



УДК 577.152.342*153.02

СОПРЯЖЕНИЕ ПРОТЕОЛИЗА И ГИДРОЛИЗА АТФ ПРИ ФУНКЦИОНИРОВАНИИ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *Escherichia coli* II. ГИДРОЛИЗ АТФ И АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДГИДРОЛАЗНЫХ ЦЕНТРОВ ФЕРМЕНТА

© 2001 г. Э. Э. Мельников, К. Б. Цирульников, Т. В. Ротанова[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.09.2000 г. Принята к печати 03.10.2000 г.

Выявлено отсутствие прямой корреляции между эффективностью функционирования АТФ-азных и пептидгидролазных центров Lon-протеиназы. Показано, что протеиназа Lon – аллостерический фермент, в котором каталитическая активность пептидгидролазных центров определяется связыванием нуклеотидов, их магниевых комплексов, а также свободных ионов магния в АТФ-азных центрах фермента. Обнаружено, что комплекс ADP-магний, ингибитор нативного фермента, оказывается активатором мутантной по АТФ-азному центру формы Lon-протеиназы Lon-K362Q. Рассмотрены варианты межцентровых функциональных контактов, реализующиеся в ферменте. Установлено существование двух способов передачи сигнала от АТФ-азных центров к пептидгидролазным в олигомере Lon-протеиназы – внутрисубъединичного и межсубъединичного. Высказано предположение о локализации АТФ-азных центров фермента в областях комплементарных поверхностей субъединиц. Предложена гипотеза, согласно которой гидролиз АТФ при деградации белковых субстратов Lon-протеиназой *E. coli in vivo* выступает фактором ограничения деструктивной активности фермента.

Ключевые слова: АТФ-зависимый протеолиз; протеиназа Lon; АТФ-аза; ген lon; *E. coli*.

ВВЕДЕНИЕ

Протеиназа Lon *Escherichia coli* относится к семейству распространенных энергозависимых протеиназ, обнаруженных в клетках как прокариот, так и эукариот. Lon – гомоолигомерный фермент (тетрамер), протеолитическая активность которого сопряжена с гидролизом АТФ [1]. Эндогенными субстратами Lon-протеиназы являются поврежденные, чужеродные и некоторые регуляторные белки. Деградация белков-субстратов происходит по процессивному механизму (без высвобождения высокомолекулярных промежуточных продуктов).

Субъединица Lon-протеиназы состоит из трех функциональных доменов. Протеолитическим является С-концевой домен (His⁵⁶⁷ – Lys⁷⁸⁴), содержащий каталитически активный остаток Ser⁶⁷⁹, однако образование в пептидгидролазном центре субъединицы фермента классической каталитической триады (Ser, His, Asp) маловероятно. В центральном домене субъединицы (Glu¹⁰⁸ – Lys⁵⁶⁶) локали-

зован АТФ-азный центр, характеризующийся наличием консервативных фрагментов последовательности – мотивов Уолкера А и В. АТФ-азная активность Lon-протеиназы несколько увеличивается при связывании белкового субстрата. Степень подобия в протеолитических и в АТФ-азных доменах известных Lon-протеиназ весьма высока. Наиболее вариабельны как по размеру, так и по первичной структуре N-концевые части Lon-протеиназ (условные функциональные N-домены). Насколько самостоятельна структура и функция N-концевой части (Met¹ – Gly¹⁰⁷), не выяснено. В ферменте существует дополнительная область связывания белкового субстрата, локализованная вне протеолитического домена [1].

Согласно имеющимся представлениям, ключевыми элементами в регуляции активности Lon-протеиназы при АТФ-зависимой деградации белковых субстратов являются два обстоятельства: ингибирующее действие ADP и происходящая в результате связывания Lon-протеиназы с субстратом-мишенью активация гидролиза АТФ [2, 3]. С учетом обсуждения этих положений, проведенного в предыдущей статье [1] на основании данных по изучению АТФ-азной активности фермента, вполне обоснованным становится вопрос о том, какую роль в проявлении Lon-протеиназой

Сообщение I см. [1].

Сокращения: ПерТВЕ – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl; Lon – Lon-протеиназа; nhАТФ – негидролизуемый аналог АТФ; AMP-CPP – α, β-метиленаденозин-5'-трифосфат.

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

пептидгидролазной функции играют нуклеотиды (прежде всего – АТР и АДФ). Самостоятельный интерес представляет функция ионов магния, выступающих, как было показано [1], в качестве не только необходимого активатора гидролиза АТР, но и ингибитора базовой АТР-азной активности фермента (в отсутствие белкового субстрата). Выявляется и другая проблема: каков характер корреляции между АТР-азной и пептидгидролазной активностями Lon-протеиназы.

Обсуждению этих аспектов функционирования фермента посвящена настоящая работа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие эффекторов и активность пептидгидролазных центров Lon-протеиназы. Для изучения активации пептидгидролазных центров фермента и выяснения характера возможных межцентровых взаимодействий в олигомере при исследовании проблемы сопряжения гидролиза АТР и протеолиза использовали низкомолекулярный субстрат, тиобензиловый эфир замещенного трипептида (Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, ПерТВЕ) [4]. Ранее нами было показано, что ПерТВЕ может служить модельным субстратом при выявлении кинетических аспектов сопряжения гидролиза АТР с функционированием протеолитических (пептидгидролазных) центров фермента, поскольку эффективность гидролиза этого тиоэфирного субстрата Lon-протеиназой оказывается нуклеотидрегулируемой [4].

Lon-протеиназа гидролизует ПерТВЕ в отсутствие АТР, проявляя базовую активность пептидгидролазных центров; в присутствии (АТР–Mg)²⁻ значительно (до 20 раз) увеличивается значение k_{cat} реакции гидролиза тиоэфира без изменения значения K_m (эффект неконкурентной активации). АДФ (в присутствии или в отсутствие ионов Mg²⁺) снижает базовую активность фермента, однако последующее введение (АТР–Mg)²⁻ приводит к быстрому и эффективному увеличению активности Lon-протеиназы [4].

