

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

**КУДЖАЕВ АРСЕН МИЗАМУДИНОВИЧ**

**УЧАСТИЕ УНИКАЛЬНОГО ИНСЕРЦИОННОГО ДОМЕНА  
АТР-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕАЗЫ ИЗ *Escherichia coli*  
В ФОРМИРОВАНИИ АКТИВНОЙ СТРУКТУРЫ И  
ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТА**

02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории химии протеолитических ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН)

**Научный руководитель:** **Ротанова Татьяна Васильевна**,  
доктор химических наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН

**Официальные оппоненты:** **Демидкина Татьяна Викторовна**,  
доктор химических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории химических основ  
биокатализа Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки «Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук» (ИМБ РАН)

**Демидюк Илья Валерьевич**,  
доктор химических наук, доцент, профессор РАН,  
заместитель директора по научной работе, заведующий  
лабораторией функциональной энзимологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
Институт молекулярной генетики Национального  
исследовательского центра «Курчатовский институт»  
(НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
им. В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Защита состоится 28 октября 2020 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан 17 сентября 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы исследования.** Поддержание сохранности клеточного протеома во всех природных царствах обеспечивается функционированием системы контроля качества белков (СКК). СКК образована молекулярными шаперонами и АТР-зависимыми протеазами. Шапероны принимают участие в ремоделировании и дезагрегации клеточных белков, в формировании белковых ансамблей. Протеазы контролируют уровень регуляторных белков путем их селективного гидролиза и освобождают клетки от потенциально опасных аномальных, дефектных и избыточных белков посредством их исчерпывающей деградации.

Протеазы СКК – это бифункциональные ферменты, протеолитическая активность которых сопряжена с одновременным гидролизом АТР и характеризуется процессивным механизмом деградации белков-мишеней (образование коротких пептидов без высвобождения промежуточных высокомолекулярных продуктов). Протеолитические компоненты протеаз СКК относятся к пептидазам разных классов, а АТР-азные являются членами единого суперсемейства AAA<sup>+</sup>-белков (АТР-азы, ассоциированные с различными клеточными активностями). К этому же суперсемейству принадлежат не обладающие протеолитической активностью молекулярные шапероны-«анфолдазы» СКК, объединяющие семейства ClpA, ClpX и ClpB (в бактериях) и Hsp104 (в эукариотах).

LonA-протеазы, составляющие самое крупное из трех известных подсемейств Lon-протеаз (A, B и C), играют ключевую роль в функционировании СКК в бактериях и эукариотах. Эти ферменты участвуют в таких важнейших биологических процессах как окислительный стресс, проявление вирулентности и канцерогенез, отвечая за снижение уровня поврежденных белков, накопление которых сопутствует многим заболеваниям, в том числе неопластическим патологиям и процессу старения организма. Биологическая роль LonA-протеаз определяет важность их структурно-функционального исследования.

**Степень разработанности темы исследования.** LonA-протеаза из *Escherichia coli* (EcLon) явилась первой обнаруженной АТР-зависимой пептидгидролазой и до настоящего времени остается основной моделью при изучении ферментов семейства Lon. При исследовании EcLon было установлено, что протеолитическим компонентом LonA-протеаз является серин–лизиновая пептидаза, а АТР-азный компонент представлен специфическим AAA<sup>+</sup>-модулем, который сформирован нуклеотид-связывающим и α-спирализованным доменами, а также нехарактерной для других AAA<sup>+</sup>-белков СКК пролонгированной N-концевой областью, содержащей участок с coiled-coil(CC)-конформацией. В лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН ранее была выдвинута гипотеза о том, что N-концевая область LonA-протеаз состоит из двух доменов – N-концевого и инсерционного (N- и HI(CC)-домены), причем, последний подобен α-спирализованному домену первого из двух АТР-азных модулей (D1 и D2) шаперона-дезагрегазы ClpB.

К настоящему времени накоплен значительный объем сведений о роли AAA<sup>+</sup>-модуля и протеолитического домена в функционировании LonA-протеаз. Однако вопросы участия некаталитической N-концевой области и, в особенности ее инсерционного домена, в структурной организации ферментов, в реализации ими уникальных энзиматических свойств, а также в характерном исключительно для

LonA-протеаз взаимодействия с нуклеиновыми кислотами все еще остаются нерешенными.

**Цели** настоящей работы заключались в проверке справедливости гипотезы о двухдоменной организации N-концевой области LonA-протеаз и в исследовании неохарактеризованной до настоящего времени роли уникального инсерционного HI(CC)-домена в формировании активной структуры и функционировании ферментов на примере *EcLon*-протеазы. Для достижения поставленных целей были сформулированы следующие **задачи**:

1. Получение структурных характеристик фрагмента, включающего инсерционный и нуклеотидсвязывающий домены *EcLon*-протеазы, и проведение сравнительного структурного анализа LonA-протеаз и ClpB-шаперонов в области их предполагаемого подобия.
2. Осуществление дизайна и получение очищенных препаратов ряда модифицированных в N-концевой области форм *EcLon*-протеазы.
3. Сравнительное исследование энзиматических свойств и олигомерного состояния модифицированных форм *EcLon*-протеазы и интактного фермента.
4. Изучение способности модифицированных форм *EcLon*-протеазы к связыванию ДНК.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование роли некаталитической N-концевой области и ее инсерционного HI(CC)-домена в формировании активной структуры и функционировании АТФ-зависимой LonA-протеазы из *E. coli*. Установлена трехмерная структура фрагмента *EcLon*(235-584), состоящего из C-концевой части HI(CC)-домена и AAA<sup>+</sup>-модуля фермента и формирующего открытый спиральный гексамер. Методом крио-ЭМ показано, что полноразмерный мутант *EcLon*-S679A также представлен открытыми спиральными гексамерными кольцами. Показана важность HI(CC)-домена для олигомеризации фермента. Обнаружено, что HI(CC)-домен играет ключевую роль в реализации *EcLon*-протеазой процессивного механизма гидролиза белкового субстрата, а N-домен обеспечивает конформационную стабильность фермента. Выявлено влияние N- и HI(CC)-доменов на функционирование АТФ-азного и пептидазного центров *EcLon*. Показано, что N-концевая область не существенна для связывания нуклеиновой кислоты *EcLon*-протеазой. Полученные данные подтверждают уникальную доменную организацию Lon-протеаз подсемейства А и позволяют рассматривать эти ферменты как особый подкласс AAA<sup>+</sup>-белков.

Использованные в работе методы и подходы могут быть применены при изучении ферментов других подсемейств семейства Lon, в частности, недавно выявленных гибридных LonVA-протеаз – потенциальных новых участников системы контроля качества клеточных белков. Углубленное изучение архитектуры Lon-протеаз и механизмов их функционирования может служить важным вкладом как в разработку новых подходов к выявлению патологических нарушений, вызванных накоплением в организме поврежденных белков, так и, возможно, к дизайну перспективных соединений для терапии этих нарушений.

### **Положения, выносимые на защиту:**

- структурная характеристика фрагмента EcLon(235-584), включающего С-концевую часть инсерционного HI(CC)-домена и AAA<sup>+</sup>-модуль фермента;
- формирование EcLon-протеазой и фрагментом EcLon(235-584) открытых спиральных гексамеров;
- ключевая роль HI(CC)-домена N-концевой области в реализации процессивного механизма протеолиза, осуществляемого EcLon-протеазой;
- участие HI(CC)-домена в олигомеризации, во взаимодействии с нуклеотидами и белковыми субстратами, во взаимодействиях между каталитическими центрами;
- исключительная роль N-домена в обеспечении конформационной стабильности EcLon-протеазы в условиях процессивного гидролиза белкового субстрата;
- отсутствие в N-концевой области EcLon-протеазы сайтов специфического связывания нуклеиновой кислоты;
- подтверждение справедливости гипотезы о LonA-протеазах как об особом подклассе AAA<sup>+</sup>-белков.

**Связь с государственными программами.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ 14-50-00131) и РФФИ (№№ 15-04-04627, 11-04-01015).

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 160 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, основных выводов и списка цитируемой литературы, включающего 181 ссылку. Диссертация содержит 21 таблицу и 81 рисунок.

**Личный вклад автора** состоит в сборе и анализе литературных данных, в планировании и проведении научных экспериментов, в обработке и интерпретации полученных результатов и в подготовке материалов для публикаций.

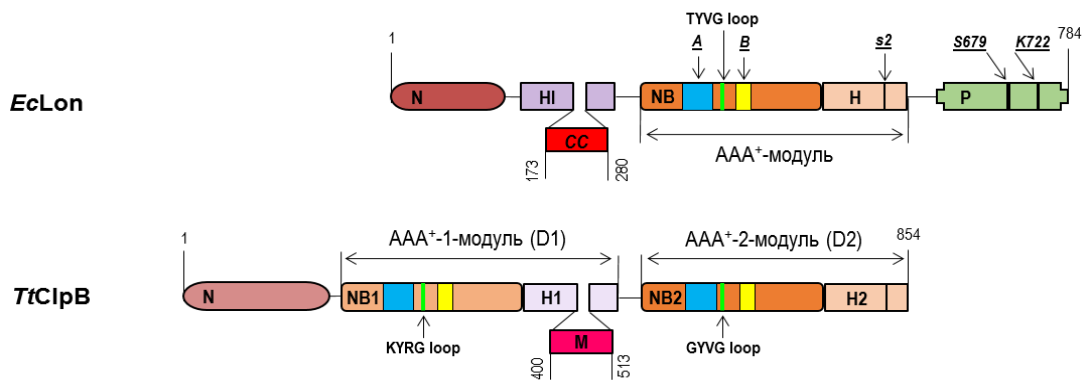
**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на следующих конференциях и симпозиумах: 42-й и 44-й Конгрессы FEBS (Иерусалим, 2017; Краков, 2019); XI конференция Международного протеолитического общества (Марианске-Лазне, 2019); V Съезд биохимиков России (Дагомыс, 2016); VI–VIII Российские симпозиумы «Белки и пептиды» (Уфа, 2013, Новосибирск, 2015, Москва, 2017); Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014); VII Всероссийская конференция «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014); XXVI–XXIX и XXXI Зимние международные молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2014–2017, 2019); Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2015–2017).

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, и 17 тезисов конференций.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Структурный анализ N-концевой области *EcLon*-протеазы

Субъединицы LonA-протеаз (в том числе *EcLon*) включают пять доменов (рис. 1): протеолитическим является С-концевой домен, центральные нуклеотидсвязывающий и  $\alpha$ -спирализованный домены формируют АТФ-азный AAA<sup>+</sup>-модуль, уникальная для AAA<sup>+</sup>-белков СКК некаталитическая N-концевая область ферментов образована N-концевым (N) и инсерционным (HI(CC)) доменами, причем, последний содержит coiled-coil(CC)-участок.

