

УДК 577.15

СРАВНЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ НОВЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ С ПОМОЩЬЮ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

А.А. Пометун^{1,2}, С.Ю. Клейменов^{1,4}, С.А. Зарубина^{2,3}, И.С. Каргов^{1,2,3},
П.Д. Паршин^{2,3}, Э.Г. Садыхов¹, С.С. Савин^{2,3}, В.И. Тишков^{1,2,3*}

(¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; ³химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; ⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования формиатдегидрогеназ (ФДГ) из разных источников. За последние несколько лет были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* новые гены четырех ФДГ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), метилотрофных термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* (OpaFDH), дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (SceFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PpaFDH). С помощью дифференциальной сканирующей калориметрии проведен сравнительный анализ температурной стабильности новых рекомбинантных формиатдегидрогеназ и ряда ФДГ из других источников. Показано, что два новых фермента – SauFDH и OpaFDH – по своей стабильности сравнимы с ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101. Наименее стабильной среди описанных ФДГ оказалась SceFDH.

Ключевые слова: термостабильность, формиатдегидрогеназа, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Список сокращений: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, SauFDH, PseFDH, OpaFDH, CboFDH, SceFDH, AthFDH, SoyFDH и PpaFDH – рекомбинантные формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas* sp. 101, метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* и *Candida boidinii*, пекарских дрожжей, растения *A. thaliana*, сои *Glycine max* и мха *Physcomitrella patens* соответственно.

Формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) из разных источников изучаются в нашей лаборатории в течение многих лет [1–3]. ФДГ присутствует в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах, а также высших и низших растениях. Важность исследования этого фермента обусловлена следующими факторами: ФДГ активно применяется на практике в качестве биокатализатора для регенерации кофактора [4], а также играет важную роль в жизнедеятельности различных организмов [1, 3]. Для того чтобы оценить возможность использования формиатдегидрогеназы в качестве биокатализатора, необходимо обладать информацией о кинетических параметрах и стабильности этого фермента.

Гены, кодирующие ФДГ в разных организмах, были успешно клонированы в *E. coli* во многих лабораториях мира. Создание эффективных экспрессирующих векторов позволило получить рекомбинантные ФДГ в активной и растворимой формах. В нашей лаборатории имеется самая большая в мире коллекция клонированных ге-

нов ФДГ. В эту коллекцию входят гены из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH), *Moraxella* sp. C-1, *Mycobacterium vaccae* N10, метилотрофных дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH), растений *Arabidopsis thaliana* (AthFDH) и сои *Glycine max* (SoyFDH). В течение последних лет нами были клонированы и экспрессированы в активной форме новые гены ФДГ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), метилотрофных термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* (OpaFDH), пекарских дрожжей (SceFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PpaFDH).

Исследование температурной стабильности ФДГ представляет собой важную задачу, так как многие биокаталитические процессы проводят в течение длительного времени при повышенной температуре. Как правило, температурную стабильность формиатдегидрогеназ изучают двумя методами – по кинетике инактивации и методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). В данной работе нами было проведено

сравнительное исследование термостабильности четырех новых и некоторых ранее полученных рекомбинантных ФДГ методом ДСК.

Экспериментальная часть

Экспрессия рекомбинантных формиатдегидрогеназ. Экспрессию генов, кодирующих целевую формиатдегидрогеназу, проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS. Культивирование штаммов-продуцентов рекомбинантных ФДГ осуществляли по следующей методике. Музейную культуру клеток высевали в питательную среду 2YT (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л хлорида натрия, 1,5 г/л однозамещенного фосфата натрия, 1 г/л двузамещенного фосфата калия; pH 7,0) и инкубировали в течение ночи (37 °С, 180 об/мин) в присутствии антибиотиков (150 мкг/мл Amp для PseFDH, SauFDH, CboFDH, SceFDH, AthFDH, SoyFDH и 30 мкг/мл Kan для PpaFDH, OraFDH) и хлорамфеникола (25 мкг/мл). На следующем этапе ночную культуру пересеивали в аналогичную свежую питательную среду с такой же концентрацией антибиотиков и культивировали при 30 °С в специальных колбах с отбойниками объемом 250 мл или 1 л. Объем посевного материала составлял 10–15% от общего объема среды (20% от объема колбы). Далее по достижении поглощения суспензии клеток при 600 нм (A_{600}) 0,6–0,8 в среду добавляли индуктор биосинтеза ФДГ лактозу до конечной концентрации 20 мг/мл. Затем клетки культивировали при максимальной аэрации в течение ночи при температуре 20 °С для SoyFDH, 25 °С для CboFDH, SauFDH, PpaFDH и 30 °С для остальных ферментов. Клетки осаждали на центрифуге «Beckman J-21» (США) при 6000 об/мин в течение 20 мин при 4 °С.

