

УДК 577.152.342*1'134

Участие остатков E34, K35 и R38 N-домена в формировании функционально активной структуры Lon-протеазы *Escherichia coli*

А. Г. Андрианова¹, А. М. Куджаев¹, В. А. Абрикосова¹, А. Е. Гущина², И. В. Смирнов¹, Т. В. Ротанова^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Macromolecular Crystallography Laboratory NCI-Frederick, P.O. Box B, Frederick, MD 21702, USA

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

Поступила в редакцию 09.09.2020

Принята к печати 21.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11197

РЕФЕРАТ АТФ-зависимая Lon-протеаза *Escherichia coli* (*EcLon*), относящаяся к суперсемейству AAA⁺-белков, является ключевым участником системы контроля качества клеточного протеома, в которой она отвечает за расщепление потенциально опасных для клетки мутантных, поврежденных и короткоживущих регуляторных белков. *EcLon* функционирует как гомоолигомер, субъединица которого включает центральный характеристический AAA⁺-модуль, С-концевой протеазный домен, а также N-концевую некаталитическую область, образованную двумя доменами – собственно N-концевым и вставочным α-спирализованным. Анализ пространственной структуры N-домена позволил выявить остатки E34, K35 и R38 на поверхности молекулы фермента, предположительно вовлеченные в формирование стабильной, функционально активной *EcLon*-протеазы. Получен тройной мутант LonEKR, несущий замены остатков E34, K35 и R38 на аланин. Показано, что введение указанных замен влияет на конформационную стабильность и межцентровые аллостерические взаимодействия в ферменте, обусловленные действием нуклеотидов, а также на формирование корректного сайта связывания белкового субстрата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА контроль качества клеточного протеома, AAA⁺-белки, АТФ-зависимый протеолиз, LonA-протеазы, N-домен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AMPPNP – аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат; DTDP – 4,4'-дитиодипиридин; Nu – нуклеотид; PepTBE – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl; Suc – сукцинил; ОП – оптическое поглощение.

ВВЕДЕНИЕ

АТФ-зависимые Lon-протеазы (MEROPS: клан SJ, семейство S16) – ключевые участники системы контроля качества клеточных белков, обеспечивающей сохранность протеома во всех царствах природы. Наряду с Lon и другими АТФ-зависимыми протеазами система контроля качества (СКК) включает молекулярные шапероны, которые обеспечивают корректный фолдинг белков, отвечают за формирование белковых ансамблей и препятствуют накоплению агрегатов в клетке. В свою очередь АТФ-зависимые протеазы и мультисубъединичные бифункциональные комплексы – протеасомы – деградируют поврежденные, мутантные, а также короткоживущие регуляторные белки, потенциально опасные для клетки [1–6].

Lon-протеазы – гомоолигомерные ферменты. Их субъединицы включают АТФ-азный (AAA⁺) модуль, образованный нуклеотидсвязывающим (NB) и α-спирализованным (H) доменами, протеазный (P) домен, представляющий собой серин-лизиновую пептидгидролазу, а также N-концевой или инсерционный некаталитический экстрадомен (ED) (рис. 1) [7, 8].

Наличие AAA⁺-модуля в структуре Lon-протеаз, как и других протеаз СКК, определяет их принадлежность суперсемейству AAA⁺-белков (ATPases Associated with a variety of cellular Activities), широко распространенных в природе и участвующих в важнейших процессах, таких, как репликация ДНК, транскрипция, деление клеток, внутриклеточный транспорт, фолдинг, протеолиз и др. [9–12]. AAA⁺-протеазы – высокоселективные ферменты,

основными особенностями которых являются сопряжение протеолитической активности с гидролизом АТФ и процессивный характер гидролиза белковых мишеней, в результате которого образуются исключительно низкомолекулярные продукты (5–15 аминокислотных остатков, а.о.) [13–15].

Из множества клеточных белков АТФ-зависимые протеазы отбирают свои субстраты по наличию в них особых структурных элементов: экспонированных гидрофобных частей белковой молекулы либо меток, называемых дегронами. Дегроны представляют собой специфические аминокислотные последовательности, локализованные на конце или внутри полипептидной цепи субстрата [16–18]. Меткой для субстратов протеасом, функционирующих в клетках эукариот, служит белок убиквитин [19, 20]. Процессивный механизм гидролиза субстратов AAA⁺-протеазами реализуется благодаря бочкообразной четвертичной структуре этих ферментов. Их цилиндрические олигомеры используют энергию АТФ для связывания,

денатурации и транслокации белковых субстратов вдоль центральной поры, образованной уложенными друг на друга кольцами АТФ-азных модулей и протеазных доменов, к пептидазным центрам, скрытым внутри олигомера фермента [21–23].

На сегодняшний день в базе данных MEROPS из общего пула АТФ-зависимых Lon-протеаз выделены три подсемейства: А, В и С (рис. 1А). Основой для разделения ферментов Lon на подсемейства служат различия в окружении каталитически активных остатков серина и лизина протеолитических центров, а также локализация экстрадоменов, определяющая архитектуру АТФ-азного компонента [7, 8, 24]. В семействе Lon-протеаз идентифицировано два типа протеолитических центров – тип P_A, обнаруженный в P-доменах ферментов самого крупного подсемейства LonA, объединяющего ферменты бактерий и эукариот [7, 8, 24, 25], и тип P_B, детектируемый в ферментах подсемейства LonB из архей [8, 26], а также малочисленного бактериального подсемейства LonC (рис. 1А) [27, 28].

