

УДК 577.152.342\*1'134

# Роль инсерционного $\alpha$ -спирализованного домена АТФ-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* в функционировании фермента

А. М. Куджаев, А. Г. Андрианова, Е. С. Дубовцева, О. В. Серова, Т. В. Ротанова\*

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

\*E-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru

Поступила в редакцию: 05.07.2016

Принята к печати 20.01.2017

**РЕФЕРАТ** Мультидоменная АТФ-зависимая протеаза Lon из *Escherichia coli* (Ec-Lon) – один из ключевых ферментов системы контроля качества клеточного протеома. С целью изучения роли инсерционного HI(CC)-домена Ec-Lon получен и охарактеризован рекомбинантный фермент с делецией HI(CC)-домена (Lon-dHI(CC)). Проведено сравнительное исследование АТФ-азной, протеолитической и пептидазной активности интактной Lon-протеазы и Lon-dHI(CC), изучена возможность автолиза обеих форм фермента и их способность к связыванию ДНК. Показано, что HI(CC)-домен необходим для формирования функционально активной структуры Ec-Lon-протеазы и реализации белок-белковых взаимодействий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** AAA<sup>+</sup>-белки, АТФ-зависимый протеолиз, LonA-протеазы, инсерционный  $\alpha$ -спирализованный домен, связывание ДНК.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** AMPNP – аденозин-5'-( $\beta,\gamma$ -имидо)трифосфат; DTDP – 4,4'-дитиодипиридин; Glt – глутарил; Nu – нуклеотид; PerTBE – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl; Suc – сукцинил.

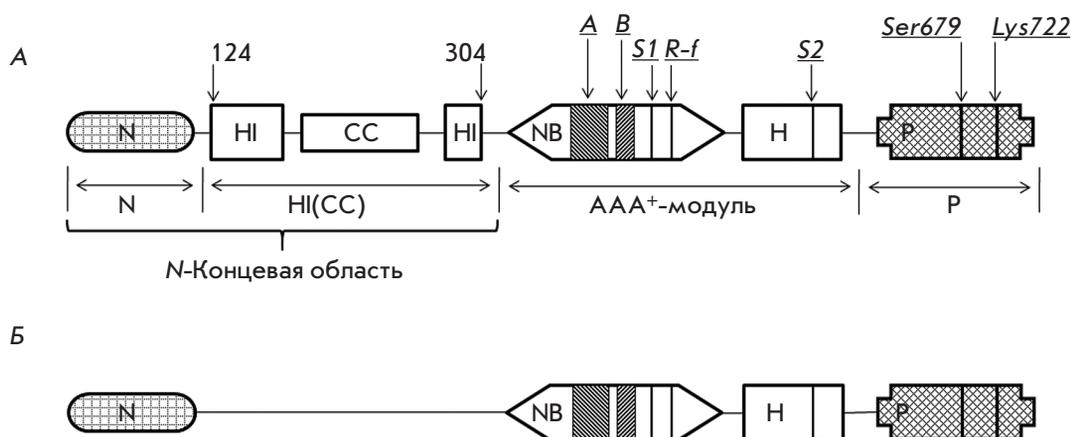
## ВВЕДЕНИЕ

АТФ-зависимая Lon-протеаза *Escherichia coli* (Ec-Lon [КФ 3.4.21.53]; MEROPS: клан SJ, семейство S16, ID S16.001) – представитель семейства Lon-протеаз, которое играет ключевую роль в системе контроля качества клеточного протеома, функционирующей во всех доменах жизни [1–4]. Семейство Lon состоит из двух подсемейств – LonA, включающего бактериальные и эукариотические ферменты, и LonB, объединяющего ферменты архей. Протеазы подсемейств А и В различаются доменной организацией субъединиц, а также окружением каталитических остатков протеолитического центра [5]. Ec-Lon относится к подсемейству А, деградирует аномальные и дефектные полипептиды, а также ряд регуляторных клеточных белков по процессивному механизму в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ [4–7]. Отличительной характеристикой Ec-Lon, как и других LonA-протеаз, является их способность к связыванию ДНК [8–10].

Субъединица Ec-Lon (784 аминокислотных остатка) состоит из пяти доменов: N-HI(CC)-NB-N-P (рис. 1А), где нуклеотидсвязывающий (NB) и  $\alpha$ -спирализованный (N) домены формируют АТФ-

азный модуль, относящийся к суперсемейству AAA<sup>+</sup>-белков (АТФ-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) [11, 12], С-концевой Р-домен представляет серин-лизиновую пептидгидролазу, а N-концевой и следующий за ним «инсерционный»  $\alpha$ -спирализованный домены образуют некаталитическую область (N-HI(CC)), включающую фрагмент последовательности со специфической coiled-coil (CC) конформацией [13, 14]. Определены кристаллические структуры индивидуальных доменов (за исключением HI(CC)-домена) Ec-Lon и некоторых других LonA-протеаз. Пространственные структуры полноразмерных ферментов подсемейства LonA до сих пор не известны.

