

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**

Специальность
02.00.10 – Биоорганическая химия

диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Ротанова Татьяна Васильевна

Москва – 2020

Оглавление

1. Список сокращений	5
2. Введение	6
3. АТР-Зависимые протеазы внутриклеточной системы контроля качества белков. Сходство и различия некаталитических доменов (обзор литературы)	10
3.1. Система контроля качества белков в клетках бактерий и эукариот	10
3.1.1. Молекулярные шапероны	13
3.1.1.1 Шапероны семейства Hsp70	13
3.1.1.2 Шапероны семейства Hsp60	14
3.1.1.3 Шапероны семейства Hsp90	17
3.1.1.4 Малые Hsp-белки	18
3.1.1.5 Шапероны семейства Hsp100/Clp	19
3.1.2. Внутриклеточные АТР-зависимые протеазы	22
3.1.2.1. AAA ⁺ -модуль – характеристический компонент АТР-зависимых протеаз	24
3.1.2.2. Доменная организация АТР-зависимых протеаз	25
3.1.2.3. Некаталитические экстрадомены АТР-зависимых протеаз	32
N-Домены Clp-шаперонов	32
N-Домены AAA ⁺ -АТР-аз протеасом	39
N-Домены FtsH-протеаз	42
Экстрадомены LonB и HslUV-протеаз	42
3.1.2.4. Сходство и различия экстрадоменов AAA ⁺ -белков	43
3.2. Семейство Lon-протеаз	44
3.2.1. Классификация Lon-протеаз	45
3.2.2. Особенность LonA-протеаз – необычная некаталитическая N-концевая область	46
3.2.2.1. N-домены LonA-протеаз	46
3.2.2.2. HI(CC)-домены LonA-протеаз	48
3.2.3. Взаимодействие LonA-протеаз с ДНК	50
3.2.4. Биологическая роль Lon-протеаз	51
3.3. Заключение	54
4. Материалы и методы	56
4.1. Материалы	56
4.1.1. Штаммы <i>E. coli</i>	56

4.1.2. Плазмидные конструкции	56
4.1.3. Реактивы	56
4.1.4. Культуральные среды	57
4.1.5. Растворы	57
4.2. Методы	58
4.2.1. Получение компетентных клеток BL21(DE3) (или TOP10) <i>E. coli</i>	58
4.2.2. Получение генно-инженерных плазмидных конструкций	59
4.2.2.1. Получение базовой плазмидной конструкции <i>pET28a-lon-C-His</i>	59
4.2.2.2. Получение плазмидных конструкций, кодирующих делеционные и укороченные формы <i>Ec-Lon-протеазы</i>	60
4.2.2.3. Получение плазмидных конструкций, кодирующих мутантные формы <i>Ec-Lon-протеазы</i>	61
4.2.3. Трансформация компетентных клеток плазмидной ДНК и индукция экспрессии целевого белка	62
4.2.4. Выделение и очистка <i>Lon-протеазы</i> и её модифицированных форм	63
4.2.5. Тестирование ферментативной активности	65
4.2.6. Процедуры, использованные при работе с белками	68
4.2.7. Процедуры, использованные при работе с нуклеиновой кислотой	71
5. Результаты работы и их обсуждение	74
5.1. Структурный анализ N-концевой области <i>EcLon-протеазы</i>	74
5.2. Дизайн модифицированных форм <i>Ec-Lon-протеазы</i> , использованных для изучения роли инсерционного HI(CC)-домена фермента	94
5.3. Выделение <i>Ec-Lon-протеазы</i> и ее модифицированных форм	96
5.4. Олигомерное состояние <i>Ec-Lon-протеазы</i> и ее модифицированных форм	100
5.5. Микрокалориметрическое исследование <i>Ec-Lon-протеазы</i> и ее модифицированных форм	106
5.6. Функциональная характеристика <i>Ec-Lon-протеазы</i> и её модифицированных форм	110
5.6.1. Функционирование АТР-азных центров <i>Ec-Lon-протеазы</i> и ее модифицированных форм	111
5.6.2. Функционирование пептидгидролазных центров <i>Ec-Lon-протеазы</i> и ее модифицированных форм	117
5.6.3. Протеолитическая активность и автолиз <i>Ec-Lon-протеазы</i> и ее модифицированных форм	125

5.7. Взаимодействие Eс-Lop-протеазы и её модифицированных форм с нуклеиновой кислотой	141
6. Заключение	148
7. Выводы	150
8. Список литературы	151

1. Список сокращений

- а.о. – аминокислотный остаток;
БВГ – буфер для верхнего геля;
БНГ – буфер для нижнего геля;
БСА – бычий сывороточный альбумин;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
Мм – молекулярная масса;
о.е. – оптическая единица;
ПААГ – полиакриламидный гель;
п.о. – пара оснований;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
РНК – рибонуклеиновая кислота;
СКК – система контроля качества;
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;
ADP – аденозин-5'-дифосфат;
AMPPNP – 5'-аденилил- β , γ -имидодифосфат;
ATP – аденозин-5'-трифосфат;
DMSO – диметилсульфоксид;
DTDP – 4,4'-дитиодипиридин;
DTT – дитиотреитол;
eNA – эндогенная нуклеиновая кислота;
FITC – изотиоцианат флуоресцеина;
GTP – гуанозин-5'-трифосфат;
IPTG – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
Nu – нуклеотид;
PepTBE – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl;
PSA – персульфат аммония;
PVDF – поливинилиденфторид;
SBzl – тиобензил;
SDS – додецилсульфат натрия;
Suc – сукцинил;
TEMED – N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин.

2. Введение

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⁺-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⁺-модулем, который сформирован нуклеотид-связывающим и α -спирализованным доменами, а также нехарактерной для других AAA⁺-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-деагрегазы ClpB.

К настоящему времени накоплен значительный объем сведений о роли AAA⁺-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 взаимодействии 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 АТР-зависимой LonA-протеазы из *E. coli*. Установлена трехмерная структура фрагмента *EcLon*(235-584), состоящего из C-концевой части HI(CC)-домена и AAA⁺-модуля фермента и формирующего открытый спиральный гексамер. Методом крио-ЭМ показано, что полноразмерный мутант *EcLon*-S679A также представлен открытыми гексамерными спиральными кольцами. Показана важность HI(CC)-домена для олигомеризации фермента. Получены данные, которые подтверждают уникальную доменную организацию Lon-протеаз подсемейства A и позволяют рассматривать эти ферменты как особый подкласс

AAA⁺-белков. Показано, 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 АТР-азного и пептидазного центров *EcLon*. Показано, что N-концевая область не существенна для связывания нуклеиновой кислоты *EcLon*-протеазой.

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 C-концевую часть инсерционного HI(CC)-домена и AAA⁺-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⁺-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,

заклучения, 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.

3. АТР-Зависимые протеазы внутриклеточной системы контроля качества белков. Сходство и различия некаталитических доменов (обзор литературы)

3.1. Система контроля качества белков в клетках бактерий и эукариот

Основополагающее значение для роста и выживания клеток имеет поддержание гомеостаза клеточных белков (протеостаз). Существование внутриклеточных белков в активном состоянии является абсолютно необходимым условием для выполнения клеткой самых разнообразных функций. Вместе с тем, вследствие возможных транскрипционных и трансляционных ошибок, мутаций генома или различных стрессовых состояний (таких как облучение, экстремальные значения температуры, воздействие окислительных агентов) в клетках постоянно продуцируются поврежденные, мутантные белки или белки с нарушенной структурой (включая неправильно фолдированные, misfolded) [1]. Такие aberrantные белки утрачивают свойственные нативным белкам функции, зачастую формируют неупорядоченные агрегаты и могут оказаться токсичными для клетки. Более того, нарушение фолдинга и агрегация клеточных белков являются основными причинами возникновения так называемых возрастных дегенеративных заболеваний и приводят к различным патологиям [2–9].

Для преодоления нарушений протеостаза в клетках сформировались мощные сети системы контроля качества (СКК), состоящие из молекулярных шаперонов и энергозависимых протеаз (рис. 1). Компоненты СКК контролируют сворачивание вновь синтезированных полипептидов и их сборку в функциональные комплексы, обеспечивают распознавание и высокоэффективное связывание белков с нарушенной структурой и их последующий рефолдинг, а также осуществляют выборочное удаление из клетки избыточных и поврежденных белков путем их деградации [10–12].

Известно [13], что организмы могут адаптироваться к росту температур от точки замерзания воды до 113 °С. Тем не менее, как главный стресс-фактор, тепло представляет собой значимый барьер для жизни. Для всех живых организмов, растущих при соответствующих оптимальных температурах, даже умеренное повышение температуры представляет собой сложную проблему для выживания. В ответ на тепловой стресс клетки активируют сигнальные пути, ведущие к экспрессии белков теплового шока (**H**eat **s**hock **p**roteins, Hsps) [14].

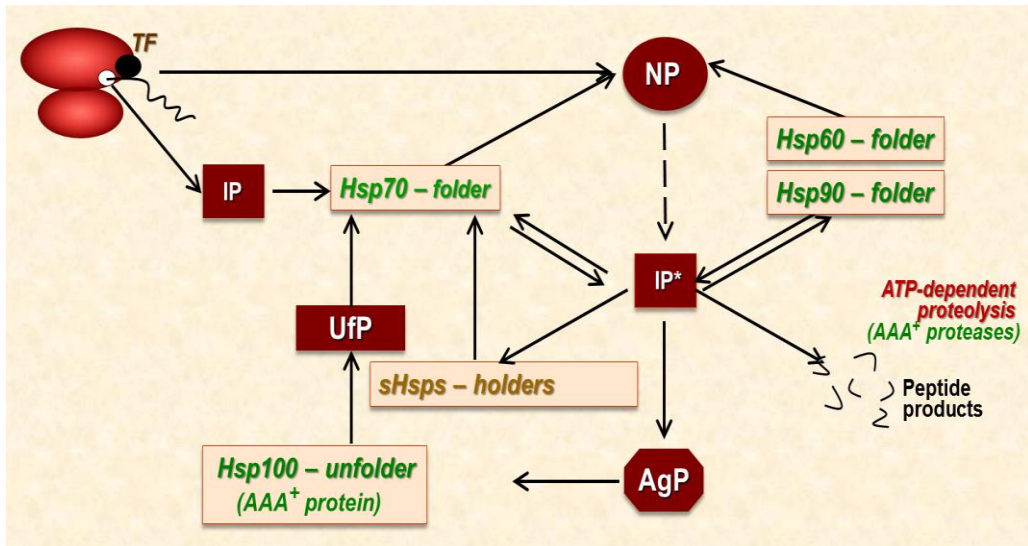


Рисунок 1. Контроль качества клеточных белков в *E. coli*.

Сокращения: NP – фолдированный белок; IP, IP* – частично фолдированный белок; AgP – агрегированный белок; UfP – развернутый белок. Шапероны: Hsp60-система – *GroEL/GroES*; Hsp70-система – *DnaK/DnaJ/GrpE*; Hsp90-система – *HtpG/кошапероны*; Hsp100-система – *ClpB*; small Hsps – *IbpA/B*; TF – триггер-фактор.

В последнее время многие исследования посвящены изучению реакций теплового шока на уровне генома с использованием дифференциального дисплея, транскрипционного профилирования или протеомных подходов в различных клетках и организмах [15]. Эти исследования показали, что примерно 50-200 генов индуцируются в значительной степени у разных модельных организмов, от архей до клеточных линий человека. Функционально стресс-индуцируемые белки могут быть сгруппированы в семь классов (рис. 2) [14].

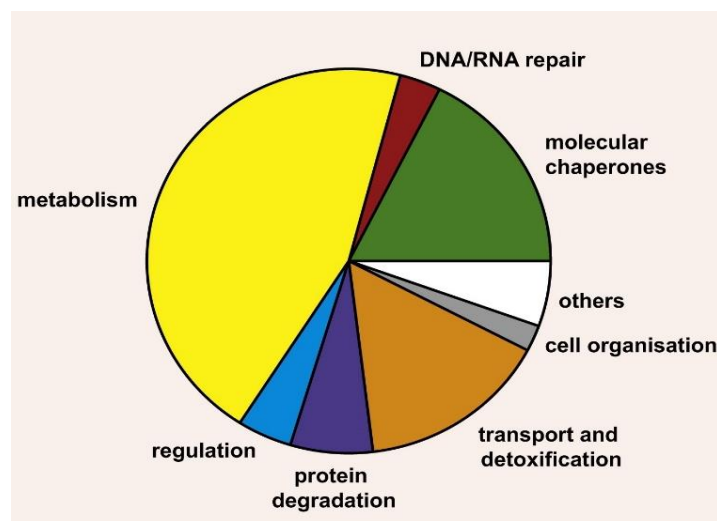


Рисунок 2. Белки теплового шока [14].

Совокупность функциональных классов белков, демонстрирующих повышенную степень экспрессии, в ответ на реакцию теплового шока в *S. cerevisiae* (сдвиг температуры от 25 до 35 °C в течение 10 мин).

Преобладающим классом, с точки зрения повышения уровня экспрессии, являются молекулярные шапероны. Второй класс представлен компонентами протеолитической системы, которые необходимы для утилизации ненативных и необратимо агрегированных белков из клетки. Третий класс участвует в «корректировке» нефизиологических ковалентных модификаций нуклеиновых кислот. Этот класс включает РНК- и ДНК-модифицирующие ферменты, которые необходимы для восстановления повреждений ДНК и сбоя процессинга, возникающих во время стресса [16], таких как индуцированное нагреванием метилирование рибосомных РНК [17]. Четвертый класс состоит из метаболических ферментов, которые могут потребоваться для реорганизации и стабилизации энергообеспечения клетки [18]. Пятый класс включает регуляторные белки, такие как транскрипционные факторы или киназы, некоторые из которых необходимы для дальнейшего инициирования путей ответа на стресс или для ингибирования каскадов экспрессии, включая пути сборки рибосом [19]. Шестой класс включает белки, участвующие в поддержании клеточных структур, таких как цитоскелет. Седьмой класс сверхрегулируемых белков содержит транспортерные, детоксицирующие и мембранно-модулирующие белки, необходимые для поддержания или восстановления стабильности и функционирования мембран [20].

Биологическая активность белка определяется его уникальной трехмерной структурой. Однако формирование такой структуры является весьма трудным процессом. Одно из исследований показывает, что до 30 % всех вновь синтезированных белков никогда не достигает своего нативного состояния [21]. Поскольку нарушение трехмерной структуры белка создает серьезную угрозу функционированию и жизнеспособности клеток, молекулярные механизмы должны эволюционировать для предотвращения накопления неправильно свернутых белков и, следовательно, образования агрегатов [21-23]. В этом направлении клетки выработали две защитные стратегии: они либо стабилизируют конформации ненативных белков и, если возможно, способствуют их рефолдингу (рис. 1), либо используют альтернативный путь, согласно которому белки с неправильной укладкой удаляются из клетки путем деградации энергозависимыми протеазами (в бактериях) или убиквитин-протеасомной системой (в эукариотах) (рис. 1) [24].

Если оба пути защиты перегружены или ингибированы, то белки с ненативной конформацией образуют агрегаты (рис. 1), которые затем могут быть удалены из клетки селективной аутофагией, опосредованной лизосомной деградацией [23, 24]. Востребованность в белках теплового шока (Hsps), относящихся к семейству молекулярных шаперонов, является отличительной чертой данных путей деградации белков, вырабатываемых в ответ на тепловой стресс. Именно белки теплового шока являются

основными компонентами системы контроля качества белков, играющей ключевую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах.

3.1.1. Молекулярные шапероны

Молекулярные шапероны СКК (преимущественно белки теплового шока – **heat shock proteins**, Hsps) – это сеть функционально родственных белков, которые классифицируются в соответствии с их молекулярной массой (Мм). К ним относятся белки семейств Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100, обладающие АТФ-азной активностью, и не-АТФ-азные малые белки теплового шока (**small Hsps**, sHsps, мол. массы 12-43 кДа) (рис. 1) [24, 25]. Кроме того, в клетках бактерий функционирует триггер-фактор (ТФ, 48 кДа), представляющий собой единственный связанный с рибосомой шаперон, который конститутивно экспрессируется и присутствует в цитозоле в двух-трехкратном молярном избытке относительно рибосом. ТФ локализуется в области выхода синтезирующегося полипептида из рибосомного туннеля и совместно с большой субъединицей рибосомы обеспечивает его котрансляционное сворачивание [25, 26]. Условно молекулярные шапероны разделяются на группы фолдеров, холдеров и анфолдеров. Фолдеры (семейства Hsp60, Hsp70 и Hsp90) обеспечивают сворачивание белков, холдеры (sHsps) удерживают мишени, не влияя на их конформацию, а анфолдеры (Hsp100) разворачивают белковые мишени [25].

3.1.1.1. Шапероны семейства Hsp70

Одним из наиболее высококонсервативных шаперонов в эукариотах является белок Hsp70. Аналогом шаперона данного семейства в прокариотах является DnaK (рис. 1), который идентичен Hsp70 на 60 %. Это семейство шаперонов участвует в большом количестве разнообразных биологических процессов и встречается в цитозоле и органеллах, таких как эндоплазматический ретикулум, митохондрии и хлоропласты [14, 27]. В физиологических условиях шапероны Hsp70 участвуют в фолдинге белков, а при стрессе они предотвращают агрегацию анфолдированных белков и совместно с шаперонами семейства Hsp100 могут даже рефолдировать агрегированные белки [28]. Структура Hsp70 включает три функциональных домена: N-концевой нуклеотидсвязывающий домен, центральный субстратсвязывающий домен и варибельный C-терминальный, выполняющий роль «крышки» для субстратсвязывающего сайта (рис. 3А) [25, 27].

Особенностью шаперонов Hsp70 является их способность к изменению сродства к полипептидам, регулируемого связыванием нуклеотидов. АТФ-связанная форма Hsp70

обладает более низким сродством к белкам-мишеням, чем ADP-форма. Регуляторами АТР-азной и шапероновой активностей Hsp70 являются кошапероны, которые представлены группой Hsp40/J-домен-содержащих белков [29]. Связывание белков-субстратов опосредовано предварительным образованием комплексов субстрат-кошаперон с участием С-концевого домена Hsp40, далее комплекс доставляется к Hsp70. Затем J-домен Hsp40 взаимодействует с АТР-азным доменом шаперона и стимулирует гидролиз связанного АТР. Высвобождение нуклеотида (ADP) и субстрата ускоряется связыванием с шапероном Hsp70 фактора нуклеотидного обмена (NEF) (рис. 3Б).

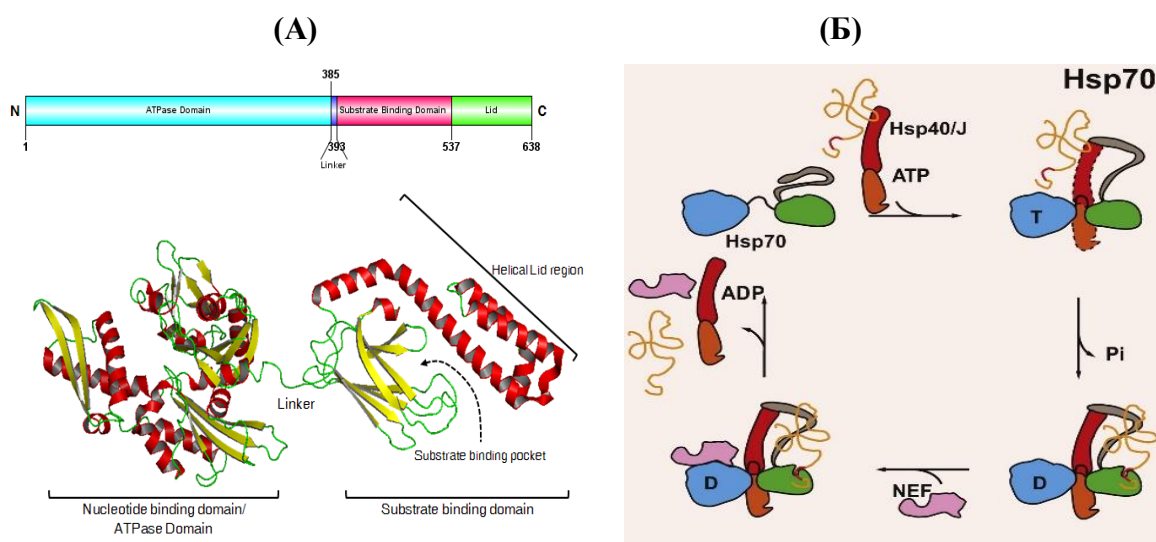


Рисунок 3. Доменная организация Hsp70 шаперона (<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp70.php>) (А) и **механизм его действия** (Б) [14] (здесь и далее: Т – АТР, D – АDР). Ограничение пунктирной линией кошаперона Hsp40 в комплексе с Hsp70-АТР и субстратом (Б) указывает на переходное состояние.