Очистка рекомбинантных ферментов. Ферменты, экспрессированные в клетках *E. coli*, очищали согласно методике, разработанной для рекомбинантной ФДГ из *Pseudomonas* sp. 101 [5]. Процесс очистки фермента включал разрушение клеток (суспензия 2 г биомассы в 10 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, 0,01 М ЭДТА; pH 8,0) при 0 °С на ультразвуковом дезинтеграторе «BraunSonic» (Германия), термообработку в течение 10 мин (при 55 °С для PseFDH, SauFDH и при 50 °С для OraFDH), высаживание балластных белков сульфатом аммония (35% от насыщения). Для SoyFDH и PpaFDH проводили дополнительное высаживание при концентрации сульфата аммония 85% от насыщения и последующее перерастворение в растворе сульфата аммония (35% от насыщения) в 0,1 М фос-

фатном буфере, pH 7,0 (раствор А). Далее проводили гидрофобную хроматографию на «Phenyl Sepharose Fast Flow» («Amersham») в нисходящем градиенте концентрации сульфата аммония (35–0% от насыщения) и гель-фильтрацию на колонке с Сефакрил S-200. Чистоту полученных препаратов контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-го додецилсульфата натрия (аппаратура для электрофореза фирмы «BioRad»). Полученные препараты были не менее 98% степени чистоты.

Определение температурной стабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Исследование температурной стабильности проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре «Nano DSC». Рабочий объем капиллярных калориметрических ячеек из платины составлял 300 мкл. Для предотвращения образования пузырьков и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживалось избыточное давление 3 атм. Перед проведением эксперимента определяли инструментальную базовую линию. При измерениях в контрольную ячейку помещали буферный раствор, а в рабочую – раствор исследуемой ФДГ в том же буферном растворе. Концентрация ферментов составляла 1–2 мг/мл, а скорость прогрева – 1 °С/мин.

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ первичной структуры ферментов одного семейства, как правило, позволяет понять взаимосвязь между свойствами конкретных ферментов и наличием/отсутствием определенных аминокислотных остатков в их последовательностях. На рис. 1 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из разных источников, для которых было проведено изучение температурной стабильности. Звездочками выделены консервативные аминокислотные остатки. Из рис. 1 видно, что на N-конце у растительных ферментов находится специфическая последовательность, называемая сигнальным пептидом (у AthFDH и SoyFDH выделены курсивом). Практически все растительные про-ФДГ, имеющие сигнальный пептид, неактивны. Из литературы известно, что этот фрагмент отщепляется после транспорта ФДГ из цитоплазмы в митохондрии. Фермент из мха (PpaFDH) имеет один из самых длинных сигнальных пептидов по сравнению с другими ФДГ растений [3]. Кроме того,

OpaFDH -----MGKVVVLVLDYAGKHAQDEERL-----YGC TENALGIRDWLEKQ
 CboFDH -----MKIVLVLDYAGKHADEEKL-----YGC TENKLGIANWLKQK
 SceFDH -----MSKGVLLVLYEGGKHAEEQEKL-----LGC IENELGIRNFIEEQ
 SauFDH -----MSGAVFVFIKQATCNTYFKEVKIYHLGEMDMKIVALFPEAVEGQENQLNTKKA-IGLKTFLEER
 PseFDH -----MAKVLVLYDDPVDGPKTYARDLPLKIDHYGGQTLTPKAIIDFTPGQLLGSVSEGLGRKRKYLESN
 SoyFDH -----MLNFTLKMSDP-TLAQPHLVKVTHTLEVTVTHNHRP SINASGEKKKIVGVFYKNEYA-----KLNPNFVCGVEGALGIREWLESQ
 AthFDH -----MAMRQAAKATIRACSSSSSSGYFARRQFNASSGDSKKIVGVFYKANEYA-----TKNPNFLGCVENALGIRDWLESQ
 PpaFDH -----MASRRIGVLLAGSRALSQRHGLTGASAAADSQILQRHLQFSRFSYSSAAGGESKILGVFFAAHEYA-----KNPEFLGCVENALGIREWLESK