Двухдоменная организация N-концевой области является уникальной характеристикой Ec-Lon и всего пула LonA-протеаз. От других AAA<sup>+</sup>-белков системы контроля качества, представленных совокупностью АТФ-зависимых протеаз (ClpAP, ClpXP, FtsH, HslUV) и шаперонов-дезагрегас (ClpB, Hsp104), LonA-протеазы отличает наличие вставочного HI(CC)-домена. Ранее нами было показано, что HI(CC)-домен Ec-Lon проявляет выраженное сходство как с N-доменом собственного



**Рис. 1.** Доменная организация LonA-протеазы *E. coli* (А) и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) (Б). Обозначения доменов: N – N-концевой, HI(CC) – инсерционный α-спирализованный с coiled-coil(CC)-областью, NB – нуклеотидсвязывающий, H – α-спирализованный, P – протеолитический. Компоненты АТФ-азного центра: *A* и *B* – мотивы Уолкера, *S1* и *S2* – сенсорные остатки; *R-f* – остаток «аргининовый палец»; компоненты протеолитического центра: *Ser679* и *Lys722* – каталитические остатки

AAA<sup>+</sup>-модуля, так и с α-спирализованным доменом (HI(M)) первого из двух AAA<sup>+</sup>-модулей ClpВ-шаперонов [13, 14]. При этом участие HI(CC)-домена в функционировании Ec-Lon-протеазы, во взаимодействии с нуклеиновыми кислотами и/или в структурной организации фермента до настоящего времени не охарактеризовано.

С целью изучения роли инсерционного HI(CC)-домена в проявлении функциональных свойств Ec-Lon нами проведено сравнительное исследование энзиматических характеристик и способности к связыванию ДНК как интактного фермента (рис. 1А), так и его делеционной формы Lon-dHI(CC), утратившей HI(CC)-домен (рис. 1Б).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

В работе использовали коммерческие реактивы фирм Sigma, Bio-Rad, Thermo Scientific (США), Fluka (Швейцария), Boehringer Mannheim (Германия), Pharmacia (Швеция), Difco (Англия), Panreac (Испания) и «Реахим» (Россия).

### Получение Ec-Lon (Lon-H<sub>6</sub>) и ее делеционной формы Lon-dHI(CC)

Рекомбинантную форму Ec-Lon, содержащую гексагистиридиновый фрагмент (в составе октапептида LENNNNN) на С-конце белка (Lon-H<sub>6</sub>), получали по ранее описанной методике [15].

Делеционную форму Lon-dHI(CC) получали на основе Lon-H<sub>6</sub>-протеазы. Методом мегапрай-

мера сконструировали праймеры Lon\_d\_124-304, Lon\_HindIII и Lon\_BamHI\_rev (соответственно: 5'-TTTTTTGACSTTGCTGCGCGCATCAATG-GTCGGCGACTCCAG-3', 5'-CGCAGAAAGA-AGCTTCAACGG-3' и 5'-GTTCTGCTCTGGA-TCCAGCAC-3'). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК pET28-lon-H<sub>6</sub>. На первом этапе с помощью праймеров Lon\_d\_124-304 и Lon\_HindIII получили ПЦР-фрагмент, который использовали в качестве праймера на втором этапе вместе с праймером Lon\_BamHI\_rev. Полученный фрагмент ДНК длиной около 625 п.н. клонировали в вектор pET28\_lon по уникальным сайтам рестрикции HindIII и BamHI.

Секвенирование клонированных ДНК и синтез праймеров осуществлены компанией «ЗАО ЕВРОГЕН» (www.evrogen.ru). Процедуры рестрикции и лигирования проводили согласно протоколам производителей соответствующих ферментов.

Выделение и очистку Lon-H<sub>6</sub> и Lon-dHI(CC) проводили в две стадии методами Ni<sup>2+</sup>-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонок HisTrap FF (тандем 2 × 5 мл, GE Healthcare, США) и анионообменной хроматографии на колонке HiTrap™ Q FF (5 мл, GE Healthcare) согласно ранее описанной методике [15].

Концентрации белков определяли по методу Брэдфорд [16].

Гомогенность белков в препаратах тестировали электрофоретически [17] с использованием коммер-

ческого набора маркеров ( $M$ , кДа):  $\beta$ -галактозидаза (116.0), бычий сывороточный альбумин (66.2), овальбумин (45.0), лактатдегидрогеназа (35.0), рестриктаза Bsp98I (25.0),  $\beta$ -лактальбумин (18.4) и лизоцим (14.4).

#### Очистка ДНК

ДНК очищали согласно протоколу, представленному в руководстве [18].

