

УДК 577.1:577.15

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа растений

А. А. Алексеева^{1,2,3}, С. С. Савин^{2,3}, В. И. Тишков^{1,2,3*}¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96³Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 05.08.2011 г.

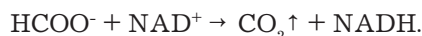
РЕФЕРАТ NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа [КФ 1.2.1.2] (FDH), состоящая из двух идентичных субъединиц и не содержащая простетических групп и ионов металлов, широко распространена в природе. FDH этого типа найдены в различных микроорганизмах (включая патогенные) – в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах, а также в растениях. В отличие от FDH микробного происхождения, находящихся в цитоплазме, растительные FDH локализованы в митохондриях. Впервые формиатдегидрогеназную активность описали еще в 1921 г. именно в растениях, однако до последнего времени растительные FDH были изучены существенно хуже, чем ферменты микроорганизмов. В представленном обзоре рассмотрены последние достижения в области изучения физиологической роли, свойств, структуры и белковой инженерии формиатдегидрогеназ растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА растительная формиатдегидрогеназа, физиологическая роль, свойства, структура, экспрессия, *Escherichia coli*, белковая инженерия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FDH – формиатдегидрогеназа; PseFDH, CboFDH – формиатдегидрогеназы бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и дрожжей *Candida boidinii*; SoyFDH, AthFDH – растительные формиатдегидрогеназы из сои и *Arabidopsis thaliana*.

ВВЕДЕНИЕ

NAD⁺-зависимые формиатдегидрогеназы (FDH) [КФ 1.2.1.2] относятся к группе ферментов, катализирующих окисление формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD⁺ до NADH:



На основании различий в структуре можно выделить две большие группы FDH. В первую группу входят формиатдегидрогеназы анаэробных микроорганизмов и археобактерий. FDH этой группы представляют собой гетероолигомеры со сложной четвертичной структурой и высокой молекулярной массой. Для них характерны наличие в активном центре различных простетических групп (железосерные кластеры, ионы молибдена, вольфрама) и высокая чувствительность к кислороду [1, 2].

Вторую группу образуют NAD⁺-зависимые формиатдегидрогеназы, которые состоят из двух идентичных субъединиц, имеют по два активных центра и не содержат в белковой глобуле ни ионов металлов, ни простетических групп. FDH этой группы принад-

лежат к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот [3]. Реакция окисления формиата, катализируемая FDH этой группы, является простейшим примером дегидрирования карбонильных соединений, так как в каталитическом механизме отсутствует стадия переноса протона(ов), а также какие-либо другие стадии кислотно-основного катализа. Скорость реакции в целом ограничивается скоростью переноса гидрид-иона от субстрата на атом С-4 никотинамидного кольца [4]. Таким образом, FDH служит модельным ферментом для изучения механизма переноса гидрид-иона в активном центре дегидрогеназ, входящих в данное суперсемейство.

Активное и систематическое изучение FDH началось в начале 70-х гг. прошлого века и было в основном посвящено ферментам микроорганизмов. Физиологическая роль микробных FDH различна. Например, в метанолутилизирующих бактериях и дрожжах фермент участвует в снабжении клетки энергией, а в патогенных бактериях и микроскопических грибах FDH является белком стресса. Подробно свойства и белковая инженерия FDH рассмотрены в работах [5, 6].

NAD⁺-зависимые формиадегидрогеназы растений также относятся ко второй группе FDH. Исследования последних лет показали, что в растениях, как и в патогенных микроорганизмах, FDH также входит в число белков стресса, и ее синтез сильно возрастает в условиях засухи, при резком изменении температуры, облучении жестким ультрафиолетом, воздействии химических реагентов [7–9], гипоксии [10], а также патогенных микроорганизмов [11]. Важность физиологической роли этого фермента обуславливает необходимость изучения растительных FDH. В настоящее время нет ни одной публикации, в которой систематизированы данные о растительных FDH. В представленном обзоре рассмотрены основные особенности растительных формиадегидрогеназ, их кинетические свойства и стабильность, а также подробно описана физиологическая роль.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ FDH

Впервые растительную FDH обнаружили в бобах фасоли (*Phaseolus vulgaris*) в 1921 г. [12].

Первая попытка детально описать FDH и оценить роль этого фермента в метаболизме растений была предпринята Дэвисоном в 1951 г. [13] на примере формиадегидрогеназ из семян гороха и фасоли. Считалось, что роль FDH заключается в восстановлении NADH, который впоследствии расходуется на образование этанола, сукцината и глутамата в сопряженных реакциях. Таким образом, впервые была обозначена роль FDH как «поставщика» молекул NADH для удовлетворения различных потребностей клетки. В этой же работе было высказано предположение о механизмах появления формиа в растительной клетке. Согласно первой гипотезе формиа мог образоваться вместе с этанолом и уксусной кислотой в результате анаэробного дыхания. Согласно другой гипотезе формиа мог образоваться в процессе окисления гликолевой кислоты, однако однозначные данные, подтверждающие метаболический путь, в ходе которого образуется формиа, отсутствуют.

Первые опыты по определению локализации FDH в клетках растений были проведены в 1956 г. Оказалось, что формиадегидрогеназная активность присутствует прежде всего в митохондриях [14]. Однако в силу того, что исследуемые образцы были загрязнены другими органеллами, нельзя было однозначно утверждать, что FDH локализована именно в митохондриях. В 1960 г. показали, что FDH находится не только в семенах, но и в других частях растений. Формиадегидрогеназная активность выявлена в листьях капусты и шпината, корнях редиса и репы, почках цветной капусты, а также в плодах тыквы [15]. На листьях шпината показано, что в растительной

клетке существуют как минимум два пути окисления формиа – с помощью FDH в митохондриях и пероксидазы в пероксисомах [16]. Отдельно установили, что при pH > 6 формиа окисляется с помощью FDH в митохондриях, при более кислых значениях pH основную роль в окислении формиа играет пероксидаза в пероксисомах. Позже установили, что в митохондриях FDH представлена не индивидуальной молекулой, а входит в белковый комплекс массой около 200 кДа [17]. В качестве возможных кандидатов на образование таких комплексов рассматриваются глициндекарбоксилаза и фумараза, концентрация которых возрастает синхронно с ростом активности FDH [9].

В ходе систематических исследований показано, что величина формиадегидрогеназной активности очень сильно зависит как от вида растения, так и от органа, в котором содержится фермент [18]. Также выявлена зависимость активности фермента от скорости потребления кислорода растением. Так, в растениях с высоким потреблением кислорода (шпинат, табак и др.) формиадегидрогеназная активность была выше, чем в растениях с низким потреблением (бобовые, зеленый салат и др.) [18]. В этой же работе впервые было высказано предположение, что в результате окисления NADH, полученного с помощью формиадегидрогеназной реакции, запасенная энергия по электрон-транспортной цепи расходуется на образование АТФ, удовлетворяя таким образом энергетическую потребность клетки [18]. К сожалению, большой разброс в активности FDH у растений разного вида не позволяет однозначно ответить на вопрос о роли этого фермента в метаболизме. Взаимосвязь метаболизма формиа и ответа растений на стрессовые воздействия впервые отметили в 1978 г. [19], когда при выращивании ячменя в условиях избыточного увлажнения наблюдали повышенное образование меченого углекислого газа из формиа.

На качественно новый уровень изучение физиологической роли формиадегидрогеназы растений перешло в 1992 г. [20], когда обнаружили, что митохондрии нефотосинтезирующих тканей картофеля содержат неизвестный полипептид с молекулярной массой около 40 кДа, составляющий до 9% всех белков митохондрий. кДНК этого полипептида клонировали в 1993 г., а анализ кодируемой этой кДНК аминокислотной последовательности показал, что она имеет более чем 55% гомологии с FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [21]. Сравнение N-концевых последовательностей природной FDH картофеля и клонированного полипептида выявило в последнем присутствие сигнального пептида из 23 аминокислотных остатков, который обеспечивает транспорт профер-

мента из цитоплазмы в митохондрии. Полипептиды с такой же молекулярной массой найдены в растениях гороха, томата, лука и др., причем содержание FDH в митохондриях нефотосинтезирующих тканей (клубни, корни) было примерно в 8 раз выше, чем в листьях [20]. Кроме того, в растениях, выращенных без доступа света (стебли гороха, листья цикория, корни моркови, клубни батата и др.), количество FDH резко возрастало [20].

В настоящее время опубликованы многочисленные данные в пользу того, что FDH синтезируется в большом количестве в условиях, неблагоприятных для роста растений – при засухе, пониженной температуре, воздействии жесткого ультрафиолетового излучения, химических соединений, при недостатке света, железа, а также при пониженном содержании кислорода, однако скорость ответа сильно зависит от типа воздействия. Например, самый быстрый ответ растений картофеля, выраженный синтезом мРНК, наблюдали при непосредственном повреждении растительной ткани (около 20 мин), в то время как время ответа на другие воздействия составило в среднем 8 ч [7]. В условиях нехватки железа количество мРНК формиадегидрогеназы в корнях ячменя начинало увеличиваться через 1 день и достигало максимума через 14 дней [8, 22], тогда как в листьях синтез формиадегидрогеназы не увеличился. При анаэробном стрессе концентрация мРНК FDH в корнях ячменя повышалась уже через 12 ч и к 48 ч достигала максимального значения. У приморской сосны биосинтез FDH усиливается в условиях засухи [23]. Повышение уровня мРНК FDH отмечено и в растениях *Lotus japonicus*, росших в условиях гипоксии [10].