Несмотря на то, что изучены многие особенности данного цикла гидролиза АТР, вклад Hsp70 в процесс фолдинга белка или в солюбилизацию и рефолдинг агрегированных белков [30] остается важным нерешенным вопросом.

3.1.1.2. Шапероны семейства Hsp60

Семейство шаперонов Hsp60 или шаперонинов выполняет роль ключевых компонентов клеточного аппарата шаперонов в СКК (рис. 1). Они представляют наиболее консервативный класс молекулярных шаперонов и присутствуют в пластидах, митохондриях и цитоплазме всех эукариот и бактерий. Шаперонины являются частью сложной, кооперативной сети шаперонов, которые обеспечивают корректный фолдинг новосинтезированных или денатурированных при стрессовых условиях белков [27]. Шаперонины представляют с собой олигомерные высокомолекулярные комплексы с молекулярной массой около 800 кДа. Они образуют структуры, которые формируются

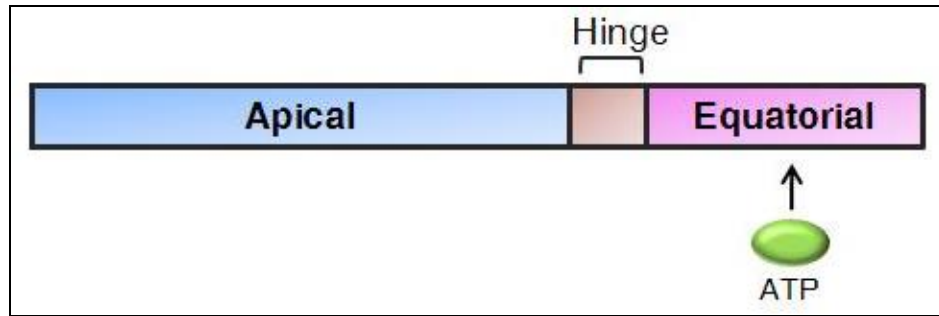
двумя гептамерными кольцами, каждое из которых содержит центральную полость. Эти структуры способны на своих противоположных поверхностях попеременно связывать и инкапсулировать белки, подлежащие рефолдингу [25].

Наиболее изученным представителем семейства Hsp60 является шаперонин GroEL из *Escherichia coli*, функционирующий в комплексе с кошаперонином GroES – белком теплового шока семейства Hsp10 [25, 27, 31, 32]. Мономер GroEL состоит из трех доменов: апикального домена (Ap), который связывает субстрат и кошаперон GroES; шарнирного промежуточного домена (Hinge) и С-концевого экваториального домена (Eq), несущего АТФ-азный центр (рис. 4А) [<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp60.php>, 31, 32, 33]. При взаимодействии экваториальных доменов двух гептамерных колец GroEL образуется зеркально симметричный тороид с двумя изолированными гидрофобными полостями (*транс*-состояние колец), а апикальные домены формируют входные отверстия [25]. Субъединицы GroES кошаперонина также образуют циклический гептамерный куполообразный комплекс, способный прикрывать один из торцов тороида GroEL, образуя несимметричный комплекс GroEL:GroES. Это приводит к значительным конформационным изменениям шаперонина, увеличению размеров полости и ее гидрофилизации (*цис*-состояние кольца). «Классическая» схема функционирования системы GroEL-GroES представлена на рис. 4Б [14, 25].

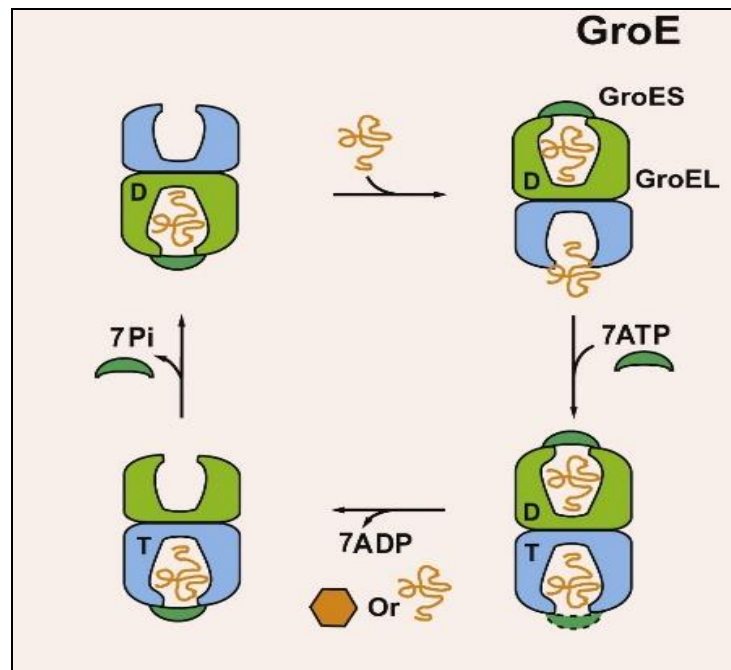
Белок в ненативной конформации узнается апикальными доменами колец и при связывании АТФ и кошаперонина GroES, белок инкапсулируется и погружается в полость кольца. Гидролиз АТФ в одном кольце приводит к высвобождению GroES и белка-субстрата из противоположного кольца. Во время инкапсуляции белок-субстрат в зависимости от собственных характеристик может складываться частично или полностью. Данный механизм фолдинга, называемый *цис*-механизмом, реализуется по отношению к относительно небольшим белковым мишеням, способным разместиться внутри полости *цис*-кольца системы GroEL–GroES (рис. 4Б). Крупные субстраты, инкапсулирование которых невозможно, фолдируются по *транс*-механизму, согласно которому связывание белка-мишени и кошаперонина GroES происходит на противоположных кольцах GroEL [25, 34].

В самое последнее время предложен новый вариант механизма фолдинга белков с помощью системы шаперонина GroEL, в котором функционируют симметричные комплексы GroEL:2GroES, содержащие кошаперонины на обоих концах тороида GroEL (рис. 4В) [35, 36]. Следует заметить, что в новом механизме частичный фолдинг белка-мишени в процессе инкапсулирования не рассматривается в качестве необходимого этапа общего процесса.

(A)



(B)



(B)

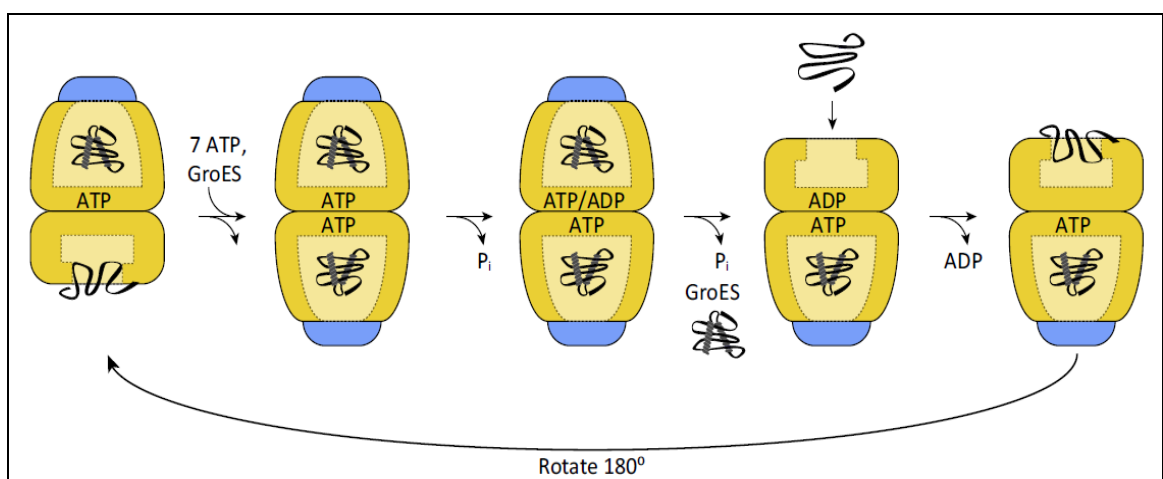


Рисунок 4. Доменная организация шаперона Hsp60 (A) (<http://pds-lab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp60.php>) и схемы функционирования системы GroEL-GroES (Б, В) [14, 35].

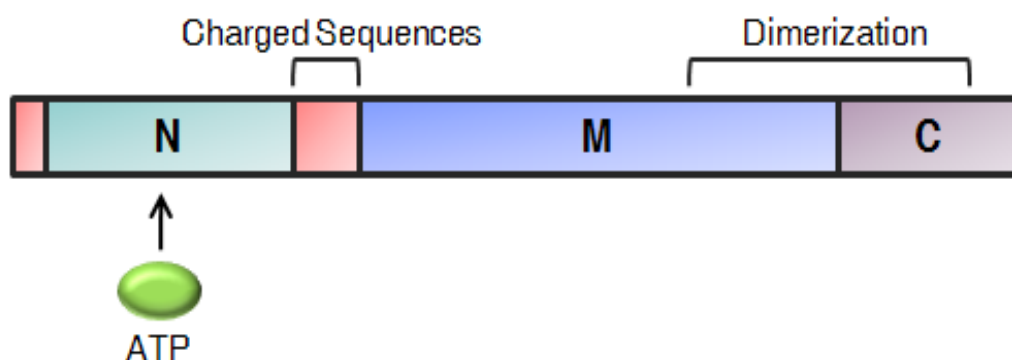
3.1.1.3. Шапероны семейства Hsp90

Шапероны Hsp90 (рис. 1) присутствуют в очень высоких концентрациях в цитозоле бактерий и эукариотов в физиологических условиях и еще более экспрессируются в условиях стресса. Эти шапероны обладают рядом особенностей. Во-первых, по отношению к субстратам они более «разборчивы», чем GroE или Hsp70 [37]. Во-вторых, они связывают не столько развернутые белки, сколько частично фолдированные [38]. В-третьих, Hsp90 выполняют свои функции совместно с группой кошаперонов, которые в определенном порядке связываются с Hsp90 во время цикла функционирования [14, 39].

Hsp90 – гомодимер, протомер которого состоит из трех последовательно связанных доменов (рис. 5A) (<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp90.php>): АТФ-связывающего N-концевого, центрального M-домена, отвечающего за взаимодействие с белками-мишенями и некоторыми кошаперонами, и C-концевого домена, ответственного за димеризацию Hsp90 [40]. За исключением заряженного линкера, расположенного между N- и M-доменами шаперона Hsp90 у эукариотов, эта структурная организация сохраняется от бактерий до человека [41].

В данной шапероновой системе участвует большое количество белков и более десятка кошаперонов (рис. 5Б). Одним из кошаперонов является Sti1/Нор, который связывается как с Hsp90, так и с Hsp70. Посредством этого комплекса, который содержит также дополнительный кошаперон, представляющий собой пролил-изомеразу (PPIase), белок-мишень переносится от Hsp70 к Hsp90. После того как Hsp90 связывает нуклеотид и кошаперон p23, Sti1/Нор и Hsp70 высвобождаются из комплекса. Связывание АТФ приводит к сближению субъединиц и возникновению контакта между N-доменами с образованием закрытой формы Hsp90, в которой происходит гидролиз АТФ.

(A)



(Б)

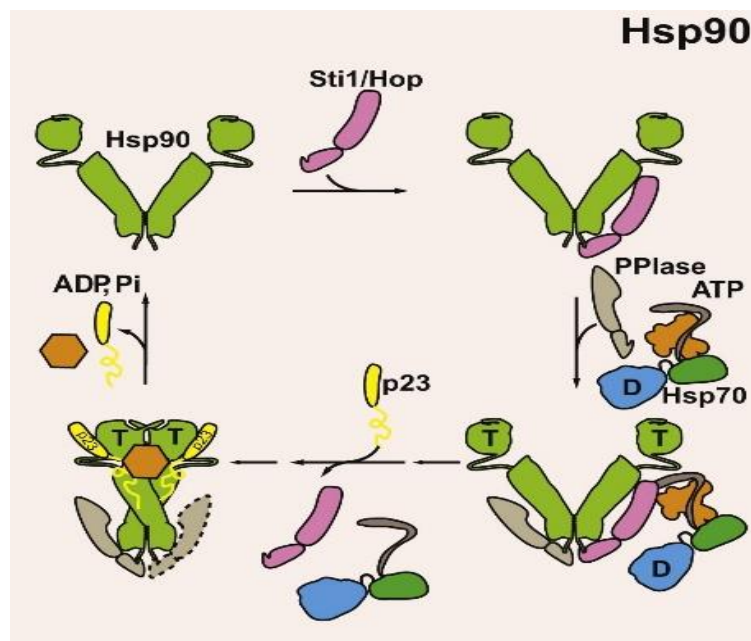


Рисунок 5. Доменная организация Hsp90 шаперона (А) (<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp90.php>) и цикл функционирования системы шаперона Hsp90 (Б) [14, 39].

N – N-концевой домен, М – центральный домен, С – С-концевой домен.

После гидролиза АТФ N-домены диссоциируют, высвобождаются белок-мишень, АDР и неорганический фосфат, и Hsp90 вновь принимает открытую конформацию. В отличие от взаимодействия с другими шаперонами белок-субстрат из комплекса с Hsp90 высвобождается в виде структурированного промежуточного соединения, которое затем подвергается рефолдингу (рис. 5Б) [14, 41].

3.1.1.4. Малые Hsp-белки

Малые белки теплового шока (sHsps), подобно Hsp-белкам других семейств в СКК, функционируют как молекулярные шапероны, препятствуя нежелательным белок-белковым взаимодействиям, и принимают участие в рефолдинге денатурированных белков (рис. 1) [42]. sHsps представляют собой наиболее распространенное, но низкоконсервативное семейство молекулярных шаперонов. Их общим отличительным признаком является наличие в центральной части последовательности домена размером около 100 а.о. со структурой, характерной для α -кристаллина хрусталика глаза млекопитающих [14, 25, 43]. sHsps обычно образуют крупные динамические олигомеры, зачастую состоящие из 24 субъединиц. В противоположность другим семействам шаперонов каждый олигомер sHsp способен удерживать по несколько молекул ненативных белковых субстратов, что позволяет рассматривать sHsp-белки в качестве «резервуаров»

ненативных белков, сохраняющих их для последующего рефолдинга с помощью других семейств шаперонов (рис. 6) [14, 25, 43, 44].

На рис. 6 показана схема функционирования шаперона Hsp25 в условиях теплового шока [45].

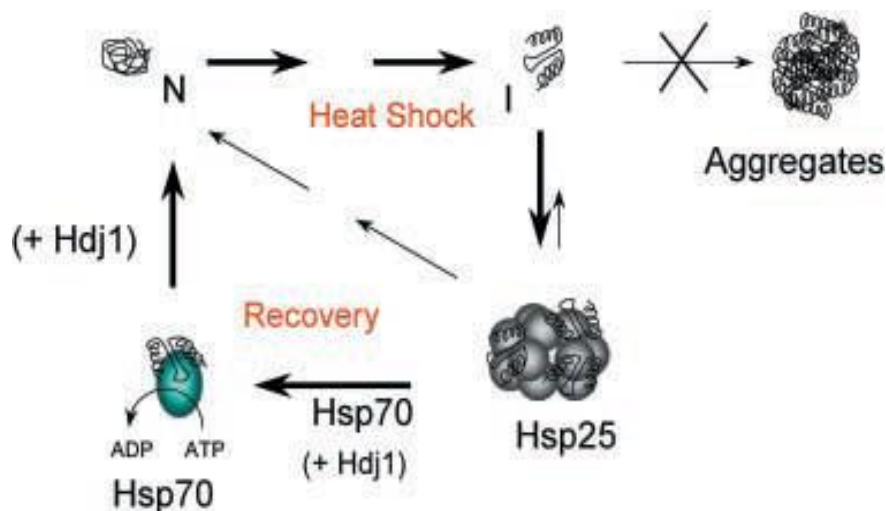


Рисунок 6. Предположительная схема функционирования шаперона Hsp25 при тепловом стрессе [45].

Разворачивание нативного белка (N) приводит к его переходу в промежуточное состояние (I), склонное к агрегации. Олигомерный комплекс шаперонов Hsp25 связывает значительные количества развернутого белка I, сохраняя его в растворимом состоянии, способном к рефолдингу. Далее в присутствии шаперона Hsp70, АТФ и некоторых кофакторов возможно высвобождение белка I и его рефолдинг до нативного состояния N.

3.1.1.5. Шапероны семейства Hsp100/Clp

Шапероны Hsp100/Clp также являются членами системы контроля качества внутриклеточных белков, представляющими суперсемейство AAA⁺-белков (АТФ-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) (рис. 1), которые используют энергию гидролиза АТФ для ремоделирования белков-субстратов [46]. Hsp100-семейство в бактериях представлено белками ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX, ClpY (HslU) и некоторыми другими (в частности, АТФ-азными составляющими Lon- и FtsH-протеаз) (рис. 7). У эукариот представители данного семейства (Hsp104, Hsp101, Hsp78 и др.) встречаются в митохондриях клеток млекопитающих и дрожжей, а также в пластидах растений [14].

Белки семейства Hsp100 разделяются на два класса по количеству АТФ-азных составляющих: к классу 1 (I) относятся белки, включающие два так называемых AAA⁺-модуля (NBD-1 и NBD-2 на рис. 7), а к классу 2 (II) – белки, содержащие только один такой

модуль. Представленные на рис. 7 белки Hsp104, ClpB и Hsp78 функционируют исключительно как шапероны, в то время как белки ClpA, ClpC, ClpX и HslU в комплексах с протеолитическими составляющими (белками ClpP или HslV) участвуют в селективной деградации внутриклеточных белков.

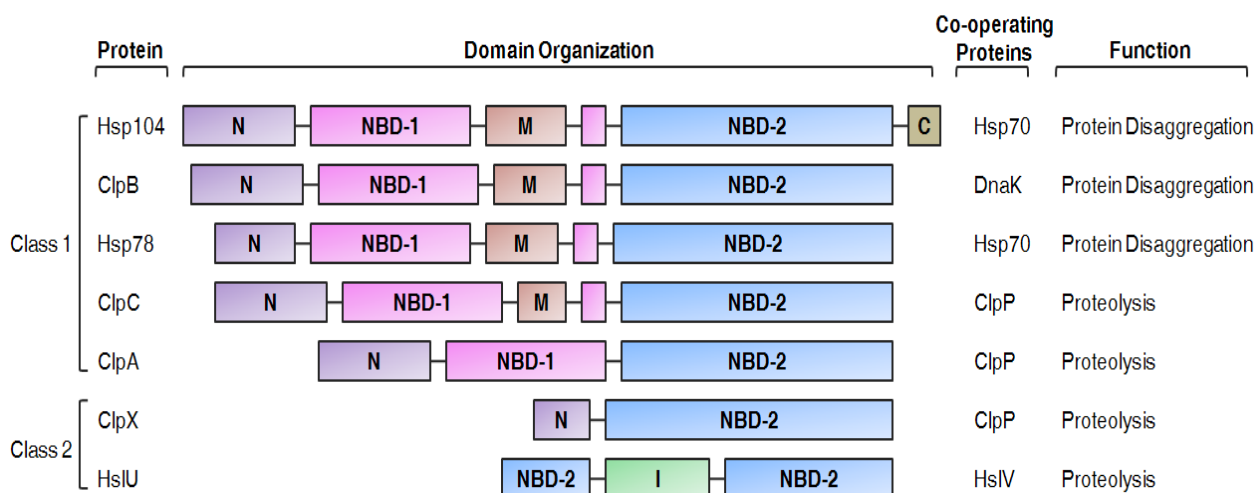


Рисунок 7. Доменная организация субъединиц Hsp100/Clp

(<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp100.php>).

N – N-концевой домен, NBD – нуклеотидсвязывающий домен, M – вставочный (middle) домен, I – инсерционный домен, C – C-концевой домен.

Наиболее изученными представителями семейства Hsp100 являются бактериальные шапероны ClpB и Hsp104-белок из дрожжей.

