УДК 577.151.32

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН ОСТАТКА ЦИСТЕИНА В СОСТАВЕ МОТИВА GCSAG АКТИВНОГО ЦЕНТРА НА СВОЙСТВА ЭСТЕРАЗЫ PMGL2

© 2020 М.В. Крюкова¹, Л.Е. Петровская^{2*}, К.А. Новотоцкая-Власова³, Е.А. Крюкова², С.А. Якимов², А.Ю. Николаева¹, К.М. Бойко⁴, Д.А. Долгих^{2,5}, М.П. Кирпичников^{2,5}

¹ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

117997 Москва, Россия; электронная почта: lpetr65@yahoo.com

³ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук, 119071 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 28.02.2020 После доработки 07.04.2020 Принята к публикации 09.04.2020

Эстераза PMGL2, ген которой был обнаружен в результате скрининга метагеномной библиотеки ДНК из вечномерзлого грунта, относится к семейству HSL (гормон-чувствительной липазы млекопитающих). Аминокислотная последовательность PMGL2 характеризуется наличием не описанного ранее варианта консервативного мотива активного центра GXSXG, включающего остаток Cys173 рядом с каталитическим остатком Ser174. С целью выяснения функциональной роли данного остатка цистеина сконструирован ряд мутантных вариантов PMGL2, содержащих в этом положении остатки треонина, аспарагиновой кислоты или серина, и определены их свойства. Удельная активность мутанта С173D по отношению к *n*-нитрофенилбутирату на 60% выше, чем для фермента дикого типа (wtPMGL2), в то время как вариант C173T/C202S продемонстрировал пониженную активность. По отношению к *n*-нитрофенилоктаноату, вариант C173D активнее wtPMGL2 на 15%, тогда как замены C173T/C202S понизили активность на 17%. Для мутанта C173D также характерна высокая активность в области пониженных температур (20-35 °C) при существенной потере термостабильности. Значение k_{cat} для данного белка на 56% выше, чем для исходного фермента, тогда как для варианта C173S, который обнаружил наиболее высокую термостабильность среди исследованных мутантов, она такая же как для фермента дикого типа. Полученные результаты демонстрируют, что замены аминокислотных остатков, соседних с каталитическим остатком серина в составе мотива GXSXG, оказывают существенное влияние на свойства эстеразы PMGL2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эстераза PMGL2, семейство HSL, мотив GCSAG, мутагенез, термостабильность, пространственная структура.

DOI: 10.31857/S0320972520060081

введение

Липолитические ферменты (липазы и эстеразы; триацил-глицерол-ацилгидролазы) катализируют реакции гидролиза эфиров глицерина и высших карбоновых кислот и широко представлены в царствах животных и растений, а также в бактериях и археях [1, 2]. Липазы микробного происхождения находят применение в различных областях промышленности, включая фармакологическую и пищевую отрасли, производство бытовой химии и тонкий органический синтез [2, 3].

Липолитические ферменты относятся к суперсемейству α/β -гидролаз, характерной особенностью строения которых является наличие центрального (каталитического) домена, имеющего структуру α/β -сэндвича, и каталитической триады, включающей остатки серина (нуклеофил), гистидина и дикарбоновой аминокислоты (Asp/Glu) [4, 5]. Большинство подобных белков содержит также *сар*-домен, расположенный над активным центром и участвующий в связыва-

Принятые сокращения: HSL – гормон-чувствительная липаза млекопитающих, wtPMGL2 – эстераза PMGL2 дикого типа, SOE-PCR (splicing by overlapping extension PCR) – ПЦР с перекрывающимися праймерами, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

^{*} Адресат для корреспонденции.

нии субстрата. Структура каталитического домена характеризуется наличием β-слоя, образованного 5–11 (обычно восемью) β-тяжами, фланкированного α-спиралями [2]. Консервативный участок последовательности, содержащий каталитический остаток серина, образует т.н. «нуклеофильный локоть» – γ-поворот с нуклеофилом на вершине. Каталитические остатки дикарбоновой кислоты и гистидина чаще всего расположены в петлях, следующих за тяжами β7 и β8 соответственно.

