

УДК 577.1:577.15

Инактивация пероксидом водорода как метод оценки стрессовой стабильности формиаатдегидрогеназы *in vivo*

С.С. Савин^{1,2}, В.И. Тишков^{1,2,3*}¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33² ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96³ Химический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

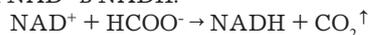
*E-mail: vitishkov@gmail.com

РЕФЕРАТ Исследование кинетики инактивации пероксидом водорода мутантной формиаатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) с заменой Cys255Ala свидетельствует, что взаимодействие фермента с инактивирующим агентом протекает по простому бимолекулярному механизму. В присутствии избытка пероксида водорода потеря активности описывается кинетикой реакции первого порядка. Поэтому наблюдаемая эффективная константа скорости инактивации первого порядка, полученная для различных форм ФДГ при постоянной концентрации H₂O₂, может быть использована в качестве количественной характеристики стабильности этих форм. Показано, что два остатка цистеина, расположенные в формиаат- и кофермент-связывающем доменах активного центра (Cys145 и Cys255 соответственно), при инактивации H₂O₂ вносят одинаковый вклад в стабильность фермента, а остаток Cys354 не является существенным. Сравнение кинетики инактивации PseFDH дикого типа, мутанта PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala и стресс-индуцируемых формиаатдегидрогеназ из бактерий *Staphylococcus aureus*, растений *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max* свидетельствует, что «стрессовые» ФДГ минимум в 20 раз более стабильны против инактивации пероксидом водорода, чем PseFDH, экспрессия которой индуцируется при росте бактерий *Pseudomonas* sp. 101 на метаноле, но не в условиях стрессовых воздействий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА формиаатдегидрогеназа, пероксид водорода, инактивация, стресс, мутантный фермент.

ВВЕДЕНИЕ

Формиаатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) является NAD⁺-зависимым ферментом. Она катализирует окисление формиаат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD⁺ в NADH.



Эта реакция является одной из важнейших, поскольку обеспечивает клетку NADH, который потом идет на синтез аденозинтрифосфата. ФДГ широко распространены в природе. Они найдены в различных типах бактерий, например метилотрофных бактериях, симбиотических азотфиксирующих бактериях [1]. Кроме того, гены ФДГ обнаружены в большом количестве патогенных микроорганизмов – как в бактериях (*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* str. k10, различных штаммах *Bordetella* и *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4), так и в микроскопических грибах (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21 и др.) [1]. Формиаатдегидрогеназы также были найдены в различных типах дрожжей, непатогенных микроскопических грибах, мхах и растениях. В патогенных микроорганизмах и растениях эти ферменты являются белками стресса. При стрессовых воздействиях содержание ФДГ в этих организмах возрастает в десятки раз [2].

Формиаатдегидрогеназа представляет большой интерес не только в плане изучения ее физиологической роли,

но и с точки зрения исследования механизма действия этого фермента. ФДГ принадлежит к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-гидроксиацетат [3]. Субстрат формиаатдегидрогеназы – формиаат-ион, является одним из самых простых по структуре среди субстратов для других ферментов данного суперсемейства. Кроме того, в каталитическом цикле ФДГ отсутствуют стадии кислотно-основного катализа. Именно поэтому формиаатдегидрогеназа рассматривается как модельный фермент для всего суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-гидроксиацетат.

На практике формиаатдегидрогеназа широко используется в тонком органическом синтезе. Этот фермент является идеальным биокатализатором для регенерации кофакторов. На основе системы регенерации NAD(P)H с помощью ФДГ было разработано большое число процессов синтеза оптически активных соединений [4–7]. В качестве примера можно привести процесс получения *tert*-L-лейцина, который реализован в объеме сотен тонн в год фирмой Degussa (новое название Evonik) [8]. Поэтому разработка новых биокатализаторов на основе ФДГ, которая будет стабильна не только в водных растворах, но и в более агрессивных средах, является важной задачей сегодняшнего дня.