На рис. 8А показана схема ремоделирования белков-субстратов шаперонами Hsp100/Clp. Субстраты через неструктурированные области, содержащие мотивы узнавания, взаимодействуют с шаперонами Hsp100/Clp-семейства (стадия i). Связывание нуклеотида стабилизирует бочкообразную гексамерную структуру шаперона. Субстраты подвергаются разворачиванию путем «принудительной» транслокации через центральный канал Hsp100/Clp с использованием энергии гидролиза АТФ (стадия ii). Развернутые белки высвобождаются (iii) из комплексов с шаперонами благодаря энергии гидролиза АТФ, и подвергаются рефолдингу – либо спонтанному (стадия iv), либо с участием молекулярных шаперонов других семейств, в зависимости от специфичности субстрата [47].

Характерной особенностью Hsp100-белков (ClpB, Hsp104), отличающей их от других семейств молекулярных шаперонов СКК, является проявление ими дезагрегационной активности, обусловленное наличием в их первом AAA⁺-модуле вставочного пропеллерообразного домена (middle (M) domain) с coiled-coil конформацией [48]. Белки ClpB и Hsp104 выполняют дезагрегационную функцию совместно с белками

системы шаперонов Hsp70/DnaK (рис. 8Б). Компоненты Hsp70/DnaK-системы взаимодействуют с Hsp104/ClpB-шаперонами и оказывают воздействие на агрегированный белок либо до действия Hsp104/ClpB, либо в сочетании с Hsp104/ClpB.

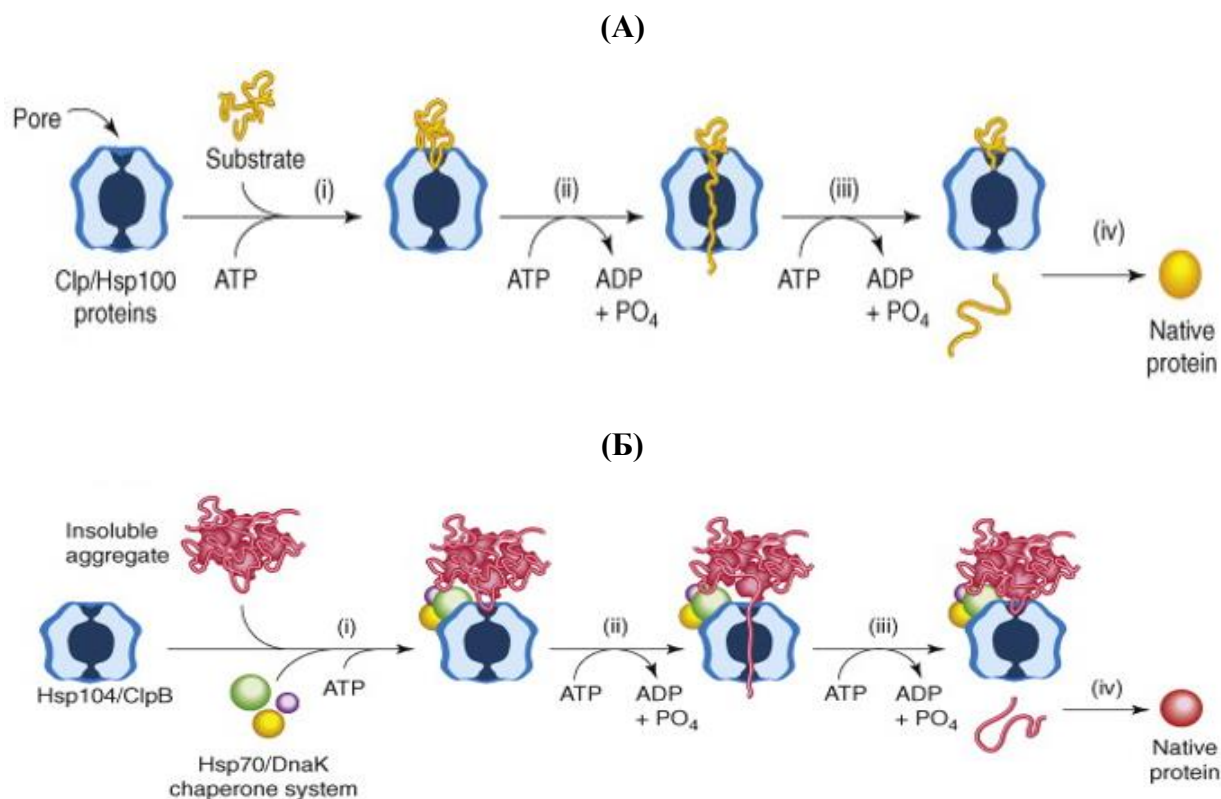


Рисунок 8. Участие Hsp100/Clp-шаперонов в ремоделировании (А) и дезагрегации клеточных белков (Б) (по данным работы [47]).

Роль Hsp70/DnaK-системы, заключается в предоставлении субстратов Hsp104/ClpB-шаперону (i), а также в дополнительном координировании гидролиза АТФ шапероном. Считается, что Hsp70/DnaK-система способствует изменению физических свойств агрегатов на начальных этапах дезагрегации и необходима для представления неструктурированных участков агрегатов Hsp104/ClpB-шаперону. Предполагается, что взаимодействие Hsp70/DnaK- и Hsp104/ClpB-систем осуществляется через подвижный М-домен, локализованный на внешней поверхности гексамерного кольца Hsp104/ClpB. М-домен принимает различные конформации – «горизонтальную» и «наклонную», которым соответствуют «подавленное» и «активированное» состояния Hsp104/ClpB-шаперона и, таким образом, он может выступать как молекулярный переключатель дезагрегационной активности Hsp104/ClpB [46]. В «подавленном» состоянии М-домен шаперона взаимодействует с ААА⁺-1-доменом соседней субъединицы, что ограничивает подвижность М-домена, тогда как в «активированном» состоянии он более гибок. Важно отметить, что

M-домен может связываться с Hsp70/DnaK-системой только в «диссоциированном» состоянии (вне взаимодействия с соседней субъединицей), и это приводит к перемещению агрегированных белков к аксиальному каналу Hsp104/ClpB. При этом следует отметить, что вспомогательную роль во взаимодействии шаперона с агрегатами играет также N-домен Hsp104/ClpB-шаперона. Извлеченный полипептид транслоцируется через центральный осевой канал гексамера Hsp104/ClpB с использованием энергии гидролиза АТФ (стадии i-iii), в результате чего происходит разворачивание полипептида с последующим высвобождением в среду, где развернутый полипептид рефолдируется или спонтанно, или с помощью других шаперонов, в число которых могут входить в том числе компоненты системы Hsp70/DnaK (iv) [46, 47].

3.1.2. Внутриклеточные АТФ-зависимые протеазы

АТФ-зависимые протеазы, также относящиеся к суперсемейству AAA⁺-белков, присутствуют во всех живых организмах и являются критическими регуляторами состава клеточного протеома (рис. 1). Энергозависимый протеолиз отвечает за деградацию более чем 90% белков внутри клетки. Этот процесс важен для контроля качества дефектных, неправильно свернутых или агрегированных белков, а также для регуляции протеолиза при обычных условиях путем контроля концентрации большинства регуляторных белков [49-51]. В прокариотических и эукариотических органеллах бифункциональные энергозависимые протеазы представлены пятью семействами ферментов: ClpAP, ClpXP, Lon, HslUV и FtsH. В археях аналогичные функции выполняются архейной протеасомой, которая состоит из протеасомаактивирующей нуклеотидазы (PAN), работающей в комплексе с протеолитическим компонентом – 20S-протеасомой; в цитоплазме и ядрах эукариот такие же функции выполняются мультисубъединичным протеолитическим комплексом – 26S-протеасомой [52, 53]. Эти различные протеазы и протеолитические комплексы демонстрируют невысокую консервативность последовательностей вне АТФ-связывающих доменов, но в то же время формируют общую архитектуру: олигомерные бочкообразные комплексы, включающие от одного до нескольких колец с активными сайтами протеолиза, изолированными внутри центральной деградационной камеры. В камеру деградации белки попадают только в развернутом состоянии [54]. Общим для АТФ-зависимых протеаз является наличие АТФ-азного региона (AAA⁺-модуля), который преобразует энергию АТФ в механическую работу, необходимую для инициации деградации субстрата. Процесс деградации субстрата можно разделить на четыре этапа (рис. 9): узнавание белковой мишени, ее разворачивание и транслокация в деградационную

камеру осуществляется АТР-азным компонентом AAA^+ -протеазы, а собственно гидролиз белка-субстрата – протеолитическим [55].

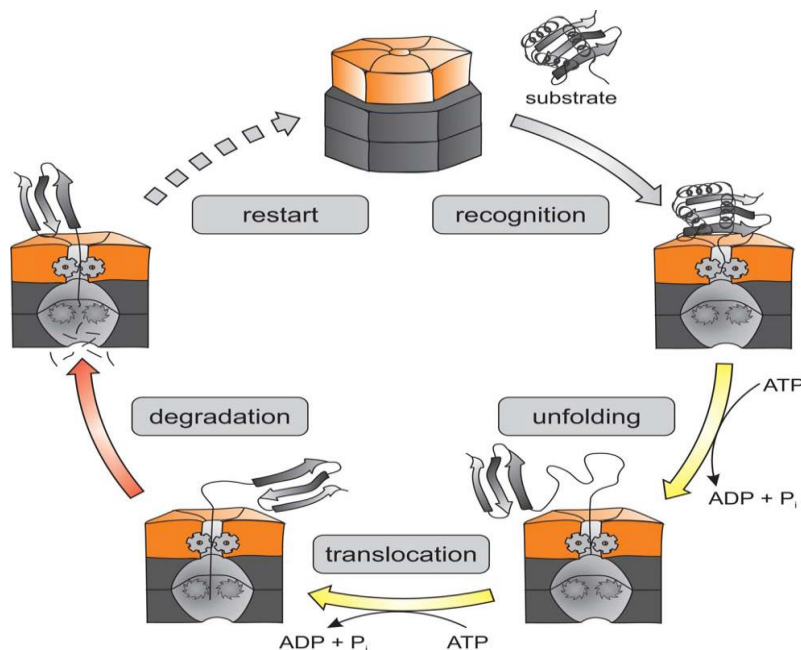


Рисунок 9. Механизм действия AAA^+ -протеаз [55]. Анфолдазный (АТР-азный) домен – оранжевый, протеазный – серый. Субстратное узнавание и деградация – АТР-независимые процессы, а разворачивание и транслокация субстрата – АТР-зависимые.

Этап узнавания субстрата, как правило, является АТР-независимым, и может быть либо прямым, либо косвенным, т.е. опосредованным адаптерными белками. Многие белковые субстраты содержат мотивы, так называемые дегроны, которые способствуют процессу узнавания. Часто, дегроны – это неструктурированные терминальные концы белка. Одним из ярких примеров является фрагмент SsrA-tag – AAXXXXXALAA (где X – любая аминокислота), который узнается протеазами ClpAP, ClpXP, FtsH, Lon и архейной протеасомой [54].

АТР-зависимые протеазы отличаются от классических протеолитических ферментов следующими уникальными характеристиками: (1) высокой селективностью взаимодействия с белковыми мишенями при отсутствии выраженной специфичности по отношению к аминокислотам, образующим расщепляемые связи; (2) сопряжением протеолитической активности с гидролизом АТР; (3) процессивным механизмом деградации белков-субстратов (с образованием 10-15-членных пептидных продуктов без высвобождения высокомолекулярных интермедиатов); (4) мультисубъединичной (гомо- или гетероолигомерной) организацией [49, 56, 57].

3.1.2.1. AAA⁺-модуль – характеристический компонент АТР-зависимых протеаз

Представители суперсемейства AAA⁺-белков обычно содержат в своей структуре N-концевой (или инсерционный) домен (экстрадомен) и высококонсервативный АТР-азный модуль (NBD), состоящий из 200–250 аминокислотных остатков (а.о.) (рис. 7). АТР-азный или AAA⁺-модуль формируется основным нуклеотидсвязывающим (NB) и дополнительным С-концевым α-спирализованным (H) доменами [58-60]. Любой AAA⁺-белок содержит один или два топологически подобных AAA⁺-модуля, включающих набор различных консенсусных фрагментов (рис. 10) [55].

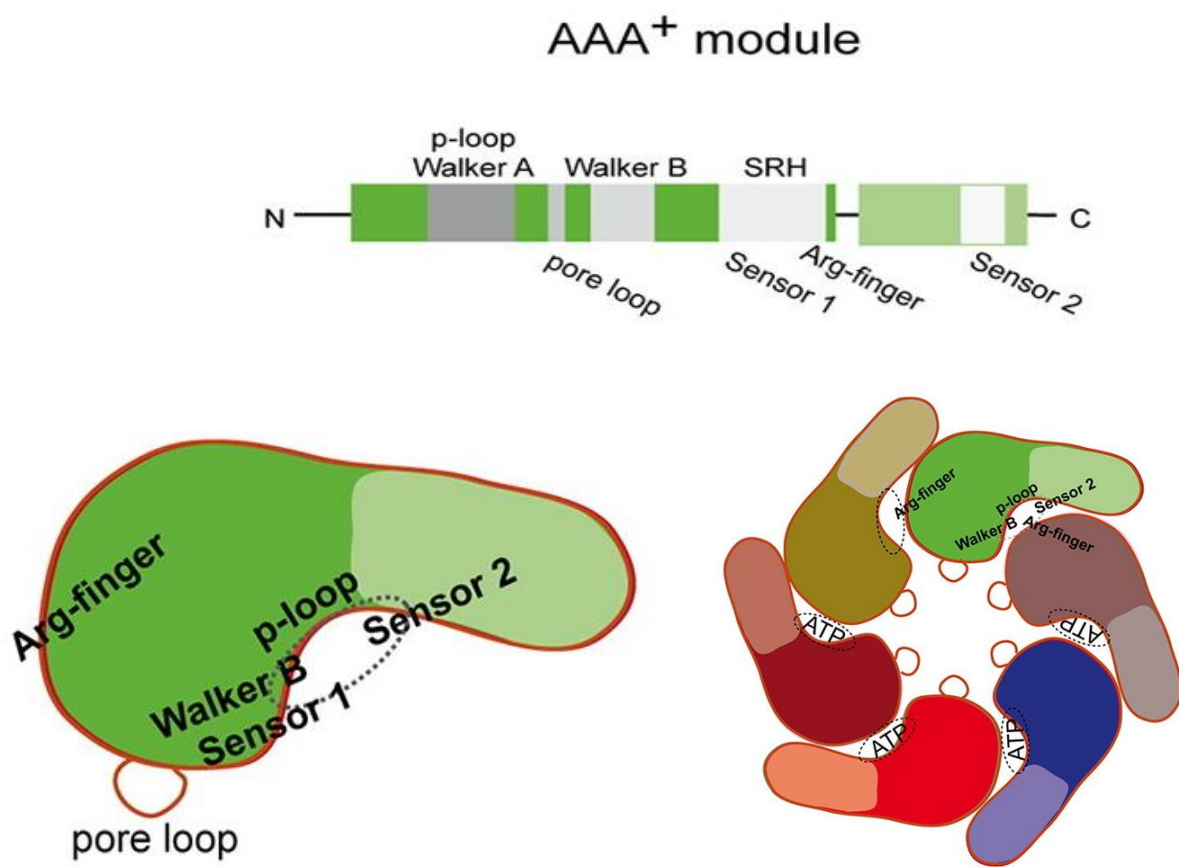


Рисунок 10. Структурная организация и ключевые элементы AAA⁺-модуля [61]. Примерное расположение ключевых элементов – мотивов Уолкера А и В, остатка Sensor 1, области вторичной гомологии (SRH), «аргининового пальца» (Arg-finger), локализованных в NB-домене, и остатка Sensor 2 из H-домена (линейная диаграмма). Внизу слева приведена 2D-иллюстрация фолдированного AAA⁺-модуля. Внизу справа показан принцип формирования гексамерного кольца со связанными молекулами АТР, расположенными между AAA⁺-субъединицами.

Консенсусный мотив Уолкера А (называемый также Р-петлей, Р-loop), который играет важную роль как в олигомеризации гексамерного АТР-азного кольца, так и в связывании нуклеотида и координации иона металла, представлен последовательностью GX₂GZGK[ST], где X и Z – любые аминокислоты, но хотя бы один из X-остатков является

остатком пролина, а мотив Уолкера В – фрагментом Φ_4DE , где Φ – остатки гидрофобных аминокислот. Наряду с координацией иона металла мотив Уолкера В принимает участие в гидролизе АТФ. AAA^+ -модуль содержит также ряд других консервативных мотивов, включая «аргининовый палец» (Arg-finger), Sensor 1-, Sensor 2- и SRH-последовательности (рис. 10) [55, 61, 62].

Мотив Sensor 1 содержит консервативный полярный остаток аспарагина, треонина или гистидина. Sensor 1 критически важен для функционирования AAA^+ -белков и участвует в гидролизе нуклеотида путем координации взаимодействия атакующей воды с остатками мотива Уолкера В. Мотив Sensor 2 содержит консервативный остаток аргинина, который взаимодействует с γ -фосфатом АТФ и выполняет ряд важных функций, включая связывание/гидролиз нуклеотида, а также участвует в межсубъединичных взаимодействиях.

Важной характеристикой AAA^+ -АТФ-аз является наличие так называемых «аргининовых пальцев», роль которых рассматривается аналогичной роли соответствующих остатков в устройстве нуклеотидсвязывающего кармана в небольших GTP-азах [25]. В активном олигомере эти остатки находятся в непосредственной близости от γ -фосфата АТФ, связанного в соседней субъединице.

Все AAA^+ -белки содержат следующую за мотивом Уолкера В область, называемую вторичной областью гомологии (second region of homology, SRH) [63]. Этот фрагмент полипептидной цепи образован 15–20 а.о. (рис. 10). SRH включает охарактеризованные выше остатки Sensor 1 и «аргининовый палец» (Arg-finger), вовлеченные в гидролиз АТФ. Эти мотивы координируют гидролиз нуклеотида и передают конформационные изменения, следующие за актом гидролиза, между субъединицами AAA^+ -комплекса. Благодаря функциональной значимости и отсутствию SRH в других нуклеотидтрифосфатазах (NTP-азах), эта область служит отличительной характеристикой белков AAA^+ -суперсемейства.

Следует упомянуть, что остатки «аргининовый палец», Sensor 1 и Sensor 2 сохраняются не у всех членов AAA^+ -суперсемейства. Более того, классические AAA -АТФ-азы часто не содержат остатка Sensor 2 [25, 62].

3.1.2.2. Доменная организация АТФ-зависимых протеаз

Как показано выше (рис. 7) суперсемейство AAA^+ -белков делится на классы I и II [64, 65]. В первом случае AAA^+ -белки содержат два AAA^+ -модуля (AAA -1 (или D1) и AAA -2 (или D2)), разделенных вставками разной длины, а во втором – один AAA^+ -модуль, гомологичный D2-модулю. Сообщество АТФ-зависимых протеаз объединяет

представителей обоих классов AAA^+ -белков: к классу II относятся протеазы LonA, LonB, FtsH, ClpXP, HslUV и PAN/20S-протеасомы, а к классу I – ClpAP/CP/EP-протеазы (рис. 11).