По классификации, основанной на сходстве аминокислотных последовательностей, липолитические ферменты делятся на несколько семейств, число которых непрерывно растет за счет обнаружения новых белков [6, 7]. Семейство IV (семейство гормон-чувствительных липаз, HSL) объединяет белки, аминокислотные последовательности которых обнаруживают сходство с последовательностью каталитического домена HSL липаз млекопитающих [6, 8]. Характерной особенностью этих ферментов является также наличие консервативного мотива активного центра GXSXG, который включает в себя каталитический остаток серина.

В последние десятилетия развитие метагеномных подходов открыло широкие возможности обнаружения генов новых биокатализаторов, которые ранее были ограничены доступностью геномов микроорганизмов, поддающихся культивированию в лабораторных условиях [9, 10]. В результате было выделено и охарактеризовано значительное количество липолитических ферментов, в том числе относящихся к семейству HSL, из различных местообитаний, включая морские, озерные и арктические отложения, лесные и горные почвы [7, 11].

Ранее нами были проведены конструирование и функциональный скрининг метагеном-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для конструирования генов мутантных вариантов эстеразы PMGL2

Обозначение	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
C173Tfor	CTTCGGCACCTCGGCGG
C173Trev	CGCCGAGGTGCCGAAGATG
C202Sfor	GCACCCTGAGCGGCACC
C202Srev	GTGCCGCTCAGGGTGCC
C173Sfor	CTTCGGCTCCTCGGCGG
C173Srev	CGCCGAGGAGCCGAAGATG
C173Dfor	CTTCGGCGACTCGGCGG
C173Drev	CGCCGAGTCGCCGAAGATG

ной библиотеки ДНК из вечномерзлых грунтов, что позволило обнаружить ряд генов, кодирующих потенциальные липолитические ферменты семейства HSL [12, 13]. Установлено, что каталитический остаток серина одного из таких ферментов – эстеразы PMGL2 находится в составе последовательности GCSAG, которая является новым, ранее не описанным вариантом консервативного мотива GXSXG. Были получены рекомбинантный белок PMGL2 и определены его биохимические свойства [12] и пространственная структура [14], а также точечный мутант C173T/C202S, содержащий остаток треонина вместо остатка цистеина из мотива GCSAG [14]. В данной работе с целью получения дополнительных данных о функциональной роли остатка Cys173 был сконструирован ряд новых точечных мутантов эстеразы PMGL2 и определены их биохимические свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реактивы фирм «Bio-Rad» (США), «Merck» (США), «Panreac» (Испания), субстраты для определения липолитической активности «Sigma» (США), органические растворители производства «Химмед» (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Для множественного выравнивания аминокислотных последовательностей использовали алгоритм ClustalOmega [15].

Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартными методами в клетках *Escherichia coli* XL-1 Blue («Stratagene»). Использовали ферменты производства «Thermo Fisher Scientific» (США). Олигонуклеотиды были синтезированы в «Евроген» (Россия). Ген мутантного варианта C173T/C202S был получен нами ранее [14]. Для конструирования мутантов использовали двухступенчатый SOE-PCR с праймерами, приведенными в табл. 1. Мутантные гены клонировали в вектор pET32a («Novagen», США), как и ген исходного белка, и подтверждали последовательность секвенированием («Евроген»).

Выделение рекомбинантных белков, определение липолитической активности и стабильности проводили как описано ранее [12]. Измерение липолитической активности осуществляли спектрофотометрическим методом после инкубации белка (1 мкг/мл) с 0,25 mM *n*-нитрофенилбутиратом (С4) в буфере 50 mM CHES-NaOH, pH 8,5, 100 mM NaCl в течение 15 мин при 45 °C. Реакцию останавливали добавлением SDS до 2%. Светопоглощение при 415 нм изме-

ряли с помощью планшетного ридера Model 680 («Bio-Rad»).

Кинетические параметры реакции определяли, варьируя концентрацию субстрата в диапазоне 0,3–2,1 мМ. Реакцию проводили в течение 1 мин, концентрация фермента в реакционной смеси составляла 3 мкг/мл. Значения $K_{\rm m}$ и $V_{\rm max}$ оценивали методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin 8 с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен.