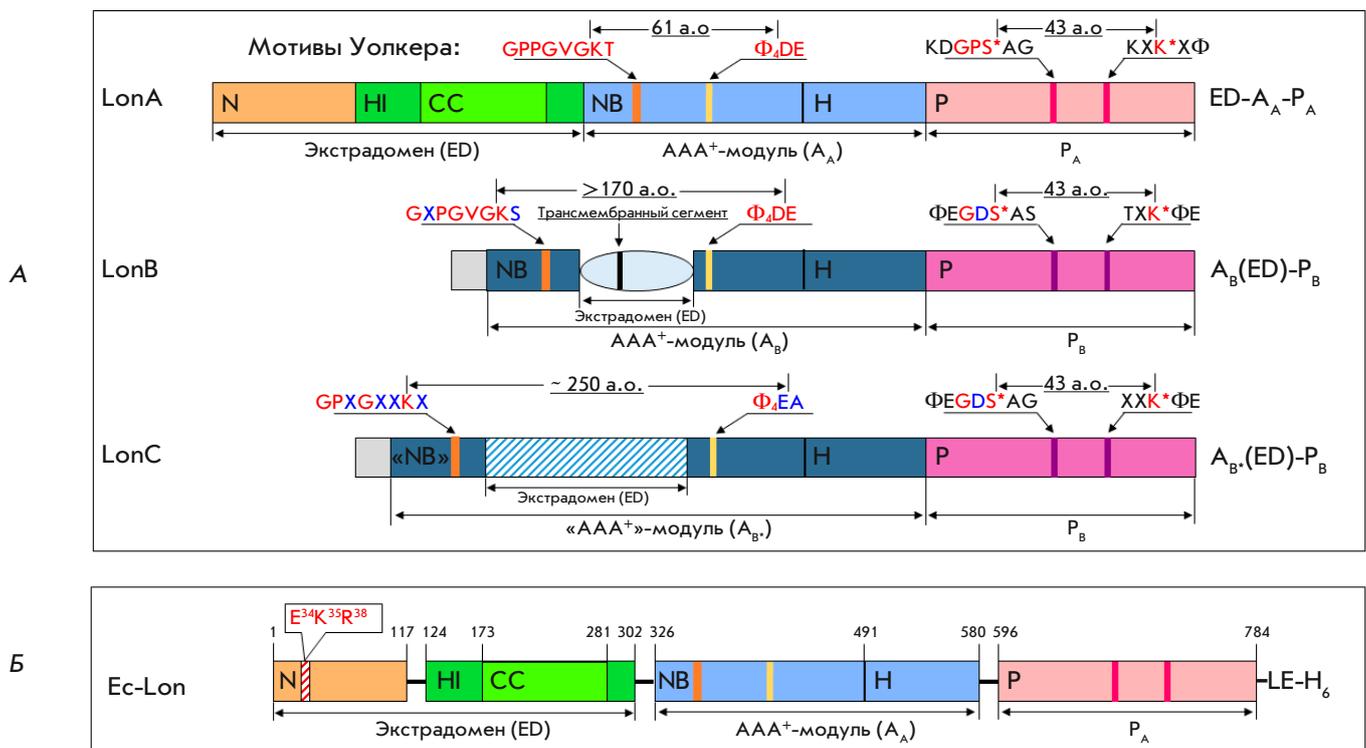


Рис. 1. Доменная организация Lon-протеаз из разных подсемейств (А) и границы доменов в субъединице Lon-протеазы *E. coli* (Б). А – S* и K* – каталитически активные остатки протеолитического центра, Φ – остаток гидрофобной аминокислоты, X – остаток любой аминокислоты, P_A и P_B – протеазные домены А-типа (розовый) и В-типа (фиолетовый), A_A, A_B и A_{B*} – AAA⁺-модули соответственно А-типа (голубой), В-типа и В*-типа «вырожденный» (синие), NB – нуклеотидсвязывающие домены, H – α-спирализованные домены, ED – экстрадомены, представленные N-доменом (коричневый) и HI(CC) – вставочным α-спирализованным доменом (зеленый) с coiled-coil-участком (салатовый) у протеаз LonA, трансмембранным доменом (светло-голубой) у LonB и вставочным доменом (заштрихован) у LonC; а.о. – аминокислотный остаток; замены аминокислот в консервативных фрагментах выделены синим цветом. Б – субъединица LonA-протеазы *E. coli* с С-концевым 6His-тэгом; в N-домене заштрихован регион, включающий остатки E34, K35 и R38

Экстрадомен LonA-протеаз представлен пролонгированной N-концевой областью, являющейся отличительной особенностью представителей этого подсемейства. Протеазы LonB и LonC содержат инсерционные экстрадомены, локализованные в их нуклеотидсвязывающих доменах между мотивами Уолкера А и В. Особенностью экстрадомена ферментов LonB является наличие включенного в него трансмембранного сегмента. Экстрадомен LonC-протеаз отличает большая протяженность по сравнению с экстрадоменом LonB и вырождение АТФ-азной функции вследствие замены существенных остатков АТФ-азного центра (рис. 1А). Тем не менее, LonC-протеазы также участвуют в системе контроля качества протеома, поскольку регуляция их протеолитической активности опосредована сохранившейся способностью к связыванию нуклеотидов [27].

Наиболее изучены представители подсемейства LonA. Их N-концевая область имеет двухдоменную организацию [21, 29]. У LonA-протеазы *Escherichia coli* (*EcLon*) она включает 325 а.о. и сформирована «истинным» N-концевым (M1-Y117) и вставочным α -спирализованным (α -helical inserted, HI(CC), (E124-P302)) доменами (рис. 1Б) [29, 30]. Первый имеет структуру скрученного β -листа и топологически сходен с РНК-связывающими РUA-доменами [31, 32]. Второй, сформированный восемью α -спиралями, включает участок последовательности со специфической coiled-coil (CC) конформацией и проявляет выраженное сходство с H-доменом собственного AAA⁺-модуля, а также с α -спирализованным доменом первого AAA⁺-модуля шаперонов-дезагрегас ClpB/Hsp104, содержащим инсерционный M-домен с CC-конформацией [30, 31, 33].

К настоящему времени накоплен значительный объем сведений о роли AAA⁺-модуля и протеазного домена в функционировании LonA-протеаз. Однако функции N-концевой области LonA-протеаз охарактеризованы еще не в полной мере. Согласно опубликованным данным, эта область молекулы участвует в распознавании и связывании белков-субстратов [34–37]. Недавно было показано участие N-концевой области в образовании додекамерных структур из гексамеров LonA-протеазы *E. coli* [38, 39]. Кроме того, выявлено различие функций, выполняемых N- и HI(CC)-доменами в полноразмерной *EcLon*-протеазе [40–45], что служит подтверждением двухдоменной организации N-концевой области фермента. Совокупность результатов различных исследований указывает на важнейшую роль N-концевой области LonA-протеаз в поддержании их функционально активной конформации. При этом остается неясным, какие именно фрагменты N-домена важны

для структурной организации и принимают участие в стабилизации ферментов.

Цель настоящей работы состояла в выявлении остатков N-концевого домена, способных участвовать в формировании стабильной, функционально активной структуры *EcLon*-протеазы (далее – Lon-протеаза), проведении сайт-направленного мутагенеза этих остатков с получением мутантной формы фермента и последующем исследовании ее структурных и ферментативных характеристик в сравнении с соответствующими характеристиками интактной *EcLon*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

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

Получение рекомбинантной *EcLon*-протеазы (*Ec-Lon*) и ее мутантной формы LonEKR

Рекомбинантную форму *EcLon*-протеазы, содержащую гексагистидиновый фрагмент в составе октапептида LENNNNN на C-конце белка (*Ec-Lon*), получали по ранее описанной методике [40].

Тройной мутант LonEKR получали с помощью мегапраймерного подхода на основе нуклеотидной последовательности *Ec-Lon*-протеазы с использованием следующих праймеров: Lon_E34K35R38/AAA, T7 promoter и f9 (5'-CCATCGCCGCTTCCAGACAAGCGATAGATGCTGCCCGCCCGACAAATAAGGGG-3', 5'-ТТААТАСГАСТСАСТАТАГГГГА-3' и 5'-CGTTTACACCCGGCTCATCC-3' соответственно). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК рЕТ28-*Ec-lon*. На первом этапе с помощью праймеров Lon_E34K35R38/AAA и T7 promoter получили ПЦР-фрагмент, который использовали в качестве праймера на втором этапе совместно с праймером f9. Полученный фрагмент ДНК длиной около 250 п.н. клонировали в вектор рЕТ28-*Ec-lon* по уникальным сайтам рестрикции XbaI и HindIII.

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

Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), несущие плазмиду рЕТ28-*lonEKR*, культивировали в среде LB с канамицином при 37°C и интенсивном перемешивании до достижения ОП₆₀₀ 0.5 о.е., после чего темпера-

туру клеточной культуры понижали до 25°C и проводили индукцию при 0.1/1 мМ IPTG в течение 3 ч.

Выделение и очистку EcLon и LonEKR проводили с использованием Ni²⁺-хелатной аффинной хроматографии (колонка HisTrap FF, 5 мл, GE Healthcare, США) и анионообменной хроматографии (колонка HiTrap™ Q FF, 5 мл, GE Healthcare) согласно ранее описанной методике [40], а также последующей двухстадийной гель-фильтрацией на HiPrep™ 16/60 Sephacryl S-300 HR (120 мл, GE Healthcare), буферы: 50 мМ имидазол, pH 7.5; 0.5 М NaCl (стадия 1) и 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5; 0.5 М NaCl (стадия 2).

Концентрации белков определяли по методу Брэдфорд [46].

Гомогенность белков в препаратах тестировали электрофоретически [47] с использованием коммерческого набора маркеров (кДа): β-галактозидаза (116.0), бычий сывороточный альбумин (66.2), овальбумин (45.0), лактатдегидрогеназа (35.0), рестриктаза Bsp98I (25.0), β-лактальбумин (18.4) и лизоцим (14.4).

Определение энзиматических свойств EcLon и ее тройного мутанта LonEKR

АТФ-азную активность тестировали по накоплению во времени неорганического фосфата в реакции гидролиза АТФ в 50 мМ Трис-НСl-буфере, pH 8.1, содержащем 200 мМ NaCl, 2.5 мМ АТФ, 2.5 или 20 мМ MgCl₂ и 0.1–1.0 мкМ фермент в отсутствие и при наличии β-казеина (1 мг/мл), при 37°C [48]. В контрольном опыте фермент заменяли буфером. Начальные скорости реакций определяли по величине ОП смеси из 200 мкл реакционной среды и 600 мкл реагента (100 мМ Zn(АсО)₂, 15 мМ (NH₄)₆Мо₇О₂₄, 1% SDS, pH 4.5–5.0) при длине волны 350 нм ($\epsilon_{350} = 7\ 360\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$).