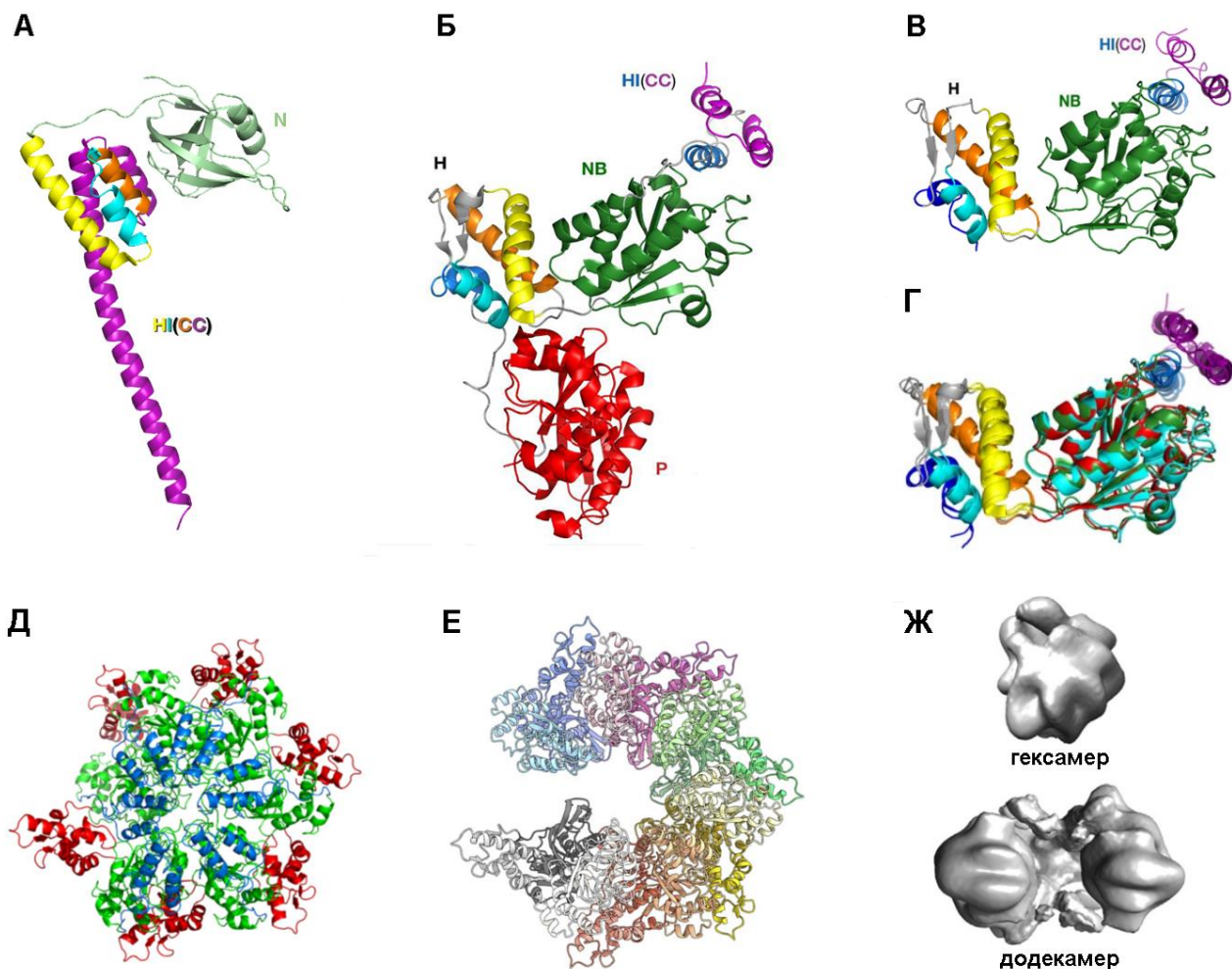


**Рисунок 1. Доменная организация Lon-протеазы *E. coli* (*EcLon*) и ClpB-шаперона *Thermus thermophilus* (*TtClpB*).** Обозначения структурных фрагментов: N – N-концевые домены; NB, NB1 и NB2 – нуклеотидсвязывающие домены; HI, H, H1 и H2 –  $\alpha$ -спирализованные домены; CC – coiled-coil-участок; M – вставочный домен с CC-конформацией; P – протеолитический домен. *A* и *B* – консенсусные мотивы Уолкера, TYVG, KYRG и GYVG – петли "pore-1"; *s*<sub>2</sub> – сенсорный остаток; Ser679 и Lys722 – каталитические остатки.

Ранее на основании сопоставления первичных и вторичных структур HI(CC)-доменов LonA-протеаз и H1-доменов AAA<sup>+</sup>-1-модулей (D1) шаперонов ClpB, включающих вставочный M-домен с coiled-coil структурой, была выдвинута гипотеза, согласно которой инсерционный HI(CC)-домен LonA-протеаз можно рассматривать как компонент потенциального добавочного AAA<sup>+</sup>-модуля, локализованного аналогично D1-модулю шаперонов, но утратившего свой нуклеотидсвязывающий домен (рис. 1).

Пространственное строение полноразмерных LonA-протеаз до сих пор не известно, но для некоторых ферментов решены третичные структуры их N-, NB-, H- и P-доменов. Упаковка изолированного HI(CC)-домена, образованного восемью  $\alpha$ -спиралями, пока не определена. При этом известны кристаллические структуры фрагментов LonA-протеаз, которые включают пять N-концевых спиралей HI(CC)-домена (*EcLon*(1-245), рис. 2А) или три его С-концевые спирали (топологически подобные *BsLon*(240-774) и *MtLon*(242-793) из *Bacillus subtilis* и *Meiothermus taiwanensis*, рис. 2Б).

В настоящей работе впервые определена кристаллическая структура фрагмента *EcLon*(235-584), который состоит из AAA<sup>+</sup>-модуля фермента и трех предшествующих ему спиралей HI(CC)-домена (рис. 2В). Тем самым *EcLon* стала структурной моделью для общего пула LonA-протеаз, поскольку только для нее решены 3D-структуры фрагментов, в совокупности покрывающих полную последовательность фермента.



**Рисунок 2.** Кристаллические структуры фрагментов протеаз: *Eclon*(1–245) (А), *BsLon*(240–774) (Б), *Eclon*(235–584) (PDB: 6N2I) (В); совмещение структур *Eclon*(235–584), *BsLon*(240–582) и *MtLon*(244–584) (Г); гексамер *Eclon*(235–584) (Д); гексамер *Eclon*-S679A (крио-ЭМ, PDB: 6U5Z) (Е); гексамер и додекамер *Eclon*-S679A (ЭМ) (Ж). (А) N-домен ( $M^1-Y^{116}$ ) показан оливковым цветом, спирали HI(CC)-домена показаны желтым ( $\alpha 3$ ), голубым ( $\alpha 4$ ), оранжевым ( $\alpha 5$ ) и фиолетовым ( $\alpha 6$  и  $\alpha 7$ , СС-участок) цветами. (Б) Спирали HI(CC)-домена показаны фиолетовым ( $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ , СС-участок) и темно-синим ( $\alpha 10$ ) цветами; NB-домен – зеленый; спирали H-домена окрашены так же, как спирали  $\alpha(3-5)$  и  $\alpha 10$  HI(CC)-домена; P-домен – красный. (В) Спирали окрашены как на рис. 2Б; NB-домен – зеленый. (Г) Спирали окрашены как на рис. 2Б и В; NB-домены: красный – *Eclon*, зеленый – *BsLon*, голубой – *MtLon*. (Д) N-концевые спирали ( $\alpha 8-\alpha 10$ ) показаны синим цветом, NB-домены – светло-зеленые, H-домены – красные. (Е) Шесть протомеров *Eclon*-S679A окрашены в разные цвета. (Ж) Гексамер и додекамер *Eclon*-S679A.

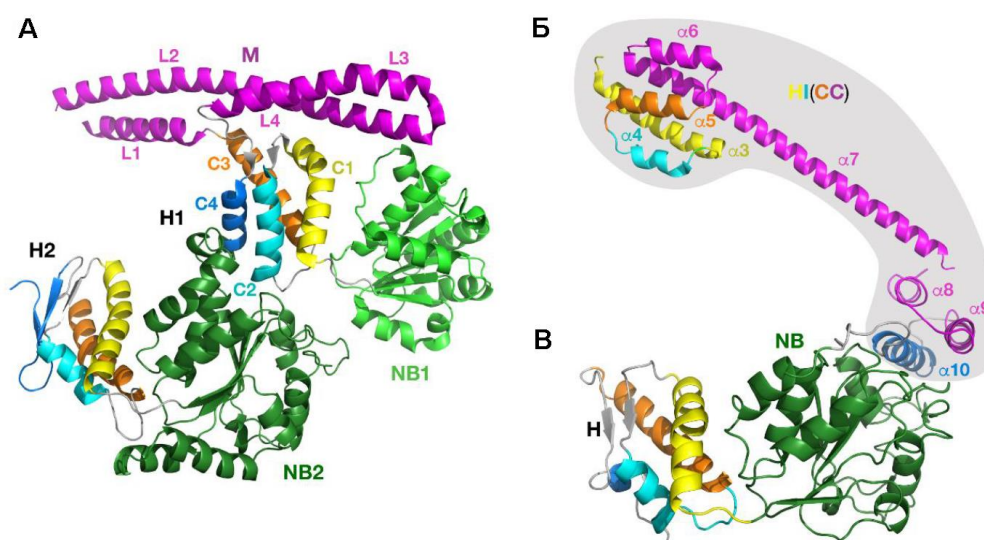
Фрагмент *Eclon*(235-584) обнаруживает высокое структурное подобие с соответствующими фрагментами *BsLon* и *MtLon* (рис. 2Г), а шесть его протомеров формируют открытое спиральное кольцо (рис. 2Д). Можно было ожидать, что адекватное совмещение фрагментов *Eclon*(1-245) и *Eclon*(235-584) создаст представление о структуре целого HI(CC)-домена в бактериальных ферментах. Однако такое моделирование оказалось невыполнимым вследствие чрезвычайной гибкости региона, включающего HI(CC)-домен.

Изучение структуры *Eclon* методом криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) показало, что полноразмерный фермент также образует открытые спиральные гексамерные кольца (рис. 2Е). Однако, поскольку гибкий N-концевой фрагмент (1-244) *Eclon* оказался не видимым на картах электронной плотности, структура HI(CC)-домена не была определена и в этом случае. Таким образом, вопрос об упаковке инсерционного HI(CC)-домена остается открытым. В то же время, из



данных ЭМ с негативным контрастированием следует, что в популяции *EcLon* содержатся также асимметричные V-образные додекамеры, которые формируются за счет взаимодействия N-концевых областей гексамеров (рис. 2Ж).

Для подтверждения справедливости гипотезы о LonA-протеазах как об особом подклассе AAA<sup>+</sup>-белков было проведено структурное сопоставление  $\alpha$ -спирализованной составляющей D1-модуля *TiClpV* (фрагмент H1(M) на рис. 1 и 3А) и фрагментов *EcLon*, потенциально формирующих HI(CC)-домен (объединены серым фоном на рис. 3Б и В). Ключевым элементом пропеллерообразного М-домена, внедренного в H1-домен *TiClpV*, является «длинная» спираль L2, образованная 58 а.о. (рис. 3А). Сходная спираль  $\alpha 7$  (55 а.о.) служит отличительной чертой фрагмента *EcLon*(1-245) (рис. 3Б). Высокая степень подобия длинных спиралей (около 50 %), совпадение общего количества спиралей ( $\alpha 3$ - $\alpha 10$  в *EcLon* и C(1-3)-L(1-4)-C4 в *TiClpV*), а также сходство их топологического расположения следует рассматривать как указание на возможное подобие архитектуры этих фрагментов протеаз и шаперонов. Вместе с тем, из-за уменьшенных размеров спиралей  $\alpha 5$  и  $\alpha 6$  по сравнению со спиральями C3 и L1 можно ожидать различия упаковок сопоставляемых доменов и, как следствие, предполагать их различную роль в функционировании Lon-протеаз и ClpV-шаперонов.



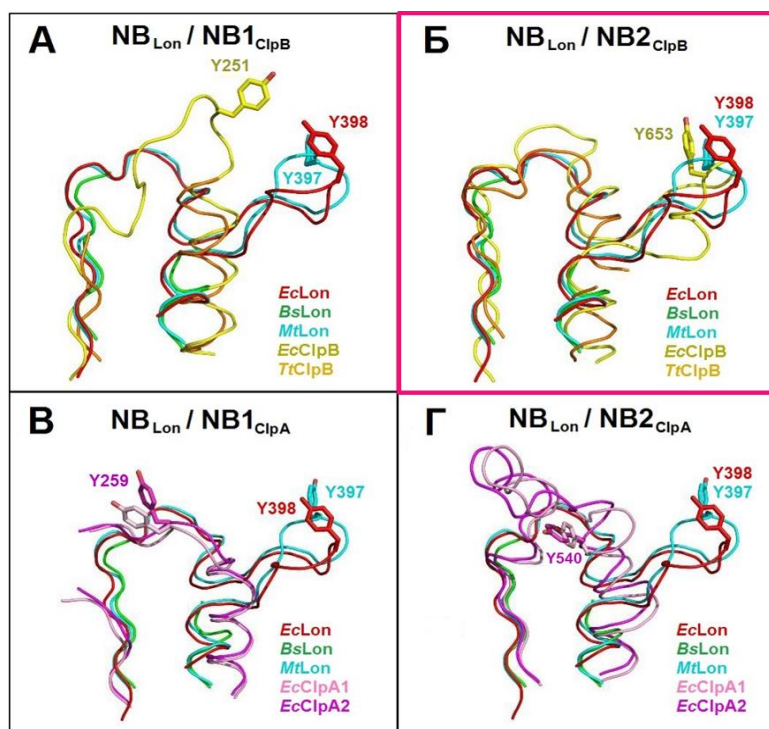
**Рисунок 3.** Кристаллические структуры укороченной формы ( $Y^{150}-A^{854}$ ) шаперона *TiClpV* (А) и фрагментов *EcLon*-протеазы ( $E^{124}-D^{245}$ ) (Б) и ( $A^{247}-F^{584}$ ) (В). Нуклеотидсвязывающие домены показаны светло-зеленым (NB1) и темно-зеленым (NB2 и NB) цветами.  $\alpha$ -Спирали в доменах H1, H2 (*TiClpV*), HI(CC) и H (*EcLon*) окрашены как на рис. 2. Серым фоном объединены фрагменты *EcLon*, потенциально составляющие HI(CC)-домен.