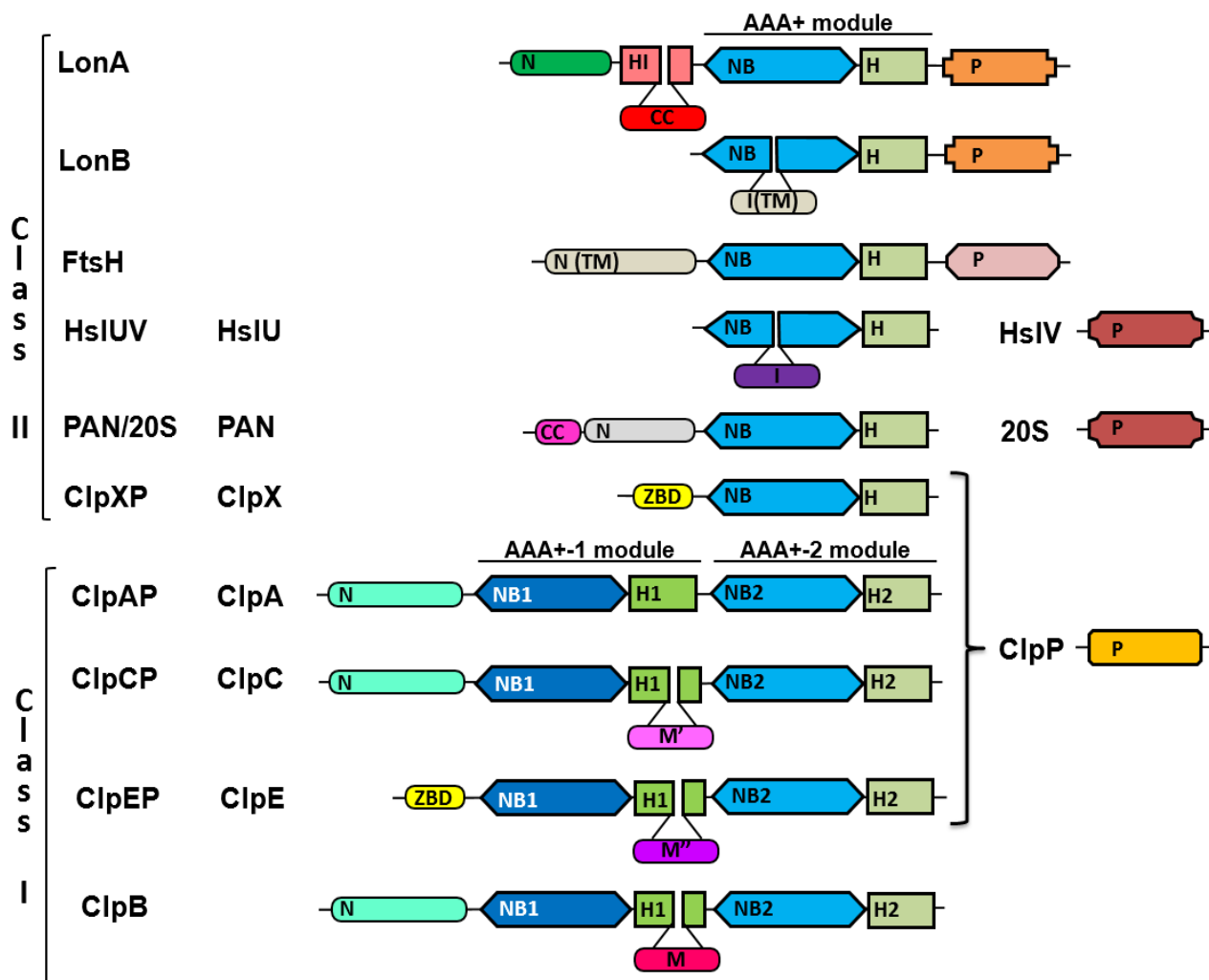


Рисунок 11. Архитектура AAA^+ -белков системы контроля качества.

N и ZBD – N-концевые домены; NB, NB1 и NB2 – нуклеотидсвязывающие домены; H, H1, H2 и H1 – α -спирализованные домены; I – вставочные или инсерционные домены; TM – трансмембранные домены; CC – coiled-coil области; M, M' и M'' – «серединные» вставочные домены с coiled-coil конформацией; P – протеолитические домены/субъединицы (кланы в классификации MEROPS: SJ (Lon), MA (FtsH), PB (HslV и 20S), SK (ClpP)). Пары доменов (NB-H), (NB1-H1) и (NB2-H2) формируют соответствующие AAA^+ -модули.

Известно, что подавляющее большинство AAA^+ -белков взаимодействует с функциональными белковыми партнерами, образуя комплексные гетероолигомерные структуры, АТФ-азные составляющие которых представлены самостоятельными субъединицами [62, 66]. В редких случаях АТФ-азный и функциональный компоненты AAA^+ -белка локализованы в единой полипептидной цепи [67, 68].

На рис. 11 показана доменная организация АТФ-зависимых протеаз и ClpV-шаперонов системы контроля качества белков. Видно, что в протеазах трех семейств – LonA, LonB и FtsH – АТФ-азная и протеолитическая составляющие локализованы в единой

полипептидной цепи, и эти ферменты функционируют как гомоолигомеры, а их АТР-азные компоненты, включающие единственный AAA^+ -модуль, относятся к AAA^+ -белкам класса II.

В то же время большинство AAA^+ -протеаз являются гетероолигомерными комплексами, в которых АТР-азный и протеолитический компоненты представлены индивидуальными субъединицами. При этом АТР-азные составляющие протеаз ClpAP, ClpCP и ClpEP относятся к классу I AAA^+ -белков, а протеаз HslUV, ClpXP и комплекса PAN/20S – к классу II.

Особенностью протеаз ClpCP и ClpEP, как и в случае ClpB-шаперонов, служит наличие в α -спирализованных доменах (H1) их первых AAA^+ -модулей вставочных «серединных» (middle) или «линкерных» доменов (M' и M''), обладающих coiled-coil-конформацией, но различающихся размерами. Показано, что эти домены участвуют во взаимодействии протеаз со специфическими адаптерными белками, которые опосредуют связывание и деградацию белковых мишеней (рис. 11) [69, 70]. Надо подчеркнуть, что M-домены ClpB более чем вдвое превышают M' - и M'' -домены по размеру и выполняют другие функции – они обеспечивают, как уже было отмечено ранее (раздел 3.1.1.5), дезагрегазную активность шаперонов [71].

Разнообразие протеолитических компонентов АТР-зависимых протеаз и протеасом, вовлеченных в селективный АТР-зависимый протеолиз, отражено в табл. 1. Из табл. 1 и рис. 11 видно, что внутриклеточный гидролиз белков осуществляется пептидгидролазами, представляющими четыре разных клана в классификации пептидгидролаз MEROPS: каталитический центр протеолитической субъединицы (ClpP) гетероолигомерных протеаз ClpAP, ClpCP, ClpEP и ClpXP представлен классической триадой Ser–His–Asp, у протеаз HslUV/CodWX, а также протеасом архей и эукариотов каталитически активным является N-концевой остаток (Thr или Ser), в активных центрах протеаз LonA и LonB функционирует каталитическая диада Ser–Lys, а мембраносвязанная протеаза FtsH является Zn-зависимой металлопротеазой.

Специфические для каждого семейства AAA^+ -протеаз и протеасом экстрадомены (рис. 11) часто служат местами связывания субстратов или адаптерных белков [67]. Обычно экстрадомен – это либо переменный «не-АТР-азный» N-концевой домен (N-домен), предшествующий AAA^+ -модулям, либо вставочный домен (I-домен), локализованный внутри NB-домена между мотивами Уолкера А и В (рис. 11, табл. 2) [59, 64, 67]. Экстрадомены выполняют функцию первичного узнавания субстрата-мишени, а также играют вспомогательную роль в разворачивании субстрата и/или контролируют доступ мишеней к связывающим центрам, локализованным внутри AAA^+ -модуля.

Таблица 1. АТР-зависимые протеазы и протеолитические комплексы, осуществляющие селективный внутриклеточный протеолиз [56].

Протеаза или протеолитический комплекс	Субъ-единицы	А.о., <i>n</i> *	Мол. масса, Да (число субъединиц)**	Класс AAA+- АТР-азы	Тип протеолитического активного центра (каталитические остатки)	MEROPS		
						Клан	Семейство	
В клетках бактерий (<i>Escherichia coli</i>)								
Lon (La, подсемейство А)	Lon	784	87300 (6, 12?)	II	Серин – лизиновая протеаза (<i>Ser679, Lys722</i>)	SJ	S16	
FtsH (HflB) (мембраносвязанная)	FtsH	633	70700 (6)	II	Zn-зависимая металлопротеаза (<i>His414-Glu-Ala-Gly-His</i>)	MA	M41	
ClpAP/XP	ClpAP (Ti)	ClpA ClpP	758 207	84200 (12) 21000 (14)	I	Сериновая протеаза (<i>Ser111, His136, Asp185</i>)	SK	S14
	ClpXP	ClpX ClpP	424 207	46200 (12) 21000 (14)	II			
HslUV/ CodWX	HslUV (ClpYQ)	HslU HslV	443 176	49600 (12) 19000 (12)	II	Треониновая протеаза (<i>Thr1</i>)	PB	T1B
	CodWX (в <i>B. subtilis</i>)	CodX CodW	467 175	52500 (12) 19500 (12)	II			
В клетках археобактерий (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)								
Lon (подсемейство В) (мембраносвязанная)	Lon	621	68300 (6)	II	Серин – лизиновая протеаза (<i>Ser509, Lys552</i>)	SJ	S16	
Протеасома	Рап-комплекс 20S протеасома		(12, 600 кДа) (28, 700 кДа)	II	Треониновые протеазы (<i>Thr1</i>)	PB	T1A	
В клетках эукариотов								
26S-протеасома	19S-комплекс 20S-протеасома		(17, 890 кДа) (28, 720 кДа)	II	Треониновые протеазы (<i>Thr1</i>)	PB	T1A	

* – А.о., *n* – количество аминокислотных остатков

** – для протеасом в скобках указана мол. масса комплексов

Таблица 2. Типы АТР-азных компонентов AAA⁺-протеаз и протеолитических комплексов.

Протеаза или протеолитический комплекс	Субъединицы, содержащие AAA ⁺ -модули	Количество субъединиц в функциональном ферменте	Характеристика АТР-азного компонента		
			Локализация в четвертичной структуре	Количество AAA ⁺ -модулей	Экстрадомен*
LonA	LonA	6	Домен	1	N
LonB	LonB	6	Домен	1	I
FtsH	FtsH	6	Домен	1	N
ClpAP/CP/EP	ClpA/C/E	12	Субъединица	2	N
ClpXP	ClpX	12	Субъединица	1	N
HslUV, CodWX	HslU, CodX	12	Субъединица	1	I
Протеасома архей	Pan	6 или 12	Субъединица	1	N
26S-протеасома эукариотов	Rpt(1-6) в 19S-комплексе	6 или 12	Субъединица	1	N

* – **N** – N-концевой экстрадомен, **I** – вставочный или инсерционный экстрадомен.

В LonB и FtsH трансмембранные экстрадомены встроены в клеточные мембраны. Обеспечение селективности при отборе субстратов AAA⁺-белками часто связано с использованием вспомогательных белков-адаптеров (рис. 12). Последние участвуют в распознавании мишеней посредством специфического связывания и с мишенью и с AAA⁺-партнерным белком [64]. Большинство адаптеров связываются с N-концевым доменом AAA⁺-белка, чем обеспечивают идеальное взаиморасположение AAA⁺-олигомера и «заякоренной» через этот белковый линкер мишени.

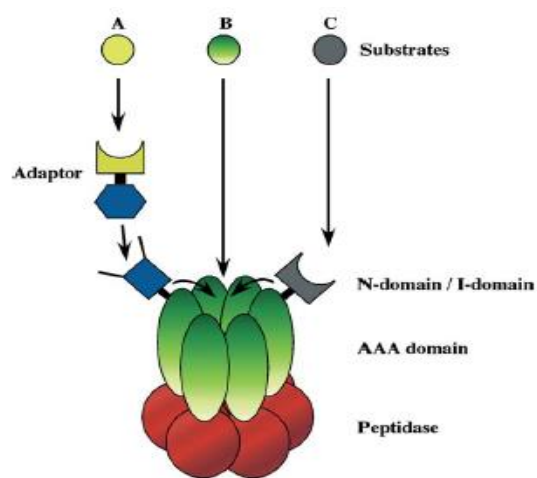


Рисунок 12. Механизмы связывания субстратов AAA⁺-белками (по данным работы [56]).

- А – связывание через белок-адаптер;
- В – непосредственное связывание с AAA⁺-модулем;
- С – связывание через экстрадомен.

Функционально активной формой бактериальных гетероолигомерных АТФ-зависимых протеаз (ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP и HslUV) являются бочкообразные комплексы из четырех состыкованных колец, в которых два центральных пептидазных кольца (гептамерных в случае ClpP или гексамерных в случае HslV) с каталитическими центрами, обращенными внутрь полости, фланкированы с обеих сторон гексамерными кольцами регуляторных АТФ-азных субъединиц (ClpA, ClpC, ClpE, ClpX или HslU), выполняющих функции узнавания, разворачивания и транслокации субстрата (рис. 13А) [55, 72]. Гомоолигомерные протеазы Lon и FtsH собираются в бочкообразные структуры из шести идентичных субъединиц (рис. 13Б) [73].

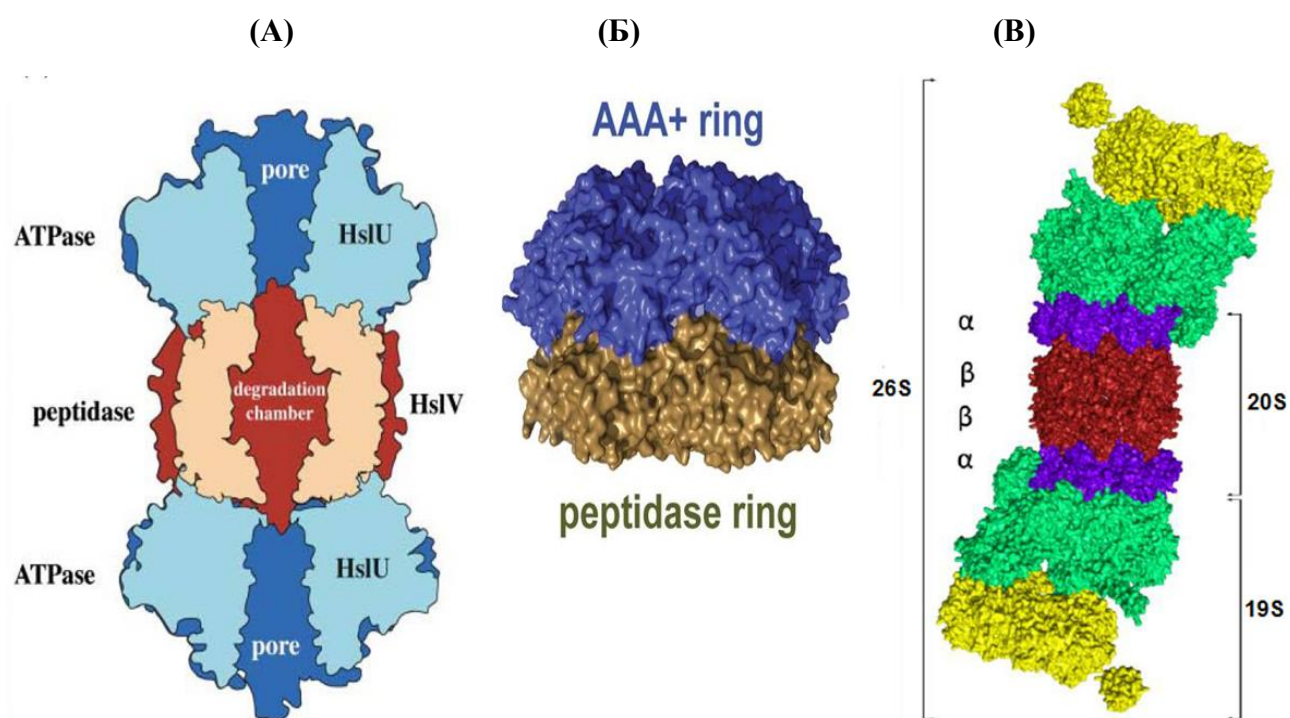


Рисунок 13. Олигомерное устройство AAA⁺-протеаз: HslUV (А), FtsH (Б) и 26S-протеасомы (Б) (по данным работ [72-74]). 19S – регуляторный комплекс, 20S – протеолитический кор.

Недавно было показано, что Lon-протеаза из *E. coli* способна формировать также некоторое количество додекамеров, представляющих два гексамера Lon, соединенных друг с другом посредством N-концевых областей [73]. Однако сведений о функциональных свойствах таких додекамеров не приведено.

Аналогично бактериальным AAA⁺-протеазам формируются более сложные мультисубъединичные комплексы протеасом архей и эукариотов, у которых протеолитические компоненты (20S) представляют тетраэрусные кольца из внутренних каталитических β-субъединиц и внешних регуляторных α-субъединиц.

Регуляторные 19S-комплексы протеасом, обладающие АТР-азной активностью, содержат 17 субъединиц у эукариотов и 12 субъединиц у архей, при этом их структуры включают гексамерные кольца AAA^+ -белков (рис. 13В) [74]. Следует отметить, что в отличие от АТР-зависимых протеаз бактерий и протеасом архей функционирование 26S-протеасом эукариотов включает этап предварительной селективной модификации белков-мишеней, подлежащих деградации, путем ковалентного присоединения небольшого белка убиквитина.

На рис. 14 представлен общий принцип функционирования АТР-зависимых протеаз. Распознавание и связывание белка-мишени (ТР – target protein) осуществляется регуляторными AAA^+ -компонентами (RC – regulatory complexes), локализованными во внешних кольцах активного комплекса фермента. На следующих этапах происходит разворачивание молекулы субстрата и транслокация ее в область протеолитических центров. Внутри мультисубъединичного ферментного комплекса осуществляется процессивный гидролиз субстрата с последующим высвобождением продуктов. Образовавшиеся олигопептидные фрагменты могут в дальнейшем гидролизироваться АТР-независимыми протеазами до коротких пептидов и, наконец, клеточными аминопептидазами до свободных аминокислот.

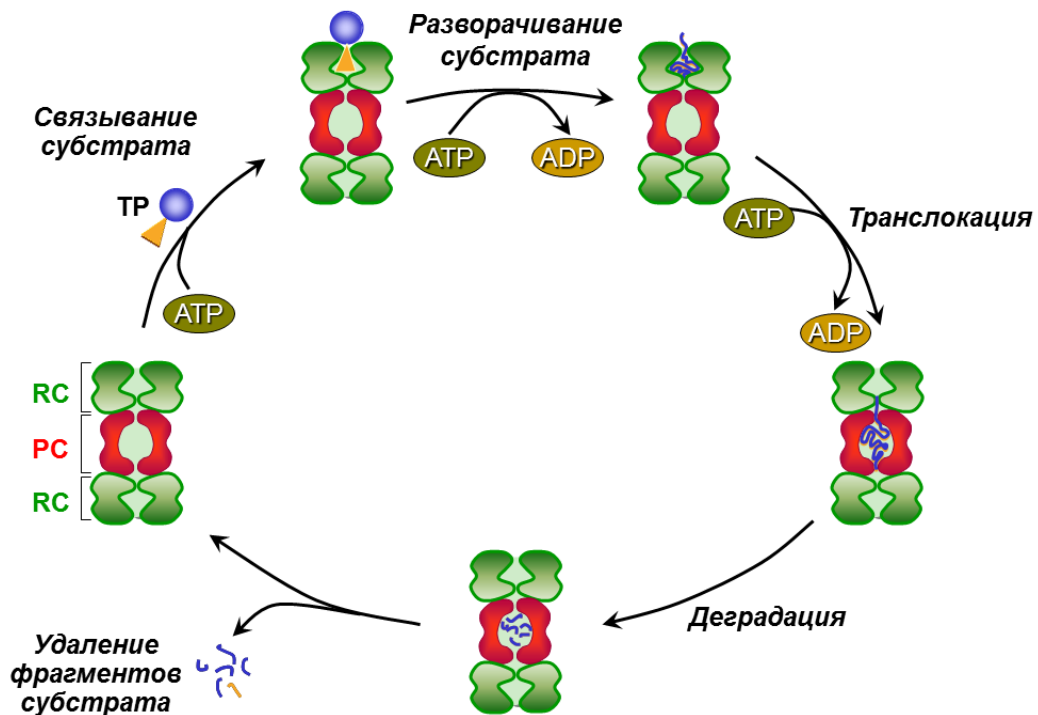


Рисунок 14. Общность механизма АТР-зависимой деградации белков в клетках бактерий, архей и эукариотов.

RC – регуляторный АТР-азный компонент (ClpA/X, HslU, Pap или 19S-комплекс);

PC – протеолитический компонент (ClpP, HslV или 20S-протеасома); TP – белок-мишень.

3.1.2.3. Некаталитические экстрадомены АТР-зависимых протеаз

Независимо от количества АТР-азных компонентов в AAA⁺-белках, в их структурах, кроме высокоподобных AAA⁺-модулей, содержатся различающиеся вспомогательные домены (экстрадомены) – N-концевые (N) или инсерционные (I) (см. раздел 3.1.1.5, рис. 7). В AAA⁺-белках системы контроля качества обнаружены как N-концевые (в белках LonA, FtsH, ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX и PAN), так и вставочные (LonB и HslU) экстрадомены (рис. 11). Чаще всего вспомогательные домены участвуют в связывании субстратов и/или адаптерных белков.