Оказалось, что активация пептидгидролазных центров Lon-протеиназы осуществляется не только при гидролизе (АТР–Mg)²⁻ [4], но и при наличии в системе лишь одного из эффекторов – либо ионов Mg²⁺, либо АТР или его негидролизуемого аналога – АМР–СРР (рис. 1). Максимальная активность фермента при гидролизе ПерТВЕ наблюдается при концентрациях эффекторов около 0.2 мМ (рис. 1). Обнаруживаемая немонотонность зависимости скорости гидролиза ПерТВЕ от концентрации лиганда, по-видимому, может свидетельствовать в пользу “полуцентральной активации” фермента при связывании лигандов (максимальная активность при частичном насыщении фермента). При этом очевидно, что АТР или его негидролизуемый аналог – условные ак-

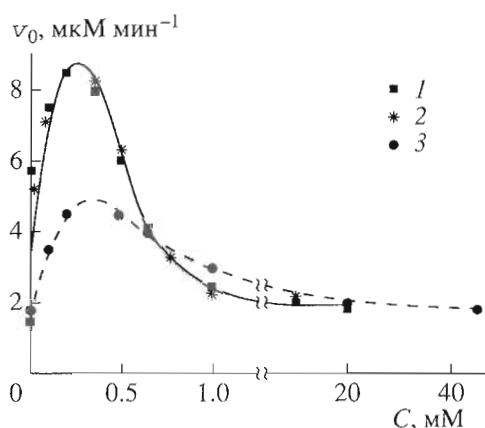


Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl от концентрации АТР (1), АМР–СРР (2) или ионов Mg²⁺ (3). Условия реакции: 70 мМ Трис–HCl, pH 8.2; 10% DMSO; 37°C. Концентрации: Lon – 0.45 мкМ; субстрата – 50 мкМ.

тиваторы, поскольку характер действия этих лигандов зависит от их концентрации.

Действие ионов Mg²⁺ на пептидгидролазные центры фермента проявляется менее эффективно (рис. 1, 3), чем действие АТР или АМР–СРР (рис. 1, 1, 2), и может быть объяснено либо специфическим связыванием этих ионов в самостоятельных “магневых сайтах” (таковые существуют, например, в АТР-азных центрах), либо неспецифическим влиянием этих ионов на ферментативную активность. При этом из рис. 1 следует, что сродство ионов Mg²⁺ и свободного нуклеотида к ферменту должно быть сопоставимо. Поскольку выделенный из клеток препарат Lon-протеиназы содержит примерно эквивалентное по отношению к ферменту количество АДФ (показано по окислению NADH с использованием системы сопряженных реакций с участием пируваткиназы и лактатдегидрогеназы [5], неопубликованные данные), не исключено, что эффекторное действие ионов Mg²⁺ может быть связано с образованием комплекса АДФ–магний. Таким образом, можно предположить, что при некоторых условиях комплекс (АДФ–Mg)⁻, но не свободный АДФ, способен выполнять функцию активатора пептидгидролазных центров фермента.

Mg-зависимые эффекты при функционировании пептидгидролазных центров Lon-протеиназы. Согласно сложившимся ранее представлениям, эффективность протеолиза, осуществляемого Lon-протеиназой, определяется эффективностью гидролиза АТР [2, 6]. Увеличение АТР-азной активности Lon-протеиназы в присутствии белкового субстрата традиционно представляют ключевым элементом в активации протеолитической функции фермента [3]. Поскольку низкомолекулярные субстраты (в том числе и тиоэфирный субстрат,

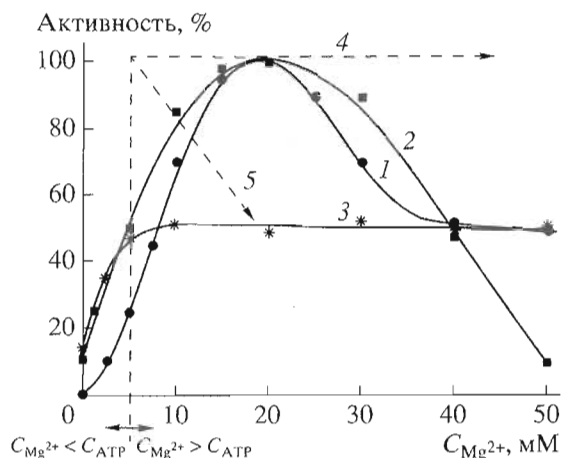


Рис. 2. Активность Lоп-протеиназы в зависимости от концентрации ионов Mg^{2+} при гидролизе казеина (1) и ПерТВЕ (2 и 3) в присутствии АТР (1, 2) или АМР-СРР (3) (стрелками показаны тенденции в проявлении АТР-азной активности в присутствии белкового (4) и тиоэфирного субстратов (5), по данным работы [1]). Условия реакций см. подпись к рис. 1. Концентрации: Lоп – 0.45 мкМ; ПерТВЕ – 50 мкМ; белкового субстрата – [^{14}C]ацетил- α -казеина – 0.3 мг/мл; нуклеотидов (АТР или АМР-СРР) – 5 мМ.

ПерТВЕ) в отличие от белковых не способны активировать гидролиз АТР [3], можно было ожидать, что наиболее эффективный гидролиз ПерТВЕ в пептидгидролазных центрах фермента будет происходить в условиях наиболее активного гидролиза АТР.

В работе [1] нами было показано, что ионы Mg^{2+} – не только необходимый активатор гидролиза АТР и ингибитор базовой АТР-азной активности фермента. В области миллимолярных концентраций АТР и ионов Mg^{2+} максимальная АТР-азная активность фермента (по значению k_{cat}) наблюдается в отсутствие избытка компонентов субстратного комплекса $(АТР-Mg)^{2-}$, т. е. при эквимольном соотношении АТР и ионов магния в реакционной среде (константа диссоциации этого комплекса на свободные компоненты $\sim 10^{-5}$ М). Понижение АТР-азной активности фермента при наличии свободных ионов магния наблюдается только в отсутствие белкового субстрата. В присутствии белкового субстрата в насыщающей концентрации (дефосфорилированный α -казеин, 1 мг/мл) ингибирующее действие свободных ионов Mg^{2+} (0–40 мМ) не проявляется [1].