Тиоэстеразная активность. За гидролизом тиобензилового эфира N-защищенного трипептида Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (ПерТВЕ) следили спектрофотометрически при длине волны 324 нм по величине ОП 4-тиопиридона ($\epsilon_{324} = 16\ 500\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолата, BzlS⁻) с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP) [49]. Гидролиз ПерТВЕ проводили при 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, pH 8.1, содержащем 200 мМ NaCl, 10% DMSO, 0.2 мМ DTDP, 0.1 мМ ПерТВЕ и 0.1–1.0 мкМ фермент. При изучении влияния эффекторов в смесь добавляли нуклеотид до 2.5 мМ и MgCl₂ до 20 мМ.

Протеолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически [47]. Реакцию проводили при температуре 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере,

pH 8.1, содержащем 200 мМ NaCl, 20 мкМ β-казеин и 1 мкМ фермент, в отсутствие или при наличии 5 мМ Nu и 20 мМ MgCl₂. В контрольном эксперименте фермент заменяли буфером. Аликвоту реакционной или контрольной смеси смешивали с лизирующим буфером (0.2 М Трис-НСl, pH 8.9, 4% SDS, 20% глицерин, 0.5 мМ EDTA, 0.8% бромфеноловый синий, 3% β-меркаптоэтанол) в соотношении 3:1, кипятили в течение 5 мин, наносили на 12% ПААГ для электрофореза.

Автолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически [47] в условиях, аналогичных условиям определения протеолитической активности, но в отсутствие β-казеина.

Ограниченный протеолиз химотрипсином EcLon-протеазы и ее тройного мутанта LonEKR проводили при температуре 30°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, pH 8.1, содержащем 300 мМ NaCl, 11 мкМ фермент и 0.2 мкМ химотрипсин, в отсутствие и при наличии эффекторов EcLon-протеазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация остатков N-домена EcLon-протеазы, предположительно участвующих в формировании функционально активного фермента

Ранее нами было показано, что ключевая роль в корректном связывании белкового субстрата EcLon-протеазой, эффективном функционировании ее АТФ-азного и пептидазного центров, реализации межцентровых аллостерических взаимодействий и процессивного механизма протеолиза принадлежит инсерционному HI(CC)-домену [40–45]. При этом для взаимодействия с белковым субстратом и его гидролиза критически важными оказались фланкирующие CC-участок фрагменты (E124–H172) и (M281–N302) [41–43].

Нами установлено [44], что N-концевой домен обеспечивает конформационную стабильность EcLon-протеазы в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ, поскольку укороченная форма фермента (G107–K784), полученная в результате удаления фрагмента (M1–N106), подвергается интенсивному автолизу, несмотря на сохранение способности к процессивному протеолизу. Наряду с этим показано [34], что остатки R33, E34 и K35 N-концевого домена принимают участие в специфическом связывании субстратов EcLon, содержащих так называемый sul20-дегрон (фрагмент ингибитора клеточного деления SulA), что, в свою очередь, влияет на активность АТФ-азного и протеолитического центров.

В то же время результаты рентгеноструктурного анализа N-концевой области LonA-протеазы *E. coli* [31] позволяют предположить, что регион, включающий остатки R33, E34, K35, а также R38, может иметь важное значение для реализации межмономерных и/или межсубъединичных взаимодействий в ферменте. Этот регион локализован на поверхности N-домена *EcLon*-протеазы (рис. 2), и, таким образом, указанные остатки могут быть непосредственно вовлечены как во взаимодействия с субстратом, так и во взаимодействия между протомерами внутри олигомеров *EcLon*. Предположение об участии рассматриваемого региона в формировании активной структуры и функционировании *EcLon* можно проверить путем изучения свойств мутантной формы фермента, несущей замены потенциально значимых остатков.

Однако, как следует из рис. 2, остаток R33 образует ионную пару с остатком E62, расположенным на конце длинной поверхностной петли из 18 остатков. Такое взаимодействие ограничивает подвижность этой петли и тем самым поддерживает ее конформацию. Предполагаемая мутация остатка R33 может привести к нарушению топологии исследуемой области. По этой причине в настоящей работе исследована мутантная форма *EcLon*-протеазы (LonEKR), в которой заменам на аланин были подвергнуты только три остатка, а именно, E34, K35 и R38.

Получение LonEKR – тройного мутанта Lon-протеазы *E. coli*

Мутантную форму LonEKR, содержащую замены E34A, K35A и R38A, получали на основе рекомбинантной формы *EcLon*, содержащей гексагистициновый фрагмент на С-конце белка (*EcLon*) [40]. Интактный фермент и его тройной мутант выделяли согласно схеме, включающей аффинную хроматографию на Ni-сефарозе, ионообменную хроматографию на Q-сефарозе и гель-фильтрацию на сефакриле S-300. Для интактного и мутантного ферментов определяли АТФ-азную, пептидазную, протеолитическую и автолитическую активность. При изучении гидролиза АТФ оценивали влияние избытка ионов магния и присутствия белкового субстрата. Пептидазную (субстрат – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, ПерТВЕ), протеолитическую (модельный белковый субстрат – β -казеин) и автолитическую активность тестировали в отсутствие и в присутствии эффекторов Lon-протеазы – нуклеотидов и ионов магния.

АТФ-азная активность мутантной формы LonEKR

Ранее было показано, что интактная *EcLon*-протеаза демонстрирует максимальный уровень АТФ-азной активности в реакционной среде с рН 8.0–8.2 и при эквимоллярных концентрациях АТФ

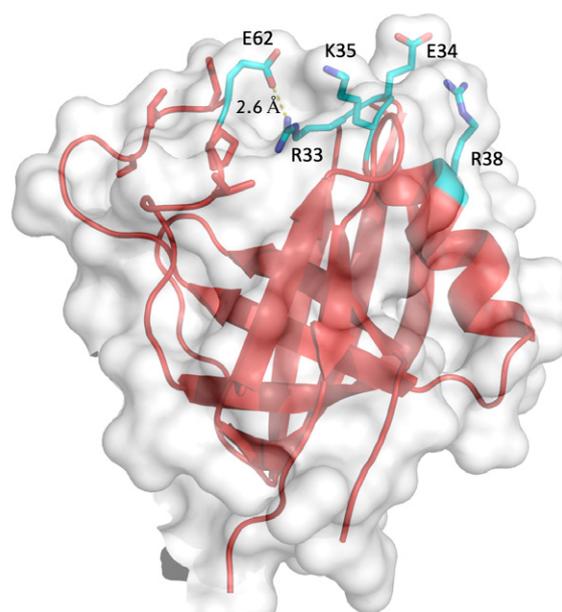


Рис. 2. Поверхность N-домена *EcLon*-протеазы (остатки 7–118). Красным цветом показаны элементы вторичной структуры, голубым – боковые цепи поверхностных остатков, желтым пунктиром обозначено ионное взаимодействие между остатками R33 и E62

и ионов магния, равных 2.5 мМ. При повышенной концентрации ионов Mg^{2+} , характерной для физиологических условий (20 мМ), наблюдается понижение АТФ-азной активности. Присутствие белкового субстрата способно восстанавливать скорость гидролиза АТФ до значений, соответствующих оптимальным условиям ее проявления [40, 43].

Тройной мутант *EcLon*-протеазы по эффективности гидролиза АТФ близок к интактному ферменту, при этом сохраняются особенности его функционирования, в том числе ингибирование избытком ионов магния и последующая активация АТФ-азных центров β -казеином (далее – казеин). Однако активация центров мутантной формы в ответ на взаимодействие с казеином происходит с меньшей эффективностью, чем у интактной *EcLon*-протеазы (рис. 3), что может быть обусловлено ослаблением связывания белковой мишени вследствие введения мутаций по остаткам E34, K35 и R38.

