковой глобулы до 24 раз, по сравнению с 0,1 М раствором буфера.

Полученные результаты коррелируют с данными ДСК по температурам плавления, которые представлены на рисунке 3. Как видно из рисунка, по стабильности OpaFDH превосходит все известные эукариотические FDHs и уступает лишь двум бактериальным ферментам.

Кроме того, было изучено влияние добавления кофермента NAD<sup>+</sup> и ингибитора азид-иона на температурную стабильность OpaFDH (рис. 4). На примере PseFDH ранее было показано, что при образовании тройного комплекса происходят сильные структурные изменения за счет компактизации белковой глобулы и образования точечных взаимодействий. Согласно рисунку 4, в случае добавки NAD<sup>+</sup> происходит незначительный сдвиг температуры плавления фермента на 1°C. Однако образование тройного комплекса OpaFDH с NAD<sup>+</sup> и N<sub>3</sub><sup>-</sup> приводит к большей стабилизации белковой глобулы и увеличению температуры плавления на 3,5 градуса.



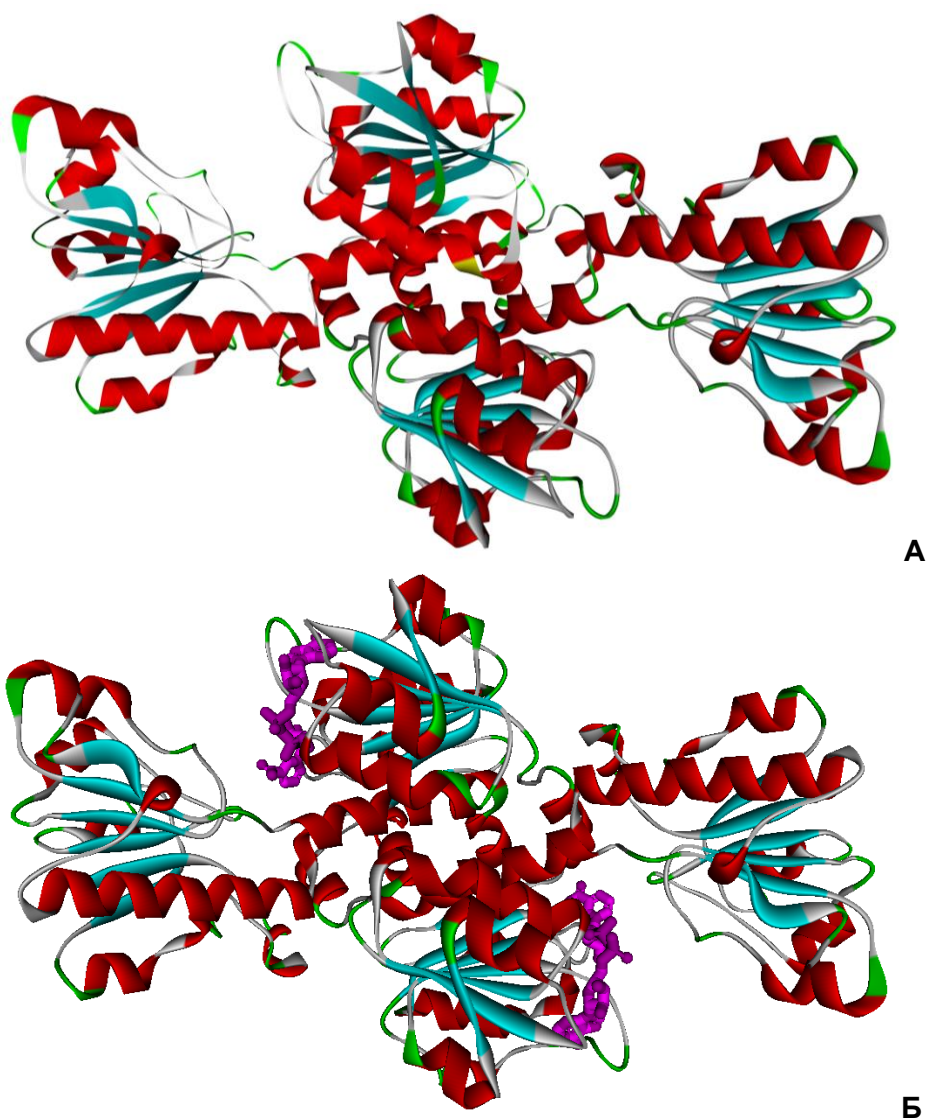
**Рис. 3.** Кривые плавления, полученные методом ДСК для ОраFDH и других формиатдегидрогеназ дикого типа. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.



**Рис. 4.** Кривые плавления, полученные методом ДСК для wt-ОраFDH, комплексов wt-ОраFDH+NAD<sup>+</sup> и wt-ОраFDH+NAD<sup>+</sup>+N<sub>3</sub><sup>-</sup>. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

### Структурные исследования ОраFDH

Трехмерная структура является эффективным инструментом для понимания взаимосвязи между структурой и функцией фермента, которая может быть получена как экспериментально (с помощью РСА или ЯМР), так и с помощью компьютерного моделирования. На первом этапе, когда известна только первичная последовательность аминокислот используют компьютерное моделирование, далее с помощью РСА возможно определить реальную трехмерную структуру.



**Рис. 5.** Уточненные трехмерные структуры OraFDH апо-формы с разрешением 2,2 Å (А) и холо-формы с разрешением 2,4 Å (Б). Розовым цветом выделен кофермент NAD<sup>+</sup> для обеих субъединиц.