Из зависимостей активности фермента от содержания ионов Mg^{2+} в реакционной смеси (рис. 2) видно, что в присутствии АТР при деградации ферментом как белкового субстрата (кривая 1), так и ПерТВЕ (кривая 2) ионы Mg^{2+} проявляют свойства эффектора. Наибольшая пептидгидролазная активность фермента, независимо от при-

роды субстрата и его способности активировать гидролиз АТР, обнаруживается при концентрации ионов Mg^{2+} , значительно превышающей концентрацию АТР, при этом оптимальная концентрация соответствует переходной концентрации свободных ионов Mg^{2+} (12–13 мМ), при которой изменяется характер ингибирования этими ионами базовой АТР-азной активности фермента (переход от бесконкурентного к конкурентному типу ингибирования [1]).

Стрелками на рис. 2 показаны тенденции в изменении АТР-азной активности фермента в зависимости от концентрации ионов Mg^{2+} : горизонтальная стрелка (4) – при гидролизе белкового субстрата, наклонная (5) – при гидролизе тиоэфира, ПерТВЕ [1]. Вертикальная пунктирная линия ($C_{Mg} = C_{ATP}$) разделяет области концентраций, характеризующиеся наличием свободного нуклеотида ($C_{Mg} < C_{ATP}$) или свободных ионов Mg^{2+} ($C_{Mg} > C_{ATP}$).

В условиях проявления максимальной АТР-азной активности ($C_{Mg} = C_{ATP}$) эффективность гидролиза Lоп-протеиназой и тиоэфирного, и белкового субстратов понижена (рис. 2). Увеличение содержания ионов Mg^{2+} до 17–18 мМ (соответствует концентрации свободных ионов 12–13 мМ) в процессе гидролиза ПерТВЕ приводит к уменьшению АТР-азной активности фермента (рис. 2, 5) и, вместе с тем, к пропорциональному увеличению активности пептидгидролазных центров фермента (рис. 2, 2). При деградации белкового субстрата (рис. 2, 1) АТР-азная активность остается максимальной независимо от содержания ионов Mg^{2+} (рис. 2, 4) [1], но активирующее действие ионов Mg^{2+} на пептидгидролазную функцию сохраняется и выражено даже в большей степени, чем при гидролизе тиоэфира.

Увеличение общей концентрации ионов Mg^{2+} выше 17–18 мМ (при концентрации АТР 5 мМ) приводит к снижению эффективности гидролиза как белкового, так и низкомолекулярного субстрата (рис. 2), однако профиль кривых 1 и 2 в этой области различен, что может быть связано с различием в способности субстратов влиять на функционирование АТР-азных центров.

Крайне важно отметить, что в присутствии АМР-СРР – негидролизуемого аналога АТР – максимальная эффективность гидролиза ПерТВЕ достигается при равных концентрациях нуклеотида и ионов Mg^{2+} (рис. 2, 3) и остается неизменной при дальнейшем увеличении концентрации этих ионов. При концентрации активаторного комплекса $(АМР-СРР-Mg)^{2-}$ 5 мМ максимальная эффективность гидролиза тиоэфира примерно в два раза меньше, чем при гидролизе АТР (5 мМ) и оптимальной концентрации ионов Mg^{2+} (17–18 мМ). Совокупность приведенных данных позволяет сде-

лать заключение, что Mg-зависимое изменение активности пептидгидролазных центров связано с особенностями функционирования Lon-протеиназы именно при гидролизе АТФ, а не с существованием в ферменте каких-либо дополнительных участков связывания ионов Mg^{2+} .

Закономерности функционирования Lon-протеиназы при гидролизе АТФ и при связывании комплекса негидролиземого аналога АТФ и магния различны (рис. 2, кривые 2 и 3). Это наблюдение дополнительно подтверждается в экспериментах по ингибированию активности пептидгидролазных центров фермента аденозиндифосфатом (рис. 3). При гидролизе АТФ (рис. 3, 1) ингибирование деградации РерТВЕ оказывается полным, но при использовании в качестве активатора АМР-СРР (рис. 3, 2) – частичным. Ингибирование гидролиза тиоэфира в присутствии комплекса $(AMP-CPP-Mg)^{2-}$ происходит на фоне весьма эффективного связывания комплекса $(ADP-Mg)^{-}$ (предельный эффект достигается в области низких концентраций ингибитора). Однако при гидролизе АТФ ингибирование пептидгидролазных центров выражено в значительно меньшей степени: концентрация $(ADP-Mg)^{-}$, при которой в условиях гидролиза АТФ происходит 50%-ное уменьшение активности фермента (примерно 2 мМ), на порядок превышает значение концентрации, при которой достигается предельный эффект в условиях активации негидролиземым аналогом АТФ (около 0.2 мМ). Эти данные могут свидетельствовать о существовании выраженного положительного гетеротропного кооперативного эффекта при заполнении АТФ-азных центров фермента комплексами нуклеотид–магний.

Обнаруженные закономерности позволяют сделать следующие заключения: (1) прямая корреляция между эффективностью функционирования АТФ-азных и пептидгидролазных центров Lon-протеиназы отсутствует; (2) для проявления активности фермента существенное значение могут иметь кооперативные эффекты в связывании нуклеотидов, определяющие состояние каталитического аппарата пептидгидролазных центров, а также согласованность состояний АТФ-азных центров в олигомере (не исключено, что при гидролизе АТФ наиболее эффективному функционированию пептидгидролазных центров фермента соответствует состояние полунасыщения по $(ATP-Mg)^{2-}$); (3) в присутствии белкового субстрата характер кооперативных эффектов может изменяться; (4) ионы Mg^{2+} играют роль не только необходимого активатора гидролиза АТФ, но и активатора пептидгидролазной функции фермента; при этом активирующее действие свободных ионов Mg^{2+} связано с особенностями функционирования фермента именно при гидролизе АТФ (не исключено, что эффекторное действие ионов Mg^{2+} вызывается образованием комплекса аденозинди-

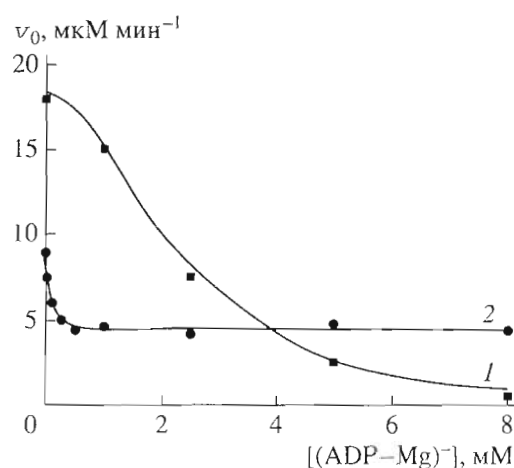


Рис. 3. Ингибирование гидролиза РерТВЕ аденозиндифосфатом в присутствии АТФ (1) и АМР-СРР (2). Условия реакций см. подпись к рис. 1. Концентрации: Lon – 0.45 мкМ; РерТВЕ – 50 мкМ; $MgCl_2$ – 20 мМ; АТФ или АМР-СРР – 1 мМ.