Аналитическую гель-фильтрацию проводили на колонке Superdex 75 10/300 GL («GE Healthcare») при скорости потока 0,4 мл/мин в буфере 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl. Детекцию белка осуществляли по светопоглощению при 230 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование мутантных вариантов PMGL2. В результате сравнения аминокислотных

последовательностей липолитических ферментов семейства HSL, гомологичных wtPMGL2, было установлено, что в положении N-1 по отношению к каталитическому остатку Ser174 чаще всего обнаруживается один из следующих остатков — треонин, серин или аспартат (рис. 1, a). Соответственно нами были получены и исследованы три точечных мутанта PMGL2 C173T/C202S, C173S и C173D. Мутагенез остатка Cys202 при получении первого мутанта был проведен с целью предотвращения его участия в замыкании межмолекулярных дисульфидных связей, однако в результате исследований пространственной структуры показано, что боковая цепь этого остатка направлена внутрь белковой глобулы и практически недоступна для растворителя [12, 14]. Гены мутантных вариантов PMGL2 были сконструированы с помощью ПЦР и клонированы в вектор рЕТ32а под контролем промотора T7lac аналогично гену *PMGL2* дикого типа. Экспрессию полученных генов и выделение мутантных белков проводили соглас-



Рис. 1. Получение и свойства мутантных вариантов PMGL2. *a* – Выравнивание аминокислотных последовательностей эстераз семейства HSL, содержащих различные варианты мотива GXSXG, с помощью ClustalOmega. Показан участок 152–191 (нумерация wtPMGL2), содержащий каталитический остаток серина (обозначен черным кружком). 4Q3O – эстераза MGS-MT1 [16]; 4Q05 – эстераза E25 [17]; 3K6K – эстераза EstE7; δ – электрофорез в 13%-ном SDS-ПААГ по Лэммли очищенного белка wtPMGL2 (дорожка *1*) и мутантов C173T/C202S (дорожка *2*), C173S (дорожка *3*), C173D (дорожка *4*). М – маркеры мол. массы (кДа); *в* – гель-фильтрационный анализ wtPMGL2 и мутантных вариантов на колонке Superdex 75. Расчетная мол. масса PMGL2 составляет 37,5 кДа, время выхода с колонки 23,8 мин. Штриховыми линиями обозначены время выходов бычьего сывороточного альбумина (24,3 мин, мол. масса 66,5 кДа) и овальбумина (27,4 мин, 43 кДа). Данные гель-фильтрационного анализа wtPMGL2 и мутанта C173T/C202S взяты из ранней публикации [14]. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/)



Рис. 2. Специфичность PMGL2 и его мутантов по отношению к субстратам. Реакцию проводили в стандартных условиях с субстратами с разной длиной углеводородной цепи (C4, C8). Активность wtPMGL2 по отношению к *n*-нитрофенилбутирату принята за 100%. Представлены средние значения из трех повторностей \pm стандартное отклонение

но протоколу, описанному для wtPMGL2 [12]. С помощью белкового электрофореза в присутствии SDS показано, что все мутантные белки демонстрируют высокую чистоту и электрофоретическую подвижность, соответствующую расчетной мол. массе (рис. 1, δ).

Монодисперсность выделенных белков была подтверждена с помощью аналитической гельфильтрации на предварительно откалиброванной колонке Superdex 75 (рис. 1, *в*). Установлено, что время выхода с колонки мутантных вариантов PMGL2 составляет 23,8 мин, что соответствует димерной форме аналогично исходному белку [14]. Липолитическая активность мутантных вариантов PMGL2. Ранее нами было установлено, что максимальный уровень липолитической активности PMGL2 наблюдается при 45 °C с использованием *n*-нитрофенилбутирата (C4) в качестве субстрата [12]. Измерения липолитической активности мутантных вариантов PMGL2 проводили в данных условиях. Удельная активность варианта C173D превысила удельную активность PMGL2 на 60% и составила 3200 ед/мг, в то время как вариант C173T/C202S продемонстрировал пониженную активность (60% от активности PMGL2, 1215 ед/мг). Белок C173S обладал удельной активностью, сопоставимой с исходным ферментом (2330 ед/мг).

Исследование субстратной специфичности полученных мутантов показало, что, как и для PMGL2, предпочтительным субстратом для них является *n*-нитрофенилбутират (C4) (рис. 2). По сравнению с PMGL2, вариант C173D продемонстрировал увеличенную на 15% активность по отношению к *n*-нитрофенилоктаноату (C8), в то же время активность мутанта C173T/C202S, напротив, была на 17% снижена. Активность исследованных белков по отношению к субстратам большей длины (C10, C12, C16) оказалась незначительной.

