



УДК 577.152.342*1'134:577.322.23

УНИКАЛЬНАЯ СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АТР-ЗАВИСИМЫХ Lon-ПРОТЕИНАЗ ПОДСЕМЕЙСТВА A

© 2013 г. Т. В. Ротанова*., Н. И. Дергоусова*, А. Д. Морозкин**

* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

** НИИ Экспериментальной кардиологии ФГУ «РКНПК» Минздравсоцразвития, 121552 Москва, ул. Черепковская 15а

Поступила в редакцию 29.11.2012 г. Принята к печати 6.12.2012 г.

Гомоолигомерные LonA-протеиназы являются ключевыми компонентами системы контроля качества белков в клетках бактерий и эукариот. Сравнительным анализом первичных и вторичных структур ряда бактериальных и эукариотических ферментов установлена доменная организация общего пула LonA-протеиназ. Проведена оценка подобия индивидуальных доменов ферментов, выявлены междоменные линкерные зоны, обнаружены области, способные к включению вставочных пептидных фрагментов. Выявлена уникальность LonA-протеиназ как AAA⁺-белков, которые кроме классического AAA⁺-модуля содержат α-спирализованный домен, аналогичный α-спирализованному домену AAA⁺-1-модуля шаперонов-дезагрегас ClpB/Hsp104 и включающий фрагмент с coiled-coil-структурой.

Ключевые слова: AAA⁺-белки, АТР-зависимый протеолиз, LonA-протеиназы, шапероны ClpB, первичная и вторичная структура, доменная организация, coiled-coil область.

DOI: 10.7868/S0132342313030111

ВВЕДЕНИЕ

LonA-протеиназы — бифункциональные гомоолигомерные эндопептидазы — относятся к суперсемейству AAA⁺-белков (АТР-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) и являются ключевыми компонентами системы контроля качества белков, поддерживающей сохранность клеточного протеома [1]. АТР-азные AAA⁺-модули и протеолитические (P) домены LonA-протеиназ последовательно локализованы в единой полипептидной цепи и совместно участвуют в селективном гидролизе белковых мишеней [2, 3]. AAA⁺-модули имеют обычную для AAA⁺-белков организацию и состоят из двух структурных доменов — большего нуклеотидсвязывающего (NB-домен) и меньшего α-спирализованного (H-домен). Они содержат полный набор характеристических для AAA⁺-белков элементов: консенсусные мотивы Уолкера А и В, SRH-фрагмент, консервативные остатки “sensor-1”, “sensor-2” и “аргининовый палец” [4–6]. P-Домены ферментов, функционирующие в условиях сопряжения с гидролизом АТР и деградирующие белковые субстраты по процессивному механизму [2], принад-

лежат к классу серин—лизиновых пептидгидролаз [7–9], формирующих семейство S16 клана SJ в классификации MEROPS [10]. Пространственное строение полноразмерных LonA-протеиназ до настоящего времени не определено. Вместе с тем, известны кристаллические структуры ряда функциональных фрагментов ферментов: H- и P-доменов Lon-протеиназы из *Escherichia coli* (EcLon) [9, 11], P-домена митохондриального фермента человека (HumLon) [12], а также фрагмента, включающего AAA⁺-модуль и P-домен Lon-протеиназы *Bacillus subtilis* (BsLon) [13].

Характерной особенностью LonA-протеиназ, отличающей их как от протеиназ подсемейства LonB, так и от других AAA⁺-белков, является наличие пролонгированной N-концевой области, имеющей размер от 300–330 (у бактериальных ферментов) до 420–570 а.о. (у ферментов эукариот) и включающей, согласно предсказанию (<http://www.ch.embnet.org>), фрагмент последовательности со специфической coiled-coil конформацией (СС-участок) [14, 15]. Роль N-концевой области в осуществлении АТР-зависимого протеолиза и/или в поддержании активной структуры ферментов до настоящего времени окончательно не выявлена, а архитектура LonA-протеиназ в этой области исследована недостаточно.

* Автор для связи (тел.: (495) 335-42-22; факс: (495)335-71-03; эл. почта: tatyana.rotanova@ibch.ru).

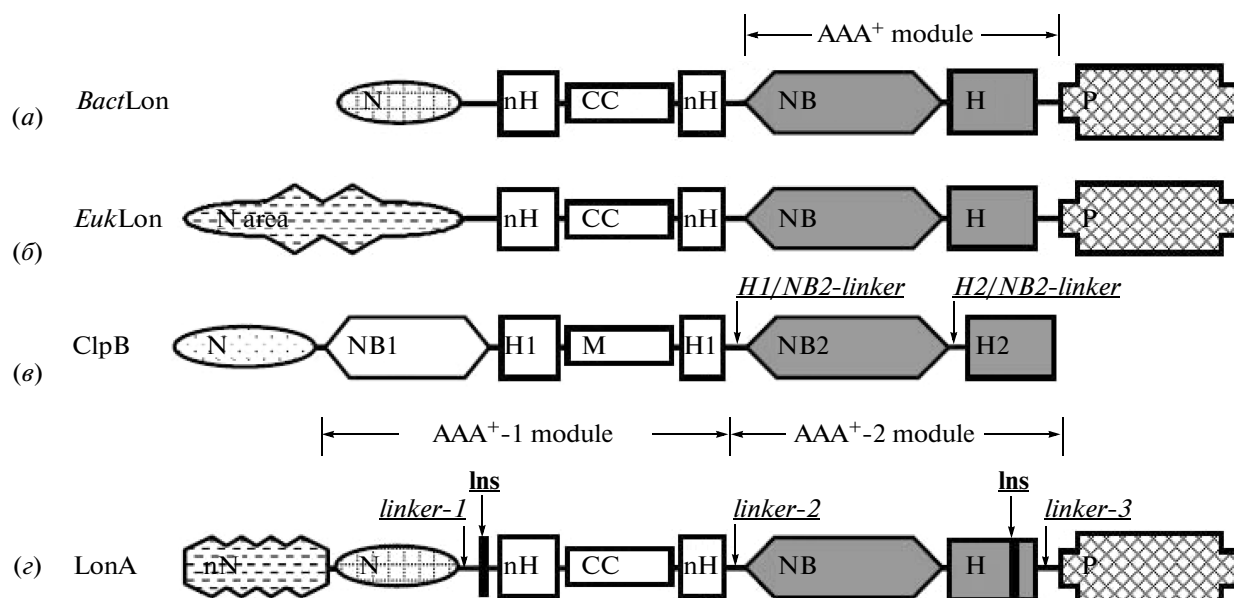


Рис. 1. Схемы строения бактериальных (а) и эукариотических (б) Lon-протеиназ, шаперонов ClpB (в) и общего пула протеиназ подсемейства LonA (г).

N – N-домен; N area – N-зона; nN – N-концевой сегмент; NB, NB1 и NB2 – нуклеотидсвязывающие домены; nH, H, H1 и H2 – α -спирализованные домены; CC – coiled-coil участок; M – промежуточный coiled-coil домен; P – протеолитический домен; Ins – вставочный фрагмент; linker – линкерный фрагмент.

Пары доменов NB/H, NB1/H1 и NB2/H2 формируют AAA⁺-модули.

Недавно предложена концепция [16], представляющая N-концевую область бактериальных ферментов комбинацией двух доменов – собственно N-концевого (N-домен, около 120 а.о.) и заключенного между ним и AAA⁺-модулем α -спирализованного домена (nH-домен, около 180 а.о.) (рис. 1а), подобного H1-доменам молекулярных шаперонов семейства ClpB/Hsp104, содержащих в своей структуре два АТФ-азных модуля (класс I AAA⁺-белков). Уникальная особенность ClpB/Hsp104-шаперонов по сравнению с другими AAA⁺-белками состоит в строении их AAA⁺-1-модуля, в H1-домен которого между третьей и четвертой α -спиралями внедрен вставочный пропеллероподобный M-домен (около 115 а.о.), образованный четырьмя α -спиралями и имеющий CC-конформацию (рис. 1в) [17].

Обсуждаемые α -спирализованные nH-домены бактериальных LonA-протеиназ (далее – nH(CC)-домены) также состоят из восьми α -спиралей, четыре из которых (от четвертой до седьмой включительно) предположительно вовлечены в формирование предсказанного (<http://www.ch.embnet.org>) CC-участка, как и в H1-доменах шаперонов [16]. Вопрос о топологическом подобии CC-участков LonA-протеиназ и M-доменов ClpB-шаперонов остается открытым. Тем не менее, есть все основания полагать, что доменная организация бактериальных LonA-протеиназ соответствует схеме: N–nH(CC)–NB–H–P [16], при этом между-

ные зоны в последовательностях ферментов (линкеры) до настоящего времени не охарактеризованы.

