

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.151

**ИНЖЕНЕРИЯ N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СОИ *GLYCINE MAX***

Леонид Александрович Шапошников¹, Святослав Сергеевич Савин¹,
Денис Леонидович Атрошенко^{1,2}, Татьяна Анатольевна Чубарь¹, Евгений
Владимирович Пометун³, Владимир Иванович Тишков^{1,2}, Анастасия
Александровна Пометун^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

³ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Авторы, ответственные за переписку: Анастасия Александровна Пометун, aapometun@gmail.com; Владимир Иванович Тишков, vitishkov@gmail.com

Аннотация. NAD(P)⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH, КФ 1.2.1.2.) катализирует окисление формиат-иона при сопряженном восстановлении NAD(P)⁺ до NAD(P)H. Ранее в нашей лаборатории была получена генетическая конструкция с геном *soyfdh2*, кодирующим изофермент 2 формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max* (SoyFDH), в котором была удалена нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, отвечающий за транспорт профермента в митохондрии клеток растений (фермент SoyFDH_L). В настоящей работе получен второй вариант SoyFDH_S, в котором по сравнению с SoyFDH_L последовательность на N-конце была уменьшена и изменена в целях получения начального участка, соответствующего последовательности N-конца в FDH из бактерий *Pseudomonas* sp.101. Далее на N-конец этой и укороченной форм SoyFDH была добавлена последовательность из шести остатков гистидина (His-tag). Все четыре варианта SoyFDH были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus, проведена очистка этих ферментов, определены их кинетические параметры и исследована термостабильность. Показано, что в случае SoyFDH_L, аналогичной природному варианту фермента, как с His-tag, так и без него уровень экспрессии выше в два раза по сравнению с укороченным вариантом. Добавление His-tag на N-конец ферментов снижает уровень экспрессии. Изменение последовательности N-конца, а также введение на N-конец последовательности His-tag не оказывает значительного влияния на термостабильность при температуре 50–56 °С, однако за счет более высоких значений энтальпии активации процесса термоинактивации укороченная форма при нормальных значениях температуры стабильнее природной в 3 раза. Сравнение кинетических параметров двух вариантов SoyFDH показывает, что каталитические константы одинаковы, но длинный вариант SoyFDH_L имеет более низкие значения $K_M^{\text{HCOO}^-}$, а короткий – более низкие значения $K_M^{\text{NAD}^+}$. Введение His-tag на N-конец ферментов не оказывает влияния на их кинетические параметры.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, *Glycine max*, белковая инженерия, каталитические параметры, температурная стабильность

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-3-377-390

Список сокращений: FDH – формиатдегидрогеназа, SoyFDH – изофермент 2 формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max*, NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид, SoyFDH_L – длинный вариант фермента, SoyFDH_S – короткий вариант фермента, SoyFDH_L_His и SoyFDH_S_His – соответственно длинный и укороченные варианты с His-tag на N-конце, NaPB – натрий-фосфатный буфер.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 21-34-70046 и частично в рамках государственного научного задания.

Для цитирования: Шапошников Л.А., Савин С.С., Атрошенко Д.Л., Чубарь Т.А., Пометун Е.В., Тишков В.И., Пометун А.А. Инженерия N-концевой последовательности формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 4. С. 377–390.

ORIGINAL ARTICLE

ENGINEERING THE N-TERMINAL SEQUENCE OF *GLYCINE MAX* SOYBEAN FORMATE DEHYDROGENASE

Leonid A. Shaposhnikov¹, Svyatoslav S. Savin¹, Denis L. Atroshenko¹, Tatyana A. Chubar¹, Evgenii V. Pometun³, Vladimir I. Tishkov^{1,2}, Anastasia A. Pometun^{1,2}

¹ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Corresponding authors: Vladimir I. Tishkov, vitishkov@gmail.com, Anastasia A. Pometun, aapometun@gmail.com

Abstract. NAD(P)⁺-dependent formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2.) catalyzes the oxidation of formate ion with the coupled reduction of NAD(P)⁺ to NAD(P)H. Previously, in our laboratory, a genetic construct was obtained with the *soyfdh2* gene encoding isoenzyme 2 of formate dehydrogenase from soybean *Glycine max* (SoyFDH). In this construct the nucleotide sequence encoding the signal peptide responsible for the transport of the pro-enzyme into the mitochondria of plant cells (the SoyFDH_L enzyme) was deleted. In this work, a second variant of SoyFDH_S was obtained, in which, compared to SoyFDH_L, the sequence at the N-terminus was reduced and changed to mimic the N-terminus sequence in FDH from *Pseudomonas* sp.101 bacteria. Next, a sequence of six histidine residues (His-tag) was added to the N-terminus of the long and short forms of SoyFDH. All four SoyFDH variants were expressed in *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus, these enzymes were purified, their kinetic parameters were determined, and thermal stability was studied. In the case of SoyFDH_L, which is similar to the natural variant of the enzyme, both with and without His-tag, the expression level is two times higher compared to the truncated variant. The addition of His-tag to the N-terminus of enzymes reduces the level of expression. Changing the sequence of the N-terminus, as well as introducing the His-tag sequence to the N-terminus, does not significantly affect thermal stability of the enzymes at temperatures of 50–56 °C. However, due to the higher values of the activation enthalpy ΔH^\ddagger of the thermal inactivation process, the shortened form at normal temperatures is 3 times more stable than the natural one. A comparison of the kinetic parameters of the

two SoyFDH variants shows that the catalytic constants are the same, but the long version of SoyFDH_L has lower values $K_M^{\text{HCOO}^-}$, and the short version has lower $K_M^{\text{NAD}^+}$ values. The introduction of His-tag into the N-terminus of enzymes does not affect their kinetic parameters.

Keywords: formate dehydrogenase, *Glycine max*, protein engineering, catalytic parameters, temperature stability

Abbreviations used: FDH, formate dehydrogenase, SoyFDH, formate dehydrogenase isoenzyme 2 from soybean *Glycine max*, NAD^+ , nicotinamide adenine dinucleotide, SoyFDH_L, long enzyme variant, SoyFDH_S, short enzyme variant, SoyFDH_L_His and SoyFDH_S_His, respectively, long and short variants with His-tag at the N-terminus, NaPB – sodium phosphate buffer.

Financial Support. The research was carried out with partial financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 21-34-70046 as well as with partial financial support in frame of state research program.

For citation: Shaposhnikov L.A., Savin S.S., Atroshenko D.L., Chubar T.A., Pometun E.V., Tishkov V.I. Pometun A.A. Engineering the N-terminal Sequence of *Glycine max* Soybean Formate Dehydrogenase // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. № 4. P. 377–390.