Экспрессия генов мха *Physcomitrella patens* в ответ на стрессовые воздействия изучена в работе [24]. Растения мха обрабатывали абсцизовой кислотой (гормон, индуцирующий переход растений к периоду покоя и способный тормозить рост стеблей; накапливается осенью в семенах и почках), а также охлаждали до +4°C. Обнаружено, что под действием абсцизовой кислоты увеличивается устойчивость мха к воздействию низких температур, а также изменяется набор экспрессируемых генов. FDH – один из ферментов, ген которых экспрессируется в ответ на абсцизовую кислоту. Оказалось, что уровень экспрессии гена FDH возрастает в течение нескольких часов после обработки абсцизовой кислотой, а также при содержании растений на холоду в течение 24 ч. В отсутствие абсцизовой кислоты ответ на воздействие низких температур развивается гораздо медленнее. Обработка хлоридом натрия в больших концентрациях (0.125 и 0.25 М) и маннита (0.25 и 0.5 М) увеличивала как устойчивость мха к действию низких температур, так и экспрессию ряда генов,

в том числе гена FDH. Таким образом, показано, что и у высших растений, и у мхов формиадегидрогеназа служит белком стресса, и уровень синтеза этого фермента может регулироваться гормонами. Другие растительные гормоны, такие, как ауксин и цитокинин, также влияют на активность FDH у высших растений [25].

Синтез FDH изучен и у *Arabidopsis thaliana*, подвергнутого различным воздействиям. Это первое растение, у которого определена полная нуклеотидная последовательность генома, поэтому во многих случаях *A. thaliana* используется как модельное растение. Растения опрыскивали различными С1-соединениями: метанолом, формальдегидом, формиатом, и проводили Нозерн-блот-анализ, используя кДНК FDH в качестве пробы. Наиболее интенсивная экспрессия гена FDH наблюдалась при обработке формальдегидом или метанолом. Более низкий уровень экспрессии наблюдался в образцах, опрысканных формиатом и деионизованной водой. Не обнаружено повышения экспрессии гена FDH в растениях с обрезанными листьями, а также в контрольном экземпляре. Эти данные позволили сделать вывод о том, что синтез FDH индуцируется в большей степени не субстратом – формиатом, а его восстановленной формой – формальдегидом [26]. Показано также [27], что одноуглеродные соединения – метанол, формальдегид и формиат, индуцируют синтез FDH в листьях растений. Метанол влияет непосредственно на синтез FDH-транскриптов, в то время как его окисленные модификации (формальдегид, формиат) могут служить сигнальными молекулами. Анализ N-концевой области фермента позволил предположить, что FDH может транспортироваться и в хлоропласты. Двойная локализация FDH – и в митохондриях, и в хлоропластах, показана на трансгенных растениях *A. thaliana* и табака, содержащих ген *AthFDH* [28].

Невыясненным остается происхождение формиата в клетках растений, подвергнутого стрессовым воздействиям. Были высказаны предположения, что формиат может синтезироваться в процессе фотодыхания, метаболизма метанола, а также из глиоксилата, образующегося из различных продуктов цикла Кребса [7]. Обсуждалось образование формиата из серина, как это происходит в бактериях [1], поскольку добавление серина приводило к увеличению концентрации FDH в растениях картофеля. В ходе дальнейших экспериментов [29] получен трансгенный картофель, в котором подавлен синтез FDH. Оказалось, что в тканях трансгенных растений накапливается формиат, который не окисляется в дальнейшем до углекислого газа. Показано также, что в условиях засухи в трансгенном картофеле образуется большое количество пролина и его предшественника – глутамата.

Метаболизм формиата и его физиологическая роль хорошо изучены [30]. В фотосинтезирующих тканях картофеля формиат служит главным предшественником всех других углеродсодержащих соединений, и синтезируется он главным образом через ферредоксин-зависимую фиксацию углекислого газа. В других тканях формиат является побочным продуктом фотодыхания и неких ферментативных процессов, его образование, по-видимому, может быть результатом непосредственного восстановления углекислого газа в хлоропластах. В растениях картофеля метаболизм формиата связан с синтезом серина.

Тесная взаимосвязь между биосинтезом формиата и серина существует и у *A. thaliana* [31]. Получены три линии трансгенных растений с повышенной экспрессией FDH. Уровень формиата в трансгенных растениях был практически таким же, как и в *A. thaliana* дикого типа. При добавлении меченого формиата образование радиоактивно меченого углекислого газа в трансгенных растениях происходило гораздо интенсивнее, в то время как накопление серина оставалось на прежнем уровне. Трансгенные растения *A. thaliana* с повышенным уровнем экспрессии гена FDH получены и в работе [32].

Фосфорилирование – важнейший способ регуляции метаболизма. Известно 14 белков митохондрий картофеля, которые могут находиться в фосфорилированном виде [33], в том числе и FDH. Идентифицированы аминокислотные остатки митохондриальной FDH картофеля, которые подвергаются фосфорилированию – Thr76 и Thr333 [34]. Анализ структуры FDH показал, что эти два остатка треонина находятся на поверхности белковой глобулы и могут быть легко доступны для киназ, катализирующих процесс фосфорилирования. Высокий уровень фосфорилирования наблюдается и в субъединице E1- α пируватдегидрогеназы (ПДГ). Фосфорилирование как FDH, так и пируватдегидрогеназы регулируется изменением концентрации NAD^+ , формиата и пирувата, что говорит о сходстве в механизмах регуляции работы этих ферментов. При повышении концентрации NAD^+ , формиата и пирувата уровень фосфорилирования фермента сильно снижается. Предполагается, что пируват может превращаться в формиат в реакции, катализируемой пируват-формиатлиазой (ПФЛ), а далее формиат окисляется при участии FDH.

Как видно из представленных данных, формиат-ион вовлечен в большое количество сложно регулируемых метаболических процессов. Наиболее полную схему участия формиата в метаболизме растений можно найти в работе [11].

Исследования последних лет свидетельствуют, что содержание FDH в митохондриях растений воз-

растает в ответ не только на физические и химические факторы, но и при «биологической атаке». Активацию биосинтеза FDH наблюдали при заражении дуба черешчатого (*Quercus robur*) патогенным грибом *Piloderma croceum* [35], пшеницы – грибом *Blumeria graminis f. sp. tritici* [36] и фасоли (*P. vulgaris*) – грибом *Colletotrichum lindemuthianum* [11]. В геноме фасоли имеются три гена FDH, и их экспрессия регулируется типом воздействия. Предполагают, что синтез FDH у пшеницы индуцируется метанолом в результате воздействия пектинметилэстеразы на пектин. В растениях табака *Nicotiana attenuate*, поврежденных гусеницами *Manduca sexta*, происходит выделение конъюгатов жирных кислот, которые запускают синтез ряда белков, в том числе и FDH [37].

В заключение этого раздела отметим, что формиатдегидрогеназа – это универсальный фермент, вовлеченный в ответ клеток на стресс, вызванный как экзогенными (негативные воздействия окружающей среды), так и эндогенными (нехватка важнейших микроэлементов, воздействие патогенов) процессами. Это свидетельствует о ключевой роли FDH в процессах метаболизма высших растений. Получение мутантных форм FDH, обладающих повышенной каталитической активностью, и встраивание их генов в геном растений вместо генов ферментов дикого типа открывает принципиально новый подход к созданию растений с повышенной устойчивостью к стрессовым воздействиям.

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ FDH

Активное развитие методов мегасеквенирования привело к тому, что практически каждый день публикуется структура генома различных организмов, включая растения. Поиск в базах данных GenBank (GB), EMBL, а также KEGG (<http://www.genome.jp/>) позволил найти нуклеотидные последовательности генов (полные или в виде кДНК) растительных FDH более чем из 70 источников. Кроме того, ряд последовательностей, отсутствующих в банках данных, представлен в работе [11]. В табл. 1 приведены названия растений, а также сокращенные обозначения FDH. При сравнении использовали FDH, характерные для различных микроорганизмов, например, ферменты мезофильных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (наиболее изученная к настоящему времени FDH) и *Moraxella* sp. C2, патогенных *Burkholderia stabilis* и *Bordetella bronchiseptica* RB50 (*Alcaligenes bronchisepticus*), глубоководных некультивируемых морских альфа-протеобактерий и азотфиксирующих бактерий *Sinorhizobium meliloti*, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida boidinii*.

Таблица 1. Источники и сокращенные обозначения форматдегидрогеназ, рассмотренных в данной работе

Организм		FDH	Источник данных
Латинское название	Русское название		
РАСТЕНИЯ			
<i>Antirrhinum majus</i>	Львиный зев	AmaFDH1	KEGG: EST 2545
<i>Aquilegia formosa x Aquilegia pubescens</i>	Лютик	ApuFDH1	KEGG: EST 273
		ApuFDH2	[11]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Резуховидка Таля	AthFDH	EMBL AF208029
<i>Brachypodium distachyon</i>	Коротконожка	BdiFDH1	[11]
<i>Brassica napus</i>	Рапс	BnaFDH1	[11]
		BnaFDH2	KEGG: EST 21261
<i>Brassica oleracea</i>	Капуста	BolFDH1	[11]
<i>Cryptomeria japonica</i>	Японский кедр	CjaFDH1	KEGG: EST 5066
<i>Carica papaya</i>	Папайя	CpaFDH1	KEGG: EST 3924
<i>Citrus reticulata</i>	Мандарин	CreFDH3	KEGG: EST 11052
<i>Citrus sinensis</i>	Апельсин	CsiFDH1	[11]
<i>Coffea canephora</i>	Кофе	CcaFDH1	KEGG: EST 1007
<i>Festuca arundinacea</i>	Овсяница тростниковая	FarFDH1	KEGG: EST 5855
<i>Glycine max</i>	Соя	SoyFDH1	GB AK244764, [38]
		SoyFDH2	GB BT094321
		SoyFDH3	GB AK243932, [38]
		SoyFDH4	GB BT095613
		SoyFDH5	KEGG: EST 19520
<i>Gossypium arboreum</i>	Хлопчатник	GarFDH1	KEGG: EST 1085
<i>Gossypium hirsutum</i>	Хлопчатник	GhiFDH1	KEGG: EST 19680
<i>Gossypium raimondii</i>	Хлопчатник	GraFDH1	KEGG: EST 213
<i>Helianthus annuus</i>	Подсолнечник	HanFDH1	[11]
<i>Hordeum vulgare</i>	Ячмень обыкновенный	HvuFDH1	GB D88272, [8]
<i>Ipomoea batatas</i>	Батат	IbaFDH	EMBL BM878811
<i>Lactuca saligna</i>	Латук солончаковый	LsaFDH1	KEGG: EST 1616
<i>Lotus japonicus</i>	Лядвенец	LjaFDH1	GB FM865900, [10]
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Томат	LesFDH1	GB AJ849378
<i>Malus domestica</i>	Яблоня	MdoFDH	EMBL CN496368
<i>Manihot esculenta</i>	Маниок съедобный, кассава	MesFDH1	KEGG: EST 2788
<i>Medicago truncatula</i>	Люцерна трункатула	MtrFDH1	KEGG: EST 1503
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Ледяник, хрустальная трава	McrFDH	GB BE035085
<i>Nicotiana tabacum</i>	Табак	NtaFDH1	[11]
<i>Oryza sativa Japonica group</i>	Рис японский	OsaFDH_Ja	GB AK065872, [39]
<i>Oryza sativa indica cultivar-group</i>	Рис индийский	OsaFDH_In	GB CT832868, [40]
<i>Oryza sativa</i>	Рис	OsaFDH1	AB019533, [41]
<i>Panicum virgatum</i>	Просо	PviFDH1	KEGG: EST 8602
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Фасоль обыкновенная	PvuFDH1	GB ACZ74695, [42]
<i>Phyllostachys edulis</i>	Бамбук	PedFDH	GB FP093692
<i>Physcomitrella patens</i>	Мох Фискомитрелла раскрытая	PpaFDH	GB XM001768721, [43]
<i>Picea glauca</i>	Ель сизая	PglFDH1	KEGG: EST 2327
<i>Picea sitchensis</i>	Ель ситхинская	PsiFDH	GB EF085163, [44]
<i>Pinus pinaster</i>	Сосна приморская	PpiFDH1	KEGG: EST 174