Если рассматривать стабильность ФДГ, то можно выделить три основных воздействия на фермент, по которым она оценивается. Во-первых, это температурная ста-

бильность – способность фермента сохранять активность при повышенных температурах. Как правило, термоинактивация ферментов связана с денатурацией белковой глобулы. Формиатдегидрогеназы из разных источников сильно отличаются по своей термостабильности. Например, ФДГ из сои, которая была клонирована в нашей лаборатории, быстро инактивируется уже при температуре порядка 45–46 °С [9]. То же самое касается и ФДГ из пекарских дрожжей. В то же время клонированные в нашей лаборатории ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 и *Staphylococcus aureus* и из растений *Arabidopsis thaliana* показывают высокую стабильность при температурах 60–65 °С.

Второй важной характеристикой фермента является т.н. химическая стабильность – способность сохранять активность в присутствии химических реагентов, модифицирующих аминокислотные остатки белка. Как правило, это остатки, расположенные в активном центре фермента или отвечающие за поддержание третичной и четвертичной структуры. В случае формиатдегидрогеназ наиболее критичными являются остатки цистеина. Практически все ФДГ имеют существенные остатки цистеина. Большинство случаев инактивации фермента при температурах до 40 °С связаны с тем, что происходит либо химическая модификация, либо окисление сульфогидрильных групп.

Третий тип стабильности связан со стабильностью в присутствии протеаз. Этот тип стабильности очень важен при хранении белков. Даже незначительные примеси протеаз (сотые и даже тысячные доли процента) могут привести к полной потере активности при хранении. Систематических исследований ФДГ в этой области не проводилось, однако ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 не расщепляется протеазами *E.coli* при культивировании штамма-продуцента рекомбинантного фермента в течение 72 и более часов.

Если процессы изучения термостабильности ФДГ хорошо изучены и описаны в литературе, то в случае с химической стабильностью таких экспериментов намного меньше. Фактически, такие эксперименты были сделаны только на нескольких ферментах, таких как ФДГ бактерий *Pseudomonas* sp.101 [10, 11], *Mycobacterium vaccae* N10 [12] и дрожжей *Candida boidinii* [13]. При проведении подобных экспериментов важным моментом является способ, с помощью которого можно будет охарактеризовать химическую стабильность фермента. В случае ФДГ для инактивации применяли ионы ртути Hg^{2+} , меди Cu^{2+} , специфические реагенты на сульфгидрильные группы остатков цистеина, такие как 5,5'-дителиобис(2-нитробензоат) (ДТНБ) и *n*-хлормеркурибензоат. Однако получить четкую корреляцию между данными по химической стабильности и структурой модифицирующего агента так и не удалось.

В нашей работе мы решили использовать другой реагент – пероксид водорода. H_2O_2 был выбран в качестве инактивирующего агента по следующим причинам:

1. Пероксид водорода имеет небольшие размеры и способен окислять сульфгидрильные группы не только на поверхности, но и в глубине белковой глобулы. Широко используемые реагенты для модификации остатков цистеина, такие как *n*-хлормеркурибензоат и ДТНБ, имеют достаточно большие размеры и в силу стерических затруднений в первую очередь быстро взаимодействуют

с высокореакционноспособным остатком Cys255, а скорость взаимодействия с остальным(и), неиндефицированным(и) остатком(ми) Cys в несколько десятков раз медленнее [10].

2. Пероксид водорода активно образуется в природе, т.е. он является *природным* инактивирующим агентом. В силу природного происхождения и малого размера молекулы пероксид водорода является хорошим химическим агентом для оценки стабильности ФДГ *in vivo*.

3. Высокие концентрации пероксида водорода в клетке возникают при стрессовых воздействиях. В ряде случаев в условиях стресса в клетке также резко возрастает концентрация ФДГ. Например, в растениях формиатдегидрогеназа локализована в митохондриях, и в стрессовых ситуациях содержание фермента внутри органеллы возрастает до 9 % от общего белка митохондрий [14]. ФДГ из патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus* также является белком стресса. При росте *S.aureus* в виде биопленок количество мРНК ФДГ в клетке занимает третье место среди всех мРНК. В этих условиях уровень биосинтеза ФДГ возрастает в 20 раз по сравнению с таковым при росте бактерий в виде планктона [15]. Таким образом, можно полагать, что ФДГ, индукция биосинтеза которых происходит в условиях стресса, должны проявлять более высокую стабильность в присутствии пероксида водорода по сравнению с формиатдегидрогеназами, которые синтезируются в клетке не при стрессовых воздействиях, например, как ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 при росте на метаноле.

