



УДК 577.152.342*1'134

РОЛЬ α -СПИРАЛИЗОВАННЫХ ДОМЕНОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ АТФ-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕАЗЫ ИЗ *ESCHERICHIA COLI*

© 2014 г. А. Г. Андрианова, А. М. Куджаев, О. В. Серова, Н. И. Дергусова, Т. В. Ротанова[#]

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

Поступила в редакцию 19.05.2014 г. Принята к печати 22.05.2014 г.

Гомоолигомерные АТФ-зависимые LonA-протеазы – бифункциональные ферменты, относящиеся к суперсемейству AAA⁺-белков. Их субъединицы сформированы пятью последовательно соединенными доменами: N-концевым (N), α -спирализованным (H1(CC)), нуклеотидсвязывающим (NB), вторым α -спирализованным (H) и протеолитическим (P). Наличие “вставочного” H1(CC)-домена определяет уникальность LonA-протеаз среди AAA⁺-белков. На примере Lon-протеазы *E. coli* (Ec-Lon) исследована роль α -спирализованных доменов в функционировании LonA-протеаз. Проведено сравнительное изучение свойств интактной Ec-Lon и ее мутантных форм Lon-R164A и Lon-R542A, несущих замены остатков аргинина, локализованных в сходных положениях в H1(CC)- и H-доменах. Показано, что H-домен играет исключительную роль для реализации гидролиза АТФ и для связывания ферментом белка-мишени. H1(CC)-Домен не имеет определяющего значения для проявления каталитических свойств фермента, однако влияет на эффективность функционирования АТФ-азного и пептидазного центров Lon-протеазы и участвует в поддержании стабильности фермента. Выдвинуто предположение об участии H1(CC)-домена в формировании пространственной структуры LonA-протеаз и/или в образовании комплексов с ДНК.

Ключевые слова: AAA⁺-белки, АТФ-зависимая Lon-протеаза, доменная организация, α -спирализованные домены, сайт-направленный мутагенез, *Escherichia coli*.

DOI: 10.7868/S0132342314060037

ВВЕДЕНИЕ

Семейство АТФ-зависимых Lon-протеаз (КФ 3.4.21.53; MEROPS: клан SJ, S16) является одним из ключевых компонентов системы контроля качества (СКК), обеспечивающей целостность и функциональность клеточных белков [1–4]. СКК объединяет молекулярные шапероны, представленные, в основном, белками теплового шока (Hsp) различных семейств [5, 6], и ряд селективных пептидгидролаз и протеолитических комплексов – протеасом [7, 8]. Пептидгидролазы СКК (или AAA⁺-протеазы) – это бифункциональные ферменты, протеолитические компоненты которых относятся к протеазам разных классов, а АТФ-азные являются представителями суперсемейства шаперонов-дезагрегас Hsp100 или AAA⁺-белков (АТФ-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями [9, 10]). В процессе функционирования СКК AAA⁺-проте-

азы осуществляют селективную деградацию клеточных регуляторных белков и, кроме того, освобождают клетки от дефектных, поврежденных и мутантных белков.

Гомоолигомерные Lon-протеазы принадлежат к редким представителям AAA⁺-белков, у которых АТФ-азные модули, состоящие из нуклеотидсвязывающих (nucleotide binding, NB) и α -спирализованных (helical, H) доменов, и протеолитические компоненты (P-домены), представленные серин–лизиновыми эндопептидазами [11], последовательно расположены в единой полипептидной цепи. Семейство Lon подразделяется на подсемейства А и В, первое из которых объединяет цитоплазматические ферменты бактерий и митохондриальные протеазы эукариот, а второе – мембраносвязанные Lon-протеазы архей. LonA- и LonB-протеазы различаются окружением каталитических остатков серина и лизина в Р-домене, а также общей архитектурой: LonA-последовательности содержат пролонгированные N-концевые области, а LonB – трансмембранные домены, внедренные внутрь AAA⁺-модулей [12].

Сокращения: AMPPNP – аденозин-5'-(β , γ -имидо)трифосфат; DTDP – 4,4'-дитиодипиридин; Nu – нуклеотид; РепТВЕ – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (495) 335-42-22; факс: (495) 335-71-03; эл. почта: tatyana.rotanova@ibch.ru).