Дополнительные данные в поддержку сходства HI(CC)-домена и H1(M)-фрагмента были получены при сопоставлении кристаллических структур NB-доменов LonA-протеаз и NB1- и NB2-доменов ClpV, а также топологически подобных им шаперонов ClpA, у которых отсутствует вставочный М-домен.

Известно, что связывание, разворачивание и перемещение белков-мишеней в аксиальных каналах гексамерных AAA<sup>+</sup>-белков осуществляется с помощью локализованных в их NB-доменах консервативных петель трех типов: pore-1 (или «GYVG» с консервативным остатком тирозина, рис. 1), «RKH» и pore-2 (при этом наличие двух последних петель не является обязательным).



При наложении соответствующих структурных фрагментов шаперонов и протеаз обнаружилось как сходство, так и отличия в расположении петель GYVG, RKN и pore-2. Прежде всего было выявлено кардинальное несовпадение ориентации ключевых петель GYVG между шаперонами ClpB и ClpA, как в их NB1-, так и NB2-доменах (рис. 4А-Г). При этом ориентация петли GYVG LonA-протеаз однозначно и безусловно совпадает только с ее расположением в NB2-доменах ClpB (рис. 4Б). Выявленное соответствие позволяет полагать, что и предстоящие NB-доменам  $\alpha$ -спирализованные домены HI(CC) (у LonA-протеаз) и H1 с внедренным M-доменом (у ClpB-шаперонов) также могут проявлять топологическое сходство.



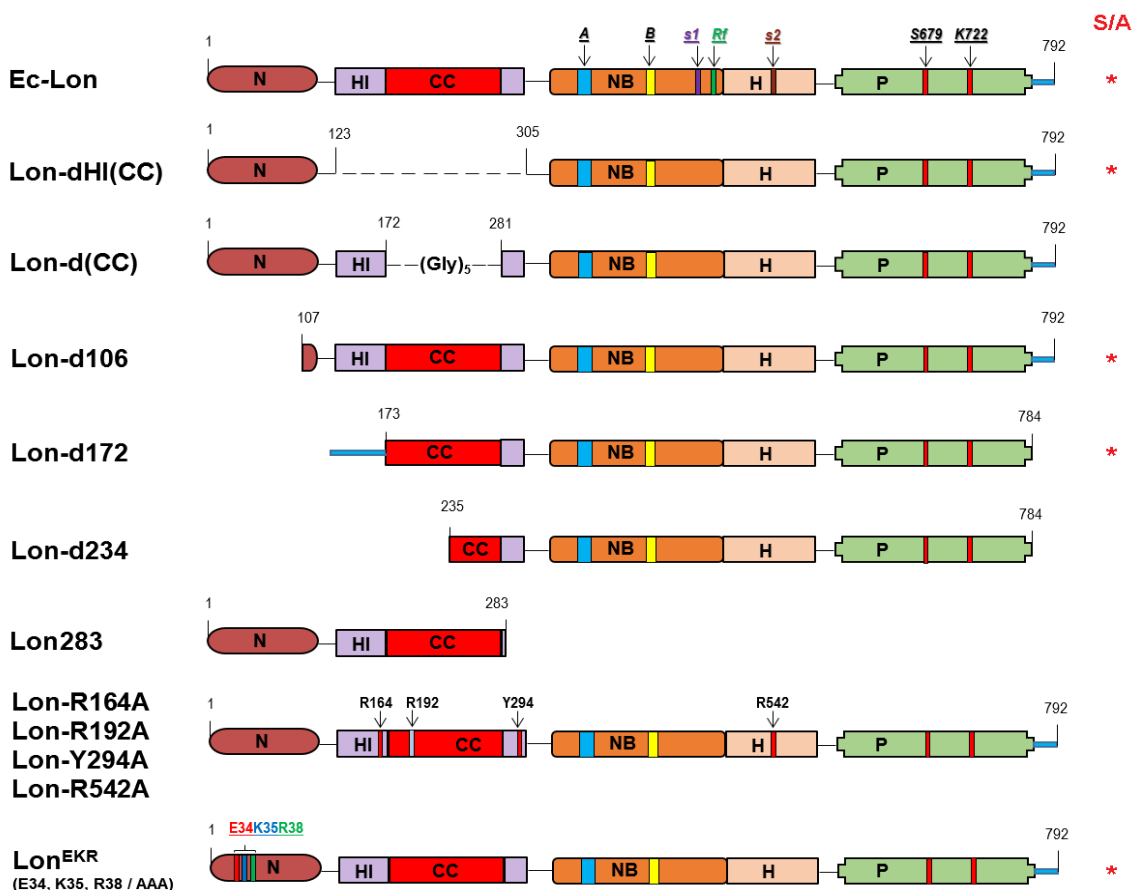
**Рисунок 4.** Сопоставление фрагментов, содержащих аксиальную петлю GYVG (pore-1), в кристаллических структурах NB-доменов LonA-протеаз и NB(1-2)-доменов шаперонов ClpA и ClpB. Цвета фрагментов последовательностей: EcLon – красный, BsLon – ярко-зеленый, MtLon – голубой, EcClpB – желтый, TrClpB – оранжевый, EcClpA-1 – розовый и EcClpA-2 – пурпурный. Показана ориентация остатков Tyr в соответствующих GYVG-петлях.

Установлено, что менее значимые петли pore-2 присутствуют только в NB1-доменах шаперонов ClpA и ClpB, а RKN – в их NB2-доменах, в то время как LonA-протеазы содержат оба вида петель. Суперпозицией соответствующих фрагментов структур выявлено высокое сходство размеров и ориентации одноименных петель в протеазах и шаперонах.

Суммируя данные структурного анализа, можно констатировать, что получены достаточно веские аргументы в пользу справедливости гипотезы о том, что LonA-протеазы наряду с классическим AAA<sup>+</sup>-модулем содержат также  $\alpha$ -спирализованный домен другого, гипотетического AAA<sup>+</sup>-модуля, проявляющего сходство с соответствующим фрагментом D1-модуля шаперонов ClpB. Таким образом, LonA-протеазы действительно могут представлять собой особый, ранее неохарактеризованный подкласс AAA<sup>+</sup>-белков.

## 2. Дизайн модифицированных форм *EcLon*-протеазы, использованных для изучения роли инсерционного HI(CC)-домена фермента

С целью исследования роли инсерционного HI(CC)-домена в функционировании *EcLon*-протеазы в настоящей работе была получена рекомбинантная форма фермента с гексагистидиновым тэгом на С-конце белка (далее – *EcLon*), и на ее основе осуществлен дизайн ряда экспрессионных конструкций, кодирующих белки, модифицированные в N-концевой области (рис. 5).



**Рисунок 5. Модифицированные и мутантные формы, использованные для изучения N-концевой области *EcLon*-протеазы.** *Консервативные элементы:* A и B – мотивы Уолкера, s1 и s2 – сенсорные остатки, Rf – остаток «аргининовый палец», Ser679 и Lys722 – каталитические остатки.

Получены следующие модификации *EcLon*: делеционные формы Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC), лишённые, соответственно, HI(CC)-домена (остатки E<sup>124</sup>–N<sup>304</sup>) и его coiled-coil участка (M<sup>173</sup>–M<sup>280</sup>); укороченные формы Lon-d106 (делеция консервативной части N-домена, M<sup>1</sup>–N<sup>106</sup>) и Lon-d172 (делеция N-концевой области вплоть до начала CC-участка); три мутанта с заменами потенциально важных остатков, локализованных в разных участках HI(CC)-домена (Lon-R164A, Lon-R192A и Lon-Y294A); мутант по остатку s2 H-домена (Lon-R542A) и тройной мутант по N-домену (Lon<sup>EKR</sup>, замены: E34A, K35A и R38A) с потенциально ослабленными межсубъединичными/междоменными взаимодействиями (рис. 5). Надо отметить, что в форму Lon-d(CC) вместо удаленного фрагмента введен пентаглициновый пептид, а в форме Lon-d172 гексагистидиновый тэг локализован на N-конце в дополнительном 20-членном пептиде строения MGSSHHHHHSSGLVPRGSH. Для

сравнения были использованы также ранее полученные формы *EcLon*: Lon-d234 – продукт химотрипсинализа нативного фермента и Lon283 – фрагмент (M<sup>1</sup>-P<sup>283</sup>), модель N-концевой области фермента (рис. 5).

В целях предотвращения вероятного автолиза интактная *EcLon* и формы Lon-dHI(CC), Lon-d106, Lon-d172 и Lon<sup>EKR</sup> получены также в протеолитически неактивных вариантах путем замены каталитически активного остатка серина-679 на аланин (отмечены звездочками на рис. 5).

### 3. Выделение *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм

После экспрессии соответствующих плазмидных конструкций в бактериальной системе *E. coli* с использованием штамма BL21(DE3) проводили наработку *EcLon*-протеазы и её модифицированных форм в препаративных количествах согласно схеме, представленной на рис. 6. Стадию хроматографии на Q-сефарозе вводили в случае необходимости. При получении формы Lon283 аффинную стадию опускали и использовали очистку белка на Q-сефарозе, гепарин-сефарозе и Сефакриле S-300.

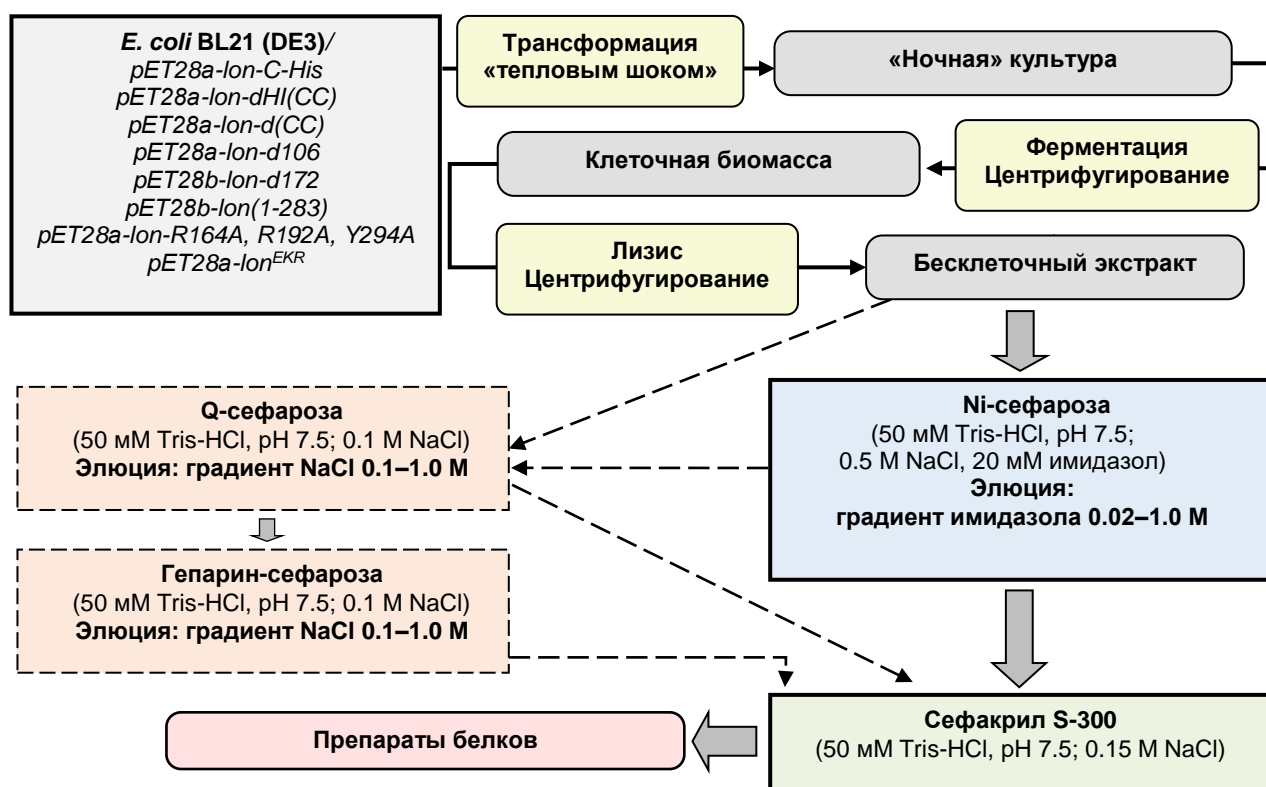


Рисунок 6. Схема выделения *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм.