 OpaFDH GHELVVTSKEG-NSVLEKNI PDADVIITPFHPAYITKERIDKAKKLLVYAGVGDHIDLIDYINQSGRDISVLEVTGSNVVSAEHHVVMTMLVLRNFPVPAHEQIISGGWNVAEIAKDSF
 CboFDH GHELITTSKEG-TSELDKHIPDADIIITPFHPAYITKERIDKAKNKLKVVYAGVGDHIDLIDYINQFGKKISVLEVTGSNVVSAEHHVVMTMLVLRNFPVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAY
 SceFDH GYELVTTIKPEPTSTVDRELKDAEIVITPFHPAYITSRNRIAEAPNLKCLVTAGVGDHVDLEAANE--RKITVTEVTGSNVVSAEHHVVMATILVLRNVEGGHQOANGEWDIAGVAKNEY
 SauFDH GHEFIIILANGED---LDKHLPDMDVITISAPFYAPMTREIEKAPNLKLAITAGVGDHVDLAAASE--HNIGVVEVTGSNTVSAEHAVMDDLILRNVEEGHRQSVGEWNLISQVGNHAH
 PseFDH GHTLVVTSKDG-PDSVFERELVDADVVISQPFWPAYLTPERIAKAKNLKIALTAGIGSDHVDLQSAID--RNVTVAEVTYCNISVAEHHVVMMLISLRNVLPSHEWARKGGWNIADCVS HAY
 SoyFDH GHQIVTDKEGP-DSELEKHIPDAHVIITPFHPAYITAEIRIKAKNLELLTAGIGSDHVDLKAANA--AGLTVAEVTGSNVVSAEDELMRLIILMRNFLPGYHQVNGEWNVAGIAHRAI
 AthFDH GHQIVTDKEGP-DCELEKHIPDLHVLITPFHPAYITAEIRIKAKNLKLLTAGIGSDHIDLQAAAA--AGLTVAEVTGSNVVSAEDELMRILILMRNFPVPGYNQVVKGEWNVAGIAYRAY
 PpaFDH GHKYVVTSKDG-PDSELDKELADAHILITPFHPAYITKERIDKAKNLELLVYAGVGDHIDLHAAAE--KGLTVSEVTGSNVVSAEDEVLRLILVLRNFPAGPWKQVSEGGWNVAIVVHHAY

 OpaFDH DIEGKVIATIGAGRIGRVLERLVAFNPKELLYDYQSLSREAEEKVGAR-----RVHDIKELVAQADIVTINCPHLAGSKGLVNAELLKHFKGAWLVTARGAICVAEDVAAAANK
 CboFDH DIEGKIATIGAGRIGRVLERLFPNPKELLYDYQALPKAEAEKVGAR-----RVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVTARGAICVAEDVAAAAL
 SceFDH DLEDKIISTVGAGRIGRVLERLVAFNPKLLDYQELPAEAENRLEASKLFNGRGDIIVQRVEKLEMDVAQSDVVTINCPHLKDRGLSRGLFNKLIISHMKGAYLVNTARGAICVAEDVAAEAVK
 SauFDH ELQHKITIGIFEGRIGLVAERLAFNFVTLQHYDPIHQDHLKSK-----FVSFDELVSSSDAITIHAPLTPETDNLFDKDLVSRMKHSHYLVNTARGKIVNRDALVEALA
 PseFDH DLEAMHVTGVAAGRIGLVAERLAFNFVTLQHYDPIHQDHLKSK-----WHATREDMYPVCDVVTINCPHLPETEMINDETLKFKRGAYLVNTARGKICDRDVARALE
 SoyFDH DLEGKTVTVGAGRIGLLIQLRKPFCN-LLYYDRLRMNTDLEKIGAK-----FEEDLDAMLPKCDVIVINMPLTEQTRGLFKRNIKAKKGGVIVNARGAIMDTQAIADACS
 AthFDH DLEGKITGTVGAGRIGLLIQLRKPFCN-LLYYDRLRQMAPELEKETGAK-----FVEDLNEMLPKCDVIVINMPLTEKTRGMFNKELIGLKKGGVIVNARGAIMERQAVVDAVE
 PpaFDH DLIDRTVGTGGGRIGELMKRLKGFGLKEMLYYDRNSLGAEREXELGCK-----RETDLDITMLSKCDVVVVVVTPLTDQTRGLFNKERIAKMKKGLVLRNARGAIDTEAVKEACE