В пользу выдвинутой концепции свидетельствуют результаты определения кристаллической структуры трех фрагментов бактериальных LonA-протеиназ. Два фрагмента представляют N-концевые последовательности ферментов – это N-домен *EcLon*, преимущественно β -структурированный [18], и фрагмент *EcLon*-(1-245), объединяющий N-домен и последующие пять α -спиралей nH(CC)-домена [19]; третий фрагмент, *BsLon*-(246–774), объединяет три C-концевые спирали (от шестой до восьмой) nH(CC)-домена, AAA⁺-модуль и P-домен фермента [13]. Таким образом, получено экспериментальное подтверждение существования всех структурных элементов (восьми α -спиралей) nH(CC)-домена, однако, пространственная укладка LonA-протеиназ в области этого домена остается не определенной, поскольку ни для одного из представителей подсемейства до сих пор не решена структура полного nH-домена со встроенным в него CC-участком.

В LonA-протеиназах эукариот N-концевые области, предстоящие AAA⁺-модулям, объединяют N-концевые зоны (N-зоны), по размеру значительно превышающие N-домены бактериальных ферментов, и nH(CC)-домены, подобные nH(CC)-доменам бактериальных LonA-протеи-

Таблица 1. Характеристика использованных при сравнительном анализе LonA-протеиназ

ID, идентификатор в базе данных MEROPS	Фермент	Источник	Номер в базе данных MEROPS	Кол-во остатков в субъединице	N-Концевой остаток в зрелом ферменте*	Локализация каталитических остатков	
						Ser	Lys
LonA-протеиназы бактерий и архей							
S16.001, LonA peptidases	<i>EcLon</i>	<i>Escherichia coli</i> , γ -proteobacteria	MER000485	784	Met ¹	679	722
	<i>BsLon</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , bacilli	MER000487	774	Met ¹	677	720
	<i>ThthLon</i>	<i>Thermus thermophilus</i> , deinococci	MER006064	795	Met ¹	683	726
	<i>BrabLon</i>	<i>Brucella abortus</i> , α -proteobacteria	MER004081	812	Met ¹	689	732
	<i>NemeLon</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> , β -proteobacteria	MER011561	820	Met ¹	696	739
	<i>HepyLon</i>	<i>Helicobacter pylori</i> , ϵ -proteobacteria	MER003852	835	Met ¹	741	784
S16.UPW	<i>MemaLon</i>	<i>Methanosarcina mazei</i> , archaea	MER019389	795	Met ¹	681	724
LonA-протеиназы эукариот							
S16.002, PIM1 peptidases	<i>HumLon</i>	<i>Homo sapiens</i>	MER000495	959	Pro ¹¹⁴	855	898
	<i>RatLon</i>	<i>Rattus norvegicus</i> , rodent	MER017098	950	Pro ¹⁰²	845	888
	<i>CaeLon</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> , nematoda	MER004130	971	Pro ⁷⁹	878	921
	<i>DrmLon</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> , fruit fly	MER011218	1006	Pro ⁸²	880	923
S16.UPW	<i>SalmLon</i>	<i>Salmo salar</i> , fish	MER164996	1014	Pro ¹⁵⁸	919	962
	<i>SacLon</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , baker's yeast	MER000496	1133	Pro ¹⁷²	1015	1058
	<i>MetrLon</i>	<i>Medicago truncatula</i> , plantae	MER080354	1146	Met ¹⁰³	1044	1087

* – N-Концевые аминокислотные остатки зрелых форм LonA-протеиназ эукариот идентифицированы согласно работе [20].

наз [16] (рис. 1б). Архитектура N-зон до сих пор до конца не выяснена.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ первичных и вторичных структур бактериальных и эукариотических LonA-протеиназ, объединенных в группы по семь представителей, с целью уточнения доменной организации всего пула LonA-протеиназ, а также для выявления сходства и различий как внутри каждой из групп, так и между группами. Для сопоставления выбраны последовательности, представляющие ферменты из максимально отдаленных источников (табл. 1). Особо следует отметить, что в группу бактериальных ферментов включена LonA-протеиназа из археобактерии (*MemaLon*), хотя еще до недавнего времени считалось, что LonA-протеиназы археобактерий представлены исключительно ферментами подсемейства LonB.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выравнивание последовательностей анализируемых LonA-протеиназ (далее Lon-протеиназы,

Lon) и их предсказанных вторичных структур было проведено с учетом экспериментальных данных по вторичной структуре *EcLon*, *BsLon* и *HumLon*, полученных в результате определения кристаллической структуры фрагментов этих белков (индивидуальных доменов или их комбинаций) [9, 11–13, 18, 19]. Результаты выравнивания, представленные на рис. 2, позволили уточнить границы доменов, формирующих полноразмерные ферменты, выявить междоменные линкерные зоны, а также обнаружить области, способные к включению вставочных фрагментов. Для оценки степени консервативности первичных структур белков в качестве референсных были выбраны последовательности *EcLon* (для бактериальных ферментов) и *HumLon* (для ферментов эукариот).

Далее будут представлены результаты детального сопоставления отдельных областей, доменов и линкеров бактериальных и эукариотических Lon-протеиназ.

nN segment	N domain		linker-1
	←	→	
Ec[18, 19]	β_1	β_2	β_3
Bs[13]	α_1	α_2	α_3
Thth	β_4	β_5	INS
Brab			
Name			
Hepy			
Mema			
bact			
Hum			
Rat			
Cae			
Drm			
Salm			
Sac			
Metr			
euk			
bc/eu			
Ec[18, 19]	β_6	α_3 (α_1)	α_4 (α_2)
Bs[13]	α_6 (α_3)	α_5 (α_3)	α_7 (α_3)
Thth			
Brab			
Name			
Hepy			
Mema			
bact			
Hum			
Rat			
Cae			
Drm			
Salm			
Sac			
Metr			
euk			
bc/eu			

