



УДК 577.34.01:577.152.361.01:577.112

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ В ОБЛАСТИ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ФОРМ АТР-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ *Escherichia coli*

© 1998 г. Ф. С. Расулова[#], Н. И. Дергоусова, Э. Э. Мельников, Л. М. Гиодман, Т. В. РотановаИнститут биоорганической химии им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН
117871, Москва, ГСП-7, ул.Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 26.01.98 г. Принята к печати 30.01.98 г.

Сравнительным анализом структур АТР-зависимых Lon-протеиназ из эволюционно удаленных источников установлены границы функциональных доменов в субъединицах ферментов. Методами генной инженерии получены модифицированные формы Lon-протеиназы *Escherichia coli* с удлиненным или замененным N-концевым доменом, а также “укороченный” фермент, лишенный N-концевого домена. Анализ энзиматических свойств модифицированных форм Lon-протеиназы позволил сделать заключение о важности N-концевого домена для активности фермента.

Ключевые слова: Lon-протеиназа, сериновая протеиназа, междоменные взаимодействия, ген lon, рекомбинантные гены, гибридные белки, *E. coli*.

Lon-протеиназа из *Escherichia coli* (КФ 3.4.21.53), называемая ранее La-протеиназой [1], осуществляет быструю селективную деградацию дефектных и некоторых короткоживущих регуляторных белков (субстраты-мишени) в цитозоле клетки [1–3]. Этот фермент является энергозависимой сериновой протеиназой, функционирование которой сопряжено с гидролизом АТР. К настоящему времени установлено, что энергозависимые протеиназы играют ключевую роль в регуляции клеточных функций и в поддержании гомеостаза у прокариот и эукариот [1–7].

По ряду параметров Lon-протеиназа отличается от “классических” сериновых протеиназ. Характерные особенности фермента:

- 1) селективность действия по отношению к субстратам-мишеням при отсутствии выраженной первичной специфичности;
- 2) сопряжение протеолиза с гидролизом АТР;
- 3) олигомерная структура (четыре идентичные субъединицы или более);
- 4) доменная организация субъединиц.

Основной задачей при изучении Lon-протеиназы является выяснение природы селективности

действия фермента и механизма сопряжения протеолиза с гидролизом АТР.

К настоящему времени аналоги гена lon, кодирующего Lon-протеиназу в клетках *E. coli*, обнаружены как у прокариот, так и у эукариот; выведены аминокислотные последовательности соответствующих ферментов [3, 8–20]. Таким образом, выявлено новое подсемейство сериновых протеиназ из эволюционно удаленных источников. Строение известных Lon-протеиназ схематически представлено на рис. 1, размеры Lon-протеиназ сравниваются в табл. 1.

Как видно из рис. 1а, в структурах субъединиц Lon-протеиназ можно выделить три функциональных домена, существование которых было постулировано ранее [10, 21]. Центральный домен (А-домен) обладает АТР-азной активностью и содержит характерные для ряда нуклеотид-триггерных белков фрагменты последовательности (мотивы Уолкера), участвующие в связывании нуклеотида и иона Mg^{2+} , – мотив А (GXXXXGKT/S) и мотив В (ZZZZD, Z – гидрофобная аминокислота) [22]. Структура мотива А консервативна для всех Lon-протеиназ, структуры мотива В несколько различаются у ферментов из прокариот и эукариот. С-Концевой домен (Р-домен) – протеолитический; идентифицированный нами ранее для фермента из *E. coli* каталитически активный остаток серина-679 [23] локализован в строго консервативном для всех Lon-протеиназ фрагменте последовательности PKDGPS*AG, который не обнаруживается в структурах ни одной из сериновых протеиназ других подсемейств.

Сокращения: IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид, GST – глутатион-S-трансфераза, tl – тромбинчувствительный линкер.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-42-22; e-mail: fatima@enzyme.siobc.ras.ru).

Функция N-концевого домена (N-домен) пока не выяснена, однако известно, что в N-концевом домене митохондриальной протеиназы из дрожжей содержится, в частности, адресующая препропоследовательность [24].