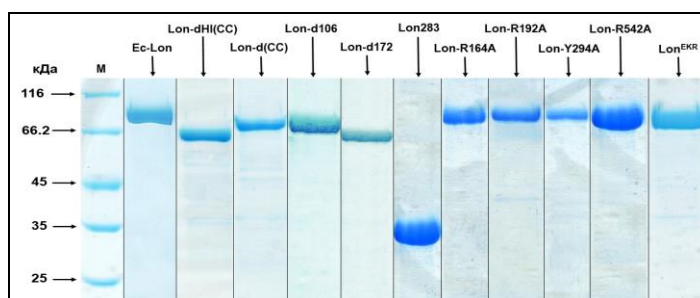


Рисунок 7. Препараты *EcLon*-протеазы и ее модифицированных и мутантных форм (электрофорез в 10 % ПААГ в присутствии SDS). М – маркеры.

По данным гель-электрофореза степень чистоты полученных препаратов Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм достигала 95 % (рис. 7).

#### **4. Олигомерное состояние Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм**

Как отмечено выше, в популяции полноразмерной Lon-протеазы по данным электронной микроскопии идентифицируются, в основном, гексамерные и додекамерные формы. В то же время при использовании методов гель-фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования обнаружено, что подобно многим AAA<sup>+</sup>-белкам, интактная Ec-Lon представлена в растворе смесями, которые включают разные олигомерные формы фермента (от димеров до гекса- и додекамеров), а также ассоциаты. Состав таких смесей зависит от наличия/отсутствия нуклеотидных эффекторов.

Делеционные формы Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC), а также укороченные формы Lon-d172 и Lon-d234, утратившие N-концевой и частично вставочный домены, проявляют пониженные степени олигомеризации (от моно- до тетрамеров) и большую склонность к ассоциации. Для формы Lon-d106, лишенной только N-домена, характерно превалирующее формирование гексамеров наряду с тримерами и октамерами. Форма Lon283 образует димеры.

Мутантные формы Ec-Lon-протеазы с заменами в HI(CC)-домене (Lon-R164A, Lon-R192A и Lon-Y294A) в отсутствие нуклеотидов преимущественно образуют высокомолекулярные ассоциаты. Вместе с тем при наличии ADP или комплекса ADP-Mg олигомерное состояние мутантов различается: Lon-R164A кроме мономеров образует ди- и тримеры, в препаратах Lon-R192A наряду с тетрамерами представлены димеры, октамеры и ассоциаты, а образцы Lon-Y294A содержат мономерную, тетрамерную и декамерную формы вместе с ассоциатами.

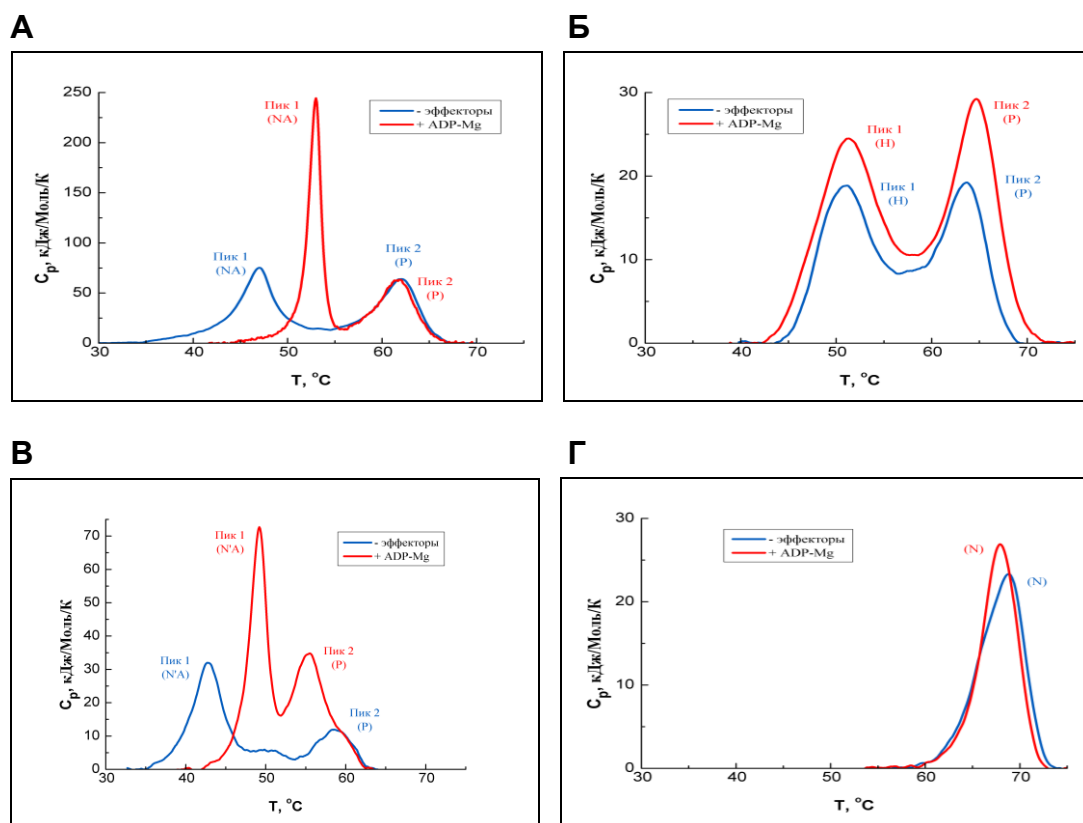
Таким образом, точечные мутации в HI(CC)-домене вызывают изменения в олигомерном состоянии Ec-Lon-протеазы. Эти результаты в совокупности с данными по понижению олигомерности в делеционных и укороченных формах фермента позволяют сделать заключение о значимости инсерционного домена для мультимеризации фермента, необходимой для полноценного проявления Ec-Lon-протеазой функциональной активности.

Тройной мутант по N-домени Lon<sup>EKR</sup>, в отличие от интактной Ec-Lon, представлен, в основном, гексамерами, из чего следует, что мутированные остатки Glu<sup>34</sup>, Lys<sup>35</sup> и Arg<sup>38</sup> могут быть вовлечены в межсубъединичные взаимодействия, приводящие к формированию додекамерных форм фермента.

#### **5. Микрокалориметрическое исследование Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм**

При анализе структурной организации Ec-Lon-протеазы методом тепловой денатурации были использованы следующие формы фермента: Lon-S679A, Lon-d106-S679A, Lon283 (рис. 1), а также ранее полученный фрагмент Lon-HP (a.o. S<sup>491</sup>–K<sup>784</sup>), включающий  $\alpha$ -спирализованный и протеолитический домены. Установлено, что в отсутствие нуклеотидных эффекторов плавление полноразмерного фермента происходит в два этапа (рис. 8А, синяя кривая), то есть пять доменов Ec-Lon-протеазы формируют в пределах субъединицы две глобулы. Можно полагать, что в

образовании первой из них участвует AAA<sup>+</sup>-модуль фермента, поскольку его взаимодействие с комплексом ADP-Mg приводит к изменению формы пика 1 со сдвигом температуры денатурации (рис. 8А, красная кривая), и это указывает на более компактный и устойчивый тип новой структуры. Второй пик отражает денатурацию Р-домена, что подтверждается общей температурой плавления пиков-2 для Lon-S679A и Lon-HP (рис. 8А, Б). При этом оба домена Lon-HP плавятся автономно и независимо от присутствия нуклеотидного эффектора.



**Рисунок 8. Зависимость парциальной теплоемкости от температуры для полноразмерного фермента Lon-S679A (А) и его укороченных форм Lon-HP (Б), Lon-d106-S679A (В) и Lon283 (Г). Условия определения:** 150 мМ имидазол, рН 7.5, 0.5 М NaCl, 1 мМ ADP, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>; концентрация белка 2 – 3 мг/мл. **Обозначения:** NA – фрагмент, включающий N-концевую область (N) и AAA<sup>+</sup>-модуль (А); N' – укороченная N-область; Н – α-спирализованный домен; Р – протеолитический домен.

Укороченная форма Lon-d106-S679A по характеру плавления аналогична Lon-S679A, но отличается пониженными температурами денатурации как в отсутствие, так и при наличии ADP-Mg (рис. 8В). Таким образом, удаление N-домена приводит к понижению стабильности структуры фермента. Двухдоменный N-концевой фрагмент Lon283 формирует в растворе компактную структуру с высокой температурой плавления, на которую нуклеотидный эффектор влияния не оказывает (рис. 8Г).

Из совокупности полученных данных следует, что (1) изолированная N-концевая область Eс-Lon-протеазы (Lon283), включающая бóльшую часть инсерционного HI(CC)-домена, формирует высокостабильную трехмерную структуру; (2) в полноразмерном ферменте фрагмент Lon283 находится в тесном блоке с AAA<sup>+</sup>-модулем, и этот блок плавится как единое целое, но проявляет пониженную стабильность; (3) N-концевой домен участвует в стабилизации Eс-Lon-протеазы; (4) взаимодействие AAA<sup>+</sup>-модуля с нуклеотидом приводит к повышению стабильности структуры фермента.

## 6. Функциональная характеристика Ес-Lon-протеазы и её модифицированных форм

### 6.1. АТФ-азная активность Ес-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

АТФ-азную активность ферментов тестировали по накоплению продукта реакции гидролиза АТФ – неорганического фосфата. Интактная Ес-Lon-протеаза проявляет значительную базовую АТФ-азную активность в условиях, близких к физиологическим ( $[ATP] - 2.5 \text{ мМ}$ ,  $[Mg^{2+}] - 20 \text{ мМ}$ ) (рис. 9, табл. 1, А).

При эквимоллярных концентрациях АТФ и ионов магния (2.5 мМ) скорость гидролиза АТФ увеличивается. Присутствие белкового субстрата ( $\beta$ -казеин, далее – казеин) в обоих случаях приводит к повышению эффективности гидролиза АТФ, достигающей близких значений (рис. 9, табл. 1, А).

Базовые АТФ-азные активности делеционных (Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC)) и укороченных (Lon-d106 и Lon-d172) форм Ес-Lon-протеазы сильно понижены по сравнению с активностью интактного фермента (рис. 9, табл. 1, Б-Д).

Варьирование концентрации ионов магния лишь незначительно влияет на АТФ-азную функцию всех модифицированных форм фермента (табл. 1). Присутствие казеина практически не вызывает изменений АТФ-азной активности делеционных форм (табл. 1, Б и В), но оказывает разное воздействие на укороченные ферменты, которое в случае формы Lon-d106 соизмеримо с активацией интактного фермента (выделено красным в табл. 1, А и Г) и невелико при влиянии на форму Lon-d172 (табл. 1, Д).

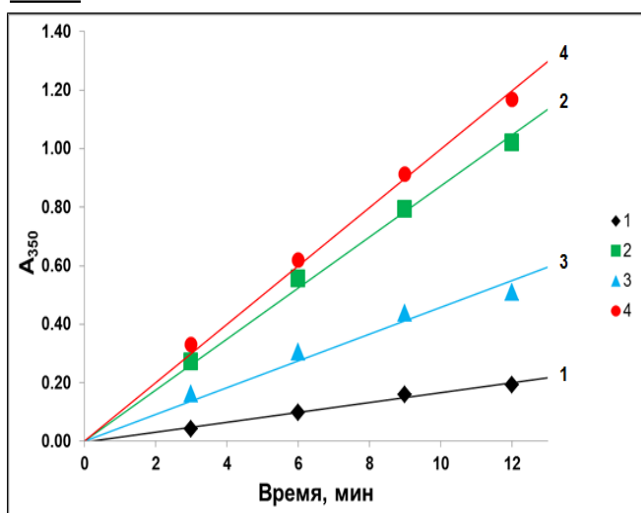
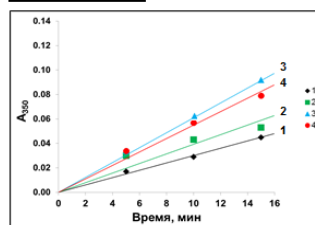
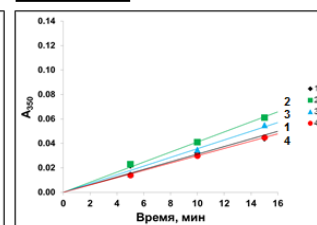
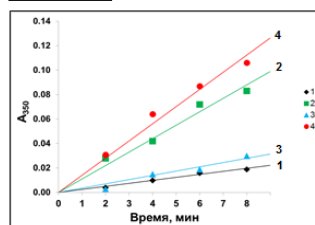
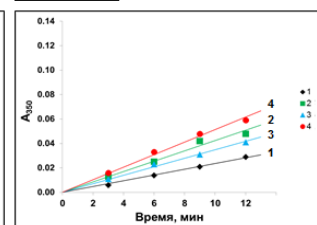
Полученные результаты свидетельствуют о том, что вставочный HI(CC)-домен крайне важен для эффективного функционирования АТФ-азного центра Ес-Lon-протеазы, необходим для корректного связывания белкового субстрата и участвует в реализации аллостерических взаимодействий в ферменте. Кроме того, установлено, что N-концевой фрагмент ( $M^1-N^{106}$ ) влияет на активность АТФ-азного центра, однако он не является существенным для связывания белка-субстрата, так как только у формы Lon-d106 сохраняется свойственное интактному ферменту регуляторное воздействие протеолитического центра на АТФ-азный.

