



УДК 577.152.342*153.134

ПРОТЕОЛИЗ, СОПРЯЖЕННЫЙ С ГИДРОЛИЗОМ АТФ. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *Escherichia coli*

© 2003 г. К. Б. Цирульников, Э. Э. Мельников, Т. В. Ротанова[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, ГСП, Москва, В-437, ул. Михлухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.10.2002 г. Принята к печати 15.10.2002 г.

Изучена регуляция активности протеолитических центров Lon-протеиназы. Установлено, что АТФ–Mg проявляет свойства неконкурентного активатора пептидазных центров фермента. Экспериментально подтвержден процессивный механизм гидролиза белковых субстратов Lon-протеиназой в условиях гидролиза АТФ. Показано, что необходимым фактором процессивного протеолиза нативной Lon-протеиназой является олигомерность фермента. Исследованием свойств смешанного мутанта Lon-K362Q/S679A подтверждено существование внутрисубъединичного и межсубъединичного путей передачи сигнала от АТФ-азных центров к протеолитическим. Изучено взаимовлияние субстратов Lon-протеиназы; высказано предположение о существовании кооперативных взаимодействий между пептидажными центрами в олигомере фермента.

Ключевые слова: AAA⁺-белки; АТФ-зависимый протеолиз; протеиназа Lon; пептидазный центр; регуляция; *E. coli*.

ВВЕДЕНИЕ

Селективный протеолиз – важнейший механизм поддержания внутриклеточного гомеостаза – осуществляется AAA⁺-протеиназами, относящимися к сообществу AAA⁺-белков (АТФ-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) [1–6]. Внутриклеточные AAA⁺-протеиназы выполняют функции регуляции клеточного метаболизма путем расщепления короткоживущих регуляторных белков и деградации дефектных полипептидов, образующихся в результате ошибок транскрипции или трансляции, химического повреждения, неправильного сворачивания или действия стрессогенных факторов [7–10].

Lon-протеиназа *E. coli* (далее Lon-протеиназа, КФ 3.4.21.53, классификация MEROPS ID: S16.001), первая обнаруженная AAA⁺-протеиназа, представляет собой цитоплазматический гомоолигомерный фермент, субъединица которого (784 а.о.) содержит три функциональных домена: N-концевой, предполагаемая функция которого – участие в селективном взаимодействии с белками-мишенями, центральный – АТФ-азный и C-концевой – протеолитический [11–13]. Ранее был идентифицирован каталитически активный остаток проте-

олитического центра – Ser679 [14], однако наличие в Lon-протеиназе классической триады (Ser–His–Asp) не получило подтверждения [15], в связи с чем было выдвинуто предположение о возможном функционировании каталитической диады Ser–Lys в активном центре фермента [15]. Недавно получены доказательства принадлежности Lon-протеиназы к неклассическому семейству сериновых протеиназ с каталитической диадой Ser679–Lys722 в протеолитическом активном центре (клан SF в классификации MEROPS) [16].

Lon-протеиназа (как и другие известные к настоящему времени АТФ-зависимые протеиназы *E. coli* – ClpAP, ClpXP, FtsH и HslUV [17–20]) обладает следующими характерными свойствами: (1) протеолитическая активность фермента сопряжена с гидролизом АТФ; (2) фермент обнаруживает высокую селективность при отборе субстратов-мишеней, не проявляя выраженной первичной специфичности при их гидролизе; (3) АТФ-зависимая деградация белковых субстратов происходит по процессивному механизму (без высвобождения высокомолекулярных промежуточных продуктов).

Актуальными проблемами АТФ-зависимого протеолиза остаются выяснение роли сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ и механизма этого процесса, а также установление принципов селективного узнавания ферментами субстратов-мишеней. Одним из перспективных подходов при реше-

Сокращения: ПерТВЕ – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl; Lon-w.t. – нативная Lon-протеиназа; AMP-PP – α,β-метиленаденозин-5'-трифосфат.

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

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза ПерТВЕ и АТФ нативной Lon-протеиназой (Lon-w. t.) и мутантной формой Lon-K362Q

Фермент	Кинетические константы	Субстрат				АТФ*
		ПерТВЕ				
		Эффектор				
		–	АТФ–Mg	АМР–СРР–Mg	АДР–Mg	
Lon-w. t.	K_m , мМ	4.4 ± 0.8	3.8 ± 0.7	3.1 ± 0.5	–	0.18 ± 0.04
	k_{cat} , с ⁻¹	4.7 ± 0.4	49 ± 5	42 ± 4	–	0.80 ± 0.8
	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	1.1 ± 0.3	13 ± 4	13.5 ± 4	–	4.4 ± 1.3
Lon-K362Q	K_m , мМ	0.55 ± 0.1	0.36 ± 0.07	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.30 ± 0.06
	k_{cat} , с ⁻¹	0.43 ± 0.04	2.0 ± 0.2	6.1 ± 0.6	5.3 ± 0.5	0.06 ± 0.005
	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	0.79 ± 0.25	5.6 ± 1.7	5.6 ± 1.6	5.3 ± 1.6	0.20 ± 0.06

Условия: 50 мМ Трис–НСl–буфер, рН 8.0, 0.1 М NaCl, 37°C (при гидролизе ПерТВЕ – 10% DMSO, 0.2 мМ 4,4'-дитиодипиридин). Концентрации: АТФ и АДР – 2.5 мМ, АМР–СРР – 0.5 мМ, MgCl₂ – 20 мМ, Lon (обе формы) – 0.1 мкМ, субстрат – 30–200 мкМ.
* По данным работы [21].

нии этих проблем является исследование взаимодействия протеолитических и АТФ-азных центров нативных и модифицированных ферментов. Ранее нами были представлены результаты изучения *in vitro* АТФ-азной активности Lon-протеиназы, влияния на нее свободных нуклеотидов и ионов магния [21], а также данные о влиянии гидролиза АТФ на функционирование пептидазных центров фермента [22].