N-Домены Clp-шаперонов

α -Спирализованные N-концевые экстрадомены АТР-аз ClpA, ClpB и ClpC (рис. 11) проявляют высокую гомологию на уровне первичных и вторичных структур [75, 76]. Эти домены содержат по восемь α -спиралей, формирующих танделы из двух структурных повторов, каждый размером около 70 а.о., которые включают по четыре α -спирали (рис. 15).

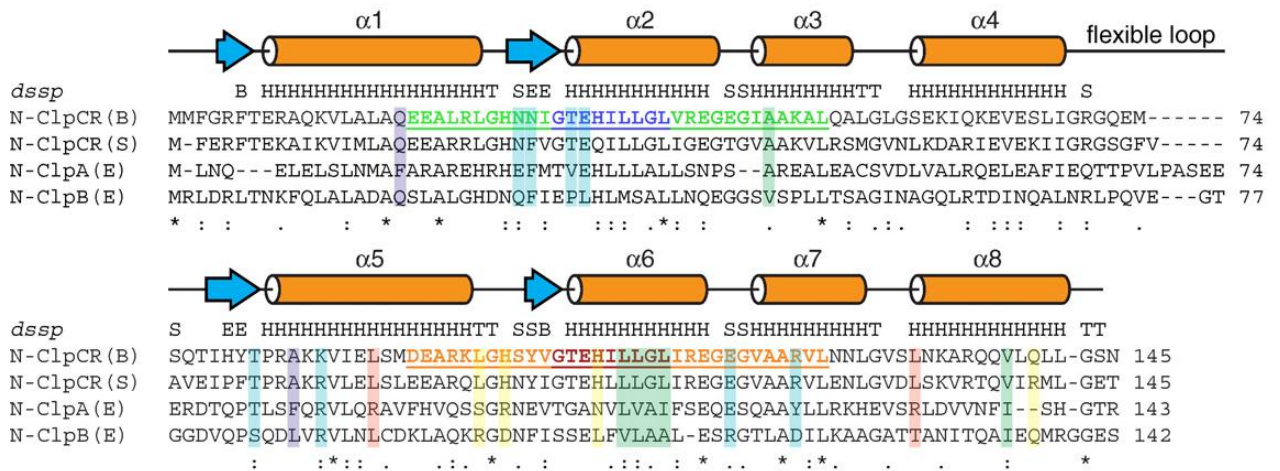


Рисунок 15. Вторичные структуры и выравнивание N-концевых доменов шаперонов ClpA, ClpB и ClpC (ClpCR – фрагмент 1–145) [76]. Источники белков: В – *B. subtilis*; Е – *E. coli*; S – *S. elongates*. Элементы вторичной структуры: Н – α -спираль, В или Е – β -тяж, Т – поворот; степени подобия остатков: * – идентичный, : – высококонсервативный, · – подобный. Повторяющиеся области выделены жирным шрифтом и подчеркнуты (подобные – зеленый/оранжевый цвета, идентичные – синий/красный цвета).

Считается, что N-домены шаперонов ClpA, ClpB и ClpC выполняют роль регуляторов их специфичности и обеспечивают взаимодействие с широким набором субстратов-мишеней [76, 77]. На примере ClpA показано, что собственно N-домен не всегда играет критическую роль в распознавании, разворачивании и транслокации белковых субстратов, поскольку фрагмент шаперона, лишенный N-домена (dN-ClpA),

оказался способным как к АТФ-зависимой олигомеризации, так и к гидролизу АТФ и к деградации (в комплексе с ClpP-пептидазой) некоторых белковых субстратов (в частности, казеина и двух SsrA-меченых белков, GFP-ssrA и λ N-cl-ssrA). Однако, надо отметить, что во всех случаях активность dN-ClpAP была значительно понижена по сравнению с активностью ClpAP-протеазы дикого типа [75]. Вместе с тем N-домен ClpA имеет исключительное значение для образования активного комплекса с ClpP-пептидазой [78].

В последнее время установлено, что взаимодействие Clp-шаперонов с белковыми мишенями преимущественно опосредуется специфическими белками-адаптерами (рис. 16) [79]. Кроме того, обнаружено, что некоторые адаптерные белки могут модулировать активности AAA⁺-белков. При этом сами белки-адаптеры также могут подвергаться регуляции (например, взаимодействием с небольшими белками-антиадаптерами и/или фосфорилированием) [79].

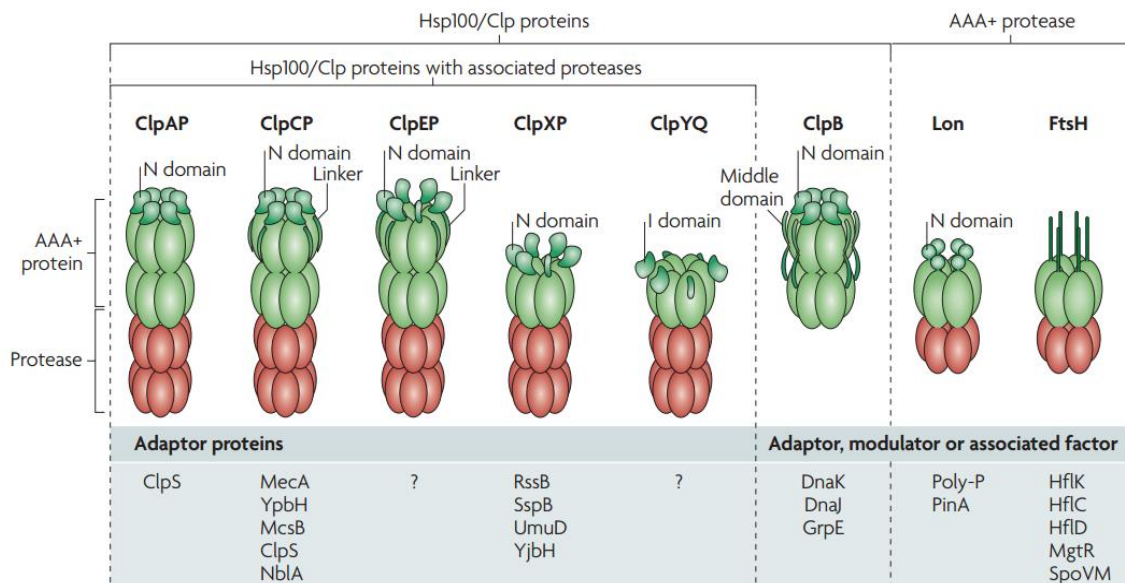


Рисунок 16. Состав и структура AAA⁺-протеаз и протеолитических комплексов, включающих шапероны семейства Hsp100/Clp [79]. Источники приведенных AAA⁺-белков – *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Перечислены идентифицированные адаптеры и/или белки-модуляторы. AAA⁺-модули и связанные с ними домены, участвующие во взаимодействии с адаптерами или модуляторами, показаны зеленым цветом, а протеазные субъединицы или домены – красным.

В случае шаперона ClpA показано, что связывание N-доменом адаптерного белка ClpS приводит к ингибированию деградации SsrA-меченых белков – известных субстратов ClpAP. В то же время комплекс ClpAP/ClpS обнаруживает способность к распознаванию и расщеплению некоторых белков, агрегированных под действием теплового шока. Таким образом, связывание ClpS модифицирует специфичность ClpA и перенаправляет активную функцию ClpAP на деградацию агрегированных белков [80].

Для ClpC из *B. subtilis* известен целый ряд адаптерных белков (рис. 16). Как и N-домен ClpA, N-домен ClpC, связанный с белком-адаптером (например, MecA) играет важную роль при деградации большинства субстратов комплексом ClpCP [68]. Показано, что в узнавании и связывании адаптерных белков шапероном кроме N-концевого домена участвует также вставочный M'-домен (58 а.о), локализованный в первом AAA⁺-модуле ClpC (рис. 11). При этом детальные подробности участия адаптерных белков в доставке субстратов к комплексу ClpCP в настоящее время неизвестны [69, 76, 79, 81].

Обнаружено, что взаимодействия N-доменов ClpA и ClpC с их адаптерами ClpS и MecA, соответственно, носят одинаковый характер (рис. 17). И MecA и ClpS используют подобные α -спирали для взаимодействия с аналогичными областями N-доменов ClpC и ClpA. Удивительно, что остаток Glu184 MecA, образующий три водородные связи с остатками Thr 31 и Thr 81 ClpC, занимает ту же позицию, что и Glu79 адаптерного белка ClpS, который образует две водородные связи с остатками Glu28 и Thr81 шаперона ClpA [81].

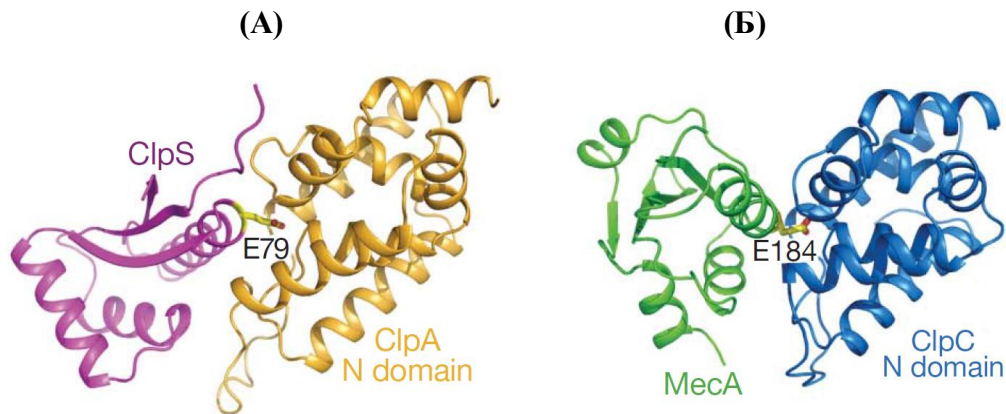


Рисунок 17. Сходство взаимодействий между N-доменом ClpA и ClpS (А) и между N-доменом ClpC и MecA (Б) [81]. Ключевую роль в связывании адаптерных белков с N-доменами ClpA и ClpC играют остатки Glu79 (ClpS) и Glu184 (MecA).

Несмотря на выявленное сходство ClpC и ClpA в отношении взаимодействия с адаптерными белками, ClpC из *Bacillus subtilis* радикально отличается от других шаперонов семейства Clp/Hsp100. Уникальность ClpC заключается в том, что все виды активности, включая распознавание и связывание белков-субстратов, гексамеризацию ClpC, шапероновую активность, образование функционально активного комплекса ClpCP и деградацию белковых мишеней, опосредованы обязательным взаимодействием шаперона с адаптерными белками. Выявлен регуляторный механизм, в соответствии с которым в отсутствие белков-субстратов происходит инактивация комплекса ClpCP за счет деградации связанного белка-адаптера [76, 77].

Шапероны ClpB также содержат подвижные N-концевые экстрадомены, проявляющие высокое подобие с N-доменами ClpA и ClpC (рис. 15). Однако адаптерные белки для ClpB до настоящего времени не обнаружены [79]. Известно, что основной функцией ClpB служит участие в дезагрегации клеточных белков. ClpB-шапероны выполняют эту функцию в комплексе с шаперонами семейства Hsp70 (DnaK/DnaJ/GrpE) (рис. 16). При этом роль N-доменов в ClpB-опосредованной дезагрегации белков все еще до конца не изучена. Показано, что различные варианты ClpB, несущие точечные мутации в N-доме, проявляют пониженную дезагрегационную активность, однако некоторые делеционные варианты ClpB, у которых отсутствовал N-домен, демонстрировали активность, соизмеримую с активностью полноразмерного белка. Кроме того, существование в *Mycoplasma sp.* гомологов ClpB, лишенных N-домена, служит дополнительным указанием на то, что N-домены не важны для дезагрегации белков [71]. Следовательно, можно полагать, что N-домены ClpB-белков, скорее всего, вовлечены в другие, более специализированные функции ClpB.

Характерной чертой строения белков ClpB/Hsp104 (как и в случае ClpC) является наличие центрального (middle, M) домена (118 а.о.), отсутствующего в ClpA, ближайшем гомологе ClpB (рис. 11, 18). Именно α -спирализованный M-домен, внедренный в N1-домен первого AAA⁺-модуля шаперона, принимает участие в реализации дезагрегационной функции ClpB [82, 83].

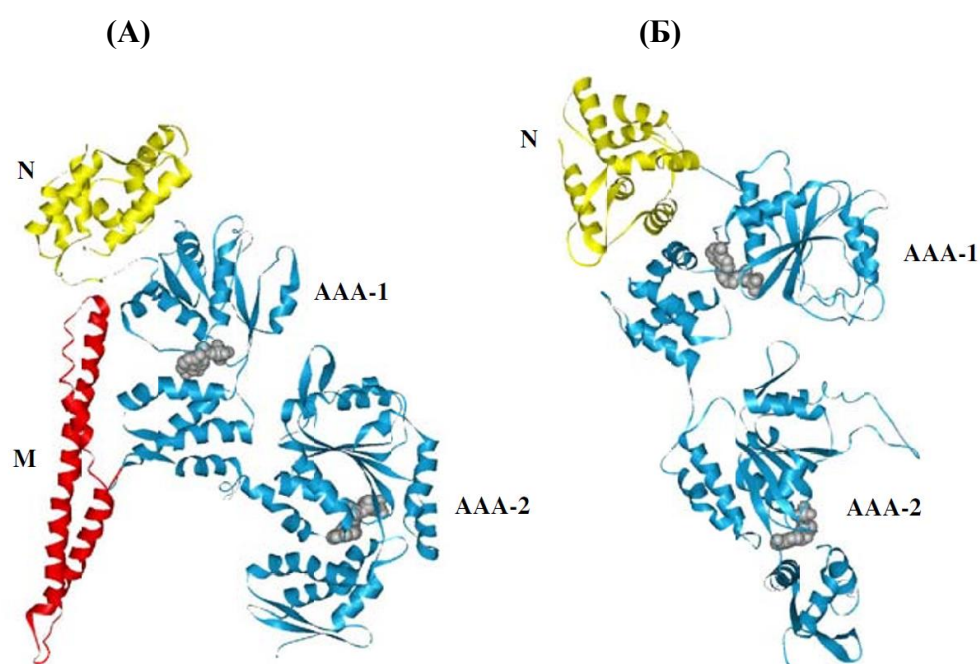


Рисунок 18. Сходство структуры и топологии мономеров ClpB из *Thermus thermophilus* (А) и ClpA из *E. coli* (Б) [71]. N-домены показаны желтым цветом, модули AAA⁺-1 и AAA⁺-2 – синим, вставочный M-домен – красным. Связанные нуклеотиды AMPPNP (ClpB) и ADP (ClpA) показаны серым цветом.

Основным этапом на пути исследования функции М-домена явилось определение кристаллической структуры ClpV из *Thermus thermophilus* (TtClpV) [84]. Авторы обнаружили, что М-домен образует протяженную coil-coiled-структуру размером в 85 Å, подобную «двухлопастному пропеллеру» (рис. 18).

В гексамерной модели ClpV М-домены располагаются на внешней поверхности комплекса на уровне кольца, сформированного AAA⁺-1-модулями (рис. 19Б) [84]. М-домены проявляют высокую степень подвижности (рис. 19А), которая имеет решающее значение для дезагрегации белка. На этом основании было выдвинуто предположение о том, что М-домены могут служить в качестве «молекулярных ломов», которые модулируют структуру белковых агрегатов (рис. 20). Ресольюбилизация белковых агрегатов с помощью ClpV-шаперона может осуществляться двумя путями.

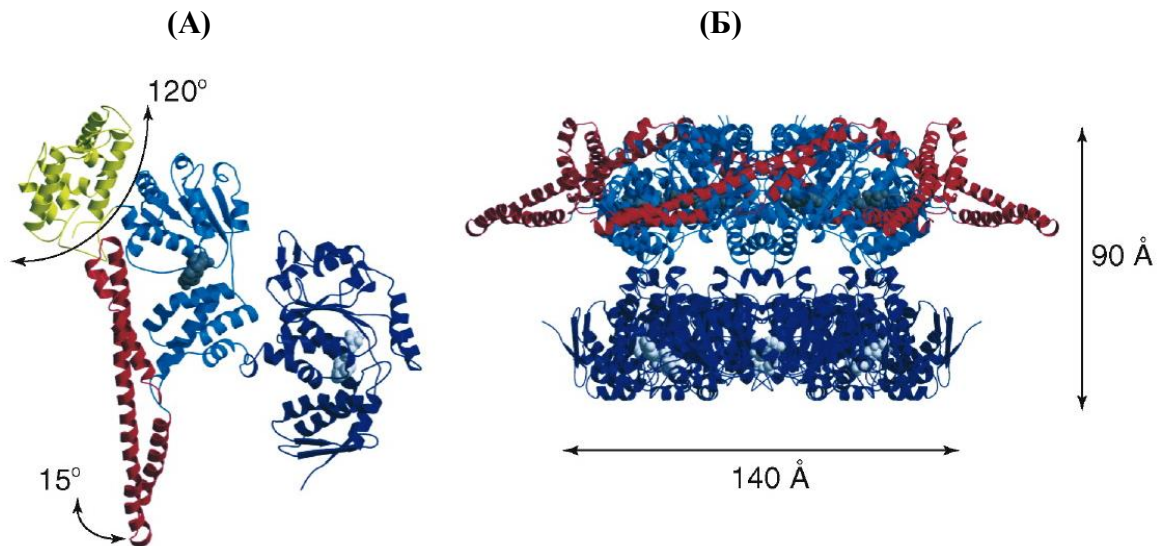


Рисунок 19. Кристаллическая структура мономера (А) и гексамера ClpV из *T. thermophilus* (Б) в связанном с АМРPNP состоянии [70]. (А) Показаны границы движения N- и М-доменов; АМРPNP показан голубым цветом. (Б) Гексамерная модель ClpV построена с использованием данных по криоэлектронной микроскопии, при этом мобильные N-домены не видны вследствие их высокой гибкости. Положение М-доменов соответствует их локализации в кристаллической структуре ClpV.

На первом пути шаперон Hsp104/ClpV разрушает крупные агрегаты до мелких, применяя активность типа «молекулярного лома», опосредованную движениями М-доменов. Полученные малые агрегаты служат субстратами для шаперонов-фолдаз Hsp70/DnaK. На втором пути Hsp104/ClpV извлекает развернутые белки из агрегатов и транслоцирует их через осевой канал шаперона при участии ароматических остатков тирозина (Y), локализованных в специфических петлях последовательности ClpV (pores-1). Затем перемещенные полипептиды захватываются шаперонами Hsp70/DnaK, что предотвращает повторное агрегирование экстрагированных белков и обеспечивает

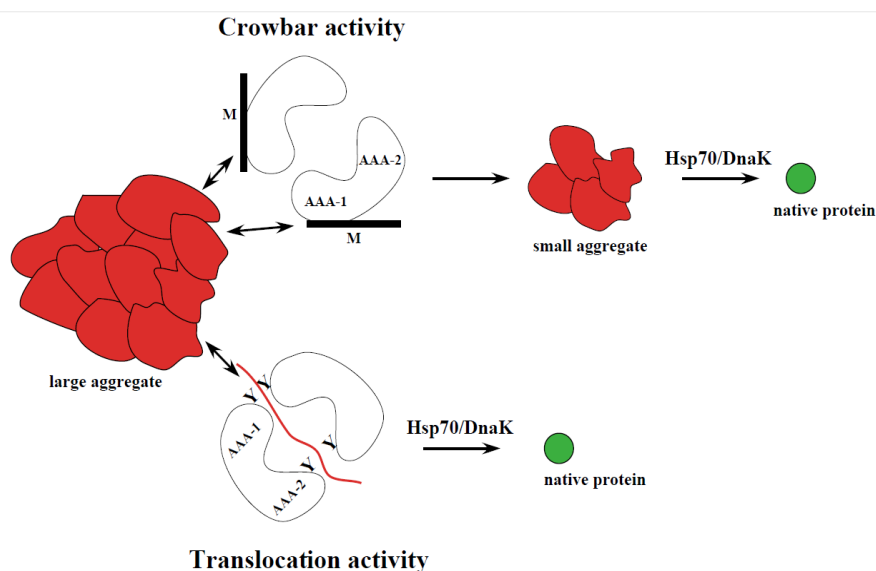


Рисунок 20. Потенциальные механизмы дезагрегации белков с помощью шаперона Hsp104/ClpB [71].