Для определения температурной зависимости липолитической активности мутантных вариантов PMGL2 реакцию проводили с использованием *n*-нитрофенилбутирата (C4) в качестве субстрата в диапазоне температур 5–60 °С (рис. 3, *a*). Температурный оптимум активности мутантных белков составил 45 °С, как и у дикого типа. Для всех вариантов наблюдалось резкое падение активности при повышении температу-



Рис. 3. a – Зависимость активности PMGL2 и мутантных вариантов от температуры. Ферменты инкубировали в реакционной смеси, содержавшей 50 мМ CHES-NaOH, pH 8,5, 100 мМ NaCl и 0,25 мМ C4 в течение 15 мин при указанной температуре; δ – сравнение относительной активности PMGL2 и мутантных вариантов при 20, 30, 40 и 50 °C. Активность при 45 °C принята за 100%. Представлены средние значения трех опытов ± стандартное отклонение

ры реакционной смеси до 60 °С. При температуре 55 °С активность PMGL2 и С173S оставалась достаточно высокой (75 и 78% от максимальной), в то время как активность мутантов C173T/C202S и C173D существенно снижалась и составляла 31 и 9,5% соответственно. По сравнению с белком дикого типа и другими мутантами, вариант C173D показал наибольшую активность в области пониженных температур (20-35 °C). Так, его активность при 20 °C составила 68% от максимальной, тогда как для wtPMGL2 – лишь 44% (рис. 3, б). Более высокую активность в этой области, по сравнению с исходным ферментом (52% от максимальной), имел также вариант C173S.

Термостабильность мутантных вариантов PMGL2. В предыдущей работе нами было показано, что wtPMGL2 обладает относительно высокой термостабильностью и выдерживает инкубацию в течение 1 ч при 45 °С без существенной потери активности [12]. Остаточная активность этого фермента после инкубации в течение 1 ч при 40 °С составила 85,5% от исходной, а при 50 °C - 75% (рис. 4). Аналогичные эксперименты, проведенные для мутантных вариантов, продемонстрировали, что они обладают пониженной стабильностью по сравнению с исходным ферментом. Активность мутанта С173Т/ C202S в результате инкубации при 40 °С уменьшалась до 68% от исходной, а при 50 °C – до 51%. Наиболее стабильным оказался мутант C173S, сохранявший после прогрева 67 и 66% активности соответственно. Существенное снижение термостабильности обнаружил вариант С173D. После прогрева при 40 °С он сохранил 61% активности, а после инкубации при 50 °C – всего лишь 34%.

Кинетические параметры реакции мутантных вариантов PMGL2. Как видно из табл. 2, по величине *K*_m мутантный вариант C173S похож на



Рис. 4. Анализ температурной стабильности мутантных вариантов PMGL2. Белки инкубировали в реакционной смеси без субстрата при 30, 40 и 50 °С в течение 1 ч, остаточную активность измеряли в стандартных условиях с 0,25 мМ С4. Активность до прогрева принимали за 100%. Представлены средние значения трех экспериментов \pm стандартное отклонение

фермент дикого типа, в то время как для мутанта С173D K_m выше в 1,3 раза, а для мутанта С173T/C202S – в 1,7 раза [14]. По «числу оборотов» (k_{cat}) мутант С173S похож на фермент дикого типа, а для C173T/C202S и C173D этот параметр выше в 1,3 и 1,6 раза соответственно. Увеличение K_m привело к уменьшению каталитиэффективности (k_{cat}/K_m) варианта ческой C173T/C202S на 24%, что отразилось в наблюдаемом понижении удельной активности данного белка, измеренной при ненасыщающей концентрации субстрата (0,25 мМ). Каталитическая эффективность варианта C173S примерно такая же как для wtPMGL2, а для варианта C173D она в 1,2 раза выше (табл. 2).