Мутантные формы Ес-Lon-протеазы с заменами потенциально важных остатков в HI(CC)- и N-доменах (Lon-R164A, Lon-R192A, Lon-Y294A и Lon<sup>EKR</sup>) гидролизуют АТФ, но с пониженной скоростью, что наиболее выражено у формы Lon-Y294A (табл. 2). При этом способность к активации белковым субстратом, характерная для интактного фермента, сохраняется у всех мутантных форм.

Особо надо отметить, что мутация остатка Arg<sup>164</sup> не является критичной для фермента, хотя замена предполагаемого его топологического аналога – остатка sensor-2 N-домена Ес-Lon (Arg<sup>542</sup>), участвующего в формировании АТФ-азного центра, – приводит к полной утрате АТФ-азной активности вне зависимости от наличия или отсутствия белка-субстрата (табл. 2). Из этого следует, что, несмотря на формальное подобие локализации остатков Arg<sup>164</sup> и Arg<sup>542</sup> (в третьих  $\alpha$ -спиралях HI(CC)- и N-доменов), фрагменты, включающие эти остатки, имеют различную функциональную значимость для Ес-Lon-протеазы.

Увеличение степени активации казеином АТФ-азных центров форм Lon-Y294A и Lon<sup>EKR</sup> по сравнению с интактным ферментом может указывать на то, что при взаимодействии с белком-мишенью происходит частичное восстановление



**Ec-Lon****Lon-dHI(CC)****Lon-d(CC)****Lon-d106****Lon-d172****Рисунок 9. Гидролиз АТФ Ec-Lon-протеазой и ее модифицированными формами.**

Условия эксперимента: 50 мМ Tris-HCl-буфер, рН 8.5, 0.15 М NaCl; 37°C. Концентрации: АТФ – 2.5 мМ (1–4); MgCl<sub>2</sub> – 2.5 (3, 4) или 20 мМ (1, 2); β-казеин – 0.5 мг/мл (2, 4); Ec-Lon – 0.5 мкМ; Lon-dHI(CC) – 1.0 мкМ; Lon-d(CC) – 1.5 мкМ; Lon-d106 – 0.5 мкМ; Lon-d172 – 0.5 мкМ.

**Таблица 1. АТФ-азная активность Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм**

Условия определения			Удельная активность фермента *									
			Ec-Lon (А)		Lon-dHI(CC) (Б)		Lon-d(CC) (В)		Lon-d106 (Г)		Lon-d172 (Д)	
[АТФ], мМ	[Mg <sup>2+</sup> ], мМ	казеин (№ прямой)	v	n	v	n	v	n	v	n	v	n
2.5	20	– (1)	4.20 ± 0.11 (100 %)	1.00	0.42 ± 0.02 (10.0 %)	1.00	0.21 ± 0.01 (5.01 %)	1.00	0.62 ± 0.04 (14.8 %)	1.00	0.60 ± 0.02 (14.3 %)	1.00
		+ (2)	21.3 ± 0.58	5.10	0.49 ± 0.09	1.16	0.30 ± 0.01	1.43	2.60 ± 0.21	4.20	1.10 ± 0.07	1.80
2.5	2.5	– (3)	10.8 ± 0.80	2.57	0.70 ± 0.03	1.67	0.28 ± 0.01	1.33	0.95 ± 0.10	1.53	0.87 ± 0.03	1.45
		+ (4)	24.3 ± 1.26	5.80	0.64 ± 0.05	1.52	0.19 ± 0.02	0.90	3.30 ± 0.22	5.30	1.30 ± 0.06	2.17

\* – Приведены значения удельных скоростей гидролиза АТФ ( $v$ , ([P], мкМ)/([E], мкМ)·мин) и  $n$  ( $v_1/v_0$ ) – отношения скоростей гидролиза АТФ в текущих условиях (при понижении концентрации ионов магния и/или в присутствии казеина,  $v_1$ ) к базовой скорости гидролиза АТФ (выделена светло-зеленым фоном,  $v_0$ ); в скобках показаны доли базовой удельной активности модифицированных форм по отношению к активности Ec-Lon. Погрешности рассчитаны с помощью программы OriginPro 8.0.

**Таблица 2. АТФ-азная активность интактной Ec-Lon-протеазы и ее мутантных форм**

Казеин	Относительная АТФ-азная активность, %					
	Ec-Lon	Lon-R164A	Lon-R192A	Lon-Y294A	Lon <sup>EKR</sup>	Lon-R542A
–	19.7	7.50	3.80	1.00	5.20	0.00
+ (активация)	100 (5.10 p)	24.1 (3.20 p)	22.6 (6.00 p)	10.7 (10.4 p)	42.5 (8.20 p)	0.0 (–)

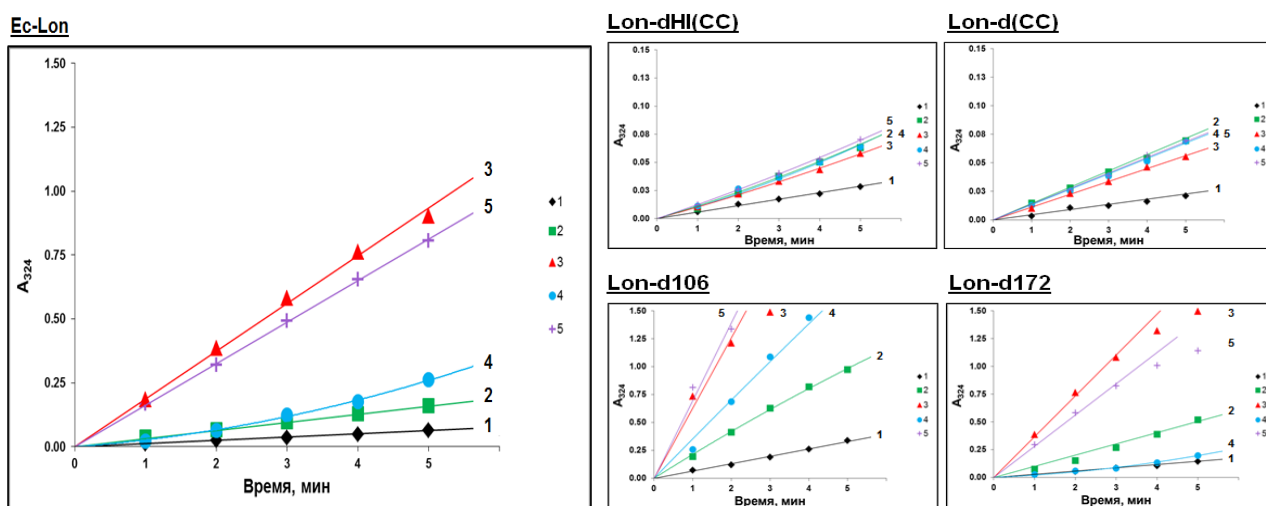
Условия см. в подписи к рис. 9. Концентрации: АТФ – 2.5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; β-казеин – 0.5 мг/мл; Ec-Lon – 0.5 мкМ; мутантные ферменты – 0.2–1.0 мкМ. В скобках показаны степени активации АТФ-азной активности. Погрешность определения не превышает 15 %.

конформации Ес-Lon-протеазы, нарушенной в результате мутаций. Кроме того, из сопоставления данных по АТФ-азной активности форм Lon<sup>EKR</sup> и Lon-d106 следует, что для корректной работы АТФ-азного центра Ес-Lon необходимо не только отмеченное выше наличие N-домена, но и сохранение его нативной конформации.

## 6.2. Пептидгидролазная активность Ес-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Пептидгидролазную активность Ес-Lon-протеазы и её модифицированных форм тестировали по гидролизу тиобензилового эфира N-защищенного трипептида (Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, ПерТВЕ). Все модифицированные и мутантные формы Ес-Lon-протеазы в разной степени способны гидролизовать пептидный субстрат в отсутствие эффекторов (базовая пептидазная активность).

Для **интактной Ес-Lon** установлено, что ионы Mg<sup>2+</sup> и комплексы Nu-Mg являются активаторами пептидгидролазного центра, причем, максимальный стимулирующий эффект оказывают АТФ-Mg и АМРРNP-Mg (рис. 10, табл. 3, А). При этом свободные нуклеотиды ADP и АМРРNP (негидролизуемый аналог АТФ) оказались ингибиторами, а АТФ – слабым активатором фермента (данные не приведены).



**Рисунок 10. Гидролиз ПерТВЕ Ес-Lon-протеазой и ее модифицированными формами.**

Условия эксперимента: 50 мМ Tris-HCl-буфер, рН 8,5, 0,15 М NaCl; 0,2 мМ DTDP; 10 % DMSO; 37°C. Концентрации: ПерТВЕ – 0,1 мМ; Nu – 2,5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; Ес-Lon – 0,1 мкМ; Lon-dHI(CC), Lon-d(CC), Lon-d106 и Lon-d172 по 0,5 мкМ. Эффекторы: 1 – отсутствуют, 2 – Mg<sup>2+</sup>, 3 – АТФ-Mg, 4 – ADP-Mg, 5 – АМРРNP-Mg.

Базовая активность **делеционных форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC)** ниже, чем активность интактного фермента, более чем на порядок (рис. 10, табл. 3, Б и В). Показано, что свободные нуклеотиды не влияют на гидролиз пептидного субстрата, а ионы магния и Nu-Mg-комплексы оказывают близкое по величине слабое активирующее действие. Из этих данных следует, что инсерционный HI(CC)-домен и его CC-участок важны как для корректного функционирования пептидазного центра Ес-Lon-протеазы, так и для реализации регуляторного влияния АТФ-азного центра на пептидазный. Кроме того, HI(CC)-домен, вероятно, вовлечен в формирование области фермента, ответственной за распознавание природы нуклеотидов, связывающихся в АТФ-азном центре.

Таблица 3. Пептидазная активность Ec-Lon и ее делеционных и укороченных форм

Эффектор		Удельная активность ферментов *									
		Ec-Lon (A)		Lon-dHI(CC) (Б)		Lon-d(CC) (B)		Lon-d106 (Г)		Lon-d172 (Д)	
		<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>
1	Без эффектора (базовая акт-ть)	8.40 ± 0.21 (100 %)	1.00	0.70 ± 0.02 (8.3 %)	1.00	0.56 ± 0.01 (6.7 %)	1.00	8.50 ± 0.10 (101 %)	1.00	3.40 ± 0.14 (40.9 %)	1.00
2	Mg <sup>2+</sup>	18.8 ± 0.53	2.23	1.50 ± 0.09	2.14	1.80 ± 0.03	3.25	23.2 ± 0.69	2.71	12.8 ± 0.25	3.73
3	АТР-Mg	106 ± 1.79	12.6	1.30 ± 0.03	1.88	1.40 ± 0.04	2.43	82.1 ± 2.80	9.62	43.6 ± 2.35	12.7
4	ADP-Mg	52.7 ± 3.10	6.26	1.50 ± 0.06	2.14	1.70 ± 0.07	3.04	42.7 ± 1.81	5.00	3.82 ± 0.33	1.11
5	AMPPNP-Mg	93.6 ± 5.52	11.1	1.70 ± 0.05	2.40	1.70 ± 0.08	3.04	91.8 ± 11.4	10.8	33.3 ± 1.78	9.70

\* – Приведены значения удельных скоростей гидролиза ПерТВЕ (*v*, ([P], мкМ)/([E], мкМ)·мин) и *n* – степень активации гидролиза (отношение скоростей гидролиза субстрата в присутствии и в отсутствие эффектора, *v*<sub>эф</sub>/*v*<sub>0</sub>), в скобках показаны доли базовой удельной активности модифицированных форм по отношению к базовой активности Ec-Lon. Погрешности рассчитаны с помощью программы OriginPro 8.0.

