



СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АТФ-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ *Escherichia coli*

© 1999 г. Т. В. Ротанова[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 05.04.99 г. Принята к печати 13.05.99 г.

Представлены данные о ферментативных свойствах и структурных особенностях АТФ-зависимой Lon-протеиназы *Escherichia coli* и ее мутантных и модифицированных форм. Выявлены аминокислотные остатки, существенные для функционирования протеолитического и АТФ-азного центров фермента и для передачи междоменного сигнала сопряжения активностей. Показано, что только полноразмерный фермент обладает способностью к гидролизу белковых субстратов, а изолированный протеолитический домен проявляет пептидгидролазную активность.

Ключевые слова: АТФ-зависимый протеолиз; Lon-протеиназа; активный центр; сайт-направленный мутагенез; междоменные взаимодействия; *Escherichia coli*.

Внутриклеточная деградация белков – строго контролируемый процесс. В цитозоле, ядре и митохондриях эукариотических клеток и в цитоплазме бактериальных клеток этот процесс осуществляется главным образом высокоселективными мультимерными энергозависимыми протеиназами [1–4]. Протеолитическая активность этих ферментов сопряжена с гидролизом АТФ, что выделяет их в особую группу протеиназ. В клетках *Escherichia coli* к настоящему времени обнаружено пять АТФ-зависимых протеиназ [5]: Lon (La), FtsH (HflB), ClpAP (Ti), ClpXP и HslVU (ClpQY). Первые два фермента относятся к семейству AAA (ATPases Associated with a variety of cellular Activities)-белков, их протеолитический и АТФ-азный центры локализованы в одной полипептидной цепи, и они функционируют как гомоолигомеры. Остальные три фермента – представители семейства Clp (Chaperone-linked proteases)-протеиназ и представляют собой гетероолигомеры, состоящие из протеолитических (ClpP или HslV) и регуляторных АТФ-азных (ClpA, ClpX или HslU) субъединиц. Lon [3, 6], ClpAP и ClpXP [7] – сериновые протеиназы; каталитически активным остатком HslVU является треонин [8], а FtsH охарактеризована как Zn-зависимая металлопротеиназа [9]. Несмотря на существенные успехи в исследовании АТФ-зависимых протеиназ, природа селективности и механизм сопряжения АТФ-азной и протеолитической активностей у этих ферментов до настоящего времени не выяснены.

Первой обнаруженной АТФ-зависимой протеиназой явилась Lon-протеиназа из *E. coli* (КФ 3.4.21.53; далее – Lon-протеиназа, Lon) [10,

11]. В дальнейшем стало ясно, что ферменты субсемейства Lon-протеиназ присутствуют в клетках самых различных организмов от прокариот до эукариот. В *E. coli* Lon-протеиназа осуществляет селективную деградацию ряда короткоживущих регуляторных белков, а также освобождает клетки от дефектных и мутантных белков [1–4].

Lon-протеиназа стала объектом нашего изучения в 1987 г. Общая задача исследования состояла в выявлении особенностей строения и функционирования фермента, которые отличают Lon-протеиназу от “классических” протеиназ и которые определяются сопряжением протеолиза и гидролиза АТФ.

На начальных этапах работы нами был клонирован ген *lon* *E. coli*, определена его структура и выведена аминокислотная последовательность Lon-протеиназы (784 а.о.) (рис. 1а) [12, 13]. Практически одновременно в литературе была опубликована структура *lon*-гена и соответствующая первичная структура Lon-протеиназы, отличающаяся от предложенной нами в области остатков 264–317 и 539–563 [14]. Для выяснения истинной структуры Lon-протеиназы фермент был наработан в препаративных количествах (с помощью специально созданного штамма *E. coli* AB 1899/pBRlon) и подвергнут химической фрагментации по остаткам триптофана BNPS-скатолом [15]. Результаты определения N-концевой последовательности полученных фрагментов молекулы фермента позволили сделать выбор в пользу структуры, установленной в нашей лаборатории.

Изучение активности Lon-протеиназы в отношении гидролиза ряда белковых и пептидных

[#] Тел.: (095) 335-42-22; e-mail: rotanova@ibch.siohc.ras.ru.