Для получения кристаллов исследуемого фермента было проведено большое количество экспериментов по оптимизации условий для получения препаратов белка в высокой концентрации. Оказалось, что при концентрировании выше 3 мг/мл OraFDH, как и другой дрожжевой фермент из *Candida boidinii*, в фосфатном буфере агрегирует. Это делает невозможным получение кристаллов в присутствии фосфат-ионов, поэтому нами были проведены эксперименты по поиску оптимального состава буфера. В результате препарат OraFDH был получен в концентрации 8 мг/мл в буфере 0,1 М HEPES (pH 7,5) с добавлением 0,15 М NaCl и 10% раствора сахарозы.

Кристаллы апо-формы OraFDH были получены с размерами пластин ~50x50x20 мкм, которые росли в течение 7 дней, в противорастворе 0,1 М HEPES (pH 7,0), 2% PEG 400, 0,1 М NaCl, 1,9 М сульфате аммония. Кристаллизация была проведена совместно с м.н.с. А.Ю. Николаевой ФИЦ Биотехнологии РАН в национальном исследовательском центре "Курчатовский институт". Структура холо-формы была получена в виде комплекса с NAD<sup>+</sup>. Сбор данных и уточнение структур было проведено совместно с к.б.н. с.н.с. К.М. Бойко ФИЦ Биотехнологии РАН. Полученные структуры апо- и холо-форм OraFDH представлены на рисунке 5 (А, Б).

Структура апо-формы и холо-форм была определена с разрешением 2,2 Å и 2,4 Å и пространственной структурой P2<sub>1</sub> и P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, соответственно. При анализе структуры холо-формы было выяснено, что при связывании NAD<sup>+</sup> не происходит закрытия активного центра фермента, то есть, нет сильных конформационных изменений белковой глобулы OraFDH, что наблюдалось в случае образования тройного комплекса PseFDH с NAD<sup>+</sup> и азид-ионом. Это может являться косвенным объяснением невысокого эффекта стабилизации двойного комплекса фермента в экспериментах ДСК (см. рис. 4).

### **Белковая инженерия OraFDH и PseFDH**

С помощью методов белковой инженерии возможно изменять структуру белковой глобулы и тем самым варьировать свойства фермента под конкретную задачу. В данной работе реализовано три направления по изменению свойств OraFDH: увеличение температурной и химической стабильности, изменение коферментной специфичности от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup>.

### **Увеличение температурной стабильности OraFDH (мутация поверхностного остатка в полуконсервативной последовательности XPQP)**

Как было сказано выше, wt-OraFDH обладает самой высокой температурной стабильностью среди эукариотических FDHs. Нами было решено провести эксперименты по белковой инженерии OraFDH с целью дальнейшего увеличения температурной стабильности.

Ранее в нашей лаборатории был выявлен остаток X перед консервативным участком кофермент-связывающего домена XPQP на поверхности белковой глобулы. При замене остатка X в случае SoyFDH и PseFDH SM4 были получены мутантные SoyFDH Phe290Asp/Glu и PseFDH SM4 Phe311Asp/Tyr с повышенной температурной стабильностью в 44 и 2,5 раза, соответственно. Таким образом, замена гидрофобного остатка Phe на гидрофильные остатки Asp, Glu и Tyr приводит к стабилизации белка. Мутантные FDHs с заменами на остатки Ser и Ala обладали хорошими кинетическими параметрами, по сравнению с ферментом дикого типа. Мутантные SoyFDH с заменами на остатки Ser и Ala обладали хорошими кинетическими параметрами, по сравнению с ферментом дикого типа. В аналогичном положении OraFDH уже находится остаток Tyr286, поэтому было решено произвести замены на остатки Asp, Glu, Ala и Ser.

В таблице 4 приведены кинетические параметры мутантных ферментов OraFDH в сравнении с таковыми для FDHs из сои и бактерий. В случае мутантных SoyFDH замена данного остатка приводила к увеличению каталитической эффективности, однако, для OraFDH, как и в случае и PseFDH SM4, ее значение снизилось. Тем не менее, каталитическая эффективность с NAD<sup>+</sup> для мутантных OraFDH принимает довольно низкие значения.

Кинетика термоинактивации мутантных OraFDH и бактериальных FDHs представлена на рисунке 6. Из рисунка видно, что при 62°C две мутантные OraFDH Tyr286Asp и Tyr286Glu более стабильны в 15 и 10 раз по сравнению с wt-OraFDH, соответственно. Более того, данные мутантные ферменты превосходят бактериальные PseFDH и SauFDH дикого типа и уступают лишь самому стабильному PseFDH SM4. В случае двух других OraFDH Tyr286Ala и Tyr286Ser, введенные замены не привели к стабилизации белковой глобулы.

Таблица 4.

Кинетические параметры мутантных ОраFDH и формиатдегидрогеназ с мутацией в районе PQR.

FDHs	$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M^{NAD^+}, \mu M$	$K_M^{HCOO^-}, mM$	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}, (c \cdot \mu M)^{-1}$
wt-ОраFDH	4,5±0,4	12,7±0,6	2,0±0,1	0,30
ОраFDH Tyr286Asp	4,1±0,6	20±2	6,4±0,3	0,20
ОраFDH Tyr286Glu	3,8	28,9	15,3	0,13
ОраFDH Tyr286Ala	3,2	20,2	2,0	0,16
ОраFDH Tyr286Ser	2,8	20,0	4,1	0,14
PseFDH SM4	7,3	41	3,2	0,18
PseFDH SM4 Phe311Tyr	7,3	55	3,7	0,13
PseFDH SM4 Phe311Asp	4,0	230,0	29,8	0,02
wt-SoyFDH	2,9	13,3	1,5	0,22
SoyFDH F290D	5,1	12,8	5,0	0,40
SoyFDH F290A	3,8	8,6	1,1	0,44
SoyFDH F290Y	3,5	10,9	0,9	0,32
SoyFDH F290E	4,7	13,7	2,9	0,34