фосфат–магний [1]); (5) функционирование фермента как пептидгидролазы при гидролизе АТФ и при активации комплексом $(AMP-CPP-Mg)^{2-}$ различно.

Особенности функционирования мутантной по АТФ-азному центру формы Lon-протеиназы – Lon-K362Q. Учитывая олигомерную организацию фермента, можно рассматривать следующие варианты передачи сигнала от АТФ-азного центра к пептидгидролазному: в пределах одной субъединицы и/или на уровне олигомера (структурно-функциональное сопряжение АТФ-азного и протеолитического доменов разных субъединиц). Осуществление последнего варианта возможно при участии АТФ-азного центра в формировании четвертичной структуры фермента, как установлено при исследовании другой АТФ-зависимой протеиназы из *E. coli* – ClpAP [7].

В мутантной по АТФ-азному центру форме Lon-протеиназы Lon-K362Q, содержащей замену в мотиве Уолкера А, нарушено функционирование системы сопряжения (полное отсутствие АТФ-зависимой протеолитической активности при частичном сохранении АТФ-азной [8]). Методом гель-фильтрации (FPLC, Superose 6 и Superose 12 HR 10/30, Pharmacia) нами было показано (неопубликованные данные), что мутация приводит к образованию значительной доли мономерной формы Lon-K362Q. Изменение олигомерности в результате мутации в АТФ-азном центре можно объяснить тем, что эти центры задействованы в формировании четвертичной структуры и локализованы вблизи комплементарных поверхностей субъединиц.

Тем не менее, несмотря на неспособность гидролизовать белковый субстрат и значительное снижение АТФ-азной активности [8], форма Lon-

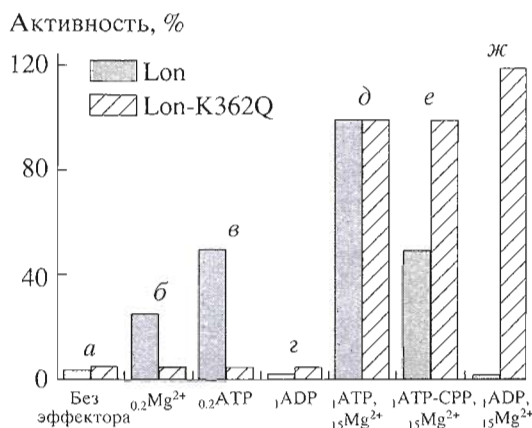


Рис. 4. Действие эффекторов при гидролизе Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl нативной Lon-протеиназой и ее мутантной формой Lon-K362Q (в обоих случаях за 100% принимали активность фермента в присутствии 1 мМ АТФ и 15 мМ Mg²⁺; нижний индекс при обозначении эффектора – концентрация (мМ), необходимая для его максимально эффективного действия на нативный фермент).

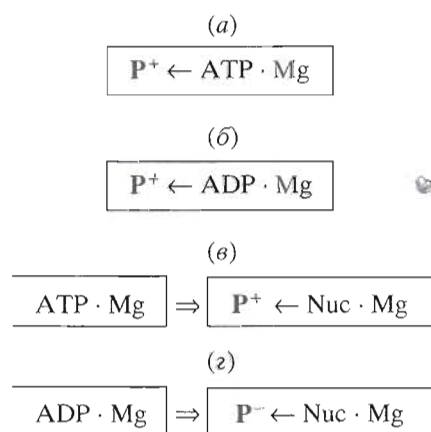


Рис. 5. Варианты аллостерического действия АТФ-азных центров на пептидгидролазные в Lon-протеиназе внутри субъединиц (а, б) и с учетом межсубъединичного контакта (в, г). Обозначения: Nuc – нуклеотид (АТФ или АДФ); (⇒) и (←) – межсубъединичное и внутрисубъединичное действие АТФ-азного центра на пептидгидролазный, соответственно; P⁺ и P⁻ – активированное и дезактивированное состояния пептидгидролазного центра в субъединице.

K362Q сохраняет активность пептидгидролазных центров. Lon-K362Q проявляет базовую активность при гидролизе тиоэфирного субстрата ПерТВЕ, мало отличающуюся от активности нативной Lon-протеиназы (рис. 4а). Гидролиз АТФ или связывание комплекса его негидролизуемого аналога и магния (рис. 4д и 4е, соответственно) приводят к эффективной активации гидролиза тиоэфира как мутантной, так и нативной формами фермента. Однако свободные компоненты активаторного комплекса (АТФ–Mg)²⁻, т.е. Mg²⁺ и АТФ, не

оказывают заметного действия на активность пептидгидролазных центров в мутантном ферменте, в отличие от их влияния на нативную Lon-протеиназу (рис. 4б и 4в).

Наиболее значительно нативная Lon-протеиназа и Lon-K362Q различаются при действии на них комплекса АДФ–магний. Для мутантного фермента действие этого эффектора приводит к активации гидролиза ПерТВЕ, по величине даже превышающей активацию комплексом (АТФ–Mg)²⁻, однако базовая активность нативной Lon-протеиназы в этих условиях практически полностью ингибируется (рис. 4ж).

Таким образом, независимо от природы нуклеотида комплекс нуклеотид–магний оказывает активирующее действие на мутантную форму Lon-протеиназы Lon-K362Q, функционирующую как мономер (рис. 4д–4ж). Эти данные можно рассматривать как прямое подтверждение высказанного выше предположения о потенциальной способности (АДФ–Mg)⁻ при некоторых условиях выполнять функцию активатора фермента.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании двух способов передачи сигнала от АТФ-азных центров к пептидгидролазным, реализующихся в нативном ферменте на уровне четвертичной структуры – межсубъединичном и внутрисубъединичном (рис. 5а–5г):

– внутри субъединиц в присутствии ионов Mg²⁺ пептидгидролазные центры активируются при связывании нуклеотида любого типа (рис. 5а и 5б);

– при межсубъединичной передаче сигнала действие АТФ · Mg приводит к активации пептидгидролазных центров сопряженных субъединиц (рис. 5в), а действие АДФ · Mg – к их ингибированию (рис. 5г), независимо от природы комплекса нуклеотид–магний, связанного в АТФ-азном центре собственной субъединицы.