 OpaFDH SGQLRGYGGDVVYQPA PKDHP RSMANKYGAGNAMTPHYSGSVIDAQVRYAQGTKNILESFFTQKFDYRPQDIILLNGKYKTKSYG-ADK-----
 CboFDH SGQLRGYGGDVYFPQPA PKDHP RDMRNKYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGKHDKK-----
 SceFDH SGKLAGYGGDVMDKQPA PKDHP RTMDNKDHVGNAMTVHISGTS HAQRYAQGVKNILNSYFSKFKFDYRPQDIIVQNGSYATRAYG-QKK-----
 SauFDH SEHLQGYAGDVYQPA PADHP RTMPR-----NAMTVHYSGMTLEAQKRIEDGVKDI LEREFNHE-PFQDKDIIVASGRIAKSYTAK-----
 PseFDH SGRLAGYAGDVYFPQPA PKDHP RTMPY-----NGMTPHISGTTLTAQARYAAGTRELIECFEGR-PIRDEYLI VQGGALAGTGAHYSKGNATGGSEEA AKFKKAV
 SoyFDH SGHVAGYGGDVYFPQPA PKDHP RYMPN-----HAMTPHISGTTIDAQLRYAAGTKMDLRHFKGE-DFFEQNYIVKEGQLASQYR-----
 AthFDH SGHIGGYGGDVYDQPA PKDHP RYMPN-----QAMTPHISGTTIDAQLRYAAGTKMDLRYFKGE-DFFEQNYIVKDELAPQYR-----
 PpaFDH SGHLGGYGGDVYVMAQPA PKDHP RYMPN-----HAMTPHISGTTILDAQKRFAGTKMDIRWLKHE-AFFEQNYIVREGKLASQYL-----

 * * * * *

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей формидегидрогена из разных источников. OpaFDH – *O. parapolymorpha*, CboFDH – *Candida boidinii*, SceFDH – *Saccharomyces cerevisiae*, SauFDH – *S. aureus*, SauFDH, PseFDH – *Pseudomonas* sp. 101, SoyFDH – *Glycine max* (soya), AthFDH – *Arabidopsis thaliana*, PpaFDH – *Physcomitrella patens* (мох). Звездочками выделены консервативные аминокислотные остатки. Курсивом выделены подтвержденные последовательности сигнальных пептидов в AthFDH и SoyFDH. Светло- и темно-серым выделены консервативные участки соответственно в кофермент-связывающем и каталитическом доменах ФДЦ

PpaFDH – единственное известное на настоящий момент исключение. Это первый в мире пример среди ФДГ, когда полноразмерный формиатдегидрогеназный профермент из растений активен и с неотщепленным сигнальным пептидом. Частичная делеция сигнального пептида очень слабо влияет на каталитические параметры (данные в печати), однако выход активного фермента зависит от длины отщепляемой последовательности. На рис. 1 показано, что ФДГ из *S. aureus* имеет в первичной структуре существенные отличия от других ферментов. Степень гомологии у SauFDH с другими бактериальными ФДГ (и с PseFDH) составляет менее 40%.

На рис. 2 представлены кривые плавления исследованных формиатдегидрогеназ. Кроме новых ФДГ приведены данные для ряда ферментов, которые считаются модельными для формиатдегидрогеназ из различных источников. Основным параметром, характеризующим стабильность ФДГ в случае ДСК, считается значение температуры максимума на этих кривых. Из рис. 2 видно, что самой высокой стабильностью обладают бактериальные формиатдегидрогеназы SauFDH и PseFDH. Следом идет ФДГ из термотолерантных дрожжей *O. parapolymorpha* (OpaFDH). Она сильно превосходит по этому параметру высокоомологичную ФДГ из метилотрофных дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH),

которая в настоящее время широко применяется на практике. С учетом того, что и по каталитическим свойствам OpaFDH превосходит CboFDH, можно полагать, что в ближайшем будущем OpaFDH также найдет применение на практике. Самой низкой стабильностью обладает ФДГ из дрожжей *S. cerevisiae* (SceFDH), которая вообще оказалась одной из самых нестабильных среди описанных формиатдегидрогеназ. Две ФДГ растений (SoyFDH и новая PpaFDH) также обладают невысокой температурной стабильностью, однако ФДГ из *A. thaliana* намного стабильнее и даже превосходит по стабильности дрожжевую CboFDH.