Цель настоящей работы – изучение регуляции протеолитических центров нативной Lon-протеиназы и ее мутантной формы Lon-K362Q [23], несущей замену остатка Lys362 на Gln в А-мотиве Уолкера АТФ-азного центра фермента. Основное внимание уделено получению количественной характеристики активности протеолитических центров нативного и мутантного ферментов, выявлению особенностей функционирования протеолитических центров при гидролизе низкомолекулярного и белкового субстратов и выяснению вопроса, является ли олигомерное состояние фермента необходимым условием для сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ и реализации процессивного механизма протеолиза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественное изучение активности протеолитических центров Lon-протеиназы проводилось с использованием предложенного нами ранее [24] тиоэфирного субстрата – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (ПерТВЕ). В работе [24] показано, что активность Lon-протеиназы в отношении гидролиза этого низкомолекулярного субстрата является нуклеотидрегулируемой: фермент проявляет тиоэстеразную активность в отсутствие нуклеотидов (“базовая активность”); в присутствии комплекса

АТФ–Mg скорость гидролиза возрастает; АДР–Mg ингибирует процесс гидролиза ПерТВЕ.

Вместе с тем гидролиз ПерТВЕ Lon-протеиназой не может в полной мере отражать взаимодействие фермента с белковыми субстратами, поскольку при анализе эффективности гидролиза низкомолекулярного субстрата не может быть учтен весь комплекс взаимодействий белка-мишени и фермента. Поэтому для удобства обсуждения проблем АТФ-зависимого протеолиза целесообразно различать пептидазный и протеолитический центры фермента: первый включает каталитический центр и сорбционный участок, обеспечивающий связывание с областью субстрата, примыкающей к гидролизуемой связи, а второй, кроме пептидазного центра, включает и другие участки взаимодействия фермента с белковым субстратом, в том числе локализованный в АТФ-азном домене так называемый “центр узнавания” белка-мишени [21]. В связи с этим для исследования эффективности функционирования протеолитических центров Lon-протеиназы наряду с низкомолекулярным тиоэфирным субстратом, позволяющим получать информацию о пептидазных центрах фермента, были использованы также олигопептидный (мелиттин) и белковый (β-казеин, далее – казеин) субстраты.

Сравнительная характеристика гидролиза ПерТВЕ, мелиттина и казеина нативной Lon-протеиназой

Гидролиз ПерТВЕ Lon-протеиназой был изучен как в отсутствие АТФ–Mg, так и в стандартных условиях исследования фермента (при концентрациях АТФ и Mg²⁺ 2.5 и 20 мМ соответственно). Значение K_m , определенное в отсутствие АТФ–Mg, практически не меняется в присутствии нуклеотид-магниевого комплекса, однако значение k_{cat} повы-

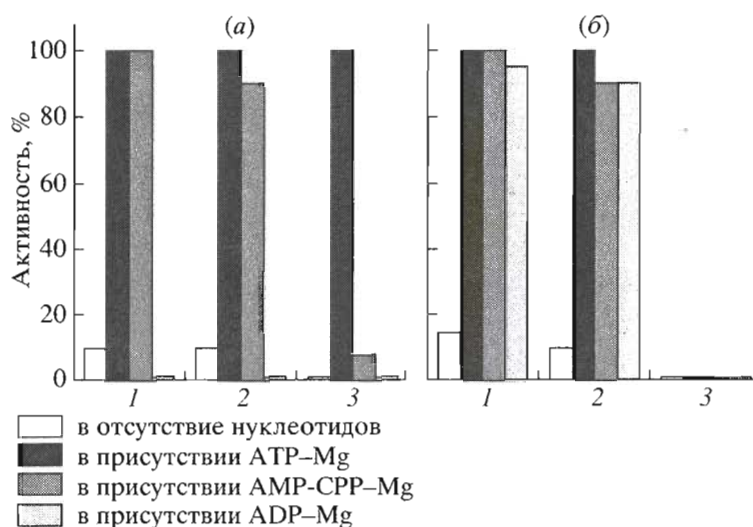


Рис. 1. Активность нативной Lon-протеиназы (а) и ее мутантной формы Lon-K362Q (б) при гидролизе ПерТВЕ (1), мелиттина (2) и казеина (3) в отсутствие и в присутствии нуклеотид-магневых комплексов. Условия: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.0, 0.1 М NaCl, 37°C. Концентрации: нуклеотиды – 2.5 мМ, MgCl₂ – 20 мМ.

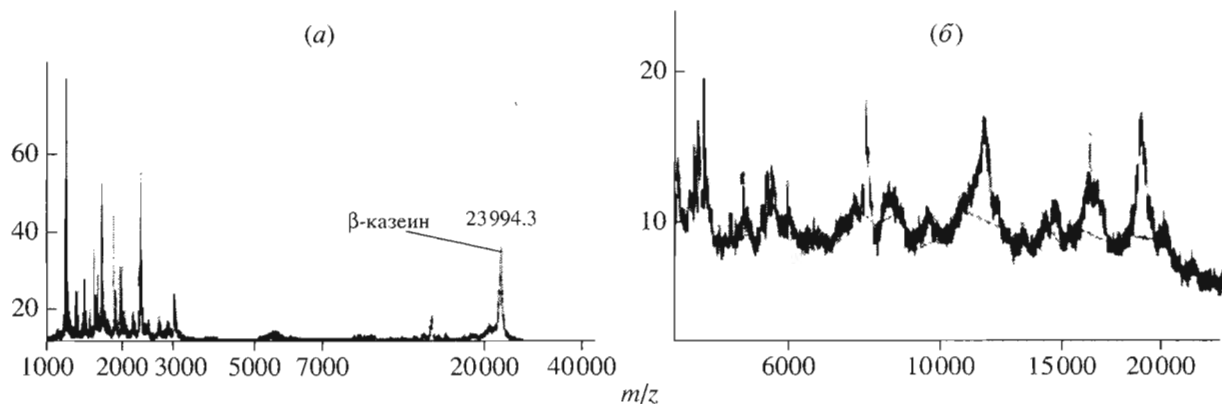


Рис. 2. Масс-спектры продуктов гидролиза β -казеина Lon-протеиназой в присутствии ATP-Mg (а) и AMP-CPP-Mg (б). Время реакции 30 мин; степень гидролиза субстрата 30 (а) или 10% (б).