			_				
_	Численное значение						
Параметр	wtPMGL2	C173T/C202S	C173S	C173D			
<i>K</i> _m , мМ	$1,13\pm0,10$	$1,\!88\pm0,\!06$	$1,03\pm0,05$	$1,\!45\pm0,\!07$			
$k_{\rm cat},{f c}^{-1}$	38 ± 1	48 ± 1	36 ± 0,6	59 ± 1			
$k_{\rm cat}/K_{\rm m},{\rm c}^{-1}/{\rm M}{\rm M}^{-1}*$	33 (100%)	25 (76%)	35 (106%)	41 (124%)			

Таблица	2. 1	Кинетические г	араметры	реакци	иwtPMG	L2 и м	тантных ва	риантов
паолица		i vinite i ni teenne i	iupume ipbi	решкци			y i u i i i i bin bu	phantob

* В скобках приведен процент по отношению к величине k_{cat}/K_m для wtPMGL2. Измерения проводили в буфере 50 мМ CHES-NaOH, pH 8,5, 100 мМ NaCl при 45 °C с использованием *n*-нитрофенилбутирата (C4) в качестве субстрата в диапазоне концентраций 0,3-2,1 мМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков, расположенных рядом с остатками, образующими каталитическую триаду, широко используется в белковой инженерии липолитических ферментов, в том числе относящихся к семейству HSL, с целью повышения их термостабильности, изменения субстратной специфичности и энантиоселективности [18, 19]. Так, замена в молекуле эстеразы PsyEst из психрофильной бактерии Psychrobacter sp. Ant300 остатка глицина, расположенного в петле по соседству с активным центром, на остаток пролина привела к значительному увеличению времени полуинактивации фермента [20]. Мутантный вариант эстеразы E. coli R48S отличался от исходного белка повышенной каталитической эффективностью (величина k_{cat} возросла в три раза), а также более высокой термостабильностью [21]. Замены остатков Met211 и Arg215, находящихся в участке связывания субстрата термофильной эстеразы 2 Alicyclobacillus acidocaldarius, существенно увеличивали эффективность расщепления длинноцепочечных субстратов [22]. Аналогичный эффект наблюдался в результате мутагенеза эстеразы *Thermogutta terrifontis* [23], холодоактивной липазы *Salinisphaera* sp. P7-4 [24] и липазы MgMDL2 *Malassezia globosa* [25].

В настоящей работе впервые исследовано влияние замен аминокислотных остатков, являчастью консервативного юшихся мотива GXSXG, на свойства эстеразы PMGL2, относящейся к семейству HSL. Классическим вариантом данного мотива считается GDSAG, который обнаруживается в последовательностях большинства микробных липолитических ферментов данного семейства. Недавно в последовательностях ряда эстераз, полученных в результате скрининга метагеномной библиотеки ДНК из литоральных отложений, был обнаружен новый вариант этого мотива GTSAG, что послужило основанием для выделения содержащих его белков в отдельное подсемейство [26]. В результате выравнивания последовательностей липолитических ферментов, относящихся к семейству HSL, установлено, что в положении N-1, где N обозначает нуклеофил (остаток серина), могут находиться остатки Asp (Glu), Thr, Ser, Cys [17]. Для уточнения роли остатка цистеина в данном положении на свойства липолитических фер-



Рис. 5. Наложение пространственных структур wtPMGL2 (PDB 6QIN) и mPMGL2 (PDB 6QLA), выполненное с помощью программы COOT [32]. Показаны аминокислотные остатки, входящие в каталитическую триаду (подчеркнуты) и образующие участок связывания субстрата. Темно-серым цветом обозначены боковые цепи остатков, относящихся к wtPMGL2, а также молекула ПЭГ в структуре мутантной формы фермента. Для остатка Tyr208 в структуре wtPMGL2 приведены два положения боковой цепи, наблюдаемые в кристаллической структуре

ментов семейства HSL ранее мы сконструировали мутант C173T/C202S [14]. В данной работе были дополнительно получены и охарактеризованы мутанты C173S и C173D. Были определены субстратная специфичность, температурный оптимум, термостабильность мутантных вариантов, а также кинетические параметры катализируемой ими реакции.

