



УДК 577.152.342\*153.02

**Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl – НОВЫЙ СУБСТРАТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АТР-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ  
*Escherichia coli* И ЕЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ**© 1998 г. Э. Э. Мельников, К. Б. Цирульников, Ф. С. Расулова,  
Л. М. Гинодман, Т. В. Ротанова<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 20.04.98 г.

Принято к печати 27.04.98 г.

Предложен высокочувствительный субстрат Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl для исследования функционирования АТР-зависимой Lon-протеиназы из *Escherichia coli* и ее модифицированных форм. Охарактеризован гидролиз субстрата, и показано, что эстеразная активность, проявляемая ферментом, оказывается нуклеотидрегулируемой.

*Ключевые слова:* АТР-зависимый протеолиз; Lon-протеиназа; активный центр; эстераза; *E. coli*.

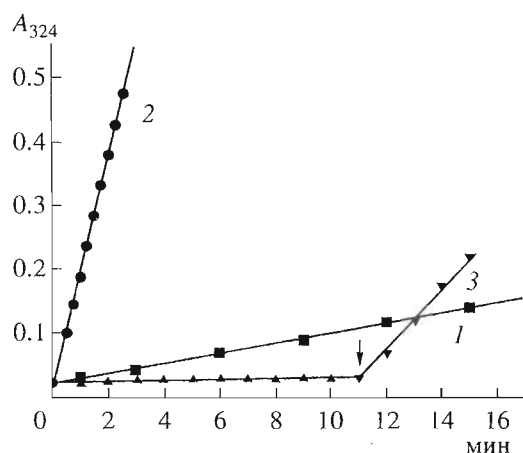
АТР-зависимая Lon-протеиназа из *Escherichia coli* (КФ 3.4.21.53) – представитель уникального семейства энергозависимых сериновых протеиназ, осуществляющих внутриклеточную селективную деградацию ряда короткоживущих регуляторных белков, а также дефектных и мутантных белков [1–5]. Фермент функционирует как гомотетрамер, субъединица которого представлена одной полипептидной цепью и состоит из трех функциональных доменов: N-концевого, АТР-азного (центральный домен) и протеолитического (С-концевой домен) [2, 6].

В Lon-протеиназе идентифицирован каталитически активный остаток серина протеолитического центра (Ser<sup>679</sup>) [7]; выявлен ряд остатков, участвующих в системе сопряжения протеолитической и АТР-азной функций фермента [8, 9]. Получены индивидуальный протеолитический домен Lon-протеиназы [10] и “укороченный” фермент, состоящий только из АТР-азного и протеолитического доменов [6], и охарактеризованы их энзиматические свойства. При этом протеолитическую активность препаратов Lon-протеиназы исследовали по гидролизу белкового субстрата – [<sup>14</sup>C]ацетил- $\alpha$ -казеина [11] или по гидролизу пептидного субстрата – мелиттина [10]. Ранее в ряде работ при исследовании Lon-протеиназы использовали также флуорогенные пептидные субстраты [2, 12, 13]. Скорость гидролиза этих субстратов ферментом, как правило, невы-

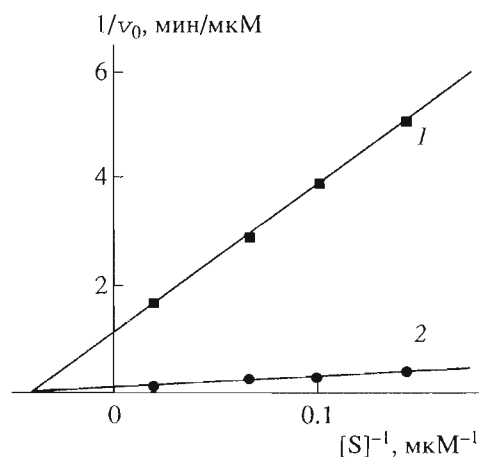
сока, а для регистрации продукта гидролиза требуется высокочувствительный спектрофлуориметр с автоматической детекцией интенсивности флуоресценции. Во всех случаях методика определения активности многостадийна. Таким образом, очевидно, что поиск доступного и удобного субстрата для тестирования протеолитической активности Lon-протеиназы и ее модифицированных форм – весьма актуальная задача.

Потенциальными субстратами Lon-протеиназы могли оказаться сложноэфирные соединения. В частности, был исследован Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, предложенный ранее как чувствительный субстрат для сериновых протеиназ [14, 15]. Гидролиз Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl регистрируется спектрофотометрически по величине оптического поглощения 4-тиопиридона ( $\epsilon_{324} 19\ 800\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолат) с находящимся в реакционной смеси 4,4'-дитиодипиридином [14]. Тиоэфирный субстрат можно рассматривать как аналог одного из флуорогенных амидных субстратов Lon-протеиназы [12]. Как видно из рис. 1, Lon-протеиназа гидролизует этот субстрат в отсутствие АТР; в присутствии АТР-Mg скорость гидролиза значительно возрастает, а ADP ингибирует этот процесс. Активность, утраченная после введения в систему ADP, быстро и эффективно восстанавливается при добавлении АТР-Mg (рис. 1). Следует отметить, что самостоятельно ни АТР, ни Mg<sup>2+</sup> не оказываются эффективными активаторами эстеразной активности Lon-протеиназы, хотя некоторые признаки активации свободным АТР могут быть зарегистрированы (таблица).

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 335-42-22; e-mail: Rotanova@cnzyme.iobc.ras.ru).