шается более чем на порядок (табл. 1). Таким образом, взаимодействие с ATP-Mg не влияет на связывание субстрата в сорбционном участке пептидазного центра, но воздействует на каталитический аппарат Lon-протеиназы, активируя расщепление тиоэфирной связи, то есть ATP-Mg проявляет свойства неконкурентного аллостерического активатора пептидазных центров фермента.

Изучение тиоэстеразной активности Lon-протеиназы в присутствии комплекса негидролизующего аналога ATP (AMP-CPP) с магнием позволяет моделировать функционирование пептидазных центров для случая, когда ATP-азные центры фермента находятся в связанном с ATP-Mg состоянии, но гидролиз нуклеотида не происходит. Значения кинетических констант гидролиза Lon-протеиназой тиоэфирного субстрата в присутствии AMP-CPP-Mg практически совпадают со значениями, полученными в условиях гидролиза ATP

(табл. 1). В присутствии ADP-Mg пептидазные центры фермента, как и было показано ранее [24], полностью ингибируются (табл. 1 и рис. 1а, 1). Таким образом, именно связывание ATP-Mg вызывает активацию, а связывание ADP-Mg – ингибирование пептидазных центров Lon-протеиназы, то есть ATP-Mg проявляет свойства модифицируемого аллостерического эффектора по отношению к пептидажным центрам Lon-протеиназы. Аналогичные данные получены при изучении гидролиза мелиттина Lon-протеиназой (рис. 1а, 2).

Влияние состояния ATP-азных центров Lon-протеиназы на гидролиз белкового субстрата существенно отличается от влияния на гидролиз ПерТВЕ (ср. 1 и 3 на рис. 1а): казеин эффективно расщепляется ферментом только в условиях гидролиза ATP. Методом масс-спектрометрии MALDI установлено, что при гидролизе казеина нативной Lon-протеиназой в присутствии ATP-Mg

образуются исключительно низкомолекулярные продукты (10–20 а. о., m/z до 3000) без накопления крупных интермедиатов (процессивный протеолиз, рис. 2а). В присутствии АМР-СРР-Мг наблюдается низкоэффективный протеолиз казеина (рис. 1а, 3), при этом в смеси продуктов обнаруживаются фрагменты субстрата с высокой молекулярной массой – от 5 до 16 кДа (непроцессивный протеолиз, рис. 2б). Таким образом, для реализации процессивного протеолиза необходима не только активация пептидазных центров, но и гидролиз АТФ.

Полагают, что процессивный механизм деградации белков инициируется связыванием концевой (N- или C-) области белкового субстрата с центром узнавания фермента, локализованным в АТФ-азном домене [25–28]. При этом в дальнейшем процессе последовательного отщепления пептидов от концевой части субстрата могут поочередно участвовать несколько активных центров, расположенных в протеолитических доменах различных субъединиц олигомера фермента, а гидролиз АТФ может быть направлен на регуляцию активности пептидазных центров различных субъединиц с целью обеспечения согласованности их функционирования. Функция гидролиза АТФ при гидролизе белковых субстратов может заключаться также и в осуществлении дезагрегации или дезолигомеризации белковых комплексов Lon-протеиназой (шапероноподобное действие) [4], что обеспечивает увеличение доступности отдельных участков структуры субстратов для связывания с ферментом.

Олигопептидный субстрат мелиттин, подобно низкомолекулярному субстрату РерТВЕ, гидролизуется нативной Lon-протеиназой как в отсутствие, так и в присутствии АТФ-Мг или АМР-СРР-Мг (ср. 2 и 1 на рис. 1а). Методом масс-спектрометрии MALDI показано, что во всех случаях образуются одинаковые продукты – расщеплению подвергаются следующие связи: Val8–Leu9, Leu9–Thr10, Thr10–Thr11; при этом образуется шесть фрагментов олигопептида (Gly1–Val8, Leu9–Gln26; Gly1–Leu9, Thr10–Gln26; Gly1–Thr10, Thr11–Gln26). Ранее было показано, что полученный с помощью генно-инженерных методов протеолитический домен Lon-протеиназы гидролизует мелиттин с образованием тех же продуктов, что и полноразмерная Lon-протеиназа [29]. Таким образом, можно полагать, что молекула мелиттина, подвергаясь гидролизу, взаимодействует только с протеолитическим центром полноразмерного фермента и что Lon-протеиназа независимо от состояния АТФ-азных центров осуществляет лишь один акт гидролиза внутри каждой молекулы мелиттина, то есть процессивный механизм гидролиза в случае мелиттина не реализуется.

Таблица 2. Влияние субстратов протеолитического центра на АТФ-азную активность нативной Lon-протеиназы

Эффектор	–	Казеин, 20 мкМ	Мелиттин, 100 мкМ	РерТВЕ, 100 мкМ
v_0 , мкМ/мин	1.83	3.84	3.92	1.89

Приведены начальные скорости гидролиза АТФ; погрешность определения 10%. Условия см. в подписи к табл. 1.