Анализ выравнивания аминокислотных последовательностей позволяет выявить ряд закономерностей, которые и обуславливают различия исследованных формиатдегидрогеназ по термостабильности. Высокая температурная стабильность в случае бактериальных формиатдегидрогеназ частично обусловлена наличием дополнительной последовательности на N-конце (рис. 1). Эта дополнительная последовательность содержит до 7 остатков пролина и, как было показано ранее [6], представляет собой неструктурированную жесткую петлю, которая отвечает за обеспечение стабильности в этом регионе белковой глобулы. Как уже отмечалось выше, ФДГ из золотистого стафи-

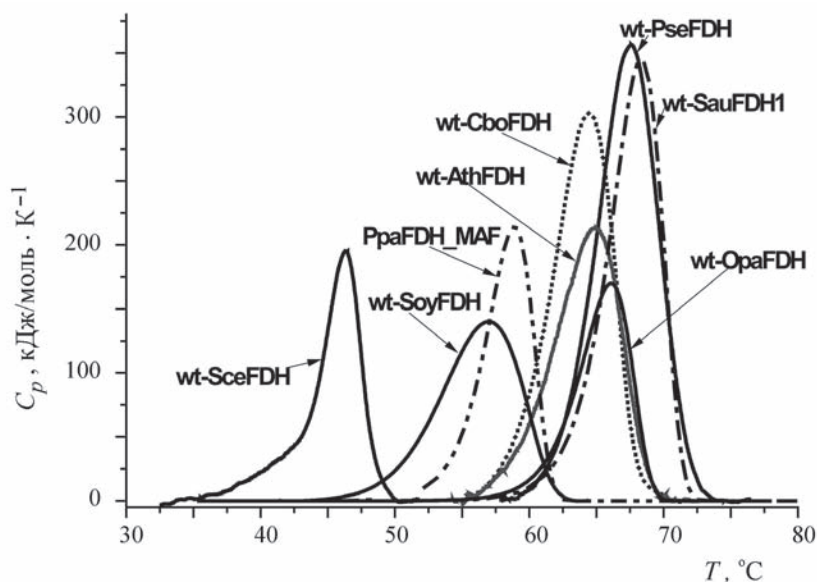


Рис. 2. Кривые плавления для формиатдегидрогеназ дикого типа из разных источников. SauFDH, PseFDH, OpaFDH, CboFDH, SceFDH, AthFDH, SoyFDH и PpaFDH – рекомбинантные формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas* sp. 101, метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* и *Candida boidinii*, пекарских дрожжей, растения *A. thaliana*, сои *G. max* и мха *Physcomitrella patens* соответственно (0,1 М натрий-фосфатный буфер; pH 7,0; концентрация ферментов 1–2 мг/мл; скорость сканирования 1 град/мин)

лококка сильно отличается от всех остальных форматдегидрогеназ по своей аминокислотной последовательности. Различия наблюдаются в том числе и в характерной последовательности Gly(Ala)XGlyXXGly (X – любой остаток) для аденинсвязывающего домена (так называемый «finger print», выделен серым фоном на рис. 1), причем остаток Gly в первом положении обеспечивает более оптимальные углы ϕ и ψ на карте Рамачандрана. Замена A198G в PseFDH (первый аминокислотный остаток в характеристической последовательности) приводит к повышению термостабильности [7].

Интересно также проанализировать влияние на стабильность ферментов состава полуконсервативной последовательности XP(A/K)QP (в нее входит каталитически важный остаток Gln [5]). У большинства форматдегидрогеназ эта последовательность представляет собой XPQR, где X – гидрофобные Phe или Tug. Было показано, что гидрофилизация этого положения приводит к повышению стабильности. Например, замена остатка Phe190 в SoyFDH на отрицательно заряженные остатки Asp и Glu привела к повышению температурной стабильности более чем в 50 раз [8, 9]. Отметим, что в AthFDH дикого типа в этом положении уже изначально находится остаток Asp, в чем, вероятно, и заключается причина высокой стабильности природного фермента. У PpaFDH в этом положении находится остаток аспарагина, который по дан-

ным направленного мутагенеза SoyFDH не обеспечивает высокую стабильность в отличие от ФДГ сои дикого типа.