В отдельном эксперименте показано влияние условий культивирования штамма-продуцента, в частности условий индукции, на эффективность функционирования АТФ-азных центров выделенной формы фермента LonEKR. При работе с *EcLon*-протеазой и ее модифицированными формами в качестве оптимальных были приняты условия, понижающие влияние краудинг-эффекта в процессе экспрессии целевого гена: ферментацию проводили в присутствии 0.1 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида

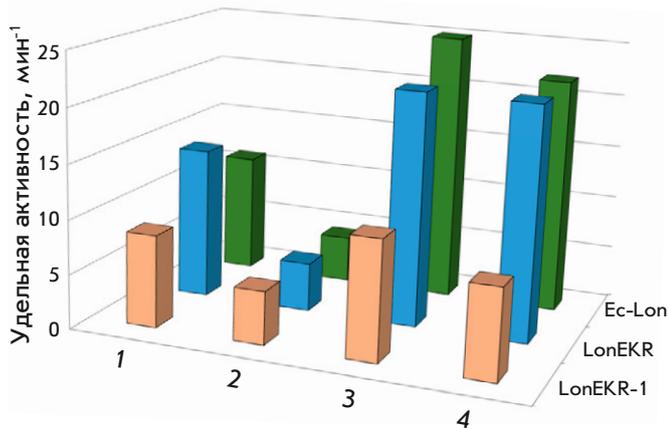


Рис. 3. АТФ-азная активность интактной *Ec-Lon*-протеазы и ее мутантных форм *LonEKR* и *LonEKR-1*. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 37°C. Концентрации: АТФ – 2.5 мМ; MgCl₂ – 2.5 (1, 3) или 20 мМ (2, 4); β-казеин – 0 (1, 2) или 1 мг/мл (3, 4); фермент – 0.1–1.0 мкМ. Величина среднеквадратичного отклонения R² в экспериментах составила 0.98–1.00

(IPTG) и температуре 25°C. В случае увеличения концентрации индуктора до 1 мМ наблюдалось понижение базовой АТФ-азной активности выделенного мутанта (*LonEKR-1*) на 40% по сравнению с интактным ферментом (рис. 3). Эффективность восстановления АТФ-азной активности *LonEKR-1* при взаимодействии с белковым субстратом также оказалась заметно ниже, чем у интактной *Lon*-протеазы и формы *LonEKR* (рис. 3). Таким образом, можно полагать, что присутствие IPTG в концентрации 1 мМ неблагоприятно влияет на фолдинг мутантной формы *Ec-Lon*-протеазы, что также подтверждается экспериментами по гель-фильтрации *LonEKR-1*, в ходе которой наблюдаются изменения в характере белкового пика по сравнению с *Lon* и *LonEKR* – расширение пика и появление у него «хвоста».

Активность пептидазного центра мутантной формы *LonEKR*

Эффективность функционирования пептидазных центров интактной *Ec-Lon*-протеазы и ее мутантной формы *LonEKR* оценивали по гидролизу тиобензильного эфира N-защищенного трипептида – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (ПерТВЕ) [40]. При гидролизе пептидного субстрата в отсутствие нуклеотидных эффекторов мутантная форма *LonEKR* оказалась более эффективной (в 1.7 раза), чем интактная *Lon* (рис. 4). При этом ионы магния активируют пептидазные центры обеих форм в незначительной мере. Среди свободных нуклеотидов лишь АТФ проявляет слабое, но близкое по эффективности активирующее действие, в то время как ADP и AMPPNP в одина-

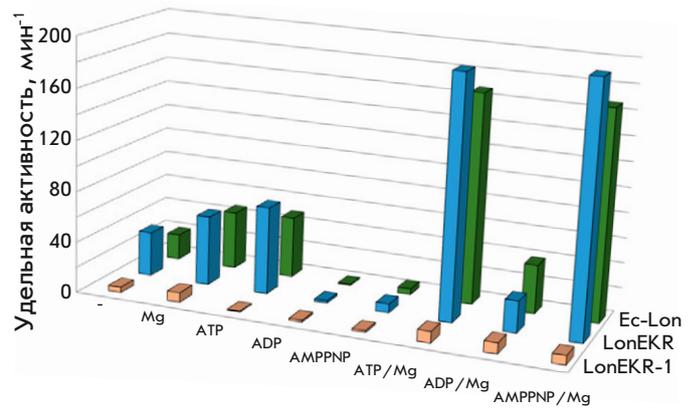


Рис. 4. Пептидазная активность интактной *Ec-Lon*-протеазы и ее мутантных форм *LonEKR* и *LonEKR-1*. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 10% DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C. Концентрации: ПерТВЕ – 0.1 мМ; нуклеотиды – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; фермент – 0.1–1.0 мкМ. Величина среднеквадратичного отклонения R² в экспериментах составила 0.98–1.00

ковой мере ингибируют пептидазную активность, что свидетельствует о сходном родстве нуклеотидов с интактной и мутантной формами фермента. Наибольшее активирующее влияние на пептидазные центры обеих форм *Lon* оказывают комплексы АТФ/Мg и АМPPNP/Мg (рис. 4). Таким образом, можно констатировать, что пептидгидролазные центры тройного мутанта ведут себя, в целом, подобно центрам интактного фермента.

Полученные результаты позволяют считать, что введение мутаций по остаткам Е34, К35 и R38 N-концевого домена *EcLon* не приводит к значительным изменениям функционирования пептидазных центров фермента. Однако, поскольку активация интактной *Lon* комплексами АТФ/Мg и АМPPNP/Мg заметно превышает активацию ими формы *LonEKR*, можно полагать, что у мутанта изменяется передача аллостерических сигналов от АТФ-азного центра к пептидазному, возможно, за счет различий в эффективности связывания комплексов Nu/Mg.

Необходимо отметить, что форма фермента *LonEKR-1*, полученная в результате экспрессии гена мутантной формы *Lon*-протеазы в присутствии 1 мМ IPTG, проявляет резко пониженную пептидазную активность относительно активности формы *LonEKR* (рис. 4). В отсутствие эффекторов гидролиз низкомолекулярного субстрата формой *LonEKR-1* протекает в 8 раз медленнее, чем формой *LonEKR*, но при этом сохраняется активирующий эффект ионов магния. В отличие от действия на *LonEKR* любые свободные нуклеотиды ингибируют пептидазную активность *LonEKR-1*, а их комплексы с Mg²⁺ ускоряют

гидролиз пептида в среднем только в 2 раза, что мало отличается от действия ионов магния. Таким образом, как и в случае с АТФ-азной активностью, полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что проведение индукции в присутствии 1 мМ IPTG приводит к значительным конформационным нарушениям в структуре фермента, что сказывается на его функциональной активности.

Протеолитическая активность и автолитические свойства мутантной формы LonEKR

Протеолитическую активность *Ec*-Lon-протеазы и ее мутантной формы оценивали по гидролизу β -казеина (рис. 5) как в [40–45]. Форма LonEKR сохраняет характерную для ферментов СКК способность гидролизовать белковую мишень по процессивному механизму (без высвобождения крупных промежуточных продуктов) в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ (рис. 5Б). Этот механизм реализуется гексамерной структурой LonEKR, образование которой подтверждено экспериментами по гель-фильтрации (данные не приведены). В присутствии комплекса АТФ/Мg за первые 10 мин реакции более 50% казеина подвергается деградации мутантной формой, что сопоставимо с известной эффективностью АТФ-зависимого гидролиза этого субстрата нативной *Ec*Lon-протеазой [43]. Интактный фермент характеризуется также способностью деградировать белковый субстрат в присутствии комплекса негидролизуемого аналога АТФ, АМPPNP, с ионами магния. Продуктами реакции в этом случае являются высокомолекулярные фрагменты, т.е. протеолиз происходит по непроцессивному механизму и с низкой эффективностью (рис. 5А). Ионы магния отдельно также можно рассматривать в качестве активаторов непроцессивного гидролиза казеина *Ec*-Lon-протеазой (рис. 5А). В противоположность интактному ферменту протеолитическая активность тройного мутанта LonEKR в присутствии как ионов магния, так и комплекса АМPPNP/Мg за тот же период времени практически не проявляется (рис. 5Б). Полученные результаты могут отражать как ухудшение эффективности связывания белкового субстрата с LonEKR, так и нарушения аллостерических взаимодействий между АТФ-азным и протеолитическим центрами в мутантном ферменте.