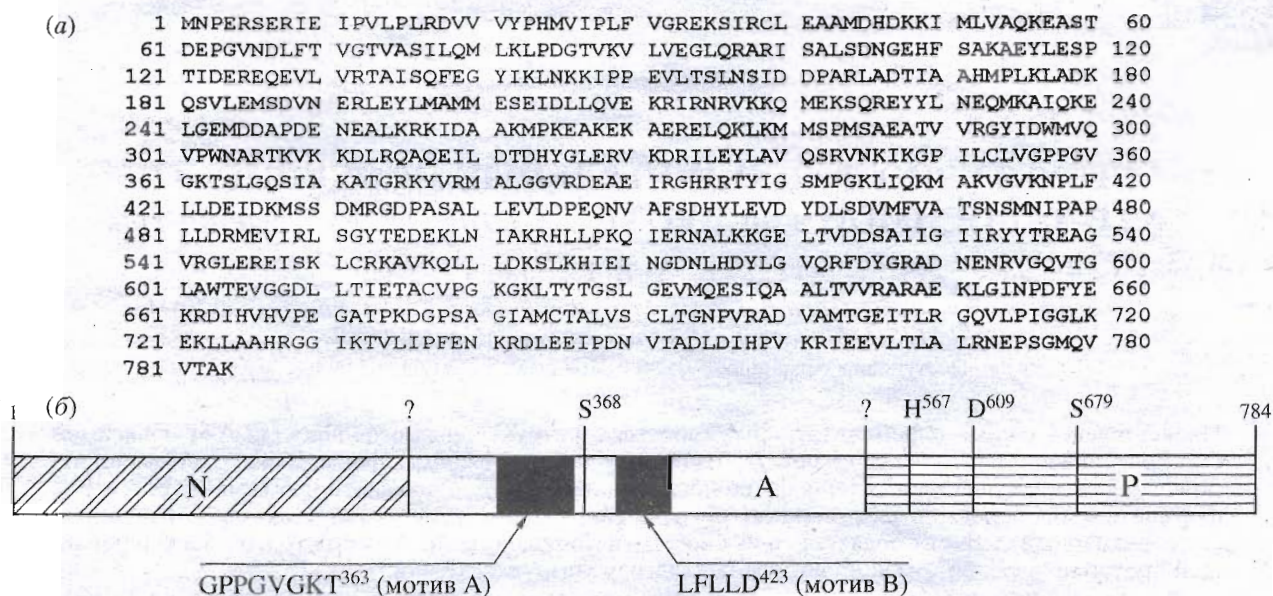


Рис. 1. Первичная структура [13] (а) и схема строения по данным работы [6] (б) полипептидной цепи Lon-протеиназы *E. coli*. Показаны мотивы Уолкера А и В и отмечена локализация аминокислотных остатков, тестируемых на принадлежность к протеолитическому центру; знаками "?" отмечены предполагаемые границы доменов.

субстратов привело к заключению о том, что фермент не обладает выраженной первичной специфичностью [15] и гидролизует белковые субстраты по процессивному механизму [1, 3]. Данные по частичной инактивации Lon-протеиназы под действием диэтилопропилфторфосфата позволяли отнести фермент к семейству сериновых протеиназ [16], однако анализ первичной структуры показал отсутствие в молекуле фермента характерных для известных "классических" сериновых протеиназ консервативных фрагментов последовательностей, содержащих каталитически активные остатки серина, гистидина и аспарагиновой кислоты [17]. Вместе с тем в центральной части молекулы были обнаружены мотивы Уолкера А и В (рис. 1б) – консервативные фрагменты последовательности, характерные для ряда АТФ-связывающих белков и АТФ-аз, участвующие в связывании нуклеотида и иона магния [18]. В.К. Антоновым с сотр. была сформулирована концепция [6], согласно которой субъединица Lon-протеиназы состоит из трех последовательно соединенных функциональных доменов: N-концевого (N-домен, около 330 а.о.), центрального, обладающего АТФ-азной активностью (А-домен, около 200 а.о.) и С-концевого – протеолитического (Р-домен, около 250 а.о.) (рис. 1б), при этом некоторые косвенные признаки свидетельствовали в пользу того, что каталитически активен остаток Ser679 Р-домена [6, 13]. В это же время в литературе на роль каталитически активного был предложен другой остаток, а именно, Ser368 [19], который в соответствии с вышеизложенной концепцией принадлежит А-домену. Выбор между этими двумя вари-

антами был сделан после получения мутантных форм Lon-протеиназы, в которых предполагаемые каталитически активные остатки серина (рис. 1б) были заменены на аланин [15]. Оказалось, что у мутанта Lon-Ser368Ala сохраняется АТФ-зависимая протеолитическая активность, а мутант Lon-Ser679Ala полностью ее утрачивает. Таким образом, было показано, что каталитически активным является остаток Ser679, то есть получено подтверждение справедливости предположения, что именно С-концевая часть молекулы Lon-протеиназы содержит протеолитический активный центр [15].

Исходя из представления о том, что каталитический центр сериновой протеиназы должен быть представлен "классической" триадой аминокислот – Ser, His, Asp – была предпринята попытка идентифицировать в Lon-протеиназе остальных участников триады. Поскольку на рассматриваемом этапе исследования была известна первичная структура единственного представителя подсемейства сериновых Lon-протеиназ – фермента из *E. coli*, не включающего, как было отмечено выше, фрагментов последовательности, подобных консервативным участкам последовательностей известных сериновых протеиназ, в основу поиска был положен фактор удаленности от остатка Ser679 (вдоль полипептидной цепи) потенциальных каталитически активных остатков His и Asp. В молекулах ключевых ферментов известных подсемейств сериновых протеиназ каталитические триады представлены остатками Ser195, His57 и Asp102 (химотрипсин, 243 а.о.) и Ser221, His64 и Asp32 (субтилизин, 275 а.о.) [17]