NAD(P)^+ -зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, FDH) была найдена в бактериях, дрожжах, грибах и растениях [1–3]. В отличие от дрожжей и грибов, в которых FDH находится в цитоплазме, в растениях формиатдегидрогеназа локализована в митохондриях и за счет окисления формиат-иона снабжает клетку энергией в виде восстановленного NADH. Было показано, что в растениях формиатдегидрогеназа является ферментом стресса, поскольку при неблагоприятных воздействиях синтез FDH резко возрастает и ее содержание может достигать до 10% от всех митохондриальных белков [3–10]. Кроме того, растительные FDH отличаются от формиатдегидрогеназ микроорганизмов способностью к регуляции активности за счет фосфорилирования. [11]. Таким образом, изучение структуры и свойств растительных FDH может дать информацию о механизме ответа на стрессовые воздействия у растений. Выбор сои в качестве объекта исследования обусловлен тем, что это важное сельскохозяйственное растение, и понимание того, что именно влияет на его выживаемость в окружающей среде, является важной и актуальной задачей.

Характерной особенностью генов формиатдегидрогеназ растений является наличие на 5'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный пептид [3]. В начале работ по исследованию растительных FDH проводили клонирование кДНК полноразмерного

варианта гена. При экспрессии такой последовательности в клетках *E. coli* либо фермент синтезировался в виде нерастворимых телец включения [5, 6], либо уровень экспрессии был очень низким [12, 13]. Использование системы гомологичной экспрессии FDH в растениях *Arabidopsis thaliana* (AthFDH) также не позволяло получить значимые количества рекомбинантного фермента [14]. Высокого уровня экспрессии генов растительных FDH в клетках *E. coli* в активной форме удалось достичь за счет создания генетических конструкций без участка, кодирующего сигнальный пептид. Такие эксперименты проводили для AthFDH, SoyFDH [15] и LjaFDH [4]. Уровень экспрессии при использовании клеток *E. coli* в качестве штамма-хозяина достигал 40% от всех растворимых белков клетки.

Во многих растениях FDH может быть представлена в виде как одного, так и нескольких изоферментов, которые кодируются разными генами [16]. Так, для *Arabidopsis thaliana* было показано, что в геноме присутствует только один ген AthFDH, кодирующий активный фермент, но с этого гена происходит образование трех транскриптов, отличающихся по длине нетранслируемой области на 3'-конце [17]. В геноме *A. thaliana* были также обнаружены псевдогены FDH. В случае патогенного гриба *Histoplasma capsulatum* было показано, что в зависимости от внешних условий существования

происходит альтернативный сплайсинг мРНК FDH на участке, кодирующем N-конец [18]. В сое *Glycine max* по данным транскриптомики и геномики нами были идентифицированы шесть изоферментов FDH, каждый из которых имел свой собственный сигнальный пептид [3]. На основании вышесказанного можно предположить, что последовательность FDH эукариот на N-конце способна оказывать значительное влияние на локализацию и уровень экспрессии, а также свойства этого фермента.

В нашей лаборатории систематически изучаются FDH из разных источников. Для SoyFDH было осуществлено клонирование гена без участка, кодирующего сигнальный пептид, проведена экспрессия и изучены основные свойства этого фермента [15, 19]. На настоящий момент методом сайт-направленного мутагенеза получено множество мутантных форм SoyFDH. Показано, что замены в положениях 267, 272 [20] и 290 [21–23] значительно увеличивают температурную стабильность, а замена в положении 267 приводит также и к увеличению каталитической константы $k_{\text{кат}}$ [20]. Для ряда мутантных SoyFDH стабильность возросла более чем в 100 раз по сравнению с ферментом дикого типа [23].

На практике FDH активно используются для регенерации NAD(P)H как в виде смеси отдельных ферментов, так и в форме гибридных белков [24]. Поскольку растительные FDH среди аналогичных ферментов имеют самые низкие значения K_M по коферменту, то их применение будет наиболее эффективным в таких процессах, где необходимо использовать как можно более низкие концентрации NAD⁺.

Для упрощения процесса получения ферментов часто используется стратегия добавления последовательности из нескольких остатков гистидина на N- или C-конец фермента, которая позволяет использовать быстрый и простой метод очистки – металл-хелатную хроматографию. Этот подход наиболее эффективен, когда требуется очистка сложных гибридных биокатализаторов, в которых два и более ферментов объединены в одну полипептидную цепь. Поскольку His-tag может оказывать влияние на свойства фермента, то при создании таких конструкций важно оценить, где именно с точки зрения сохранения свойств должна находиться эта последовательность. Так, для OraFDH был получен фермент с His-tag на C-конце и $K_M^{\text{NAD}^+}$ составила 80 мкМ [25], в то время как у полученного в нашей лаборатории фермента без

His-tag значение $K_M^{\text{NAD}^+}$ оказалось почти в семь раз ниже – 12 мкМ [19]. В случае PseFDH нами было проведено моделирование и установлено, что более оптимальным является расположение His-tag на N-конце фермента, поскольку N-концевая последовательность находится вдали от активного центра этого фермента [26]. Проведенные эксперименты подтвердили результаты моделирования. Было показано, что нахождение His-tag на N-конце PseFDH не оказывает влияния на каталитические свойства фермента и его стабильность [26]. Турецкими исследователями были получены две формы FDH из *Chaetomium thermophilum* (CtFDH) с His-tag на C- и N-концах соответственно. Показано, что для CtFDH лучшим является расположение His-tag на C-конце [27]. Из приведенных данных следует, что априори (несмотря на множество проведенных исследований FDH из разных источников) однозначно предсказать оптимальную локализацию His-tag не представляется возможным.

В настоящей работе нами проведен анализ N-концевой последовательности SoyFDH, получен укороченный вариант фермента с N-концом, аналогичным бактериальному, проведено моделирование структуры FDH из сои *Glycine max* (SoyFDH) с His-tag на N- и C-конце аминокислотной последовательности фермента, получены два типа SoyFDH с His-tag на N-конце, изучены их каталитические свойства и термостабильность.

Материалы и методы

Моделирование мутантных ферментов

При моделировании использовали алгоритм AlphaFold2, для которого имеется открытый онлайн-сервер [28, 29]. Моделирование проводили для фермента в форме гомодимера, для MSA (multiple sequence alignment – множественное выравнивание последовательностей) использовали метод Jackhammer. Моделировали 5 моделей, лучшую модель выбирали по pLDDT, моделирование проводили без релаксации структур.

Получение плазмид с генами, кодирующими SoyFDH с заменами

Введение нуклеотидных замен проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы для получения укороченного варианта гена *soyfdh_s*, а также *soyfdh_l_his* использовали плазмиду pSoyFDH_L, в которой ген *soyfdh* находится под контролем сильного

промотора РНК-полимеразы фага T7. Для получения укороченного варианта гена с участком, кодирующим His-tag, использовали плазмиду pSoyFDH_S.

В работе для введения мутаций использовали прямые праймеры (SoyFDH_L_His_for, SoyFDH_S_for, SoyFDH_S_His_for) и обратный (SoyFDH_Rev) праймер на начало и конец гена соответственно. Последовательности праймеров приведены ниже.