#### Определение ферментативных свойств Lon-H<sub>6</sub>-протеазы и делеционной формы Lon-dHI(CC)

*АТФ-азную активность* тестировали по накоплению во времени неорганического фосфата в реакции гидролиза АТФ в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.1, содержащем 150 мМ NaCl, 5 мМ АТФ, 20 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мкМ фермент, при 37°C [19]. В контрольном опыте фермент заменяли буфером. Начальные скорости реакций определяли по величине оптического поглощения смеси из 200 мкл реакционной среды и 600 мкл реагента (100 мМ Zn(АсО)<sub>2</sub>, 15 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 1% SDS, рН 4.5–5.0) при длине волны 350 нм ( $\epsilon_{350} = 7\ 800\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ).

*Тиоэстеразная активность.* За гидролизом тиобензилового эфира *N*-замещенного трипептида Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (PepTBE) следили спектрофотометрически при длине волны 324 нм по величине оптического поглощения 4-тиопиридона ( $\epsilon_{324} = 16\ 500\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолата, BzIS<sup>-</sup>) с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP) [20]. Гидролиз PepTBE проводили при 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.1, содержащем 150 мМ NaCl, 10% DMSO, 0.2 мМ DTDP, 0.1 мМ PepTBE и 0.2 мкМ фермент. При изучении влияния эффекторов в смесь добавляли нуклеотид до 2.5 мМ и MgCl<sub>2</sub> до 20 мМ.

*Протеолитическую активность* ферментов тестировали электрофоретически [17]. Реакцию проводили при температуре 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.1, содержащем 150 мМ NaCl, 20 мкМ  $\beta$ -казеин и 2–6 мкМ фермент, в отсутствие или в присутствии 5 мМ Nu и 20 мМ MgCl<sub>2</sub>. Аликвоту реакционной или контрольной смеси (20 мкл) смешивали с 7 мкл лизирующего буфера (0.2 М Трис-НСl, рН 8.9, 4% SDS, 20% глицерин, 0.5 мМ EDTA, 0.8% бромфеноловый синий, 3%  $\beta$ -меркаптоэтанол), кипятили в течение 10 мин, наносили на 12% полиакриламидный гель (ПААГ) для электрофореза.

*Автолитическую активность* ферментов тестировали электрофоретически [17] в условиях, аналогичных условиям определения протеолитической активности, но в отсутствие  $\beta$ -казеина.

#### Тестирование комплексов Lon-H<sub>6</sub>-протеазы и Lon-dHI(CC) с плазмидной ДНК

За образованием комплексов фермент–ДНК следили по торможению ДНК в агарозном геле (метод GMSA) [21]. 20–25 мкг Lon-H<sub>6</sub> или Lon-dHI(CC) инкубировали в течение 30 мин при 25°C с 500 нг плазмидной ДНК (pET28a) в 25 мкл 20 мМ Трис-НСl-буфера, рН 7.5, содержащего 60 мМ NaCl. Комплексы белок–ДНК анализировали гель-электрофорезом в стандартном 1.0% агарозном геле. Полосы ДНК визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованная в работе рекомбинантная Ec-Lon-протеаза, содержащая дополнительный С-концевой октапептид, включающий гексагистиридиновый фрагмент (Lon-H<sub>6</sub>), была получена и охарактеризована ранее [15]. На основе Lon-H<sub>6</sub> получена рекомбинантная делеционная форма Lon-dHI(CC) без инсерционного HI(CC)-домена (остатки Glu124–Asn304, рис. 1Б). В препаративных количествах Lon-H<sub>6</sub> ( $M$  88.5 кДа) и ее делеционную форму Lon-dHI(CC) ( $M$  67.5 кДа) выделяли с использованием аффинной хроматографии на Ni-сефарозе и анионообменной хроматографии на Q-сефарозе. Проведено сравнительное изучение ферментативной активности интактной Lon-H<sub>6</sub>-протеазы и ее делеционной формы. При этом охарактеризовано три типа активности – АТФ-азная, протеолитическая (субстрат –  $\beta$ -казеин) и пептидазная (субстрат – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, PepTBE), а также изучена возможность автолиза препаратов ферментов. Кроме того, методом фенольной экстракции проверено присутствие нуклеиновой кислоты в различных препаратах белка.

#### АТФ-азная активность делеционной формы Ec-Lon-протеазы

Для тестирования как АТФ-азной, так и других видов активности Lon-H<sub>6</sub>-протеазы и ее делеционной формы в качестве стандартных условий были выбраны 37°C и 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1, содержащий 150 мМ NaCl.

Известно, что нативная wt-Ec-Lon проявляет максимальный уровень АТФ-азной активности при равных концентрациях АТФ и Mg<sup>2+</sup>, а избыток ионов магния оказывает ингибирующее влияние на гидролиз АТФ, которое нивелируется связыванием белкового субстрата [22].