Целью данной работы было сравнить стабильности ФДГ дикого типа из разных источников при инактивации под действием пероксида водорода, а также изучить роль отдельных остатков Cys в химической стабильности ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101. Для решения поставленной задачи были запланированы следующие эксперименты:

1) изучить кинетику инактивации модельного фермента в присутствии различных концентраций пероксида водорода и определить возможный кинетический механизм;

2) исследовать роль отдельных остатков цистеина в ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, а именно остатков Cys в положениях 145 (формиат-связывающий участок активного центра, расположен в глубине активного центра), 255 (кофермент-связывающий участок активного центра, экспонирован в раствор) и 354 (расположен вдали от активного центра, экспонирован в раствор);

3) сравнить химическую стабильность ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (синтез фермента в нестрессовых условиях) и бактерий *S. aureus* и растений *A. thaliana* и сои *G max* (повышенный синтез фермента при стрессовых воздействиях).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты рекомбинантной формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) и ее мутантные формы с точечной заменой Cys255Ala и двойными заменами Cys-145Ser/Cys255Ala и Cys255Ala/Cys354Ser, а также рекомбинантные ФДГ дикого типа из бактерий *S. aureus* (SauFDH) и растений *A. thaliana* (AraFDH) и сои *G max* (SoyFDH) были любезно предоставлены ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (<http://www.innotech-msu.com>). Соглас-

но данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия все препараты были не менее 97–98 %-ной степени чистоты.

Определение активности формилдегидрогеназ. Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) на спектрофотометре Shimadzu UV 1601PC при 30 °C в 0.1M натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Концентрации NAD⁺ и формиата натрия в кювете были насыщающими и составляли 1.5 мМ и 0.3M соответственно.

Исследование инактивации рекомбинантных ФДГ пероксидом водорода. Инактивацию ФДГ пероксидом водорода изучали в 0.1M натрий-фосфатном буфере, 0.01M ЭДТА, pH 7.0, при 25 °C. Концентрацию H₂O₂ определяли по поглощению на 240 нм, пользуясь коэффициентом экстинкции, равным 43.6 M⁻¹cm⁻¹. Для эксперимента брали раствор ФДГ с активностью 2.5–4 единицы на миллилитр и добавляли к нему раствор пероксида водорода нужной концентрации в соотношении 0.7 объема раствора фермента и 0.3 объема раствора H₂O₂, предварительно термостатированных при 25 °C. Раствор быстро перемешивали и помещали в предварительно прогретый до температуры 25 °C термостат «Гном» (точность термостатирования ± 0.1 °C). Затем в определенные моменты отбирали пробы по 20 мкл для измерения остаточной активности. Для приготовления рабочих растворов пероксида водорода брали раствор с концентрацией 33 % (9.1 моль) и разбавляли бидистиллированной водой до нужной концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИНАКТИВАЦИЯ PSEFDH С ЗАМЕНОЙ CYS255ALA ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Для изучения зависимости скорости инактивации ФДГ от концентрации пероксида водорода была выбрана мутантная форма фермента из *Pseudomonas* sp.101 серии GAV. Как уже отмечалось выше, в активном центре PseFDH имеется два остатка Cys в положениях 145 и 255. Химическая модификация любого из них может привести к инактивации фермента. Существовала вероятность того, что, как и в случае химической модификации ДТНБ, пероксид водорода может по-разному взаимодействовать с этими остатками – остаток Cys145 расположен в глубине активного центра, а второй остаток – Cys255 находится на поверхности белковой глобулы и доступен действию растворителя. Поскольку в первую очередь было интересно изучить инактивацию PseFDH пероксидом водорода именно за счет окисления остатка Cys145, поэтому в этой серии экспериментов была использована мутантная PseFDH, у которой остаток Cys255 был заменен на остаток аланина (PseFDH Cys255Ala).