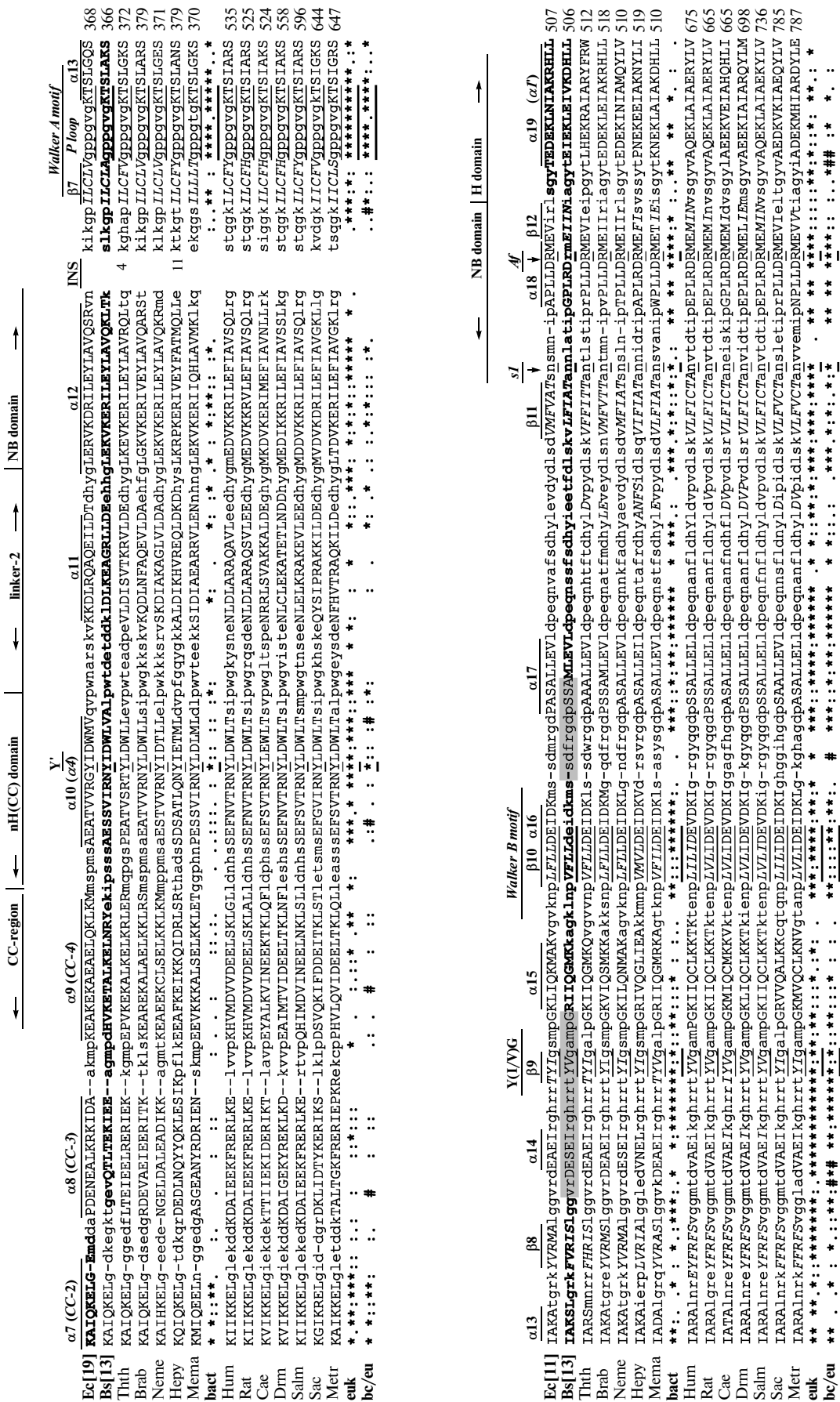


Рис. 2. Продолжение

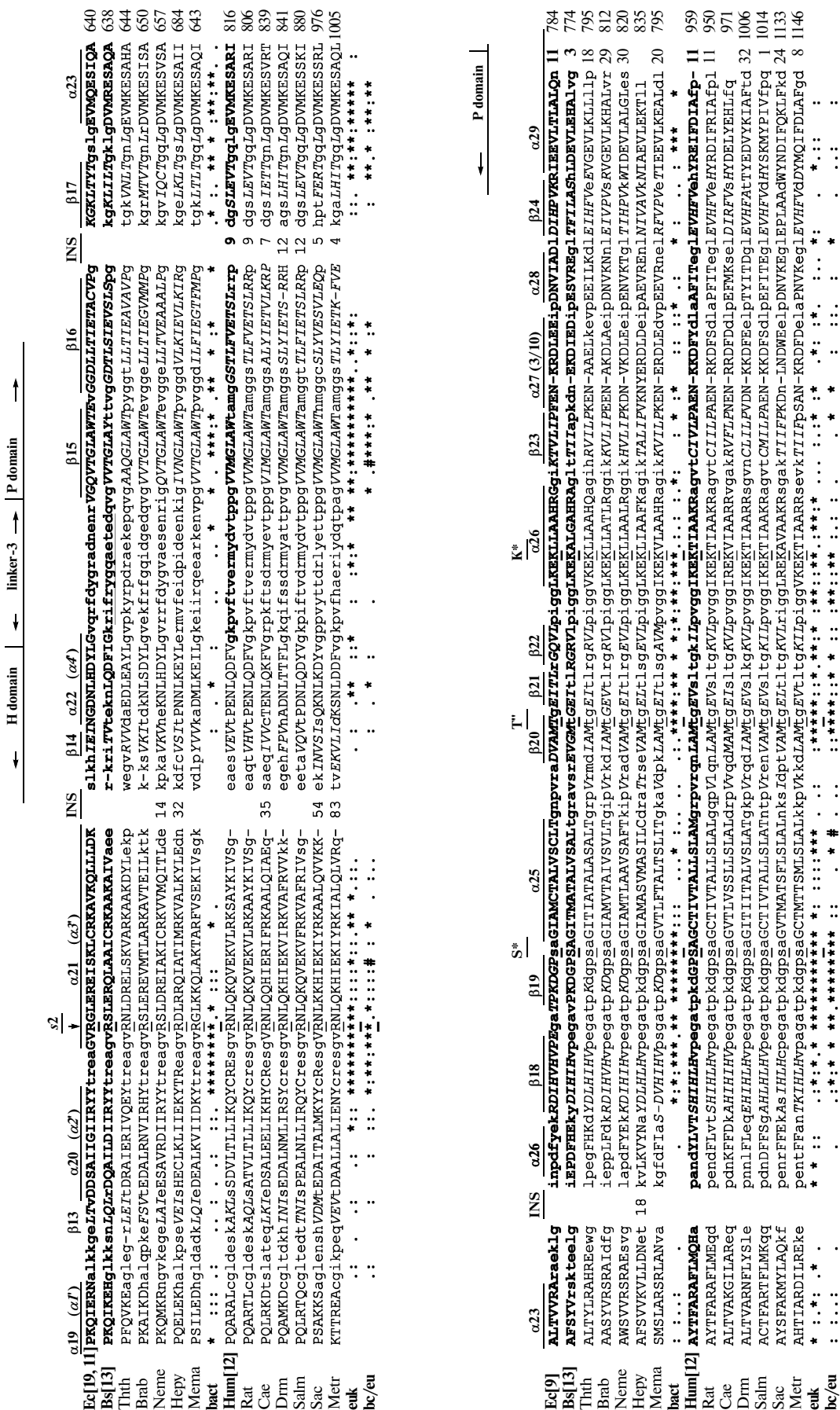


Рис. 2. Продолжение

Рис. 2. Выравнивание первичных и вторичных структур бактериальных и эукариотических LonA-протеиназ.

Ферменты: Ec – *EcLon*, Bs – *BsLon*; Thth – *ThthLon*; Brab – *BrabLon*; Neme – *NemeLon*; Hepy – *HepyLon*; Mema – *MemaLon*; Hum – *HumLon*; Rat – *RatLon*; Cae – *CaeLon*; Drm – *DrmLon*; Salm – *SalmLon*; Sac – *SacLon*; Metr – *MetrLon* (см. табл. 1).

Показаны консенсусные элементы последовательностей: мотивы Уолкера А и В (*Walker A/B motifs*), остатки sensor-1 (*s1*), sensor-2 (*s2*), Arg finger (*Af*); каталитические остатки серина (*S**) и лизина (*K**), строго консервативный остаток тирозина (*Y'*), важный для активности остаток треонина (*T''*); петля Y(I/V)G; INS – вставочные пептидные фрагменты.

Сопоставление фрагментов первичных структур проводили с использованием программы <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW-XXL.html>, границы фрагментов определяли согласно данным по вторичной структуре.

В строках bact, euk и bc/eu отмечены подобные аминокислотные остатки соответственно для бактериальных, эукариотических ферментов и всего пула LonA-протеиназ (степени подобия: * – консервативность, : – высокое подобие; . – подобие; # – различие).

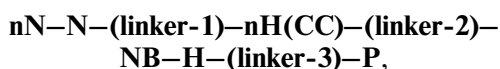
Обычным шрифтом представлены предсказанные (<http://distill.ucd.ie/porter/>) вторичные структуры ферментов и/или их фрагментов, жирным шрифтом – вторичные структуры, полученные согласно данным рентгеноструктурного анализа (строки, обозначенные ссылками [9, 11–13, 18, 19]). Серым цветом выделены фрагменты, для которых отсутствуют рентгеноструктурные данные.

Аминокислотные остатки, образующие α -спирали, показаны прямыми прописными буквами, а β -тяжи – наклонными, аминокислотные остатки, не включенные в элементы вторичной структуры, – строчными буквами. Подчеркнуты аминокислотные остатки, потенциально важные для ферментов или формирующие консенсусные элементы.

N-Концевые препоследовательности (*nN*-сегменты) Lon-протеиназ эукариот

Из рис. 2 следует, что эукариотические Lon-протеиназы в своих протяженных *N*-концевых зонах содержат крупные фрагменты последовательностей, обнаруживающие подобие с *N*-доменами бактериальных ферментов, однако этим фрагментам предшествуют неконсервативные полипептидные сегменты (*nN*) переменной величины (от 78 а.о. у *CaeLon* до 171 а.о. у *SacLon*). На примере протеиназ *HumLon*, *RatLon* и *SacLon* показано, что *nN*-сегменты – это адресующие препоследовательности, обеспечивающие пост-трансляционный перенос в митохондрии синтезированных в цитозоле белков-предшественников и последующий процессинг предшественников с образованием зрелых форм ферментов [20, 21]. *nN*-Сегменты содержат весьма ограниченное количество подобных аминокислот (степень подобия менее 3%, табл. 2), и их предсказанные вторичные структуры не обнаруживают сходства. Можно полагать, что эти сегменты индивидуальны для каждого фермента либо для ограниченной группы Lon-протеиназ.

Принимая во внимание данные о наличии *nN*-сегментов у Lon-протеиназ эукариот, а также приведенную выше схему доменной организации бактериальных Lon-протеиназ, строение всего пула LonA-протеиназ можно представить в виде условной схемы, включающей последовательно соединенные *nN*-сегмент и пять доменов (*N*, *nN(CC)*, *NB*, *H* и *P*), связанных линкерными фрагментами последовательностей (*linkers*-(1-3)):



где домены *NB* и *H* формируют AAA⁺-модуль, а наличие препоследовательности *nN* характерно исключительно для ферментов эукариот (рис. 1z).

Группы полноразмерных бактериальных ферментов и эукариотических ферментов, лишенных *nN*-сегментов, проявляют близкую консервативность (около 40%), которая значительно снижается для объединенного пула LonA-протеиназ (табл. 2). Однако следует заметить, что попарное сопоставление последовательностей *EcLon*-протеиназы и других представителей пула LonA подтверждает высокое сходство ферментов: степень подобия варьируется от 68.8 до 86.0% для пар *EcLon*/бактериальная Lon и от 51.8 до 66.3% – для пар *EcLon*/эукариотическая Lon (табл. 3).