рефолдинг субстрата. Полагают [71], что оба механизма действия Hsp104/ClpB не являются взаимоисключающими, и могут действовать либо последовательно, либо согласованно.

В противоположность другим прокариотическим AAA⁺-белкам системы контроля качества протеома шапероны ClpB не могут участвовать в протеолизе. AAA⁺-белки, вовлеченные в протеолиз, обычно образуют с пептидазными компонентами протеолитические комплексы, подобные эукариотической протеасоме. Ассоциация AAA⁺-модулей ClpA (а также ClpC, ClpE и ClpX) с пептидазой ClpP опосредуется участием «стыковочной петли» шаперона (ClpP-loop), содержащей консервативный мотив (I/V)G(F/L). Этот мотив присутствует в AAA⁺-модулях всех ClpP-взаимодействующих AAA⁺-белков и локализован в С-концевых частях их NB-доменов между остатком sensor-1 и Н-доменом [85]. Поскольку ClpB не содержит такого мотива, он не может связываться с ClpP-пептидазой для реализации протеолитической функции, но способен участвовать в реактивации белков.

АТФ-азные составляющие протеаз ClpXP и ClpEP имеют гомологичные N-концевые Zn-связывающие домены (ZBD) и различающиеся AAA⁺-модули: ClpX относится к AAA⁺-белкам класса II, а ClpE – к белкам класса I (рис. 11). При этом как и в протеазе ClpCP первый AAA⁺-модуль шаперона ClpE содержит вставочный M'-домен (53 a.o), более чем на 60 % подобный M'-домену ClpC (рис. 21).

Следует отметить, что домены M' и M'' протеаз ClpCP и ClpEP значительно отличаются от вставочного M-домена шаперона ClpB по размеру, однако проявляют выраженное подобие с N-концевой половиной последнего (рис. 21).

ClpC-M'	408	<u>TTPPNLKELEQKLEVRKEKDAAVQSQEF</u> <u>EKAASLRDTEQRLREQVEDTKKSWKEKQGO</u> <u>ENSE</u>
ClpE-M''	318	<u>E--LNDEDAERLTATEAEKTKALEEENYELAAKLRDEELALEKLNSSAHTAVT</u> -----
		* :: ::* . . ** *:::.* **.* ** * .:::.* .
ClpB-M	407	<u>SKPEELDRLDRRI IQLKLEQQALMKE</u> <u>SD</u> <u>EASKKRLDMLNEELSDKERQYSELEEEWKAEKASL</u>
		: . .:: .: * : :::: * : * .: . . .
ClpC-M'	471	-----VT
ClpE-M''	372	-----VE
		*
ClpB-M	470	<u>SGTQTIKAELEQAKIATEQARRVGD</u> <u>LARMS</u> <u>ELQY</u> <u>GKI</u> <u>PELEKQLEAATQ</u> <u>LEGKTMRLLRNKVT</u>
		*

Рисунок 21. Выравнивание последовательностей вставочных coiled-coil-доменов M, M' и M'' (подчеркнуты) ClpB-, ClpC- и ClpE-шаперонов. Красным цветом показаны α -спирали; степени подобия остатков: * – идентичный, : – высококонсервативный, . – подобный.

ZBD-домены ClpX и ClpE, имеющие размеры около 60 а.о., включают по четыре остатка цистеина, которые координируют один атом Zn (рис. 22A) [86].

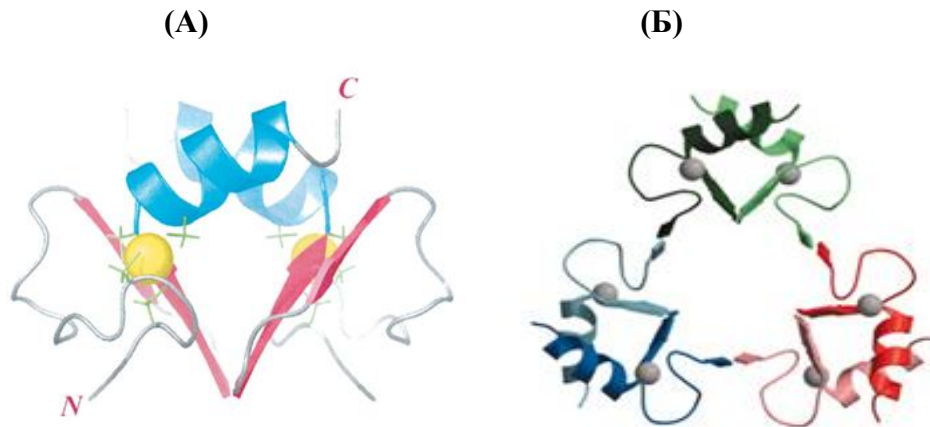


Рисунок 22. Структура ZBD-домена ClpX (A) и его димер-тримерная модель (Б) [86]. (A) Димер ZBD-домена (синий цвет – α -спирали, красный цвет – β -тяжи, желтые сферы – атомы Zn, зеленые палочки – остатки цистеина). (Б) Гексамер ZBD-домена, представляющий кольцевой тример димеров.

Показано, что в ClpX из *E. coli* ZBD-домен отвечает за узнавание некоторых субстратов (таких как λ O и MuA, но не SsgA-меченых белков) и, кроме того, связывает адаптерный SspB-белок, направляющий субстраты к ClpX для разворачивания (рис. 16) [86]. О белке ClpE, участвующем в процессе дезагрегации и в последующей деградации агрегированных белков, известно, что при обычных условиях он присутствует в клетке в очень малых количествах, и его синтез строго регулируется. Было показано, что N-концевой домен ClpE необходим для проявления базовой АТФ-азной активности шаперона *in vitro* [68, 87].

На примере ClpX установлено, что индивидуальные ZBD-домены образуют стабильные димеры (рис. 22A), в то время как полноразмерные шапероны формируют гексамерные кольцевые структуры, ассоциированные с тетрадекамерными ClpP-

протеазами. В связи с этим было выдвинуто предположение о том, что гексамеры ZBD образованы тримерами димеров (рис. 22Б) и локализуются на поверхности гексамерных колец AAA⁺-модулей ClpX (рис. 23).

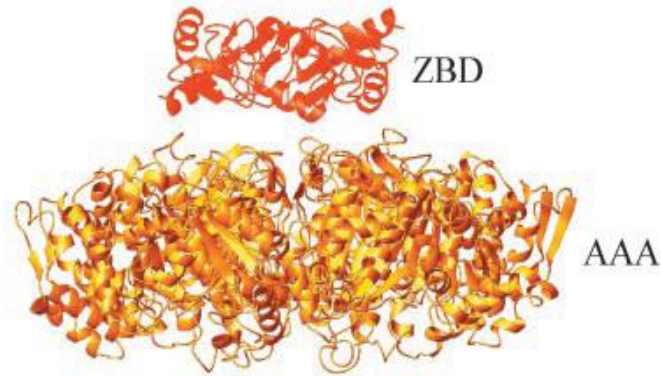


Рисунок 23. Модель структуры ClpX-шаперона [86]. Тример димеров ZBD-домена (красный цвет) располагается на вершине модели гексамера AAA⁺-модуля ClpX (желто-оранжевый цвет).

Интересно отметить, что, несмотря на отсутствие консервативности первичных и вторичных структур, N-концевые домены шаперонов ClpA, ClpB и ClpC, с одной стороны, и ZBD-домен ClpX, с другой стороны, проявляют заметное топологическое подобие (рис. 24) [86].

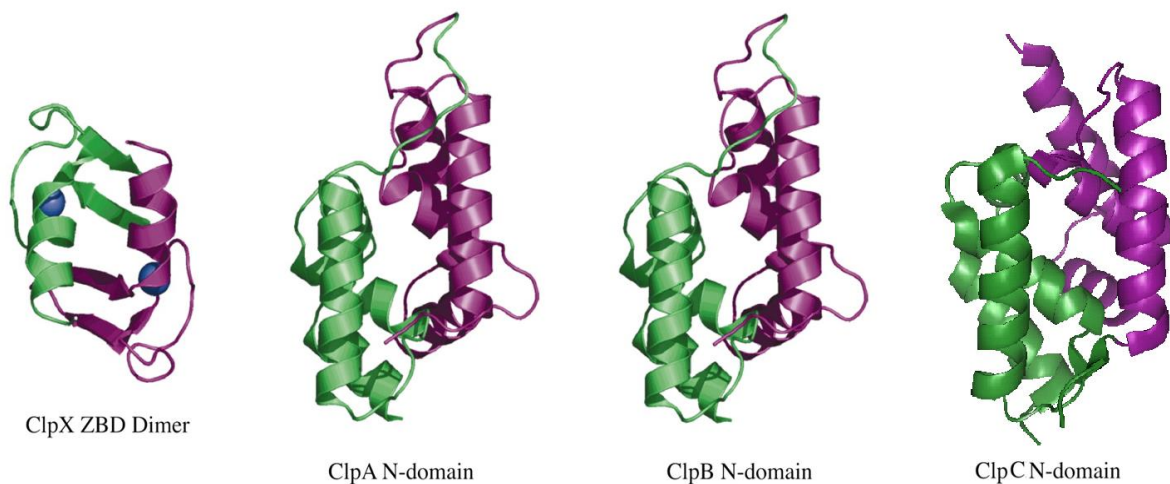


Рисунок 24. Сравнение кристаллических структур N-концевых доменов ClpX, ClpA, ClpB и ClpC (по данным работ ([81] и 86)). Показаны структуры ZBD-димера и N-доменов ClpA (PDB ID: 1K6K), ClpB (PDB ID: 1KHU) и ClpC. Атомы Zn (II) в ZBD-димере представлены в виде голубых сфер.

N-Домены AAA⁺-АТФ-аз протеасом

AAA⁺-АТФ-азы протеасом архей (proteasome-activating nucleotidases, PAN) и эукариотов (Rpt(1-6)), формирующие регуляторные комплексы (RC) и активирующие

протеолитические 20S-коры протеасом, также содержат N-концевые домены, которые участвуют в узнавании и связывании белковых мишеней и совместно с AAA⁺-модулями превращают химическую энергию в механическую работу (рис. 25) [88].



Рисунок 25. Доменная организация PAN-субъединицы протеасомы из *Methanocaldococcus jannaschii* [88]. Фрагменты Coiled Coil, P и OB fold составляют N-домен, фрагменты ATPase Core и CTD (С-концевой домен) образуют AAA⁺-АТФ-азный домен.

На примере PAN-субъединицы архейной протеасомы из *Methanocaldococcus jannaschii* показано, что N-домены PAN (PAN-N) начинаются с небольшого α -спирального фрагмента (α -1), за которым следует богатый β -тяжами С-концевой участок, представленный олигосахарид-связывающим (OB) фолдом (рис. 26А) [89]. N-домены различающихся Rpt-субъединиц протеасом эукариотов (Rpt-N) построены аналогичным образом и проявляют высокое подобие с PAN-N-доменами [89].

N-домены PAN и Rpt формируют так называемые субкомплексы I, состоящие из гексамерных колец, образованных OB-фрагментами, и трех coiled-coil участков, сформированных парами N-концевых спиралей (α -1) соседних субъединиц (рис. 26Б).

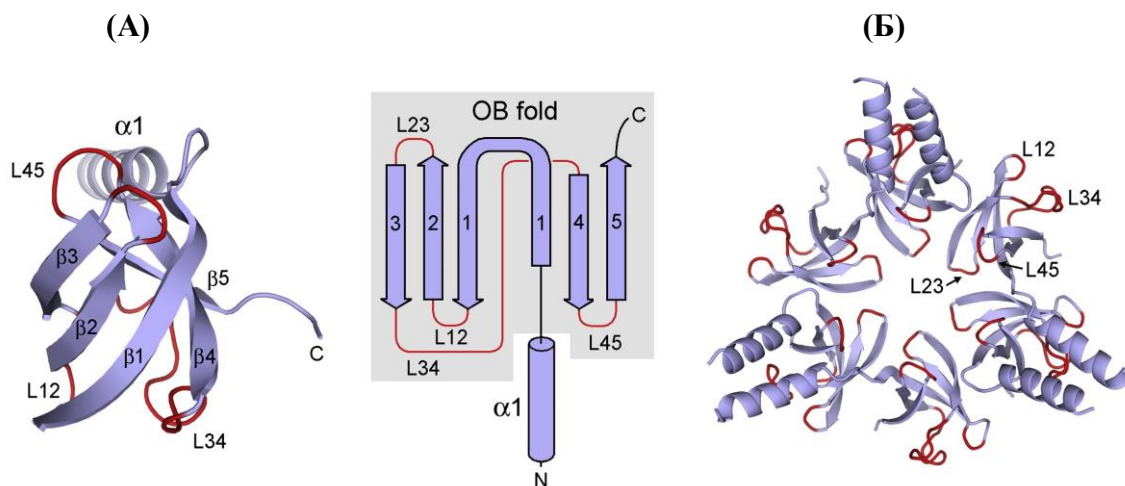


Рисунок 26. Структура N-домена PAN (PAN-N) (А) и субкомплекса I (Б) [89]. В центре представлена топология PAN-N-домена, образованного α -спиралью (α -1) и пятью β -тяжами (OB fold). (А) Укладка структурных элементов PAN-N. (Б) Субкомплекс I, сформированный шестью фрагментами «OB fold» и тремя coiled-coil участками, образованными парами α -спиралей соседних субъединиц.

Подобно ZBD-доменам в шаперонах ClpX субкомплексы I располагаются на гексамерных кольцах субкомплексов II, образованных нуклеотидазными (АТФ-азными)

доменами PAN или Rpt-субъединиц, имеющими каноническую укладку AAA⁺-АТФ-аз [89]. Таким путем формируется регуляторный комплекс RC с аксиальным каналом для транслокации белкового субстрата (рис. 27) [90].

Полноразмерные N-домены PAN (PAN-N) формируют комплексы размером около 1 мДа, которые обратимо дезагрегируют при нагревании, тогда как N-домены без СС-участка образуют преимущественно димеры. Тем не менее, роль СС-фрагмента в мультимеризации PAN все еще не ясна и требует дальнейшего исследования [84].

Также было показано, что СС-фрагмент необходим для узнавания субстратов-мишеней, а полноценный N-домен действует как шаперон, предотвращая агрегацию белков *in vitro* [90].

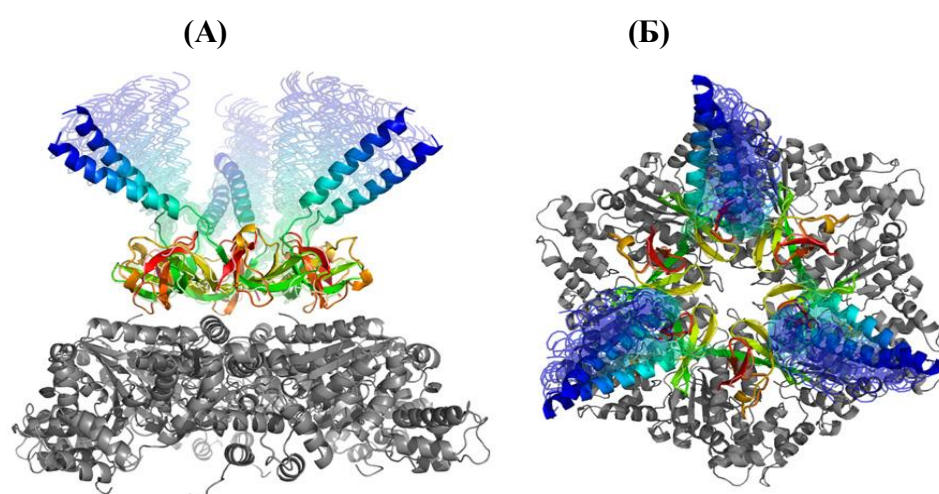


Рисунок 27. Модель гексамера PAN-АТФ-азы (отображена подвижность СС-фрагментов) [90]. Субкомплекс I показан в цветах радуги, субкомплекс II показан серым цветом. (А) – вид сбоку, (Б) – вид сверху.

Функционально активная протеасома образуется путем образования комплекса между регуляторным и протеолитическим компонентами (рис. 28) [91]. При этом

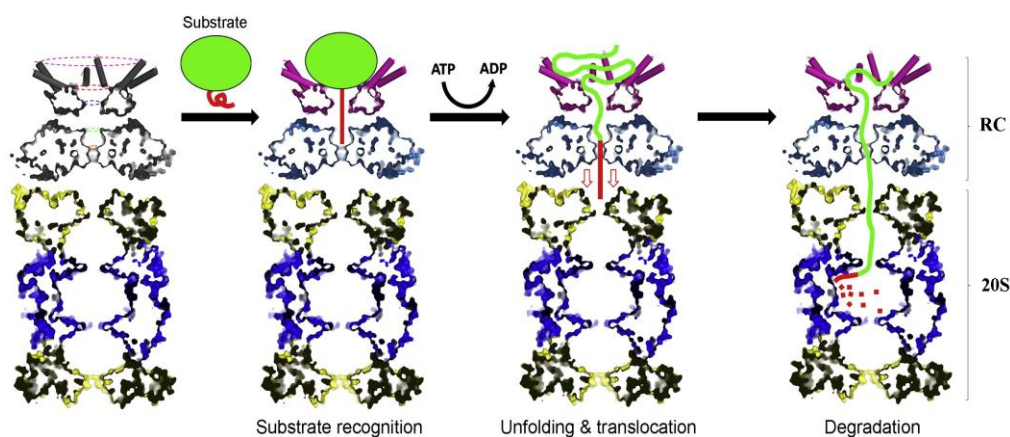


Рисунок 28. Модель функционирования PAN-20S-комплекса [91]. RC – регуляторный АТФ-азный компонент (Pan); 20S – протеолитический компонент.

субкомплекс II PAN, состоящий из АТФ-азных доменов, ассоциируется с протеолитическим кором 20S и управляет АТФ-зависимым разворачиванием белка-субстрата, тогда как дистальный субкомплекс I образует входное отверстие канала транслокации субстрата. Линкерный сегмент между субкомплексами I и II необходим для обеспечения функционального и, возможно, механического взаимодействия между этими доменами PAN.

N-Домены FtsH-протеаз

FtsH – единственная мембраносвязанная AAA⁺-протеаза у бактерий. Аналоги FtsH обнаружены в митохондриях и хлоропластах эукариотов. В N-доменах FtsH-протеаз обычно содержатся две трансмембранные спирали (рис. 29) [92, 93]. Установлено высокое подобие N-доменов бактериальных и эукариотических FtsH-протеаз [93].

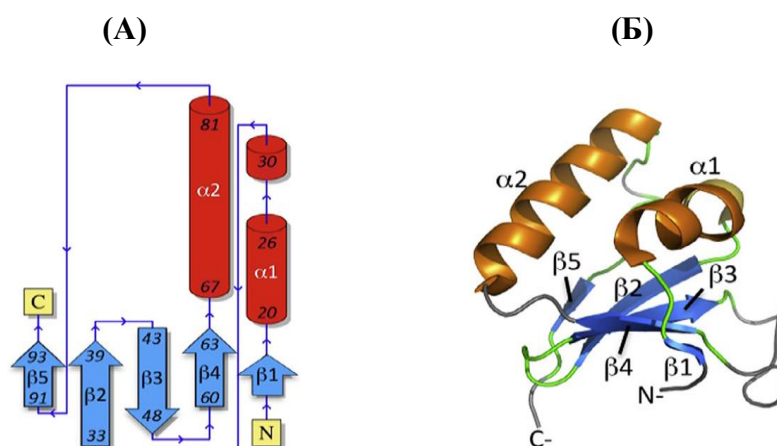


Рисунок 29. Структура и топология трансмембранного N-домена FtsH-протеазы человека (AFG3L2) [93]. (А) Структура N-домена: красный цвет – α -спирали, синий цвет – β -тяжи. (Б) Топология N-домена FtsH.

Функционально активной формой FtsH служит кольцевой гомогексамер. Показано, что в большинстве бактерий фермент отвечает за деградацию мембраносвязанных белков [92]. Ряд белков-адаптеров FtsH представлен на рис. 16. Считается, что N-домен FtsH влияет на олигомеризацию и стабильность фермента [94]. Обнаружена также особая роль FtsH как единственной AAA⁺-протеазы, имеющей критическое значение для выживаемости *E. coli*.