Зависимости остаточной активности фермента от времени при всех изученных концентрациях пероксида водорода описываются простой экспонентой. В полулогарифмических координатах эти зависимости представляют собой серию прямых (рис. 1). Из тангенса угла наклона прямой можно рассчитать эффективную константу скорости инактивации $k_{in}^{эф}$. Величина этой константы не зависела от концентрации фермента.

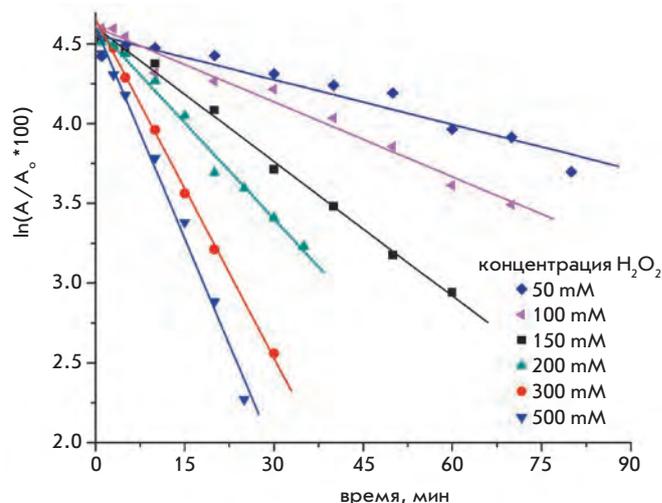
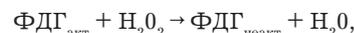


Рис. 1. Инактивация PseFDH с заменой Cys255Ala в присутствии различных концентраций пероксида водорода. 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

Если предположить, что взаимодействие фермента с пероксидом водорода происходит по би-молекулярному механизму:



то скорость реакции инактивации будет описываться уравнением

$$v_{in} = k_{in} * [\text{ФДГ}_{\text{акт}}] * [\text{H}_2\text{O}_2],$$

где [ФДГ_{акт}] и [H₂O₂] – концентрации активного фермента и пероксида водорода в данный момент времени. Если учесть, что [H₂O₂] >> [ФДГ_{акт}]₀, то расходом пероксида водорода в ходе реакции можно пренебречь (т.е. [H₂O₂] ≈ [H₂O₂]₀). В этом случае для процесса инактивации фермента должны наблюдаться первый порядок реакции, а эффективная константа скорости инактивации первого порядка будет равна

$$k_{in}^{эф} = k_{in} * [\text{H}_2\text{O}_2]_0.$$

Истинная константа скорости инактивации второго порядка может быть определена из зависимости эффективной константы скорости инактивации $k_{in}^{эф}$ от концентрации пероксида водорода. Как видно из рис. 2, наблюдаемая зависимость $k_{in}^{эф}$ от концентрации пероксида действительно представляет собой прямую. Величина бимолекулярной константы скорости инактивации PseFDH с заменой Cys255Ala составила $(3.17 \pm 0.14) * 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что инактивация фермента происходит в результате бимолекулярной реакции, когда фермент сразу взаимодействует с пероксидом водорода без образования промежуточного комплекса. Поскольку в присутствии избытка пероксида водорода инактивация протекает в соответствии с кинетикой реакции первого порядка, то величина наблюдаемой эффективной константы скорости инактивации первого порядка $k_{in}^{эф}$ не должна зависеть от концентрации фермента (что и наблюдали в реальных экспериментах). Поэтому, если инактивацию формилдегидрогеназ из разных источников (или различных мутантных форм) изучать