В то же время обнаружено, что мелиттин стимулирует АТФ-азную активность Lon-протеиназы (табл. 2), то есть проявляет свойство, присущее белковому субстрату и отсутствующее у низкомолекулярного субстрата. Поскольку известно, что увеличение АТФ-азной активности Lon-протеиназы обусловлено связыванием белкового субстрата в так называемом аллостерическом центре (предполагаемом центре узнавания белка-мишени, локализованном в АТФ-азном домене фермента) [21], можно считать, что олигопептид также способен связываться с аллостерическим центром Lon-протеиназы. Следует отметить, что в работе [30] показано, что мелиттин формирует стабильные гомотетрамеры с M более 11000 Да, которые, вероятно, взаимодействуют с Lon-протеиназой подобно белковым субстратам. Таким образом, Lon-протеиназа, по-видимому, может одновременно связывать мелиттин в двух своих центрах – в центре узнавания белка-мишени и в пептидазном центре.

Мутант Lon-K362Q как модель активной субъединицы Lon-протеиназы

Мутантная форма фермента Lon-K362Q [23] с заменой консервативного остатка Lys362 АТФ-азного центра характеризуется значительно пониженной по сравнению с нативным ферментом АТФ-азной активностью (табл. 1). Мутант полностью утрачивает протеолитическую активность по казеину (рис. 1б, 3). В то же время Lon-K362Q сохраняет способность гидролизовать РерТВЕ и мелиттин (рис. 1б, 1 и 2). В отсутствие нуклеотидов эффективность гидролиза РерТВЕ мутантом и нативным ферментом (значения k_{cat}/K_m) различаются мало (табл. 1), хотя величины k_{cat} у мутанта уменьшаются примерно на порядок. АТФ-Мг и АМР-СРР-Мг активируют тиоэстеразную активность мутанта подобно действию на нативный фермент.

Методом седиментации активного фермента [31] было продемонстрировано, что олигомерные состояния нативной и мутантной форм Lon-протеиназы существенно различаются: в присутствии АТФ-Мг функционально активной формой Lon-протеиназы является тетрамер, а мутанта Lon-K362Q – мономер. Таким образом, в условиях

Таблица 3. Гидролиз ПерТВЕ смесью мутантов Lon-K362Q и Lon-S679A (комплементация мутаций)

Эффекторы	Фермент			
	Lon-S679A	Lon-K362Q	Lon-K362Q + Lon-S679A	Lon-w. t.
–	0	2	0	10
2.5 мМ АТР, 20 мМ MgCl ₂	0	20	33	100
2.5 мМ АДР, 20 мМ MgCl ₂	0	20	2	0

Приведены относительные скорости гидролиза субстрата; погрешность определения 10%.

Условия см. в подписи к табл. 1. Концентрации: Lon-w. t. и Lon-K362Q – 0.06 мкМ, Lon-S679A – 0.4 мкМ, субстрат – 100 мкМ.

гидролиза АТР мутант моделирует функционирование отдельной субъединицы Lon-протеиназы. Тогда отсутствие у мономерного мутанта способности гидролизовать белковый субстрат свидетельствует о том, что олигомерность нативной Lon-протеиназы наряду с гидролизом АТР является необходимым фактором процессивного протеолиза (как и протеолиза вообще). По-видимому, участок узнавания белкового субстрата формируется олигомерной структурой нативного фермента и включает область АТР-азного домена, локализованную вблизи остатка Lys362.

Уникальным свойством мутанта Lon-K362Q оказалось то, что ADP-Mg, ингибитор АТР-азной, протеолитической и тиоэстеразной активности нативной Lon-протеиназы, оказывает активирующее действие на гидролиз им низкомолекулярного субстрата ПерТВЕ, причем практически столь же эффективное, как АТР-Mg и AMP-PP-Mg (табл. 1 и рис. 1б, 1 и 2). Эти результаты позволяют сделать заключение, что независимо от природы нуклеотида его комплекс с магнием активирует пептидазный центр собственной субъеди-

ницы (внутрисубъединичное взаимодействие АТР-азного и пептидазного центров). В таком случае, эффект ингибирования олигомерной нативной Lon-протеиназы аденозиндифосфатом может быть обусловлен межсубъединичными взаимодействиями АТР-азных и пептидазных центров.

Подтверждение этого предположения было получено в экспериментах по изучению свойств смешанного олигомера Lon-K362Q/S679A, образованного мутантами, несущими замены по каталитически активным остаткам АТР-азного и протеолитического центров, соответственно: Lon-K362Q [23] (обладает пептидазной активностью) и Lon-S679A [14] (не имеет пептидазной активности). Образование активных тетрамеров Lon-K362Q/S679A в результате смешения концентрированных растворов индивидуальных мутантов было доказано седиментационным анализом [31]. Следует подчеркнуть, что гидролиз ПерТВЕ смешанным мутантом может быть обусловлен исключительно функционированием пептидазных центров Lon-K362Q.

Установлено, что Lon-K362Q/S679A не гидролизует ПерТВЕ в отсутствие нуклеотидмагниевого комплекса, но обладает повышенной по сравнению с индивидуальным мутантом Lon-K362Q тиоэстеразной активностью в присутствии АТР-Mg (табл. 3). Связывание комплекса ADP-Mg с Lon-K362Q/S679A, в противоположность действию на Lon-K362Q, приводит к ингибированию гидролиза ПерТВЕ – эффект, аналогичный действию ADP-Mg на нативный фермент (табл. 3). Следовательно, в Lon-K362Q/S679A восстанавливаются межсубъединичные взаимодействия, характерные для нативного фермента, то есть наблюдается эффект комплементации мутаций. Эти результаты являются доказательством наличия взаимодействий протеолитических и АТР-азных центров различных субъединиц в молекуле Lon-протеиназы и показывают, что ингибирующее действие ADP-Mg на пептидазные центры действительно осуществляется из соседних субъединиц. При этом эффект межсубъединичного ингибирования подавляет активацию пептидазного центра из АТР-азного центра собственной субъединицы.