Наличие междоменных вставок в структурах ферментов эукариот (рис. 1а) позволяет уточнить границы доменов (табл. 1): размеры АТР-азного домена (459-471 а.о.) мало различаются у ферментов из разных источников; то же относится к протеолитическому домену (206-239 а.о.). Размеры N-концевых доменов значительно варьируют (96-288 а.о.). Наибольшая гомология последовательностей наблюдается в АТР-азном и протеолитическом доменах; в N-концевом домене подобие невелико.

Таким образом, именно N-концевой домен – наиболее вариабельный (как по размеру, так и по структуре) фрагмент Lon-протеиназ. Поэтому представляется актуальным вопрос о значении N-концевого домена для функционирования фермента. Из известных Lon-протеиназ наиболее доступен фермент из *E. coli* (далее – Lon-протеиназа) (рис. 1б), который обычно служит моделью при исследовании закономерностей функционирования сериновых протеиназ этого подсемейства. Цель данной работы – получение и исследование активности укороченной Lon-протеиназы, лишенной N-концевого домена (двухдоменный фрагмент фермента).

Для получения Lon-протеиназы и ее двухдоменного фрагмента был использован плазмидный вектор рGEX-KG [25] (рис. 2), который позволяет получать гибридные белки, состоящие из глутатион-S-трансферазы (GST, белок-носитель) и целевого белка, соединенных линкером Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Pro-Gly, который гидролизуетс тромбином по связи Arg-Gly.

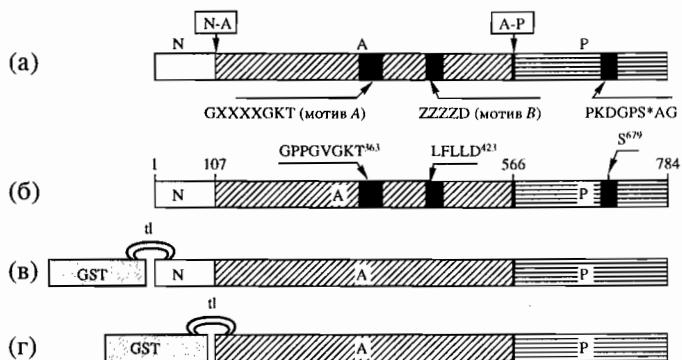


Рис.1. Схемы строения: АТР-зависимых Lon-протеиназ из различных источников (обобщенная, а), Lon-протеиназы *E. coli* (б) и гибридных белков, использованных для получения Lon-протеиназы (в) и ее двухдоменного фрагмента (г). N, А, Р – соответственно N-концевой, АТР-азный и протеолитический домены, N-А и А-Р – вставочные полипептидные фрагменты, GST – глутатион-S-трансфераза, tl – тромбинчувствительный линкер. Показана локализация консервативных фрагментов (мотивов А и В Уолкера и фрагмента, включающего каталитически активный остаток серина).

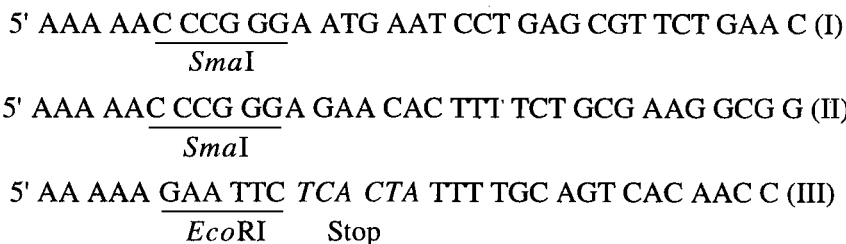
Фрагменты ДНК, кодирующие полноразмерную и модифицированную Lon-протеиназу, получали полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием в качестве матрицы ранее сконструированного экспрессионного вектора рВR327lon [10].