Из рис. 5 следует, что в отсутствие эффекторов, а также при наличии ионов магния взаимодействие фермента с белковым субстратом сопровождается выраженным автолизом интактной Lon-протеазы и слабым автолизом мутанта. Изучение автолитической функции нативной и мутантной форм Lon в отсутствие белка-мишени показало, что за исследуемый интервал времени (36 ч – для Lon и 33 ч –

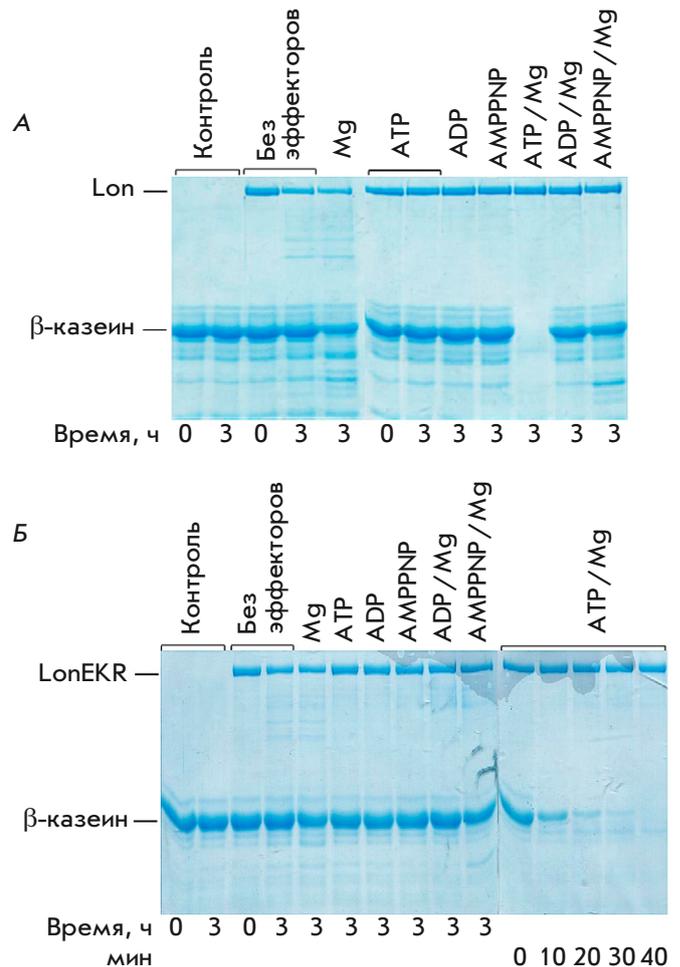
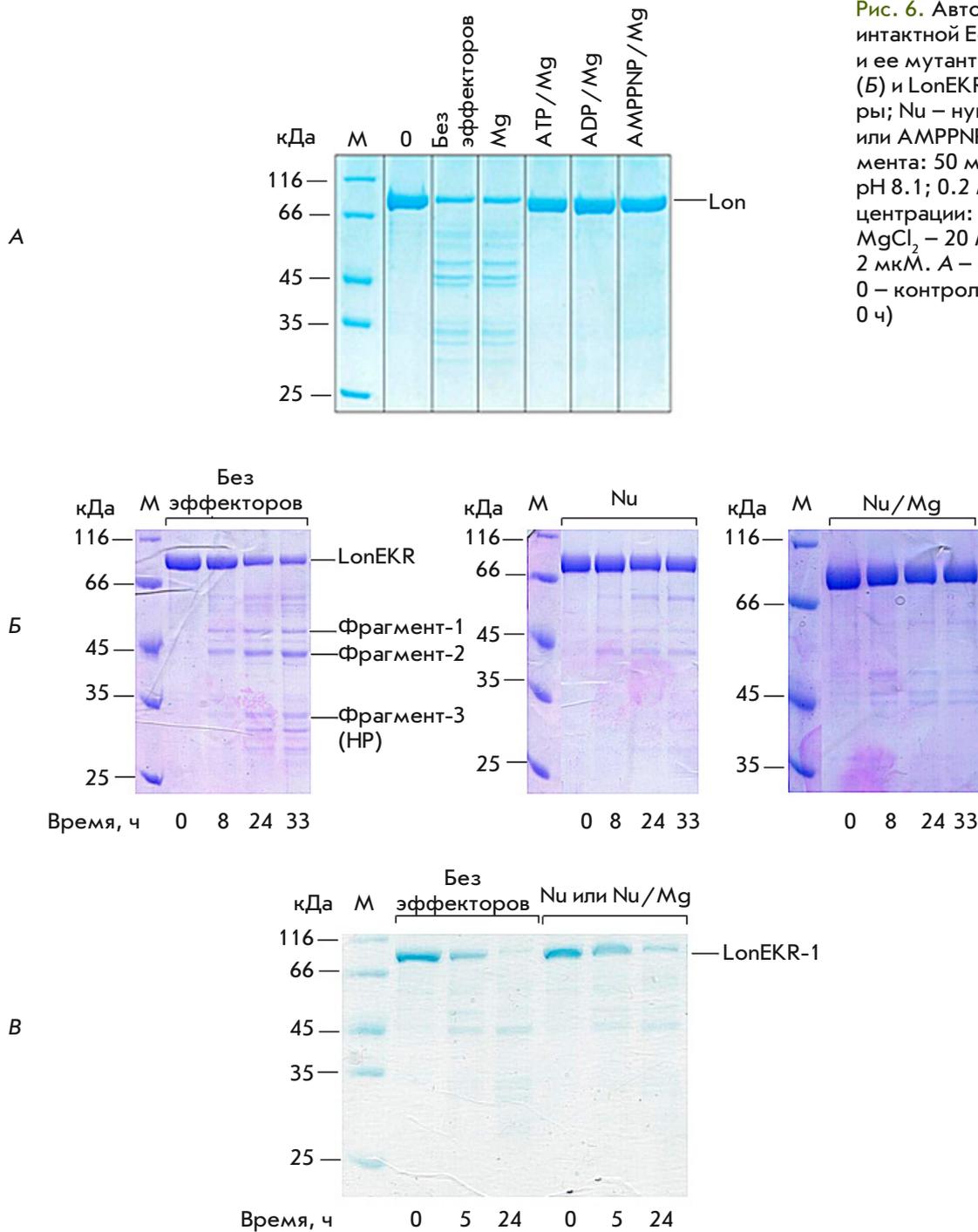


Рис. 5. Гидролиз β -казеина *Ec*-Lon-протеазой (А) и ее мутантной формой LonEKR (Б) в отсутствие и в присутствии эффекторов (электрофорез в 12% ПААГ). Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 37°C; концентрации: β -казеин – 20 мкМ; нуклеотиды – 5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; фермент – 1 мкМ

для LonEKR) количество обеих форм фермента значительно уменьшается (рис. 6А, Б). При этом автолиз интактной Lon наблюдается исключительно в отсутствие нуклеотидных эффекторов, в то время как автолиз мутанта LonEKR происходит при любых условиях, однако нуклеотиды и их комплексы с ионами магния заметно стабилизируют мутантную форму фермента.

С помощью N-концевого секвенирования установлено, что стабильные фрагменты LonEKR образуются в результате автолиза фермента по связям, локализованным во вставочном HI(CC)-домене (F138–E139 и M234–K235), а также на границе NB- и H-доменов (L490–S491) (рис. 1Б и 7). Продуктами автолиза по связям F138–E139 и M234–K235 являются соответственно Фрагмент-1 с молекулярной массой около 50 кДа и Фрагмент-2 около 44 кДа (рис. 6Б).