N-Домены LonA-протеиназ

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, *N*-концевые области бактериальных Lon-протеиназ *EcLon* и *BsLon*, сформированные шестью β -тяжами и двумя α -спиральными фрагментами, образуют компактную структуру, что позволило рассматривать эти области в качестве *N*-концевых доменов (*N*-домены) ферментов [13, 16, 18, 19]. По пространственной структуре *N*-домен Lon-протеиназ оказался подобным только *N*-домену гипотетического белка BPP1347 из *Bordetella parapertussis* [19], который, как было обнаружено впоследствии, относится к клану PUA-доменов РНК-связывающих белков [22, 23].

Размеры *N*-концевых областей близки у всех бактериальных Lon-протеиназ, однако, как следует из рис. 2, выраженное подобие всей совокупности аминокислотных последовательностей сохраняется только в пределах пятого β -тяжа (до Asp105, здесь и далее нумерация аминокислотных остатков и элементов вторичной структуры по

Таблица 2. Степень подобию (%) последовательностей бактериальных и эукариотических Lopa-протеиназ и составляющих их фрагментов

Источники Lopa-протеиназ	Домены / фрагменты / линкеры															
	п/р ^{a,b} последовательности	N-домен	linker-1		пН(СС)-домен				linker-2		NВ-домен		N-домен		linker-3	R-домен (без вставок и С-концевых а.о.)
			п/р ^b	без вставок	α3-α5	СС-участок (α6-α9)		α10	linker-2	NВ-домен	п/р ^b	без вставок				
						п/р ^b	α7									
Бактерии и археи	40.0 (784-835) ^c	26.1 (101-116) ^c	4.8 (17-20) ^c	—	42.6 (179-183) ^c	19.6 (48-51) ^c	48.2 (107-110) ^c	60.0 (55) ^c	68.2 (22) ^c	34.8 (23) ^c	75.0 (165-176) ^c	36.7 (88-120) ^c	49.4 (88-89) ^c	31.3 (16) ^c	64.6 (177-178) ^c	
Эукариоты	42.8 (846-1042) ^c	32.5 (108-120) ^c	4.2 (62-179) ^c	4.8 (19-20) ^c	53.6 (178-190) ^c	28.3 (52-60) ^c	62.2 (106-110) ^c	66.7 (56) ^c	81.8 (22) ^c	56.6 (23) ^c	80.8 (166-167) ^c	32.8 (88-171) ^c	63.6 (88) ^c	50.0 (16) ^c	73.0 (177-178) ^c	
Общий пул	25.4 (784-1042) ^c	12.5 (101-120) ^c	0.0 (17-179) ^c	0.0 (17-20) ^c	30.4 (178-190) ^c	8.3 (48-60) ^c	38.8 (106-110) ^c	50.0 (55-56) ^c	50.0 (22) ^c	30.4 (23) ^c	72.2 (165-176) ^c	22.8 (88-171) ^c	43.8 (88-89) ^c	6.2 (16) ^c	52.2 (177-178) ^c	

^a Сопоставлены полноразмерные последовательности бактериальных ферментов и последовательности эукариотических ферментов, лишенные pN-сегментов.

^b п/р — полноразмерные (ый).

^c В скобках приведены размеры (количество аминокислот) субъединиц, доменов или фрагментов ферментов.

Таблица 3. Степень подобия (%) *EcLon* и отдельных бактериальных и эукариотических LonA-протеиназ

Ферменты	П/р ^a	Домены/линкеры							
		N	linker-1 без вставок	nN(CC)	linker-2	NB	Н без вставок	linker-3	Р без вставок и С- концевых а.о.
Ec/bacterial Lons									
<i>Ec/(bact)</i> ^b	40.0	26.1	4.8	37.7	34.8	69.1	46.1	41.2	60.9
<i>Ec/Bs</i>	85.8	84.2	61.1	87.7	78.3	92.2	87.6	81.3	86.5
<i>Ec/Thth</i>	76.6	82.1	63.2	73.2	60.9	90.6	70.8	81.3	87.1
<i>Ec/Brab</i>	85.1	86.8	66.7	89.4	91.3	97.0	85.4	87.5	87.1
<i>Ec/Neme</i>	86.0	87.7	47.4	88.8	82.6	98.2	92.1	93.7	90.0
<i>Ec/Неру</i>	68.8	70.5	50.0	74.0	73.9	81.5	78.6	62.5	84.3
<i>Ec/Mema</i>	71.0	61.4	45.0	72.2	78.3	90.4	76.4	62.5	84.8
Ec/eukaryotic Lons (без nN-сегментов)									
<i>Ec/(euk)</i> ^c	37.1	19.8	0.0	41.3	47.8	78.4	55.1	25.0	56.7
<i>Ec/Hum</i>	66.3	60.5	52.4	68.8	69.6	87.4	78.6	31.3	56.7
<i>Ec/Rat</i>	64.2	59.6	52.6	68.8	78.3	87.4	76.4	43.8	75.8
<i>Ec/Cae</i>	60.9	61.5	52.4	66.3	60.9	86.8	79.8	43.8	75.8
<i>Ec/Drm</i>	59.8	59.1	47.6	68.3	69.6	86.8	80.9	50.0	78.6
<i>Ec/Salm</i>	62.0	57.1	28.6	67.7	87.0	86.8	77.5	56.3	79.2
<i>Ec/Sac</i>	56.0	56.1	25.0	65.8	78.3	88.0	84.3	50.0	78.1
<i>Ec/Metr</i>	51.8	48.8	33.3	60.5	73.9	85.5	73.0	43.8	74.2

^a Сопоставлены полноразмерные (п/р) последовательности бактериальных ферментов и последовательности эукариотических ферментов, лишенные nN-сегментов.

^b Сопоставление *EcLon*-протеиназы и пула бактериальных Lon-протеиназ.

^c Сопоставление *EcLon*-протеиназы и пула эукариотических Lon-протеиназ.

последовательности *EcLon*). Практически полная утрата подобия фрагментов последовательностей в области шестого β-тяжа свидетельствует о том, что эти фрагменты представляют собой линкерные зоны (linker-1, табл. 2), а собственно N-домены бактериальных ферментов ограничены тягом β5 и имеют размеры от 101 (*НеруLon*) до 116 а.о. (*BrabLon*). Следует заметить, что ранее именно такая величина N-доменов была постулирована для бактериальных Lon-протеиназ [24, 25].

Несмотря на относительно невысокую степень консервативности последовательностей N-доменов бактериальных Lon-протеиназ (около 26%, табл. 2), их предсказанные вторичные структуры практически полностью совпадают с экспериментально определенными структурами N-доменов *EcLon* и *BsLon* (за исключением делеции короткой α2-спирали у *НеруLon*-протеиназы, рис. 2). Из этих данных следует, что конформация основной цепи N-концевых доменов имеет более важное значение для ферментов, чем подобие их аминокислотных последовательностей. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что попарное сопоставле-

ние N-доменов *EcLon* и каждой из Lon-протеиназ резко увеличивает степень подобия их первичных структур (от минимального значения 61.4% до максимального – 87.7%, табл. 3). Эти результаты также свидетельствуют о большом сходстве N-доменов бактериальных Lon-протеиназ.

В последовательностях Lon-протеиназ эукариот непосредственно после nN-сегментов локализованы домены, близкие по размеру к N-доменам бактериальных ферментов (108–122 а.о.) (рис. 2) и проявляющие более высокую степень подобия внутри группы (табл. 2), несмотря на то, что между структурными элементами некоторых последовательностей (в частности, в *SacLon* и *MetrLon*) внедрены пептидные вставки небольшой длины. При этом вторичные структуры N-доменов бактериальных и эукариотических ферментов, в целом, совпадают (рис. 2), хотя подобие их первичных структур в объединенном пуле LonA-протеиназ весьма невелико (около 12%, табл. 2).

Подобие совокупности N-доменов Lon-протеиназ эукариот и N-домена референсной бактериальной *EcLon*-протеиназы возрастает почти до

20% (табл. 3). Более того, попарное сопоставление последовательностей N-доменов *EcLon* и отдельных ферментов эукариот выявляет достаточно высокие значения степени консервативности (от 48.8% для пары *EcLon/MeirLon*, до 61.5% для пары *EcLon/CaeLon*, табл. 3). Представленные данные позволяют сделать заключение о выраженном сходстве N-доменов Lon-протеиназ бактерий и эукариот как по размеру, так и по первичной и вторичной структуре.