SoyFDH_L_His_for 5'-GAA GGA GAT ATACAT ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GCG ATA AAT GCC TCA GGT GAA AAG AAG AAA-3'

SoyFDH_S_for 5'-TGC CTC AGG TCA TATGGC GAA AAT TGT GGG GGT G-3'

SoyFDH_S_His_for 5'-GAA GGA GAT ATACAT ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GCG AAA ATT GTG GGG GTG TTC TAC-3'

SoyFDH_Rev 5'-CGA CGG AGC TCG AAT TCT CAC CGG TAT TGG CTT GCA AGT TGA CCC TCC TT-3'

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2,5 мкл 10-кратного буфера для *Pfu* ДНК-полимеразы (200 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25 °C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ KCl, 1 мг/мл БСА, 1% (v/v) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 2,5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого компонента составляла 2,5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0,5 мкл *Pfu* ДНК-полимеразы (2,5 Ед./мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0,5 мл («SSI», США) на приборе «Терцик» («ДНК-Технологии», Россия). Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95 °C, а затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация –95 °C, 30 с; связывание праймеров – 54–58 °C, удлинение цепи – 72 °C, 2 мин, всего 25–35 циклов. После окончания последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали 5 мин при 72 °C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5 градусов ниже температуры плавления дуплексов (T_m), образуемых праймерами.

Продукты ПЦР очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле. Затем продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI. Далее ДНК очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле с последующей экстракцией из геля и лигировали с расщепленной теми же эндонуклеазами ре-

стрикции плазмидой pET 21a. После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5a и высевали их на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и выдерживали в течение 16 ч при 37 °C. Для каждого мутанта SoyFDH с чашки брали по три колонии и выделяли из них плазмиды. Для контроля введения требуемых мутаций проводили секвенирование плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН).

Экспрессия SoyFDH

Экспрессию SoyFDH дикого типа и мутантов проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Для получения штамма-продукта клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Для приготовления посевного материала с чашки отбирали единичную колонию и культивировали в течение 7–9 ч при 30 °C и 180 об/мин до достижения величины поглощения $A_{600} \approx 0,6–0,8$ на длине волны 600 нм в 5 мл среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактриптон 16 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7,0) в присутствии 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Затем содержимое пробирок переносили в качалочные колбы (1 л), содержащие 200 мл среды 2YT, и культивировали клетки при 30 °C и 80–90 об/мин до достижения величины поглощения $A_{600} = 0,6–0,8$ на длине волны 600 нм. Далее проводили индукцию клеток, добавляя в среду для культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора 20 г/л. После индукции клетки культивировали в течение 17 ч при 120 об/мин. Полученную биомассу осаждали на центрифуге «Beckman J-21» (США) при 5500 об/мин в течение 20 мин при 4 °C. После удаления культуральной жидкости клетки ресуспендировали в 0,1 М NaPB (pH 8,0) в массовом соотношении 1:4 (для белков без His-tag) и в 0,05 М трис, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазола (для белков с His-tag). Полученную суспензию замораживали и хранили при –20 °C.

Очистка SoyFDH без His-tag

SoyFDH_L и SoyFDH_S очищали по следующей методике. Суспензии клеток разрушали ультразвуком и далее раствор центрифугировали (14 000 об/мин, 40 мин., +4 °C), осадок уда-

ляли. К раствору, содержащему целевой белок, добавляли сульфат аммония (AS) до 30% от насыщения, а затем смесь инкубировали при +4 °С в течение 1,5–2 ч, после чего нерастворившиеся белки осаждали на центрифуге «Eppendorf 5403» (30 мин, 11 000 об/мин, +4 °С). Отделяли супернатант, к нему добавляли при постоянном перемешивании твердый AS до 85% от насыщения и инкубировали раствор при +4 °С в течение 2 ч, после чего проводили центрифугирование на приборе «Eppendorf 5403» (30 мин, 11 000 об/мин, +4 °С). Супернатант удаляли, к осадку добавляли раствор AS в 0,1 М NaPB, pH 7,0 (45% от насыщения) (раствор А), инкубировали при перемешивании (+4 °С; 1,5 ч). Нерастворившиеся белки удаляли центрифугированием на центрифуге «Eppendorf 5403» при 11 000 об/мин и +4 °С. Далее проводили гидрофобную хроматографию на приборе «ÄKTA start protein purification system» («General Electrics», США). Раствор фермента наносили на колонку 1,0×10 см, содержащую высокозамещенную фенил-сефарозу FastFlow («Pharmacia Biotech», Австрия), со скоростью 1 мл/мин. Колонку предварительно уравнивали раствором А. После нанесения фермента колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на длине волны 280 нм. Фермент элюировали с колонки нисходящим линейным градиентом сульфата аммония (45–0% от насыщения) в 0,1 М NaPB, pH 7,0, общий объем 100 мл. Во время проведения хроматографии собирали фракции по 5 мл и измеряли поглощение на длине волны 280 и 260 нм (A_{280} и A_{260}) и ферментативную активность (А). Далее проводили обессоливание на приборе «ÄKTA start protein purification system» («General Electrics», США). Фракции с максимальным соотношением (A/A_{280}) объемом 1,4 мл наносили на колонку 2,5×10 см (объем 25 мл) с Sephadex G25 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция). Собирали фракции по 0,5 мл, для каждой фракции определяли ферментативную активность (А) и поглощение при длине волны 280 нм (A_{280}). Чистоту полученного препарата фермента определяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях.

Очистка вариантов SoyFDH с His-tag

Для очистки ферментов, содержащих His-tag, использовали метод металл-хелатной хроматографии. Суспензии клеток разруша-

ли ультразвуком, раствор центрифугировали (10 000 об/мин, 40 мин, +4 °С), осадок удаляли. Полученный бесклеточный экстракт наносили на колонку HisTrap FF 1 ml («GE Healthcare»), предварительно уравновешенную буфером 0,05 М TrisHCl 0,5 М NaCl 0,02 М имидазола, pH 7,5 (буфер А2). Элюирование белка с колонки проводили линейным градиентом буфера Б2 (0,05 М TrisHCl 0,5 М NaCl 0,5 М имидазола) по увеличению концентрации имидазола (от 0 до 60% буфера Б2). Активные фракции фермента обессоливали на колонке с Сефадекс G-25 в натрий-фосфатном буфере (pH 7,0), как описано выше для белков без His-tag.

Анализ чистоты полученных препаратов SoyFDH

Контроль чистоты полученных препаратов осуществляли с помощью аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-го додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза «MiniProtean II» фирмы «BioRad».

Определение активности формиатдегидрогеназы

Активность FDH определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800 PC» при 30 °С в 0,1 М NaPB (pH 7,0). Концентрация формиата натрия и NAD^+ в кювете составляла 0,6 М и 1 мг/мл соответственно.