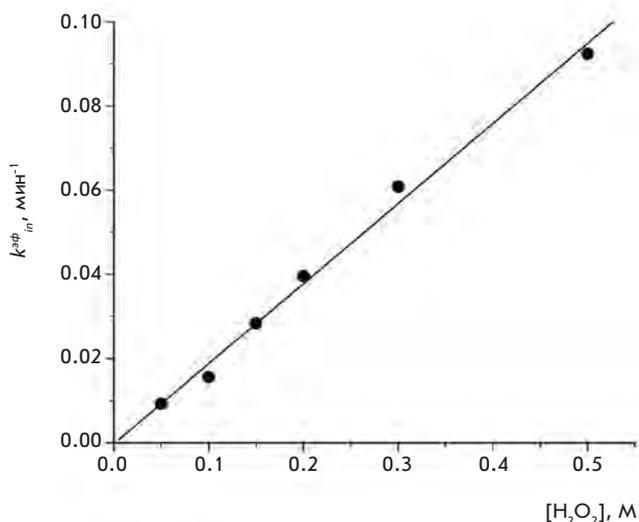


Рис. 2. Зависимость эффективной константы скорости инактивации $k_{in}^{эф}$ PseFDH с заменой Cys255Ala от концентрации пероксида водорода. 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

при одной и той же постоянной концентрации пероксида водорода, то величина эффективной константы скорости инактивации первого порядка $k_{in}^{эф}$ может быть использована в качестве количественной характеристики стабильности данной ФДГ. В дальнейшем для проведения экспериментов была выбрана концентрация пероксида водорода 0.15M.

ИНАКТИВАЦИЯ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА МУТАНТНЫХ ФОРМ PSEFDH

На рис. 3 представлены результаты изучения инактивации пероксидом водорода фермента дикого типа и трех мутантных форм ФДГ из *Pseudomonas* sp.101, в которых были заменены различные остатки цистеина. Ранее нами были получены многочисленные мутантные формы PseFDH с различными заменами остатков Cys в положениях 145, 255 и 354, однако в данной работе были изучены только те мутанты, которые имели наилучшие кинетические свойства.

Инактивация пероксидом водорода всех мутантных форм PseFDH и фермента дикого типа описывается кинетикой реакции первого порядка. Как и следовало ожидать, самая низкая стабильность наблюдается в случае фермента дикого типа (рис. 3, нижняя прямая). Замена остатка Cys255 на остаток Ala приводит к тому, что константа скорости инактивации снижается в два раза ($k_{in}^{эф}$ 9.13×10^{-4} и 4.69×10^{-4} c⁻¹ соответственно). В следующей мутантной форме PseFDH в дополнение к замене Cys255Ala была введена мутация Cys354Ser. Как видно, замена остатка цистеина 354 на остаток серина очень слабо влияет на стабильность фермента против инактивации пероксидом водорода, что подтверждает наши данные о том, что этот остаток цистеина не является существенным для проявления каталитической активности фермента [1]. Наиболее высокая стабильность против инактивации пероксидом

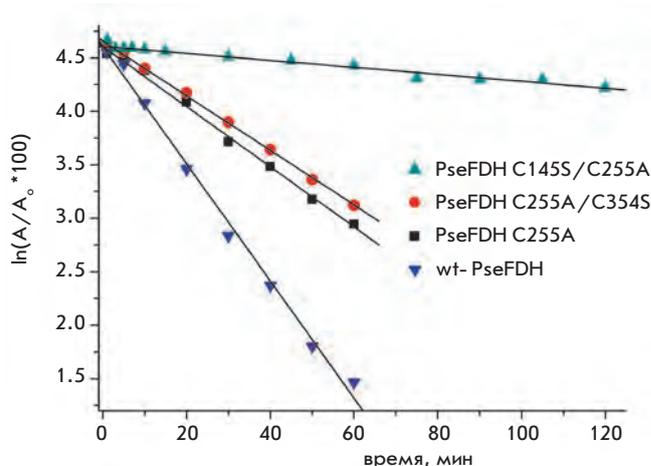


Рис. 3. Инактивация пероксидом водорода PseFDH дикого типа (wt- PseFDH) и ее мутантов с различными заменами остатков Cys. 0.15M пероксид водорода, 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

водорода наблюдается в случае замены двух остатков цистеина, расположенных в активном центре фермента, – Cys145Ser и Cys255Ala.