Использовали синтетические праймеры (I) – (III). Праймеры (I) и (II) – прямые, частично комплементарные участкам цепи ДНК, кодирующим N-концевые аминокислотные последовательности полноразмерной Lon-протеиназы (NAP) или ее двухдоменного фрагмента (AP) в составе гибридного белка; праймер (III) – обратный, частично комплементарный участку кодирующей цепи гена *lon*, содержащему стоп-кодону (выделены

Таблица 1. Сравнение Lon-протеиназ из различных источников

№	Источник	Число аминокислотных остатков					Всего	Ссылки
		N-домен	N-A	A-домен	A-P	P-домен		
1	<i>Escherichia coli</i>	107	–	459	–	218	784	[8–10]
2	<i>Erwinia amylovora</i>	107	–	459	–	218	784	[11]
3	<i>Bacillus brevis</i>	106	–	460	–	213	779	[12]
4	<i>B. subtilis</i>	105	–	460	–	210	775	[13]
5	<i>Mycococcus xanthus V</i>	119	–	459	–	239	817	[14]
6	<i>M. xanthus D</i>	130	–	461	–	237	828	[15]
7	<i>Borrelia burgdorferi</i>	138	–	464	–	206	808	В [3]
8	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	96	–	466	–	217	779	[16]
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	288	85	471	53	219	1116	[17, 18]
10	<i>Homo sapiens</i>	201	45	466	–	225	937	[19, 20]
	Гомология	<20%	–	~50%	–	~55%		

курсивом). Праймеры содержали последовательность сайтов узнавания рестриктаз *Sma*I и *Eco*RI, использованных при клонировании в экспрессионном векторе pGEX-KG.



Аmplифицированные фрагменты ДНК размером 2352 и 2028 п.о. выделяли из 1% агарозного геля и последовательно обрабатывали рестриктазами *Sma*I и *Eco*RI. В результате клонирования полученных фрагментов ДНК в плазмидном векторе pGEX-KG были получены рекомбинантные плазмиды pGEX-NAP и pGEX-AP.

Экспрессию соответствующих генов проводили в клетках *E. coli* штамма МН I. Индукцию *tac*-промотора (P_{tac}) осуществляли добавлением IPTG. Клетки осаждали центрифугированием. Накопление рекомбинантных белков контролировали электрофорезом в 10% ПААГ в присутствии SDS (рис. 3).

В результате были получены гибридные белки (в растворимой форме), содержащие полноразмер-

ную (остатки 1-784) Lon-протеиназу (GST-tl-NAP, *M* 113 кДа) (рис. 1в) и укороченную (остатки 107-784) Lon-протеиназу (GST-tl-AP, *M* 101 кДа) (рис. 1г), tl – тромбинчувствительный линкер. Выход гибридных белков по данным гель-электрофореза составил около 30% суммарного белка клетки (рис. 3). Полученные гибридные белки можно рассматривать как Lon-протеиназу с модифицированным N-концевым доменом: увеличенным (в случае GST-tl-NAP) или полностью замененным (в случае GST-tl-AP).

При выделении гибридных белков клетки разрушали ультразвуком и после центрифугирования получали бесклеточный экстракт. Далее использовали один из двух вариантов: 1) последовательная хроматография на фосфоцеллюлозе P-11 и на DEAE-ТоуоРearl (стандартная методика выделения Lon-протеиназы [21]) или 2) аффинная хроматография на глутатион-агарозе, сорбирующей только GST-содержащие белки, которые элюировали далее раствором восстановленного глутатиона [25, 26]. Чистота полученных препаратов гибридных белков в обоих вариантах составляла около 90% (по данным гель-электрофореза). Выход гибридного белка достигал 5 мг на 1 г клеток *E. coli*, что более чем на порядок превышает выход Lon-протеиназы в случае использования экспрессионной конструкции pBR327lon [21].

Гидролиз гибридных белков GST-tl-NAP и GST-tl-AP тромбином [26] по связи -Arg-Gly- в тромбинчувствительном линкере приводит к образованию целевых белков – Lon-протеиназы и ее двухдоменного фрагмента (NAP и AP соответственно), содержащих на N-концевых частях молекул дополнительный тетрапептид Gly-Ser-Pro-Gly. Строение полученных белков подтверждено N-концевым аминокислотным секвенированием (15 а.о.).