Изучение температурной стабильности ферментов

Термостабильность ферментов измеряли в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0) при нескольких значениях температуры в диапазоне 50–56 °С. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0,5 мл, каждая из которых содержала по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл). Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0,1$ °С). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об/мин на центрифуге «Eppendorf 5415D». Остаточную активность FDH измеряли, как описано выше. Константу

скорости термоинактивации $k_{ин.}$ определяли как тангенс угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу «OriginPro 8.5».

Определение кинетических параметров SoyFDH

Константы Михаэлиса по NAD^+ и формиату определяли по зависимости активности фермента от концентрации (0,5–5 K_M) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей ($>15 K_M$). Точную концентрацию исходных растворов NAD^+ определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17\ 800\ M^{-1}cm^{-1}$). Раствор формиата натрия с заданной concentra-

цией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0). Объем раствора доводили в мерной колбе. Значения K_M были рассчитаны по экспериментальным зависимостям методом нелинейной регрессии с помощью программы «OriginPro 8.5».

Константу скорости реакции $k_{кат.}$ рассчитывали по уравнению $V_{макс.} = k_{кат.} \cdot [E_0]$, где $V_{макс.}$ – максимальная скорость ферментативной реакции, $[E_0]$ – концентрация фермента. Значение $V_{макс.}$ находили при измерении кинетики ферментативной реакции, $[E_0]$ оценивали с помощью формулы Калькара:

$$[E_0] \text{ (мг/мл)} = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{260},$$

где A_{280} – поглощение раствора фермента при длине волны 280 нм, A_{260} – поглощение раствора фермента при длине волны 260 нм.

```

HvuFDH1 -----MAAMWRAAARQLVDRAVGSRRAHTSAG--SKKIVGVFVYQAGEYA
TaeFDH1 -----MAAMCRAAARQLVDRAVGSRRAHTSAG--SKKIVGVFVYQAGEYA
LjaFDH1 -----MAMKRAASSAVRSLLTAPTNPSSSIFSRNLHASGG--KKKIVGVFVYKANEYA
SoyFDH2 -MLNFTLKMSDPTLAQPHLVKVHTT-LETVVV'THNNHNRPSINASGE--KKKIVGVFVYKANEYA
SoyFDH_L -----MAINASGE--KKKIVGVFVYKANEYA
SoyFDH_S -----MAKIVGVFVYKANEYA
TpuFDH1 -----MAMKRAVASTVGAITSSGNP ASSVLARYLHASPG--SKKIVGVFVYKANEYA
LesFDH1 -----MAMRRVASTAARAIASPSLVFTRELQASPG--PKKIVGVFVYKANEYA
StuFDH1 -----MAMSRVASTAARAITSPSSLVFTRELQASPG--PKKIVGVFVYKANEYA
QroFDH1 -----MAGAATSAIKSVLTRHLHASPG--SKKIVGVFVYKANENA
MdoFDH -----MASKGVIASAVRALASSGSSASSTFTTRHLHASGG--SKKIVGVFVYKANEYA
CpaFDH1 -----MKRAATSAIKAFASSQTSFSGSLSTNFARNLHASPG--SKKIVGVFVYKANEYA
AthFDH -----MAMRQAAKATIRACSSSSSSSGYFARRQFNASSG-DSKKIVGVFVYKANEYA
PsiFDH -----MASKRAVISTFRAASRKPIFSSVSPLASSVRELHAPAG--SNKIVGVFVYKANEYA
MgrFDH -----MARPASSLLSQRATASFTORGANLARAGGVRTLSTSSR-QGKVLVLYDGHENA
AjcFDH1 -----MGKVLVLYDGGRHA
SceFDH -----MSKGVLLVLYEGGKHA
CboFDH -----MKIVLVLYDAGKHA
OpaFDH -----MKVVLVLYDAGKHA
MorFDH -----MAKVVCVLYDDPING
BstFDH -----MATVLCVLYPDPVDG
PseFDH -----MAKVLVLYDDPVDG
    
```

Рис. 1. Выравнивание N-концевых последовательностей FDH из разных источников. HvuFDH1 – FDH из ячменя обыкновенного *Hordeum vulgare*, TaeFDH1 – FDH из мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, LjaFDH1 – FDH из лядвенца *Lotus japonicus*, SoyFDH2 – FDH из сои *Glycine max*, TpuFDH1 – FDH из карликового клевера *Triphysaria pusilla*, LesFDH1 – FDH из томата *Lycopersicon esculentum*, StuFDH1 – FDH из картофеля *Solanum tuberosum*, QroFDH1 – FDH из дуба черешчатого *Quercus robur*, MdoFDH – FDH из яблока *Malus domestica*, CpaFDH1 – FDH из папайи *Carica papaya*, AthFDH – FDH из модельного растения *Arabidopsis thaliana*, PsiFDH – FDH из ели ситхинской *Picea sitchensis*, MgrFDH – FDH из гриба *Mycosphaerella graminicola*, AjcFDH1 – FDH из *Ajellomyces capsulatus*, SceFDH – FDH из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, CboFDH – FDH из дрожжей *Candida boidinii*, OpaFDH – FDH из термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha*, MorFDH – FDH из бактерий *Moraxella*, BstFDH – FDH из бактерий *Burkholderia stabilis*, PseFDH – FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101

Результаты и их обсуждение

Получение рекомбинантных SoyFDH

В базах данных последовательностей генов содержится всего 6 изоформ FDH сои, отличающихся последовательностью сигнального пептида, локализованного на N-конце фермента. На рис. 1 представлено выравнивание N-концевых аминокислотных последовательностей FDH из разных источников. Видно, что, как для всех растительных FDH и некоторых ферментов из других источников, FDH сои содержит сигнальный пептид. Для успешной экспрессии FDH сои в клетках *E. coli* было решено удалить фрагмент гена, кодирующего сигнальный пептид, так как ранее было показано, что в случае синтеза полноразмерного варианта растительной FDH могут синтезироваться тельца включения [5]. При этом было решено получить два варианта фермента – длинный (аналогичный природному без сигнального пептида – SoyFDH_L [19] и укороченный (аналогичный по своей N-концевой последовательности фермен-

ту из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) – SoyFDH_S (рис. 1). В результате были созданы две генетические конструкции, содержащие гены FDH сои, кодирующие последовательности, N-концы которых представлены на рис. 1 как pSoyFDH_L и pSoyFDH_S. В последовательностях, соответствующих нативному ферменту, была произведена замена остатков серина (SoyFDH_L) и лизина (SoyFDH_S) на остаток аланина, так как наличие небольшого гидрофобного остатка на N-конце фермента, как правило, способствует увеличению уровня экспрессии целевого белка [30].