Эти же тенденции характерны для интактной Lon-H<sub>6</sub>-протеазы (рис. 2А): эффективность гидролиза АТФ ферментом в условиях, близких к физиологическим (соотношение концентраций Nu : Mg<sup>2+</sup> = 1 : 4), существенно ниже, чем при эквимольных концен-

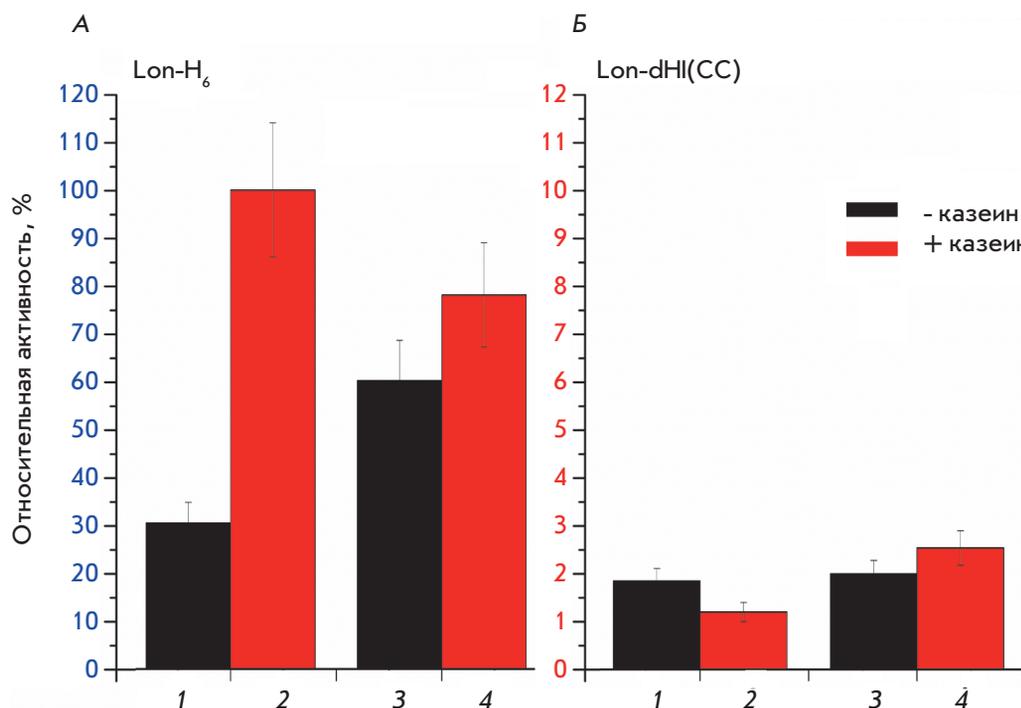


Рис. 2. АТФ-азная активность интактной Lon-H<sub>6</sub>-протеазы (А) и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) (Б) в отсутствие (черные столбцы) и в присутствии (красные столбцы) белкового субстрата – β-казеина. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1; 0.15 М NaCl; 37°C; концентрации: АТФ – 5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 (1, 2) или 5 мМ (3, 4); β-казеин – 0 (1, 3) или 0.5 мг/мл (2, 4); фермент – 0.5–1 мкМ

трациях Nu и ионов Mg<sup>2+</sup>. Добавление белкового субстрата (β-казеин) в обоих случаях приводит к значительному возрастанию АТФ-азной активности.

С утратой HI(CC)-домена Lon-протеаза почти полностью теряет способность к гидролизу АТФ: АТФ-азная активность Lon-dHI(CC) снижена по сравнению с активностью интактной Lon-H<sub>6</sub>-протеазы более чем в 10 раз и практически не зависит ни от соотношения концентраций нуклеотида и ионов Mg<sup>2+</sup>, ни от добавления белка-субстрата (рис. 2Б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инсерционный α-спирализованный HI(CC)-домен необходим для формирования АТФ-азного центра Eс-Lon-протеазы и его корректного функционирования.