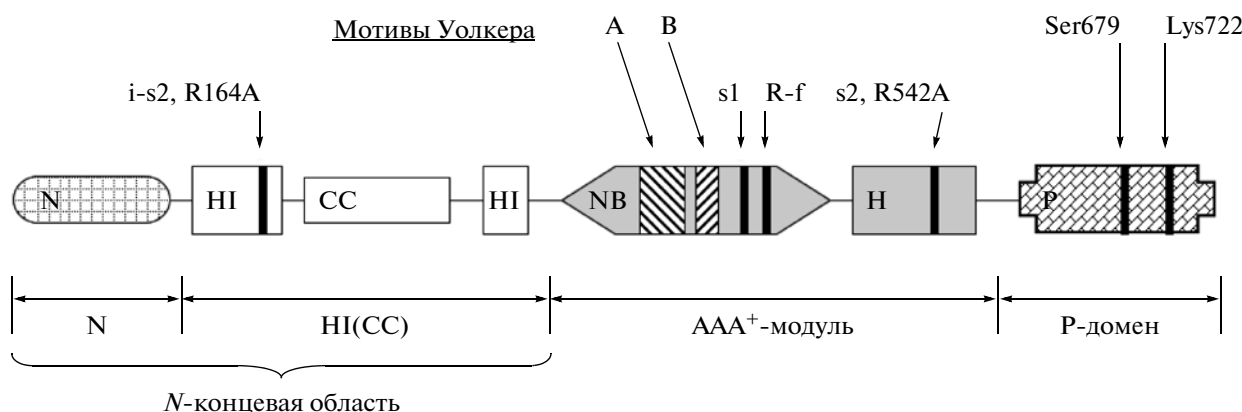


Рис. 1. Доменная организация LonA-протеазы *E. coli*. Обозначения доменов: N – N-концевой; HI(CC) – α -спирализованный с coiled-coil-областью; NB – нуклеотидсвязывающий; H – α -спирализованный; P – протеолитический. NB- и H-домены формируют AAA⁺-модуль. Обозначения консервативных элементов: A и B – мотивы Уолкера, s1 и s2 – сенсорные остатки, i-s2 – потенциальный сенсорный остаток, R-f – остаток “аргининовый палец”, Ser679 и Lys722 – каталитически активные остатки.

В наших предыдущих работах показано, что N-концевые области LonA-протеаз образованы двумя доменами – собственно N-концевым (N-домен) и вставочным α -спирализованным, который включает участок с coiled-coil (CC) конформацией (helical inserted CC-containing domain, HI(CC)-домен) [13, 14]. Таким образом, доменная организация индивидуальных субъединиц LonA-протеаз может быть представлена следующей схемой: N–HI(CC)–NB–H–P, где фрагмент NB–H формирует AAA⁺-модуль.

Нами обнаружено сходство между LonA-протеазами и шаперонами семейства ClpB/Hsp104 [14]. Субъединицы последних сформированы N-концевым доменом и двумя AAA⁺-модулями, при этом HI-домен первого AAA⁺-модуля шаперонов включает фрагмент с CC-конформацией, именуемый M-доменом, что соответствует схеме: N–NB1–HI(M)–NB2–H2. Оказалось, что HI(CC)-домен LonA-протеаз проявляет выраженное подобие с HI(M)-доменом шаперонов. В то же время в структуре ферментов отсутствует нуклеотидсвязывающий домен, аналог NB1-домена шаперонов, и это обстоятельство обуславливает уникальность строения LonA-протеаз среди AAA⁺-белков, которые обычно содержат либо один, либо два полноценных двухдоменных AAA⁺-модуля. Роль вставочного HI(CC)-домена в функционировании LonA-протеаз и/или в поддержании их активной структуры до настоящего времени не исследована. Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение вклада двух α -спирализованных доменов – “классического”, H, и вставочного, HI(CC), – в проявление энзиматических свойств LonA-протеаз на примере Lon-протеазы из *E. coli* (далее – Ec-Lon).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

α -Спирализованные домены (H), которые вместе с нуклеотидсвязывающими доменами (NB) формируют АТФ-азные модули, служат отличительной характеристикой структуры AAA⁺-белков [10, 15, 16]. Классические H-домены образованы четырьмя α -спиралями и включают положительно заряженный консенсусный остаток “sensor-2” (s2), локализованный в N-концевой части третьей спирали. Этот остаток совместно с другими консервативными фрагментами NB-домена, к которым относятся мотивы A и B Уолкера, а также остатки “sensor-1” (s1) и “аргининовый палец” (R-f), участвует в формировании АТФ-азного центра AAA⁺-белка.

Схема доменной организации субъединицы Ec-Lon-протеазы, полипептидная цепь которой образована 784 а.о., представлена на рис. 1. H-Домен AAA⁺-модуля фермента включает остатки (491–579), где роль сенсорного остатка s2 выполняет Arg542. Вставочный HI(CC)-домен сформирован остатками (124–302), при этом, как и в H-домине, в начале третьей спирали HI(CC)-домена также локализован остаток аргинина – Arg164 (i-s2, рис. 1). С целью выявления роли α -спирализованных доменов Ec-Lon-протеазы в функционировании фермента осуществлена точечная замена остатков Arg164 и Arg542 на аланин и проведено исследование свойств полученных мутантных форм в сравнении со свойствами интактного фермента.