ОБЗОРЫ

<i>Pinus taeda</i>	Сосна ладанная	PtaFDH1	[11]
		PtaFDH2	KEGG: EST 2972
		PtaFDH3	KEGG: EST 15504
<i>Populus nigra</i>	Тополь черный	PniFDH2	KEGG: EST 7989
<i>Populus tremula</i>	Осина	PtmFDH1	KEGG: EST 4757
<i>Populus trichocarpa</i>	Тополь волосистоплодный	PtrFDH1	GB XM002320465, [45]
<i>Prunus persica</i>	Персик	PpeFDH1	KEGG: EST 4281
<i>Quercus robur</i>	Дуб черешчатый	QroFDH1	GB AJ577266.2, [35]
<i>Raphanus raphanistrum</i> subsp. <i>raphanistrum</i>	Редька дикая	RraFDH1	KEGG: EST 15157
<i>Ricinus communis</i>	Клещевина	RcoFDH1	GB XM_002517292
<i>Saccharum officinarum</i>	Сахарный тростник	SofFDH1	KEGG: EST 18227
<i>Solanum tuberosum</i>	Картофель	StuFDH1	GB Z21493, [21]
<i>Sorghum bicolor</i>	Сорго	SbiFDH1	GB XM002438363, [46]
		SbiFDH2	GB XM002454363, [46]
<i>Taraxacum officinale</i>	Одуванчик обыкновенный	TofFDH1	[11]
<i>Theobroma cacao</i>	Какао	TcaFDH1	KEGG: EST 10274
<i>Triphysaria pusilla</i>	Карликовый совиный клевер	TpuFDH1	KEGG: EST 5550
<i>Triticum aestivum</i>	Мягкая пшеница	TaeFDH1	GB AK332605, [47]
<i>Vigna unguiculata</i>	Коровий горох	VunFDH1	KEGG: EST 6491
<i>Vitis vinifera</i>	Виноград	VviFDH1	GB XM002278408
<i>Yucca filamentosa</i>	Юкка	YfiFDH1	[11]
<i>Zea mays</i>	Кукуруза	ZmaFDH	GB EU967680, [48]
<i>Zingiber officinale</i>	Имбирь	ZofFDH1	KEGG: EST 5316
МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ			
<i>Aspergillus oryzae</i>	Аспергилл, плесневый гриб	AorFDH1	NCBI XM001827498
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Плесневый гриб	MgrFDH	GB AW180713 180985 180259 180189 180073
<i>Penicillium marneffei</i>	Плесневый гриб	PmaFDH1	GB XM002153251
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Патогенный гриб	AjcFDH1	[49]
		AjcFDH3	
ДРОЖЖИ			
<i>Candida boidinii</i>	Метилотрофные	CboFDH	EMBL AF004096
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Пекарские	SceFDH	EMBL Z75296
БАКТЕРИИ			
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	Метилотрофные	PseFDH	[50]
<i>Moraxella</i> sp.	Метилотрофные	MorFDH	EMBL Y13245
<i>Burkholderia stabilis</i>	Патогенные	BstFDH	[51]
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50 (<i>Alcaligenes bronchisepticus</i>)	Патогенные	BbrFDH	EMBL BX640441
Uncultured marine alpha proteobacterium HOT2C01 cosmid clone	Некультивируемые глубоководные морские альфа-протеобактерии	UmaFDH	GB AY372455
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Азотфиксирующие	SmeFDH	GB AE006469, [52]

BdiFDH1	-----MAMWRAAARQLVDRALVGSRAAHTSAG-SKKIVGVF
PedFDH	-----MAMWRAAARQLVDRALVGSRAAHTSAG-SKKIVGVF
FarFDH1	-----MWRAAARHLVDRALGSSAAHTSAG-SKKIVGVF
HvuFDH1	-----MAAMWRAAARQLVDRALVGSRAAHTSAG-SKKIVGVF
TaeFDH1	-----MAAMCRAAARQLVDRALVGSRAAHTSAG-SKKIVGVF
SbiFDH1	-----MAMWRAAARQLVDRALGSSAAHTSAG-SKKIVGVF
SofFDH1	-----MAMWRAAARQLVDRALGSSAAHTSAG-SKKIVGVF
ZmaFDH	-----MAMWRAAARQLVDRALGSSAAHTSAG-SKKIVGVF
PviFDH1	-----MAMWRAAARQLVDRALGARAHTSAG-SKKIVGVF
OsaFDH1	-----MAMWRAAAGHLLGRALGSSAAHTSAG-SKKIVGVF
SbiFDH2	-----MAMWRAAARQLVDRALGSSAAHTSAG-SKKIVGVF
LjaFDH1	-----MAMKRAASSAVRSLLTAPTNPSSSIFSRNLHASGG-KKKIVGVF
MtrFDH1	-----MAMKRAASTLITASSKISSLSPPSSITTRDLHASGG-KKKIVGVF
PvuFDH1	-----MAMKRAAASSAFRSLSSSTFSRNLH-----KKKIVGVF
VunFDH1	-----MAMKRAAASSAIRSLFSSSTFSRNLHVSSE-KKKIVGVF
SoyFDH3	-----MAMKRAAASSVRSLLSSSSSTFTRNHLHASGE-KKKIVGVF
SoyFDH4	-----MAMKRAAASSALRSLSSSTFTRNHLHASGE-KKKIVGVF
SoyFDH1	-----MSNFLLKMSDPTLAQOHLVKVHTTTHETVVTTHNNHQTPSINASGE-KKKIVGVF
SoyFDH2	-----MLNFLLKMSDPTLAQPHLVKHTT-LETVVTTHNNHNRPSINASGE-KKKIVGVF
SoyFDH5	-----MAMKRAAASSLSSSTFTRNHLHASGE-KKKIVGVF
TofFDH1	-----MAIAMKRAAAAAATRAISSANSISIFTRHLHASGG-KKKIVGVF
LsaFDH1	-----MAIAMKSDSGSLLTRHLHASGG-KKKIVGVF
HanFDH1	-----MAMSMAMKRSAAAATRALSSATSSSLLTRDLHASGG-KKKIVGVF
AmaFDH1	-----MAMKRAAVTAVRALTSSAPSSVLTGRLHASPG-SKKIVGVF
TpuFDH1	-----MAMKRAVASTVGAITSSGNPASSVLARYLHASPG-SKKIVGVF
LesFDH1	-----MAMRRVASTAARAIASPSLVTRELOASPG-PKKIVGVF
StuFDH1	-----MAMSRVASTAARAITSPSSLVTRELOASPG-PKKIVGVF
NtaFDH1	-----MAMRRVASTAARAFASSSPSSLVTRELOASPG-SKKIVGVF
VviFDH1	-----MAMMKRVAESAVRAFALGSSSTLTKRLHASPG-SKKIVGVF
MesFDH1	-----MKRAATSARAFSSSFGISGSSALGRHLHASAG-SKKIVGVF
GraFDH1	-----MKQVANSIKAIAIANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
GarFDH1	-----MKQVANSIKAIAIANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
GhiFDH1	-----MKQVANSIKAIAIANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
TcaFDH1	-----MKQVASSAIKALANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
CcaFDH1	-----MAMKRVAASALRAFTSSGNSSTSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
IbaFDH	-----MAMRRVAASGLRAFASYGNPS--LLTRQLHASPG-SKKIVGVF
ApuFDH1	-----MATRKAVVLGAQSLLRSSSTSSPSIRNLHASSE-SKKIVGVF
ApuFDH2	-----MKKAALSTVQSVLSSSSSFTSTRLVRRHSHTSPG-SKKIVGVF
YfiFDH1	-----MAMLRRAAKQAIQTLGSRIPSSSSTFSRHLHASPG-SKKIVGVF
ZofFDH1	-----MAMLRRAAKHAMRALGSRAPDASPFAARMLHASTG-SKKIVGVF
QroFDH1	-----MAGAATSIAIKSVLTKRLHASPG-SKKIVGVF
RcoFDH1	-----MKSYSKRIALWLQRIEDGASDVTEELGVSTINASASAG-SKKIVGVF
BnaFDH2	-----MAMRRVTRAAIRASCVSSSSSGYFARKFNASSGDSKKIVGVF
BolFDH1	-----MAMRRVIRASCVSSSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
CsiFDH1	-----MAMKRVASSAINAFASSGYLRSRFRSRHY-ASSG-RKKIVGVF
MdoFDH	-----MASKGVIASAVRALASSGSSASSTFTTRHLHASGG-SKKIVGVF
PpeFDH1	-----MKGVIASAVRTLLASSGSSASSTFTTRHLHASAG-SKKIVGVF
CpaFDH1	-----MKRAATSAIKAFASQTSFGLSTNFARNHLHASPG-SKKIVGVF
CreFDH3	-----MKRVASSAINAFASSGYLRSRFRSRHY-ASSG-SKKIVGVF
BnaFDH1	-----MAMRRTGAIASCVSSSSSGYFARQFHASSGDSKKIVGVF
AthFDH	-----MAMRQAATKATIRACSSSSSSGYFARQFNASSGDSKKIVGVF
RraFDH1	-----MAMQAARACVSNSSSGFLSRHLHASGGDSKKIVGVF
PpiFDH1	-----MASRRVISAFAAASRRPICSPVSSIASVRELHAPAG-SKKIVGVF
PtaFDH2	-----MASRRSVISAFAAASRRPICSPVSSVRELHAPAG-SNKIVGVF
PtaFDH3	-----MASKRAVISAFAAASRRPICSPVSSIASVRELHAPAG-SNKIVGVF
PtaFDH1	-----MASRRSVISAFAAASRRPICSPVSSVRELHAPAG-SNKIVGVF
PsiFDH	-----MASKRAVISTFRAASRKPIFSSVPLASSVRELHAPAG-SNKIVGVF
PglFDH1	-----MASKRAVISTFRAASRRPICSSVPLASSVRELHAPAG-SNKIVGVF
CjaFDH1	-----MASKRAVKS--AAQ-----AFSPL-SSIRALHAPAG-PNKIVGVF
PtrFDH1	-----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSSSTRLLHASAE-SKKIVGVF
PtmFDH1	-----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSSSTRLLHASAE-SKKIVGVF
PniFDH2	-----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSSSTRLLHASAE-SKKIVGVF
McrFDH	-----MKRATASAIRAVASSSTNSSTILSRNLHASD-SKKIVGVF
AcrFDH1	-----MTFARSITRAALKASPLSRASRTFSSSSAQSQKVLMLV
MgrFDH	-----MVFARSSLRMARPASSLLSQRATASFTRGANLARAGGVRTLTSTSSRQKVLMLV
PmaFDH1	-----MVFSRSPRALQRPATSLLAIPARQWRAPVFGVRTLTASAPRQKVLMLV
AjcfFDH3	-----MGRGLPRSSSAPFPQYNTQSYGLPLRPLSLTRVITLTASPKLQKVLMLV
AjcfFDH1	-----MGRGLPRSSSAPFPQYNTQSYGLPLRPLSLTRVITLTASPKLQKVLMLV
PseFDH	-----MAKVLCLV