### Активность пептидазного центра делеционной формы Eс-Lon-протеазы

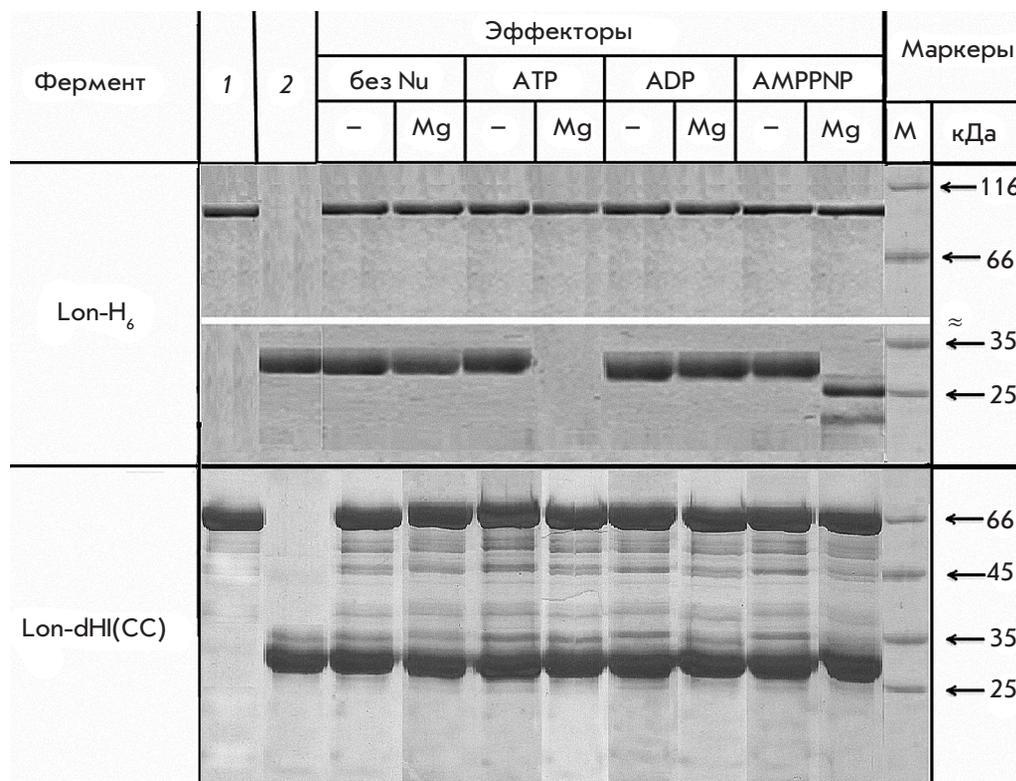
Аналогично Lon-H<sub>6</sub>-протеазе Lon-dHI(CC) способна к гидролизу модельного пептидного субстрата ПерТВЕ, однако базовая пептидазная активность делеционной формы составляет около 30% от активности интактного фермента (таблица). Из приведенных в таблице данных следует, что только ионы Mg<sup>2+</sup> активируют пептидазные центры и Lon-H<sub>6</sub>, и Lon-dHI(CC). Влияние нуклеотидных эффекторов на интактный и модифицированный ферменты кардинально различается. Свободные нуклеотиды (кроме ADP) и комплексы Nu-Mg в разной степени (2–11 раз) активируют Lon-H<sub>6</sub>-протеазу, а ADP ингибирует ее, тогда как ни один из нуклеотидов прак-

### Влияние эффекторов на активность пептидгидролазных центров Lon-H<sub>6</sub> и Lon-dHI(CC)

Эффектор	Lon-H <sub>6</sub>		Lon-dHI(CC)	
	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>
Без эффектора	5.88	1	1.64	1
Mg	<b>33.1</b>	<b>5.62</b>	<b>5.19</b>	<b>3.16</b>
АТФ	<b>47.1</b>	<b>8.01</b>	1.33	0.81
ADP	0.49	0.08	1.79	1.09
АМPPNP*	<b>14.2</b>	<b>2.41</b>	1.82	1.11
АТФ-Mg	<b>63.5</b>	<b>10.8</b>	<b>4.62</b>	<b>2.82</b>
ADP-Mg	<b>10.1</b>	<b>1.73</b>	<b>4.89</b>	<b>2.98</b>
АМPPNP-Mg	<b>58.0</b>	<b>9.86</b>	<b>5.6</b>	<b>3.41</b>

Примечание. Приведены значения удельной скорости гидролиза субстрата ПерТВЕ (*v*, ([S], мкМ)/([E], мкМ)·мин) и *n* – отношение скоростей гидролиза субстрата в присутствии и в отсутствие эффектора (*v*<sub>эф</sub>/*v*<sub>0</sub>), где *n* < 1 соответствует ингибированию (показано курсивом), а *n* > 1 – активации гидролиза (показано жирным шрифтом). Ошибка не превышала 10%. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1; 0.15 М NaCl; 10% DMSO; 0.1 мМ ПерТВЕ; 0.2 мМ DTDP; 2.5 мМ Nu; 20 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0.2 мкМ фермент; 37°C.

\*Негидролизуемый аналог АТФ, аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат.



**Рис. 3.** Гидролиз β-казеина Lon-H<sub>6</sub>-протеазой и ее делеционной формой Lon-dHI(CC) в отсутствие и в присутствии эффекторов (электрофорез в 12% ПААГ). Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.15 М NaCl; 37°C; время реакции 2 ч; концентрации: Nu – 5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; β-казеин – 0.5 мг/мл; Lon-H<sub>6</sub> – 2.5 мкМ; Lon-dHI(CC) – 6 мкМ. 1 – фермент (контроль), 2 – β-казеин (контроль), «←» – в отсутствие ионов Mg<sup>2+</sup>, Mg – в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>, M – маркеры

тически не влияет на гидролиз пептида Lon-dHI(CC)-протеазой, а комплексы Nu-Mg оказывают близкое по величине, но относительно невысокое активирующее воздействие на пептидазный центр фермента, сопоставимое с влиянием ионов Mg<sup>2+</sup>. Из этих данных следует, что форма Lon-dHI(CC) не способна связывать свободные нуклеотиды и слабо взаимодействует с их комплексами с ионами магния. Наиболее действенным эффектором, влияющим на активность пептидазного центра, следует считать ионы магния.