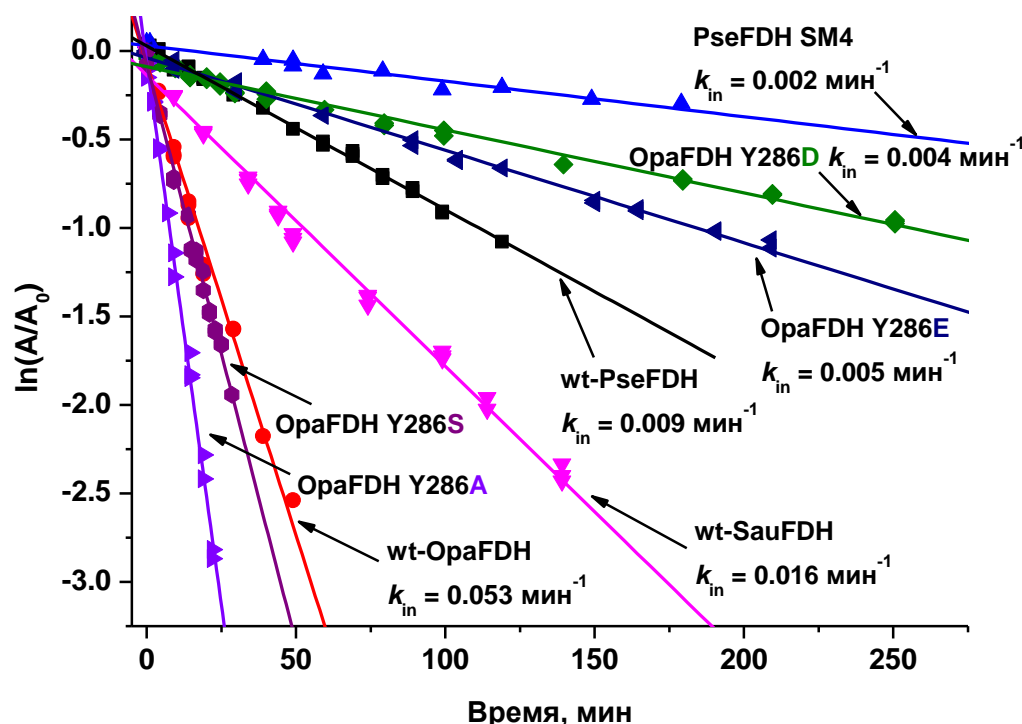


Рис. 6. Зависимость логарифма остаточной активности wt-ОраFDH, мутантных ОраFDH Y286D, Y286E, Y286A, Y286S и бактериальных формиатдегидрогеназ при 62°C. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

Данные ДСК, согласуются с данными, полученными в эксперименте по кинетике термоинактивации. По сравнению с wt-ОраFDH замены Tyr286Asp и Tyr286Glu привели к увеличению максимума температуры плавления на 2,3 и 2,0 градуса, соответственно.

Таким образом, в случае OpaFDH точечная замена остатка Tyr286 на Asp и Glu позволила существенно повысить температурную стабильность фермента.

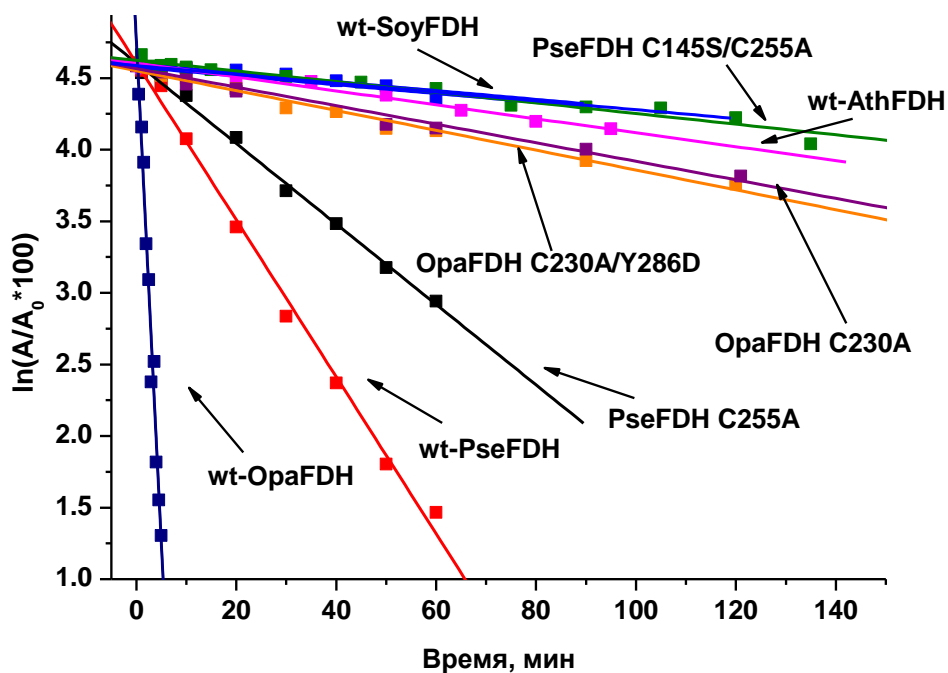
### **Увеличение химической стабильности OpaFDH**

Химическая стабильность, которую можно определить как способность сохранять активность в присутствии химических реагентов, модифицирующих аминокислотные остатки белка, является важной технической характеристикой фермента. В ходе проведения процесса катализа может происходить денатурация белка как примесями основных субстратов, так и за счет окисления кислородом. В FDH в первую очередь окислению подвергаются остатки цистеина, которые могут находиться как на поверхности белковой глобулы, так и внутри нее. В данной работе пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) использовался в качестве инактивирующего агента, поскольку он способен окислять SH-группы как на поверхности, так и внутри белковой глобулы. На примере PseFDH было показано, что остатки Cys145 и Cys255, находящиеся в кофермент-связывающем домене, играют главную роль в химической стабильности этого фермента. Так, мутантные PseFDH Cys255Ala и PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala обладают повышенной химической стабильностью в 2 и 15 раз по сравнению с wt-PseFDH в реакции с 0,15 М  $H_2O_2$ .