В области тяжа $\beta 6$ бактериальные и эукариотические ферменты сильно различаются, что служит дополнительным подтверждением назначения этого фрагмента как линкера, связывающего два домена фермента. Размеры последовательностей linker-1 в Lon-протеиназах эукариот (64–181 а.о.) значительно превышают размеры тех же фрагментов в Lon-протеиназах бактерий (17–20 а.о.) (рис. 2). Таким образом, область, соединяющая N-домен со следующим за ним nH(CC)-доменом, способна к включению протяженных фрагментов аминокислотных последовательностей. При этом ни во всем пуле LonA-протеиназ, ни внутри каждой группы ферментов фрагменты linker-1 практически не проявляют подобия (табл. 2).

nH(CC)-Домены LonA-протеиназ

nH(CC)-Домены, согласно работе [16], можно рассматривать в качестве аналогов классического N-домена AAA⁺-белков, сформированных четырьмя α -спиралями (обозначены как $\alpha 3$ – $\alpha 5$ и $\alpha 10$ или $\alpha 1$ – $\alpha 4$ на рис. 2), которые образуют собственно nH-домен, причем, последний включает инсерционный СС-участок, объединяющий четыре промежуточные α -спирали ($\alpha 6$ – $\alpha 9$ или *СС-1*–*СС-4*, рис. 2). Данные по выравниванию последовательностей с учетом установленной и/или предсказанной вторичной структуры анализируемых LonA-протеиназ свидетельствуют о том, что nH(CC)-домены близки по размеру во всем пуле ферментов и обнаруживают достаточно высокие степени гомологии в группах бактериальных и эукариотических ферментов (табл. 2). Следует отметить, что инсерционные СС-участки по степени подобия превосходят полноразмерные nH(CC)-домены, при этом наиболее консервативным фрагментом СС-участков является протяженная спираль $\alpha 7$ (*СС-2*) (табл. 2). Из рис. 2

видно, что именно в области спирали $\alpha 7$ сосредоточено большинство строго консервативных остатков рассматриваемых доменов как для каждой группы ферментов, так и для всего пула LonA-протеиназ.

СС-Участки разделяют собственно nH-домены на два фрагмента: первый включает спирали $\alpha 3$ – $\alpha 5$, а второй представлен спиралью $\alpha 10$. Эти фрагменты проявляют разную консервативность – степень подобия в первом фрагменте очень невелика (ниже, чем у N-доменов), тогда как С-концевые спирали $\alpha 10$ обнаруживают наивысшую степень подобия в пределах nH(CC)-доменов (табл. 2). Строгая консервативность остатка тирозина (Y'), обнаруживаемого в $\alpha 10$ -спирали всего пула ферментов (Y294 у *EcLon*), позволяет предположить важность этого остатка для функционирования или поддержания структуры LonA-протеиназ. Вместе с тем, в ряде случаев группы бактериальных и эукариотических ферментов содержат остатки различной природы в сходных положениях (в частности, это касается остатков № 250, 270, 288 и 299 nH(CC)-домена, рис. 2). Роль такого рода замещений еще предстоит выяснить.

Кристаллическая структура фрагмента *EcLon*–(1–245), включающего N-домен и пять α -спиралей ($\alpha 3$ – $\alpha 7$) nH(CC)-домена [19], хорошо согласуется с его теоретически предсказанной архитектурой. Для фрагмента *BsLon*–(1–209) также обнаружено полностью подобное строение [13], за исключением незначительных различий в отдельных элементах вторичной структуры (например, укороченный размер тяжа $\beta 6$ или утрата петли между спиралями $\alpha 3$ и $\alpha 4$) (рис. 2).

Подтверждением справедливости предложенного в работе [16] строения nH(CC)-доменов служат результаты наложения аминокислотных последовательностей α -спирализованных доменов протеиназ *EcLon* и *BsLon* и шаперона ClpB из *Thermus thermophilus* (*TrClpB*), проведенного с учетом подобия вторичных структур доменов, определенных рентгеноструктурным анализом [13, 17, 19] (рис. 3). Для сравнения на рис. 3 приведены соответствующие фрагменты первичной структуры шаперона ClpC из *B. subtilis* (*BsClpC*), который, как и ClpB, относится к классу I AAA⁺-белков и H1-домен которого также содержит вставочный M-домен, но со значительно укорочен-

Рис. 3. Выравнивание первичных и вторичных структур α -спирализованных и нуклеотидсвязывающих доменов Lon-протеиназ и Clp-шаперонов.

α -Спирализованные домены (а.о.): *EcLon*-nH (124–302), *EcLon*-H (491–579), *BsLon*-nH (122–300), *BsLon*-H (490–577), *TrClp*-H1 (331–532), *TrClp*-H2 (755–854), *BsClpC*-H1 (341–482), *BsClpC*-H2 (712–810).

Нуклеотидсвязывающие домены (а.о.): *EcLon*-NB (326–490), *BsLon*-NB (324–489), *TrClpB*-NB1 (169–330), *TrClpB*-NB2 (562–736), *BsClpC*-NB1 (179–340), *BsClpC*-NB2 (512–693).

В строках nH/H1, nH/H2, NB/NB1 и NB/NB2 отмечены подобные аминокислотные остатки соответствующих доменов. Серым цветом выделены фрагменты, для которых отсутствуют рентгеноструктурные данные. Условные обозначения см. в подписи к рис. 2.

ченными спиральями $\alpha 6$ (CC-1) и $\alpha 7$ (CC-2) [26]. Из рис. 3 видно, что несмотря на наличие нескольких делеций в N-концевой части nH(CC)-доменов LonA-протеиназ, в целом, они конформационно подобны H1(M)-домену именно ClpV-шаперона, хотя в структуре *TiClpV* выявлено два коротких β -тяжа ($\beta 6'$ и $\beta 6''$), отсутствующих в структурах ферментов. При этом степень подобия собственно nH- и H1-доменов (в пределах спиралей $\alpha 3$ – $\alpha 5$ и $\alpha 10$) составляет 28.0%. Для вставочных CC-участков и M-доменов (спирали $\alpha 6$ – $\alpha 9$) сходство возрастает до 35.9%, причем, максимальное подобие (54.2%) проявляют длинные спирали $\alpha 7$.

Без учета CC-участков nH-домены LonA-протеиназ конформационно подобны также H-доменам собственных AAA⁺-модулей и вторых AAA⁺-модулей Clp-шаперонов (рис. 3), хотя в этом случае степень подобия последовательностей относительно невелика: 15.1% для спиралей $\alpha 3$ – $\alpha 5$ и 9.1% для спирали $\alpha 10$. При этом следует отметить, что в H2-доменах обоих шаперонов отсутствуют C-концевые α -спирали ($\alpha 22$). Особо надо подчеркнуть, что в nH(CC)-доменах большинства бактериальных LonA-протеиназ сохраняется консервативный для H-доменов AAA⁺-белков остаток “sensor-2” (*n-s2*) – положительно заряженный остаток, локализованный в начале спирали $\alpha 5$ ($\alpha 3$ -спираль любого H-домена [5], рис. 3).

В то же время ряд характеристик nH(CC)-доменов заметно отличает их от H1-, H2- и H-доменов – это, прежде всего, укороченные спирали $\alpha 4$ – $\alpha 6$ и увеличенный размер спирали $\alpha 10$, а также нарушение β -структуры в области коротких тяжей $\beta 6'/\beta 13$ и $\beta 6''/\beta 14$ (рис. 3). Выявленные отличия, сконцентрированные, в основном, в N-концевой части nH(CC)-доменов, обуславливают невозможность формирования LonA-протеиназами пропеллероподобных образований, характерных для ClpV-шаперонов. Кроме того, сравнение кристаллических структур *EcLon*-(1–245) и *TiClpV* [17, 19] обнаруживает противоположную направленность их длинных спиралей $\alpha 7$ (CC-2), несмотря на проявление ими высокой консервативности. Представленные данные позволяют полагать, что nH(CC)- и H1-домены имеют разную укладку и, как следствие, должны по-разному участвовать в функционировании LonA-протеиназ и ClpV-шаперонов.

AAA⁺-модули LonA-протеиназ

LonA-протеиназы относятся к классу II AAA⁺-белков, и их единственные AAA⁺-модули состоят из доменов NB и H, сформированных стандартными для AAA⁺-белков конформационными элементами [4–6]. Локализация консервативных

консенсусных фрагментов AAA⁺-модулей представлена на рис. 2: мотивы Уолкера A и B занимают, соответственно, положения 356–363 и 418–424 в последовательности *EcLon*, участки “sensor-1” и “sensor-2” – 467–475 и 540–548 (титульные остатки *s1* – Asn473 и *s2* – Arg542), остаток “аргининовый палец” (*Af*) – Arg484.