Сравнение величин эффективных констант скоростей инактивации $k_{in}^{эф}$ для PseFDH дикого типа и ее мутантов PseFDH Cys255Ala и PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala (табл. 1) позволяет оценить вклад каждого из этих остатков в стабильность фермента. В случае остатка Cys255 вклад в величину $k_{in}^{эф}$ составляет 4.40×10^{-5} c⁻¹ (разность между $k_{in}^{эф}$ для PseFDH дикого типа и PseFDH Cys255Ala). Для остатка Cys145 вклад в величину $k_{in}^{эф}$ составляет 4.17×10^{-5} c⁻¹ (разность между $k_{in}^{эф}$ для PseFDH Cys255Ala и PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala), т.е. оба остатка практически одинаково взаимодействуют с пероксидом водорода, несмотря на то что один остаток расположен на поверхности, а второй – в глубине белковой глобулы. Как отмечалось выше, в случае использования в качестве модифицирующего агента ДТНБ разница в реакционной способности между остатками Cys145 и Cys255 составляла минимум 2–3 порядка [10].

ИНАКТИВАЦИЯ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ БАКТЕРИЙ И РАСТЕНИЙ

На последнем этапе мы изучили устойчивость против инактивации пероксидом водорода ФДГ из разных источников. Для исследования были взяты 3 формиаатде-

Таблица 1. Эффективные константы скорости инактивации пероксидом водорода PseFDH дикого типа и ее мутантов (0.15M пероксид водорода, 0.1 M фосфат, pH 7.0)

Фермент	PseFDH дикого типа	PseFDH C255A	PseFDH C255A/C354S	PseFDH C145S/C255A
$k_{in}^{эф} \times 10^{-5}, c^{-1}$	91.3 ± 3.2	46.9 ± 1.2	42.5 ± 0.8	5.20 ± 0.37

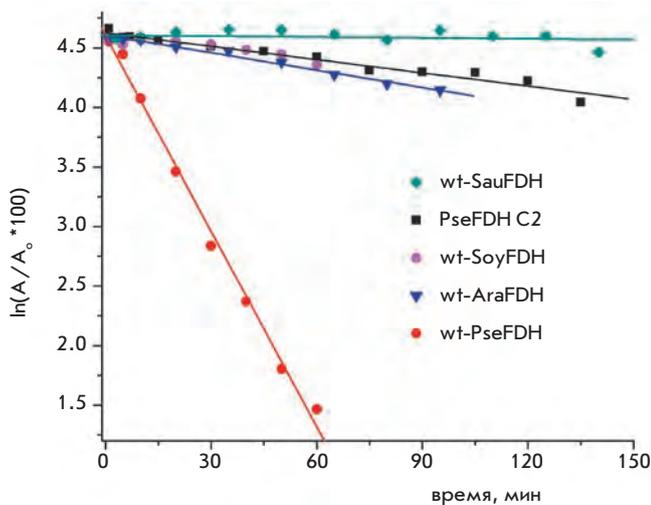


Рис. 4. Инактивации пероксидом водорода ФДГ из различных источников. wt-SauFDH, wt-PseFDH, wt-SoyFDH и wt-AraFDH – рекомбинантные формиаатдегидрогеназы дикого типа из бактерий *S.aureus* и *Pseudomonas* sp.101, сои *Glycine max* и растений *A.thaliana* соответственно. PseFDH C2 – мутантная PseFDH C145S/C255A. 0.15M пероксид водорода, 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

гидрогеназы, чей биосинтез резко возрастает в условиях стресса (бактериальная SauFDH и растительные AraFDH и SoyFDH) (рис. 4). В качестве сравнения использовали ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 дикого типа и ее наиболее устойчивый против инактивации пероксидом водорода мутант PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala. PseFDH не является белком стресса. Ее биосинтез индуцируется при росте бактерий *Pseudomonas* sp.101 на метаноле. Как видно из рис. 4, «стрессовые» ФДГ, как растительные, так и бактериальная, обладают высокой стабильностью против инактивации пероксидом водорода. Они намного стабильнее, чем PseFDH дикого типа, и только самый лучший мутант PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala может сравниться по стабильности с формиаатдегидрогеназами растений. Также отметим, что растительные ФДГ, демонстрируя практически одинаковую стабильность против инактивации пероксидом водорода, отличаются по термостабильности более чем в 5000 раз [9]. Самой высокой стабильностью при инактивации пероксидом водорода обладала ФДГ из патогенных бактерий *S.aureus*. Из рис. 4 видно, что после 4 ч инкубации в присутствии 0.15M H₂O₂ активность этого фермента составляла более 90 % от исходной. SauFDH также характеризуется высокой термостабильностью. По этому параметру среди известных формиаатдегидрогеназ она уступает только PseFDH.