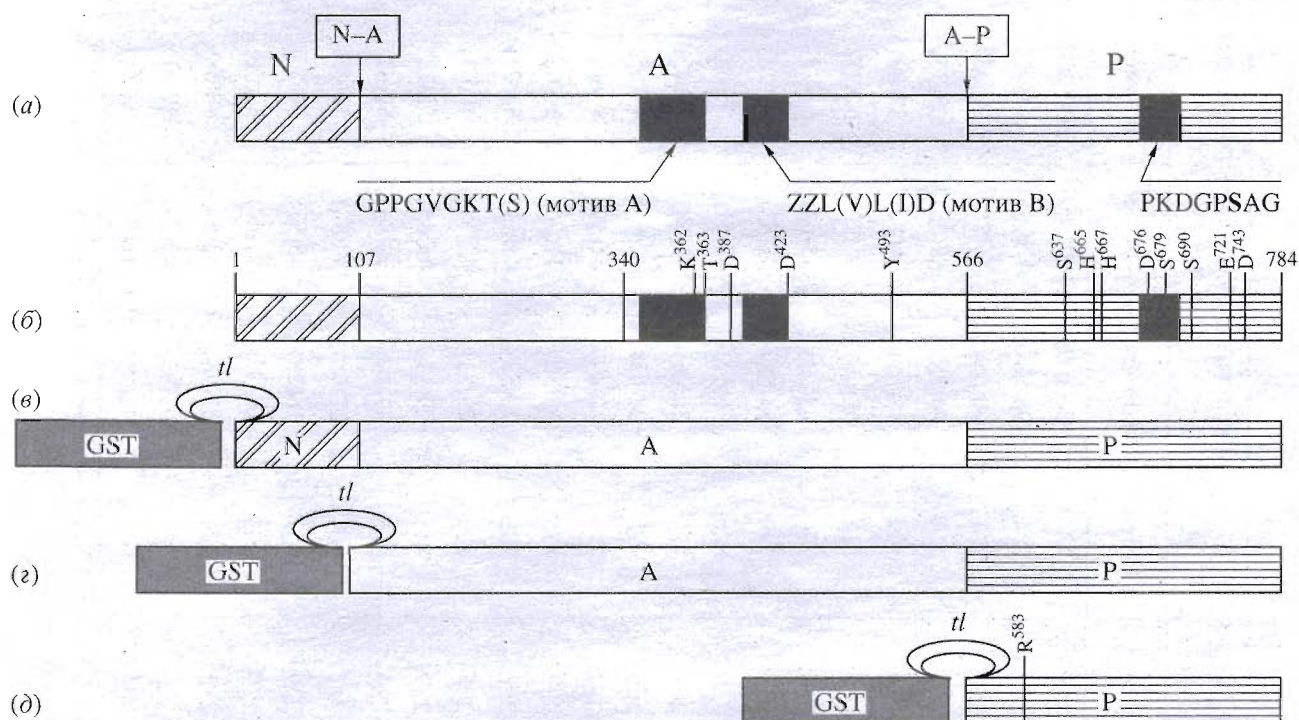


Рис. 2. Схемы строения Lon-протеиназ из различных источников: обобщенная (а), Lon-протеиназы *E. coli* (б) и гибридных белков, использованных для получения Lon-протеиназы (в), ее двухдоменного фрагмента (г) и изолированного протеолитического домена (д). N, A, P – соответственно N-концевой, АТФ-азный и протеолитический домены, N–А и А–Р – междоменные фрагменты, GST – глутатион-S-трансфераза, tl – тромбинчувствительный линкер. Показаны локализация консервативных фрагментов (мотивов А и В Уолкера и участка, включающего каталитически активный остаток серина); аминокислотные остатки, подвергнутые сайт-направленному мутагенезу (б) и положение расщепляемой при автолизе связи (д).

(следует заметить, что в обоих случаях активный остаток серина локализован в С-концевой части молекул ферментов, в то время как у Lon-протеиназы Ser679 занимает центральное положение в протеолитическом домене, рис. 1б). По аналогии с химотрипсином в пределах протеолитического домена Lon-протеиназы потенциально активными остатками представлялись His567 и Asp609. Однако было установлено, что эти остатки не принадлежат активному центру Lon-протеиназы, так как соответствующие мутантные формы фермента (Lon-His567Tyr и Lon-Asp609Asn) сохраняют АТФ-зависимую протеолитическую активность (Америк А.Ю., Ротанова Т.В., неопубликованные данные).

Результаты проведенных на начальном этапе исследований [6, 12, 13, 15] в совокупности с литературными данными [1, 3] позволили охарактеризовать Lon-протеиназу как фермент, который отличается от классических сериновых протеиназ следующими особенностями: (1) протеолиз имеет место только в условиях функционирования АТФ-азного центра фермента; в то же время в отсутствие белкового субстрата фермент проявляет АТФ-азную активность ("базовая" активность), которая возрастает при добавлении белка-субстрата; (2) фермент обнаруживает высокую селектив-

ность по отношению к субстратам (белки-мишени) и осуществляет процессивную их деградацию при отсутствии выраженной первичной специфичности; (3) протеолитический центр условно можно подразделить на центр узнавания белкового субстрата (центр селективности) и пептидгидролазный центр, состоящий из области связывания остатков, примыкающих к гидролизуемой связи, и каталитического центра; (4) субъединица Lon-протеиназы имеет доменную организацию; (5) фермент функционирует как гомотетрамер.