В отношении **укороченных форм** установлено, что базовая пептидазная активность либо не отличается от активности интактной Ec-Lon-протеазы (Lon-d106), либо незначительно понижена (Lon-d172) (рис. 10, табл. 3, Г и Д). При этом для обеих форм полностью сохраняются тенденции, характеризующие влияние эффекторов на интактный фермент. Таким образом, ни N-домен Ec-Lon, ни фрагмент HI(CC)-домена (E<sup>124</sup>–N<sup>172</sup>) не оказывают существенного влияния на работу пептидазного центра фермента и на реализацию аллостерического воздействия АТР-азного центра на пептидазный. Из совокупности результатов для укороченных и делеционных форм следует, что важную роль в этом отношении играет фрагмент HI(CC)-домена (M<sup>173</sup>–N<sup>304</sup>), включающий CC-участок.

**Мутантные по N-концевой области формы Ec-Lon-протеазы** проявляют пониженную в разной степени базовую пептидазную активность (табл. 4). При этом характер влияния эффекторов на гидролиз ПерТВЕ аналогичен таковому для интактного фермента (выделено красным в табл. 4). Таким образом, эти мутанты сохраняют способность к аллостерическим межцентровым взаимодействиям, несмотря на нарушения конформации фермента, приводящие к изменениям эффективности функционирования их пептидазных (и АТР-азных, табл. 2) центров.

Таблица 4. Пептидазная активность интактной Ec-Lon-протеазы и ее мутантных форм

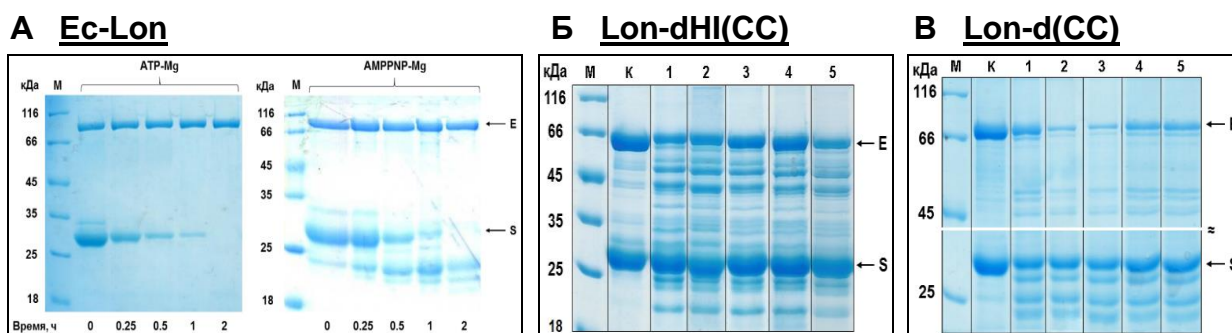
Эффектор	Относительная удельная пептидазная активность, %					
	Ec-Lon	Lon-R164A	Lon-R192A	Lon-Y294A	Lon <sup>EKR</sup>	Lon-R542A
— (базовая акт-ть)	7.90	2.30	3.90	0.53	0.70	20.1
Mg <sup>2+</sup>	17.7	20.4	19.2	1.90	2.40	29.0
АТР-Mg (активация)	100 (12.6 p)	49.4 (21.5 p)	26.7 (6.90 p)	7.70 (14.5 p)	7.90 (11.3 p)	6.60 (0.33 p)
AMPPNP-Mg (активация)	88.3 (11.2 p)	49.2 (21.4 p)	26.3 (6.80 p)	6.80 (12.8 p)	6.90 (9.80 p)	11.9 (0.59 p)

Условия см. в подписи к рис. 10. Концентрации: ПерТВЕ – 0.1 мМ; Nu – 2.5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; ферменты – 0.2–0.5 мкМ. Данные, соответствующие ингибирующему действию эффекторов, показаны *курсивом*; в скобках показаны степени активации/ингибирования пептидазной активности. Погрешность определения не превышает 15 %.

Неожиданно оказалось, что максимально высокую базовую пептидазную активность обнаруживает форма Lon-R542A с заменой остатка s2 в Н-домене, не обладающая АТФ-азной функцией (табл. 2). Несмотря на это, мутант сохранил способность связывать нуклеотиды, о чем свидетельствует подавление гидролиза РерТВЕ комплексами Nu-Mg.

### 6.3. Протеолитическая активность и автолиз Ес-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

**Интактная Ес-Lon-протеаза** деградирует модельный белковый субстрат ( $\beta$ -казеин) только при сопряжении протеолиза с гидролизом АТФ (высокая скорость, процессивный механизм) или в присутствии комплекса АМРРNP-Mg (пониженная скорость, непроцессивный механизм) (рис. 11, А). Использование  $\beta$ -казеина, меченного изотиоцианатом флуоресцеина (FITC-казеин), позволило подтвердить, что скорости гидролиза белка-субстрата в присутствии АТФ-Mg и АМРРNP-Mg различаются в 6.5 раза. Кроме того, было установлено, что Ес-Lon-протеаза значительно менее активна, чем классический сериновый фермент химотрипсин, поскольку даже в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ она более чем в 10 раз уступает химотрипсину по эффективности деградации FITC-казеина (данные не приведены).

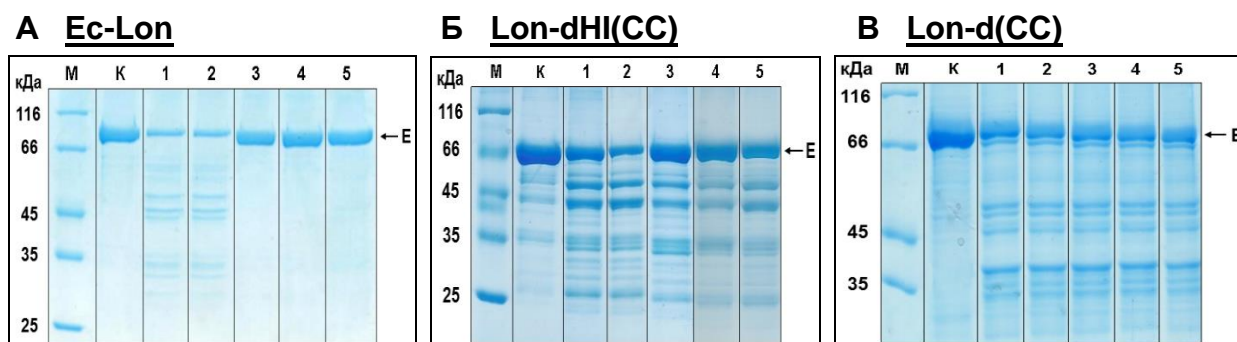


**Рисунок 11.** Гидролиз  $\beta$ -казеина интактной Ес-Lon-протеазой (А) и делеционными формами Lon-dHI(CC) (Б) и Lon-d(CC) (В) (электрофорез в 10 % ПААГ).

Условия см. в подписи к рис. 9. Время реакции – 24 ч (Б и В). Концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; казеин – 0.5 мг/мл; Ес-Lon – 2.8 мкМ; Lon-dHI(CC) – 3.0 мкМ; Lon-d(CC) – 2.6 мкМ. М – маркеры; К – контроль (фермент, казеин, 0 ч); 1 – без эффекторов; 2 – Mg<sup>2+</sup>; 3 – АТФ-Mg; 4 – АДФ-Mg; 5 – АМРРNP-Mg. Здесь и далее Е – фермент, S – казеин.

**Формы Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC)**, имеющие пониженные относительно интактной Ес-Lon степени олигомеризации и не обладающие способностью к реализации межцентровых аллостерических взаимодействий, очень медленно гидролизуют казеин по непроцессивному механизму в любых условиях (рис. 11 Б, В). При этом по эффективности гидролиза субстрата Lon-d(CC) преобладает над Lon-dHI(CC), что свидетельствует о важности фрагментов (E<sup>124</sup>-H<sup>172</sup>) и/или (M<sup>281</sup>-N<sup>304</sup>), фланкирующих СС-участок, для взаимодействия с белковым субстратом. Деградация казеина делеционными формами во всех случаях сопровождается выраженным автолизом модифицированных ферментов (рис. 11 Б, В), что указывает на утрату ими конформационной стабильности.

Изучение собственно автолитических свойств Ес-Lon и ее делеционных форм показало, что интактный фермент подвергается медленной самодеградации исключительно в отсутствие эффекторов или при наличии ионов  $Mg^{2+}$  (рис. 12 А).

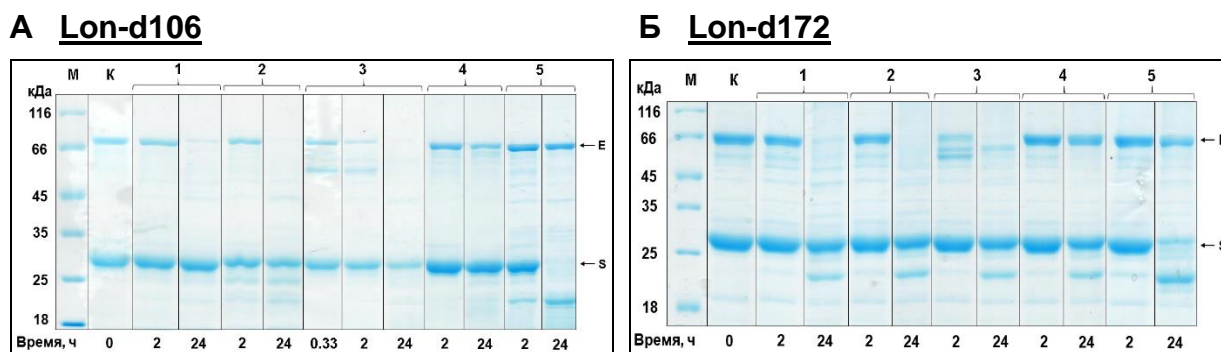


**Рисунок 12. Автолитическая активность полноразмерной Ес-Lon-протеазы (А) и ее делеционных форм Lon-dHI(CC) (Б) и Lon-d(CC) (В)** (электрофорез в 10 % ПААГ). Условия см. в подписи к рис. 9. Время реакции 36 ч (А) и 24 ч (Б, В). Концентрации: Nu – 2.5 мМ;  $MgCl_2$  – 20 мМ; Ес-Lon – 2.8 мкМ; Lon-dHI(CC) – 12 мкМ; Lon-d(CC) – 12 мкМ. М – маркеры; К – контроль (фермент, 0 ч); 1 – без эффекторов; 2 –  $Mg^{2+}$ ; 3 – АТФ-Mg; 4 – АДФ-Mg; 5 – АМРРNP-Mg.

Делеционные формы, напротив, деградируют при любых условиях, причем для Lon-dHI(CC) автолиз более выражен в отсутствие нуклеотидных эффекторов (рис. 12 Б, В). Важно отметить, что в сочетании с ионами  $Mg^{2+}$  белковый субстрат проявляет свойства активатора саморасщепления Lon-d(CC) (ср. рис. 11 В и 12В), чего не наблюдается для формы Lon-dHI(CC). Это служит дополнительным подтверждением участия фрагментов, фланкирующих СС-участок, во взаимодействии с белком-субстратом.

**Укороченные формы Lon-d106 и Lon-d172** гидролизуют белок-субстрат с более высокими скоростями, чем делеционные формы (Рис. 13), что согласуется с повышенной эффективностью функционирования их АТФ-азных и пептидазных центров (табл. 1 и 3).

Установлено, что Lon-d106 – единственная из модифицированных форм Ес-Lon-протеазы, которая, как и интактный фермент, способна эффективно гидролизовать казеин по процессивному механизму в присутствии комплекса АТФ-Mg и по непроцессивному – в присутствии АМРРNP-Mg. Lon-d106 проявляет также



**Рисунок 13. Влияние эффекторов на гидролиз казеина укороченными формами Lon-d106 (А) и Lon-d172 (Б)** (электрофорез в 10 % ПААГ). Условия см. в подписи к рис. 9. Концентрации: Nu – 2.5 мМ;  $MgCl_2$  – 20 мМ; казеин – 0.5 мг/мл; Lon-d106 – 2.2 мкМ; Lon-d172 – 2.8 мкМ. М – маркеры; К – контроль (фермент, казеин); 1 – без эффекторов; 2 –  $Mg^{2+}$ ; 3 – АТФ-Mg; 4 – АДФ-Mg; 5 – АМРРNP-Mg.