Началом NB-доменов, согласно работе [5], служит α -спираль, предшествующая мотиву A Уолкера ($\alpha 12$, рис. 2), поэтому фрагмент последовательности, заключенный между спиральями $\alpha 10$ и $\alpha 12$, логично рассматривать как линкерную зону (linker-2) между nH(CC)- и NB-доменами (рис. 1z). Размер линкера-2, включающего спираль $\alpha 11$, одинаков у бактериальных и эукариотических Lon-протеиназ (23 а.о.), и его консервативность сопоставима с консервативностью nH(CC)-доменов (табл. 2).

У обоих Clp-шаперонов размеры пептидных фрагментов, соединяющих модули AAA⁺-1 и AAA⁺-2 (H1/NB2-linker, рис. 1e), составляют 29 а.о. (рис. 3), при этом подобие первичных структур линкеров шаперонов и протеиназ превышает 34%. Выявленное для nH(CC)- и H1-доменов конформационное подобие сохраняется и в области линкера-2 (за исключением утраты спиральности у фрагментов Lon-протеиназ, соответствующих короткой спирали $\alpha 10'$ в *TiClpV*) и распространяется далее на спираль $\alpha 12$ и последующие структурные элементы NB-домена (рис. 3). Следует заметить, что в предсказанной последовательности шаперона ClpC место спирали $\alpha 10'$ занимает короткий β -тяж, и это может указывать на незначительность роли вторичной структуры линкера для шаперонов (рис. 3). Таким образом, можно констатировать, что зона “H1/NB2-linker”, характерная для AAA⁺-белков класса I, сохраняется и в структуре LonA-протеиназ – AAA⁺-белков класса II.

Область собственно NB-доменов, ограниченная спиралью $\alpha 12$ и тяжом $\beta 12$, проявляет максимальную консервативность среди доменов LonA-протеиназ (табл. 2). Особо следует выделить районы консенсусных фрагментов (рис. 2) – это Р-петля, включающая мотив A Уолкера, петля Y(I/V)G (участок 398–400), которая, как полагают, участвует в продвижении развернутой молекулы мишени внутри аксиального канала LonA-протеиназы [27], тяж $\beta 10$ (мотив B Уолкера), а также остатки *s1* и *Af*. При этом некоторые сайты в последовательностях бактериальных и эукариотических ферментов различаются по природе локализованных в них аминокислот (положения 350, 386, 388 и 431 у *EcLon*, рис. 2). Размеры NB-доменов одинаковы у всего пула ферментов за исключением бактери-

альных протеиназ *ThthLon* и *HepyLon*, у которых между спиралью $\alpha 12$ и тяжом $\beta 7$ локализованы небольшие пептидные вставки, образованные преимущественно заряженными аминокислотами (рис. 2).

Предсказанная вторичная структура NB-домена в большей своей части получила подтверждение в результате решения кристаллической структуры *BsLon*-(246–774) [13]. Однако в ходе рентгеноструктурного анализа не было определено строение двух подвижных фрагментов (выделены серым цветом на рис. 2), включающих предсказанные элементы $\alpha 14$ и $\beta 9$, а также петлю между спиралью $\alpha 16$ и $\alpha 17$. Не была обнаружена и собственно спираль $\alpha 16$, а выявленный в эксперименте C-концевой тяж $\beta 12$, согласно предсказанию, может отсутствовать у целого ряда LonA-протеиназ, несмотря на высокую консервативность образующего его тетрапептида EVIR (рис. 2). Таким образом, к настоящему времени вторичная структура NB-доменов LonA-протеиназ охарактеризована недостаточно полно и требует дальнейшего изучения.

В то же время NB-домены LonA-протеиназ проявляют выраженное сходство с обоими NB-доменами шаперонов ClpB и ClpC (рис. 3), причем, несколько более высокой гомологией обладает пара NB(Lon)/NB2(Clp) (в частности, при сопоставлении *EcLon* с *TiClpB* установлено, что консервативность доменов NB/NB1 составляет 41.7%, а доменов NB/NB2 – 48.6%). Степень подобия протеиназ и шаперонов наиболее высока в области мотивов Уолкера А и В и петли Y(I/V)G (рис. 3). Наибольшие различия в размерах и подобии доменов NB, NB1 и NB2 сосредоточены в их C-концевых фрагментах (вслед за мотивом В Уолкера).

Вторичные структуры NB-доменов *BsLon* и *TiClpB* также хорошо согласуются в N-концевых частях, причем, именно в NB2-домене шаперона выявлены предсказанные для LonA-протеиназ спираль $\alpha 14$ и $\alpha 16$, обнаружению которых в *BsLon*, возможно, помешала их локализация в высоколабильных фрагментах (рис. 3). К небольшим различиям сопоставляемых фрагментов структур следует отнести присутствие в NB1-домене дополнительного короткого тяжа $\beta 8'$. Укладка последовательностей в C-концевых частях NB-доменов *BsLon* и *TiClpB* заметно различается. Общими для всех трех доменов остаются только тяж $\beta 11$ и спираль $\alpha 18$, локализованные в непосредственной близости от остатков *s1* и *Af*, соответственно (следует отметить, что полярный остаток *s1* в NB- и NB2-доменах представлен наиболее характерным для AAA⁺-белков аспарагином, а в NB1-домене – реже встречающимся треонином [28]). К

основным различиям вторичных структур C-концевых частей NB-доменов относятся отсутствие в NB1-домене спирали $\alpha 17$, обнаруженной в NB- и NB2-доменах, а также наличие у шаперонов в окружении тяжа $\beta 11$ ряда структурных элементов ($\alpha 17'$, $\alpha 17''$, $\beta 10'$ и $\beta 10''$), отсутствующих в NB-домене *BsLon* (рис. 3). Кроме того, особенностью NB2-доменов служит присутствие 18-членного C-концевого пептидного фрагмента, включающего спираль $\alpha 18'$ и тяж $\beta 12'$, который следует рассматривать как линкер между NB2- и H2-доменами (NB2/H2-linker, рис. 1*в* и 3). Поскольку и в AAA⁺-1-модулях шаперонов ClpB и ClpC, и в AAA⁺-модулях LonA-протеиназ α -спирализованные домены непосредственно примыкают к NB-доменам, присутствие NB2/H2-линкера служит отличительной характеристикой AAA⁺-2-модулей шаперона.

H-Домены AAA⁺-модулей LonA-протеиназ образованы четырьмя α -спиралью ($\alpha 19$ – $\alpha 22$ или $\alpha 1'$ – $\alpha 4'$) и включают два коротких тяжа ($\beta 13$ и $\beta 14$) (рис. 2). В пределах этих структурных элементов, сформированных 87–89 а.о., консервативность H-доменов достаточно высока (более 49 и 63% соответственно для представителей бактерий и эукариот и около 44% для всего пула ферментов) (табл. 2). В отличие от nH(CC)-доменов, степень подобия которых увеличивается от спирали $\alpha 3$ к спирали $\alpha 10$, консервативность H-доменов наиболее высока в области первой спирали ($\alpha 19$) и в окружении консенсусного остатка *s2* (рис. 2). Различия в природе остатков, формирующих H-домены бактериальных и эукариотических ферментов, незначительны (ср. положения 494, 495 и 549 в последовательности *EcLon*).

Вторичная структура H-доменов *EcLon* и *BsLon* [11, 13], в целом, хорошо согласуется со структурами, предсказанными для всех представителей пула LonA-протеиназ, однако размеры спиралей $\alpha 21$ и $\alpha 22$ несколько различаются в кристаллических структурах *EcLon* и *BsLon* (рис. 2). Вместе с тем, H-домены ферментов проявляют высокое топологическое подобие с обоими H-доменами шаперонов (без учета инсерционного M-домена) как по набору структурных элементов, так и по их размеру (исключением служат только C-концевые фрагменты шаперонов, рис. 3).

В то же время из рис. 2 видно, что H-домены значительной части эукариотических LonA-протеиназ (три из семи ферментов в обсуждаемой выборке) содержат пролонгированные вставочные фрагменты, размер которых может превышать 80 а.о. (см., например, *MetrLon*). Небольшое число бактериальных LonA-протеиназ также

имеет пептидные вставки, но их размер обычно невелик и не превышает 30–35 а.о. (рис. 2). Вставочные фрагменты не консервативны и локализируются исключительно между спиралью $\alpha 21$ ($\alpha 3'$) и коротким тяжом $\beta 14$, предвещающим спираль $\alpha 22$ ($\alpha 4'$), то есть расположены аналогично СС-участку в nH(CC)-домене ферментов или М-домени в Н1-домени шаперонов. На этом основании следует признать ошибочной постулированную в работе [29] локализацию сайта встраивания инсерционного 54-членного пептида между AAA⁺-модулем и Р-доменом *SacLon*-протеиназы.