Рис. 1. Сигнальные последовательности растительных формиатдегидрогеназ. Здесь и на рис. 2 и 3 обозначения ферментов см. в табл. 1. Названия ферментов из растений выделены зеленым, из микроскопических грибов – розовым, а FDH из бактерий – синим. Подчеркнуты потенциальные специфические последовательности, обеспечивающие транспорт фермента в митохондрии. Остаток, после которого происходит отщепление сигнального пептида, показан зеленым курсивом. Красным выделены консервативные аминокислотные остатки для всех формиатдегидрогеназ.

Отличительной чертой растительных FDH является наличие на N-конце синтезируемого профермента сигнального пептида, который отвечает за транспорт FDH из цитоплазмы в митохондрии [21]. У бактериальных и дрожжевых FDH сигнальные пептиды отсутствуют. Гены FDH ряда патогенных микроскопических грибов также содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Однако в зависимости от состояния клетки хозяина синтезируемая с гена FDH РНК подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого образуются разные мРНК, кодирующие белок как с сигнальным пептидом, так и без него [49].

На рис. 1 представлены сигнальные последовательности формиатдегидрогеназ из различных источников. Подчеркнуты потенциальные специфические последовательности, обеспечивающие транспорт фермента в митохондрии. Остаток, после которого происходит отщепление сигнального пептида, показан зеленым курсивом. У большинства формиатдегидрогеназ это остаток аргинина, в этом положении находятся также остаток серина (FDH сорго SbiFDH1, клещевины RcoFDH1), лизина (виноград VviFDH1), пролина (FDH сои SoyFDH1, SoyFDH2, изоформы 1, 2). Сигнальная последовательность FDH обогащена аминокислотными остатками, содержащими гидроксильные или положительно заряженные группы, и способна образовывать амфифильную α -спираль. Сигнальная последовательность очень консервативна: удаление всего двух N-концевых аминокислот полностью блокирует транспорт фермента в митохондрии [53]. Установлено, что N-концевой мотив MAM позволяет осуществлять быстрый транспорт фермента в митохондрии. На рис. 1 представлены N-концевые последовательности 63 растительных FDH, из них мотив MAM в положении 1–3 имеют 35 ферментов. У ряда растительных FDH на N-конце находятся

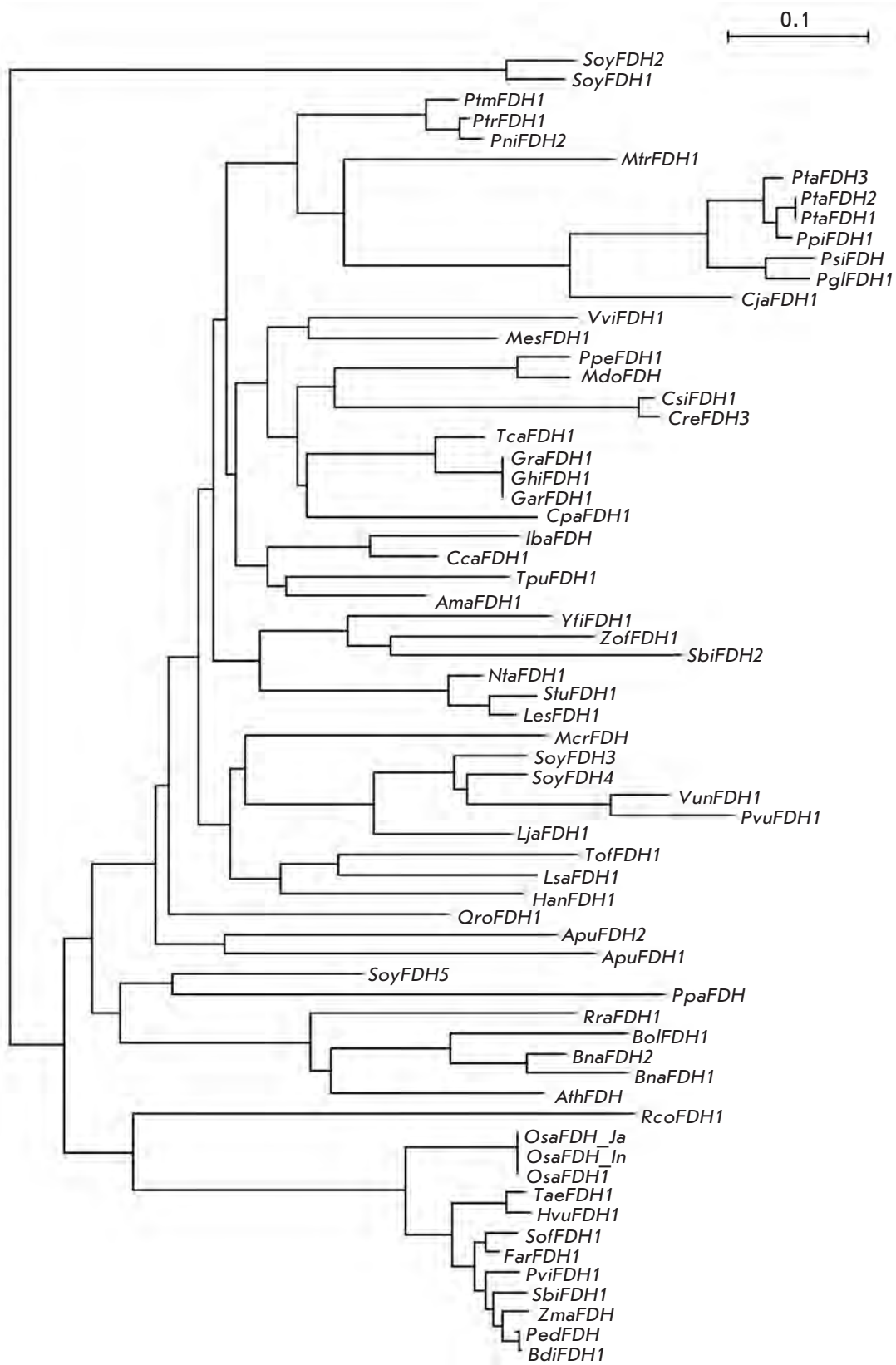


Рис. 2. Филогенетическое дерево N-концевых последовательностей FDH растений.

сходные мотивы: МААМ (у двух) и MAS (у восьми). N-Концевые аминокислотные последовательности изоферментов 1 и 2 FDH сои резко отличаются от последовательностей других растительных формиатдегидрогеназ как по составу (начинается с MSN и MLN), так и по размеру, что говорит о возможной специфической функции этих изоформ FDH. На рис. 1 представлены также N-концевые последовательности FDH грибов *Aspergillus oryzae*, *As. flavus*, *Penicillium marneffeii*, *Mycosphaerella graminicola*, *Ajellomyces capsulatus* (названия отмечены розовым). Приведены две изоформы фермента из *Aj. capsulatus* (AjcFDH1 и AjcFDH3), образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК [49]. Некоторые последовательности содержат также остаток аргинина, по которому может происходить отщепление сигнального пептида (отмечен курсивом и розовым цветом). По-видимому, у микроскопических грибов существует аналогичный механизм транспорта FDH в различные органеллы клетки. Красным на рис. 1 выделены полностью консервативные во всех формиатдегидрогеназах остатки Lys и Val. Для сравнения показана N-концевая последовательность формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101, высокоомологичная N-концевой области AjcFDH3 без сигнального пептида. Из рис. 1 видно, что последовательности сигнальных пептидов в ферментах из растений одного семейства (пасленые: томаты, картофель; злаки: рис, ячмень, рожь и др.) имеют высокую степень гомологии.