Начало современного этапа исследования Lon-протеиназы можно отнести к появлению данных об аналогах гена *lon* и кодируемых ими ферментах из других источников. В настоящее время подсемейство Lon-протеиназ включает более 20 представителей (табл. 1, [20]) с размерами субъединиц от 774 до 1133 а.о. (среди них – Lon-протеиназа из мозга человека, структура которой практически одновременно была определена в нашей лаборатории и в лаборатории проф. Готтесмана [21, 22]). Сопоставление первичных структур ферментов из эволюционно отдаленных источников позволило выявить наличие междоменных полипептидных участков в молекулах некоторых ферментов, уточнить границы доменов (рис. 2а, б,

Таблица 1. Сравнение Lon-протеиназ из различных источников*

Номер	Источник	Число аминокислотных остатков						Степень подобия с Lon-протеиназой <i>E. coli</i> , %		
		N-домен	N-A-фрагмент	A-домен	A-P-фрагмент	P-домен	Всего	N-домен	A-домен	P-домен
1	<i>Escherichia coli</i>	107	—	459	—	218	784	100(100)	100(100)	100(100)
2	<i>Erwinia amylovora</i>	107	—	459	—	218	784	98(98)	92(95)	94(96)
3	<i>Haemophilus influenzae</i>	105	—	461	—	237	803	60(65)	75(81)	79(86)
4	<i>Azospirillum brasilense</i>	112	—	461	—	237	810	60(75)	68(78)	63(75)
5	<i>Caulobacter crescentus</i>	103	—	458	—	238	799	58(68)	64(74)	57(69)
6	<i>Mycococcus xanthus</i> V	119	—	459	—	239	817	52(66)	61(72)	62(73)
7	<i>Bacillus subtilis</i>	105	—	459	—	210	774	48(63)	55(68)	61(72)
8	<i>Bacillus brevis</i>	106	—	459	—	214	779	54(68)	55(68)	56(70)
9	<i>Mycococcus xanthus</i> D	128	—	460	—	238	826	36(52)	48(61)	53(68)
10	<i>Mycoplasma genitalium</i>	109	—	480	—	206	795	30(46)	43(58)	50(62)
11	<i>Mycoplasma pneumonia</i>	109	—	480	—	206	795	28(45)	42(57)	49(63)
12	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	96	—	466	—	217	779	30(45)	44(57)	47(60)
13	<i>Helicobacter pylori</i>	103	—	503	—	229	835	23(36)	41(56)	56(68)
14	<i>Campylobacter jejuni</i>	109	—	467	—	217	793	28(52)	41(59)	54(72)
15	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1)***	138	—	462	—	206	806	29(53)	42(58)	49(65)
16	<i>Borrelia burgdorferi</i> (2)***	125	—	459	—	229	813	29(53)	46(63)	55(72)
17	<i>Zea mays</i> (1)***	151	—	470	25	239	885	33(49)	48(62)	52(67)
18	<i>Zea mays</i> (2)***	197	—	469	81	217	964	27(48)	44(57)	50(67)
19	<i>Shizosaccharomyces pombe</i>	265	23	516	24	239	1067	16(29)	45(57)	44(55)
20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	287	47	538	25	236	1133	19(35)	42(54)	39(56)
21	<i>Caenorhabditis elegans</i> *	190	59	475	35	212	971	33(48)	42(57)	48(68)
22	<i>Homo sapiens</i> [21]	177	45	489	—	226	937	21(35)	40(53)	42(61)
23	<i>Homo sapiens</i> [22]	202	45	489	—	226	962	34(55)	41(56)	44(62)

* Ссылки на данные по первичной структуре ферментов представлены в работе [20]; № 1–16 – прокариоты, № 17–23 – эукариоты.

** В скобках приведена степень подобия в процентах. В качестве подобных рассматривались аминокислоты следующих групп: (L, I, Y, V, F); (D, E); (K, R); (S, T).

*** (1) и (2) – белковые продукты двух разных генов *lon*.

табл. 1) и сделать ряд общих заключений в относительно структурной организации Lon-протеиназ:

1. N-Концевые домены Lon-протеиназ наиболее вариабельны по размеру (96–287 а.о.) и по структуре. Интересно отметить, что в N-доменах всех Lon-протеиназ консервативным является единственный остаток Gly72 (еще в четырех положениях локализованы подобные остатки), тем не менее степень подобия с ферментом *E. coli* для N-доменов различных Lon-протеиназ колеблется от 29 до 98% (табл. 1).

2. А-Домены Lon-протеиназ близки по размеру (458–538 а.о.), обладают высокой гомологией (табл. 1) и содержат мотивы Уолкера; следует отметить, что по данным работы [23] А-домен Lon-протеиназы *E. coli* представляет собой два субдомена (рис. 2б): фрагмент (108–339), состоящий из протяженных α -спиральных участков и предположительно обеспечивающий регуляторные функции фермента, и собственно АТФ-азный фрагмент (340–566), причем, степень подобия структур во втором субдоме существенно выше, чем в первом.

3. Р-Домены Lon-протеиназ мало различаются по размеру (206–239 а.о.), обладают наивысшей среди доменов степенью подобия (табл. 1), каталитически активный остаток серина (Ser679 для Lon-протеиназы *E. coli*) локализован в строго консервативном фрагменте последовательности PKDGPSAG (674–681), который не обнаруживается ни в одной из сериновых протеиназ других подсемейств.

Таким образом, ранее в работе [6] был практически правильно предсказан размер Р-домена, а постулированный авторами N-концевой домен из 330 а.о. на самом деле представляет собой совокупность N-домена, выявленного при сравнительном анализе структур Lon-протеиназ, и первого субдомена АТФ-азного домена Lon-протеиназы.