Для оптимизации схемы выделения Ec-Lon-протеазы и ее мутантных форм получена рекомбинантная форма фермента, содержащая гексагистидиновый фрагмент (в составе октапептида LENNNNN) на C-конце белка (C-His-Lon), а на ее основе – мутанты, несущие замены по сен-

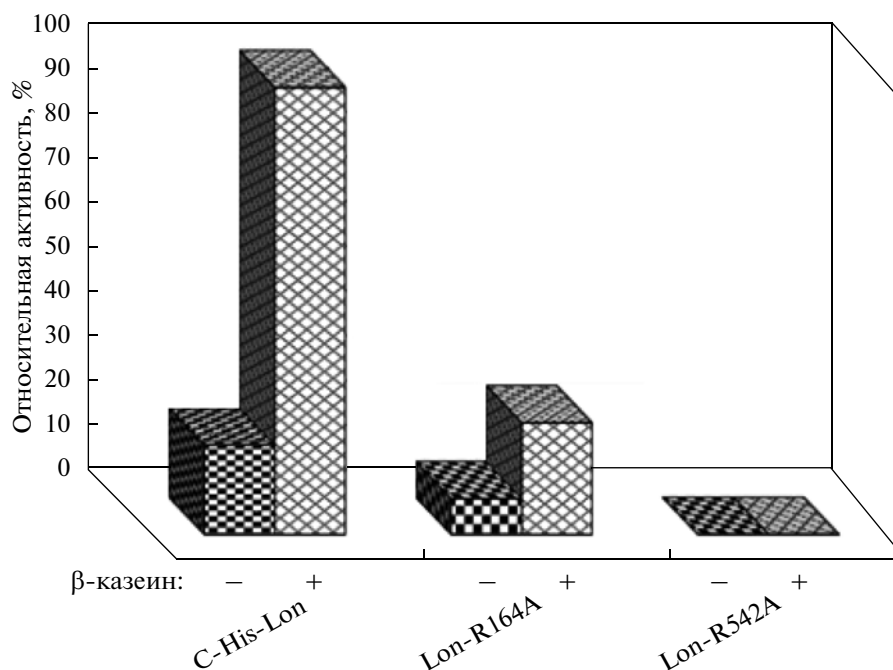


Рис. 2. АТФ-азная активность интактной C-His-Lon-протеазы и ее мутантных форм Lon-R164A и Lon-R542A. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1; 0.15 М NaCl; 37°C; концентрации: 5 мМ АТФ; 20 мМ MgCl₂; 1 мг/мл β -казеин; 1 мкМ фермент.

сорному остатку s2 и подобному ему остатку i-s2 (Lon-R542A и Lon-R164A, соответственно). C-His-Lon и мутантные формы Lon-R164A и Lon-R542A в препаративных количествах получены с помощью аффинной хроматографии на Ni-сефарозе и гель-фильтрации на сефакриле S-400.

Активность АТФ-азных центров мутантных форм *Ec-Lon*-протеазы

Известно, что гидролиз АТФ нативной *Ec-Lon*-протеазой в отсутствие белкового субстрата (базовая АТФ-азная активность) наблюдается в области рН 7.0–9.0 (с максимумом при рН 8.0–8.2). При этом скорость гидролиза АТФ максимальна при эквимольном содержании нуклеотида и ионов магния. Наличие свободных ионов Mg²⁺ вызывает эффект ингибирования АТФ-азной активности фермента, который устраняется в присутствии белкового субстрата [17].

Показано, что в отношении гидролиза АТФ C-His-Lon-протеаза и мутант Lon-R164A сохраняют свойства нативного фермента, однако АТФ-азная активность Lon-R164A заметно понижена (рис. 2, где за 100% принята начальная скорость гидролиза АТФ C-His-Lon-протеазой в присутствии белкового субстрата). В то же время мутантная форма Lon-R542A не проявляет АТФ-азной активности в интервале рН 7.0–9.0 при любых соотношениях концентраций нуклеотида и ионов магния и в присутствии в среде как белкового (β -казеин), так

и пептидного (меллитин) субстрата. Таким образом, следует констатировать, что Lon-R542A полностью утрачивает способность к гидролизу АТФ.

Полученные результаты подтверждают участие сенсорного остатка s2 (R542 у *Ec-Lon*) в формировании АТФ-азного центра у LonA-протеаз (как и у других представителей AAA⁺-белков) и согласуются с данными по утрате способности к гидролизу АТФ мутантными формами АТФ-зависимых протеаз, также содержащими замены остатков s2: ClpXP из *E. coli* [18], HslUV из *E. coli* [19] и LonB из *Thermoplasma acidophilum* [20]. Значительное понижение АТФ-азной активности мутанта Lon-R164A по сравнению с интактной C-His-Lon-протеазой может быть обусловлено нарушением корректной конформации фермента при замене остатка i-s2.

Активность пептидазных центров мутантных форм *Ec-Lon*-протеазы

Ранее в качестве индикатора эффективности функционирования пептидазных центров *Ec-Lon*-протеазы нами был предложен тиобензиловый эфир *N*-защищенного трипептида – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (PepTBE) [21]. Использование этого субстрата позволило оценить влияние введенных мутаций на активность пептидазных центров фермента.