Экстрадомены LonB и HslUV протеаз

Клетки архей лишены протеазы FtsH. В них в качестве мембраносвязанного фермента функционирует подробно описанная ниже AAA⁺-протеаза Lon из подсемейства

LonB, не содержащая N-концевого экстрадомена (рис. 11, табл. 1) [49, 56, 95]. Трансмембранный участок (ТМ) последовательности LonB-протеазы заключен в инсерционном (I) экстрадомене, который локализован в NB-домене фермента между мотивами Уолкера (рис. 11).

Подобно LonB-протеазе характерной особенностью АТР-азного компонента протеазы HslUV является отсутствие N-концевого домена. Вставочный экстрадомен (I-домен) HslU размером около 130 а.о. также расположен между мотивами Уолкера (рис. 11, 30) [96].

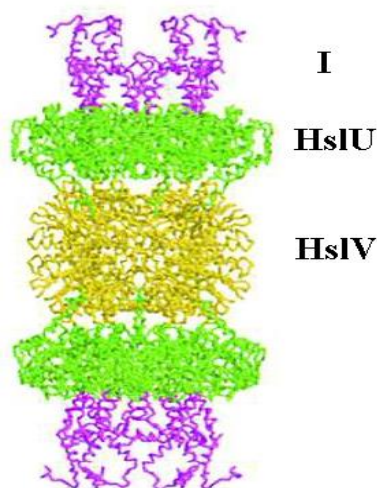


Рисунок 30. Кристаллическая структура HslUV из *H. influenzae* [96].

Зеленый цвет – HslU (AAA⁺-модули), фиолетовый цвет – I-домены, желтый цвет – HslV (протеолитические субъединицы).

Выступающий из HslU-кольца в виде «щупалец» I-домен (рис. 30) формирует воронкообразную полость [97]. α -Спирализованный I-домен обеспечивает отбор полипептидных субстратов для деградации, способствует транслокации субстратов в протеолитическую камеру HslUV комплекса, а также участвует в гидролизе АТР и деградации белковых мишеней [96, 97].

3.1.2.4. Сходство и различия экстрадоменов AAA⁺-белков

Приведенные выше данные по экстрадоменам AAA⁺-белков – представителей системы контроля качества клеточного протеома – показывают, что некаталитические домены AAA⁺-протеаз и протеолитических комплексов разнообразны по структуре: они могут быть полностью α -спирализованными (как N-домены ClpA, ClpB и ClpC, а также I-домен HslU), могут иметь α/β -структуру (ZBD-домены ClpX и ClpE), могут представлять β -структурный фолд (OB), с включением N-концевых coiled-coil-фрагментов (N-домены регуляторных комплексов как эукариотических, так и архейных протеасом), и наконец, их

последовательности могут содержать спиральные фрагменты, обеспечивающие взаимодействие с клеточными мембранами (N-концевой домен FtsH и I-домен LonB-протеазы). Вместе с тем, все эти экстрадомены имеют одно общее свойство – их размеры не превышают 150–170 а.о.

В этом отношении протеазы подсемейства LonA (рис. 11) стоят особняком среди всех AAA⁺-белков СКК, поскольку их характерной особенностью служит наличие очень протяженной N-концевой области, которая может включать от 300 до более чем 400 аминокислот. В последнее время сложилось представление о том, что N-концевая область LonA-протеаз сформирована двумя доменами – фактическим N-концевым (N) размером около 120 а.о. и следующим за ним доменом, расположенным между N-доменом и AAA⁺-модулем фермента (вставочный или инсерционный домен) [98].

Данные рентгеноструктурного анализа показали, что N-домен преимущественно состоит из β-тяжей [99-101]. Кристаллическая структура вставочного домена до настоящего времени не определена, однако известно, что он формируется исключительно α-спиралями и включает, согласно предсказанию (<http://www.ch.embnet.org>) [98], фрагмент последовательности с coiled-coil (CC) конформацией. Этот домен был назван HI(CC) (**h**elical **i**nserted with **CC**-fragment – инсерционный спирализованный с CC-фрагментом, рис. 11 [102]).

Таким образом, N-концевая область LonA-протеаз, действительно отличается от известных экстрадоменов AAA⁺-белков. Роль ее в реализации АТФ-зависимого протеолиза и в стабилизации структуры активных ферментов до сих пор полностью не выяснена, и пространственная структура полноразмерной N-концевой области LonA-протеаз не определена. Имеются данные в пользу того факта, что этот регион играет важную роль в олигомеризации ферментов и участвует в связывании белкового субстрата [103-107]. Кроме того, в ряде работ было показано, что укорочения или делеции в N-концевых областях различных LonA-протеаз могут нарушать ферментативную активность [103-105, 108-111].

3.2. Семейство Lon-протеаз

В этом разделе представлена краткая характеристика Lon-протеаз. По классификации MEROPS [112] Lon-протеазы представляют семейство S16 клана SJ. Lon-протеаза *E. coli* явилась первой экспериментально обнаруженной АТФ-зависимой пептидгидролазой [57]. Семейство Lon-протеаз, наряду с другими селективными энергозависимыми протеазами, молекулярными шаперонами и регуляторными

молекулами участвует в системе контроля качества белка, которая играет ключевую роль в поддержании клеточного протеома во всех природных царствах [50, 113-116].

3.2.1. Классификация Lon-протеаз

На основании данных по подобию последовательностей и в соответствии со структурными особенностями семейство Lon-протеаз в 2004 г. было разделено на два подсемейства: LonA и LonB (рис. 11) [95], которые отличаются друг от друга:

1. Различным окружением каталитически активных остатков протеолитических центров (подсемейство LonA характеризуется последовательностями GPSAG и $(\text{K/R})\text{XKX}\Phi$, а LonB – последовательностями GDSAS/T и $(\text{T/N})\text{XK}\Phi\text{E}$, где **S** и **K** – каталитически активные остатки Ser и Lys, отстоящие друг от друга на 43 а.о., **X** – любая, а Φ – гидрофобная аминокислота.

2. Типом архитектуры АТФ-азных составляющих. AAA^+ -модули LonB-протеаз характеризуются наличием вставочного трансмембранного домена (ТМ), который находится в NB-домене между мотивами Уолкера. Наблюдаются также различия в аминокислотных последовательностях мотивов Уолкера А (GPPGVGKTS для LonA и $\text{GXPGXGKS}\Phi$ для LonB) и мотивов Уолкера В ($\text{P}\Phi_4\text{DEIDK}$ для LonA и $\text{G}\Phi_4\text{DEIXX}$ для LonB) (рис. 31) [95, 117-118]. Кроме того, LonA-протеазы содержат протяженную N-концевую область, которая имеет размер от 300–330 (у бактериальных ферментов) до 420–570 а.о. (у ферментов эукариот), отсутствующую у LonB-протеаз [98, 102].

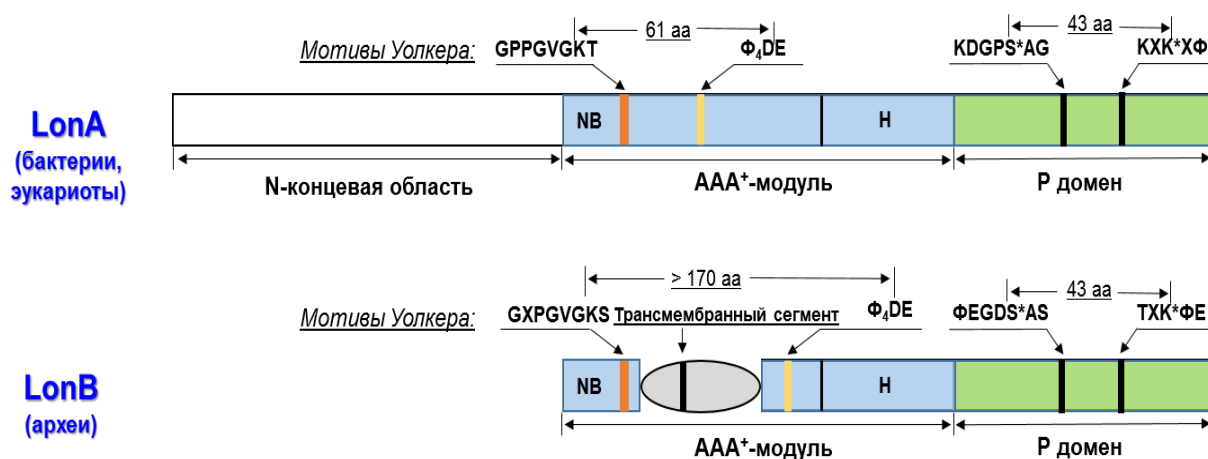


Рисунок 31. Схема строения LonA- и LonB-протеаз. NB – нуклеотидсвязывающие домены; H – α -спирализованные домены; домены NB и H формируют AAA^+ -модули [98].

LonA-протеазы присутствуют в прокариотических и эукариотических организмах (соответственно, цитозольные и митохондриальные ферменты). Кроме того, ферменты

подсемейства LonA идентифицированы у некоторых представителей архей (*Methanosarcina sp.*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobrevibacterium psychrophilus*). Протеазы LonB встречаются преимущественно в археобактериях. Однако помимо архей, протеазы с LonB-типом протеолитического центра обнаружены также у целого ряда бактерий (в частности, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thermotoga maritima* и др.) [68, 95]. Отличительной характеристикой этих ферментов оказалась вырожденность АТФ-азного центра, способного только связывать, но не гидролизовать АТФ. К настоящему времени это сообщество ферментов оформилось в третью подгруппу Lon-протеаз – LonC.

3.2.2. Особенность LonA-протеаз – необычная некаталитическая N-концевая область

Как было отмечено выше, отличительной особенностью LonA-протеаз является протяженная двухдоменная N-концевая область, которая состоит из N-домена и инсерционного α -спирализованного HI(CC)-домена.

3.2.2.1. N-домены LonA-протеаз

N-концевые домены LonA-протеаз обладают β -структурным фолдом. Показано, что компактные кристаллические структуры N-доменов бактериальных Lon-протеаз из *E. coli* и *B. subtilis* (*EcLon* и *BsLon*) образованы семью β -тяжами и двумя α -спиральными фрагментами [99, 100]. Первые 117 а.о., формирующих N-домены *EcLon* и *BsLon*, проявляют 49.1 % подобия и структурно очень хорошо выравниваются (рис. 32).

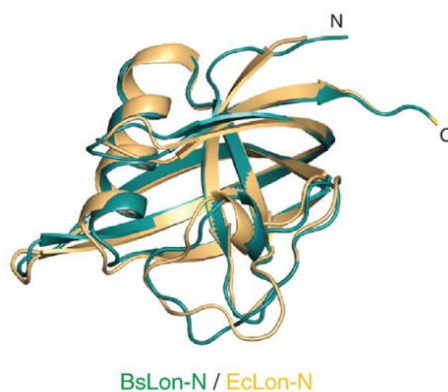


Рисунок 32. Структурное выравнивание N-доменов *BsLon* (зеленый) и *EcLon* (оранжевый) (по данным работы [99]).

Следует отметить, что в большинстве LonA-протеаз эукариот C-концевая шпилька, образованная шестым и седьмым β -тяжами, несет очень крупную вставку, которая может включать до 100 аминокислот.

Ранее было обнаружено, что кристаллическая структура N-домена *EcLop* подобна структуре N-домена гипотетического белка BPP1347 из *Bordetella parapertussis* [PDB ID: 1ZBO, 100] – белок из 203 а.о. с неизвестной функцией (рис. 33).

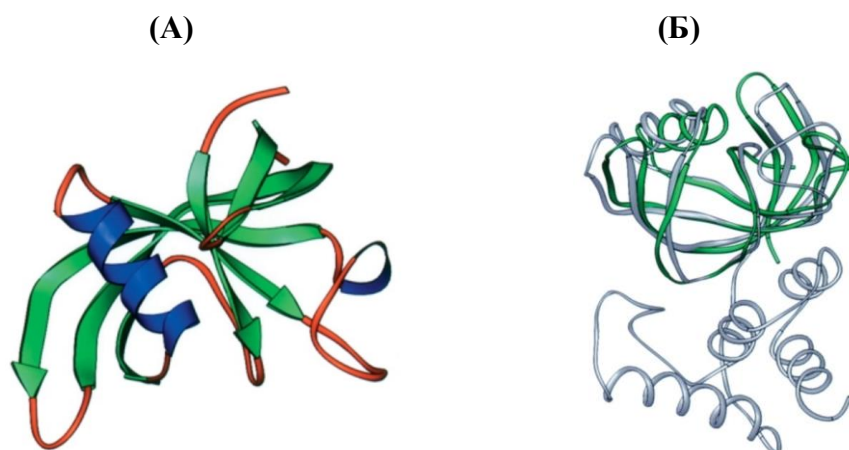


Рисунок 33. Кристаллическая структура N-домена (119 а.о.) *EcLop*-протеазы и ее сравнение со структурой гипотетического белка BPP1347 (по данным работы [100]). А) Структура N-домена *EcLop*. Показаны элементы вторичной структуры: α -спирали (синий цвет), β -тяжи (зеленый цвет) и coil-участки (коричневый цвет). Б) Суперпозиция N-домена *EcLop* (зеленый) и *B. parapertussis* BPP1347 (серый).

Впоследствии было показано, что N-домен BPP1347 относится к группе доменов с PUA-подобной архитектурой [119]. PUA-домен является высококонсервативным РНК-связывающим мотивом, который присутствует в ферментах, модифицирующих РНК (например, псевдоуридинсинтаза), а также в некоторых рибонуклеопротеинах. Топология β -структурированного N-домена *EcLop* и РНК-связывающего PUA-домена показана на рис. 34. Наблюдаемое сходство фолдов N-доменов *LopA* и PUA-доменов [119] указывает на возможное участие N-домена во взаимодействиях с нуклеиновыми кислотами и ставит под сомнение предполагаемую роль N-доменов *LopA* во взаимодействии с белковыми мишенями как их единственную функцию.

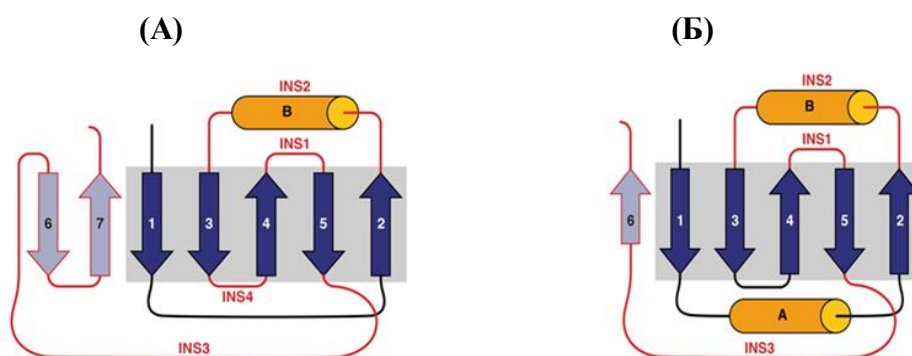


Рисунок 34. Топология N-Домена *EcLop*-протеазы (А) и РНК-связывающего PUA-домена (Б). Синим цветом обозначены β -тяжи, оранжевым - α -спирали. INS1, INS2, INS3 и INS4 – характеристические домены (выделены красным цветом); 6 и 7 – дополнительные β -тяжи.

3.2.2.2. HI(CC)-домены LonA-протеаз

Инсерционный HI(CC)-домен LonA-протеаз предшествует NB-домену и состоит из восьми α -спиралей. Такое расположение и количество спиралей приводит к идее о выявлении возможного топологического сходства между HI(CC)-доменом и α -спирализованными доменами Clp-шаперонов класса I – N-концевым, локализованным перед NB1-доменом первого AAA⁺-модуля, или H1-доменом, локализованным перед NB2-доменом второго AAA⁺-модуля (рис. 11 и 15).

N-домены шаперонов ClpA, ClpB и ClpC состоят из 150–170 а.о. и демонстрируют высокое сходство на уровне своих первичных и вторичных структур [76]. Выше уже отмечалось, что они сформированы тандемами структурных повторов по четыре спиральных мотива (рис. 15). Сопоставление первичных и вторичных структур обнаруживает кардинальное различие размеров и топологического расположения спиралей в HI(CC)-доменах LonA-протеаз из *E. coli* и *Bacillus subtilis* и в N-доменах ClpB-шаперонов из *E. coli* и *Thermus thermophilus* (рис. 35). При этом степень подобия между N-доменами ClpB и HI(CC)-доменами Lon-протеаз составляет 18.8 %.

Среди Clp-шаперонов только представители семейства ClpB имеют в своем составе H1-домены, сходные по размеру и количеству α -спиралей с HI(CC)-доменами LonA-протеаз. При этом четыре из восьми их спиралей составляют пропеллероподобный coiled-coil-фрагмент (или вставочный M-домен, рис. 18). Из результатов сопоставления первичных и вторичных структур видно (рис. 35), что HI(CC)-домены LonA и H1(M)-домены ClpB демонстрируют достаточно близкие размеры и сходную топологию спиралей при степени подобия доменов, равной 25.2 %.

Обнаруженное сходство HI(CC)-доменов LonA-протеаз и H1-доменов первых AAA⁺-модулей шаперонов ClpB явилось основанием для выдвинутой в последнее время гипотезы, согласно которой предполагается, что HI(CC)-домен является α -спирализованным доменом гипотетического AAA⁺-модуля, который мог бы занимать место между N-доменом и существующим AAA⁺-модулем LonA, но потерял свой собственный NB-домен. Тогда LonA-протеазы можно рассматривать как особый подкласс AAA⁺-белков, который по структурным характеристикам подобен как белкам класса I, так и белкам класса II. Косвенным подтверждением этой гипотезы служит тот факт, что организация единственных АТР-азных модулей AAA⁺-белков класса II, к которым относятся и Lon-протеазы, аналогична организации D2-модулей AAA⁺-белков класса I [59, 120] (см. рис. 11).