Полученные данные позволили конкретизировать задачи следующих этапов исследования Lon-протеиназы. Стало возможным подойти к выяснению природы селективности фермента. Естественно полагать, что доминирующее значение для селективности имеет сопряжение протеолиза с гидролизом АТФ, которое в значительной степени определяется междоменными взаимодействиями в ферменте. В связи с этим поиск каталитически активных остатков Lon-протеиназы был дополнен поиском остатков, участвующих в сопряжении активностей, то есть в передаче сигнала от АТФ-азного домена к протеолитическому. Инструментом исследования был выбран сайт-направленный мутагенез потенциально важных остатков (рис. 2б) с последующим изучением протеолитической и АТФ-азной активностей полученных мутантных форм Lon-протеиназы и влияния

Таблица 2. Энзиматические характеристики мутантных форм Lon-протеиназы и выявление нарушений в междоменных взаимодействиях [23, 24, 28]

Мутация	АТФ-зависимая протеолитическая активность, %	АТФ-азная активность**, %		НМВ*
		базовая	в присутствии казеина	
Нативный фермент	100	100	250	–
Мутации в Р-домене				
Ser637Ala	100	н. о.	н. о.	–
Ser679Ala	0	94	175	–
Ser690Ala	100	н. о.	н. о.	–
His665Tyr	0	4.4	8.7	+
His667Tyr	0	3.2	7.4	+
Asp676Asn	0	6.0	6.4	+
Asp743Asn	100	н. о.	н. о.	–
Glu721Gln	100	н. о.	н. о.	–
Мутации в А-домене				
Lys362Gln	0	20	20	+
Thr363Ala	0	18	17	+
Asp387Asn	80	21	130	–
Asp423Asn	30	18	18	±
Tyr493Phe	50	250	250	±

* НМВ – нарушения междоменных взаимодействий, возникающие в результате мутации; (+ или –) – наличие или отсутствие нарушений соответственно.

** н. о. – не определяли.

белкового субстрата на АТФ-азную активность. Другим направлением исследования явилось получение индивидуальных доменов фермента или их комбинаций и изучение свойств этих белков в сравнении со свойствами соответствующих доменов в составе полноразмерного фермента (рис. 2в–д).

При сравнительном анализе аминокислотных последовательностей протеолитических доменов Lon-протеиназ из ряда источников было выявлено еще два строго консервативных остатка серина – Ser637 и Ser690, которые находятся в менее консервативном окружении, чем остаток Ser679, и поэтому их участие в активном центре представлялось менее вероятным. Эти остатки также были подвергнуты сайт-направленному мутагенезу и было установлено, что они действительно не входят в состав активного центра (соответствующие мутантные формы Lon-Ser637Ala и Lon-Ser690Ala не теряли АТФ-зависимой протеолитической активности, табл. 2) [23]. Одновременно выяснилось, что предполагавшиеся ранее как участники каталитической триады His567 (N-концевой остаток протеолитического домена)

Таблица 3. Энзиматические характеристики модифицированных форм Lon-протеиназы [31, 32]

Форма фермента (см. рис. 2)	АТФ-зависимая протеолитическая активность, %	АТФ-азная активность, %	
		базовая	в присутствии казеина
Нативный	100	100	250
GST- <i>tl</i> -NAP	100	100	230
NAP	100	100	240
GST- <i>tl</i> -AP	5	8	н. о.
AP	1	5	н. о.
GST- <i>tl</i> -P	<5	—	—
P	<1	—	—

н. о. — не определяли.

и Asp609 даже не являются консервативными для подсемейства Lon-протеиназ. Вместе с тем было обнаружено, что в протеолитических доменах Lon-протеиназ содержится четыре потенциальных участника классической каталитической триады — это консервативные остатки гистидина (His665 и His667) и аспарагиновой кислоты (Asp676 и Asp743). Точечным мутагенезом с последующей характеристикой активности мутантных форм фермента (табл. 3) показано, что удаленный остаток Asp743 не существен для функционирования фермента, а остатки His665, His667 и Asp676 важны для проявления протеолитической активности [24]. В то же время наличие в ферменте классической каталитической триады, включающей эти остатки, представляется маловероятным, поскольку все они локализованы в непосредственной близости от каталитически активного остатка серина в составе высококонсервативного 18-членного фрагмента первичной структуры I⁶⁶⁴ **NVHVPEGATPKDGPSAG⁶⁸¹** (аналогов подобного расположения каталитически активных групп в известных сериновых протеиназах не отмечено). Присутствие в обсуждаемом фрагменте Lon-протеиназы трех остатков Pro (669, 674 и 678) позволяет предположить для него увеличенную конформационную “жесткость” структуры с фиксированным взаиморасположением аминокислотных остатков, и тогда всякая мутация, нарушающая это взаиморасположение, должна привести к потере активности фермента. По-видимому, окончательное заключение о роли остатков His665, His667 и Asp676 можно будет сделать только после рентгеноструктурного исследования Lon-протеиназы.

В качестве альтернативного участника каталитической триады вместо остатка Asp мы рассматривали также остаток Glu721. Однако мутант Lon-Glu721Gln полностью сохраняет катали-

тические свойства нативной Lon-протеиназы, что означает, что Glu721 не принадлежит активному центру фермента (Старкова Н.Н., Ротанова Т.В., неопубликованные данные). Другой альтернативой классической триаде может быть функционирование в активном центре Lon-протеиназы каталитической диады серин–лизин, идентифицированной для некоторых сериновых протеиназ [25]. Мы планируем провести исследования и в этом направлении.