Из табл. 1 видно, что оба мутанта сохранили способность к гидролизу PepTBE в отсутствие эффекторов, однако замена остатка i-s2 (R164)

Таблица 1. Влияние эффекторов на активность пептидазных центров С-His-Lon, Lon-R164A, Lon-R542A и смешанного олигомера Lon-R542A/Lon-S679A

Эффектор	С-His-Lon		Lon-R164A		Lon-R542A		Lon-R542A/Lon-S679A	
	v	n	v	n	v	n	v	n
Без эффектора	7.41	1	1.71	1	14.9	1	21.2	1
Mg	48.6	6.56	15.1	8.81	21.4	1.44	н.о.	н.о.
АТР	138	18.7	26.4	15.4	1.91	0.13	н.о.	н.о.
ADP	1.41	0.19	1.06	0.62	1.96	0.13	н.о.	н.о.
АМРРNP*	9.09	1.23	3.30	1.93	4.19	0.28	н.о.	н.о.
АТР-Mg	163	22.0	36.7	21.4	4.89	0.33	46.8	2.21
ADP-Mg	12.0	1.61	4.95	2.89	4.24	0.28	5.50	0.26
АМРРNP-Mg	158	21.3	36.4	21.3	8.76	0.59	53.3	2.54

Приведены значения удельной скорости гидролиза Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (v , мкМ_С/(мин мкМ_Е), где мкМ_С и мкМ_Е – концентрации субстрата и фермента соответственно) и n – степень ингибирования ($n < 1$, курсив) или активации ($n > 1$) гидролиза субстрата. н.о. – не определяли.

Условия эксперимента: 50 мМ Трис-HCl-буфер, pH 8.1; 0.15 М NaCl; 10% DMSO; 0.1 мМ ПерТВЕ; 0.2 мМ DTDP; 2.5 мМ Nu; 20 мМ MgCl₂; 0.2 мкМ фермент (в случае индивидуальных ферментов) или 0.05 мкМ Lon-R542A + 0.5 мкМ Lon-S679A (в случае смешанных олигомеров); 37°C.

* Негидролиземый аналог АТР, аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат.

привела к значительному понижению активности пептидазного центра, в то время как замена остатка s2 (R542) вызвала существенную активацию пептидазного центра мутанта: соотношение удельных активностей С-His-Lon, Lon-R164A и Lon-R542A составляет ~100 : 25 : 200. Ионы Mg²⁺ заметно активируют все ферменты, а общим ингибитором является только ADP.

Нуклеотиды (Nu) и их комплексы с ионами магния (Nu-Mg) одинаковым образом влияют на активность пептидазных центров в С-His-Lon и Lon-R164A: скорость гидролиза ПерТВЕ этими ферментами в присутствии эффекторов увеличивается в ряду ADP < без эффектора < АМРРNP < ADP-Mg < Mg²⁺ < АТР < АМРРNP-Mg ≤ АТР-Mg (табл. 1). Максимальная эффективность функционирования пептидазных центров в присутствии АТР-Mg свидетельствует о том, что в мутанте Lon-R164A сохраняется свойство сопряженного функционирования АТР-азного и пептидазного центров, характерное для интактного фермента.

По отношению к Lon-R542A любые нуклеотиды и комплексы Nu-Mg проявляют ингибирующее действие (эффекторы изменяют скорость гидролиза ПерТВЕ следующим образом: ADP = АТР < АМРРNP = ADP-Mg < АТР-Mg < АМРРNP-Mg < без эффектора < Mg²⁺, табл. 1). Из этих данных следует, что, несмотря на утрату возможности гидролиза АТР, АТР-азный центр мутанта Lon-R542A сохраняет способность как

связывать нуклеотиды, так и оказывать влияние на функционирование пептидазного центра, которое, однако, радикально отличается от влияния АТР-азного центра в интактном ферменте. Для протеазы ClpXP было показано [18], что мутация остатка s2 нарушает взаимодействие между АТР-азной и протеолитической субъединицами. Можно полагать, что и в случае Ec-Lon-протеазы замена остатка R542 на аланин приводит к изменению междоменных и/или межсубъединичных контактов в ферменте.

Частичное восстановление этих контактов наблюдается в смешанных олигомерах, образованных формой Lon-R542A, утратившей АТР-азную активность, и ранее полученной мутантной по каталитическому центру формой Lon-S679A, неспособной к гидролизу пептидных и белковых субстратов. Влияние нуклеотид-магневых комплексов на гидролиз ПерТВЕ мутантом Lon-R542A в составе смешанных олигомеров Lon-R542A/Lon-S679A оказалось подобным влиянию этих эффекторов на нативный фермент: АТР-Mg и АМРРNP-Mg со сходной эффективностью активируют гидролиз тиоэфирного субстрата, а ADP-Mg проявляет ингибирующие свойства (табл. 1). Полученные результаты можно рассматривать как подтверждение выдвинутого нами ранее заключения о реализации взаимодействий между АТР-азными и пептидазными/протеолитическими центрами фермента, локализованными в разных субъединицах олигомерной Ec-Lon-протеазы [22].