Сравнительные данные по АТФ-зависимой протеолитической и АТФ-азной активности исследуемых препаратов и нативной Lon-протеиназы (табл. 2) свидетельствуют о том, что удлинение N-концевой части Lon-протеиназы на 4 (NAP) и на 226 а.о. (GST-tl-NAP) практически не влияет на энзиматические характеристики фермента.

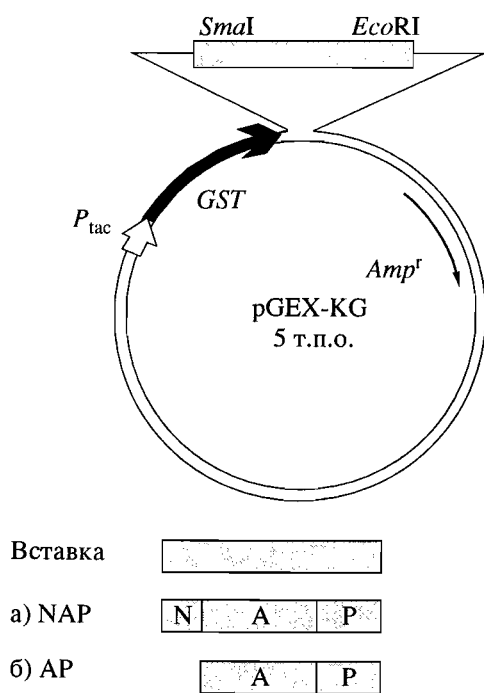


Рис. 2. Экспрессионный вектор pGEX-KG со вставками NAP (а) и AP (б), черная стрелка – ген GST, вынесен полилинкер со вставкой и показаны сайты рестрикции, по которым проводилось клонирование.

Добавление казеина приводит к стимуляции гидролиза АТФ обеими модифицированными формами более чем в 2 раза, что также согласуется с результатами, полученными для нативной Lon-протеиназы.

В то же время замена N-концевого домена на GST (GST-tl-AP) значительно снижает и АТФ-зависимую протеолитическую активность, и АТФ-азную активность. Укороченная форма Lon-протеиназы (двухдоменный фрагмент, AP) практически полностью утрачивает оба вида активности.

Приведенные данные позволяют заключить, что структура N-концевого домена имеет важное значение для проявления Lon-протеиназой ферментативной активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и ферменты: трис-гидроксиметиламинометан (трис), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония, додецилсульфат натрия, агарозу, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, реагент для определения белка (Bio-Rad, США); этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), дитиотреит, бромистый этидий, бычий сывороточный альбумин (BSA), бычий α-казеин, глутатион-агарозу, восстановленный глутатион (Sigma, США); фосфоцеллюлозу P-11 (Whatman, Англия), DEAE-ToyoPearl (Toyo Soda, Япония); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Англия); динатриевую соль аденозин-5'-трифосфорной кислоты (АТФ) (Boehringer Mannheim, Германия), бычий тромбин (КФ 3.4.21.5), IPTG, эндонуклеазы рестрикции *Sma*I, *Eco*RI (Fermentas, Литва), бактериальную щелочную фосфатазу (Amersham, США), трихлоруксусную кислоту, глицерин ("Реахим", Россия). ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* и ДНК-лигаза фага Т4 любезно предоставлены В.М.Крамаровым. В работе использовался бак-

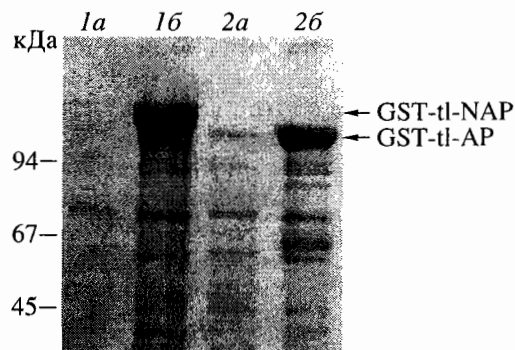


Рис.3. Электрофорез в 10% SDS-ПААГ лизатов клеток *E. coli* МН I, трансформированных плазмидами pGEX-NAP (1) и pGEX-AP (2); а) до индукции, б) через 3 ч после индукции IPTG. Стрелками показано положение целевых белков. Слева указаны стандарты молекулярных масс (кДа).