Эксперименты по инактивации пероксидом водорода растительных формиаатдегидрогеназ дикого типа и бактериальных SauFDH дикого типа и двойного мутанта PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala свидетельствуют, что даже в отсутствие остатков цистеина в активном центре все вышеуказанные ферменты, пусть гораздо медленнее, но все равно теряют активность (рис. 4). Значения эффективных констант скорости инактивации для точечного мутанта PseFDH Cys255Ala и двойного мутанта Cys255Ala/Cys-

354Ser (табл. 1) свидетельствуют, что это падение активности, скорее всего, связано не с окислением остатков Cys, расположенных вне активного центра фермента, а с модификацией каких-то других аминокислотных остатков, т.е. пероксид водорода не является специфическим реагентом на остатки Cys в ФДГ, и именно эта неспецифичность действия позволяет с помощью H₂O₂ выявить наличие в молекуле ФДГ других аминокислотных остатков, окисление которых приводит к потере ферментативной активности, и по величине $k^{эф}_{in}$ количественно оценить вклад этих остатков в химическую стабильность фермента. В случае растительных ФДГ вклад этих остатков в 6 раз меньше, чем для SauFDH (рис. 4).

Более высокая стабильность SauFDH при инактивации пероксидом водорода по сравнению с ФДГ растений очень хорошо согласуется с требованиями по стабильности этих ферментов при стрессовых воздействиях на организм *in vivo*. В случае растений величина и длительность таких воздействий, при которых клетка погибает, намного меньше по сравнению с теми стрессовыми условиями, при которых могут существовать биопленки *S.aureus*. Очевидно, что более высокая сопротивляемость стафилококков стрессу должна быть обеспечена высокой стабильностью всех компонентов клетки (в т.ч. и формиаатдегидрогеназы), отвечающих за выживание в стрессовых условиях. Таким образом, наши данные подтверждают высказанную во введении гипотезу, что ФДГ, синтез которых возрастает в стрессовых условиях, должны обладать высокой стабильностью против инактивации пероксидом водорода, причем эта стабильность должна быть тем выше, чем более сильным стрессовым воздействиям подвергается клетка. Таким образом, данные по инактивации очищенных препаратов ФДГ пероксидом водорода могут быть использованы для сравнительной оценки стрессовой стабильности формиаатдегидрогеназ *in vivo*. ●

Работа поддержана Российским Фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01589-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. P. 89.
2. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Remy R. // *Plant Physiol.* 1993. V. 102. P. 1171.
3. Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 192. P. 182.
4. Hummel W., Kula M.R. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 184. P. 1.
5. Hummel W. // *Trends Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 487.
6. Liese A., Filho M.V. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. V. 10. P. 595.
7. Тишков В.И., Попов В.О. // *Биохимия.* 2004. Т. 69. С. 1537.
8. Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. // *Tetrahedron-Asymmetry.* 1995. V. 6. P. 2851.
9. Sadykhov E., Serov A., Voinova N., Uglanova S., Petrov A. et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. V. 42. P. 236.
10. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Egorova O.A., Sheluho D.V. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 192. P. 976.
11. Odintzeva E.R., Popova A.S., Rojkova A.M., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2002. V. 43. P. 356.
12. Yamamoto H., Mitsuhashi K., Kimoto N., Kobayashi Y., Esaki N. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004.
13. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 1280.
14. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Darpas A., Sallantin M., Huet J.C. et al. // *Plant Physiol.* 1992. V. 98. P. 273.
15. Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Gotz F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 2663.