У большинства растений FDH находится в митохондриях, но детальное изучение сигнального пептида фермента из *A. thaliana* показало, что фермент может транспортироваться и в хлоропласты. N-Концевая часть этого фермента сильно отличается от сигнальных последовательностей FDH из картофеля,

Рис. 3. Сравнение последовательностей формиатдегидрогеназ из различных источников. Расшифровку обозначений ферментов см. в табл. 1. Названия ферментов из растений выделены зеленым, из микроскопических грибов – розовым, а FDH из бактерий – синим. Подчеркиванием выделены потенциальные специфические последовательности, обеспечивающие транспорт фермента в митохондрии. Нумерация остатков приведена согласно последовательности FDH из *Pseudomonas* sp. 101 (*PseFDH*). Звездочкой и красным отмечены консервативные аминокислотные остатки.

FarFDH1	---MWRRAARHLVDRLALGSAANTHAG--SKKIVGVF YKANEYA
HuFDH1	---MAAMWRAARQLVDRAVGSAAHTSAG--SKKIVGVF YKANEYA
TaeFDH1	---MAAMCRRAARQLVDRAVGSAAHTSAG--SKKIVGVF YKANEYA
ZmaFDH	---MAMWRAARQLVDRAVGSAAHTSAG--SKKIVGVF YKANEYA
OsaFDH1	---MAMWRAARHLGRLALGSAANTHAG--SKKIVGVF YKANEYA
SbiFDH2	---MAMRRRAAQARFAMGRPHVHTAPALSLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
LjFDH1	---MAMKRAASAVSLLTAPHTNPSSTIFSLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
SoyFDH2	---MAMKRAASAVSLLTAPHTNPSSTIFSLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
SoyFDH3	---MAMKRAASAVSLLTAPHTNPSSTIFSLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
AnaFDH1	---MAMKRAAVTAVRALTSAPSVLTLGLHNASFG--SKKIVGVF YKANEYA
TruFDH1	---MAMKRAVATVGAITSQNPASSVLA YLHNASFG--SKKIVGVF YKANEYA
LesFDH1	---MAMKRVASAAARAIAAPSILVFTLEQASFG--PKKIVGVF YKANEYA
ScuFDH1	---MAMKRVASAAARAIAAPSILVFTLEQASFG--PKKIVGVF YKANEYA
VviFDH1	---MAMKRVASAVRALGSGTSGALTLHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
GhiFDH1	---MKQVANSALKAIANSGSSLLLEHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
TcaFDH1	---MKQVASSALKAIANSGSSVLLLEHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
CsaFDH1	---MAMKRVASAVRALGSGTSGALTLHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
AruFDH1	---MAMKRVASAVRALGSGTSGALTLHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
ZoFDH1	---MAMKRAAMKRALGSRAPASFPALHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
QcFDH1	---MAGAATSAIKSVLTLHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
RcFDH1	---MKS YKRRALMQRLEDGASDVTTEIGVINSASAG--SKKIVGVF YKANEYA
BnaFDH2	---MAMRVTRAAIRASCVSSSSGYLAKFNASGDSKIVGVF YKANEYA
Bo1FDH1	---MAMRRVTRASCVSSSTYLA KFNASGDSKIVGVF YKANEYA
MoFDH	---MAKGVILASAVRALAGSSASSTFTLHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
PreFDH1	---MKGVILASAVRALAGSSASSTFTLHLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
CpaFDH1	---MKRAATSAIKAFASOTFSGLSTNFA NLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
AchFDH	---MAMROAKATLRACSSSSSGYPAEONASGDSKIVGVF YKANEYA
PriFDH1	---MASREAVLISA FRAASRRPICSPVSLA YLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
PaFDH2	---MASRSVILSNAPRAASRRPICSPVSLA YLHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
PsiFDH	---MAKRAVILSIPRAASRRPICSPVSLASSYELHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
PtFDH1	---MAMKRAATSAIRAFSSPSSSSGSSYELHNASAG--SKKIVGVF YKANEYA
VpFDH1	---VFAKSLRMAPASSLLSQRATAFTQRGANLARAGGVTLTSSYKSLVLLVLDGHEHA
MgFDH1	---KIVLIVLYDAGKHA
AjFDH1	---SKGKVLIVLYEGKHA
CoFDH	---AKVVCVLYDFPDVGVYPPHYVVDTLVITRYADQATPAPAGPPGFRGELVSVGALGKYLEAEGHCHLVTSDKGG--PDSERFRLPDAVLIISO PFPAY-LTAER
ScFDH	---ATVLCVLYDDPVGGMETAYRDSLPALARYPGGATLPTPKALDF--TGHLLCCVSGELGKLFKLEAGHTLVVADKQG--PGCVFERELPDVADVLIISO PFPAY-LTAER
Be1FDH	---KVLCLVLYDDPVGGMETAYRDSLPALARYPGGATLPTPKALDF--TGHLLCCVSGELGKLFKLEAGHTLVVADKQG--PGCVFERELPDVADVLIISO PFPAY-LTAER
Be2FDH	---KVLCLVLYDDPVGGMETAYRDSLPALARYPGGATLPTPKALDF--TGHLLCCVSGELGKLFKLEAGHTLVVADKQG--PGCVFERELPDVADVLIISO PFPAY-LTAER
UnaFDH	---EMAKVAVLYDDPVGGMETAYRDSLPALARYPGGATLPTPKALDF--TGHLLCCVSGELGKLFKLEAGHTLVVADKQG--PGCVFERELPDVADVLIISO PFPAY-LTAER
SmeFDH	---
PeFDH	---

ячменя и риса. Предполагается, что при некоторых условиях AthFDH, локализованная в хлоропластах, может катализировать обратную реакцию, т.е. превращение углекислого газа в формиат [27]. Использование другого алгоритма для сравнения сигнальных пептидов FDH показало, что все ферменты, кроме FDH из растений томата, могут транспортироваться как в митохондрии, так и в хлоропласты [28]. Анализ сигнальных последовательностей, проведенный с помощью программ Predotar, TargetP и Mitoprot [11], подтвердил, что FDH локализуется преимущественно в митохондриях.

В растениях формиатдегидрогеназа часто представлена несколькими изоформами, или изоферментами, синтез которых определяется состоянием растения. Различия в изоферментном составе FDH в здоровых и больных пальмах *Pericopsis mooniana* используют для отбора деревьев при выборочной вырубке [54]. Полиморфизм характерен и для FDH из миндаля *Prunus dulcis* [55] или *P. amygdalus* [56]. На основании анализа изоформ FDH и нескольких других дегидрогеназ предложен метод идентификации генотипа растения. Как уже отмечалось выше, причиной образования различных изоформ FDH может быть фосфорилирование [34]. В зависимости от степени модификации наблюдалось образование многочисленных форм фермента с *pI* от 6.75 до 7.19. Кроме того, установлено, что дополнительные изоформы FDH картофеля возникают в результате посттрансляционного деамидирования остатков Asn329 и Gln330 [34].

В отличие от самих растительных FDH, уровень гомологии между которыми составляет около 80%, различия в последовательностях сигнальных пептидов гораздо более выражены. Особенно наглядно это видно в случае изоферментов FDH сои. Гомология последовательностей самих изоферментов составляет 98%, в то время как у сигнальных последовательностей не достигает и 40%. На рис. 2 представлено филогенетическое дерево сигнальных пептидов растительных FDH. Видно, что два изофермента FDH сои *Glycine max* – SoyFDH1 и SoyFDH2, образуют отдельную группу. N-Концевая область этих ферментов гораздо длиннее, чем у FDH из других растений (рис. 1), и сильно отличается по аминокислотному составу. Далее от дерева отделилась большая группа семейства злаков. Это ферменты риса (OsFDH), пшеницы (TaeFDH), ячменя (HvuFDH), сахарного тростника, бамбука и других. Большая группа представлена ферментами растений семейства капустных (крестоцветных): редьки (RraFDH), капусты (VolFDH), рапса (BnaFDH), а также *A. thaliana* (AthFDH). Другие группы образуют белки астровых, бобовых, пасленовых, мальвовых, сосновых и иво-

вых. Как уже отмечалось выше, пять изоферментов FDH сои не образуют отдельную группу. Поскольку сигнальный пептид отвечает прежде всего за транспорт фермента внутри клетки, можно предположить, что разные изоферменты FDH сои транспортируются в разные органеллы.

На рис. 3 представлено выравнивание некоторых известных на настоящий момент полных последовательностей растительных FDH, для сравнения приведены также последовательности ряда аналогичных ферментов микроорганизмов. Абсолютно консервативные участки выделены красным, остатки, повторяющиеся только в растительных FDH, отмечены зеленым. Важное отличие бактериальных ферментов от растительных состоит в наличии жесткой N-концевой петли. Этот участок покрывает значительную часть субъединицы фермента. Вероятно, его взаимодействие с другими аминокислотными остатками является причиной более высокой термостабильности бактериальных ферментов по сравнению с растительными. Кроме того, у FDH микробного происхождения C-концевая область длиннее, чем у ферментов растений. В то же время в остальной части аминокислотной последовательности отчетливо прослеживается разделение FDH по гомологии на две группы. В первую входят ферменты бактерий и растений, а во вторую – дрожжей и микроскопических грибов.

Ферменты растений высокогомологичны между собой (около 80%), гомология между бактериальными и растительными FDH составляет около 50%.

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

В растениях FDH локализованы в митохондриях, поэтому они составляют малую часть всех растворимых белков клетки, и выделение фермента непосредственно из растений представляет трудоемкую и длительную процедуру. Как правило, растительные FDH не отличаются высокой стабильностью, что приводит к достаточно существенной инактивации фермента в процессе выделения. В результате удельная активность полученных препаратов FDH намного ниже, чем можно было ожидать (табл. 2). Впервые очищенная растительная FDH была получена в 1951 г. из гороха и фасоли [13]. В 1983 г. в достаточных количествах FDH выделили из бобов сои *G. max*, что позволило определить аминокислотный состав растительной формиатдегидрогеназы [57].