слабую протеолитическую активность при наличии только ионов  $Mg^{2+}$  (рис. 13 А). Вместе с тем в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ форма Lon-d106 подвергается интенсивному автолизу, что кардинально отличает ее от Ec-Lon. Из этих данных следует, что N-концевой домен Ec-Lon-протеазы не участвует в реализации механизма процессивного протеолиза, но обеспечивает конформационную стабильность фермента в классических условиях его функционирования. Форма Lon-d172 гидролизует белковый субстрат только непроцессивно и в присутствии любых эффекторов, при этом ее максимальная активность проявляется при наличии комплекса AMPPNP-Mg (рис. 13 Б). В присутствии АТФ-Mg протеолиз казеина сопровождается автолизом Lon-d172, как и в случае формы Lon-d106.

Надо подчеркнуть, что наблюдаемые относительно невысокие степени превращения казеина при сопряжении протеолиза с гидролизом АТФ (рис. 13) обусловлены исключительно параллельным процессом быстротечного автолиза укороченных форм Ec-Lon-протеазы. Смещение соотношения протеолиз/автолиз в пользу первого достигается понижением температуры реакции ферментативного гидролиза казеина (данные не приведены). Отдельно показано, что присутствие белка-субстрата не оказывает влияния на эффективность автолиза форм Lon-d106 и Lon-d172.

Сайты автолиза в Ec-Lon-протеазе и ее модифицированных формах, в целом, соответствуют известной специфичности фермента (расщепление связей, образованных карбоксильными группами гидрофобных или полярных незаряженных аминокислот), что было подтверждено N-концевым секвенированием стабильных фрагментов. При этом в полноразмерном ферменте (I) и в Lon-dHI(CC) (II) центры самодеградации обнаружены в NB-домене (I: M<sup>410</sup>-A<sup>411</sup>; II: L<sup>313</sup>-R<sup>314</sup>, A<sup>381</sup>-L<sup>382</sup>, A<sup>411</sup>-K<sup>412</sup>) и на его границе с H-доменом (I: I<sup>488</sup>-R<sup>489</sup>; II: L<sup>490</sup>-S<sup>491</sup>), тогда как в укороченных формах Lon-d106 (III) и Lon-d172 (IV) они локализованы в CC-участках инсерционных HI(CC)-доменов (III: A<sup>267</sup>-K<sup>268</sup>; IV: D<sup>245</sup>-D<sup>246</sup>).

**Мутантные по N-концевой области формы Ec-Lon-протеазы** в присутствии комплекса АТФ-Mg, подобно интактному ферменту, деградируют белковый субстрат по процессивному механизму. При этом активность мутантов снижается в ряду: Ec-Lon  $\geq$  Lon<sup>EKR</sup> > Lon-R164A > Lon-Y294A > Lon-R192A (табл. 5). Наименее активной оказалась форма Lon-R192A, несмотря на то, что эффективность функционирования ее АТФ-азного и пептидазного центров заметно выше эффективности соответствующих центров других мутантов (табл. 2 и 4). Из этих данных следует, что зона CC-участка фермента, включающая остаток Arg192, по-видимому, также участвует во взаимодействии с белком-субстратом.

Мутант Lon-R542A, имеющий максимально активный пептидазный центр, но не обладающий АТФ-азной активностью (табл. 2 и 4), не гидролизует казеин в присутствии АТФ-Mg (табл. 5). Эти данные служат подтверждением того, что процессивная деградация белкового субстрата осуществляется только в условиях динамической активации протеолитического центра Ec-Lon-протеазы за счет гидролиза АТФ в АТФ-азном центре фермента.

Непроцессивный гидролиз казеина в присутствии комплекса AMPPNP-Mg отмечен у всех мутантов Ec-Lon, включая форму Lon-R542A (табл. 5). Эффективность деградации белка в этом случае понижена, однако ряд активности



**Таблица 5. Влияние эффекторов на протеолитическую активность модифицированных и мутантных форм Ec-Lon-протеазы**

Эффектор	T <sub>50</sub> – время 50%-ной деградации казеина*									
	Формы Ec-Lon-протеазы**									
	Ec-Lon	dHI(CC)	d(CC)	d106	d172	R164A	R192A	Y294A	Lon <sup>EKR</sup>	R542A
–	0	>24 ч (н/пр)	>24 ч (н/пр)	0	>24 ч (н/пр)	0	>>24 ч (н/пр)	0	3.5 ч (н/пр)	0
АТФ-Mg	<10 мин (пр)	>24 ч (н/пр)	>24 ч (н/пр)	1 ч (пр)	>24 ч (н/пр)	45 мин (пр)	1.2 ч (пр)	1 ч (пр)	<10 мин (пр)	0
/межцентр. взаимод./	+++	–	–	++	–	++	+	+	+++	–
АМРРNP-Mg	<15 мин (н/пр)	>24 ч (н/пр)	>24 ч (н/пр)	12 ч (н/пр)	16 ч (н/пр)	7 ч (н/пр)	>24 ч (н/пр)	>24 ч (н/пр)	2 ч (н/пр)	6.5 ч (н/пр)

\* в скобках указан механизм протеолиза: процессивный (пр) или непроцессивный (н/пр);

\*\* формы Ec-Lon-протеазы: dHI(CC) – Lon-dHI(CC); d(CC) – Lon-d(CC); d106 – Lon-d106; d172 – Lon-d172; R164A – Lon-R164A; R192A – Lon-R192A; Y294A – Lon-Y294A; R542A – Lon-R542A. Фонovým цветом показан уровень сопровождающего автолиза: низкий уровень – голубой, средний – светло-зеленый, высокий – желтый; обозначения «+» и «–» отражают соответственно наличие или отсутствие межцентровых взаимодействий в ферментах. Условия см. в подписи к рис. 9.

мутантных форм практически сохраняется: Ec-Lon > Lon<sup>EKR</sup> > Lon-R542A ≥ Lon-R164A >> Lon-Y294A ≈ Lon-R192A. При этом в процессе гидролиза белкового субстрата мутанты Ec-Lon, в целом, остаются более стабильными, чем делеционные и укороченные формы.

Собственно автолиз мутантных форм фермента происходит, главным образом, в отсутствие эффекторов. Наличие нуклеотид-магниевых комплексов стабилизирует три мутанта – Lon<sup>EKR</sup>, Lon-R192A и Lon-R542A. В то же время мутанты Lon-R164A и Lon-Y294A подвергаются слабому автолизу в присутствии комплекса АМРРNP-Mg; кроме того, форма Lon-R164A автолизуется также при наличии АТФ-Mg.

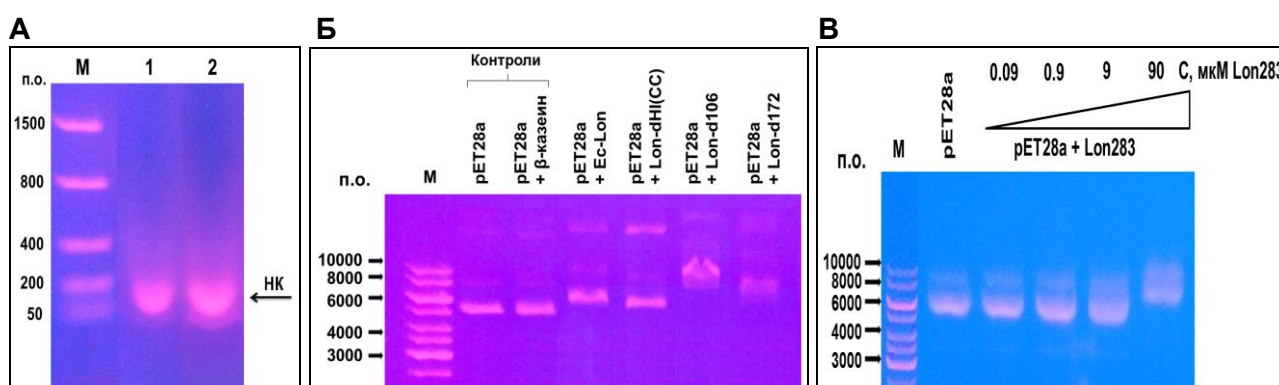
В табл. 5 представлены совокупные данные по влиянию нуклеотид-магниевых комплексов на протеолитическую активность модифицированных и мутантных форм Ec-Lon-протеазы. Полученные результаты позволяют сделать следующие заключения: (1) любые делеции и мутации в N-концевой области Ec-Lon-протеазы приводят к различным конформационным изменениям, проявляющимся в снижении устойчивости фермента к самодеградации; (2) инсерционный HI(CC)-домен необходим для корректного связывания белкового субстрата и гидролиза его по процессивному механизму; (3) N-концевой домен способствует сохранению конформационной стабильности Ec-Lon-протеазы при сопряжении протеолиза с гидролизом АТФ.

## 7. Взаимодействие Ec-Lon-протеазы и её модифицированных форм с нуклеиновой кислотой

Характерной особенностью LonA-протеаз служит их способность к связыванию ДНК, однако область фермента, ответственная за взаимодействие с

нуклеиновой кислотой до сих пор не идентифицирована. Поскольку другие AAA<sup>+</sup>-протеазы СКК не обладают ДНК-связывающими свойствами и в то же время не содержат фрагментов, подобных HI(CC)-домену, можно было ожидать, что именно инсерционный домен LonA-протеаз вовлечен в связывание нуклеиновой кислоты. Для проверки этого предположения была изучена ДНК-связывающая способность Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных в N-концевой области форм с целью возможного выявления потенциальных участков фермента с повышенной аффинностью к нуклеиновым кислотам.

Методом фенол-хлороформной экстракции было установлено, что все выделенные в работе препараты Ec-Lon и ее модифицированных форм содержат до 5 % эндогенной нуклеиновой кислоты (eNA) в виде фрагментов размером 150-200 пар оснований (показано на примере Ec-Lon и Lon-dHI(CC), рис. 14 А). Фермент, утративший eNA (d-eNA-Lon), был получен обработкой экстракта продуцента Ec-Lon-протеазы неспецифической эндонуклеазой (бензоназа из *Serratia marcescens*).



**Рисунок 14.** Фенол-хлороформные экстракты Ec-Lon-протеазы (1) и Lon-dHI(CC) (2) (А) и ДНК-связывающая способность Ec-Lon-протеазы и её модифицированных форм Lon-dHI(CC), Lon-d106, Lon-d172 (Б) и Lon283 (В).

Условия экспериментов: 20 мМ Трис-НСl-буфер, рН 7.5; 60 мМ NaCl; 25 °С; pET28a – 5.4 (Б) и 90 нМ (В), формы Ec-Lon по 6.0 мкМ (Б). М – маркеры; НК – нуклеиновая кислота.

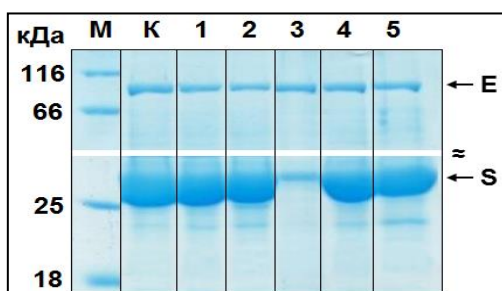
Сравнительным анализом ферментативных свойств Ec-Lon и d-eNA-Lon показано, что базовая АТФ-азная функция d-eNA-Lon значительно понижена, но остается способной к эффективной активации белковым субстратом (табл. 6). Базовая пептидазная активность d-eNA-Lon, напротив, мало отличается от активности Ec-Lon, однако комплексы Nu-Mg весьма слабо активируют фермент, утративший эндогенную нуклеиновую кислоту, и их действие сопоставимо с действием ионов магния (табл. 6).

**Таблица 6.** Относительные активности АТФ-азных и пептидазных центров Ec-Lon и d-eNA-Lon

Фермент	АТФ-азная активность, %		Пептидазная активность, %			
	Казеин		Эффектор			
	-	+	-	Mg <sup>2+</sup>	АТФ-Mg	АМPPNP-Mg
Ec-Lon	19.7	100 (5.10 p)	7.90	17.7 (2.20 p)	100 (12.6 p)	88.3 (11.2 p)
d-eNA-Lon	5.90	27.3 (4.60 p)	8.80	17.8 (2.00 p)	20.7 (2.40 p)	26.3 (3.00 p)

Условия см. в подписях к рис. 9 и табл. 3. Концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; ферменты – 0.5 мкМ (А) и 0.1 мкМ (Б). В скобках показаны степени активации ферментативной активности.