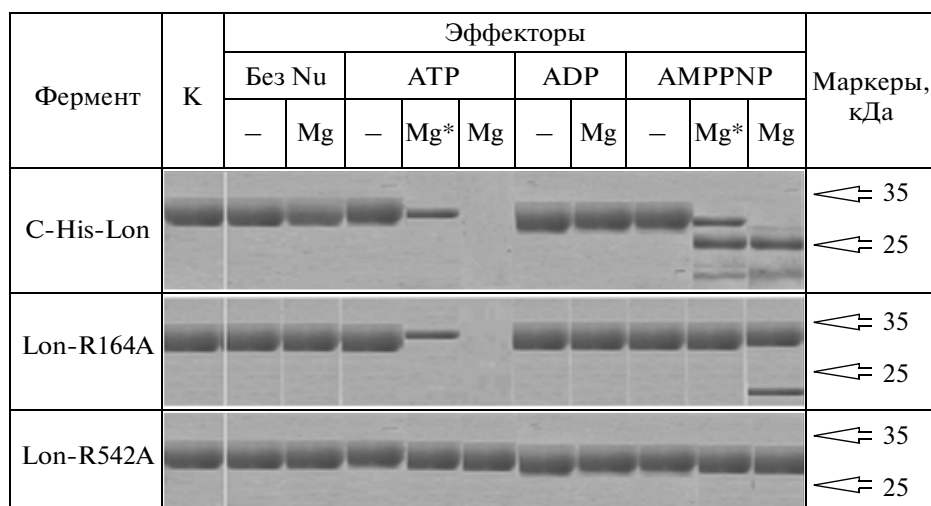


Рис. 3. Гидролиз β -казеина C-His-Lon-протеазой и мутантными формами Lon-R164A и Lon-R542A в отсутствие и в присутствии эффекторов (электрофорез в 12% ПААГ). Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, pH 8.1; 0.15 М NaCl; 37°C; время реакции 2 ч или 20 мин (дорожки, обозначенные как Mg*); концентрации: 5 мМ Nu; 20 мМ MgCl₂; 0.5 мг/мл β -казеин; 5 мкМ C-His-Lon и Lon-R164A; 10 мкМ Lon-R542A. Обозначения: Nu – нуклеотиды, К (контроль) – β -казеин, “–” – в отсутствие ионов Mg²⁺, Mg – в присутствии ионов Mg²⁺.

Сопоставление эффективности влияния АТФ, ADP и AMPPNP на пептидазную активность C-His-Lon-протеазы и ее мутантных форм свидетельствует о том, что в интактном ферменте боковая цепь остатка R542 прямо или опосредованно участвует во взаимодействии с β - γ -фосфатной связью нуклеозидтрифосфата. Мутация остатка R542 приводит к тому, что нуклеотидом, наиболее комплементарным АТФ-азному центру мутанта, становится AMPPNP, а не АТФ.

Протеолитическая активность мутантных форм Ec-Lon-протеазы

Протеолитическую активность C-His-Lon-протеазы и ее мутантных форм тестировали по эффективности деградации модельного белкового субстрата – β -казеина [22]. Оценку активности ферментов в отсутствие и в присутствии эффекторов проводили с помощью гель-электрофореза.

Согласно представленным результатам (рис. 3), C-His-Lon-протеаза и мутант Lon-R164A способны с близкой эффективностью расщеплять белковый субстрат по процессивному механизму (без накопления крупных промежуточных продуктов) в условиях гидролиза АТФ (наличие АТФ и ионов магния). Кроме того, интактный фермент и форма Lon-R164A непротессивно деградируют β -казеин в присутствии комплекса AMPPNP-Mg. Однако в этом случае свойства мутанта отличаются от свойств интактного фермента: на фоне пониженной общей скорости гидролиза белковой мишени Lon-R164A проявляет способность эффективно расщеплять промежуточный продукт протеолиза – фрагмент с молекулярной массой

около 25 кДа, который, напротив, накапливается в ходе гидролиза казеина C-His-Lon-протеазой (рис. 3).

Мутант Lon-R542A не обнаруживает протеолитической активности ни в условиях эксперимента (рис. 3), ни при увеличении времени инкубации до 24 ч (данные не приведены). Таким образом, способность к гидролизу белкового субстрата у Lon-R542A полностью отсутствует. Тем не менее, вопрос о возможности связывания казеина с мутантом Lon-R542A требует дополнительного исследования.

Автолиз Ec-Lon-протеазы и ее мутантных форм

При изучении протеолитических свойств C-His-Lon-протеазы и ее мутантов обнаружено, что продолжительная инкубация реакционной смеси может вызвать частичное разрушение ферментов. В связи с этим были исследованы автолитические свойства C-His-Lon-протеазы, Lon-R164A и Lon-R542A. Из рис. 4 видно, что для C-His-Lon и Lon-R164A процесс медленной самодеградации наблюдается исключительно в отсутствие нуклеотидов, и он наиболее выражен при наличии в среде ионов магния. При этом по эффективности автолиза мутант значительно превосходит интактный фермент.