териальный штамм *E. coli*: МН-I (*araD139*, *lacX74*, *galU*, *galK*, *hsr*⁻, *hms*, *strA*).

Олигонуклеотидные праймеры (I) – (III) синтезированы в ИБХ РАН Н.С.Быстровым.

Клонирование и экспрессия полноразмерного гена *lon* и его фрагмента. Фрагменты ДНК, соответствующие нуклеотидным последовательностям полноразмерного и укороченного гена *lon*, были получены методом ПЦР при использовании в качестве матрицы плазмидного вектора pBR327lon [10]. Полученные фрагменты ДНК после рестрикции лигировали в вектор pGEX-KG [25] по сайтам узнавания рестриктаз. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки штамма МН I. Скрининг клонов, несущих соответствующие плазмидные конструкции, осуществляли с помощью рестриктного анализа. Приготовление компетентных клеток, трансформацию бактерий, выделение плазмидной ДНК, обработку рестриктазами и электрофорез ДНК проводили по стандартным методикам [27]. Экспрессию рекомбинантных генов проводили в клетках

Таблица 2. Ферментативная активность протеиназы Lon из *Escherichia coli* и ее модифицированных форм*

Форма фермента	АТФ-зависимая протеолитическая активность, %	АТФ-азная активность					
		базовая			в присутствии казеина		
		k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , (мМ мин) ⁻¹	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , (мМ мин) ⁻¹
Нативный	100	19	0.20	95	48	0.18	267
GST-tl-NAP	100	22	0.23	96	46	0.21	219
NAP	100	20	0.21	95	47	0.19	247
GST-tl-AP	5	3	0.36	8	Не определяли		
AP	1			<5	Не определяли		

* Условия проведения реакций описаны в "Экспер. части". Кинетические параметры определены с точностью 10% для k_{cat} и 25% для K_m .

E. coli штамма МН I. Ночную культуру трансформированных соответствующей плазмидой бактерий (среда LB, содержащая 100 мкг/мл ампициллина) разбавляли в соотношении 1 : 100 этой же средой с добавлением антибиотика и наращивали биомассу при 37°C и интенсивной аэрации до достижения значения оптического поглощения A_{600} 0.3–0.5. Добавляли IPTG до конечной концентрации 0.5 mM. Индукцию проводили течение 3–4 ч, затем осаждали клетки центрифугированием.

Выделение гибридных белков. Осадок клеток, полученный из 200 мл культуры, ресуспендировали в 5 мл охлажденного 50 mM трис-HCl-буфера (pH 7.3), содержащего 10% глицерин (буфер А). Полученную суспензию обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора, разбавляли до 10 мл тем же буфером и центрифугировали (30 мин, 40000g). Бесклеточный экстракт наносили со скоростью 3 мл/ч на колонку (1.0 × 3 см) с глутатион-агарозой, предварительно уравновешенной буфером А. Колонку промывали от несвязавшихся белков буфером А. Элюцию белка осуществляли буфером А, содержащим 5 mM восстановленный глутатион. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [28] с помощью реагента фирмы Bio-Rad; фракции анализировали с помощью SDS-электрофореза по Лэммли [29].

Гидролиз гибридных белков тромбином проводили 2 ч при 25°C в 1.5 мл реакционной смеси, содержащей 0.5 мг гибридного белка и 6 мкл тромбина (330 ед. акт./мл) в буфере А.

Протеолитическую активность препаратов ферментов определяли по их способности к гидролизу [14 C]ацетил- α -казеина как описано в работе [30].

АТР-азную активность определяли по методике, описанной в работе [30].