Таким образом, можно констатировать, что область между третьей и четвертой α -спиралями Н-доменов ($\alpha 3'$ – $\alpha 4'$) – вторая выявленная в структуре *LonA*-протеиназ область, способная к включению протяженных фрагментов аминокислотных последовательностей. Следует отметить, что обнаруженное свойство не является универсальным для AAA⁺-белков класса II, поскольку до недавнего времени был известен только один пример такого рода: белки вакуолярного сортирования *Vps4* рассматривались как уникальные, так как в их Н-доменах между третьей и четвертой α -спиралями содержится вставочный β -домен (45–48 а.о.), предназначенный для взаимодействия с адаптерными белками [30, 31]. Роль вставочных фрагментов для структуры и функционирования содержащих их *LonA*-протеиназ еще предстоит выявить.

Н-Домены *LonA*-протеиназ соединяются с Р-доменами через линкерные 16-членные пептиды (linker-3, рис. 1з), которые проявляют значительное подобие внутри групп бактериальных и эукариотических ферментов, но полностью утрачивают его для общего пула протеиназ *LonA* (рис. 2, табл. 2).

Протеолитические Р-домены *LonA*-протеиназ

Протеолитические домены, локализованные в С-концевой части *LonA*-протеиназ, имеют близкие размеры (без учета С-концевых отрезков от 1 до 32 а.о., рис. 2) и проявляют высокую гомологию, хотя и несколько пониженную по сравнению с NB-доменами (табл. 2). Р-Домены начинаются высококонсервативным тяжом $\beta 15$. Другие области высокого подобия сосредоточены в районе тяжа $\beta 17$ –начала спирали $\alpha 23$, а также в зонах, окружающих каталитические остатки (Ser679 и Lys722 в *EcLon*) и важный для активности консервативный остаток треонина (Thr704 (T^{''}), рис. 2). Характерной особенностью ферментов эукариот, отличающей их от бактериальных ортологов, служит наличие небольшой пептидной вставки (от 4 до 12 а.о.) между тяжами $\beta 16$ и $\beta 17$ в N-концевой части домена (рис. 2). Кроме того, следует отме-

тить, что область между спиралями $\alpha 23$ и $\alpha 24$, по-видимому, также способна к размещению вставочных пептидных фрагментов, на что указывает присутствие в этой области 18-членного пептида в последовательности бактериальной *HeryLon*-протеиназы.

Конформационное подобие Р-доменов требует отдельного обсуждения, поскольку, несмотря на сходство превалирующей части последовательности у всего пула ферментов, некоторые экспериментально выявленные элементы вторичной структуры оказались различными в Р-доменах *EcLon*, *BsLon* и *HumLon* [9, 12, 13] (рис. 2). Это, прежде всего, касается отсутствия в структуре *EcLon* короткой спирали $\alpha 24$, обнаруженной у *BsLon* и *HumLon*, а также значительного увеличения в *BsLon* и *HumLon* размера спирали $\alpha 25$ на фоне отсутствия тяжа $\beta 19$, определенного в Р-домене *EcLon*. Последнее обстоятельство приводит к тому, что каталитический остаток серина в последовательности *EcLon* считается локализованным в петле между тяжом $\beta 19$ и спиралью $\alpha 25$, а в последовательностях *BsLon* и *HumLon* – непосредственно в самой спирали $\alpha 25$. Кроме того, обнаружено различие в типах спирали-27 (3/10-спираль у *EcLon* и α -спирали у *BsLon* и *HumLon*), обусловленное, по-видимому, неполной консервативностью первичных структур соответствующих фрагментов. Вопрос о том, отражаются ли выявленные различия на общей укладке Р-доменов и на их функциональной активности, требует дополнительного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные выше данные с очевидностью подтверждают корректность предложенной модели доменного строения *LonA*-протеиназ: nN–N–(linker-1)–nH(CC)–(linker-2)–NB–H–(linker-3)–P (рис. 1з). Сопоставление групп эукариотических и бактериальных *Lon*-протеиназ показывает, что у эукариотических ферментов консервативность, в целом, выше, чем у их бактериальных ортологов. При этом в каждой группе ферментов степени подобия индивидуальных доменов варьируют в широких пределах (табл. 2). Наиболее консервативными как для отдельных групп, так и для всего пула *Lon*-протеиназ оказались функциональные NB- и Р-домены, меньшее подобие проявляют α -спирализованные домены (nH(CC) и Н), а наибольшие различия отмечаются в N-концевых доменах ферментов.

В последовательностях *LonA*-протеиназ выявлены две области, способные к включению крупных вставочных фрагментов. Первая область совпадает с зоной первого линкерного фрагмента

	β_1 β_2 α_1 β_3 α_2 β_4	
CrStr [19]	<code> mnperserIEIPVLPVLDVvvyphmVIPLFVgrEKSIRCLEAAMDhdkKIMLVAQkeastdepgVNDLftVGTVASILQMLK </code>	82
GOR	<code> mnperserIEIpvlpVLDVvvyphmVPLFVgreksIRCLEAAMDHDKKIMLVAQkeastdepgvndLFTVGTVASILQMLK </code>	
SOPMA	<code> mnperserieipvlplrdVvvyphmviPLFVgreksIRCLEAAMDhdkKIMLVAQkeastdepgvndLFTVGTVASILQMLK </code>	
RaptorX	<code> mnperserIEIpvlpVLDVvvyphmviPLFVgreksIRCLEAAMDhdkKIMLVAQkeastdepgvndLFTVGTVASILQMLK </code>	
SSpro4	<code> mnperserIEIpvlpVLDVvvyphmVIPLFVgrEKSIRCLEAAMDhdkKIMLVAQkeastdepgVNDLFTVGTVASILQMLK </code>	
Porter	<code> mnperserIEIPVLPVLDVvvyphmVIPLFVgrEKSIRCLEAAMDhdkKIMLVAQkeastdepgVNDLftVGTVASILQMLK </code>	
	β_5 β_6 $\alpha_3 (\alpha_1)$ $\alpha_4 (\alpha_2)$ $\alpha_5 (\alpha_3)$	
CrStr [19]	<code> lpdgtVKVLEGLQRARISALSdngEHFSAKAELYLESPTIDEREQEVLVRTAISQFEGYIKLnkkippeVLTSLNSiddPAR </code>	164
GOR	<code> lpdgtVKVLEGLQRARISALSdngEHFSAKAELYLESPTIDEREQEVLVRTAISQFEGYIKLnkkippeVLTSLNSiddPAR </code>	
SOPMA	<code> lpdgtVKVLEGLQRARISALSdngEHFSAKAELYLESPTIDEREQEVLVRTAISQFEGYIKLnkkippeVLTSLNSiddPAR </code>	
RaptorX	<code> lpdgtVKVLEGLQRARISALSdngEHFSAKAELYLESPTIDEREQEVLVRTAISQFEGYIKLnkkippeVLTSLNSiddPAR </code>	
SSpro4	<code> lpdgtVKVLEGLQRARISALSdngEHFSAKAELYLESPTIDEREQEVLVRTAISQFEGYIKLnkkippeVLTSLNSiddPAR </code>	
Porter	<code> lpdgtVKVLEGLQRARISALSdngEHFSAKAELYLESPTIDEREQEVLVRTAISQFEGYIKLnkkippeVLTSLNSiddPAR </code>	
	$\alpha_5 (\alpha_3)$ $\alpha_6 (CC-1)$ $\alpha_7 (CC-2)$	
CrStr [19]	<code> LADTTAAHmp1kLADKQSVLEMSdVNERLEYLMAMMESEIDLLQVEKRIrnrVKKQMEKSQREYYLNEQMKAIQKELGemd </code>	245
GOR	<code> LADTTAAHmp1kLADKQSVLEMSdVNERLEYLMAMMESEIDLLQVEKRIrnrVKKQMEKSQREYYLNEQMKAIQKELGemd </code>	
SOPMA	<code> LADTTAAHmp1kLADKQSVLEMSdVNERLEYLMAMMESEIDLLQVEKRIrnrVKKQMEKSQREYYLNEQMKAIQKELGemd </code>	
RaptorX	<code> LADTTAAHmp1kLADKQSVLEMSdVNERLEYLMAMMESEIDLLQVEKRIrnrVKKQMEKSQREYYLNEQMKAIQKELGemd </code>	
SSpro4	<code> LADTTAAHmp1kLADKQSVLEMSdVNERLEYLMAMMESEIDLLQVEKRIrnrVKKQMEKSQREYYLNEQMKAIQKELGemd </code>	
Porter	<code> LADTTAAHmp1kLADKQSVLEMSdVNERLEYLMAMMESEIDLLQVEKRIrnrVKKQMEKSQREYYLNEQMKAIQKELGemd </code>	

Рис. 4. Сопоставление вторичных структур фрагмента *EcLon*(1–245), определенных различными методами. Приведены структуры, определенные рентгеноструктурным анализом [19] (первая строка), и предсказанные согласно программам GOR, SOPMA (www.expasy.org), RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/predict/>), SSpro4 (<http://casp.rnet.missouri.edu/sspro4.html>) и Porter (<http://distill.ucd.ie/porter/>) (строки 2–6).