Последовательность XP(A/K)QP в SceFDH также имеет нестандартный состав – FKQP (рис. 1), т.е. в дополнение к гидрофобному остатку Phe вместо остатка Pro находится остаток Lys, чем можно объяснить низкую температурную стабильность этого фермента. Данные по стабильности для ферментов из бактерий и дрожжей также согласуются с данными о повышении стабильности при замене остатка фенилаланина в положении X на остаток тирозина [10]. Ранее для SoyFDH [9] и для PseFDH [10] было показано, что замена F/Y в этом положении приводит к увеличению температурной стабильности PseFDH, CboFDH и SoyFDH. В этом положении в OpaFDH и SauFDH исходно находится остаток тирозина, чем и можно объяснить более высокую стабильность этих ферментов по сравнению с CboFDH и PseFDH соответственно, у которых в указанном положении стоит остаток фенилаланина.

В заключение хотелось бы отметить, что данные ДСК по стабильности новых ферментов хорошо согласуются с ранее опубликованными результатами по изучению стабильности других ФДГ [8–12], а также с данными по термостабильности, полученными при изучении кинетики термоинактивации при разных значениях температуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00043) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01469а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1537.
2. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. Vol. 23. N 2–3. P. 89.
3. Алексеева А.А., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 11. С. 40.
4. Hummel W.; Kula M.R. // Eur. J. Biochem. 1989. Vol. 184. N 1. P. 1.
5. Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M., Fedorchuk V.V. Savitsky A.P., Dementieva L.A., Lamzin V.S., Mezentzev A.V., Popov V.O. // FEBS Lett. 1996. Vol. 390. N 1. P. 104.
6. Федорчук В.В., Галкин А.Г., Ясный И.Е., Кулакова Л.Б., Рожкова А.М., Филиппова А.А., Тишков В.И. // Биохимия. 2002. Т. 67. N 10. С. 1385.
7. Алексеева А.А., Федорчук В.В., Зарубина С.А., Садыхов Э.Г., Маторин А.Д., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2015. Vol. 7. N 1(24). С. 64.
8. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Tishkov V.I. // PEDS. 2012. Vol. 25. N 11. P. 781.
9. Kargov, I.S., Kleymenov, S.Y., Savin, S.S., Tishkov, V.I., Alekseeva, A.A. // PEDS. 2015. Vol. 28. N 6. P. 171.
10. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. Vol. 80. N 13. P. 1690.
11. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Войнова Н.С., Уланова С.В., Петров А.С., Алексеева А.А., Клейменов С.Ю., Попов В.О., Тишков В.И. // Прикл. биохимия микробиол. 2006. Т. 42. № 3. С. 269.
12. Алексеева А.А., Каргов И.С., Клейменов С.Ю., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2015. Vol. 7. N 3(26). С. 61.

COMPARISON OF THERMAL STABILITY OF NEW FORMATE DEHYDROGENASES WITH DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

A.A. Pometun^{1,2}, S.Yu. Kleymenov^{1,4}, S.A. Zarubina^{2,3}, I.S. Kargov^{1,2,3}, P.D. Parshin^{2,3}, E.G. Sadykhov¹, S.S. Savin^{2,3}, V.I. Tishkov^{1,2,3*}

(¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the RAS; ²Innovations and High Technologies MSU Ltd.; ³Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; ⁴Koltzov Institute of Developmental Biology; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Systematic study of formate dehydrogenases (FDH) from different sources are carried out in our laboratory. Recently, new genes encoded FDH from pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* (SauFDH), methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea parapolyomorpha* (OpaFDH), yeast *Saccharomyces cerevisiae* (SceFDH) and moss *Physcomitrella patens* (PpaFDH) were cloned and expressed in our laboratory. The comparative analysis of thermal stability for new recombinant formate dehydrogenases was made with differential scanning calorimetry. It was shown that two new enzymes – SauFDH and OpaFDH were comparable in stability to FDH from bacterium *Pseudomonas* sp 101. SceFDH showed the lowest thermal stability compare to all described formate dehydrogenases.

Key words: thermal stability, formate dehydrogenase, differential scanning calorimetry.

Сведения об авторах: *Пометун Анастасия Александровна* – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (aapometun@gmail.com); *Клейменов Сергей Юрьевич* – ст. науч. сотр. Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ст. науч. сотр., Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук (s.yu.kleymenov@gmail.com); *Зарубина София Александровна* – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (zarubina.sophia@gmail.com); *Каргов Иван Сергеевич* – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (ikar.xix@gamil.com); *Паршин Павел Дмитриевич* – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (parshin.p04@gmail.com); *Садыхов Эльчин Гусейнович* – зам. директора по инновационной работе, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (elchins@gmail.com); *Савин Святослав Сергеевич* – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук (sav-inslava@gmail.com); *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).