Полученные результаты экспериментально подтверждают высказанную ранее [22] гипотезу о реализации в Lon-протеиназе двух путей передачи сигнала от АТР-азных центров к пептидазным: внутрисубъединичного и межсубъединичного. Общие представления о возможных межцентровых взаимодействиях в олигомере Lon-протеиназы рассмотрены в работе [22]. Упрощенная схема, иллюстрирующая пути передачи сигнала в Lon-протеиназе на примере одной пары субъединиц фермента, приведена на рис. 3.

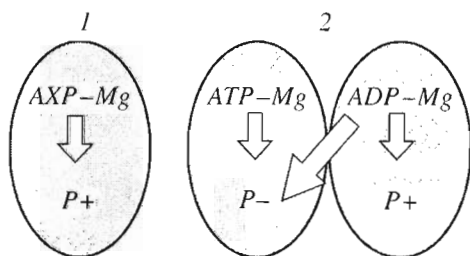


Рис. 3. Пути передачи сигнала от АТР-азных центров к пептидазным в Lon-протеиназе: 1 и 2 – внутрисубъединичная и межсубъединичная передача сигнала. P+ и P– – активированные и дезактивированные пептидазные центры соответственно, AXP – АТР или АДР.

Влияние ионов магния и нуклеотидов на гидролиз РерТВЕ нативной Lon-протеиназой и Lon-K362Q

Ионы магния – необходимый активатор ферментативного гидролиза АТФ. Известно [21], что АТФ-азная активность Lon-протеиназы зависит от концентрации ионов Mg и максимальна при эквимольном соотношении АТФ/Mg; избыток ионов Mg ингибирует гидролиз АТФ. Поскольку *in vivo* фермент функционирует в условиях избытка ионов Mg по отношению к нуклеотиду, представлялось необходимым изучить пептидазную активность Lon-протеиназы в присутствии обоих компонентов при их различных соотношениях, чтобы установить, существует ли корреляция между активностью АТФ-азных и пептидазных центров. Предварительно было раздельно исследовано влияние ионов Mg и свободных нуклеотидов на тиюэстеразную активность Lon-протеиназы.

Установлено, что в отсутствие нуклеотидов ионы магния являются эффективным активатором пептидазных центров нативной Lon-протеиназы и мутанта Lon-K362Q: зависимости степени активации гидролиза РерТВЕ от концентрации Mg^{2+} имеют колоколообразный вид (рис. 4) с максимумом в области 20 мМ. Данные результаты свидетельствуют о том, что роль Mg^{2+} при функционировании Lon-протеиназы заключается в участии не только в гидролизе АТФ, но и в активации пептидазных центров. Интересно, что ранее максимальная тиюэстеразная активность Lon-протеиназы обнаруживалась при более низких концентрациях ионов Mg [22], что может быть обусловлено формой, в которой фермент выделяется из клеток: известно [32], что сродство ADP к Lon-протеиназе очень высоко, и можно полагать, что в ряде случаев фермент после выделения оказывается в частично связанном с ADP состоянии.

Свободный АТФ также активирует гидролиз тиюэфирного субстрата нативной Lon-протеиназой (рис. 5, 1), однако максимальный эффект активации проявляется при весьма низкой концентрации нуклеотида (около 0.01 мМ) и выражен значительно слабее, чем в случае ионов Mg (ср. рис. 4 и 5). С повышением концентрации АТФ до 0.3–0.5 мМ начальная скорость реакции гидролиза снижается до уровня примерно половины от максимальной и далее не изменяется. Связывание ADP при любых концентрациях нуклеотида вызывает ингибирование тиюэстеразной активности нативного фермента. На мутантную форму Lon-K362Q оба свободных нуклеотида в отсутствие ионов Mg оказывают ингибирующее действие во всем интервале исследованных концентраций.

При одновременном действии АТФ и ионов Mg нативная Lon-протеиназа максимально эффективно гидролизует РерТВЕ в области концентрации ионов Mg от 10 до 50 мМ независимо от кон-

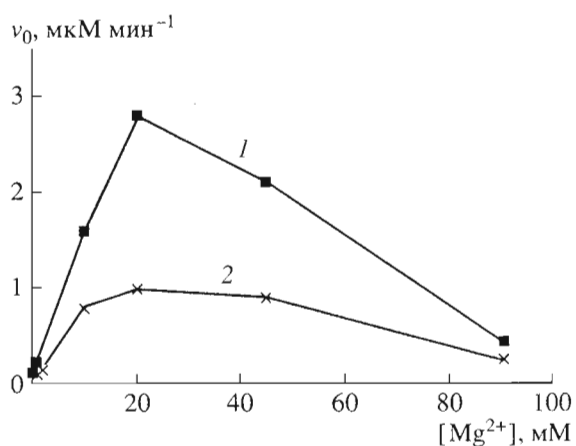


Рис. 4. Зависимость тиюэстеразной активности нативной Lon-протеиназы (1) и Lon-K362Q (2) от концентрации Mg^{2+} . Условия см. в подписи к табл. 1. Концентрация РерТВЕ – 50 мкМ.

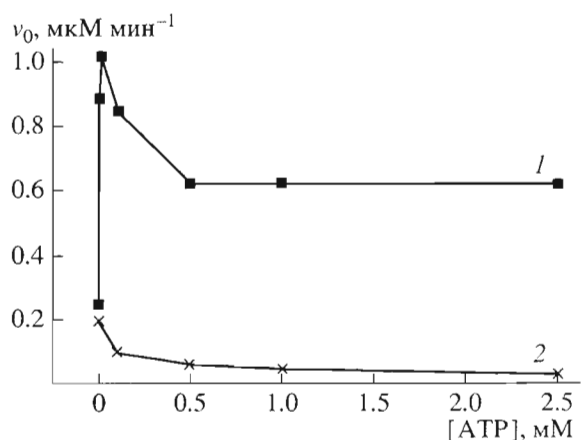


Рис. 5. Зависимость тиюэстеразной активности нативной Lon-протеиназы (1) и Lon-K362Q (2) от концентрации АТФ. Условия см. в подписи к рис. 4.