Таким образом, удаление HI(CC)-домена приводит к снижению активности пептидазного центра Eс-Lon-протеазы и к утрате регулирующего влияния АТР-азного центра на пептидазный, которое в интактном ферменте обусловлено природой связанного нуклеотида.

**Протеолитическая и автолитическая активности делеционной формы Eс-Lon-протеазы**

Протеолитическую активность Lon-H<sub>6</sub> и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) тестировали по гидролизу модельного белкового субстрата – β-казеина – в отсутствие и при наличии ионов Mg<sup>2+</sup>, свободных нуклеотидов и их комплексов. Эффективность гидролиза белка-мишени и процесс накопления продуктов деградации детектировали с помощью гелелектрофореза.

Интактная Lon-H<sub>6</sub>-протеаза способна гидролизовать β-казеин в двух случаях: по процессивному механизму (без образования крупных промежуточных фрагментов) в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТР или по непроцессивному механизму в присутствии комплекса негидролизуемого аналога АТР с магнием (рис. 3).

Удаление HI(CC)-домена приводит к полной утрате делеционной формой протеолитической активности по β-казеину, что свидетельствует о важности этого домена для связывания и гидролиза белкового субстрата (рис. 3). При этом на электрофореграмме инкубированной реакционной смеси обнаруживаются полосы, соответствующие полипептидам с молекулярными массами от 40 до 60 кДа, что указывает на возможность самодеградации Lon-dHI(CC) в условиях, используемых при определении гидролиза белка-мишени.

Выявление у Lon-dHI(CC) автолитической активности, сопровождающей потенциальный гидролиз белкового субстрата, потребовало изучения самого процесса автолиза. Показано, что интактная Lon-H<sub>6</sub>-протеаза устойчива к самодеградации в присутствии любых нуклеотидных эффекторов (рис. 4). При этом в процессе длительной инкубации (24 ч и более) обнаруживается слабый автолиз Lon-H<sub>6</sub> в отсутствие эффекторов или при наличии ионов

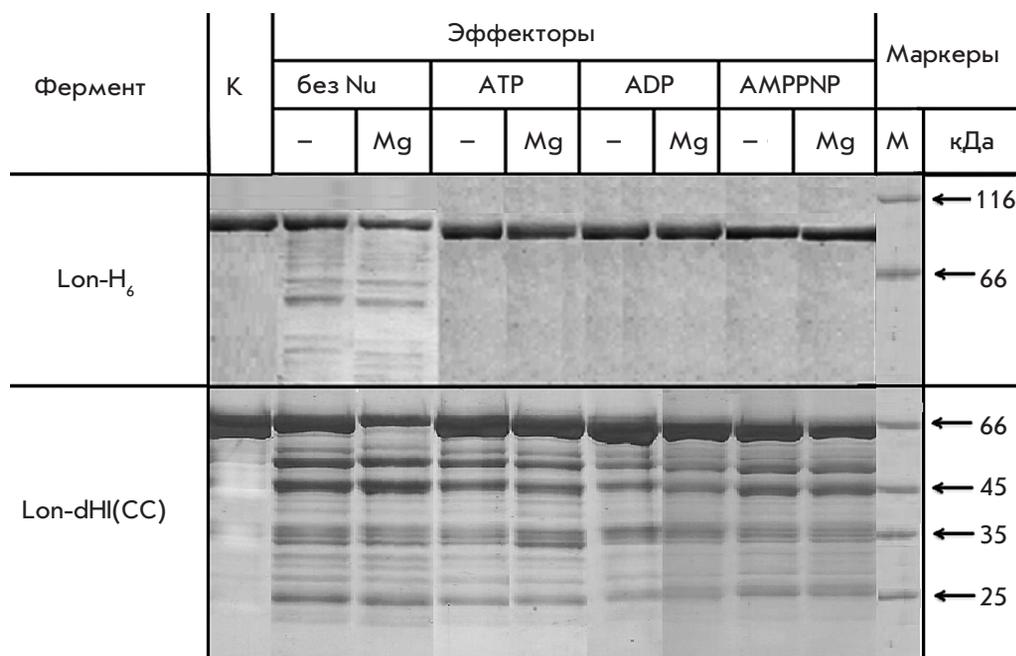


Рис. 4. Автолиз Lon-H<sub>6</sub>-протеазы и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) в отсутствие и в присутствии эффекторов. Условия эксперимента и обозначения как на рис. 3 со следующими изменениями: Lon-H<sub>6</sub> – 3.4 мкМ, время реакции 24 ч. К – исходный фермент (контроль, время реакции 0 ч)

магния (рис. 4), что согласуется с ранее полученными результатами [23].