Для успешного выбора положения последовательности из шести остатков гистидина было проведено моделирование пространственных структур SoyFDH, содержащих His-tag на N- и C-конце фермента (рис. 2, А, Б). Видно, что N-конец SoyFDH находится гораздо дальше от полости активного центра, чем C-конец. Из полученных данных видно, что нахождение His-tag на N-конце в случае SoyFDH может оказывать гораздо меньшее влияние на свойства фермента, чем локализации

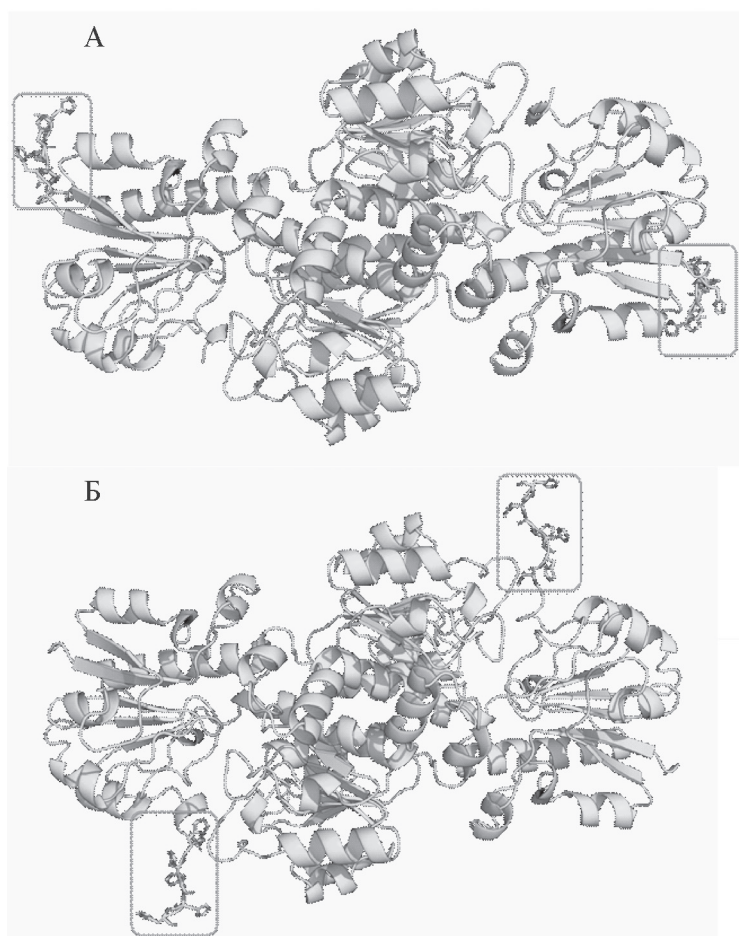


Рис. 2. Модельные структуры SoyFDH_L с His-tag на N- и C-конце (А и Б соответственно).

такой последовательности на С-конце. Поэтому в рамках настоящей работы было решено получить две конструкции, содержащие гены двух вариантов SoyFDH (SoyFDH_L – соответствующий природному и SoyFDH_S – укороченный) с His-tag на N-конце фермента.

После получения соответствующих генетических конструкций было проведено секвенирование генов разных вариантов SoyFDH по обеим цепям. Показано, что клонированные гены полностью соответствуют последовательности гена FDH сои за исключением вышеуказанных замен.

В табл. 1 представлены данные по экспрессии различных вариантов SoyFDH. Видно, что уровень экспрессии длинного варианта SoyFDH выше, чем короткого. При этом добавление His-tag на N-конец SoyFDH также снижает уровень

экспрессии. Для короткого варианта добавление His-tag приводит к снижению уровня экспрессии в 2,5 раза, а для длинного варианта этот эффект существенно ниже – уровень экспрессии снижается в 1,5 раза. Таким образом, рекомбинантный фермент, аналогичный природному варианту, характеризуется лучшими показателями уровня экспрессии по сравнению с укороченными и измененными вариантами. По всей видимости, нуклеотидная последовательность на 5'-конце гена оказывает влияние на эффективность инициации трансляции. Изменения в структуре этой последовательности могут приводить к тому, что изменяется вторичная структура в районе рибосом-связывающего участка и стартового кодона, инициация трансляции происходит медленнее и, следовательно, уровень экспрессии белка падает. Этим

Таблица 1

Результаты экспрессии мутантных SoyFDH

Фермент*	Выход фермента по активности, Ед./л среды	Выход биомассы, г/л среды	Выход фермента по массе, мг/л среды**	Содержание фермента в клетках, Ед./г
SoyFDH_S 1	521	13,05	130	40
SoyFDH_S 2	532	12,7	133	42
SoyFDH_L 1	697	16,3	174	43
SoyFDH_L 2	707	15,5	177	46
SoyFDH_S His 1	211	19,85	53	11
SoyFDH_S His 2	216	20,15	54	11
SoyFDH_L His 1	486	23,55	122	21
SoyFDH_L His 2	473	23,9	118	20

* 1, 2 – результаты повторов; ** удельная активность фермента принимается за 4 ед/мг.

Таблица 2

Кинетические параметры мутантных SoyFDH (0,1 М NaPB; 0,01 М NaEDTA; pH 7,0)

Фермент	$k_{\text{кат.}}, \text{с}^{-1}$	$K_M^{\text{HCOO}^-}, \text{мМ}$	$K_M^{\text{NAD}^+}, \text{мкМ}$	$k_{\text{кат.}}/K_M^{\text{HCOO}^-}, \text{с}^{-1}\text{мМ}^{-1}$	$k_{\text{кат.}}/K_M^{\text{NAD}^+}, \text{с}^{-1}\text{мМ}^{-1}$
SoyFDH_S	2,9	1,8±0,2	7,9±0,5	1,6	0,37
SoyFDH_L	2,8	0,73±0,04	16±2	3,8	0,18
SoyFDH_S His	2,8	1,3±0,2	8,1±0,5	2,2	0,35
SoyFDH_L His	2,9	0,70±0,05	16±1	4,1	0,18
PseFDH wt [26]	7,3	1,0±0,1	32±2	7,3	0,23
PseFDH_His [26]	7,2	1,1±0,1	39±2	6,6	0,19