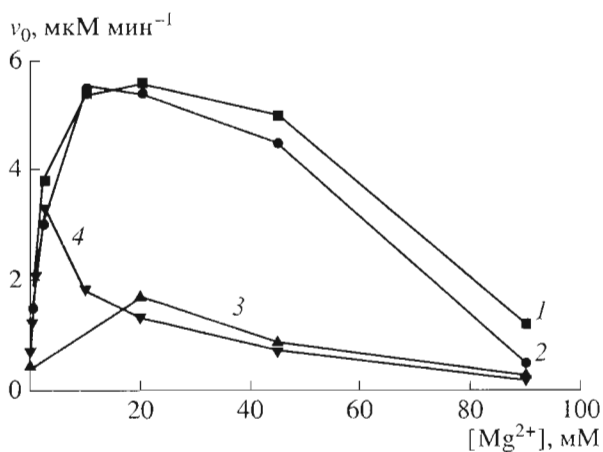


Рис. 6. Зависимость тиюэстеразной активности нативной Lon-протеиназы (1, 2) и Lon-K362Q (3) от концентрации Mg^{2+} в присутствии АТФ. Концентрации АТФ – 2.5 (1, 3) и 0.25 мМ (2). (4) – АТФ-азная активность Lon-w.t. Условия см. в подписи к рис. 4.

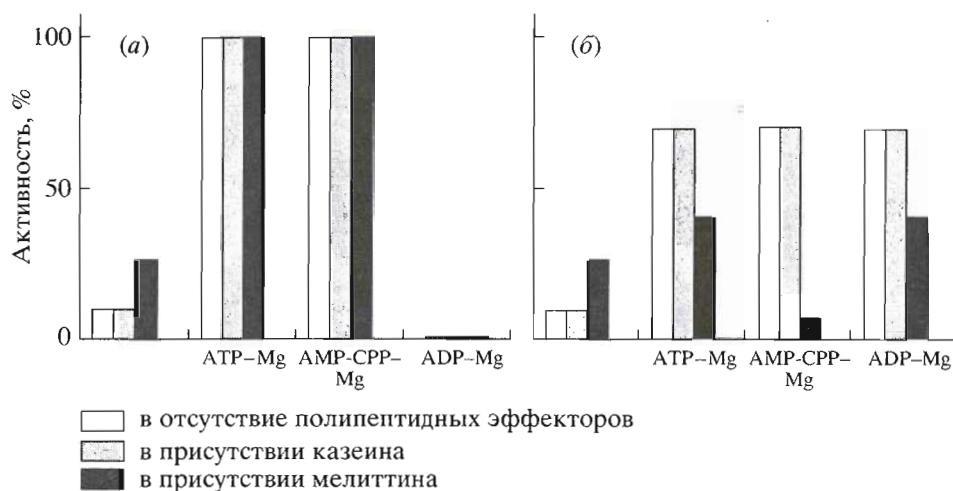


Рис. 7. Влияние полипептидных эффекторов на тиюэстеразную активность нативной Lon-протеиназы (а) и Lon-K362Q (б) в отсутствие и в присутствии нуклеотид-магниевого комплекса. Условия см. в подписи к табл. 1. Концентрации: Lon-w.t. – 0.1 мкМ, Lon-K362Q – 0.25 мкМ, ПерТВЕ – 50 мкМ, казеин – 0.5 мг/мл, мелиттин – 0.5 мг/мл.

центрации АТР (рис. 6, кривые 1, 2); высокие концентрации ионов Mg вызывают значительное снижение эффективности гидролиза. Аналогичная зависимость наблюдается и для мутанта Lon-K362Q (кривая 3). Для сравнения на рис. 6 представлена зависимость АТР-азной активности нативной Lon-протеиназы от концентрации ионов Mg (кривая 4). При сопоставлении кривых 1 и 4 видно, что максимальная тиюэстеразная активность проявляется ферментом в условиях пониженной АТР-азной активности, и это означает отсутствие прямой корреляции между АТР-азной и пептидазной активностью Lon-протеиназы. Из совокупности продемонстрированных результатов следует также, что регуляторное действие на активность пептидазных центров Lon-протеиназы оказывают как нуклеотид-магневые комплексы, так и свободные нуклеотиды и ионы магния.

Влияние мелиттина и казеина на гидролиз ПерТВЕ нативной Lon-протеиназой и Lon-K362Q

Тиюэфирный субстрат ПерТВЕ и белковый субстрат β -казеин значительно различаются по характеру взаимодействия с Lon-протеиназой и Lon-K362Q (рис. 1), а олигопептидный субстрат мелиттин проявляет сходство как с тиюэфирным субстратом (гидролизуется ферментом в отсутствие нуклеотида), так и с белковым субстратом (активирует гидролиз АТР, табл. 2). Представлялось интересным исследовать предполагаемую конкуренцию казеина и мелиттина с низкомолекулярным субстратом за связывание в пептидажном центре Lon-протеиназы.

Оказалось, что ни мелиттин, ни казеин практически не влияют на тиюэстеразную активность нативного фермента в присутствии как АТР-Mg, так

и АТР-Mg (рис. 6, кривые 1, 2); высокие концентрации ионов Mg вызывают значительное снижение эффективности гидролиза. Аналогичная зависимость наблюдается и для мутанта Lon-K362Q (кривая 3). Для сравнения на рис. 6 представлена зависимость АТР-азной активности нативной Lon-протеиназы от концентрации ионов Mg (кривая 4). При сопоставлении кривых 1 и 4 видно, что максимальная тиюэстеразная активность проявляется ферментом в условиях пониженной АТР-азной активности, и это означает отсутствие прямой корреляции между АТР-азной и пептидазной активностью Lon-протеиназы. Из совокупности продемонстрированных результатов следует также, что регуляторное действие на активность пептидазных центров Lon-протеиназы оказывают как нуклеотид-магневые комплексы, так и свободные нуклеотиды и ионы магния.