Установлено, что мутант C173S по удельной активность, температурному профилю активности и термостабильности и кинетическим константам очень похож на исходный белок. Мутантный вариант C173D проявил повышенную на 15% активность по *п*-нитрофенилоктаноату и повышенную активность по *n*-нитрофенилбутирату в температурном диапазоне 20-35 °C, а также существенное снижение термостабильности по сравнению с диким типом и другими мутантами. График температурной зависимости эстеразной активности C173D приобрел более «сглаженный» вид (рис. 3), что ранее было продемонстрировано нами для некоторых липолитических ферментов психротрофной бактерии Psychrobacter cryohalolentis K5^т [27—29]. Для данного варианта значение k_{cat} оказалось на 56%, а значение $K_{\rm m}$ – на 30 % выше, чем соответствующие параметры wtPMGL2. Повышение каталитической константы k_{cat} ферментов является одной из адаптивных стратегий, направленных на нейтрализацию негативного воздействия низких температур у приспособленных к холодным местообитаниям организмов. Также холодоактивные ферменты достаточно часто демонстрируют более высокие значения К_т по сравнению с гомологами из мезофильных организмов [30]. Таким образом, свойства мутанта C173D оказались приближенными к свойствам холодоактивных ферментов [30, 31].

В данной работе была обнаружена пониженные удельная активность и термостабильность мутантного варианта C173T/C202S. Ранее нами

было показано, что для этого мутанта характерно более высокое значение константы Михаэлиса по сравнению с белком дикого типа [14]. Каталитическая эффективность данного мутанта оказалась сниженной на 24%. Сравнение пространственных структур активного центра wtPMGL2 и мутанта C173T/C202S не обнаружило существенных различий между ними за исключением присутствия в активном центре мутанта молекулы ПЭГ, входившей в состав кристаллизационной смеси [14]. Наблюдаемые различия в конформациях некоторых остатков, например, Phe273 и Tyr208, по-видимому, связаны с присутствием молекулы ПЭГ в участке связывания субстрата мутантной формы (рис. 5). Можно предположить, что причиной изменения каталитических характеристик варианта C173T/C202S является различная конформационная подвижность остатков, образующих субстрат-связывающий «карман» белка дикого типа и мутантной формы.

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что замены аминокислотных остатков, входящих в состав консервативного мотива GXSXG, приводят к изменению свойств PMGL2 и, возможно, других липолитических ферментов семейства HSL. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей оптимизации каталитических характеристик PMGL2, а также других ферментов, относящих-ся к данному семейству.

Финансирование. Работу проводили при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00491 и Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В статье отсутствуют исследования, в которых в качестве объектов использовали людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., and Marty, A. (2012) in *Lipases and Phospholipases* (Sandoval, G. ed.), Humana Press, pp. 3-30, doi: 10.1007/ 978-1-61779-600-5 1.
- Gaur, R., Hemamalini, R., and Khare, S. (2017) in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (Pandey, A. N. S., and Soccol, C. R., eds) Elsevier, pp. 175-198, doi: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00008-7.
- Romano, D., Bonomi, F., Mattos, M. C., Fonseca, T. D., Oliveira, M. D. F., and Molinari, F. (2015) Esterases as stereoselective biocatalysts, *Biotechnol. Adv.*, 33, 547-565, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.006.

 Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., and Schrag, J. (1992) The α/β hydrolase fold, *Protein Eng.*, 5, 197-211, doi: 10.1093/protein/5.3.197.
Nardini, M., and Dijkstra, B. W. (1999) α/β Hydrolase fold

- Nardini, M., and Dijkstra, B. w. (1999) α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9, 732-737, doi: 10.1016/S0959-440X(99)00037-8.
- 6. Arpigny, J., and Jaeger, K. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.*, **343**, 177-183, doi: 10.1042/bj3430177.
- 7. Ferrer, M., Bargiela, R., Martínez-Martínez, M., Mir, J., Koch, R., Golyshina, O. V., and Golyshin, P. N. (2015) Biodiversity for biocatalysis: a review of the α/β -hydrolase

fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes, *Biocat. Biotrans.*, **33**, 235-249, doi: 10.3109/10242422.2016.1151416.