Определение АТФ-азной активности мутантных форм Lon-протеиназы, несущих замены в протеолитическом домене, показало, что мутация по каталитически активному остатку серина 679 не влияет на эффективность гидролиза АТФ Lon-протеиназой (табл. 2) [15, 24, 26]. В то же время у мутантов по остаткам His665, His667 и Asp676 АТФ-азная активность оказалась значительно сниженной по сравнению с активностью нативного фермента (табл. 2) [24]. Полученные результаты позволили высказать предположение, что протеолитический и АТФ-азный активные центры Lon-протеиназы сближены пространственно и тесно взаимодействуют в процессе функционирования фермента, а остатки His665, His667 и Asp676 участвуют в этом взаимодействии [24]. Поэтому нарушения в структуре протеолитического активного центра при введении мутаций могут приводить к нарушениям в АТФ-азном центре и к снижению скорости гидролиза АТФ. В формирование структуры Lon-протеиназы, обеспечивающей гидролиз белковых субстратов, могут быть вовлечены протеолитический и АТФ-азный центры одной субъединицы фермента или соседних субъединиц. Выбор между этими вариантами стал возможным после изучения свойств мутантных форм фермента, несущих замены в АТФ-азном домене.

При идентификации функционально важных остатков АТФ-азного домена учитывалась предложенная в литературе гипотеза, что различные АТФ-триггерные белки, содержащие мотивы Уолкера (в том числе и Lon-протеиназы), обладают сходной топологией АТФ-азных доменов [27]. В соответствии с этой гипотезой была исследована функциональная роль остатков Lys362, Thr363 (мотив А), Asp423 (мотив В), Asp387 и Tyr493 (соответственно потенциально каталитически активный остаток и вероятный участник системы переноса сигнала сопряжения) [28]. Изучение активности мутантных форм Lon-протеиназы с заменами по указанным остаткам показало (табл. 2), что Lys362, Thr363 и Asp423 участвуют в катализе гидролиза АТФ (соответствующие мутанты проявляют пониженную АТФ-азную активность), при этом Lys362 и Thr363 участвуют и в системе передачи сигнала сопряжения с АТФ-азного домена на протеолитический (мутантные формы полностью утрачивают АТФ-зависимую протеолитическую ак-

тивность). Остаток Asp423, по-видимому, не играет существенной роли в системе сопряжения (поскольку мутант Lon-Asp423Asn в значительной степени сохраняет способность к протеолизу). АТФ-азная активность мутантной формы Lon-Asp387Asn значительно возрастает в присутствии белкового субстрата, на этом основании было сделано заключение, что остаток Asp387 важен для функционирования АТФ-азного центра, но не является каталитически активным, как и было постулировано в литературе [27]. Максимально высокий уровень базовой АТФ-азной активности у мутанта Lon-Tyr493Phe (имитация влияния белкового субстрата) и частичная утрата им протеолитической активности позволили предположить, что остаток Tyr493 участвует в системе передачи сигнала сопряжения [28].

Полученные в экспериментах *in vitro* характеристики Lon-протеиназы и ее мутантных форм Lon-Lys362Gln, -Asp423Asn, -His665Tyr, -His667Tyr и -Ser679Ala в отношении гидролиза белкового субстрата совпали с результатами тестирования их активности *in vivo* с помощью недавно предложенной биолюминесцентной тест-системы на основе *lux*-регулона [29]. Применение этой системы открывает новые возможности в исследовании Lon-протеиназы и ее модифицированных форм.

Изучение пептидгидролазного центра нативной Lon-протеиназы и ее Lys362Gln-мутанта с помощью низкомолекулярного субстрата (Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl) позволило установить, что 1) мутация в АТФ-азном домене не влияет на активность пептидгидролазного центра протеолитического домена, но влияет на функционирование центра селективности, ответственного за узнавание и первичное связывание белкового субстрата; 2) центр селективности локализован во фрагменте молекулы Lon-протеиназы, включающем *N*-концевой и АТФ-азный домены; 3) конформационные изменения молекулы фермента, происходящие при связывании нуклеотидов и ионов Mg в АТФ-азном домене, влияют преимущественно на каталитический, а не на связывающий участок пептидгидролазного центра [30]; 4) в Lon-протеиназе осуществляется как внутрисубъединичная, так и межсубъединичная передача сигнала сопряжения от АТФ-азного центра к протеолитическому (Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Ротанова Т.В., неопубликованные данные).

Получение "укороченных" модификаций Lon-протеиназы (рис. 2г, д) имело целью выявить роль отдельных доменов в функционировании фермента. При этом особую значимость представляло получение ответа на вопрос, функционирует ли как протеиназа изолированный протеолитический домен, не проявляющий, как было отмечено выше, сходства по первичной структуре с известными сериновыми протеиназами.