Рис. 6. Автолитические свойства интактной Ec-Lon-протеазы (А) и ее мутантных форм LonEKR (Б) и LonEKR-1 (В). М – маркеры; Nu – нуклеотид (АТФ, АDР или АМРРNР). Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 37°C. Концентрации: нуклеотиды – 5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; фермент – 2 мкМ. А – время реакции 36 ч; 0 – контроль (время реакции – 0 ч)



В этих продуктах отщеплены, по-видимому, также С-концевые части последовательности LonEKR (предположительно Р-домены). Автолитическое расщепление тройного мутанта по связи L490–S491 приводит к образованию Фрагмента-3 (33 кДа), включающего Н- и Р-домены (рис. 6Б и 7).

Стабильные фрагменты нативной Lon-протеазы образуются при автолизе, происходящем в NB-домене по связям M410–A411 и I488–R489, и исключительно

в отсутствие нуклеотидных эффекторов [43] (рис. 7). В последнем случае так же, как и у LonEKR, образуется фрагмент, включающий α-спирализованный и протеазный домены (HP), мол. масса которого соответствует 33 кДа. Таким образом, результаты автолиза свидетельствуют о различии конформаций интактной Lon-протеазы и ее тройного мутанта LonEKR, а также о возможном влиянии введенных мутаций на эффективность связывания комплексов Nu/Mg.

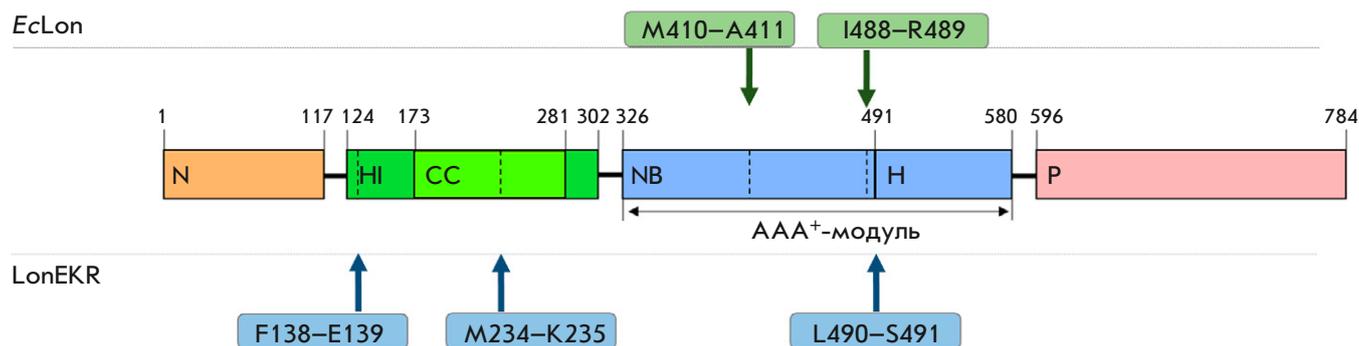


Рис. 7. Локализация сайтов автолиза в нативной Eclon-протеазе и в мутантной форме LonEKR

Расщепление нативного фермента по связи M234–K235, расположенной в характеристической «длинной спирали» СС-участка, тоже возможно, но такой характер деградации имеет место только при ограниченном протеолизе Lon химотрипсином в присутствии нуклеотидов или комплексов Nu/Mg [50]. Таким образом, можно констатировать, что связи M234–K235 и L490–S491 (или I488–R489) локализованы в областях субъединицы Lon, доступных воздействию различных протеаз. Однако расщепление по связи F138–E139, которая находится в N-концевой α-спирали HI(CC)-домена, до сих пор не обнаружили ни в нативной Lon-протеазе, ни в каких-либо ее модифицированных формах.

Сайты автолиза в HI(CC)-доме (а.о. 124–302), не характерные для интактной Lon-протеазы, ранее нашли в трех укороченных по N-концевому домену формах фермента в присутствии комплекса АТФ/Mg. Так, форма Lon-d106, утратившая первые 106 а.о., в этих условиях подвергается интенсивному расщеплению по связи A267–K268, локализованной на N-конце последней спирали СС-участка [44]. Поскольку Lon-d106 – единственная укороченная форма, которая сохраняет способность к АТФ-зависимому процессивному гидролизу белкового субстрата, сделано заключение о том, что N-домен Lon-протеазы не участвует в реализации механизма процессивного протеолиза, но его присутствие обеспечивает конформационную стабильность фермента в классических условиях его функционирования [44]. Форма Lon-d172, не содержащая первых 172 остатков, также нестабильна в присутствии комплекса АТФ/Mg и подвергается автолизу по связи D245–D246 (центральная часть СС-участка) [43]. Полученный методом ограниченного протеолиза фрагмент Lon-протеазы Lon-d234 (а.о. 235–784) тоже проявляет повышенную автолитическую активность в условиях сопряжения с гидролизом АТФ: 50%-ный автолиз наблюдается уже через 20 мин, при этом расщепление происходит непосредственно после СС-участка, по связи A286–E287 [50].

Таким образом показано, что введение трех мутаций в N-концевой домен Lon-протеазы приводит к заметной дестабилизации фермента и вызывает конформационные изменения, которые обуславливают экспонирование в среду скрытого в нативной структуре региона, включающего N-концевую часть α-спирализованного HI(CC)-домена.

Следует отметить, что эти особенности LonEKR становятся еще более очевидными, когда индукция мутантного гена происходит в условиях, неоптимальных для данного фермента (1 мМ IPTG). Полученная таким путем мутантная форма LonEKR-1 подвергается практически полному автолизу за сутки независимо от присутствия нуклеотидов или нуклеотид-магниевого комплекса в реакционной смеси (рис. 6B).

Для дальнейшей характеристики конформационной стабильности Lon-протеазы и ее мутантной формы LonEKR использовали также метод ограниченного протеолиза химотрипсином. Характер химотрипсинолиза нативной Lon-протеазы является эффектор-зависимым [50]. В отсутствие эффекторов образуются лишь N-концевой фрагмент (1–207), P- и H-домены, тогда как присутствие нуклеотида ведет к стабилизации центрального NB-домена и, как результат, к образованию добавочного фрагмента (235–584), включающего AAA⁺-модуль и, кроме того, часть HI(CC)-домена (235–302) с линкером (303–325) (рис. 8A). Продукты химотрипсинолиза Lon-протеазы схематически представлены на рис. 9. Присутствие нуклеотид-магниевого комплекса стабилизирует область между АТФ-азным модулем и протеазным доменом, что приводит к образованию фрагмента (235–784), упоминаемого выше как Lon-d234 (рис. 8A и 9).

Ограниченный протеолиз формы LonEKR химотрипсином происходит подобным же образом (рис. 8A и B), и можно полагать, что образующиеся при этом фрагменты не отличаются от продуктов химотрипсинолиза интактного фермента. Однако в случае формы LonEKR-1, полученной при 1 мМ IPTG, образование стабильных фрагментов последовательности, вклю-