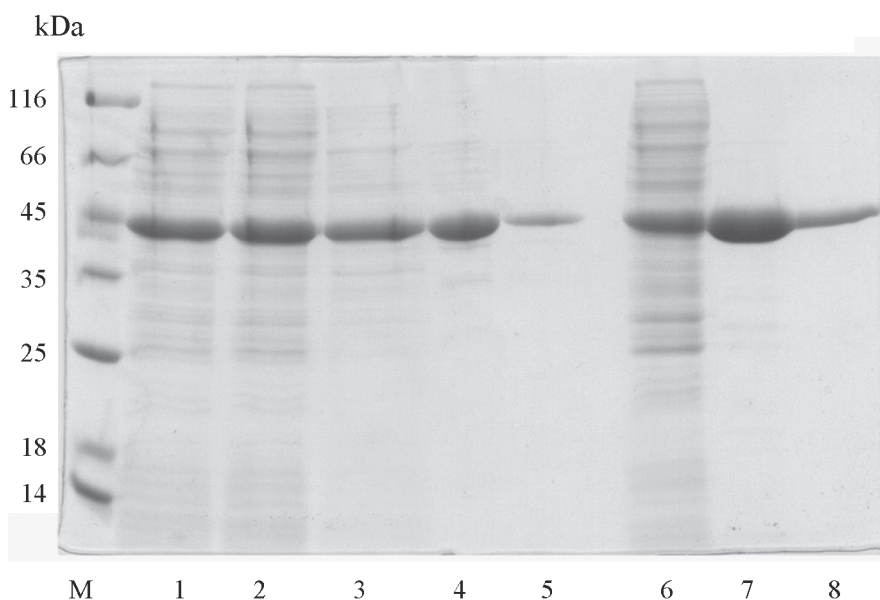


Рис. 3. Результаты электрофореза в денатурирующих условиях для SoyFDH_L и SoyFDH_L_His. М – маркеры молекулярной массы, 1 – SoyFDH_L после УЗ, 2 – SoyFDH_L после добавления сульфата аммония до 30%, 3 – SoyFDH_L после осаждения сульфатом аммония (до 85%) и перерастворением осадка в растворе с 45% AS, 4 – SoyFDH_L после гидрофобной хроматографии, 5 – SoyFDH_L после обессоливания, 6 – SoyFDH_L_His после УЗ, 7 – SoyFDH_L_His после металло-хелатной хроматографии, 8 – SoyFDH_L_His после обессоливания

можно объяснить снижение уровня экспрессии при укорочении N-концевой последовательности и при добавлении His-tag.

На рис. 3 представлены результаты очистки SoyFDH_L на разных стадиях (дорожки 1–5) и ее модификации с His-tag SoyFDH_L_His (дорожки 7, 8). В обоих случаях чистота конечных препаратов составляет не менее 99%. Однако во втором варианте упрощение процедуры выделения за счет удаления стадии фракционирования и замены гидрофобной хроматографии на металл-хелатную не оказывают негативного влияния на чистоту конечного препарата, но сокращают время очистки в несколько раз. Для укороченного варианта результаты были аналогичными. Таким образом, были получены четыре препарата SoyFDH с высокой степенью чистоты.

Кинетические параметры SoyFDH с различной структурой N-концевой последовательности

В табл. 2 представлены данные по кинетическим параметрам четырех вариантов SoyFDH. Видно, что изменения в N-концевой последовательности не оказывают влияния на каталитическую константу, но влияют на константы Михаэлиса как по NAD^+ , так и по фор-

миату, при этом добавление His-tag не меняет кинетические параметры. Для короткого варианта фермента значение $K_M^{\text{NAD}^+}$ в 2 раза ниже, чем соответствующая величина для длинного варианта, а значение $K_M^{\text{HCOO}^-}$ для длинного варианта SoyFDH_L ниже, чем соответствующая величина для SoyFDH_S. Из представленных данных следует, что последовательность из восьми аминокислот на N-конце оказывает влияние на связывание кофермента и субстрата. Так, уменьшение длины N-конца, вероятно, приводит к увеличению подвижности структуры и раскрытию полости кофермент-связывающего домена, что улучшает связывание NAD^+ . При этом наличие восьми аминокислотных остатков на N-конце SoyFDH_L более эффективно, по сравнению с SoyFDH_S, экранирует активный центр фермента от доступа растворителя и за счет снижения диэлектрической проницаемости связывание формиата становится более эффективным. Для сравнения в табл. 2 представлены данные по кинетическим параметрам для PseFDH. Видно, что SoyFDH обладает более низкими значениями $K_M^{\text{NAD}^+}$, а для укороченных вариантов SoyFDH наблюдаются более высокие значения каталитической эффективности с NAD^+ . Это свидетельствует о перспективности использования рассматрива-

емых ферментов на практике в системах ферментов с регенерацией кофактора.

Термостабильность мутантных SoyFDH

Термостабильность мутантных ферментов была изучена с использованием кинетики термоинактивации. На рис. 4 представлены зависимости остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах для SoyFDH_L_His при значениях температуры 50–56 °С. Видно, что полученные зависимости представляют собой прямые, т.е. процесс термоинактивации описывается кинетикой реакции первого порядка. Аналогичные зависимости наблюдаются и для трех остальных форм SoyFDH. По тангенсам углов наклона прямых были рассчитаны константы скорости термоинактивации. Наблюдаемые величины констант скорости инактивации не зависели от концентрации фермента во всем исследованном температурном диапазоне, что свидетельствует об истинном мономолекулярном механизме процесса термоинактивации.

На рис. 5 представлены данные по сравнению кинетики термоинактивации всех изученных форм при одном значении температуры (56 °С). Из рис. 5 видно, что по стабильности при высоких значениях температуры мутантные SoyFDH, рассматриваемые в настоящей работе, в пределах ошибки эксперимента практически не различаются. В случае истинной мономолекулярности процесса зависимость константы скорости от температуры может быть описана с помощью уравнения теории активированного комплекса (ТАК). Линейная форма этого уравнения имеет следующий вид:

$$\ln\left(\frac{k_m}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} =$$

$$= \text{const} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T},$$

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

где k_B и h – константы Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая

Т а б л и ц а 3

Активационные параметры и температуры полчинаяктивации для мутантных SoyFDH

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
SoyFDH_S	376±6	840±20
SoyFDH_L	345±7	750±20
SoyFDH_S_His	390±8	890±20
SoyFDH_L_His	345±8	750±20

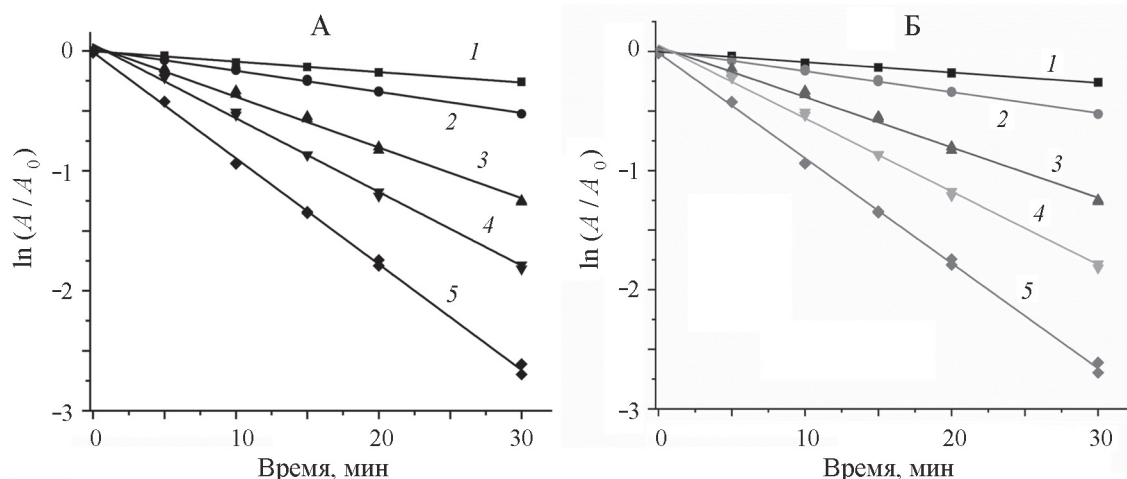


Рис. 4. Зависимость остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах для варианта SoyFDH_L_His (0,1 М NaPB; 0,01 М EDTA; pH 7,0) при T , °С: 1 – 50, 2 – 52, 3 – 54, 4 – 55, 5 – 56