В отличие от Lon-H<sub>6</sub>, делеционная форма Lon-dHI(CC) нестабильна, она подвергается автолизу как в отсутствие, так и в присутствии нуклеотидных эффекторов, причем, процесс автолиза Lon-dHI(CC) наиболее выражен при наличии ионов Mg (рис. 4).

Таким образом, утрата HI(CC)-домена приводит к полной потере способности Lon-H<sub>6</sub>-протеазы к гидролизу белкового субстрата и к дестабилизации структуры фермента.

#### Связывание нуклеиновой кислоты Lon-H<sub>6</sub>-протеазой и делеционной формой Lon-dHI(CC)

Важная характеристика Ec-Lon – способность к связыванию ДНК [8–10], однако сайт взаимодействия фермента с нуклеиновой кислотой до настоящего времени не локализован. Поскольку другие АТР-зависимые протеазы системы контроля качества клеточных белков не обладают ДНК-связывающими свойствами и не содержат характерного для LonA-протеаз инсерционного HI(CC)-домена, можно ожидать, что именно HI(CC)-домен вовлечен в связывание нуклеиновой кислоты. В связи с этим проверили содержание нуклеиновой кислоты в препаратах Lon-H<sub>6</sub>-протеазы и ее делеционной формы, полученных в настоящей работе.

Содержание ДНК в препаратах обоих ферментов, определенное по соотношению оптического поглощения ( $A_{260}/A_{280}$ ) в растворах Lon-H<sub>6</sub> и Lon-dHI(CC) (1.09

и 1.06 соответственно), не превышало 5%. Связанную с ферментами нуклеиновую кислоту выделяли из препаратов методом фенол-хлороформной экстракции. Обработка экстрактов бензоазой (неспецифическая нуклеаза, Sigma) привела к исчерпывающему гидролизу мишеней, что подтверждает их принадлежность к нуклеиновым кислотам. В то же время оба экстракта оказались устойчивыми к обработке РНКазой А. Эти результаты свидетельствуют о том, что и полноразмерная, и делеционная формы Ec-Lon выделяются из клеток *E. coli* в виде комплексов с ДНК.

Фенол-хлороформные экстракты анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (рис. 5). Установлено, что препараты и интактной Lon-H<sub>6</sub>-протеазы, и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) содержат значительное количество связанной ДНК в виде фрагментов размером около 150 п.н.

Кроме того, оказалось, что обе формы Lon-протеазы способны к связыванию дополнительного количества нуклеиновой кислоты. Показано, что инкубация плазмидной ДНК с Lon-H<sub>6</sub> или с Lon-dHI(CC) приводит к образованию комплексов ДНК-фермент и к изменению подвижности нуклеиновой кислоты при электрофорезе в агарозном геле (рис. 6).

Из представленных данных следует, что HI(CC)-домен Ec-Lon-протеазы либо не участвует во взаимодействии с нуклеиновой кислотой, либо не является определяющим в этом взаимодействии.

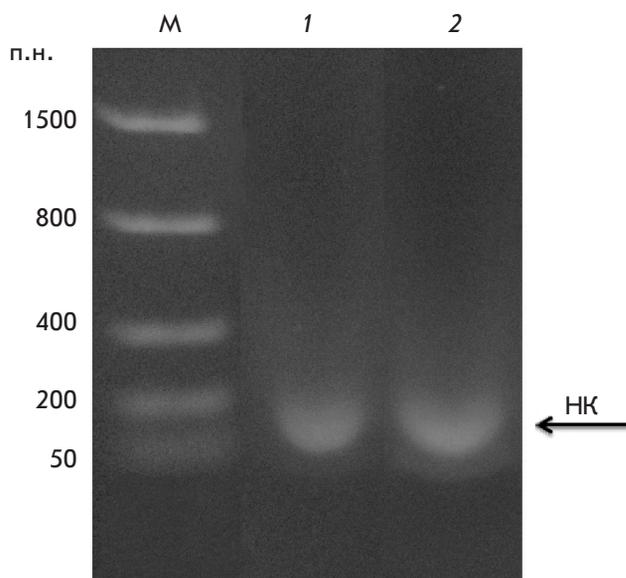


Рис. 5. Фенольные экстракты образцов Lon-H<sub>6</sub> (1) и Lon-dHI(CC) (2). М — маркеры, НК — нуклеиновая кислота

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным характеристический инсерционный HI(CC)-домен Eс-Lon-протеазы необходим для формирования и корректного функционирования АТР-азного центра фермента. В то же время HI(CC)-домен не влияет на формирование пептидазного центра Eс-Lon, однако имеет исключительное значение для взаимодействия активных центров. Следует подчеркнуть, что, несмотря на сохранение активности пептидазного центра, делеция HI(CC)-домена приводит к полной утрате ферментом протеолитической активности, что свидетельствует о важности этого домена для связывания и гидролиза белкового субстрата Eс-Lon-протеазой.