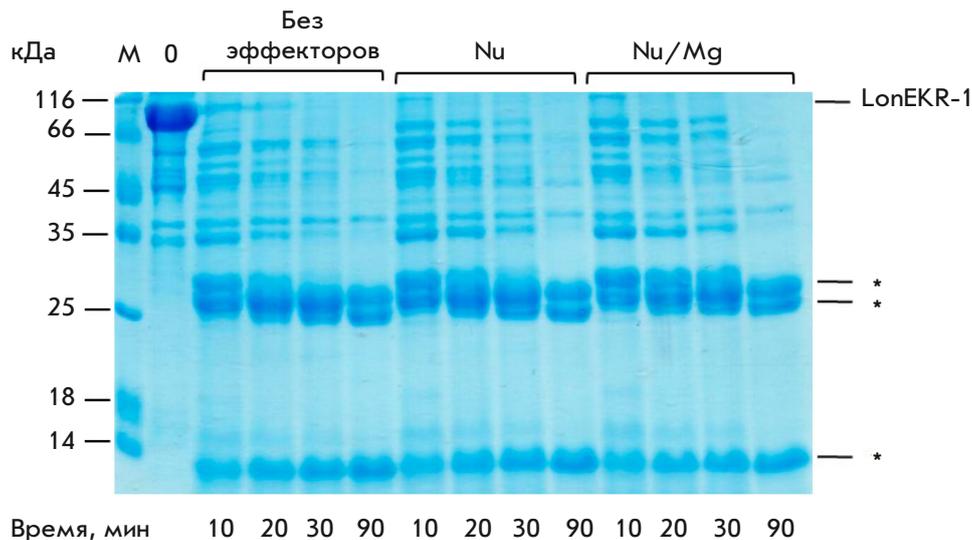
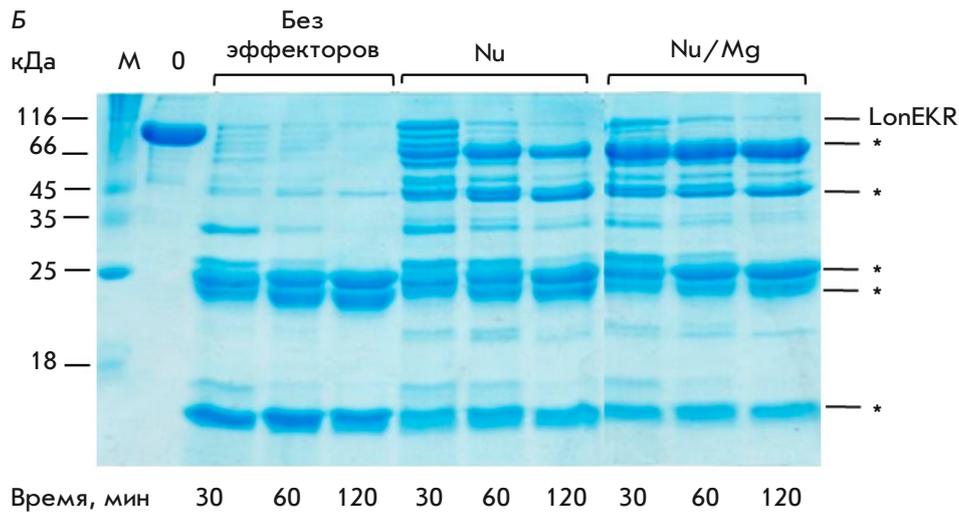
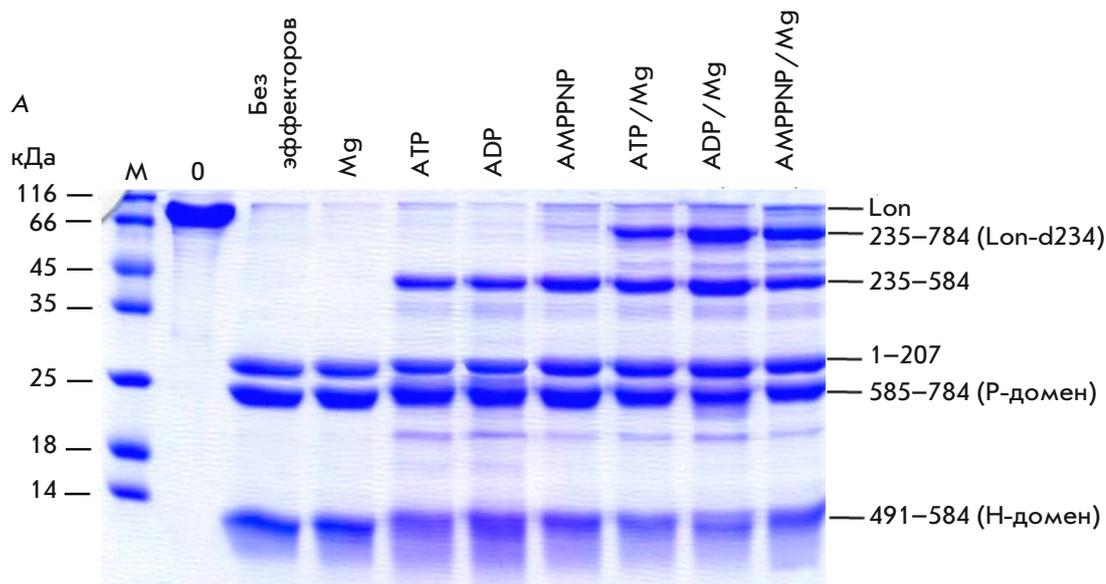


Рис. 8. Химотрипсинолиз нативной *Eclon*-протеазы (А) и мутантных форм LonEKR (Б) и LonEKR-1 (В). М – маркеры; 0 – образец реакционной смеси в начальный момент времени; Nu – нуклеотид (ATP, ADP или AMPPNP). * – Продукты химотрипсинолиза мутантных форм LonEKR и LonEKR-1, N-концы которых не подтверждены секвенированием. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер; pH 8.1; 0.3 М NaCl; 30 °С. Концентрации: *Eclon* (LonEKR или LonEKR-1) – 11 мкМ; нуклеотиды – 5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; химотрипсин – 0.2 мкМ. А – время реакции 2 ч

чающих NB-домен, не зафиксировано ни в присутствии нуклеотидов, ни в присутствии их комплексов с ионами магния (рис. 8B). Результаты химотрипсинализа, свидетельствующие о том, что нуклеотиды и нуклеотид-магниевые комплексы не стабилизируют структуру мутантной формы LonEKR-1, полностью согласуются с данными по автолизу этой формы. Таким образом, индукция гена *lonEKR* (1 mM IPTG) является причиной формирования нестабильной конформации фермента LonEKR-1, что приводит к его быстрому автолитическому расщеплению в условиях эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее мы установили, что N-концевой домен обеспечивает конформационную стабильность *EcLon*-протеазы. В настоящей работе на основании рентгеноструктурных данных было предложено тестировать роль остатков E34, K35 и R38 N-домена в качестве остатков, участвующих в поддержании стабильной функциональной структуры фермента посредством межсубъединичных и/или междоменных взаимодействий. Показано, что замены этих остатков на аланин с образованием тройного мутанта LonEKR не приводят к значительным изменениям в характере функционирования АТФ-азных и пептидгидролазных центров фермента, но вызывают ухудшение связывания белкового субстрата.

Как и нативный фермент, мутантная форма LonEKR образует гексамерные структуры, однако вопрос о возможности формирования мутантных додекамеров остается открытым. При этом форма LonEKR сохраняет главное свойство АТФ-зависимых протеаз – способность к процессивной деградации белка-мишени при сопряжении протеолиза с гидролизом АТФ, несмотря на детектируемое нарушение межцентровых аллостерических взаимодействий. Вместе с тем, в отличие от интактного фермента, форма LonEKR в некоторой степени дестабилизирована введенными заменами, поскольку нуклеотиды и их комплексы с ионами магния, являющиеся стабилизаторами структуры Lon-протеазы, не способны полностью предотвратить автолитическое расщепление мутанта.

Следует особо подчеркнуть, что ключевую роль в формировании стабильной структуры функционально активной Lon-протеазы играют индукция гена и последующий фолдинг белковой молекулы в условиях краудинг-эффекта. Форма LonEKR-1, полученная при относительно высокой концентрации индуктора (1 mM IPTG), совсем не стабилизируется нуклеотидами и проявляет повышенную скорость автолиза по сравнению с интактной Lon и формой LonEKR.