Эффект удаления eNA оказался сходным с эффектом влияния Nu-Mg-комплексов на пептидазные свойства форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) (табл. 3) и мог бы служить указанием на вероятную локализацию центра/ов связывания нуклеиновой кислоты в инсерционном домене. Однако по протеолитической активности d-eNA-Lon подобна не делеционным формам, а интактной Ec-Lon: она процессивно, хотя и с пониженной в 2-3 раза скоростью, расщепляет казеин в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ (рис.15) и подвергается медленному автолизу в отсутствие эффекторов или при наличии ионов магния (данные не приведены).



**Рисунок 15. Протеолитическая активность d-eNA-Lon-протеазы** (электрофорез в 10 % ПААГ).

Условия см. в подписи к рис. 9. Время реакции 3 ч.

Концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; казеин – 1.0 мг/мл; d-eNA-Lon – 2.3 мкМ. М – маркеры; К – контроль (фермент, казеин, 0 ч); 1 – без эффекторов; 2 – Mg<sup>2+</sup>; 3 – АТФ-Mg; 4 – АДФ-Mg; 5 – АМППNP-Mg.

Из совокупности представленных данных следует, что связанная eNA активирует функционирование АТФ-азного центра Ec-Lon-протеазы и усиливает влияние нуклеотидных эффекторов на пептидазную и протеолитическую функции, чем способствует реализации аллостерических межцентровых взаимодействий в ферменте.

Далее была изучена способность Ec-Lon и ее модифицированных форм к образованию комплексов с добавленной нуклеиновой кислотой на примере плазмидной ДНК рЕТ28а (5369 п.о.). Ожидалось, что фермент, который утратил фрагмент последовательности, обладающий высоким сродством к ДНК, потеряет способность к связыванию рЕТ28а. Однако оказалось, что все модифицированные в N-концевой области формы Ec-Lon образуют комплексы с плазмидной ДНК (рис. 14 Б). Предположение о локализации сайта/ов связывания ДНК исключительно в AAA<sup>+</sup>-модуле или Р-домене Ec-Lon было опровергнуто экспериментом по комплексообразованию рЕТ28а с белком Lon283, моделирующим N-концевую область фермента (рис. 14 В).

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что различные домены вносят совместный вклад во взаимодействие Ec-Lon-протеазы с нуклеиновой кислотой. При этом предположение об исключительной роли вставочного HI(CC)-домена в связывании ДНК не подтвердилось. По-видимому, этот домен фермента либо не участвует во взаимодействии с нуклеиновой кислотой, либо не является определяющим в этом взаимодействии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования получены структурные данные, подтверждающие справедливость выдвинутой ранее гипотезы о формировании некаталитической области АТФ-зависимых LonA-протеаз двумя доменами – N-концевым (N) и инсерционным  $\alpha$ -спирализованным (HI(CC)). Обнаруженное сходство последнего с  $\alpha$ -спирализованным доменом первого из двух АТФ-азных модулей шаперонов-дезагрегаз ClpB позволяет рассматривать LonA-протеазы как особый подкласс AAA<sup>+</sup>-белков, занимающий промежуточное положение между белками классов I и II.

Решение кристаллической структуры центрального фрагмента (K<sup>235</sup>-F<sup>584</sup>) Lon-протеазы из *E. coli* позволило ей стать первым представителем подсемейства LonA, для которого определены пространственные структуры фрагментов, в совокупности покрывающих полную последовательность фермента. Это дает основание рассматривать *EcLon*-протеазу в качестве структурной модели для общего пула LonA-протеаз. Установлено, что АТФ-азный кор *EcLon*(235-584) формирует открытые гексамерные спиральные кольца, характерные для многих AAA<sup>+</sup>-белков. Такие же открытые спиральные кольца образуют гексамеры полноразмерного мутанта *EcLon*-S679A, хотя в этих структурах укладка N-концевой области протомеров остается неопределенной. Вместе с тем показано, что образование додекамерных структур *EcLon*-S679A происходит именно за счет взаимодействия гибких N-концевых областей гексамеров.

На примере *EcLon*-протеазы продемонстрировано, что оба домена N-концевой области важны для функционирования индивидуальных АТФ-азного и пептидазного центров LonA-протеаз. Однако ключевую роль в реализации уникального процессивного механизма гидролиза белкового субстрата играет HI(CC)-домен, который участвует в формировании функционально активной гексамерной структуры фермента, во взаимодействии *EcLon*-протеазы с нуклеотидами и белковыми субстратами, в аллостерических взаимовлияниях каталитических центров. Для N-концевого домена основной функцией является обеспечение конформационной стабильности *EcLon*-протеазы в классических условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ.

Установлено, что N-концевая область вовлечена во взаимодействие *EcLon*-протеазы с ДНК, однако сайтов специфического связывания нуклеиновой кислоты не обнаружено.

## ВЫВОДЫ

1. Установлена трехмерная структура фрагмента (K<sup>235</sup>-F<sup>584</sup>), включающего С-концевую часть инсерционного домена и AAA<sup>+</sup>-модуль *EcLon*-протеазы. Показано, что полноразмерный мутант *EcLon*-S679A представлен смесью гексамеров и додекамеров. Установлено, что гексамеры *EcLon*-S679A и фрагмента (K<sup>235</sup>-F<sup>584</sup>) формируют открытые спиральные кольца.
2. Для исследования роли индивидуальных доменов в формировании функционально активной *EcLon*-протеазы осуществлен дизайн и получены девять новых делеционных и мутантных форм фермента; для пяти форм получены протеолитически неактивные аналоги с заменой каталитически активного остатка серина на аланин.
3. Установлено, что N-концевой и инсерционный домены выполняют различные функции в полноразмерной *EcLon*-протеазе:
  - инсерционный HI(CC)-домен необходим для максимально эффективного функционирования АТФ-азного и пептидазного активных центров *EcLon*-протеазы и для реализации ферментом процессивного механизма протеолиза;
  - N-концевой домен обеспечивает конформационную стабильность *EcLon*-протеазы в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ;
  - инсерционный и N-концевой домены *EcLon*-протеазы содержат неспецифические сайты связывания ДНК.
4. Полученные результаты позволяют рассматривать LonA-протеазы как особый подкласс AAA<sup>+</sup>-белков, в N-концевой области которых локализован инсерционный α-спирализованный домен – вероятный компонент добавочного AAA<sup>+</sup>-модуля, утратившего свой нуклеотидсвязывающий домен.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи в научных журналах:

1. 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. (2019) Cryo-EM structure of substrate-free *E. coli* Lon protease provides insights into the dynamics of Lon machinery. *Curr. Res. Struct. Biol.*, 1, 13-20. DOI.org/10.1016/j.crstbi.2019.10.001.
2. Rotanova T.V., Andrianova A.G., **Kudzhaev A.M.**, Li M., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. (2019) New insights into structural and functional relationships between LonA proteases and ClpB chaperones. *FEBS Open Bio*, 9, 1536-1551, DOI: 10.1002/2211-5463.12691.
3. **Куджаев А.М.**, Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. (2018) Влияние делеции участка (173–280) инсерционного α-спирализованного домена АТФ-зависимой Lon-протеазы *E. coli* на ее функциональные свойства. *Биоорганическая химия*, 44 (5), 522-532.
4. **Kudzhaev A.M.**, Andrianova A.G., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Rotanova T.V. (2017) Role of the inserted α-helical domain in *E. coli* ATP-dependent Lon protease function. *Acta Naturae*, 9 № 2(33), 75-81.
5. Андрианова А.Г., **Куджаев А.М.**, Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. (2017) Участие N-концевой области и характеристического coiled-coil-фрагмента LonA-протеазы из *E. coli* в ее функционировании и поддержании структуры. *Биоорганическая химия*, 43 (4), 357-366.
6. **Куджаев А.М.**, Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. (2016) Роль фрагмента (1-106) в функционировании АТФ-зависимой Lon-протеазы *E. coli*. *Биоорганическая химия*, 42 (4), 421-430.
7. **Куджаев А.М.**, Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. (2015) Влияние мутаций в инсерционном домене АТФ-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* на ее функционирование. *Биоорганическая химия*, 41 (5), 579-586.



8. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. (2014) Роль  $\alpha$ -спирализованных доменов в функционировании АТФ-зависимой Lon-протеазы из *Escherichia coli*. Биоорган. химия, 40 (6), 673-681.

### Материалы научных конференций, конгрессов, симпозиумов:

1. Gustchina A., Rotanova T., Andrianova A., Kudzhaev A., Li M., Cherry S., Tropea J., Lountos G., Botos I., Wlodawer A. Crystallographic and cryo-EM studies of *E. coli* Lon protease. The 44th FEBS Congress, Krakow, Poland, 2019.
2. Gustchina A., Rotanova T.V., Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Mi L., Cherry S., Tropea J., Lountos G., Botos I., Wlodawer A. Crystallographic and cryo-EM studies of *E. coli* Lon protease. 11th General Meeting of International Proteolytic Society, Mariánské Lázně, Czech Republic, 2019.
3. Gustchina A., Andrianova A., Kudzhaev A., Li M., Wlodawer A., Rotanova T. Structural and functional insights in the evolutionary relationships between LonA proteases and ClpB chaperones. The 42nd FEBS Congress, Jerusalem, Israel, 2017.
4. Абрикосова В.А., Куджаев А.М., Андрианова А.Г. Структурно-функциональная характеристика тройного мутанта по N-концевому домену АТФ-зависимой Lon-протеазы *E. coli*. XXXI Зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2019.
5. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г. Исследование роли N-концевой области LonA-протеазы *E. coli* в функционировании фермента. XIX Зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2017.
6. Дубовцева Е.С., Куджаев А.М., Андрианова А.Г. Изучение влияния экзогенной нуклеиновой кислоты на функционирование LonA-протеазы из *E. coli*. XIX Зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2017.
7. Ротанова Т.В., Андрианова А.Г., Куджаев А.М. Особенности структурной организации Lon-протеаз различных подсемейств. V Съезд биохимиков России, Дагомыс - Сочи, Россия, 2016.
8. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. Влияние делеции двух петель в AAA<sup>+</sup>-модуле Lon-протеазы *E. coli* на функционирование фермента. V Съезд биохимиков России, Дагомыс - Сочи, Россия, 2016.
9. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г. Роль инсерционного  $\alpha$ -спирализованного домена АТФ-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* в функционировании фермента. XXVIII Зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2016.
10. Дубовцева Е.С., Куджаев А.М., Андрианова А.Г. ДНК-связывающая АТФ-зависимая Lon-протеаза из *E. coli*. Влияние обработки нуклеазой на свойства фермента. XXVIII Зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2016.
11. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Широкова А.И., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. Участие N-концевого домена LonA-протеазы *Escherichia coli* в функционировании фермента и во взаимодействии с ДНК. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Новосибирск, Россия, 2015.
12. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Широкова А.И., Серова О.В., Андрианова А.Г. Роль N-концевого домена АТФ-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* в функционировании фермента и в связывании ДНК. XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2015.
13. Ротанова Т.В., Куджаев А.М., Дергоусова Н.И., Андрианова А.Г. Участие уникального инсерционного домена АТФ-зависимых LonA-протеаз в поддержании активной структуры и функционировании ферментов. VII Всероссийская конференция «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция», Петрозаводск, Россия, 2014.
14. Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. Влияние мутаций в инсерционном домене АТФ-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* на функционирование фермента. VII Всероссийская конференция «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция», Петрозаводск, Россия, 2014.
15. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. Уникальная структурная организация AAA<sup>+</sup>-протеаз семейства Lon. Участие некаталитической N-концевой области LonA-протеаз в функционировании фермента. Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения ак. Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия, 2014.
16. Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Андрианова А.Г. Исследование роли coiled-coil-участка N-концевой области Lon-протеазы *E. coli* в функционировании фермента. XXVI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2014.
17. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Серова О.В., Ротанова Т.В. Различия вклада двух  $\alpha$ -спирализованных доменов в функционирование АТФ-зависимой Lon-протеазы из *E. coli*. VI Российский симпозиум «Белки и пептиды», Уфа, Россия, 2013.

**Список сокращений:** AMPPNP – 5'-аденилил- $\beta$ , $\gamma$ -имидодифосфат; DTDP – 4,4'-дитиодипиридин; eNA – эндогенная нуклеиновая кислота; Nu – нуклеотид; PepTBE – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl; a.o. – аминокислотный остаток; СКК – система контроля качества.