Интересно, что делеционные формы Lon-протеазы из *Brevibacillus thermoruber* (Bt-Lon) [24], утратившие фрагменты (246–259) или (248–256) в coiled-coil(CC)-области, теряют все три вида активности. Противоречие в оценке возможности функционирования пептидазного центра в делеционных формах LonA-протеаз, выявленное при сопоставлении результатов настоящей работы и данных [24], может быть обусловлено использованием разных субстратов при тестировании пептидазного центра — тиобензилового эфира N-защищенного трипептида (Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl) в нашей работе и 4-метокси-β-нафтиламида менее специфичного трипептида (Glt-Ala-Ala-Phe-MNA) — в [24].

Обнаруженный нами интенсивный автолиз Lon-dHI(CC) вызван, как мы полагаем, утратой

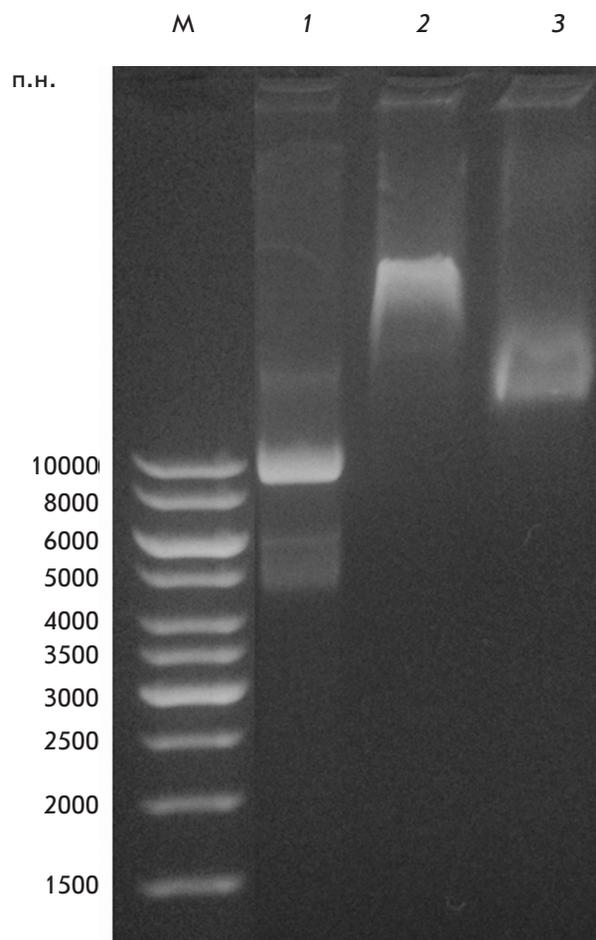


Рис. 6. ДНК-связывающая способность Lon-H<sub>6</sub> и Lon-dHI(CC). Условия эксперимента: 20 мМ Трис-НСI-буфер, рН 7.5; 60 мМ NaCl; 25°C; ДНК (рЕТ28а) — 28 нМ (1–3); Lon-H<sub>6</sub> — 33.9 мкМ (2), Lon-dHI(CC) — 22.2 мкМ (3); М — маркеры

способности к эффективному связыванию нуклеотидов — свойства, которое является стабилизирующим фактором для полноразмерного фермента. Предположение о возможной роли HI(CC)-домена как сайта связывания нуклеиновой кислоты Eс-Lon-протеазой не получило экспериментального подтверждения.

Таким образом, можно считать, что инсерционный HI(CC)-домен Eс-Lon-протеазы необходим для формирования функционально активной структуры фермента и реализации белок-белковых взаимодействий. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 815–823.
2. Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 11. P. 777–788.
3. Mogk A., Haslberger T., Tessarz P., Bukau B. // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. P. 120–125.
4. Lee I., Suzuki C.K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. P. 727–735.
5. 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.
6. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 244. P. 350–375.
7. Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 4728–4732.
8. Fu G.K., Smith M.J., Markovitz D.M. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 534–538.
9. Lee A.Y.L., Hsu C.H., Wu S.H. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 34903–34912.
10. Liu T., Lu B., Lee I., Ondrovicova G., Kutejova E., Suzuki C.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 13902–13910.
11. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
12. Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 11–31.
13. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // *Биомед. химия.* 2010. Т. 56. С. 412–419.
14. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. // *Биоорганической химия.* 2013. Т. 39. С. 309–319.
15. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. // *Биоорганической химия.* 2014. Т. 40. С. 673–681.
16. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
17. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование.* / Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
19. Bencini D.A., Wild J.R., O'Donovan G.A. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 132. P. 254–258.
20. Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 99. P. 53–64.
21. Lee A.Y.L., Tsay S.S., Chen M.Y., Wu S.H. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 834–844.
22. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Ротанова Т.В. // *Биоорганической химия.* 2000. Т. 26. С. 530–538.
23. Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорганической химия.* 2015. Т. 41. С. 579–586.
24. Chir J.L., Liao J.H., Lin Y.C., Wu S.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 382. P. 762–765.