Таким образом, в настоящей работе установлено, что остатки E34, K35 и R38 N-концевого домена *EcLon*-протеазы влияют на формирование кор-

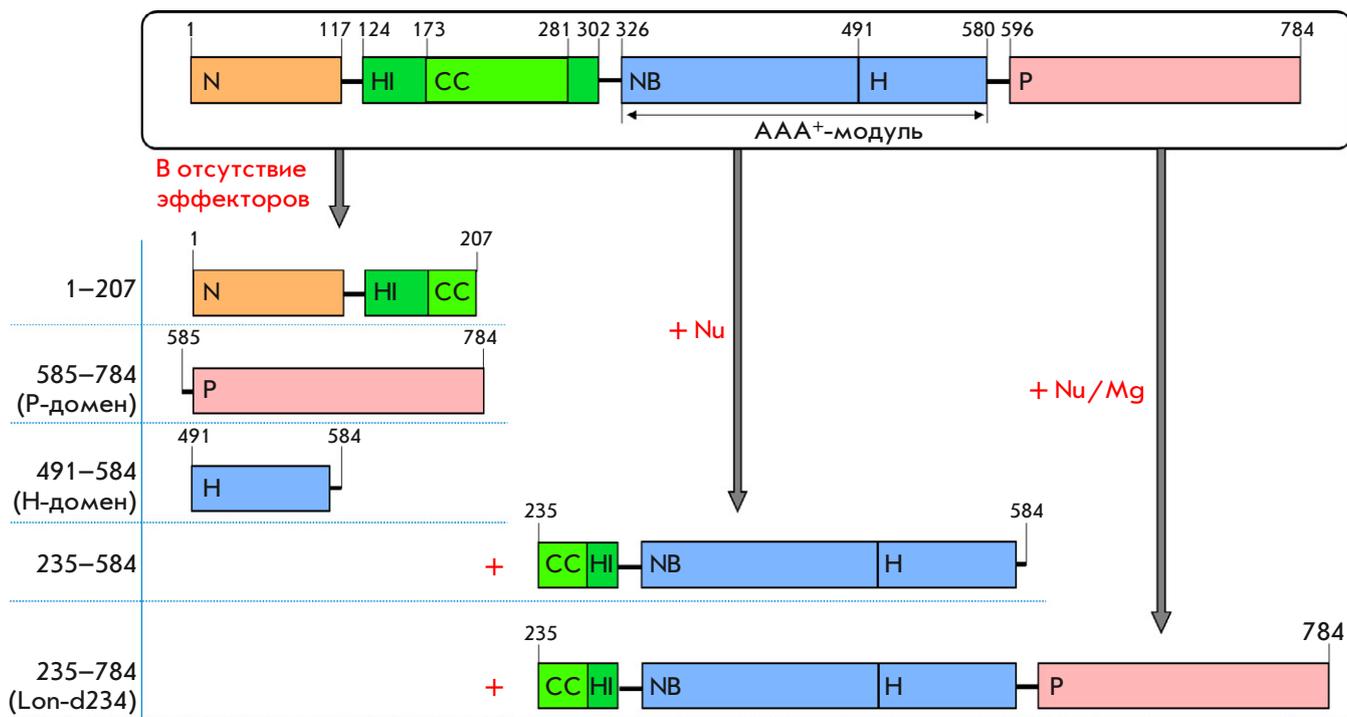


Рис. 9. Схема строения продуктов ограниченного протеолиза Lon-протеазы *E. coli* химотрипсином

ректного сайта связывания белкового субстрата, вовлечены в превращения фермента, вызываемые взаимодействием с нуклеотидами, и участвуют в поддержании конформационной стабильности фермента. Предполагаемое участие изучаемых остатков в образовании додекамерных форм EcLon-протеазы может служить задачей предстоящего структурного исследования мутанта LonEKR. ●

Авторы выражают благодарность Ю.Ф. Леоновой за проведение N-концевого секвенирования фрагментов EcLon-протеазы и мутантной формы LonEKR.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00646).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 815–823.
- Mogk A., Haslberger T., Tessarz P., Bukau B. // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 3. P. 120–125.
- Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 777–788.
- Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. // *Science.* 2016. V. 353 (6294). aac4354.
- Jeng W., Lee S., Sung N., Lee J., Tsai F.T.F. // *F1000Research.* 2015. V. 4. (F1000 Faculty Rev). 1448.
- Finka A., Mattoo R.U.H., Goloubinoff P. // *Annu. Rev. Biochem.* 2016. V. 85. P. 715–742.
- Ротанова Т.В., Цирульников К.Б., Мельников Э.Э. // *Био-орган. химия.* 2003. Т. 29. С. 97–99.
- 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.
- Steinman J.B., Kapoor T.M. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019. V. 50. P. 45–54.
- Miller J.M., Enemark E.J. // *Archaea.* 2016. V. 2016. P. 1–12.
- Puchades C., Sandate C.R., Lander G.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. P. 43–58.
- White S.R., Lauring B. // *Traffic.* 2007. V. 8. P. 1657–1667.
- Bittner L.M., Arends J., Narberhaus F. // *Biopolymers.* 2016. V. 105. P. 505–517.
- Striebel F., Kress W., Weber-Ban E. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2009. V. 19. P. 209–217.
- Gottesman S. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003. V. 19. P. 565–587.
- Anthony J.R., Steven E.G. // *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. P. 873–885.
- Baker T.A., Sauer R.T. // *Trends Biochem. Sci.* 2006. V. 31. P. 647–653.
- Gur E., Sauer R.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 18503–18508.
- Ciechanover A., Stanhill A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 86–96.
- Lopez-Castejon G. // *FEBS J.* 2020. V. 287(1). P. 11–26.
- Sauer R.T., Baker T.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. V. 80. P. 587–612.
- Gur E., Vishkautzan M., Sauer R.T. // *Protein Sci.* 2012. V. 21. P. 268–278.
- Francis T.T., Christopher P.H. // *eLife.* 2020. V. 9. P. 1–3.
- Rotanova T.V., Botos I., Melnikov E.E., Rasuloва F., Gustchina A., Maurizi M.R., Wlodawer A. // *Protein. Sci.* 2006. V. 15. P. 1815–1828.
- Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J.E., Khalatova A.G., Rasuloва F., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 8140–8148.
- Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Kozlov S., Makhovskaya O.V., Tropea J.E., Gustchina A., Rotanova T.V., Wlodawer A. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 351. P. 144–157.
- Liao J.H., Kuo C.I., Huang Y.Y., Lin Y.C., Lin Y.C., Yang C.Y., Wu W.L., Chang W.H., Liaw Y.C., Lin L.H., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7(7). P. 1–13.
- Liao J.H., Ihara K., Kuo C.I., Huang K.F., Wakatsuki S., Wu S.H., Chang C.I. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. P. 1395–1402.
- Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // *Биомед. химия.* 2010. Т. 56. С. 412–419.
- Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. // *Биоорган. химия.* 2013. Т. 39. С. 309–319.
- Li M., Gustchina A., Rasuloва F., Melnikov E.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Dauter Z., Wlodawer A. // *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 865–873.
- Bertonati C., Punta M., Fischer M., Yachdav G., Forouhar F., Zhou W., Kuzin A.P., Seetharaman J., Abashidze M., Ramelot T.A., et al // *Proteins.* 2009. V. 75. P. 760–773.
- Rotanova T.V., Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Li M., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *FEBS OpenBio.* 2019. V. 9. P. 1536–1551.
- Wohlever M.L., Baker T.A., Sauer R.T. // *Mol. Microbiol.* 2014. V. 91. P. 66–78.
- Rudiyak S.G., Shrader T.E. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 1810–1817.
- Adam C., Picard M., Déquard-Chablat M., Sellem C.H., Hermann-Le Denmat S., Contamine V. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. 1–10.
- Ebel W., Skinner M.M., Dierksen K.P., Scott J.M., Trempe J.E. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 2236–2243.
- Botos I., Lountos G.T., Wu W., Cherry S., Ghirlando R., Kudzhaev A.M., Rotanova T.V., de Val N., Tropea J., Gustchina A., Wlodawer A. // *Curr. Res. Struct. Biol.* 2019. V. 1. P. 13–20.
- Vieux E.F., Wohlever M.L., Chen J.Z., Sauer R.T., Baker T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 2002–2008.
- Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2014. Т. 40. С. 673–681.
- Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2018. Т. 44. С. 522–532.
- Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Ротанова Т.В. // *Acta Naturae.* 2017. Т. 9. № 2. С. 79–86.
- Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2017. Т. 43. С. 357–366.
- Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2016. Т. 42. С. 421–430.
- Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2015. Т. 41. С. 579–586.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
- Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
- Bencini D.A., Wild J.R., O'Donovan G.A. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 132. P. 254–258.
- Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 99. P. 53–64.
- Melnikov E.E., Andrianova A.G., Morozkin A.D., Stepnov A.A., Makhovskaya O.V., Botos I., Gustchina A., Wlodawer A., Rotanova T.V. // *Acta Biochim. Pol.* 2008. V. 55. P. 281–296.