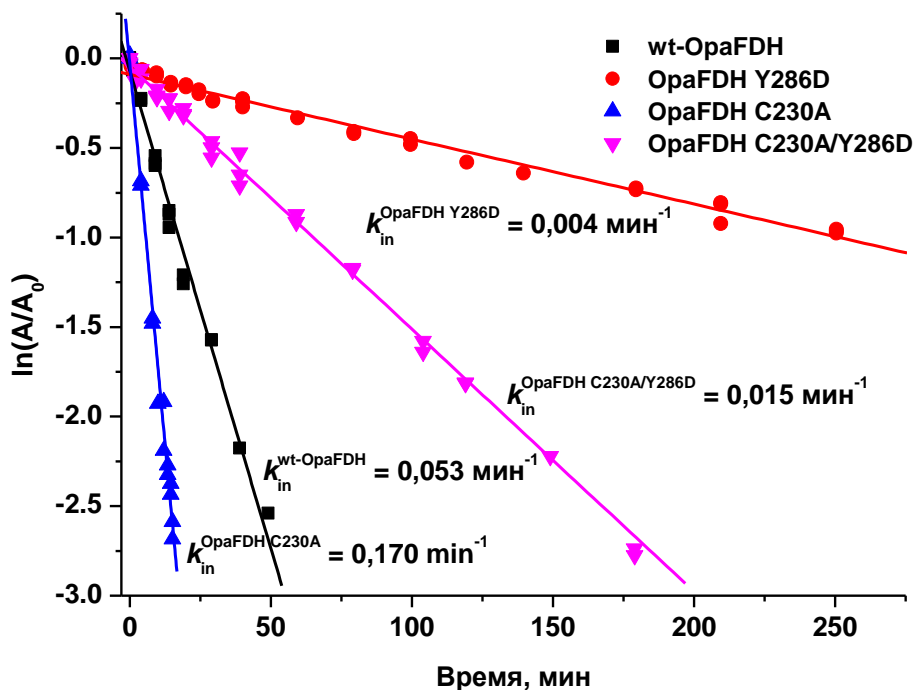
Структурно-эквивалентный остаток Cys255 в случае OpaFDH находится в 230 положении, в случае другого остатка в структуре уже находится Ser. Известно, что замена остатка цистеина приводит к снижению стабильности белка, поэтому было решено получить помимо точечного OpaFDH Cys230Ala, фермент с двойной заменой Cys230Ala/Tyr286Asp, который бы смог обеспечить как повышение химической, так и температурной стабильности.

Для сравнения химической стабильности мутантных OpaFDH с FDHs из других источников были проведены измерения остаточной активности от времени при одной концентрации пероксида водорода. На рисунке 7 представлен график зависимости остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах. Линейный характер кривой свидетельствует о кинетике инактивации первого порядка, поэтому наблюдаемая эффективная константа скорости инактивации первого порядка ( $k_{in}^{eff}$ ), найденная как значение тангенса угла наклона прямой, может быть использована в качестве количественной характеристики стабильности ферментов.

Из рисунка видно, что самую высокую стабильность проявили wt-SoyFDH и wt-AthFDH, которые изначально имеют в аналогичном положении остаток Met. В то время как wt-OpaFDH и wt-PseFDH, у которых в этом положении расположен остаток Cys, инактивируются в течение 5 и 65 минут, соответственно. Оказалось, что мутантные OpaFDH Cys230Ala и OpaFDH Cys230Ala/Tyr286Asp проявляют схожую химическую стабильность, которая более чем в 100 раз превышает стабильность фермента дикого типа. Более того, эффект стабилизации мутантных OpaFDH значительно превосходит таковой для PseFDH Cys255Ala и сравним с PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala, что связано с отсутствующим изначально структурно-эквивалентным остатком цистеина в 145 положении. Таким образом, остаток Cys230 существенно влияет на химическую стабильность OpaFDH.



**Рис. 7.** Инактивация пероксидом водорода wt-OpaFDH, OpaFDH C230A, OpaFDH C230A/Y286D, wt-PseFDH, PseFDH C255A, PseFDH C145S/C255A, wt-SoyFDH, wt-AthFDH. 0,15 М пероксид водорода, 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0, 25 °С.



**Рис. 8.** Зависимость логарифма остаточной активности от времени для wt-OpaFDH и мутантных C230A, Y286D, C230A/Y286D при 62°C. 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

Для более детального изучения химической стабильности была проведена инактивация мутантных OpaFDH и фермента дикого типа под действием пероксида водорода в диапазоне концентраций 0,15—0,8 М. Показано, что точечная замена Cys230Ala приводит к существенному повышению химической стабильности во всем диапазоне концентраций. Расчет кинетических параметров показал, что введение предложенных замен приводит к увеличению констант Михаэлиса по обоим субстратам, однако, каталитическая эффективность не уступает wt-CboFDH.



Данные, полученные в экспериментах по изучению кинетики термоинактивации и ДСК, подтверждают, что замена остатка цистеина приводит к уменьшению стабильности фермента в 3—4 раза (рис. 8). Поэтому введение второй замены Tyr286Asp позволило получить мутантный фермент, который обладает как повышенной химической, так и температурной стабильностью.