Высказанному предположению не противоречит отсутствие активирующего действия (АДФ–Mg)⁻ на нативный фермент, имеющий полноценную четвертичную структуру, поскольку после выделения препарат фермента в значительной степени может быть представлен АДФ-формой, активной частью которой будет только форма с частичным насыщением, проявляющая, по-видимому, так называемую собственную (или базовую) активность пептидгидролазных центров. Кроме того, весьма вероятным представляется и другое объяснение: связывание АДФ характеризуется положительным гомотропным кооперативным эффектом, вследствие которого фермент предрасположен к полному насыщению этим нуклеотидом в отсутствие АТФ или его негидролизуемого аналога. Таким образом, в рамках излагаемых представлений эффект ингибирования аденозиндифосфатом, проявляющийся на уровне четвертичной структуры фермента, является доминирующим.

Lop-протеиназа – аллостерический фермент.

Принимая во внимание результаты исследования способности Lop-протеиназы гидролизовать тиоэфирные субстраты, можно утверждать, что сопряжение гидролиза АТФ и протеолиза в значительной степени сводится к дифференцированному аллостерическому действию свободных нуклеотидов и их комплексов с ионами Mg^{2+} на пептидгидролазные центры фермента и к особенностям взаимодействия центров на уровне четвертичной структуры фермента.

Обобщение имеющихся для нативного фермента и мутанта Lop-K362Q данных по функционированию АТФ-азных центров, протеолитической активности, аллостерической активации пептидгидролазных центров (при исследовании гидролиза тиоэфиров) и данных, полученных при гель-фильтрации, позволяет высказать ряд предположений о функционировании системы регуляции пептидгидролазных центров в нативном ферменте. Существенным допущением при построении этих предположений следует считать неизменность характера действия эффекторов, связывающихся в АТФ-азном центре, на пептидгидролазный центр (передача сигнала) после мутации K362Q.

На рис. 6 приведены два варианта гипотетической структуры тетрамерной Lop-протеиназы, образованной двумя парами субъединиц, ориентированных “голова-к-голове” (пары субъединиц 1–4 и 2–3) и “голова-к-хвосту” (пары субъединиц 1–2 и 3–4). Различие между структурами (а) и (б) заключается в типе взаимной ориентации субъединиц, между которыми реализуется контакт АТФ-азных центров (А).

Основные положения, описывающие регуляцию активности пептидгидролазных центров (Р) в Lop-протеиназе, могут быть сведены к следующему:

1. Регуляция активности пептидгидролазных центров в ферменте достигается функциональными контактами $A \rightarrow P$ и определяется состоянием АТФ-азных центров (при гидролизе АТФ реализуются три состояния в зависимости от связанного эффектора [1]: $ATP \cdot Mg$, $ADP \cdot Mg$ или ADP) и типом контакта $A \rightarrow P$ ($[A \rightarrow P]$ – внутрисубъединичный и A) \Rightarrow $[P - \text{межсубъединичный}]$.

2. В олигомере нативного фермента пептидгидролазный центр каждой субъединицы находится под контролем, по крайней мере, двух АТФ-азных центров (рис. 5, 6).

Состояния ADP – $[P-Nuc \cdot Mg]$ или $ADP \cdot Mg$ – $[P-Nuc \cdot Mg]$ приводят к дезактивации пептидгидролазного центра Р, находящегося под контролем АТФ-азного центра сопряженной субъединицы, содержащего ADP или его комплекс с магнием ($ADP \cdot Mg$), а также под контролем АТФ-азного центра собственной субъединицы, содержащего в связанном состоянии любой из двух связанных

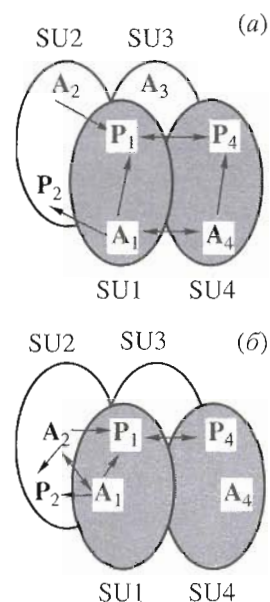


Рис. 6. Предполагаемые типы межцентровых взаимодействий (обозначены стрелками) в тетрамерной Lop-протеиназе. Обозначения: А и Р – АТФ-азные и пептидгидролазные центры, соответственно; SU1–SU4 – субъединицы 1–4.

нуклеотидов (АТФ или АДФ) в комплексе с магнием ($Nuc \cdot Mg$). При реализации рассматриваемых состояний пептидгидролазный центр P_1 первой субъединицы (SU1, рис. 6) будет дезактивирован (P_1^-), состояние центра P_2 в SU2 будет определяться типом нуклеотида в АТФ-азном центре A_1 в SU1.

Состояние $ATP \cdot Mg$ – $[P-Nuc \cdot Mg]$ соответствует активации пептидгидролазного центра Р; в АТФ-азном центре сопряженной субъединицы в этом случае находится комплекс $ATP \cdot Mg$; центр P_1 будет активирован (P_1^+), а состояние центра P_2 также будет определяться типом нуклеотида в АТФ-азном центре первой субъединицы.

3. Доминирующая роль в регуляции активности пептидгидролазных центров отводится состоянию АТФ-азных центров на сопряженных субъединицах, поскольку собственные АТФ-азные центры, содержащиеся в связанном состоянии любой нуклеотид (в комплексе с ионами магния), активируют свой пептидгидролазный центр (рис. 5). Аллостерическая дезактивация пептидгидролазных центров продуктом гидролиза АТФ осуществляется исключительно на уровне четвертичной структуры, когда реализуются контакты центров разных (сопряженных) субъединиц, т.е. существует влияние АТФ-азного центра одной субъединицы на протеолитический центр другой, по крайней мере, при эффекторном действии $ADP \cdot Mg$. Внутрисубъединичное действие $ADP \cdot Mg$ приводит к аллостерической активации пептидгидро-

лазных центров (реализуется в субъединицах Lon-K362Q).