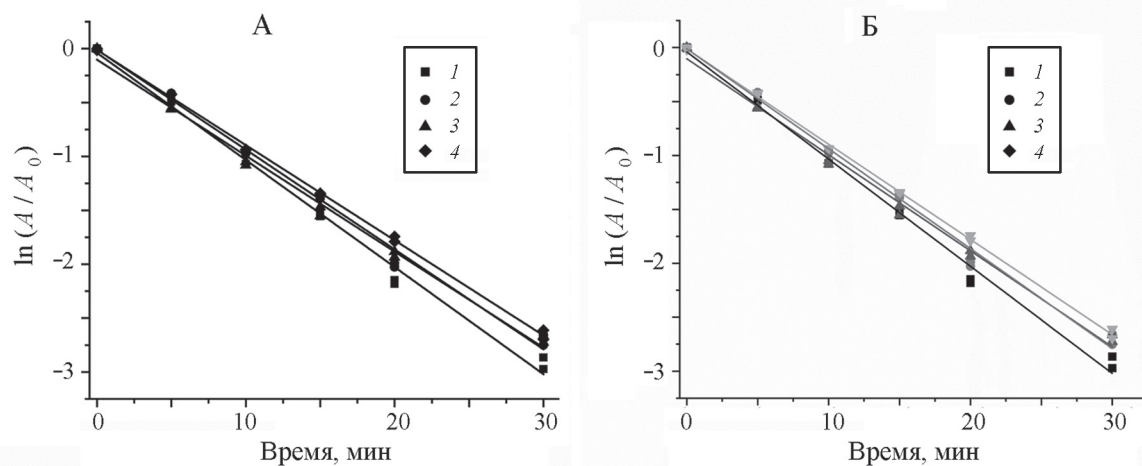


Рис. 5. Зависимость остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах для разных вариантов SoyFDH: 1 – SoyFDH_S, 2 – SoyFDH_L, 3 – SoyFDH_S_His, 4 – SoyFDH_L_His (0,1 M NaPB; 0,01 M EDTA; pH 7,0; 56 °C)

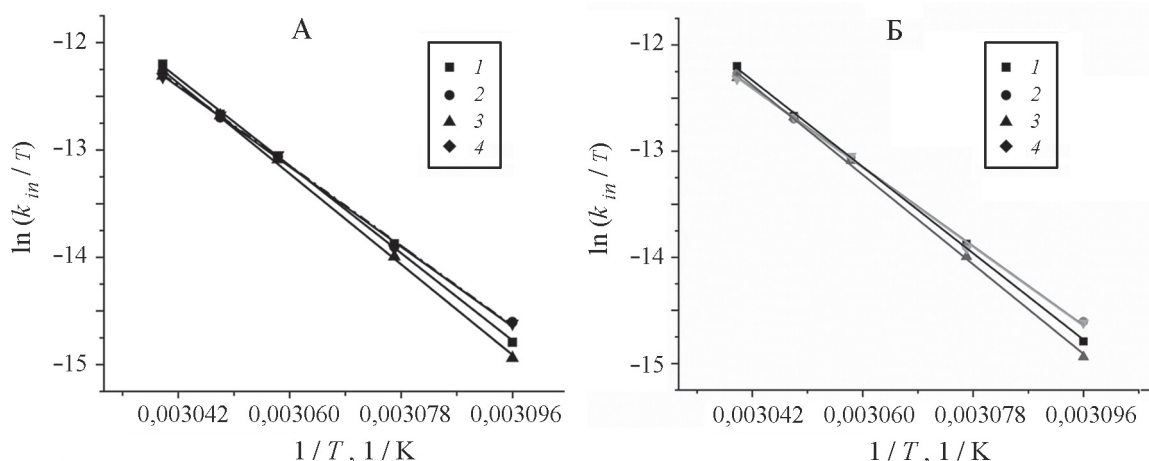


Рис. 6. Температурная зависимость константы скорости термоинактивации для четырех вариантов SoyFDH: 1 – SoyFDH_S, 2 – SoyFDH_L, 3 – SoyFDH_S_His, 4 – SoyFDH_L_His (0,1 M NaPB; 0,01 M EDTA; pH 7,0)

постоянная, а ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – активационные параметры. По температурным зависимостям наблюдаемых констант скорости термоинактивации для всех четырех форм (рис. 6) были рассчитаны активационные параметры – энтальпия активации ΔH^\ddagger и энтропия ΔS^\ddagger (табл. 3). Видно, что в случае «коротких» вариантов SoyFDH_S и SoyFDH_S_His значения энтропии активации ΔH^\ddagger больше на 30 и 45 кДж/моль соответственно, чем у «длинных» SoyFDH_L и SoyFDH_L_His, причем эти различия в несколько раз превышают ошибку определения. Более высокие значения энтропии активации ΔH^\ddagger означают, что в случае «коротких» форм константа скорости термоинактивации с ростом температуры изменяется быстрее, чем

в случае SoyFDH_L и SoyFDH_L_His. Расчет значений констант для $T = 25^\circ\text{C}$ по уравнению ТАК показывает, что при этой температуре SoyFDH_S и SoyFDH_S_His стабильнее соответственно в 3 и 5 раз по сравнению с «удлиненными» вариантами.

Таким образом, в результате выполненных экспериментов получены два варианта форматдегидрогеназы из сои *Glycine max* (SoyFDH): 1) первая форма соответствует природному ферменту, получающемуся в результате отщепления сигнального пептида от про-белка после транспорта из цитоплазмы в митохондрии; 2) в укороченном варианте сделана имитация N-конца PseFDH. Также получены варианты этих двух форм, допол-

нительно содержащие на N-конце последовательность из шести остатков гистидина His-tag. Можно отметить следующие ключевые результаты.

1. Для двух вариантов SoyFDH, как и в случае форматдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, благоприятным является расположение His-tag на N-конце. Введение в это положение последовательности из шести остатков гистидина как в нативную SoyFDH, так и в ее укороченную форму, не влияет на каталитические свойства и термостабильность фермента. В то же время наличие His-tag на N-конце позволяет в одну стадию получать практически гомогенные препараты ферментов.