- Kim, T. D. (2017) Bacterial hormone-sensitive lipases (bHSLs): Emerging enzymes for biotechnological applications, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 1907-1915, doi: 10.4014/jmb.1708.08004.
- Mirete, S., Morgante, V., and González-Pastor, J. E. (2016) Functional metagenomics of extreme environments, *Curr. Opin. Biotech.*, 38, 143-149, doi: 10.1016/ j.copbio.2016.01.017.
- Handelsman, J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 669-685, doi: 10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.
- López-López, O., Cerdán, M. E., and Siso, M. I. G. (2014) New extremophilic lipases and esterases from metagenomics, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **15**, 445-455, doi: 10.2174/1389203715666140228153801.
- Petrovskaya, L. E., Novototskaya-Vlasova, K. A., Spirina, E. V., Durdenko, E. V., Lomakina, G. Y., Zavialova, M. G., Nikolaev, E. N., and Rivkina, E. M. (2016) Expression and characterization of a new esterase with GCSAG motif from a permafrost metagenomic library, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **92**, fiw046, doi: 10.1093/ femsec/fiw046.
- Petrovskaya, L. E., Novototskaya-Vlasova, K. A., Gapizov, S. S., Spirina, E. V., Durdenko, E. V., and Rivkina, E. M. (2017) New member of the hormone-sensitive lipase family from the permafrost microbial community, *Bioengineered*, 8, 420-423, doi: 10.1080/21655979.2016. 1230571.
- Boyko, K. M., Kryukova, M. V., Petrovskaya, L. E., Nikolaeva, A. Y., Korzhenevsky, D. A., Novototskaya-Vlasova, K. A., Rivkina, E. M., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P., and Popov, V. O. (2020) Crystal structure of PMGL2 esterase from the hormone-sensitive lipase family with GCSAG motif around the catalytic serine, *PLoS One*, **15**, e0226838, doi: 10.1371/journal.pone. 0226838.
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., and Lopez, R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019, *Nucleic Acids Res.*, 47, W636-W641, doi: 10.1093/ nar/gkz268.
- Alcaide, M., Stogios, P. J., Lafraya, B., Tchigvintsev, A., Flick, R., Bargiela, R., Chernikova, T. N., Reva, O. N., Hai, T., Leggewie, C. C., Katzke, N., La Cono, V., Matesanz, R., Jebbar, M., Jaeger, K.-E., Yakimov, M. M., Yakunin, A. F., Golyshin, P. N., Golyshina, O. V., Savchenko, A., Ferrer, M., and Consortium, T. M. (2015) Pressure adaptation is linked to thermal adaptation in saltsaturated marine habitats, *Environ. Microbiol.*, **17**, 332-345, doi: 10.1111/1462-2920.12660.
- Li, P. Y., Ji, P., Li, C. Y., Zhang, Y., Wang, G. L., Zhang, X. Y., Xie, B. B., Qin, Q. L., Chen, X. L., Zhou, B. C., and Zhang, Y. Z. (2014) Structural basis for dimerization and catalysis of a novel esterase from the GTSAG motif subfamily of the bacterial hormone-sensitive lipase family, *J. Biol. Chem.*, 289, 19031-19041, doi: 10.1074/jbc.M114. 574913.
- Kourist, R., Brundiek, H., and Bornscheuer, U. T. (2010) Protein engineering and discovery of lipases, *Europ. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 64-74, doi: 10.1002/ejlt. 200900143.