4. Контакты $A \rightarrow P$ (внутри- или межсубъединичные) в олигомере могут существенно дополняться взаимодействиями типа $A \rightleftharpoons [A \text{ и } P] \rightleftharpoons [P$ (рис. 6). Результатом взаимодействий $A \rightleftharpoons [A$ могут быть наблюдаемые при связывании нуклеотидов кооперативные эффекты [2], во многом определяющие состояние P -центров. С учетом этого типа контактов для схемы (а) (рис. 6) нуклеотидный обмен в центре A_2 будет зависеть от состояния центра A_3 (т.е. центр P_1 будет контролироваться тремя АТФ-азными центрами – A_1 , A_2 и A_3). Для схемы (б) (рис. 6) эффективность нуклеотидного обмена в A_2 будет зависеть только от центра A_1 (активность P_1 регулируется двумя АТФ-азными центрами – A_1 и A_2).

Взаимодействия типа $P \rightleftharpoons [P$ могут приводить к неординарным эффектам, например, к изменению активности одних пептидгидролазных центров при функционировании других, что в настоящее время уже постулировано для протеасом [9].

Фермент функционирует как АТФ-аза независимо от присутствия белкового субстрата. В процессе гидролиза АТФ фермент никогда не находится в одной из граничных форм (АТФ- или АДФ-форма): часть субъединиц содержит комплекс АТФ · Mg, а другая часть – продукт его гидролиза, АДФ (в комплексе с магнием или в свободном виде). В присутствии ионов Mg^{2+} АТФ – модифицируемый аллостерический эффектор.

Данных о совокупности кооперативных эффектов, сопровождающих функционирование фермента, накоплено недостаточно для того, чтобы описать полную картину нуклеотидного обмена, реализующуюся при гидролизе АТФ. Тем не менее можно предположить, что сопряженные АТФ-азные центры функционируют попарно и согласованно. В этом случае состояние АТФ-азного центра в АТФ-форме может predispose сопряженный с ним центр к АДФ-состоянию; после гидролиза АТФ и перехода центра в АДФ-состояние средство АДФ к сопряженному центру значительно уменьшается, и этот центр становится predisposed к связыванию АТФ. При моделировании нуклеотидного обмена системой $pHATP/ADP$ в присутствии ионов магния, фермент будет заполнен нуклеотидом каждого типа с максимальным сродством, возможно, при половинном насыщении. Полное замещение нуклеотидов одного типа нуклеотидами другого типа в этом случае может быть затруднено. Следствием полученного состояния оказывается, например, наблюдаемое в эксперименте частичное ингибирование эстеразной активности фермента комплексом $(ADP-Mg)^-$ в присутствии $(AMP-PPM-Mg)^{2-}$ (рис. 3).

Описываемая нуклеотидзависимая регуляция активности пептидгидролазных центров на уровне

четвертичной структуры Lon-протеиназы осуществляется достаточно сложным образом. При этом фермент проявляет свойства медленной протеиназы: общая эффективность гидролиза пептидных связей в случае Lon-протеиназы по отношению к таковой для классических деструктивных протеиназ – трипсина или химотрипсина – понижена примерно на 2-3 порядка и не превосходит эффективности гидролиза АТФ. Не исключено, что относительно невысокая протеолитическая активность запрограммирована и имеет существенное значение при функционировании фермента *in vivo*, например, при контроле содержания в клетке регуляторных белков, когда деструктивная протеолитическая активность фермента не должна быть чрезмерной. В аллостерических ферментах функциональная активность ограничена регуляторной. В случае Lon-протеиназы гидролиз АТФ можно рассматривать как фактор ограничения деструктивной протеолитической активности фермента.

Действие аллостерических эффекторов и деградация белковых субстратов Lon-протеиназой.

Структурная организация Lon-протеиназы и существующая в ней система межцентровых взаимодействий (система аллостерической регуляции) направлена на осуществление функции гидролиза белкового субстрата. В олигомерном ферменте взаимодействие центров оказывается, по-видимому, согласованным и приводящим к процессивной деградации белкового субстрата, т.е. к такому типу протеолиза, при котором белок-субстрат не покидает фермент до момента завершения процесса исчерпывающего гидролиза (при удерживании субстрата и высокомолекулярных промежуточных продуктов его деградации на ферменте).

Наряду с изложенными выше представлениями о возможных способах передачи сигнала с АТФ-азных центров на пептидгидролазные и характере межцентровых взаимодействий в ферменте следует отметить, что, в общем случае, в Mg^{2+} -содержащей системе нуклеозидтрифосфат – активатор пептидгидролазной активности фермента, а нуклеозиддифосфат – ингибитор. Может ли проблема сопряжения гидролиза АТФ и протеолиза быть разрешена только на уровне исследования Lon-протеиназы как аллостерического фермента?

По-видимому, понимание этой проблемы невозможно без привлечения к рассмотрению свойств белкового субстрата и природы его взаимодействия с ферментом. Полной неспособностью гидролизовать белковый субстрат при сохранении активности пептидгидролазных центров, характеризуется ряд мутантных по АТФ-азному центру форм Lon-протеиназы [8]. Безуспешной оказывается попытка обнаружить эффективный гидролиз белкового субстрата в условиях, при которых фермент активирован (рис. 1), но гидролиз АТФ

не происходит. Тем не менее в работе [10] установлено, что в некоторых случаях Lon-протеиназа эффективно расщепляет высокомолекулярные белковые субстраты в присутствии негидролизуемых аналогов АТР. При этом протеолиз сопровождается образованием высокомолекулярных промежуточных продуктов деградации белка-субстрата, т.е. характеризуется отсутствием процессивности.

В рассматриваемом аспекте энергия гидролиза АТР формально направлена на осуществление Lon-протеиназой процессивной деградации белков. Необходимым элементом такого типа деградации белкового субстрата может оказаться участие нуклеотидов не только в аллостерическом действии на каталитический аппарат пептидгидролазных центров, но и опосредованно, через изменение структуры фермента, в связывании фрагментов полипептидной цепи белка-субстрата.