(linker-1), а вторая локализована внутри Н-домена ферментов, между его третьей и четвертой α -спиралями. Линкеры 2 и 3 имеют стабильные размеры у всего пула ферментов, но проявляют относительно невысокую консервативность. Среди отдельных доменов LonA-протеиназ наиболее стабильным по размеру является пН(CC)-домен, в N-, NB- и P-доменах некоторых представителей подсемейства обнаруживаются небольшие пептидные вставки.

В соответствии с предложенной моделью строения ферменты подсемейства LonA следует считать уникальными представителями AAA⁺-белков, поскольку они формально относятся к AAA⁺-белкам класса II (наличие одного полноразмерного AAA⁺-модуля, NB–H), но обладают также признаками AAA⁺-белков класса I (наличие части другого AAA⁺-модуля, а именно, его α -спирализованного домена, пН(CC), с междоменным линкером, linker-2).

Функционирование AAA⁺-белков класса I сопряжено с гидролизом АТР, происходящим независимо в обоих AAA⁺-модулях. В частности, показано, что связывание АТР в AAA⁺-1-модуле ClpB приводит к стабилизации гексамера шаперона, индуцирует движение М-домена, необходимое для проявления дезагрегационной функции, и вызывает активацию AAA⁺-2-модуля [32]. Отсутствие в

LonA-протеиназах нуклеотидсвязывающего домена-аналога NB1-домена шаперонов ClpB, необходимого для формирования с пН(CC)-доменом полноценного AAA⁺-модуля, приводит к заключению о том, что функции пН(CC)-домена ферментов и Н1-домена шаперонов семейства Clp должны радикально различаться. Весьма вероятно, что роль пН(CC)-домена заключается в участии в формировании третичной (а может, и олигомерной) структуры фермента. В связи с этим дальнейшее изучение LonA-протеиназ предполагает направленность на выявление взаимодействий между пН(CC)-доменом и другими доменами собственной структуры как внутри отдельных субъединиц, так и в олигомерах ферментов.

МЕТОДЫ

Аминокислотные последовательности анализируемых протеиназ получали из базы данных MEROPS (www.merops.sanger.ac.uk) [10]. Для предсказания вторичных структур белков использовали серверы SCRATCH (<http://casp.rnet.missouri.edu/sspro4.html>), ExPASy (www.expasy.org), RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/predict/>) и Porter (<http://distill.ucd.ie/porter/>). Выбор предсказательной программы был осуществлен на основе сравнения вторичной структуры фрагмента *EcLon*-(1–245), полученной в результате рентге-

ноструктурного анализа [19], с данными предсказания с помощью различных программ (рис. 4). Как видно из рис. 4, наибольшие различия между истинной и предсказанными вторичными структурами обнаруживаются в области фрагмента EcLon-(68–82) (тяж $\beta 4$, выделен серым цветом), строение которого, определенное экспериментально, предполагается только программой Porter [33]. На этом основании именно программа Porter была использована для предсказания вторичных структур LonA-протеиназ, представленных в разделе “Результаты и обсуждение”.

Выявление степени консервативности последовательностей, наличия coiled-coil-областей в белках, а также последующий анализ топологии проводили с использованием ресурсов сервера ExPASy (www.expasy.org; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>; www.ch.embnet.org).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-01015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. // *Genome Res.* 1999. V. 9. P. 27–43.
2. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 244. P. 350–375.
3. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 869–880.
4. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
5. Iyer L.M., Leippe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 11–31.
6. Wendler P., Ciniawsky S., Kock M., Kube S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 2–14.
7. Ротанова Т.В. // *Вопр. мед. химии.* 2002. Т. 48. С. 541–552.
8. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э., Цирульников К.Б. // *Биоорган. химия.* 2003. Т. 29. С. 97–99. [Rotanova T.V., Melnikov E.E., Tsirulnikov K.B. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2003. V. 29. P. 85–87.]
9. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 8140–8148.
10. Barrett A.J., Rawlings N.D., O'Brien E.A. // *J. Struct. Biol.* 2001. V. 134. P. 95–102.
11. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Tropea J.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Gustchina A., Wlodawer A. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 113–122.
12. Garcia-Nafria J., Ondrovicova G., Blagova E., Levdikov V.M., Bauer J.A., Suzuki C.K., Kutejova E., Wilkinson A.J., Wilson K.S. // *Protein Sci.* 2010. V. 19. P. 987–999.
13. Duman R.E., Löwe J. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 401. P. 653–670.
14. Ebel W., Skinner M.M., Dierksen K.P., Scott J.M., Trempe J.E. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 2236–2243.
15. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 4865–4871.
16. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // *Биомед. химия.* 2010. Т. 56. С. 412–419. [Rotanova T.V., Melnikov E.E. // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Series B: Biomed. Chem.* 2010. V. 4. P. 404–408.]
17. Lee S., Sowa M.E., Watanabe Y.H., Sigler P.B., Chiu W., Yoshida M., Tsai F.T. // *Cell.* 2003. V. 115. P. 229–240.
18. Li M., Rasulova F., Melnikov E.E., Rotanova T.V., Gustchina A., Maurizi M.R., Wlodawer A. // *Protein Sci.* 2005. V. 14. P. 2895–2900.
19. Li M., Gustchina A., Rasulova F., Melnikov E.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Dauter Z., Wlodawer A. // *Acta Crystallogr., Sec. D, Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66 (Pt 8). P. 865–873.
20. Lu B., Liu T., Crosby J.A., Thomas-Wohleverb J., Lee I., Suzuki C.K. // *Gene.* 2003. V. 306. P. 45–55.
21. Wagner I., van Dyck L., Savel'ev A.S., Neupert W., Langer T. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 7317–7325.
22. Iyer L.M., Burroughs A.M., Aravind L. // *Bioinformatics.* 2006. V. 22. P. 257–263.
23. Bertoni C., Punta M., Fischer M., Yachdav G., Forouhar F., Zhou W., Kuzin A.P., Seetharaman J., Abashidze M., Ramelot T.A., Kennedy M.A., Cort J.R., Belachew A., Hunt J.F., Tong L., Montelione G.T., Rost B. // *Proteins.* 2009. V. 75. P. 760–773.
24. Расулова Ф.С., Дергоусова Н.И., Мельников Э.Э., Гинодман Л.М., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 1998. Т. 24. С. 370–375.
25. Rasulova F.S., Dergousova N.I., Starkova N.N., Melnikov E.E., Rumsh L.D., Ginnodman L.M., Rotanova T.V. // *FEBS Lett.* 1998. V. 432. P. 179–181.
26. Kirstein J., Schlothauer T., Dougan D.A., Lilie H., Tischendorf G., Mogk A., Bukau B., Turgay K. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 1481–1491.
27. Sauer R.T., Baker T.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. V. 80. P. 587–612.
28. Erzberger J.P., Berger J.M. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006. V. 35. P. 93–114.
29. Venkatesh S., Lee J., Singh K., Lee I., Suzuki C.K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 56–66.
30. Scott A., Chung H.-Y., Gonciarz-Swiatek M., Hill G.C., Whitby F.G., Gaspar J., Holton J.M., Viswanathan R., Ghaffarian S., Hill C.P., Sundquist W.I. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 3658–3669.
31. Hill C.P., Babst M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 172–181.
32. Watanabe Y.H., Takano M., Yoshida M. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 24562–24567.
33. Bau D., Martin A.J.M., Mooney C., Vullo A., Walsh I., Pollastri G. // *BMC Bioinformatics.* 2006. V. 7. P. 402.

Unique Structural Organization of ATP-Dependent LonA Proteases**T. V. Rotanova^{*, #}, N. I. Dergousova^{*}, A. D. Morozkin^{**}**[#]Phone: (499) 335-42-22; e-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru^{*}*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*^{**}*Russian Cardiology Research and Production Centre, Institute of Experimental Cardiology,
Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

Homooligomeric LonA proteases are the key components of the protein quality control system in bacteria and eukaryotes. Domain organization of the common pool of LonA proteases is determined by comparative analysis of primary and secondary structures of a number of bacterial and eukaryotic enzymes. The similarity of individual enzyme domains was estimated, domain-domain linker areas were revealed, regions that are capable to include intercalated peptide fragments were identified. LonA proteases were shown to be unique AAA⁺ proteins, because in addition to the classic AAA⁺ module they contain a part of another AAA⁺ module, namely the α -helical domain including a coiled-coil region, which is similar to the α -helical domain of the AAA⁺-1 module of the chaperone-disagregases ClpB/Hsp104.

Keywords: AAA⁺ proteins, ATP-dependent proteolysis, LonA proteases, ClpB chaperones, primary and secondary structure, domain organization, coiled-coil region.