2. Для SoyFDH_L как с гистидиновой меткой, так и без нее уровень экспрессии выше, чем для укороченного варианта, однако эта проблема может быть решена за счет оптимизации структуры

мРНК в начале гена, а также за счет оптимизации кодонов первых аминокислот. В нашей лаборатории такая работа была в свое время проведена с геном PseFDH, когда скорость синтеза фермента в клетках *E. coli* была повышена в три раза.

3. Несмотря на то, что N-конец расположен достаточно далеко от полости активного центра, природа аминокислотных остатков в этом положении влияет на каталитические свойства фермента. Нативная форма фермента SoyFDH_L имеет более низкие значения $K_M^{\text{HCOO}^-}$ по сравнению с SoyFDH_S. «Короткий» вариант SoyFDH_S имеет в два раза более низкое значение K_M с коферментом NAD^+ по сравнению с SoyFDH_L. Таким образом, форма SoyFDH_S с имитацией N-конца PseFDH по сравнению с ферментом дикого типа SoyFDH_L в два раза более эффективна в процессах хирального синтеза с регенерацией NADH с помощью этого фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biochemistry (Mosc.) 2004. Vol. 69. N 11. P. 1252 (DOI: 10.1007/s10541-005-0071-x).
2. Tishkov V.I. Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. Vol. 23. P. 89 (DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003).
3. Alekseeva A.A., Savin, S.S., Tishkov, V.I. // Acta Naturae. 2011. Vol. 3. N. 4 (11). P. 38-54 (DOI: 10.32607/20758251-2011-3-4-38-54).
4. Andreadeli A., Fletmetakis E., Axarli I., Dimou M., Urdvardi M.K., Katinakis P., Labrou N.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1794. N 6. P. 976.
5. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Rémy R. // Plant Physiol. 1993. Vol. 102. P. 1171.
6. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Darpas A., Sallantin M., Huet J.C., Pernollet J.C., Rémy R. // Plant Physiol. 1992. Vol. 98. P. 273 (DOI: 10.1104/pp.98.1.273).
7. Wang J., Deng Y., Zhou Y., Liu D., Yu H., Zhou Y., Lv J., Ou L., Li X., Ma Y., Dai X., Liu F., Zou X., Ouyang B., Li F. // Plant J. Cell Mol. Biol. 2019. Vol. 99. N 4. P. 763 (DOI: 10.1111/tj.14351).
8. Lee S, Vemanna R.S., Oh S., Rojas C.M., Oh Y., Kaundal A., Kwon T., Lee H.-K., Senthil-Kumar M., Mysore K.S. // PLoS ONE. 2022. Vol. 17. N 5. e0264917 (DOI: 10.1371/journal.pone.0264917).
9. Kurt-Gür, G., Demirci, H., Sunulu, A. Ordu E. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2018. Vol. 25. P. 31679 (DOI: 10.1007/s11356-018-3145-1).
10. Marzorati F., Vigani G., Morandini P., Murgia I. // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2021. Vol. 114. P. 101633 (DOI: 10.1016/j.pmpp.2021.101633).
11. Bykova N.V., Stensballe A., Egsgaard H., Jensen O.N., Møller I.M. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. N 28. P. 26021.
12. Suzuki K., Itai R., Suzuki K., Nakanishi H., Nishizawa N.K., Yoshimura E., & Mori S. // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. P. 725.
13. Shiraishi T., Fukusaki E.I., Kobayashi A. // J. Biosci. Bioeng. 2000. Vol. 89. N 3. P.241.
14. Herman P.L. Ramberg H., Baack R. D, Markwell J., Osterman J.C. // Plant Sci. 2002. Vol. 163. N 6. P. 1137.
15. Sadykhov, E.G., Serov, A.E.; Yasnyi, I.E.; Voinova, N.S.; Alekseeva A.A., Petrov A.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2006. Vol. 47. N 1. P. 20.
16. David P., des Francs-Small C.C., Sévignac M., Thareau V., Macadré C., Langin T., Geffroy V. // Theor. Appl. Genet. 2010. Vol. 121. N 1. P. 87.
17. Li R., Bonham-Smith P.C., King J. // Can. J. Bot. 2001. Vol. 79. N 7. P. 796.
18. Hwang L. Hocking-Murray D., Bahrami A.K., Anderson M., Rine J., Sil A. // Mol. Biol. Cell. 2003. Vol. 14. P. 2314–2326.
19. 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. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. N 2. P. 1 (DOI 10.3103/S0027131418020153).
20. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Uporov I.V., Pometun E.V., Tishkov V.I. // Biochemistry (Mosc.). 2012. Vol. 77. N 10. P. 1199 (DOI: 10.1134/S0006297912100124).
21. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Tishkov V.I. // Prot. Eng. Des. Select. 2012. Vol. 25. N. 11. P. 781.
22. Kargov I.S., Kleymenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. // Prot. Eng. Des. Select. 2015. Vol. 28. N 6. P. 171.
23. Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2015. Vol. 7. N. 1(24). P. 60-69. DOI: 10.32607/20758251-2015-7-3-55-64
24. Kokorin A., Parshin P.D., Bakkes P.J., Pometun A.A.,

- Tishkov V.I., Urlacher V.B. // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11. 21706 DOI: 10.1038/s41598-021-00957-5
25. Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98. N 4. P. 1621.
26. Pometun A.A., Parshin P.D., Galanicheva N.P., Uporov I.V., Atroshenko D.L., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 250 (DOI: 10.3103/S0027131420040057).
27. Esen H., Alpdagtas S., Çakar M.M. Binay B. // *Prepar. Bioch. Biotechnol.* 2019. Vol. 49. N 5. P. 529 (DOI: 10.1080/10826068.2019.1599394).
28. Jumper J., Hassabis D. // *Nat. Methods.* 2022. Vol. 19. P. 11 (DOI:10.1038/s41592-021-01362-6).
29. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. // *Nat. Methods.* 2022. Vol. 19. P. 679 (DOI: 10.1038/s41592-022-01488-1).
30. Varshavsky A. // *Protein Sci.* 2011. Vol. 20. N 8. P. 1298 (DOI: 10.1002/pro.666. PMID: 21633985; PMCID: PMC3189519).

Информация об авторах

Шапошников Леонид Александрович – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (shaposhnikovleo@gmail.com);

Савин Святослав Сергеевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (savinslava@gmail.com);

Атрошенко Денис Леонидович – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (atrdenis@gmail.com);

Чубарь Татьяна Анатольевна – ассистент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (tchubar@gmail.com);

Пометун Евгений Владимирович – доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. хим. наук (epometun@gmail.com);

Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; гл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, докт. хим. наук, профессор (vitishkov@gmail.com);

Пометун Анастасия Александровна – зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (aapometun@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.01.2023;
одобрена после рецензирования 10.02.2023;
принята к публикации 15.02.2023.