Совокупность наблюдений, позволяющих определить действие эффекторов на связывание субстрата (или фрагментов его полипептидной цепи в процессе деградации) с ферментом, весьма ограничена. Кроме того, при рассмотрении этого вопроса следует принимать во внимание возможность связывания субстрата в экспериментально обнаруженной [1] и постулированной ранее в литературе [11, 12] дополнительной области, локализованной вне пептидгидролазного центра.

Для осуществления процессивности, приводящей к последовательному отщеплению фрагментов гидролизующей полипептидной цепи, по-видимому, требуется инициация деградации в концевой области субстрата. В определенном смысле Lon-протеиназа может быть рассмотрена как экзопептидаза, отщепляющая большие фрагменты полипептидной цепи (около 15–20 а.о.). Инициаторное связывание белка-субстрата с ферментом (вероятно, происходящее при участии концевой структуры субстрата) – необходимый элемент в схеме функционирования фермента [12]. В то же время однозначно указать путь транслокации белкового субстрата при его процессивной деградации достаточно сложно, хотя очевидно, что он не является случайным. Один из вероятных путей – через сопряженные центры А–Р (вдоль одной из двух эффективных зон, образованных парами субъединиц в тетрамере, рис. 6). Не исключено, что зона транслокации, разделяющая два димера субъединиц, конформационно лабильна и соответствует той области, нарушение в которой может приводить к диссоциации тетрамера (реализуется в Lon-K362Q).

Отличительная особенность белковых субстратов Lon-протеиназы – способность активировать гидролиз АТР в условиях избыточного содержания ионов Mg^{2+} [1]. Не исключено, что первый контакт субстрата-мишени с ферментом, сопровождающийся активацией гидролиза АТР,

происходит именно в дополнительном центре и реализуется благодаря комплементарности участков белковых структур, т.е. через взаимодействие определенных элементов топологии.

Проблема существования центров селективности в Lon-протеиназе может быть сведена к выявлению в структуре фермента высокоспециализированных участков связывания белкового субстрата, локализованных вне Р-центра. Такие области связывания могут возникать при формировании целостной (функциональной) четвертичной структуры. С другой стороны, дополнительные центры могут находиться в каждой субъединице фермента и оказаться задействованными в связывании участков полипептидной цепи белкового субстрата, экспонирующихся при его процессивной деградации. В этом случае маловероятно, чтобы связывание в дополнительных центрах происходило с высокой специфичностью.

Каковы принципы взаимодействия субстрата-мишени и Lon-протеиназы? Представляется маловероятным, чтобы одни и те же комплементарные структуры, обеспечивающие селективное взаимодействие субстрата с Lon-протеиназой, присутствовали в столь различающихся белках как казеин, глубоко денатурированный бычий сывороточный альбумин [13] и ряд регуляторных белков [14–19], находящихся в нативной конформации, но оказывающихся белковыми субстратами фермента. Тем не менее объединяющее эти белки свойство может быть обнаружено при сопоставлении их общих характеристик: и денатурированные, и регуляторные белки обладают пониженной термостабильностью и конформационной лабильностью, т.е. обладают близким энергетическим статусом.

По-видимому, способность белковой структуры легко разворачиваться и образовывать протяженные участки связывания с ферментом лежит в основе процессивного типа деградации белковых субстратов при функционировании Lon-протеиназы. Как следствие, белки, не обладающие этой способностью, имеющие жесткую конформацию, содержащие S–S-связи, не могут быть субстратами фермента, несмотря на потенциальную возможность взаимодействовать с центром селективности. Не исключено, что для понимания проблемы энергозависимости процессивного протеолиза, приводящего к удерживанию белкового субстрата на ферменте в процессе деградации, потребуется привлечение представлений о стабильности структуры субстрата. Вопрос о том, будет ли некоторый белок субстратом Lon-протеиназы (проблема селективности) сводится к тому, способен ли этот белок разворачиваться после инициаторного взаимодействия с ферментом в процессе гидролиза АТР при согласованном функционировании сопряженных центров фермента, т.е. способен ли подвергаться процессивному протеолизу.

Иными словами, проблема энергозависимости протеолиза может быть тесно связана с пробле-

мой селективности, поскольку **АТФ-зависимая деградация белков может быть сопряжена с отбором субстрата по энергетическому статусу.** Этот весьма интересный аспект АТФ-зависимого протеолиза наименее изучен, но начинает обсуждаться: как показано в работе [20], подвергающиеся быстрой деградации *in vivo* субстраты Lon-протеиназы – белки с термолабильной структурой. Кроме того, в работе [17] показано, что некоторые белки, негидролизующиеся в присутствии pHATP и ионов магния (подвергаются протеолизу только при гидролизе АТФ) становятся субстратами фермента при повышении температуры.

Представленный материал показывает, что в Lon-протеиназе функциональная активность (протеолитическая) весьма тонко контролируется регуляторной (гидролиз АТФ). При этом маловероятно, чтобы понимание даже самого общего механизма действия фермента и его АТФ-зависимости можно было бы ограничить представлениями в рамках схемы, постулированной в литературе [2, 3, 6]. Описание общей схемы функционирования фермента невозможно без использования представлений о его четвертичной структуре и о кооперативных взаимодействиях центров, без учета дифференцированного эффекторного действия нуклеотидов и их комплексов с ионами магния на проявление функций фермента, без исследования действия эффекторов на олигомерность Lon-протеиназы, а также без понимания процессивного характера деградации белкового субстрата. Многие вопросы, разрешение которых потенциально способно привести к созданию феноменологической схемы действия фермента, требуют дополнительных исследований.

Тем не менее, несмотря на неполное понимание механизма действия Lon-протеиназы, можно с высокой вероятностью предположить, что АТФ-зависимое функционирование пептидгидролазных центров фермента, сопровождающееся процессивной деградацией белкового субстрата, *in vivo* может быть направлено на ограничение деструктивной активности фермента. При гидролизе белков в клетке посредством такого механизма может осуществляться контроль содержания определенной группы регуляторных белков:

– с одной стороны, пептидгидролазная активность фермента не может превышать его АТФ-азную активность (медленно функционирующий фермент);

– с другой стороны, при процессивной деградации концентрация свободного фермента, способного гидролизовать белковый субстрат, определяется скоростью процессивного гидролиза молекул субстрата (новые молекулы субстрата не затрагиваются молекулами фермента до момента исчерпывающей фрагментации гидролизующихся молекул субстрата, т.е. фермент временно дез-

активируется по отношению к общему пулу молекул субстрата).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы реактивы, соответствующие квалификации “ос. ч.” или “х. ч.”. Выделение и очистка ферментов, определение АТФ-азной активности описаны в работе [1].