Неожиданным оказался тот факт, что форма Lon-R542A также способна к самодеградации, причем автолиз мутанта наблюдается как в отсутствие нуклеотидных эффекторов, так и при их наличии (рис. 4). В целом, низкая эффективность автолиза усиливается в ряду: ADP-Mg = АТФ-Mg = AMPPNP-Mg < ADP < АТФ < AMPPNP < Mg²⁺ <

Фермент	К	Эффекторы								Маркеры, кДа
		Без Nu		АТФ		ADP		AMPPNP		
		–	Mg	–	Mg	–	Mg	–	Mg	
C-His-Lon										116
										45
Lon-R164A										116
										45
Lon-R542A										116
										45
										35

Рис. 4. Автолиз C-His-Lon-протеазы и ее мутантных форм Lon-R164A и Lon-R542A в отсутствие и в присутствии эффекторов. Условия эксперимента и обозначения см. в подписи к рис. 3.

< без эффектора. Эти данные показывают, что в противоположность эффектам ионов магния, обнаруженным при изучении пептидазной активности Lon-R542A (см. выше, табл. 1), в процессе автолиза мутанта ионы магния не усиливают, а, наоборот, снижают степень воздействия нуклеотидов на протеолитический центр. Таким образом, можно констатировать, что, несмотря на неспособность к гидролизу белка-мишени, протеолитический центр мутанта Lon-R542A остается каталитически активным, при этом полученные результаты свидетельствуют в пользу внутримолекулярной природы автолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно представленным данным Н-домен AAA⁺-модуля Ec-Lon-протеазы играет исключительную роль как для реализации гидролиза АТФ, так и для связывания ферментом белкового субстрата. Активность пептидазного центра Lon-протеазы зависит от состояния АТФ-азного центра и достигает максимума при утрате ферментом способности к гидролизу АТФ (мутант Lon-R542A). HI(CC)-Домен не имеет кардинального значения для проявления каталитических свойств фермента, однако влияет на эффективность функционирования АТФ-азного и пептидазного центров Lon-протеазы и участвует в поддержании стабильности фермента. Можно полагать, что истинная роль уникальной вставки HI(CC) связана с формированием третичной и/или четвертичной структуры LonA-протеаз и, весьма вероятно, с проявлением ими способности к образованию

комплексов с ДНК. Выбор между этими возможностями требует дополнительного исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие реактивы фирм “Sigma”, “Aldrich”, “Bio-Rad” (США), “Fluka” (Швейцария), “Boehringer Mannheim” (Германия), “Pharmacia” (Швеция), “Difco” (Англия), “Panreac” (Испания), “Fermentas” (Литва) и “Реахим” (Россия).

Сайт-направленный мутагенез. Для клонирования полноразмерной C-His-Lon-протеазы в высокопродуктивный вектор pET28 проводили амплификацию гена *lon* по стандартному протоколу ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК pBRlon [23]. С использованием олигонуклеотидов f1 и f2 (прямой и обратный праймеры, табл. 2) получили фрагмент ДНК длиной около 2400 п.о. Целевой ПЦР-продукт обработали рестриктазой XhoI и клонировали в вектор pET-28a(+) (Novagen, Cat. No. 69864-3), предварительно обработанный рестриктазой NcoI, Pfu-полимеразой и рестриктазой XhoI; выделили плазмидную ДНК (pET28-lon).

Для получения мутанта C-His-Lon-протеазы с заменой Arg164Ala методом мегапрайма сконструировали праймеры Lon_R164A, f3 и f4 (табл. 2). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК pET28-lon. На первом этапе с помощью праймеров Lon_R164A и f4 получили ПЦР-фрагмент, который использовали в качестве праймера на втором этапе вместе с праймером f3. Полученный фрагмент ДНК длиной около 730 п.о. клони-

Таблица 2. Структура олигонуклеотидных праймеров, использованных для получения C-His-Lon-протеазы и ее мутантных форм Lon-R164A и Lon-R542A

Модификация Ec-Lon	Праймер	Структура праймера (5'-3')*	Сайт узнавания рестриктазы
C-His-Lon	f1	AATCCTGAGCGTTCTGAACGC	
C-His-Lon Lon-R542A	f2	GGG <u>CTCGAG</u> TTTTGCAGTCACAACCTGCATG	<i>XhoI</i>
Lon-R164A	Lon_R164A	CAGCAATGGTATCCGCCAGAGCGGCCGGATCGTCGATGCTATT	
Lon-R164A	f3	CGCAGAAAGAAGCTTCAACGG	<i>HindIII</i>
Lon-R164A	f4	CGCATTCCACGGTACCTGTAC	<i>Acc65I</i>
Lon-R542A	f5	CTGACCGTCGACGATAGCGC	<i>SaII</i>
Lon-R542A	Lon_R542A	CAGTTTGGAGATTTACGCTCTAGACCAGCCACGCCCGCCTCACGGGT	<i>XbaI</i>

* Курсивом и подчеркиванием отмечены сайты узнавания рестриктаз. Жирным шрифтом выделены сайты мутации.

ровали в вектор pET-28-lon при использовании уникальных сайтов рестрикции *HindIII* и *Acc65I*. Секвенированием выделенной плазмидной ДНК (pET28-lon-R164A) подтвердили наличие мутации.