Укороченный фрагмент Lon-протеиназы, включающий АТФ-азный и протеолитический домены (108-784, AP), индивидуальный протеолитический домен фермента (567-784, P), а также полноразмерная Lon-протеиназа (1-784, NAP) были получены с помощью плазмидного вектора pGEX-KG в форме гибридных белков, представляющих глутатион-S-трансферазу (GST, белок-носитель) и целевой белок, соединенные тромбинчувствительным линкером -Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Pro-Gly- (tl) (рис. 2в, з). Гибридные белки затем гидролизуют тромбином по связи Arg-Gly линкера с образованием целевых продуктов, содержащих на *N*-конце дополнительный тетрапептид Gly-Ser-Pro-Gly [31, 32]. В другом варианте протеолитический домен Lon-протеиназы получали ограниченным протеолизом нативного фермента глутамилэндопептидазой V8 из *Staphylococcus aureus* [33]. В этом случае Р-домен был удлинен на фрагмент Val487-Lys566 АТФ-азного домена. При исследовании активности Lon-протеиназы и ее фрагментов (табл. 3) гибридные белки, содержащие GST, также рассматривались как модифицированные формы фермента: GST-tl-NAP – как фермент с удлиненным *N*-концевым доменом, GST-tl-AP и GST-tl-P – как Lon-протеиназа с замененными *N*-концевым доменом или NA-фрагментом, соответственно [31, 32].

Показано, что удлинение *N*-концевого домена не влияет на энзиматические характеристики фермента, но замена его на GST более чем на порядок снижает и АТФ-зависимую протеолитическую и АТФ-азную активности; укороченная форма Lon-протеиназы (двухдоменный фрагмент, AP) еще менее активна (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о необходимости *N*-концевого домена для проявления ферментом как протеолитической, так и АТФ-азной активности [31].

Изолированный протеолитический домен Lon-протеиназы практически полностью утрачивает способность нативного фермента гидролизовать белковый субстрат (эффективность гидролиза казеина Р-доменом составляет менее 1% от эффективности нативного фермента) (табл. 3) [32]. Гибридный белок GST-tl-P несколько более активен, чем Р-домен (табл. 3) и при длительном хранении подвергается автолизу по связи Arg583-Phe584, проявляя слабо выраженную трипсиноподобную специфичность (Расулова Ф.С., Ротанова Т.В., неопубликованные данные).

Пептидазная активность Р-домена и нативной Lon-протеиназы была изучена путем гидролиза 26-членного природного олигопептида – мелиттина (рис. 3). Установлено, что нативный фермент расщепляет молекулу мелиттина как в присутствии, так и в отсутствие АТФ (в последнем случае скорость гидролиза снижается примерно в 3.5 раза). Р-Домен способен гидролизовать ме-

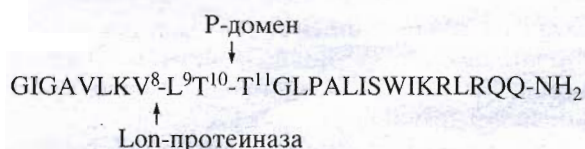


Рис. 3. Локализация сайтов преимущественного расщепления мелиттина Lon-протеиназой и ее протеолитическим доменом.

литтин с активностью, сходной с АТР-независимой активностью нативного фермента. Во всех случаях гидролиз молекулы мелиттина происходит по нескольким связям, однако неожиданным оказалось, что сайты преимущественного расщепления олигопептида Р-доменом и Lon-протеиназой различны: под действием Р-домена гидролизу, в основном, подвергается связь Thr¹⁰-Thr¹¹, а под действием нативной Lon-протеиназы – связь Val⁸-Leu⁹ (показано с помощью определения N-концевой аминокислотной последовательности) (рис. 3) [32]. Таким образом, Lon-протеиназа и ее Р-домен проявляют различную специфичность при гидролизе мелиттина. Причины этого феномена требуют дополнительного исследования.

Сравнение активности Р-домена и классической сериновой протеиназы – химотрипсина в экспериментах по гидролизу неспецифического сложноэфирного субстрата – *n*-нитрофенилового эфира триметилуксусной кислоты показало, что активный центр Р-домена функционирует примерно на два порядка менее эффективно, чем активный центр химотрипсина (Расулова Ф.С., Ротанова Т.В., неопубликованные данные).

Представленные результаты позволяют дать ответ на вопрос: функционирует ли как протеиназа изолированный протеолитический домен АТР-зависимой Lon-протеиназы *E. coli*?

Можно констатировать, что Р-домен содержит сформированный каталитический аппарат активного центра и с относительно невысокой эффективностью способен гидролизовать пептидный субстрат. С другой стороны Р-домен не активен при гидролизе белкового субстрата, хотя и способен к автолизу. И только в составе нативной молекулы фермента Р-домен приобретает способность гидролизовать белковый субстрат. Таким образом, роль N- и А-доменов состоит, по-видимому, в формировании такой структуры Lon-протеиназы (включая этап олигомеризации), которая способна к узнаванию и селективному связыванию специфического субстрата-мишени фермента (первичный сайт связывания субстрата должен быть локализован в NA-фрагменте молекулы). Эти свойства Lon-протеиназы и ее Р-домена хорошо коррелируют со свойствами другой АТР-зависимой протеиназы *E. coli*, а именно, гетероолигомерной ClpAP-протеиназы: известно, что

ClpP-субъединица – это сериновая пептидгидролаза (193 а.о., каталитическая триада: Ser⁹⁷, His¹²², Asp¹⁷¹), способная к гидролизу белковых субстратов исключительно в составе мультисубъединичного комплекса с регуляторной ClpA-субъединицей, в которой локализован центр узнавания белкового субстрата [34, 35].