Гидролиз Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl регистрировали спектрофотометрически [21] по величине оптического поглощения 4-тиопиридона (ϵ_{324} 19800 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолата, Bzl-S^-) с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP), либо непрерывно, либо методом отбора проб. В первом случае DTDP содержался в реакционной смеси в концентрации 1 мМ; во втором – в “остановочном” реагенте (50 мМ Трис- HCl , pH 8; 8 М мочевины; 2 мМ DTDP). При тестировании методом отбора проб реакцию проводили в 3 мл реакционной смеси. Аликвоты по 400 мкл отбирали в кварцевые кюветы, содержащие равный объем “остановочного” реагента, встряхивали и определяли оптическое поглощение раствора при 324 нм.

Гидролиз [^{14}C]ацетил- α -казеина. Протеолитическую активность фермента тестировали по радиоактивности кислоторастворимых продуктов деградации ацетилированного казеина в присутствии и в отсутствие АТФ. В контрольном опыте для учета АТФ-независимого протеолиза аликвоту АТФ заменяли аликвотой буфера.

Условия проведения реакции: 50 мМ Трис- HCl -буфер, pH 8.0 (при 25°C); 0.1 М NaCl ; 5% глицерин; 37°C. Концентрации: Lon – 10–40 мкг/мл; [^{14}C]ацетил- α -казеин – 0.3 мг/мл; АТФ – 5 мМ; MgCl_2 – 0–50 мМ.

Реакционную смесь параллельно с контрольной (аликвоты по 150 мкл) через равные интервалы времени (15 мин) отбирали в пробирки, содержащие по 50 мкл 5% раствора бычьего сывороточного альбумина, встряхивали, добавляли по 500 мкл 15% трихлоруксусной кислоты, встряхивали и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. Далее суспензию белка центрифугировали (10 мин, 12000 об./мин) и измеряли уровень радиоактивности в 600 мкл надосадочной жидкости методом жидкостного сцинтилляционного счета.

По значениям счета как функции от времени определяли скорость гидролиза казеина v_0 , выраженную в условных единицах ((имп./мин) мин^{-1}). Удельную АТФ-зависимую активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = C_S \Delta v_0 / (OC - \Phi C) / C_E, \text{ (моль моль}^{-1} \text{ мин}^{-1}\text{)},$$

где Δv_0 ((имп./мин) мин^{-1}) – разность скоростей гидролиза казеина в присутствии и в отсутствие АТФ; OC и ΦC (имп./мин) – общий и фоновый

счет препарата казеина при стандартизованной процедуре осаждения в отсутствие фермента; C_S и C_E (M) – молярная концентрация субстрата (казеина) и фермента (в расчете на субъединицу) соответственно.

Реакцию проводили при разных концентрациях фермента, полученные значения удельной активности усредняли.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-48829) и Государственной научно-технической программы “Новейшие методы биотехнологии” (Белковая инженерия, грант № 3-05).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Ротанова Т.В. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 530–538.
2. Menon A.S., Waxman L., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 722–726.
3. Menon A.S., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 14929–14934.
4. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Расулова Ф.С., Гириодман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 638–640.
5. Seeling G.F., Meister A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 5092–5096.
6. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // Meth. Enzymol. 1994. V. 244. P. 350–375.
7. Seol J.H., Baek S.H., Kang M.S., Ha D.B., Chung C.H. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 8087–8092.
8. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Гириодман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 293–299.
9. Kisselev A.F., Akopian T.N., Castillo V., Goldberg A.L. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 395–402.
10. Edmunds T., Goldberg A.L. // J. Cell Biochem. 1986. V. 32. P. 187–191.
11. Smith C.K., Baker T.A., Sauer R.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 6678–6682.
12. Wickner S., Maurizi M.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 8318–8320.
13. Waxman L., Goldberg A.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 4883–4887.
14. Misuzawa S., Gottesman S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 358–362.
15. Stout V., Torres-Cabassa A.S., Maurizi M.R., Gutnick D., Gottesman S. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 1738–1747.
16. Dierksen K.P., Marks J., Chen D.D., Trempy J.E. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 5126–5130.
17. van Melder L., Thi M.H.D., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M.R. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 27730–27738.
18. Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. // Молекулярная биология. 1997. Т. 31. С. 945–949.
19. Манухов И.В., Брошников Г.Е., Завильгельский Г.Б., Гириодман Л.М., Мельников Э.Э., Старкова Н.Н., Ротанова Т.В., Цирульников К.Б. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 365–368.
20. Inoue I., Rechsteiner M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 29241–29246.
21. Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. // Anal. Biochem. 1979. V. 99. P. 53–64.

Coupling of Proteolysis and Hydrolysis of ATP

upon Functioning of Lon Protease of *Escherichia coli*.

II. Hydrolysis of ATP and Activity of Peptidehydrolase Sites of the Enzyme

E. E. Mel'nikov, K. B. Tsurul'nikov, and T. V. Rotanova[#]

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

The absence of direct correlation between the efficiency of functioning of ATPase and peptidehydrolase sites of Lon protease was revealed. It was shown that Lon protease is an allosteric enzyme, in which the catalytic activity of peptidehydrolase sites is determined by the binding of nucleotides, their magnesium complexes, and free magnesium ions in the enzyme's ATPase sites. It was revealed that complex ADP-Mg, an inhibitor of the native enzyme, is an activator of the Lon-K362Q form of the Lon protease mutant in the ATPase site. Considered are variants of intersite functional contacts realizing in the enzyme. The existence of two ways of signal transduction was established from the ATPase sites to peptidehydrolase ones in the Lon protease oligomer— intra- and intersubunit ways. Location of the enzyme ATPase sites is suggested in the areas of the complementary surfaces of subunits. It is hypothesized that ATP hydrolysis upon degradation of protein substrates by the *E. coli* Lon protease *in vivo* acts as a factor of restriction of the enzyme's degrading activity.

Key words: ATPase, ATP-dependent proteolysis, *E. coli*, Lon protease, lon gene

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

The full English version of the paper is published in *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 2, and is also available (free) at <http://www.maik.ru/>.