### Изменение коферментной специфичности OpaFDH и PseFDH

Известно, что большинство природных FDHs специфичны к коферменту NAD<sup>+</sup>, и только в последнее время были найдены три бактериальных источника FDHs, специфичных к NADP<sup>+</sup>, из *Burkholderia stabilis* (BstFDH), *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 (LbuFDH), *Granulicella mallensis* MP5ACTX8 (GraFDH). Более того существует большое число процессов с применением дегидрогеназ, для которых в качестве кофактора используется именно NADPH. Поэтому в нашей лаборатории проводятся работы по изменению коферментной специфичности FDHs, и ранее были получены мутантные NADP<sup>+</sup>-специфичные FDHs. В данной работе были продолжены эксперименты по получению мутантных OpaFDH и PseFDH с измененной специфичностью.

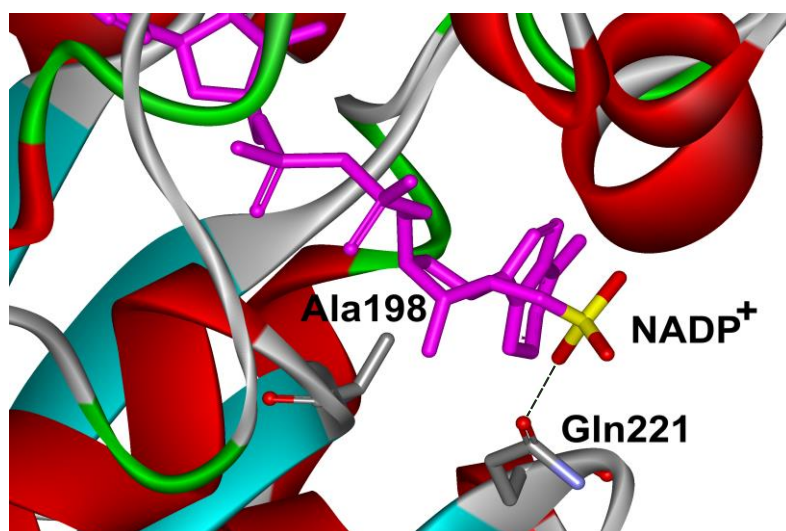
На рисунке 9 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей в районе кофермент-связывающего домена GXGXXG, где на расстоянии 17 аминокислот располагается остаток Asp для NAD<sup>+</sup>-специфичных FDHs, в то время как у NADP<sup>+</sup>-специфичных ферментов находится остаток Gln или Ala.

Анализ трехмерной структуры показал, что аспарагиновая кислота располагается вблизи 2'-ОН остатка рибозы кофермента NAD<sup>+</sup>, поэтому при попытке встраивания NADP<sup>+</sup> может происходить отталкивание карбоксильной группы Asp с отрицательно заряженным фосфат-ионом кофермента. Было проведено компьютерное моделирование структуры фермента на примере PseFDH с заменой Asp221Gln и показано, что при замене данного остатка может происходить образование водородной связи между положительно заряженной амидной группой Gln и фосфат-ионом NADP<sup>+</sup> (рис. 10). Таким образом, в нашей лаборатории были получены три мутантных PseFDH T5M8 Asp221Ala, PseFDH Asp221Gln и PseFDH SM4 Asp221Gln.

В аналогичном положении для OpaFDH находится также остаток Asp196 в структурно-эквивалентном положении. Для OpaFDH было решено получить три мутантных фермента с заменами Asp196Ala, Asp196Gln, Asp196Asn. Более того, на примере SceFDH и CboFDH было показано, что последующий за Asp остаток может также улучшать активность в реакции с NADP<sup>+</sup>. В случае BstFDH в этом положении находится остаток Arg. В результате были получены дополнено еще два мутантных OpaFDH Asp196Gln/Tyr197Arg и Asp196Gln/Tyr197His.

<b>OpaFDH</b>	DIEGKVIATI	GAGRIGYRVL	ERLVAFNPKE	LLYYDYQSLG	REAEKVG--
<b>CboFDH</b>	DIEGKTIATI	GAGRIGYRVL	ERLVPFNPKE	LLYYDYQALP	KDAEEKVG--
<b>CmeFDH</b>	DIEGKTIATI	GAGRIGYRVL	ERLLPFNPKE	LLYYDYQALP	KEAEKVG--
<b>SceFDH</b>	DLEDKIISTV	GAGRIGYRVL	ERLVAFNPKE	LLYYDYQELP	AEAINRLNEA
<b>SoyFDH</b>	DLEGKTVGTV	GAGRIGKLLL	QLKPFNCN-	LLYFDRLRID	PELEKEIG--
<b>AthFDH</b>	DLEGKTIGTV	GAGRIGKLLL	QLKPFNCN-	LLYFDRLQMA	PELEKETG--
<b>PseFDH</b>	DLEAMHVGTV	AAGRIGLAVL	RRLAPFDVH-	LHYTD RHRLP	ESVEKELN--
<b>MorFDH</b>	DVEGMHVGTV	AAGRIGLRVL	RRLAPFDMH-	LHYTD RHRLP	EAVEKELN--
<b>BstFDH</b>	DVEGMHFGTV	GAGRIGLAVL	RRLKPFGLH-	LHYTD RHRLD	AAIEQELG--

**Рис. 9.** Выравнивание аминокислотных последовательностей формилдегидрогеназ из различных источников в районе кофермент-связывающего домена.