Аналогично получили плазмидную ДНК (pET28-lon-R542A) для наработки мутанта C-His-Lon-протеазы с заменой Arg542Ala. При этом использовали праймеры f2, f5 и Lon_R542A (табл. 2). Клонирование целевого фрагмента ДНК осуществляли, используя уникальные сайты рестрикции *SaII* и *XhoI*.

Секвенирование клонированной ДНК с нескольких первичных клонов и синтез праймеров были осуществлены компанией ЗАО ЕВРОГЕН (www.evrogen.ru). Процедуры рестрикции и лигирования проводили согласно протоколам производителей соответствующих ферментов.

Выделение и очистка C-His-Lon-протеазы и ее мутантов. Компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) подвергали трансформации соответствующими плазмидными конструкциями методом “теплового шока” [24]. Трансформированные клетки инкубировали в культуральной среде LB в течение 1 ч при 37°C с целью индукции гена устойчивости к канамицину – селективному маркеру вектора pET28a и его производных. Аликвоту суспензии клеток высевали на агаризованную среду с канамицином и инкубировали 12 ч. Отобранные колонии выращивали 12 ч при 37°C в малых объемах среды LB, полученную культуру переносили в большие объемы среды с канамицином и выращивали до значения $A_{600} \sim 0.5$ ОЕ, добавляли IPTG до концентрации 0.5 мМ, инкубировали 3 ч, полученные клетки осаждали центрифугированием.

Биомассу клеток (2 г) ресуспендировали в 60 мл 50 мМ Трис-НСI-буфера, pH 7.5, инкубировали с 0.4 мг лизоцима (1 ч, 4°C), разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (15 кГц, 4 × 1 мин) при 0°C и центрифугировали (30 мин, 10000 g, 4°C).

Бесклеточный экстракт хроматографировали на Ni-сефарозе (колонки NiTrapTMFF (тандем 2 × 5 мл) фирмы GE Healthcare) в 20 мМ Трис-НСI-буфере, pH 7.5; 0.5 М NaCl; 5 мМ имидазол. Связавшиеся белки элюировали градиентом концентрации имидазола (5 мМ–1 М) в том же буфере. Гель-фильтрацию C-His-Lon-протеазы и ее мутантных форм проводили на колонке Sephacryl S-400 (объем 120 мл, GE Healthcare) в 20 мМ Трис-НСI-буфере, pH 7.5, 0.15 М NaCl.

Стандартные аналитические методы. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [25]. Гомогенность белков в препаратах тестировали электрофоретически [26], используя коммерческий набор маркеров (*M*, кДа), содержащий β -галактозидазу (116.0), бычий сывороточный альбумин (66.2), овальбумин (45.0), лактатдегидрогеназу (35.0), рестриктазу *Bsp98I* (25.0), β -лактальбумин (18.4), лизоцим (14.4).

АТФ-азную активность тестировали по накоплению неорганического фосфата в реакции гидролиза АТФ [27]. Реакцию проводили при 37°C в 1200 мкл реакционной смеси состава: 50 мМ Трис-НСI-буфер, pH 8.1, 150 мМ NaCl, 5 мМ АТФ, 20 мМ MgCl₂, 1 мкМ фермент. В контрольном опыте фермент заменяли буфером. Для определения начальных скоростей реакций по 200 мкл реакционной и контрольной смесей, отобранных через определенные промежутки времени, встряхивали в квар-

цевых кюветах с 600 мкл реагента состава: 100 мМ $Zn(AcO)_2$, 15 мМ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 1% SDS, pH 4.5–5.0 и регистрировали оптическое поглощение при длине волны 350 нм ($\epsilon_{350} = 7800 M^{-1} cm^{-1}$).

Тиоэстеразная активность. Гидролиз тиобензидового эфира *N*-замещенного трипептида Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (PepTBE) регистрировали спектрофотометрически при длине волны 324 нм по величине оптического поглощения 4-тиопиридона ($\epsilon_{324} = 16500 M^{-1} cm^{-1}$), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолата, $BzIS^-$) с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP) [28].

Реакцию проводили при 37°C в 1000 мкл реакционной смеси состава: 50 мМ Трис-HCl-буфер, pH 8.1, 150 мМ NaCl, 10% DMSO, 0.2 мМ DTDP, 0.1 мМ PepTBE, 2.5 мМ Nu, 20 мМ $MgCl_2$, 0.2–0.3 мкМ фермент. В случае реакции в отсутствие эффекторов аликвоты последних заменяли аликвотами буфера. При определении тиоэстеразной активности смешанного олигомера Lon-R542A/Lon-S679A концентрации мутантных форм Lon-R542A и Lon-S679A в реакционной смеси составляли 0.05 и 0.5 мкМ, соответственно.

Протеолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически [26]. Реакцию проводили при 37°C в отсутствие и в присутствии эффекторов в реакционной смеси состава: 50 мМ Трис-HCl-буфер, pH 8.1, 150 мМ NaCl, 5 мМ Nu, 20 мМ $MgCl_2$, 20 мкМ β -казеин, 5 мкМ фермент. В контрольных экспериментах аликвоты эффекторов или фермента заменяли буфером. Аликвоты реакционной и контрольной смеси по 20 мкл отбирали в пробирки, содержащие по 7 мкл (4-кратного) лизирующего буфера состава: 0.2 М Трис-HCl-буфер, pH 8.9, 4% SDS, 20% глицерин, 0.5 мМ EDTA, 0.8% бромфеноловый синий, 3% β -меркаптоэтанол, денатурировали кипячением в течение 10 мин, наносили на 12% ПААГ для электрофореза.

Автолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически [26] в условиях, аналогичных условиям определения протеолитической активности, но в отсутствие β -казеина.

БЛАГОДАРНОСТЬ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // *Genes Dev.* 1997. V. 11(7). P. 815–23.
2. Ellgaard L., Helenius A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. V. 4. P. 181–191.
3. Buchberger A., Bukau B., Sommer T. // *Mol. Cell.* 2010. V. 40. P. 238–252.
4. Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 777–788.
5. Saibil H.R. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14(10). P. 630–642.
6. Lee S., Tsai F.T.F. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 38(3). P. 259–265.
7. Gur E., Ottofueiling R., Dougan D.A. // *Subcell. Biochem.* 2013. V. 66. P. 1–33.
8. Sauer R.T., Baker T.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. V. 80. P. 587–612.
9. Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. // *Genome Res.* 1999. V. 9. P. 27–43.
10. Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 11–31.
11. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э., Цирульников К.Б. // *Биоорган. химия.* 2003. V. 29. P. 97–99. [Rotanova T.V., Melnikov E.E., Tsirulnikov K.B. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2003. V. 29. P. 85–87.]
12. 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.
13. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // *Биомед. химия.* 2010. V. 56. P. 412–419. [Rotanova T.V., Melnikov E.E. // *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomed. Chem.* 2010. V. 4. P. 404–408.]
14. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. // *Биоорган. химия.* 2013. V. 39. P. 309–319. [Rotanova T.V., Dergousova N.I., Morozkin A.D. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2013. V. 39. P. 268–282.]
15. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
16. Wendler P., Ciniawsky S., Kock M., Kube S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 2–14.
17. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2000. V. 26. P. 530–538. [Melnikov E.E., Tsirulnikov K.B., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2000. V. 26. P. 474–481.]
18. Joshi S.A., Baker T.A., Sauer R.T. // *Nat. Struc. Mol. Biol.* 2004. V. 11. P. 404–411.
19. Song H.K., Hartmann C., Ramachandran R., Bochtler M., Behrendt R., Moroder L., Huber R. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 14103–14108.
20. Besche H., Tamura N., Tamura T., Zwickl P. // *FEBS Lett.* 2004. V. 574. P. 161–166.
21. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Расулова Ф.С., Гинопдман Л.М., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 1998. V. 24. P. 638–640. [Melnikov E.E., Tsirulnikov K.B., Rasulova F.S., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 1998. V. 24. P. 566–568.]
22. Цирульников К.Б., Мельников Э.Э., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2003. V. 29. P. 486–494. [Tsirulnikov K.B., Melnikov E.E., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2003. V. 29. P. 486–495.]
23. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // *Биоорган. химия.*

1990. Т. 16. С. 869–880. [Amerik A.Yu., Antonov V.K., Ostroumova N.I., Rotanova T.V., Chistyakova L.G. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 1990. V. 16. P. 869–880.]
24. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 475 p.
25. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
26. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Bencini D.A., Wild J.R., O'Donovan G.A. // Anal. Biochem. 1983. V. 132. P. 254–258.
28. Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. // Anal. Biochem. 1979. V. 99. P. 53–64.

Role of the α -Helical Domains in the Functioning of ATP-Dependent Lon Protease of *Escherichia coli*

A. G. Andrianova, A. M. Kudzhaev, O. V. Serova, N. I. Dergousova, T. V. Rotanova[#]

[#]Phone: +7 (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

Homooligomeric ATP-dependent LonA proteases are bifunctional enzymes belonging to the superfamily of AAA⁺ proteins. Their subunits are formed by five successively connected domains: N-terminal (N), α -helical (HI(CC)), nucleotide binding (NB), the second α -helical (H) and proteolytic (P). The presence of the inserted HI(CC) domain defines the uniqueness of LonA proteases among AAA⁺ proteins. The role of α -helical domains in the LonA protease functioning is investigated on the example of *E. coli* Lon protease (Ec-Lon). A comparative study of properties of the intact Ec-Lon and its mutants of Lon-R164A and Lon-R542A with the substitutions of arginine residues located in similar positions in the HI(CC) and H domains is carried out. The H domain is shown to play a crucial role for the ATP hydrolysis and enzyme binding to the target protein. HI(CC) domain does not have a fundamental significance for the catalytic properties of the enzyme. However, it affects the functioning of Lon ATPase and peptidase sites and is involved in maintaining the enzyme stability. The participation of HI(CC) domain in formation of the spatial structures of LonA proteases and/or formation of their complexes with DNA is suggested.

Keywords: AAA⁺ proteins, ATP-dependent Lon protease, domain organization, α -helical domains, site-directed mutagenesis, *Escherichia coli*