Первую кДНК растительной FDH клонировали из картофеля в 1993 г. [21]. В 1998 г. клонировали кДНК FDH из ячменя [8], а в 2000 г. – из риса [41] и *A. thaliana* [26, 27]. Созданы трансгенные растения *A. thaliana* и табака, экспрессирующие AthFDH

[28], однако выход фермента был не очень высоким. Экспрессия полноразмерной кДНК FDH картофеля в клетках *Escherichia coli* приводила к образованию нерастворимых телец включения [21].

Впервые активную и растворимую рекомбинантную растительную формилдегидрогеназу получили в клетках *E. coli*, в которых экспрессировали кДНК FDH риса [41], однако уровень белка был очень низким – около 0.01% от всех растворимых белков клетки. В нашей лаборатории созданы штаммы *E. coli* – суперпродуценты активных FDH из *A. thaliana* (AthFDH) и сои *G. max* (изофермент SoyFDH2), в которых содержание фермента достигало 40% от всех растворимых белков клетки [58] (ген FDH сои любезно предоставлен профессором Н. Лабру (N. Labrou) из Афинского сельскохозяйственного университета, Греция, а ген FDH *A. thaliana* – профессором Дж. Марквеллом (J. Markwell) из Университета штата Небраска в Линкольне, США). В клетках *E. coli* отсутствует система транспорта в митохондрии, поэтому, чтобы получить «природный» фермент нам пришлось удалить из кДНК последовательности, кодирующие сигнальный пептид [58]. После оптимизации условий культивирования выход рекомбинантных FDH *A. thaliana* и сои *G. max* достигал 500–600 мг/л среды [6]. Разработана методика, которая за одну хроматографическую стадию позволяла получать несколько сотен миллиграмм гомогенного препарата FDH за одно выделение. Таким образом, были созданы все условия для проведения систематических исследований FDH из *A. thaliana* и сои *G. max*, включая эксперименты по генетической инженерии и определению структуры с помощью рентгеноструктурного анализа. Успешно проведены и эксперименты по экспрессии в клетках *E. coli* FDH из *L. japonicus* [10].

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОРМИЛДЕГИДРОГЕНАЗ РАСТЕНИЙ

В табл. 2 суммированы кинетические свойства природных и рекомбинантных растительных FDH. Для сравнения приведены характеристики наиболее изученных бактериальных и дрожжевых ферментов. Из данных, приведенных в табл. 2, можно сделать несколько важных выводов:

1. На примере FDH из *A. thaliana* хорошо видно, что многостадийное выделение природного фермента сопровождается значительной потерей активности. Удельная активность препаратов, даже полученных из трансгенных растений, в несколько раз меньше, чем у рекомбинантной AthFDH, экспрессируемой в клетках *E. coli*. Следует отметить, что AthFDH относится к стабильным FDH. По термостабильности она даже превосходит FDH *Moraxella* sp. C2 и дрож-

жей *C. boidinii* (табл. 3). Очевидно, что степень инактивации других менее стабильных FDH (особенно в случае SoyFDH), выделяемых из природных источников, будет выше. Это необходимо учитывать при анализе формилдегидрогеназной активности в растениях.

2. Удельная активность рекомбинантных AthFDH и SoyFDH сравнима с активностью формилдегидрогеназ микроорганизмов, хотя она уступает FDH метилотрофных бактерий и пекарских дрожжей. Как уже отмечалось выше, в ходе выделения может происходить частичная инактивация ферментов, поэтому расчет каталитической константы на основе величин удельной активности и молекулярной массы может давать заниженные значения k_{cat} . Это особенно важно в случае SoyFDH, термостабильность которой намного ниже, чем у других FDH (см. ниже раздел по термостабильности). Поэтому нами разработана методика определения концентрации активных центров рекомбинантной SoyFDH, основанная на тушении собственной флуоресценции фермента при его титровании азид-ионом в присутствии кофермента NAD^+ [64]. Азид-ион является сильным конкурентным ингибитором SoyFDH ($K_i = 3.6 \times 10^{-7}$ М), поэтому в условиях, обеспечивающих эквимольное связывание фермента и ингибитора, наблюдается линейная зависимость тушения флуоресценции FDH от концентрации азид-иона. Определенная из этих экспериментов величина k_{cat} фактически совпала с величиной, рассчитанной по удельной активности и молекулярной массе. Полученные данные свидетельствуют, что, несмотря на низкую термостабильность, SoyFDH, выделяемая по разработанной нами методике, не инактивируется. В настоящее время эта методика активно используется для определения величин k_{cat} мутантных форм SoyFDH.

3. Растительные FDH имеют гораздо более низкие значения констант Михаэлиса как по формилу, так и по коферменту NAD^+ , чем бактериальные и дрожжевые ферменты. Это очень важно для практического применения FDH. В настоящее время рекомбинантные FDH *Pseudomonas* sp. 101 и *C. boidinii*, химическая и температурная стабильность которых улучшены методами белковой инженерии, используются для регенерации восстановленного кофермента ($NADH$ или $NADPH$) в процессах синтеза хиральных соединений с помощью дегидрогеназ [6].

4. Практически все изученные FDH высокоспецифичны по отношению к коферменту NAD^+ . Их каталитическая эффективность в реакции с NAD^+ выше, чем в реакции с $NADP^+$ от 2500 (PseFDH) до 3 миллиардов (SceFDH) раз. Исключение составляет описанная совсем недавно FDH из патогенных бактерий *Burkholderia stabilis*, которая в 26 раз более эффек-

Таблица 2. Кинетические параметры форматдегидрогеназ из различных источников

Препарат FDH	Удельная активность, ед./мг	k_{cat} , с ⁻¹	K_M (NAD ⁺), мкМ	K_M (формат), мМ	K_M (NADP ⁺), мМ	$\frac{k_{cat}^{NADP^+}}{K_M^{NADP^+}}$ / $\frac{k_{cat}^{NAD^+}}{K_M^{NAD^+}}$	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i> , нативная, после аффинной хроматографии	нд*	нд	65	10	нд	нд	[27]
<i>A. thaliana</i> , нативная, из митохондрий	нд	нд	76	11	нд	нд	[59]
<i>A. thaliana</i> , рекомбинантная из трансгенного табака	1.3	0.87	78	11	нд	нд	[59]
<i>A. thaliana</i> , рекомбинантная из трансгенного табака + термообработка 5 мин при 60°C	0.1	0.07	35	3.3	нд	нд	[59]
<i>A. thaliana</i> , из митохондрий листьев	1.9	1.27	34	1.4	нд	нд	[60]
<i>A. thaliana</i> , рекомбинантная из <i>E. coli</i>	6.5	3.8	20	2.8	10	5.0×10^{-5}	[58]
Горох (семена) <i>Pisum sativum</i>	нд	нд	22	2 [61] 1.67; 6.25 [62]	нд	нд	[61, 62]
Бобы Маш, <i>Phaseolus aureus</i> , нативная	нд	нд	7.2	1.6	нд	нд	[63]
Соя, <i>Glycine max</i> , нативная	нд	нд	5.7	0.6	нд	нд	[57]
Соя, <i>G. max</i> , рекомбинантная	4.0	2.83 [64]	13.2	1.5	1	8.7×10^{-4}	[58, 64, 76]
<i>Lotus japonicus</i>	нд	1.2 (NAD ⁺) 0.005 (NADP ⁺)	25.9	6.1	29.5	3.7×10^{-6}	[10]
Шпинат, <i>Spinacia oleracea l.</i> , из листьев	нд	нд	нд	1.7	нд	нд	[16]
Картофель <i>Solanum tuberosum</i>	нд	нд	19	0.54	нд	нд	[29]
<i>C. boidinii</i> , рекомбинантная, дикого типа	6.3	3.7	37	5.9	нд	нд	[65]
<i>C. metillica</i> , дикого типа	2.1	1.4	55	нд	нд	$< 4 \times 10^{-6}$	[66]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , рекомбинантная	10	6.5	36	5.5	нд	$< 3.3 \times 10^{-10}$	[67, 68]
<i>Burkholderia stabilis</i>	нд	1.66 (NAD ⁺) 4.75 (NADP ⁺)	1430	55.5	0.16	25.9	[51]
<i>Moraxella</i> sp. C2, рекомбинантная	10.0	7.3	80	7.5	нд	нд	[6]
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	10.0	7.3	60	7	>200	4.2×10^{-4}	[6]

*нд – нет данных.

тивна в реакции с NADP^+ , чем с NAD^+ [51]. Отметим, что мутантная PseFDH, коферментная специфичность которой сменилась с NAD^+ на NADP^+ , получена еще в 1993 г. [6, 68], и такой фермент успешно использовали для регенерации NADPH [69, 70]. Для получения NADP^+ -специфичного фермента очень привлекательной выглядит SoyFDH, которая имеет самое низкое значение K_m по NADP^+ среди всех NAD^+ -специфичных FDH дикого типа [58] (табл. 2).

ТЕМПЕРАТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

До получения рекомбинантных AthFDH и SoyFDH в клетках *E. coli* систематические исследования термостабильности растительных FDH не проводили. Согласно [59], после инкубации трансгенной AthFDH в течение 5 мин при 60°C значения K_m по формиату и NAD^+ снижаются, однако величина удельной активности упала при этом в 13 раз. Нами проведены систематические исследования температурной стабильности рекомбинантных AthFDH и SoyFDH с использованием двух подходов – определения кинетики термоинактивации и дифференциальной сканирующей калориметрии [71, 72]. Оказалось, что термоинактивация растительных FDH, как и их аналогов из бактерий и дрожжей, протекает по мономолекулярному механизму. Зависимости падения активности AthFDH и SoyFDH от времени описываются кинетикой реакции первого порядка, а величина наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка не зависит от концентрации фермента. AthFDH и SoyFDH очень сильно отличаются по тер-

мостабильности. AthFDH теряла 50% активности за 20 мин при 59.5°C , а SoyFDH – при 52.8°C . Разница почти в 7°C соответствует разнице в константах скорости инактивации более чем в 1000 раз. Фактически AthFDH уступает по термостабильности только FDH *Pseudomonas* sp. 101 (63.0°C , самая стабильная FDH из известных) [6] и *Staphylococcus aureus* (62.0°C) и превосходит все остальные известные микробные формиатдегидрогеназы. SoyFDH, наоборот, уступает по стабильности всем известным FDH за исключением фермента из пекарских дрожжей, у которого существует другой механизм инактивации. Зависимости константы скорости инактивации AthFDH и SoyFDH от температуры описываются уравнением теории активированного комплекса. Рассчитанные значения энтальпии ΔH^\ddagger - и энтропии ΔS^\ddagger -активации приведены в табл. 3. Видно, что термостабильность формиатдегидрогеназ хорошо коррелирует со значениями ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger . Наиболее высокие значения характерны для самой стабильной PseFDH, а наиболее низкие – для SoyFDH.

Результаты экспериментов по изучению термостабильности растительных FDH с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии хорошо согласуются с данными по кинетике инактивации. В табл. 3 приведены значения температуры и теплоты фазового перехода. Для всех изученных FDH характерна высокая кооперативность процесса денатурации. PseFDH имеет самое большое значение теплоты плавления, у SoyFDH это значение в 2.5 раза меньше. Температура плавления AthFDH выше, чем у CboFDH и MorFDH.

Таблица 3. Параметры термоинактивации формиатдегидрогеназ из разных источников

Источник FDH	Кинетика термоинактивации*		Дифференциальная сканирующая калориметрия* [72]		
	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/ (моль · град)	C_p , кДж/моль	T_m , $^\circ\text{C}$	$T_{1/2}$, $^\circ\text{C}$
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	540 [6]	1320 [6]	2060	67.6	5.4
<i>Moraxella</i> sp. C2	нд**	нд**	1830	63.4	4.9
<i>Candida boidinii</i>	480 [77]	1250 [77]	1730	64.4	5.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	420 [67]	нд	820	46.4	3.2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	490 [6]	1200 [6]	1330	64.9	5.9
<i>Glycine max</i>	370 [76]	860 [76]	820	57.1	7.5

*Все измерения проводили в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0.

**Нет данных.

В настоящее время нами проводятся эксперименты по повышению термостабильности рекомбинантной SoyFDH методами генной инженерии.

ХИМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

FDH активно используется в процессах синтеза оптически активных соединений, катализируемых дегидрогеназами. В этих процессах очень большую роль играет операционная стабильность, т.е. время работы фермента. В условиях биокаталитического процесса инактивация FDH связана или с окислением кислородом, или с химической модификацией сульфгидрильных групп фермента. Операционная стабильность PseFDH и CboFDH была повышена с помощью направленного мутагенеза двух остатков Cys [6, 65]. Как уже отмечалось выше, в растениях синтез FDH усиливается при различных стрессовых воздействиях. В этих же условиях, как правило, в клетке резко возрастает концентрация активных форм кислорода (супероксид-радикалы, пероксид водорода и др.). Следовало ожидать, что для обеспечения высокой активности при стрессе растительные FDH должны быть гораздо более устойчивыми к воздействию таких агентов, чем формиатдегидрогеназы, функционирующие в нестрессовых условиях. Для проверки этой гипотезы изучили кинетику инактивации под действием пероксида водорода рекомбинантных AthFDH, SoyFDH, PseFDH, а также FDH из *S. aureus* дикого типа (SauFDH) и трех мутантных PseFDH, в которых заменили один или два остатка Cys. FDH из *S. aureus* также является белком стресса, поскольку ее биосинтез возрастает в 20 раз

при переходе стафилококков от планктонного роста к образованию биопленок [73]. Оказалось, что скорость инактивации AthFDH и SoyFDH под действием H_2O_2 примерно одинакова, и она в 18 раз ниже, чем у PseFDH дикого типа. В этих же условиях стабильность SauFDH была в 6 раз выше, чем у растительных ферментов [74]. PseFDH с такой же стабильностью, как у SoyFDH, удалось получить только после двойной замены Cys145Ser/Cys255/Ala. Таким образом, показано, что FDH растений и бактерий, синтезируемые при стрессовых воздействиях, действительно обладают более высокой химической стабильностью, чем формиатдегидрогеназы, синтез которых индуцируется другими факторами. Кроме того, изучение термоинактивации формиатдегидрогеназ в присутствии пероксида водорода может использоваться для сравнительной оценки химической стабильности FDH *in vivo*.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ РАСТЕНИЙ

FDH не относится к кристаллографически очень хорошо изученным ферментам. До недавнего времени в банке трехмерных структур белков PDB были депонированы структуры FDH только из трех источников – бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C2 (свободные ферменты и в тройном комплексе с NAD^+ и азидом) и дрожжей *C. boidinii* (структуры двух мутантных форм апо-фермента). В случае формиатдегидрогеназ свободный фермент находится в «открытой» форме. При образовании тройного комплекса FDH– NAD^+ –азид, структура которого считается аналогом структуры фермента в переход-

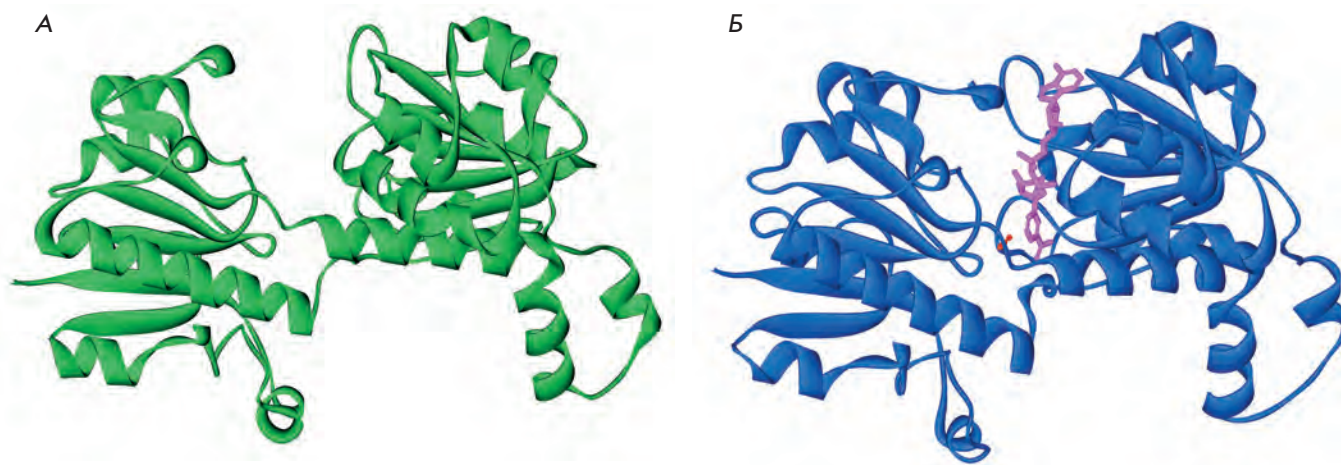


Рис. 4. Структуры апо- (А) и холо- (Б) форм FDH из *A. thaliana*. Рисунки получены с использованием структур 3JTM и 3N7U соответственно. Молекулы NAD^+ и азид-иона показаны в структуре холо-формы маджентой и красным соответственно.

ном состоянии, происходит значительная компактизация белковой глобулы, и FDH переходит в «закрытое» состояние. Разработка высокоэффективной системы экспрессии AthFDH и SoyFDH в клетках *E. coli* позволила приступить к их кристаллизации и определению структуры. В настоящее время решены структуры AthFDH как в открытой, так и в закрытой конформации (3NAQ и 3N7U, разрешение 1.7 и 2 Å соответственно). Для получения структуры AthFDH в открытой конформации с более высоким разрешением (3JTM, 1.3 Å) кристаллы фермента были получены в космосе [75]. На рис. 4 представлены структуры апо- и холо-AthFDH (открытая и закрытая конформации соответственно). Более подробный анализ этих структур будет приведен в отдельных статьях. Как на земле, так и в космосе получены кристаллы только тройного комплекса SoyFDH–NAD⁺–азид FDH сои *G. max*. Структуры этих комплексов определены с разрешением 1.9 Å, готовится их депонирование в банк структур PDB.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опубликованные и наши собственные данные свидетельствуют, что в растениях FDH играют очень важную роль, особенно при ответе на стрессовые воздействия. Регуляция биосинтеза и физиологическая роль FDH многообразны, сложны и до конца так и не выяснены. Систематическое изучение структуры и функции этих ферментов находится только