**Рис. 10.** Моделирование мутантного PseFDH D221Q в комплексе с NADP<sup>+</sup>, выделенный фиолетовым цветом.

Кинетические параметры были определены в реакциях с NAD<sup>+</sup> и NADP<sup>+</sup>, которые суммированы в таблице 5. В результате экспериментов было показано, что для PseFDH остаток Asp221 и для OpaFDH — Asp196 играют ключевую роль в связывании кофермента NADP<sup>+</sup>. В случае бактериальной PseFDH все три мутантных фермента изменили коферментную специфичность от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup>, при этом стоит отдельно отметить мутантную PseFDH Asp221Gln, которая показала значительное увеличение активности в реакции с NADP<sup>+</sup>.

В последней колонке таблицы 5 рассчитано отношение каталитической эффективности  $k_{cat}/K_M$  по NADP<sup>+</sup> к NAD<sup>+</sup>, показывающее специфичность фермента к одному из субстратов. Оказалось, что точечный мутант PseFDH Asp221Gln проявляет самую высокую активность с NADP<sup>+</sup> почти в 7—8 раз большую, чем все известные в настоящее время FDHs. В случае OpaFDH, точечная мутация остатка Asp196Ala, Asp196Asn и Asp196Gln не привела к значительному увеличению активности с NADP<sup>+</sup>, однако, замена данного остатка способствовала резкому увеличению  $K_M$  по NAD<sup>+</sup> на три порядка, что, по-видимому, связано с изменением структуры кофермент-связывающего домена от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup>. Для OpaFDH замена сразу двух остатков Asp196Gln/Tyr197Arg и Asp196Gln/Tyr197His привела к значительному увеличению активности с NADP<sup>+</sup>, что позволило впервые получить NADP<sup>+</sup>-специфичную OpaFDH Asp196Gln/Tyr197Arg с каталитической эффективностью с NADP<sup>+</sup> в 5 раз большей, чем в реакции с NAD<sup>+</sup>.

Таким образом, в ходе данной диссертационной работы были определены аминокислотные остатки, влияющие на температурную и химическую стабильность OpaFDH, а также коферментную специфичность OpaFDH и PseFDH. Полученные данные позволят получить биокатализатор для успешного применения ферментов.

Таблица 5.

Кинетические параметры природных и мутантных NADP<sup>+</sup>-специфичных формиатдегидрогеназ. н/д – нет данных.

FDHs	NAD <sup>+</sup>			NADP <sup>+</sup>			$k_{cat}^{NADP^+}/K_M^{NADP^+}$
	$k_{cat}^{NAD^+}, c^{-1}$	$K_M^{NAD^+}, мкМ$	$K_M^{HCOO^-} мм$	$k_{cat}^{NADP^+}, c^{-1}$	$K_M^{NADP^+}, мм$	$K_M^{HCOO^-} мм$	$k_{cat}^{NAD^+}/K_M^{NAD^+}$
BstFDH	1,7	1430	55,5	4,75	0,16	н/д	25
LbuFDH*	1,8	1680	н/д	3,5	0,12	н/д	27
GraFDH*	5,8	6500	80,0	4,0	0,85	200	5
PseFDH	7,3	60	6,5	н/д	>400	н/д	$4 \cdot 10^{-4}$
<b>PseFDH D221Q</b>	<b>0,6±0,1</b>	<b>3500±180</b>	<b>44±2</b>	<b>4,3±0,6</b>	<b>0,114±0,004</b>	<b>21±1</b>	<b>200</b>
PseFDH SM4	7,3	41	3,2	н/д	н/д	н/д	н/д
<b>PseFDH SM4 D221Q</b>	<b>3,1±0,2</b>	<b>1780±150</b>	н/д	<b>5,0±0,3</b>	<b>0,11±0,01</b>	<b>110±20</b>	<b>26</b>
<b>PseFDH T5M8 D221A</b>	<b>1,3±0,1</b>	<b>0,98±0,07</b>	н/д	<b>0,80±0,04</b>	<b>0,29±0,02</b>	<b>40±4</b>	<b>2</b>
OpaFDH	4,5±0,4	12,7±0,6	2,0±0,1	н/д	н/д	н/д	н/д
OpaFDH D196A	0,7	2800±75	440±10	0,09	н/д	н/д	н/д
OpaFDH D196N	1,0	5200±400	87±14	0,005	н/д	н/д	н/д
OpaFDH D196Q	1,5	1700±150	56,4±3	0,06	12±1	77±9	0,006
OpaFDH D196Q/Y197H	1,0	4700±450	94±13	0,37	2,8±0,4	н/д	0,6
<b>OpaFDH D196Q/Y197R</b>	<b>0,4±0,1</b>	<b>8000±800</b>	<b>88±7</b>	<b>0,54±0,08</b>	<b>2,4 ±0,2</b>	<b>102±12</b>	<b>5</b>
wt-SceFDH	6,5	36	5,5	н/д	н/д	н/д	н/д
SceFDH D196A/Y197R	0,12	8400	н/д	0,16	7,6	1000	0,7
wt-CboFDH	3,7	37	5,9	$4 \cdot 10^{-5}$	38000	н/д	$4,3 \cdot 10^{-9}$
CboFDH D195Q	0,26	960	н/д	0,26	4,5	н/д	0,2
CboFDH D195Q/Y196H	0,49	1800	н/д	0,44	1,7	80	1,0