и АТР-Mg (рис. 7а), что, по-видимому, объясняется значительно более высокой скоростью гидролиза Lon-протеиназой ПерТВЕ по сравнению с мелиттином и казеином и возможной активацией фермента при связывании олигопептидного и белкового субстратов. Действительно, в отсутствие нуклеотидов введение мелиттина приводит к активации гидролиза тиюэфира (рис. 7а), что можно интерпретировать как проявление кооперативных взаимодействий между пептидажными центрами, постулированных нами в работе [21].

Действие мелиттина на нуклеотиднезависимую тиюэстеразную активность мутанта Lon-K362Q подобно действию на активность нативного фермента (рис. 7б), однако в присутствии нуклеотид-магниевого комплекса мелиттин ингибирует гидролиз тиюэфира мутантом. При этом эффективность ингибирования одинакова при наличии как АТР-Mg, так и АТР-Mg, но значительно увеличивается в присутствии АТР-Mg (рис. 7б). Таким образом, только для мутанта Lon-K362Q, в котором отсутствуют межсубъединичные взаимодействия, обнаруживается ожидаемая конкуренция между ПерТВЕ и мелиттином.

Можно полагать, что неоднозначная картина взаимовлияния субстратов обусловлена параллельным протеканием целого ряда процессов в протеолитических центрах Lon-протеиназы – это гидролиз низкомолекулярного и полипептидного субстратов, возможные межцентровые кооперативные взаимодействия, а также вероятные изменения олигомерного состояния фермента при взаимодействии с полипептидными субстратами. Дополнительный эффект в общую картину сложной регуляции функционирования пептидазных центров Lon-протеиназы вносит активирующее действие белкового субстрата на АТР-азную актив-

ность фермента (табл. 2), которое может быть обусловлено зависимостью скорости высвобождения ADP из АТФ-азного центра от наличия белка-субстрата [32].

При изучении совместного влияния казеина и ADP на гидролиз РерТВЕ Lon-протеиназой было обнаружено, что добавление ADP после преинкубации Lon-протеиназы с казеином не приводит к ингибированию гидролиза тиоэфира (рис. 8, 1). Это означает, что связывание (но не гидролиз!) белкового субстрата с ферментом происходит и в отсутствие нуклеотида, при этом такое взаимодействие может ухудшать сродство ADP к Lon-протеиназе и обеспечивать дополнительный способ регуляции активности пептидазных центров белковым субстратом. Напротив, предварительное инкубирование фермента с ADP дезактивирует пептидазные центры (см. выше), а последующее добавление казеина не приводит к быстрому восстановлению активности (рис. 8, 2). По-видимому, связанные с ADP молекулы Lon-протеиназы либо вообще не взаимодействуют с белковым субстратом, либо их взаимодействие не приводит к быстрой активации пептидазных центров.

Совокупность полученных данных показывает, что регуляция функциональной активности го-моолигомерной Lon-протеиназы осуществляется сложным комплексом как внутри-, так и межсубъединичных взаимодействий активных центров. При этом обнаруживается влияние не только АТФ-азных центров на пептидазные, но и взаимовлияние последних.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы реактивы, соответствующие квалификации "ос. ч." или "х. ч.". Выделение и очистка ферментов, определение тиоэстеразной и АТФ-азной активностей описаны в работах [21, 22]. Количественные характеристики активностей получали с использованием программы Microcal Origin 5.0 (Microcal Software, Inc.).

Гидролиз β -казеина регистрировали с помощью SDS-гель-электрофореза по методу Лэммли [33], следя за убылью полосы белкового субстрата, окрашенной Кумасси R-250, во времени. Реакционная смесь содержала 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.0, 0.1 М NaCl, 5 мМ АТФ или 1 мМ AMP-CPP, 20 мМ MgCl₂, 0.5 мг/мл β -казеина, 0.1 мг/мл Lon-протеиназы. К аликвотам реакционной смеси (по 20 мкл) через равные промежутки времени (10–30 мин) добавляли по 7 мкл лизирующего буфера (0.2 М Трис-НСl, рН 8.9, 4% SDS, 20% глицерин, 0.5 мМ EDTA, 6% β -меркаптоэтанол, бромфеноловый синий), кипятили, наносили на 12%-ный гель (20 мкл на лунку) и проводили электрофорез.

Масс-спектрометрический анализ продуктов гидролиза β -казеина проводили на приборе

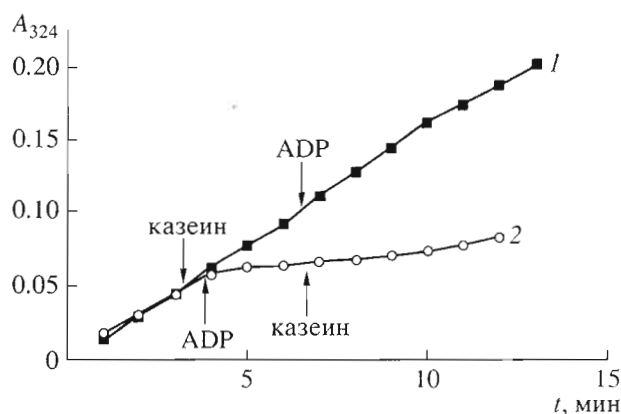


Рис. 8. Совместное влияние казеина и ADP на гидролиз РерТВЕ Lon-протеиназой. 1 – влияние казеина на взаимодействие ADP с ферментом, 2 – влияние ADP на связывание казеина с ферментом. Стрелками показаны моменты добавления эффекторов. Условия см. в подписи к табл. 1. Концентрации: РерТВЕ – 50 мкМ, казеин – 0.5 мг/мл.