Работа была выполнена при финансовой поддержке International Science Foundation (гранты NF8000 и NF8300), Российского фонда фундаментальных исследований (грант 96-04-50239) и Государственной научно-технической программы "Новейшие методы белковой инженерии" (грант 03.0004Н-342).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goldberg A.L., Swamy K., Chung C., Larimore F. // *Meth. Enzymol.* 1981. V. 80. P. 680-702.
- Goldberg A.L., Morschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 244. P. 350-375.
- Gottesman S., Wickner S., Jubete Y., Singh S.K., Kessel M., Maurizi M. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1995. V. 60. P. 533-548.
- Maurizi M.R. // 1992. *Experientia.* V. 48. P. 178-201.
- Goldberg A.L. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 203. P. 9-23.
- Gottesman S., Maurizi M.R. // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. P. 592-621.
- Phillips T., Van Bogelen R., Neidhardt F. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 159. P. 283-287.
- Chin D.T., Goff S.A., Webster T., Smith T., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 11718-11728.
- Америк А.Ю., Чистякова Л.Г., Остроумова Н.И., Гуревич А.И., Антонов В.К. // *Биоорган. химия.* 1988. Т. 14. С. 408-411.
- Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 869-880.
- Eastage J.A., Taylor N., Coleman M.J., Healy B., Thompson L., Roberts I.S. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P. 932-937.
- Ito K., Udaka S., Yamagata H. // *J. Bacteriol.* 1990. V. 174. P. 2281-2287.
- Riethdorf S.U., Volker U., Gerth U., Winkler A., Engelmann S., Hecker M. // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. P. 6518-6527.
- Tojo N., Inouye S., Komano T. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 2271-2277.
- Tojo N., Inouye S., Komano T. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 4545-4549.
- Roudiak S.G., Seth A., Knipfer N., Shrader Th. E. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 377-386.
- Suzuki C., Suda K., Wang N., Schatz G. // *Science.* 1994. V. 264. P. 273-276.
- Van Dyck L., Pearce D.A., Sherman F. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 238-242.
- Wang N., Gottesman S., Willingham M.C., Gottesman M.M., Maurizi M.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 11247-11251.
- Aмерик А.Ю., Петухова Г.В., Григоренко В.Г., Лыков И.П., Яаровои С.В., Держанова Н.И., Липкин В.М., Горбаленя А.Е. // *FEBS Lett.* 1994. V. 340. P. 25-28.
- Ротанова Т.В., Котова С.А., Америк А.Ю., Лыков И.П., Гиноман Л.М., Антонов В.К. // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 114-125.
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. // *EMBO J.* 1982. V. 1. P. 945-951.
- Aмерик А.Ю., Антонов В.К., Горбаленя А.Е., Котова С.А., Ротанова Т.В., Шимбаревич Е.В. // *FEBS Lett.* 1991. V. 287. P. 211-214.
- Wagner I., van Dyck L., Savel'ev A.S., Neupert W., Langer T. // *Embo J.* 1997. V. 16. P. 7317-7325.
- Guan K.L., Dixon J. E. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 192. P. 262-267.
- Smith D.B., Johnson K.S. // *Gene.* 1988. V. 67. P. 31-40.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
- Bradford M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248-254.
- Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680-685.
- Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Гиноман Л.М., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 1998. Т. 24. С. 293-299.

Mutant Forms of the *Escherichia coli* Lon Protease with a Modified *N*-Terminal Domain

F. S. Rasulova[#], N. I. Dergousova, E. E. Mel'nikov, L. M. Ginodman, and T. V. Rotanova

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

The functional domain boundaries of the ATP-dependent Lon proteases were identified by comparative analysis of the amino acid sequences of the enzymes from evolutionarily distant organisms. Modified forms of the *Escherichia coli* Lon protease with the elongated or substituted *N*-terminal domain and a truncated enzyme lacking the *N*-terminal domain were obtained through genetic engineering methods. Analysis of the enzymatic properties of the resulting modified forms of Lon protease revealed the importance of the *N*-terminal domain in its function.

Key words: protease Lon, serine protease, domain-domain interactions, lon gene, recombinant genes, hybrid proteins, Escherichia coli

[#] To whom correspondence should be addressed (phone: (095)335-4222; e-mail: fatima@enzyme.siobc.ras.ru).