## ВЫВОДЫ

1. Проведено клонирование гена формиадегидрогеназы из термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha*, и получен рекомбинантный фермент в активной и растворимой форме в клетках *E.coli* с выходом целевого фермента более 1 г с литра среды. В результате очистки был получен препарат фермента со степенью чистоты свыше 95%.
2. Функциональная характеристика рекомбинантной ОраFDH показала, что данный фермент обладает одними из самых низких констант Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиа-иону (12,7 мкМ и 1,6 мМ, соответственно) среди всех известных в настоящее время формиадегидрогеназ, и самой высокой температурной стабильностью из эукариотических FDH.
3. Проведена наработка ОраFDH в количестве, достаточном для кристаллизации, подобраны условия получения кристаллов свободного фермента и комплекса с NAD<sup>+</sup>. Получены кристаллы ОраFDH, а также экспериментально определены структуры апо- и холо-форм фермента в комплексе с NAD<sup>+</sup> с разрешением 2,2 и 2,4 Å, соответственно.
4. Подтверждена важность полуконсервативной последовательности X-Pro-(Ala)-Gln-Pro в стабильности ОраFDH. Методом направленного мутагенеза получено четыре мутантных ОраFDH с заменами Tyr286X (где X = Glu, Asp, Ala, Ser), из которых ОраFDH Tyr286Glu и Tyr286Asp обладали повышенной температурной стабильностью по сравнению с ферментом дикого типа в 7 и 15 раз при 62°C, соответственно. Мутантные ОраFDH Cys230Ala и Cys230Ala/Tyr286Asp в реакции с пероксидом водорода превышают wt-ОраFDH по химической стабильности более чем в 100 раз. Кроме того, двойная мутация ОраFDH Cys230Ala/Tyr286Asp привела к повышению как температурной, так и химической стабильности по сравнению с ферментом дикого типа.
5. Получены NADP<sup>+</sup>-специфичные мутантные ОраFDH и PseFDH, последний из которых обладает самой высокой каталитической эффективностью в реакции с NADP<sup>+</sup> среди всех известных в настоящее время NADP<sup>+</sup>-специфичных FDHs.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, ИНДЕКСИРУЕМЫХ В WEB OF SCIENCE:

1. Пометун А. А., Клейменов С. Ю., **Зарубина С. А.**, Каргов И. С., Паршин П. Д., Садыхов Э. Г., Савин С. С., Тишков В. И. Сравнение термостабильности новых формиадегидрогеназ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*, 2018. – Том. 59, № 2. – С. 164–169. – DOI: 10.3103/S002713141802013X.
2. Тишков В. И., Пометун А. А., Степашкина А. В., Федорчук В. В., **Зарубина С. А.**, Каргов И. С., Атрошенко Д. Л., Паршин П. Д., Шеломов М. Д., Ковалевский Р. П., Бойко К. М., Эльдаров М. А., Д'Оронцо Э., Секундо Ф., Савин С. С. Рациональный дизайн практически важных ферментов // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*, 2018. – Том. 59, № 2. – С. 70–77. – DOI: 10.3103/S0027131418020153.
3. **Zarubina S.**, Pometun A., Kleymenov S., Savin S., Tishkov V. Rational design of formate dehydrogenase from thermotolerant yeast *Ogataea parapolymorpha* // *FEBS Open Bio*, 2018. – Vol. 8 № S1. – P.186. – DOI: 10.1002/2211-5463.12453.
4. Pometun A. A., **Zarubina S. A.**, Kargov I. S., Kleimenov S. Y., Sadykhov E. G., Savin S. S., Tishkov V. I. Comparative study of thermal stability of formate dehydrogenases from different sources // *FEBS Open Bio*, 2018. – Vol. 8 № S1. – P.187. – DOI: 10.1002/2211-5463.12453.

5. Pometun A.A, **Zarubina S.A.**, Kargov I.S., Serov A.E., Parshin P.D., Savin S.S., Tishkov V.I. Role of residues in conserved sequence region in formate dehydrogenases from different sources // *FEBS Journal*, 2017. – Vol. 284, № S1. – P. 213. – DOI: 10.1111/febs.14174.
6. Тишков В. И., Пометун А. А., **Зарубина С. А.**, Каргов И. С., Виролайнен Т. С., Атрошенко Д. Л., Комарова Н. В., Голубев И. В., Хушпульян Д. М., Захарова Г. С., Чубарь Т. А., Газарян И. Г., Д'Оронцо Э., Фахерис С., Секундо Ф., Савин С. С. Структурно-функциональные исследования оксидоредуктаз // *Acta Naturae*, 2016. – Том 2. – С. 34.
7. Пометун А. А., **Зарубина С. А.**, Паршин П. А., Каргов И. С., Савин С. С., Тишков В. И. Новые формиатдегидрогеназы: взаимосвязь структура-функция // *Acta Naturae*, 2016. – Том 2. – С. 33–34.
8. Алексеева А. А., Федорчук В. В., **Зарубина С. А.**, Садыхов Э. Г., Маторин А. Д., Савин С. С., Тишков В. И. Роль остатка Ala198 в стабильности и коферментной специфичности бактериальных формиатдегидрогеназ // *Acta Naturae*, 2015. – Том. 7, № 1(24). – P. 64–73.

#### ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИЙ:

1. **Zarubina S.**, Pometun A., Kleymenov S., Savin S., Tishkov V. Rational design of formate dehydrogenase from thermotolerant yeast *Ogataea parapolymorpha*. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic, July 7-12, 2018.
2. Pometun A. A., **Zarubina S. A.**, Kargov I. S., Kleimenov S. Y., Sadykhov E. G., Savin S. S., Tishkov V. I. Comparative study of thermal stability of formate dehydrogenases from different sources. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic, July 7-12, 2018.
3. **Зарубина С.А.**, Федорчук В.В., Савин С.С., Тишков В.И., Атрошенко Д.Л. Структурно-функциональные исследования оксидазы D-аминокислот Объединенный научный форум — Международная научная конференция "XII чтения памяти Академика Юрия Анатольевича Овчинникова" и VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017.
4. Pometun A.A., **Zarubina S.A.**, Kargov I.S., Serov A.E., Parshin P.D., Savin S.S., Tishkov V.I. Role of residues in conserved sequence region in formate dehydrogenases from different sources. FEBS Journal, 2017, v. 284, № S1, p. 213. 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back", Jerusalem, Israel, September 10-14, 2017.
5. **Зарубина С.А.**, Федорчук В.В., Савин С.С., Тишков В.И. Оптимизация выделения бактериальной формиатдегидрогеназы с помощью двухфазных систем. Третий Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике-2017 (МОБИ-ХимФарма2017), Сборник тезисов докладов Третьего Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2017. С.19. г. Севастополь, Республика Крым, Россия, 28-31 мая 2017.
6. **Zarubina S.A.**, Pometun A.A., Savin S.S., Tishkov. The structure-functional relationship in formate dehydrogenases from the thermotolerant methylotrophic yeast. V.I. 11th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications", Moscow Region, Russia, June 25-30, 2017.
7. **Зарубина С.А.**, Федорчук В.В., Савин С.С., Тишков В.И. Оптимизация очистки бактериальной формиатдегидрогеназы в двухфазных системах вода — полиэтиленгликоль — соль. X Международная конференция молодых учёных по химии «МЕНДЕЛЕЕВ-2017», С.288. Санкт-Петербург, Россия, 4-7 апреля 2017 г.
8. **Zarubina S.**, Pometun A., Savin S., Tishkov V. Formate dehydrogenase from the thermotolerant yeast: expression in *E.coli*, purification and characterization. IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives», V. 2. P. 448-449. Moscow, Russia, February 20-22, 2017.
9. Tishkov V., Pometun A., **Zarubina S.**, Kargov I., Virolinen T., Parshin P., Savin S. New formate dehydrogenases with increased activity and stability for coenzyme regeneration. 22nd International Conference "INPEC-2016" (International Network of Protein Engineering Centers), Daejeon, Republic of Korea, November 6-10, 2016.
10. Пометун (Алексеева) А.А., **Зарубина С.А.**, Паршин П.А., Каргов И.С., Савин С.С., Тишков В.И. Новые формиатдегидрогеназы: взаимосвязь структура-функция. V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016.

11. Тишков В.И., Пометун (Алексеева) А.А., **Зарубина С.А.**, Каргов И.С., Виролайнен Т.С., Атрошенко Д.Л., Комарова Н.В., Голубев И.В., Хушпульян Д.М., Захарова Г.С., Чубарь Т.А., Газарян И.Г., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Савин С.С. Структурно-функциональные исследования оксидоредуктаз. V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016.
12. **Zarubina S.A.**, Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. Recombinant formate dehydrogenase from the yeast *Ogataea parapolymorpha* DL-1. 8th European Meeting on OxiZymes, Wageningen, The Netherlands, 3–6 July 2016.
13. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Atroshenko D.L., **Zarubina S.A.**, Savina L.I., Fedorchuk V.V., Kargov I.S., Fedorchuk E.A., Chubar T.A., Secundo F., Savin S.S. New and improved biocatalysts for synthesis of drugs and chiral compounds. XX Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, Yekaterinburg, Russia, 26-30 September, 2016.
14. **Zarubina S.A.** Study of kinetic parameters and thermal stability of formate dehydrogenase from the thermotolerant yeast. Abstracts of XXIII international conference of students and young scientists "Lomonosov", section "Innovation in chemistry: achievements and prospects", Moscow, April 11–15, 2016.
15. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Golubev I.V., Fedorchuk V.V., Kargov I.S., **Zarubina S.A.**, Dolina I.A., Atroshenko D.L., Zaharova G.S., Poloznikov A.A., Virolainen T.S., Kovalevsky R.P., Stepashkina A.V., Chubar T.A., Uporov I.V., Sklyarenko A.V., Yarockiy S.V., Savin S.S. Protein rational design for biotechnology. Book of materials VIII Moscow international congress situation and development prospects», v. 2, pp. 452-453, Moscow, Russia, March 17-20, 2015.
16. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., **Zarubina S.A.**, Dolina I.A., Atroshenko D.L., Stepashkina A.V., Poloznikov A.A., Zakharova G.S., Chubar T.A., Gazaryan I.G., Fedorchuk V.V., Sklyarenko A.V., Yarotsky S.V., Savin S.S. Protein engineering. New paradigm for creation of biocatalysts. Program and Abstract Book of Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Moscow region, Russia, June 21-26, 2015.
17. **Zarubina S.A.**, Alekseeva A.A., Kleimenov S.Yu., Tishkov V.I. Preparation and study of mutant bacterial formate dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 101 with changed coenzyme specificity. International Bioforum, Puschino, Russia, April 21–25, 2014.
18. Alekseeva A.A., Kargov I.S., **Zarubina S.A.**, Savin S.S., Pometun E.V., Kleimenov S.Yu., Tishkov V.I. Management of properties and stability of recombinant formate dehydrogenase from soya *Glycine max* by single-point mutation. FEBS Journal, 2013. V. 280 (Suppl. 1). P. 172-173. Saint-Petersburg, Russia, July 6-11, 2013.
19. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., **Zarubina S.A.**, Kargov I.S., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., Zakharova G.S., Uporov I.V., Komarova N.V., Poloznikov A.A., Savin S.S. Protein engineering of enzymes for fine organic synthesis, pharmaceutical industry and medicine diagnostics. Proceedings of the VII Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development", JSC "Expo-biochem-technologies" D.I. Mendeleev University of Chemistry and Technology of Russia, part II, P.140. Moscow, Russia, March 19–22, 2013.
20. **Zarubina S.A.**, Alexeeva A.A., Tishkov V.I. The engineering of coenzyme specificity of mutant bacterial formate dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 101. Abstracts of International conference «BIOCATALYSIS-2013: fundamentals & applications», P.100. Moscow, Russia, July 2–5, 2013.