MALDI-MS Vision 2000 (Thermo BioAnalysis, США) в линейном режиме с использованием в качестве матрицы раствора 2% 2,5-дигидроксibenзойной кислоты. Отобранные аликвоты реакционной смеси обессоливали на микроколонках Zip-Tip C4 или C18 (Millipore), элюировали 50% ацетонитрилом, содержащим 0.1% трифторуксусную кислоту, и подвергали масс-спектрометрии.

Гидролиз мелиттина тестировали с помощью масс-спектрометрии MALDI, следя за убылью площади пика, соответствующего мелиттину, во времени. Реакционная смесь содержала 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.0, 0.1 М NaCl, 5 мМ АТФ, 5 мМ ADP или 1 мМ AMP-CPP, 20 мМ MgCl₂, 0.5 мг/мл (0.17 мМ) мелиттина, 0.1 мг/мл Lon-протеиназы. Аликвоты реакционной смеси (по 20 мкл) обессоливали на микроколонках Zip-Tip C18 (Millipore), элюировали 50% ацетонитрилом с 0.1% трифторуксусной кислотой и затем подвергали масс-спектрометрии. Сайты расщепления мелиттина были определены с использованием программы GPMW 3.06 (Lighthouse data).

Мутантные формы Lon-K362Q и Lon-S679A получали по методикам, описанным в [23] и в [14] соответственно.

Смешанные олигомеры Lon-K362Q/S679A получали из концентрированных (1 мг/мл) растворов индивидуальных мутантов Lon-K362Q и Lon-S679A, взятых в соотношении 1 : 7, с последующим разбавлением в реакционной смеси в 25 раз. Оптимальное соотношение мутантных форм определяли по максимальному эффекту при гидролизе РерТВЕ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 01-04-49278 и 02-04-48481).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beyer A. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. P. 2043–2058.
2. Neuwald A.F., Arvind L., Spouge J.L., Koonin E.V. // *Genome Res.* 1999. V. 9. P. 27–43.
3. Patel S., Latterich M. // *Trends Cell Biol.* 1998. V. 8. P. 65–71.
4. Maurizi M.R., Li Ch.-Ch.H. // *EMBO Rep.* 2001. V. 2. P. 980–985.
5. Maupin-Furlow J.A., Wilson H.L., Kaczowka S.J., Ou M.S. // *Front. Biosci.* 2000. V. 5. P. D837–865.
6. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
7. Gottesman S. // *Ann. Rev. Genet.* 1996. V. 30. P. 465–506.
8. Goldberg A.L. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 203. P. 9–23.
9. Maurizi M.R. // *Experientia.* 1992. V. 48. P. 178–201.
10. Wickner S., Maurizi M.R., Gottesman S. // *Science.* 1999. V. 286. P. 1888–1893.
11. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // *Биоорганическая химия.* 1990. Т. 16. С. 869–880.
12. Ротанова Т.В. // *Биоорганическая химия.* 1999. Т. 25. С. 883–891.
13. Chin D.T., Goff S.A., Webster T., Smith T., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 11718–11728.
14. 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.
15. Starkova N.N., Koroleva E.P., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // *FEBS Lett.* 1998. V. 422. P. 218–220.
16. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э., Цирульников К.Б. // *Биоорганическая химия.* 2003. Т. 29. С. 97–99.
17. Katayama Y., Gottesman S., Pumphrey J., Rudikoff S., Clark W.P., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 15226–15236.
18. Gottesman S., Clark W.P., de Crecy-Lagard V., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 22618–22626.
19. Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Mori H., Yamataka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 1344–1351.
20. Rohrwild M., Coux O., Huang H.C., Moerschell R.P., Yoo S.J., Seol J.H., Chung C.H., Goldberg A.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 5808–5813.
21. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Ротанова Т.В. // *Биоорганическая химия.* 2000. Т. 26. С. 530–538.
22. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Ротанова Т.В. // *Биоорганическая химия.* 2001. Т. 27. С. 120–129.
23. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Гинопдман Л.М., Ротанова Т.В. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. С. 293–299.
24. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Расулова Ф.С., Гинопдман Л.М., Ротанова Т.В. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. С. 638–640.
25. Gonzalez M., Frank E.G., Levine A.S., Woodgate R. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3889–3899.
26. Wang L., Wilson S., Elliott T. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 6033–6041.
27. Smith C.K., Baker T.A., Sauer R.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 6678–6682.
28. Higashitani A., Ishii Y., Kato Y., Korinchi K. // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 254. P. 351–357.
29. 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.
30. Iwadata M., Asakura T., Williamson M.P. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 257. P. 479–487.
31. Hesterberg L.K., Lee J.C. // *Meth. Enzymol.* 1985. V. 117. P. 97–115.
32. Menon A.S., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 14921–14928.
33. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

Proteolysis Coupled to ATP Hydrolysis: Regulation of the Activity of Proteolytic Sites of Lon Protease from *Escherichia coli*

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

[#]Phone: +7 (095) 335-4222; e-mail: rotanova@enzyme.siocb.ras.ru
 Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Regulation of activity of the proteolytic sites of Lon protease was studied. It was found that ATP-Mg has the properties of a noncompetitive activator of peptidase sites. The processive mechanism of the hydrolysis of protein substrates by Lon protease was experimentally confirmed under the conditions of ATP hydrolysis. It was shown that the oligomeric state of the enzyme is the necessary prerequisite for the processive proteolysis by the native Lon protease. The study of the properties of the mixed mutant Lon-K362Q/S679A confirmed the existence of the intra- and intersubunit pathways of signal transduction from the ATPase to proteolytic sites. The mutual influence of substrates of Lon protease was studied, and the existence of cooperative interactions between the peptidase sites in the oligomeric enzyme was suggested. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: AAA⁺ proteins, ATP-dependent proteolysis, *Escherichia coli*, Lon protease, peptidase site, regulation