Полученная характеристика Р-домена Lon-протеиназы позволила перейти к постановке следующей задачи в его изучении – рентгеноструктурному исследованию этого уникального объекта в изолированном состоянии и в составе нативного фермента. В настоящее время проводятся эксперименты по кристаллизации Р-домена, нативной Lon-протеиназы и их мутантов по каталитически активному остатку серина, несущих замену Ser⁶⁷⁹Ala.

Дальнейшее исследование селективности и механизма передачи сигнала сопряжения от АТР-азного центра Lon-протеиназы к протеолитическому предполагается проводить по следующим направлениям: локализация центра селективности фермента, продолжение поиска каталитически активных групп протеолитического центра и изучение влияния нуклеотидов на конформацию фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке International Science Foundation (гранты № NF8000 и № NF8300), Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 96-04-50239 и № 99-04-48829) и Государственной научно-технической программы “Новейшие методы белковой инженерии” (грант № 03.0004Н-342).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottesman S., Maurizi M.R. // Microbiol. Rev. 1992. V. 56. P. 592–621.
2. Gottesman S. // Ann. Rev. Genet. 1996. V. 30. P. 465–506.
3. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // Meth. Enzymol. 1994. V. 244. P. 350–375.
4. Gottesman S., Maurizi M.R., Wickner S. // Cell. 1997. V. 91. P. 435–438.
5. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // Gen. Develop. 1997. V. 11. P. 815–823.
6. 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.
7. Maurizi M.R., Thompson M.W., Singh S.K., Kim S.-H. // Meth. Enzymol. 1994. V. 178. P. 314–341.
8. Yoo S.J., Shim Y.K., Seong I.S., Seol J.H., Kang M.S., Chung C.H. // FEBS Lett. 1997. V. 412. P. 57–60.
9. Tomoyasu T., Yuki T., Morimura Sh., Mori H., Yamanaoka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T. // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 1344–1351.
10. Swamy K.S., Goldberg A.L. // Nature. 1981. V. 292. P. 652–654.

11. Charette M., Henderson G.W., Markovitz A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 4728–4732.
12. Америк А.Ю., Чистякова Л.Г., Остроумова Н.И., Гуревич А.И., Антонов В.К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 408–411.
13. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 869–880.
14. Chin T.D., Goff S.A., Webster T., Smith T., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 11718–11728.
15. Ротанова Т.В., Котова С.А., Америк А.Ю., Лыков И.П., Гинопдман Л.М., Антонов В.К. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 114–125.
16. Waxman L., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 12022–12028.
17. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991. С. 68.
18. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. // EMBO J. 1982. V. 1. P. 945–951.
19. Baker M.E. // FEBS Lett. 1989. V. 244. P. 31–33.
20. Расулова Ф.С. // Дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т им. А.Н. Баха, 1998.
21. Amerik A.Yu., Petukhova G.V., Grigorenko V.G., Lykov I.P., Yarovoi S.V., Dergousova N.I., Lipkin V.M., Gorbaleyna A.E. // FEBS Lett. 1994. V. 340. P. 25–28.
22. Wang N., Gottesman S., Willingham M.C., Gottesman M.M., Maurizi M.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 11247–11251.
23. Лыков И.П. // Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М.: МФТИ, 1995.
24. Starkova N.N., Koroleva E.P., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // FEBS Lett. 1998. V. 422. P. 218–220.
25. Paetzel M., Dalbey R.E. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. P. 28–31.
26. Fisher H., Glockshuber R. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 22502–22507.
27. Yoshida M., Amano T. // FEBS Lett. 1995. V. 359. P. 1–5.
28. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Гинопдман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 293–299.
29. Манухов И.В., Ерошников Г.Е., Завильгельский Г.Б., Гинопдман Л.М., Мельников Э.Э., Ротанова Т.В., Старкова Н.Н., Цирульников К.Б. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 371–374.
30. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Расулова Ф.С., Гинопдман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 638–640.
31. Расулова Ф.С., Дергоусова Н.И., Мельников Э.Э., Гинопдман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 370–375.
32. Rasulova F.S., Dergousova N.I., Starkova N.N., Melnikov E.E., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // FEBS Lett. 1998. V. 432. P. 179–181.
33. Овчинникова Т.В., Мартынова Н.Ю., Потапенко Н.А., Васильева О.В., Голикова Н.Ю., Гинопдман Л.М., Ротанова Т.В. // Биомед. технол. 1998. Вып. 8. С. 62–65.
34. Thompson M.W., Maurizi M.R. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 18201–18208.
35. Wang J., Hartling J.A., Flanagan J.M. // Cell. 1997. V. 91. P. 447–456.

Structural and Functional Peculiarities of the ATP-Dependent Lon Protease from *Escherichia coli*

T. V. Rotanova[#]

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

Enzymic and structural peculiarities of the ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli* and its mutant and modified forms were studied. Amino acid residues important for the function of proteolytic and ATPase sites and for the transmission of the interdomain signals of the activity coupling were found. It was shown that the protein substrates are hydrolyzed only by the full-size enzyme, whereas the isolated proteolytic domain displays a peptide-hydrolyzing activity.

Key words: active site, ATP-dependent proteolysis, *Escherichia coli*, Lon protease, interdomain interactions, site-directed mutagenesis

[#] To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 335-4222, e-mail: rotanova@ibch.siohc.ras.ru.