в начальной стадии. Результаты таких исследований представляют очень большой интерес для фундаментальной науки, и имеют важное практическое значение. Получение мутантных форм FDH с высокой активностью открывает новый путь к созданию растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям, поскольку при таком же уровне экспрессии, как и у FDH дикого типа, более активные мутантные ферменты будут более эффективно снабжать клетку энергией, необходимой для преодоления неблагоприятных последствий стресса. FDH из сои также рассматривается как исключительно перспективная для создания высокоэффективного биокатализатора регенерации NAD(P)H в процессах синтеза оптически активных соединений с помощью дегидрогеназ. Природный фермент отличается высокой операционной стабильностью и среди известных FDH имеет одну из самых низких величин константы Михаэлиса как по NAD⁺, так и по формиату. Однако для практического внедрения SoyFDH необходимо повысить ее каталитическую активность и термостабильность. В этом направлении нами сейчас ведутся активные исследования. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства образования и науки РФ
(госконтракт № 16.512.11.2148) и Российского
фонда фундаментальных исследований
(грант № 11-04-00920).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Родионов Ю.В. // Успехи микробиологии. 1982. Т. 16. С. 104–138.
2. Ferry J.G. // FEMS Microbiol. Rev. 1990. V. 7. P. 377–382.
3. Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 192. P. 182–188.
4. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Biochimie. 1989. V. 71. № 4. P. 551–557.
5. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. С. 1537–1554.
6. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. P. 89–110.
7. Hourton-Cabassa C., Ambard-Bretteville F., Moreau F., Davy de Virville J., Remy R., Colas des Francs-Small C. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 627–635.
8. Suzuki K., Itai R., Suzuki K., Nakanishi H., Nishizawa N.-K., Yoshimura E., Mori S. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 725–732.
9. Thompson P., Bowsher C.G., Tobin A.K. // Plant Physiol. 1998. V. 118. P. 1089–1099.
10. Andreadeli A., Flemetakis E., Axarli I., Dimou M., Udvardi M.K., Katinakis P., Labrou N.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. P. 976–984.
11. David P., Colas des Francs-Small C., Seignac M., Thareau V., Macadre C., Langin T., Geffroy V. // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. P. 87–103.
12. Thunberg T. // Arch. Physiol. Biochem. 1921. V. 18. P. 601–606.
13. Davison D.C. // Biochem. J. 1951. V. 49. P. 520–526.
14. Davies D.D. // J. Exp. Bot. 1956. V. 7. P. 203–218.
15. Mazelis M. // Plant Physiol. 1960. V. 35. P. 386–391.
16. Halliwell B. // Biochem. J. 1974. V. 138. P. 77–85.
17. Jansch L., Kruff V., Schmitz U.K., Braun H.-P. // Plant J. 1996. V. 9. № 3. P. 357–368.
18. Oliver D.J. // Plant Physiol. 1981. V. 68. P. 703–705.
19. Hanson A.D., Nelsen C.E. // Plant Physiol. 1978. V. 62. P. 305–312.
20. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Darpas A., Sallantin M., Huet J.-C., Pernollet J.-C., Remy R. // Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 273–278.
21. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Remy R. // Plant Physiol. 1993. V. 102. P. 1171–1177.
22. Herbig A., Giritch A., Horstmann C., Becker R., Balzer H.-J., Baumlein H., Stephan U.W. // Plant Physiol. 1996. V. 111. P. 533–540.
23. Dubos C., Plomion C. // Plant Mol. Biol. 2003. V. 51. P. 249–262.
24. Minami A., Nagao M., Arakawa K., Fujikawa S., Takezawa D. // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 475–483.
25. Yin L., Lan Y., Zhu L. // Plant Mol. Biol. 2008. V. 68. P. 597–617.
26. Fukusaki E., Ikeda T., Shiraishi T., Nishikawa T., Kobayashi A. // J. Biosci. Bioeng. 2000. V. 90. P. 691–693.
27. Olson B.J., Skavdahl M., Ramberg H., Osterman J.C., Markwell J. // Plant Sci. 2000. V. 159. P. 205–212.

28. Herman P.L., Ramberg H., Baack R.D., Markwell J., Osterman J.C. // *Plant Sci.* 2002. V. 163. P. 1137–1145.
29. Ambard-Bretteville F., Sorin C., Rebeille F., Hourton-Cabassa C., Colas des Francs-Small C. // *Plant Mol. Biol.* 2003. V. 52. P. 1153–1168.
30. Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Kleczkowski L.A. // *Plant Physiol. Biochem.* 1999. V. 37. № 7–8. P. 503–513.
31. Li R., Moore M., King J. // *Plant Cell Physiol.* 2003. V. 44. № 3. P. 233–241.
32. Perales M., Eubel H., Heinemeyer J., Colaneri A., Zabaleta E., Braun H.P. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 350. P. 263–277.
33. Bykova N.V., Egsgaard H., Møller I.M. // *FEBS Lett.* 2003. V. 540. P. 141–146.
34. Bykova N.V., Stensballe A., Egsgaard H., Jensen O.N., Møller I.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 26021–26030.
35. Kruger A., Peskan-Berghofer T., Frettinger P., Herrmann S., Buscot F., Oelmüller R. // *New Phytol.* 2004. V. 163. P. 149–157.
36. Bruggmann R., Abderhalden O., Reymond P., Dudler R. // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 58. P. 247–267.
37. Giri A.P., Wunsche H., Mitra S., Zavala J.A., Muck A., Svatos A., Baldwin I.T. // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 1621–1641.
38. Umezawa T., Sakurai T., Totoki Y., Toyoda A., Seki M., Ishiwata A., Akiyama K., Kurotani A., Yoshida T., Mochida K., et al. // *DNA Res.* 2008. V. 15. P. 333–346.
39. Kikuchi S., Satoh K., Nagata T., Kawagashira N., Doi K., Kishimoto N., Yazaki J., Ishikawa M., Yamada H., Ooka H., et al. // *Science.* 2003. V. 301. P. 376–379.
40. Liu X., Lu T., Yu S., Li Y., Huang Y., Huang T., Zhang L., Zhu J., Zhao Q., Fan D., et al. // *Plant Mol. Biol.* 2007. V. 65. P. 403–415.
41. Shiraishi T., Fukusaki E., Kobayashi A. // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. V. 89. P. 241–246.
42. David P., Chen N.W.G., Pedrosa-Harand A., Thareau V., Seignac M., Cannon S.B., Debouck D., Langin T., Geffroy V. // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 1048–1065.
43. Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.-F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., et al. // *Science.* 2008. V. 319. № 5859. P. 64–69.
44. Ralph S.G., Chun H.J., Kolosova N., Cooper D., Oddy C., Ritland C.E., Kirkpatrick R., Moore R., Barber S., Holt R.A., et al. // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. P. 484.
45. Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., et al. // *Science.* 2006. V. 313. P. 1596–1604.
46. Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., et al. // *Nature.* 2009. V. 457. № 7229. P. 551–556.
47. Kawaura K., Mochida K., Enju A., Totoki Y., Toyoda A., Sakaki Y., Kai C., Kawai J., Hayashizaki Y., Seki M., et al. // *BMC Genomics.* 2009. V. 10. P. 271.
48. Alexandrov N.N., Brover V.V., Freidin S., Troukhan M.E., Tatarinova T.V., Zhang H., Swaller T.J., Lu Y.P., Bouck J., Flavell R.B., et al. // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69. P. 179–194.
49. Hwang L., Hocking-Murray D., Bahrami A.K., Andersson M., Rine J., Sil A. // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 14. P. 2314–2326.
50. Тишков В.И., Галкин А.Г., Егоров А.М. // *Докл. АН СССР.* 1991. Т. 317. С. 745–748.
51. Hatrongjit R., Packdibamrung K. // *Enz. Microb. Technol.* 2010. V. 46. P. 557–561.
52. Barnett M.J., Fisher R.F., Jones T., Komp C., Abola A.P., Barloy-Hubler F., Bowser L., Capela D., Galibert F., Gouzyet J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 17. P. 9883–9888.
53. Ambard-Bretteville F., Small I., Grandjean O., Colas des Francs-Small C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 311. P. 966–971.
54. Weerasinghe P.A., Weerasekera M.L.M.C., van Holm L.H.J. // *Biologia Plantarum.* 1999. V. 42. P. 541–547.
55. Colic S., Milatovic D., Nikolic D., Zec G. // *Hort. Sci. (Prague).* 2010. V. 37. P. 56–61.
56. Colich S., Milatovich D., Nikolich D., Zec G. // *Bulgarian J. Agricul. Sci.* 2009. V. 15. P. 552–556.
57. Farinelli M.P., Fry D.W., Richardson K.E. // *Plant Physiol.* 1983. V. 73. P. 858–859.
58. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е., Войнова Н.С., Алексеева А.А., Петров А.С., Тишков В.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2006. Т. 47. № 1. С. 31–34.
59. Baack R.D., Markwell J., Herman P.L., Osterman J.C. // *J. Plant Physiol.* 2003. V. 160. P. 445–450.
60. Li R., Ziola B., King J. // *J. Plant Physiol.* 2000. V. 157. P. 161–167.
61. Uotila L., Koivusalo M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. V. 196. P. 33–45.
62. Ohyama T., Yamazaki I. // *J. Biochem.* 1975. V. 77. P. 845–852.
63. Peacock D., Boulter D. // *Biochem. J.* 1970. V. 120. P. 763–769.
64. Романова Е.Г., Алексеева А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2010. Т. 51. № 3. С. 156–159.
65. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 1280–1289.
66. Karaguler N.G., Sessions R.B., Clarke A.R., Holbrook J. // *Biotechnol. Lett.* 2001. V. 23. P. 283–287.
67. Серов А.Е. Взаимосвязь структуры и свойств рекомбинантных формиадегидрогеназ из пекарских дрожжей и метилотрофных бактерий: Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2002.
68. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // *Biochem. J.* 2002. V. 367. P. 841–847.
69. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.-R., Tishkov V.I., Egorov A.M., Wandrey C., Kragl U. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. № 9. P. 1377–1380.
70. Rissom S., Schwarz-Linek U., Vogel M., Tishkov V.I., Kragl U. // *Tetrahedron: Assymetry.* 1997. V. 8. № 15. P. 2523–2526.
71. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Войнова Н.С., Угланова С.В., Петров А.С., Алексеева А.А., Клейменов С.Ю., Попов В.О., Тишков В.И. // *Прикл. биохимия и микробиол.* 2006. Т. 42. № 3. С. 269–273.
72. Садыхов Э.Г. Получение, термостабильность и структурные исследования формиадегидрогеназ из различных источников: Дис. ... канд. хим. наук. М.: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 2007.
73. Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Gotz F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 5. P. 2663–2676.
74. Савин С.С., Тишков В.И. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. № 1(4). С. 80–84.
75. Шабалин И.Г., Серов А.Е., Скиргелло О.Е., Тимофеев В.И., Самягина В.Р., Попов В.О., Тишков В.И., Куранова И.П. // *Кристаллография.* 2010. Т. 55. № 5. С. 855–859.
76. Alekseeva A.A., Shabalin I.G., Polyakov K.M., Tishkov V.I. // *J. Biotechnol.* 2010. V. 150. № S1. P. 476.
77. Тишков В.И., Угланова С.В., Федорчук В.В., Савин С.С. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. № 2(5). С. 86–92.