- Jochens, H., Hesseler, M., Stiba, K., Padhi, S. K., Kazlauskas, R. J., and Bornscheuer, U. T. (2011) Protein engineering of alpha/beta-hydrolase fold enzymes, *Chembiochem*, 12, 1508-1517, doi: 10.1002/cbic.201000771.
- Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., and Esaki, N. (2004) Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability, *Biochim. Biophys. Acta*, 1696, 59-65, doi: 10.1016/j.bbapap.2003.09.008.
- Kobayashi, R., Hirano, N., Kanaya, S., Saito, I., and Haruki, M. (2010) Enhancement of the enzymatic activity of *Escherichia coli* acetyl esterase by random mutagenesis, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 67, 155-161, doi: 10.1016/ j.molcatb.2010.08.003.
- Manco, G., Mandrich, L., and Rossi, M. (2001) Residues at the active site of the esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* involved in substrate specificity and catalytic activity at high temperature, *J. Biol. Chem.*, 276, 37482-37490, doi: 10.1074/jbc.M103017200.
- Sayer, C., Isupov, M. N., Bonch-Osmolovskaya, E., and Littlechild, J. A. (2015) Structural studies of a thermophilic esterase from a new *Planctomycetes* species, *Thermogutta terrifontis*, *FEBS J.*, **282**, 2846-2857, doi: 10.1111/ febs.13326.
- 24. Kim, B. Y., Yoo, W., Huong Luu Le, L. T., Kim, K. K., Kim, H. W., Lee, J. H., Kim, Y. O., and Kim, T. D. (2019) Characterization and mutation anaylsis of a cold-active bacterial hormone-sensitive lipase from *Salinisphaera* sp. P7-4, *Arch. Biochem. Biophys.*, 663, 132-142, doi: 10.1016/ j.abb.2019.01.010.
- Lan, D., Xu, H., Xu, J., Dubin, G., Liu, J., Khan, F. I., and Wang, Y. (2017) *Malassezia globosa* MgMDL2 lipase: Crystal structure and rational modification of substrate specificity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 488, 259-265, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.103.
- Jeon, J. H., Lee, H. S., Kim, J. T., Kim, S. J., Choi, S. H., Kang, S. G., and Lee, J. H. (2012) Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 623-631, doi: 10.1007/s00253-011-3433-x.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., and Gilichinsky, D. (2012) Cloning, purification, and characterization of a cold adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T from Siberian cryopeg, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 82, 367-375, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01385. x.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2013) Expression and chaperone-assisted refolding of a new coldactive lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T, *Protein Expr. Purif.*, **91**, 96-103, doi: 10.1016/j.pep.2013.07.011.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2013) Characterization of a cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T and its deletion mutants, *Biochemistry (Moscow)*, 78, 385-394, doi: 10.1134/S000629791304007X.
- Siddiqui, K. S., and Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted enzymes, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 403-433, doi: 10.1146/ annurev.biochem.75.103004.142723.
- 31. Feller, G., and Gerday, C. (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 200-208, doi: 10.1038/nrmicro773.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60, 2126-2132, doi: 10.1107/S0907444904019158.

THE INFLUENCE OF SUBSTITUTIONS OF THE CYSTEINE RESIDUE IN GCSAG MOTIF OF THE ACTIVE CENTER ON THE PROPERTIES OF THE PMGL2 ESTERASE

M. V. Kryukova¹, L. E. Petrovskaya^{2*}, K. A. Novototskaya-Vlasova³, E. A. Kryukova², S. A. Yakimov², A. Y. Nikolaeva¹, K. M. Boyko⁴, D. A. Dolgikh^{2,5}, and M. P. Kirpichnikov^{2,5}

¹ Kurchatov Complex of NBICS-Technologies, National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia ² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

117997 Moscow, Russia; E-mail: lpetr65@yahoo.com

³ Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Department of Biology, 119991 Moscow, Russia

Receive February 28, 2020 Revised April 7, 2020 Accepted April 9, 2020

The gene coding for PMGL2 esterase, which belongs to the family of mammalian hormone-sensitive lipases (HSLs), was discovered by screening a metagenomic DNA library from a permafrost soil. The active site of PMGL2 contains conserved GXSXG motif which includes Cys173 residue next to the catalytic Ser174. In order to clarify the functional role of the cysteine residue in the GCSAG motif, we constructed a number of PMGL2 mutants with Cys173 substitutions and studied their properties. The specific activity of the C173D mutant exceeded the specific activity of the wild-type enzyme (wtPMGL2) by 60%, while the C173T/C202S mutant displayed reduced catalytic activity. The activity of the C173D mutant with *p*-nitrophenyl octanoate was 15% higher, while the activity of the C173T/C202S mutant was 17% lower compared to wtPMGL2. The C173D mutant was also characterized by a high activity at low temperatures (20-35°C) and significant loss of thermal stability. The k_{cat} value for this protein was 56% higher than for the wild-type enzyme. The catalytic constants of the C173S mutant were close to those of wtPMGL2; this enzyme also demonstrated the highest thermal stability among the studied mutants. The obtained results demonstrate that substitutions of amino acid residues adjacent to the catalytic serine residue in the GXSXG motif can have a significant effect on the properties of PMGL2 esterase.

Keywords: PMGL2 esterase, HSL family, GCSAG motif, mutagenesis, thermal stability, three-dimensional structure