**Рис. 1.** Гидролиз Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl Lon-протеиназой: 1 – в отсутствие ATP и MgCl<sub>2</sub>; 2 – в присутствии ATP и MgCl<sub>2</sub>; 3 – в присутствии ADP и MgCl<sub>2</sub> (стрелкой показан момент добавления 1 mM ATP). Условия проведения реакции: 50 mM Трис-НСl-буфер (рН 8,0), 0,1 M NaCl, 10% DMSO. Концентрации: субстрата – 50 мкМ, фермента – 0,45 мкМ, нуклеотидов и MgCl<sub>2</sub> – 1 mM.



**Рис. 2.** Кинетика гидролиза Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl Lon-протеиназой:

1 – в отсутствие эфффекторов ( $k_{cat}$  2,0 мин<sup>-1</sup>,  $K_m$  20 мкМ); 2 – в присутствии 1 mM ATP-Mg ( $k_{cat}$  40 мин<sup>-1</sup>,  $K_m$  30 мкМ).

Преимущества рассматриваемого метода тестирования активности протеолитического центра Lon-протеиназы по сравнению с ранее использованными методами [10, 11] состоят в возможности непрерывной регистрации образования продукта и в высокой чувствительности, позволяющей проводить надежное тестирование малых активностей.

Метод был применен при исследовании мутантных форм Lon-протеиназы. Оказалось, что мутантный по АТФ-азному центру фермент (Lon-K362Q [9]), утративший способность к гидролизу белкового субстрата (казеин), гидролизует тиоэфирный субстрат, причем эстеразная активность Lon-K362Q оказывается нуклеотиднезависимой (таблица). Это подтверждает высказанное в работе [9] предположение об участии остатка К362 в системе передачи сигнала от АТФ-азного центра на протеолитический. В то же время форма Lon-протеиназы с мутацией по каталитическому остатку серина в протеолитическом центре (Lon-S679A [7]), как и следовало ожидать, не проявляет эстеразной активности (таблица).

Из данных по кинетике гидролиза Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl в присутствии и в отсутствие АТФ-Mg (рис. 2) видно, что присутствие активатора приводит к значительному (примерно в 20 раз) увеличению эффективного значения  $k_{cat}$  гидролиза эфирного субстрата, изменение  $K_m$  при этом незначительно. Из этих результатов следует, что конформационные изменения молекулы фермента, происходящие под действием нуклеотидов, преимущественно влияют на каталитический, а не на связывающий участок протеолитического центра Lon-протеиназы.

Таким образом, взаимодействие Lon-протеиназы с Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl оказывается нуклеотидрегулируемым, что хорошо соотносится с данными о взаимодействии фермента с другими известными субстратами и позволяет использовать Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl в качестве модельного субстрата при исследовании Lon-протеиназы – в частности, при установлении кинетического механизма сопряжения гидролиза АТФ с функционированием протеолитического центра фермента.

В заключение следует отметить, что Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl – не единственный эфирный субстрат, подвергающийся гидролизу Lon-протеиназой. Нами начато исследование гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров пропионовой и капроновой кислот этим ферментом.

Гидролиз Suc-Phe-Leu-SBzl Lon-протеиназой и ее мутантными формами\*

Эффектор	Lon-протеиназа	Lon-K362Q	Lon-S679A
Нет	0.65	3.10	0
Mg <sup>2+</sup>	0.65	3.0	н. о.
АТФ	1.80	3.0	н. о.
АТФ, Mg <sup>2+</sup>	12.5	3.05	0
ADP	0.1	3.0	н. о.
ADP, Mg <sup>2+</sup>	0.05	3.10	н. о.

\* Активность фермента выражена в мкмоль субстрата/(мкмоль фермента × мин).

Условия проведения реакции приведены в подписи к рис. 1; н. о. – не определяли.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottesman S. // Ann. Rev. Genet. 1996. V. 30. P. 465–506.
2. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // Meth. Enzymol. 1994. V. 244. P. 350–375.
3. Goldberg A.L. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 203. P. 9–23.
4. Maurizi M.R. // Experientia. 1992. V. 48. P. 178–201.
5. 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.
6. Расулова Ф.С., Дергоусова Н.И., Мельников Э.Э., Гинодман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 367–371.
7. Amerik A.Yu., Antonov V.K., Gorbalenya A.E., Kotova S.A., Rotanova T.V., Shimbarevich E.V. // FEBS Lett. 1991. V. 287. P. 211–214.
8. Starkova N.N., Koroleva E.P., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // FEBS Lett. 1998. V. 422. P. 218–220.
9. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Гинодман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 293–299.
10. Rasulova F.S., Dergousova N.I., Starkova N.N., Melnikov E.E., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // FEBS Lett. (in press).
11. Ротанова Т.В., Котова С.А., Америк А.Ю., Лыков И.П., Гинодман Л.М., Антонов В.К. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 114–125.
12. Waxman L., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 12022–12028.
13. Fischer H., Glockshuber R. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 22502–22507.
14. Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. // Anal. Biochem. 1979. V. 99. P. 53–64.
15. Harper J.W., Ramirez G., Powers J.C. // Anal. Biochem. 1981. V. 118. P. 382–387.

### Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, a New Substrate for Studying the Function of *Escherichia coli* ATP-dependent Lon Protease and Its Modified Forms

E. E. Melnikov, K. B. Tsirulnikov, F. S. Rasulova, L. M. Ginodman, and T. V. Rotanova<sup>#</sup>

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

A new efficient substrate, Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, was proposed for studying the function of the *Escherichia coli* ATP-dependent Lon protease and its modified forms. The kinetic parameters of hydrolysis of the substrate were determined. The esterase activity of protease Lon was found to be nucleotide-regulated.

*Key words:* ATP-dependent proteolysis, Lon protease, active site, esterase, *E. coli*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: (095) 335-4222; e-mail: rotanova@enzyme.siobc.ras.ru.