<i>EcClpB</i> -N	1	MRL-DRLT NKFQL ---- ALA --- DAQSLALGH DN----- QFI	29
<i>TtClpB</i> -N	1	MNL-ERWT QAARE ---- ALA --- QAQVLAQR MKH----- QAI	29
<i>EcLon</i> -HI (CC)	124	EREQEV LVRTAIS QFEGYIKLN - KKIP - PEVLTSLNS ---- IDD --- PARLADTIAAH ----- MPL	175
<i>BsLon</i> -HI (CC)	122	DT ED EALM RTL LDHFDQYIKIS - KKIS - AETYAAVTD ---- IEE --- PGRMADIVASH ----- LPL	173
<i>EcClpB</i> -H1 (M)	340	EPSVEDTIAILRGLKERYELHHVQITDPAIVAAATLSHRYIADRQLPDKAIDLIDEAASSIRMQIDSKPEELDRDRRII	420
<i>TtClpB</i> -H1 (M)	331	EPTVEETISILRGLKEKEYEVHHGVRISDSAIIAAATLSHRYITERRLPDKAIDLIDEAAARLRMALESAPEEIDALERKKL	411
		: * : . : * . * . . . : . * : * : * : :	
Lons/Clps		<u>H1 domain →</u>	<u>M domain →</u>
		. . . * : : : . : * : * : . : . :	
<i>EcClpB</i> -N	30	EPLHLS SALL NQEGGSVSP LLT SAGINAGQL RTD INQALN R LPQVEGTGGDVQPS ----- QDLV RVLN LCDKLA-QKRG	102
<i>TtClpB</i> -N	30	DLP HL WAVL L KDERSLAW RL LEKAGADPKALKE L QERELARLPKVEGA EV GGYLT ----- SRLS GALN RAEALM-EE LK	102
<i>EcLon</i> -HI (CC)	176	KLADKQSVLEMSDVNERLEYLMAMMESEIDLLQVEKRIRNRVKKQMEKSQREYYLNEQMKAIQKELGEMDDAPDEN-EALK	255
<i>BsLon</i> -HI (CC)	174	KLKDKQDILETADV K DRLNKVIDFINNEKEVLEIEK KIGQ RVKRSMERTQKEYYLREQMKAIQKELGDK EGKT GEVQTLTE	254
<i>EcClpB</i> -H1 (M)	421	QKLEQQALMKESDEASKKRLDMLNEELSDKERQYSELEEEWKAEKASLSGTQTIKAELEQAKIATEQARRVGD L ARMSEL	501
<i>TtClpB</i> -H1 (M)	412	QLEI EREAL KKEKD PDSQERLKATEAEIAKLTEEIAKLRAEWEREREILRKLREAQHR L DEVRR TE LAERQYD L NRAEL	492
		: * : : * : . * : : . . : : : . . . : : . :	
		CC-2 / L2	
		<u>Linkers →</u>	
		: : : . : : : . : * : : . : : : * : : .	
<i>EcClpB</i> -N	103	DNFIS SE FL VLALES RG TLADILKAAGAT T ANITQAI EQ MRG GES VNDQG-AEDQRQ ALKKY T IDLTERAE Q GKLD PVI	181
<i>TtClpB</i> -N	103	DRYVA VD TL VLALAE A TPGLPG ----- LEAL K GALKE LR GGR T VQTEH-AESTYN A LEQY G IDL TR LAA EG KLD PVI	173
<i>EcLon</i> -HI (CC)	256	RKIDAAKMPKEAKEKAEAE LQK----- LKMMS PMS A EAT VVRGYIDWM-VQVPWN ARS KVKKDLRQAQEILD TDHY-	325
<i>BsLon</i> -HI (CC)	255	KIEE AG MPD H VKE ' TALKEL N RY ----- EK-IP SS AE SS VIRNYIDWL-VALP WT DE T DDKL D LKE AG RL L DE EH H -	323
<i>EcClpB</i> -H1 (M)	502	QYGKI PE LEKQ LE AATQ LE GKT ----- MRL LR NKV T DAEIAE VL AR WT GI P VS R MMES ERE KLLR ME QEL H HR -- VI	571
<i>TtClpB</i> -H1 (M)	493	RYGE L PK LE A E VE AL SEK L-RG----- ARF VR LE V TE ED IAEIVS R WT GI PVSK L LE GE REK LL R LE EEL H KR -- VV	561
		: : : . : : : : * : : . : : : * : : .	
		← CC/M domains ← HI/H1 domains Linkers →	

Рисунок 35. Сопоставление первичных и вторичных структур HI(CC)-доменов Lon-протеаз из *E. coli* и *Bacillus subtilis* и N-доменов, а также H1(M)-доменов шаперонов ClpB из *E. coli* и *Thermus thermophilus*.

EcLon и *BsLon* – Lon-протеазы из *E. coli* и *B. subtilis*, *EcClpB* и *TtClpB* – шапероны ClpB из *E. coli* и *T. thermophilus*.

Красным цветом показаны аминокислоты, образующие α -спирали, синим – β -тяжи, черным цветом показаны аминокислоты, которые не включены в элементы вторичной структуры. «Длинные» спирали подчеркнуты. Степени подобия остатков: * – идентичный, : – высококонсервативный, · – подобный.

Таким образом, можно констатировать, что согласно вышеприведенным данным по первичной и вторичной структуре N-концевая область LonA-протеаз сформирована двумя структурно различными доменами – β -структурированным N-доменом и α -спирализованным HI(CC)-доменом. Нехарактерная для представителей AAA⁺-сообщества двухдоменная организация N-концевой области позволяет рассматривать LonA-протеазы как уникальное семейство AAA⁺-белков.

3.2.3. Взаимодействие LonA-протеаз с ДНК

Особенной характеристикой Lon-протеазы, отличающей её от других представителей AAA⁺-протеаз, является способность связывать ДНК [121].

В прокариотах LonA-протеаза, связанная с нуклеотидом, осуществляет регуляцию уровня экспрессии внутриклеточных белков. Кроме того, LonA может проявлять как ингибирующее, так и стимулирующее действие на метаболизм ДНК и РНК, а также оказывать влияние на такие клеточные процессы, как упаковка, осуществление репарации и поддержание стабильности ДНК [122].

В эукариотических клетках LonA-протеаза кодируется ядерным геномом и содержит сигнальную последовательность, которая является маркером для переноса фермента в митохондрии. После доставки LonA-протеаза автолитически удаляет маркерную последовательность и далее локализуется в митохондриях, где, кроме деградации белков, выполняет функцию связывания некодирующей области митохондриальной ДНК [123].

С использованием масс-спектрометрии было показано, что N-домен Lon-протеазы из *Brevibacillus thermoruber* (*BtLon*) принимает участие во взаимодействии с 12-членным фрагментом 5'-CTGTTAGCGGGC-3' (*ms1*) последовательности плазмиды pET28a и более эффективное – с двуцепочечной последовательностью *ms1* [124]. При этом связывание двуцепочечной *ms1* N-доменом Lon-протеазы *B. subtilis* оказалось значительно пониженным, а у N-домена Lon-протеазы из *E. coli* такое взаимодействие практически отсутствовало. Для *BtLon* выявлены остатки последовательности белка, которые непосредственно участвуют во взаимодействии с ДНК – это положительно заряженные остатки R518, R557 и R566. Авторы считают, что электростатические взаимодействия, в которые вовлечены эти остатки, важны для связывания ДНК и аллостерической регуляции ферментативной активности [125]. Важно подчеркнуть, что упомянутые остатки аргинина не являются консервативными в общем пуле LonA-протеаз.

Результаты, полученные для *EcLon*-протеазы в работе [126], подтвердили, что остатки *EcLon*, локализованные в пределах α -спирализованного N-домена AAA⁺-модуля,

не играют критической роли для образования нуклеопротеидного комплекса. Для этого были получены и исследованы три укороченные конструкции *EcLon*: N-концевая область, AAA⁺-модуль и протеолитический домен, что позволило авторам идентифицировать нуклеотидсвязывающий NB-домен *EcLon*-протеазы как домен, взаимодействующий с ДНК. С помощью биоинформационного анализа был смоделирован потенциал электростатической поверхности гексамерной модели АТР-азного домена и идентифицирован набор экспонированных на поверхности положительно заряженных остатков, вовлеченных в связывание с ДНК [126]. Было установлено, что во взаимодействии с ДНК принимают участие фрагменты, включающие остатки 306–311 и 371–379 NB-домена. Ранее, в работе [127] также было показано, что фрагмент из 166 а.о., локализованный между а.о. E272 и A437 *EcLon*-протеазы, необходим для связывания ДНК ферментом. Тем не менее, несмотря на имеющиеся данные по взаимодействию ДНК с *Lon*-протеазой, до сих пор нет полной ясности в идентификации центра/ов взаимодействия *Lon*-протеаз с ДНК.

3.2.4. Биологическая роль *Lon*-протеаз

Lon-протеазы играют важную роль в регуляции многих биологических процессов в бактериях и эукариотах. В бактериях ферменты семейства *Lon* обеспечивают более 50 % протеолиза аномальных белков [128]. Они вовлечены в такие процессы как дифференцировка клеток, споруляция и выживание в условиях голодания. *Lon* из *E. coli*, как было показано [129], участвует в контроле метилирования ДНК через *Dam* (Deoxyadenosine-метилазу) – фермент, метилирующий аденин последовательности 5'-GATC-3' в новосинтезированной ДНК. *LonA* из *B. subtilis* в начале стационарной фазы принимает участие в репликации хромосом путем деградации белка SMC (structural maintenance of chromosomes protein), стабилизирующего структуру хромосомы и играющего ключевую роль в конденсации и сегрегации хромосом [130].

Во время аминокислотного голодания стимулируется деградация белков АТР-зависимыми протеазами для увеличения пула аминокислот, которые участвуют в синтезе специфических ферментов, необходимых для адаптации к определенным условиям. В условиях аминокислотного голодания *Lon* связывается с полифосфатом, синтезируемым в клетках *E. coli* в ответ на голодание. При этом меняется специфичность *Lon*-протеазы в направлении разрушения свободных рибосомных белков, что позволяет временно справиться с аминокислотным голоданием [131].

Митохондриальная *Lon*-протеаза человека (*HumLon*) – основной фермент в матриксе митохондрий, который деградирует неправильно свернутые или поврежденные

активными формами кислорода белки и связывается с участками репликации и транскрипции митохондриальной ДНК, тем самым регулируя число ее копий [132].

В последнее время показано [133], что многие физиологические и патологические состояния человека, от старения до рака и нейродегенерации, связаны с мутациями или дисфункцией *HumLon*-протеазы. Установлено, что избыточная экспрессия фермента наблюдается при развитии аденокарциномы легких, рака молочной железы, толстой кишки, мочевого пузыря, а также при злокачественных новообразованиях головы и шеи, включая рак полости рта [133, 134-137]. *HumLon* принимает участие во многих заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона, атаксия Фридрейха, болезнь Шарко, глиобластома, лейкемия и др. (рис. 36).

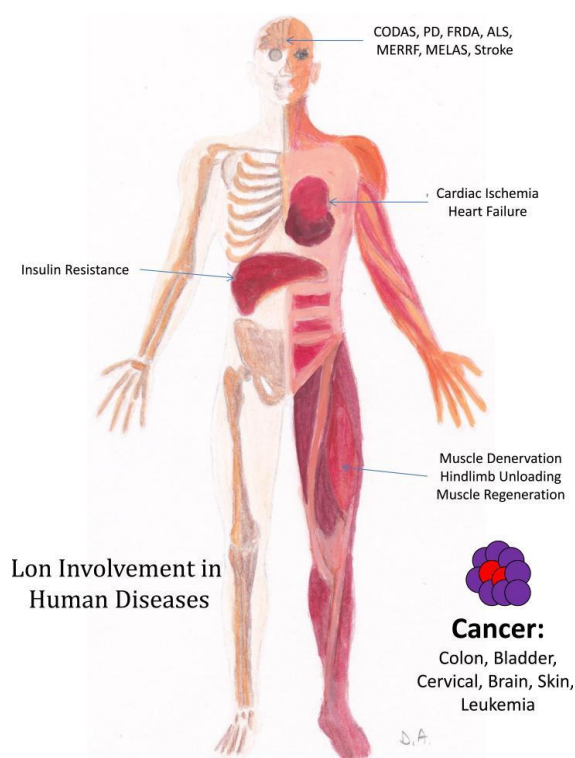


Рисунок 36. Схематическое представление участия LonA-протеазы в заболеваниях человека [133].

Обнаружено также [133], что Lon-протеаза участвует в процессах старения: уровни транскриптов мРНК Lon примерно в четыре раза ниже в скелетных мышцах у старых мышей, чем у молодых. Уровень Lon-протеазы и ее протеолитическая активность также были понижены в мышцах старых мышей. Возрастное снижение экспрессии и протеолитической активности Lon может быть тканеспецифичным. Например, уменьшение активности Lon происходит параллельно с накоплением поврежденных белков в митохондриях печени крыс, выделенных из старых животных. Однако в митохондриальном матриксе сердца этих старых животных активность Lon-протеазы

остается постоянной, и уровень экспрессии Lon у старых животных выше, чем у молодых. Это может быть доказательством влияния метаболической активности ткани на транскрипцию, трансляцию и энзиматическую активность Lon-протеазы. Вместе с тем, вопрос о регуляции Lon в процессах старения остается до конца неизученным и требует дальнейшего исследования.

Митохондриальная Lon-протеаза поддерживает жизнедеятельность клеток во время гипоксического и протеотоксического стресса, который является фенотипическим свойством раковых клеток. Кроме того, было показано, что активность *HumLon* подавляется в раковых клетках, и ее снижение приводит к гибели клеток лимфомы, поэтому *HumLon* может характеризоваться как новый потенциальный антираковый препарат [138].

В последние годы Lon-протеазы все чаще рассматриваются в качестве потенциальных диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней как для лечения различных видов рака, так и для прогнозирования эффективности химиотерапии [133, 136, 137]. Можно полагать, что углубленное изучение архитектуры Lon-протеаз и механизмов их функционирования послужит важным вкладом в разработку новых подходов к выявлению патологических нарушений и, возможно, к дизайну перспективных соединений для терапии этих нарушений.

3.3. Заключение

Объектом исследования в настоящей работе является один из ключевых участников протеолитического комплекса системы контроля качества (СКК) клеточного протеома – АТР-зависимая Lon-протеаза из *Escherichia coli* (*EcLon*), способная в отличие от других протеаз СКК к связыванию ДНК. Как показано в обзоре литературы, система контроля качества, включающая молекулярные шапероны и АТР-зависимые протеазы, вовлечена в регуляцию многих жизненно важных процессов во всех доменах жизни. При этом шапероны различных семейств участвуют в корректном фолдинге белков и сборке белковых ансамблей, а АТР-зависимые протеазы осуществляют селективный протеолиз регуляторных клеточных белков и, кроме того, деградируют мутантные, поврежденные и дефектные белки, а также белки с нарушенной пространственной структурой.

Протеолитические компоненты протеаз СКК представлены пептидгидролазами разных классов, а АТР-азные относятся к суперсемейству AAA⁺-белков – АТР-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями. К этому же суперсемейству принадлежат и шапероны-дезагрегазы семейства Clp/Hsp100. Основой структуры AAA⁺-белков являются топологически подобные АТР-азные модули, сформированные нуклеотидсвязывающими и α -спирализованными доменами, а их различительными составляющими служат преимущественно N-концевые некаталитические экстрадомены.

Подробное рассмотрение некаталитических экстрадоменов AAA⁺-протеаз и Clp-шаперонов позволило выявить как высокое сходство большинства их представителей в отношении размеров, так и значительные структурные различия. Вместе с тем было продемонстрировано, что некаталитическая N-концевая область Lon-протеаз подсемейства A, к которым относится *EcLon*-протеаза, отличается от экстрадоменов других AAA⁺-белков СКК сильно увеличенным размером и, предположительно, двухдоменной организацией – комбинацией β -структурированного N-домена и следующего за ним α -спирализованного домена, включающего участок с coiled-coil(CC)-конформацией (*helical inserted domain with CC region* – HI(CC)-домен). При этом было обнаружено, что по первичной и вторичной структуре HI(CC)-домен LonA-протеаз проявляет заметное сходство с HI-доменами D1-модулей шаперонов ClpB. Предполагаемое строение N-концевой области LonA-протеаз послужило основой для гипотезы, согласно которой HI(CC)-домен рассматривается как N-домен гипотетического AAA⁺-модуля, который мог предшествовать существующему AAA⁺-модулю LonA, но утратил свой нуклеотидсвязывающий NB-домен.

На основании вышеизложенного **цели настоящей работы** заключались в проверке справедливости гипотезы о доменной организации 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**:

- 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.
- Осуществление дизайна и получение очищенных препаратов ряда модифицированных в N-концевой области форм *EcLon*-протеазы.
- Сравнительное исследование энзиматических свойств и олигомерного состояния модифицированных форм *EcLon*-протеазы и интактного фермента.
- Изучение способности модифицированных форм *EcLon*-протеазы к связыванию ДНК.

4. Материалы и методы

4.1. Материалы

4.1.1. Штаммы *Escherichia coli*

BL21 (DE3) ($F^- ompThsdS_B(\Gamma_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)) Invitrogen, США.

TOP10 $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 nupG recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 \lambda^-$, Invitrogen, США.

4.1.2. Плазмидные конструкции

В работе были использованы плазмидные векторы *pET28a(+)* и *pET28b(+)* (Novagen, США).

4.1.3. Реактивы

В работе были использованы: дрожжевой экстракт, триптон, бакто-агар («Difco», Англия); агароза, реактив Брэдфорд (Bio-Rad, США); трис-(гидроксиметил)-аминометан (Tris), додецилсульфат натрия (SDS), кумасси R/G-250, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), β -меркаптоэтанол, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), персульфат аммония (PSA), глицерин, 4,4'-дитиодипиридин (DTDP), ADP, ATP (Boehringer Mannheim, Германия); акриламид, метиленбисакриламид (Bio-Rad, США); канамицин, бромфеноловый синий (KochLight, Англия); стрептомицин (ОАО Синтез, Россия); глицин, Tris-ацетат, мочевиная, ацетат натрия, ацетат цинка дигидрат, сульфат никеля, молибдат аммония $((NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O)$, диметилсульфоксид (DMSO), метанол, этанол, изопропанол, дигидроортофосфат калия, гидроортофосфат калия, хлорид магния, хлорид натрия, гидроксид натрия, соляная кислота (Реахим, Россия), белковые стандарты для электрофореза и калибровки колонок для гель-фильтрации (Pharmacia, Швеция); маркеры размеров ДНК для электрофореза в агарозном геле (Sigma, США).

В качестве компонентов буферов использовали соли квалификации «ос.ч.» и «х.ч.»

Эндонуклеазы рестрикции (Thermo Fisher Scientific, США); лизоцим яичного белка, РНКазы А, химотрипсин, бензоназа – неспецифическая эндонуклеаза из *Serratia marcescens* (Sigma, США). Для эндонуклеаз рестрикции использовали буферные растворы, поставляемые вместе с ферментом.

Для выделения белков использовали

- хроматографические колонки: HiTrap™ Chelating FF, HiTrap™ Q Sepharose HP, HiTrap™ Heparin HP объемом по 5 мл; HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (все фирмы «GE Healthcare Life Sciences», США),
- мембраны PVDF (поливинилиденфторид) (0.45 мкм),
- концентраторы AmiconUltra-15 и AmiconUltra-4, 10 кДа (Millipore, США).

4.1.4. Культуральные среды

Среда LB: 0.5 % NaCl; 0.5 % дрожжевой экстракт; 0.8 % триптон. Для заливки чашек использовали 1.5 % агаризованную среду LB. Среда стерилизовали автоклавированием при 120 °C в течение 30 мин.

4.1.5. Растворы

– *растворы для приготовления компетентных клеток*

Раствор 1: 0.1 М CaCl₂, 20 мМ MgCl₂.

Раствор 2: 0.1 М CaCl₂, 10 % глицерин.

Растворы стерилизовали автоклавированием при 120 °C в течение 30 мин.

– *буферные растворы для выделения и очистки Lon-протеазы и ее модифицированных форм*

Буфер (1): 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5.

Буфер (2): 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 М NaCl, 20 мМ имидазол.

Буфер (3): 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 М NaCl, 100 мМ имидазол.

Буфер (4): 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 М NaCl, 1 М имидазол.

Буфер (5): 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5; 1 М NaCl.

Буфер (6): 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 М NaCl.

Буфер (7): 50 мМ имидазол, pH 7.5; 0.5 М NaCl.

– *растворы для определения ферментативной активности*

1. Буфер GFB: 50 мМ Tris-HCl pH 8.5; 150 мМ NaCl.

2. Буфер для определения пептидазной активности: GFB, 10 % DMSO.

3. Реагент для определения неорганического фосфата: 100 мМ Zn(AcO)₂*2H₂O, 15 мМ (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 1 % SDS, pH 4.5 – 5.0.

4. Стоковые растворы субстратов и эффекторов: 100 мМ ATP (ADP или AMPNP)/0.3 М Tris-HCl pH 8.5; 10 мМ Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl/DMSO; 10 мг/мл β-казеин/GFB; 1 М MgCl₂/H₂O; 40 мМ DTDP/DMSO.

– *растворы для проведения гель-электрофореза и блоттинга белков*

Растворы для приготовления и обработки акриламидных гелей

1. Stock (30 %): 29 % акриламид; 1 % N, N'-метиленабисакриламид.
2. Буфер для нижнего геля (БНГ, 4х): 0.5 М Tris-HCl, pH 6.8, 0.4 % SDS.
3. Буфер для верхнего геля (БВГ, 4х): 1.5 М Tris-HCl, pH 8.8, 0.4 % SDS.
4. 25 % персульфат аммония (PSA).
5. Раствор-1 для фиксации и окрашивания белковых полос: 0.2 % Кумасси G-250, 45 % метанол, 10 % уксусная кислота.
6. Раствор-2 для отмывки геля: 7 % уксусная кислота, 10 % изопропанол.
7. Электродный буфер (ЭБ, 10х): 250 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 % SDS, 1.92 М глицин.
8. Буфер-1 для приготовления образцов (4х): 0.2 М Tris-HCl, pH 8.9, 4 % SDS, 20 % глицерин, 0.5 мМ EDTA, 5 % β-меркаптоэтанол, 0.8 % бромфеноловый синий.

Растворы для блоттинга

1. Буфер для электропереноса на мембрану (БЭ, 1х): 25 мМ Tris, 192 мМ глицин, pH 8.3, 20 % метанол, 0.01 % SDS.
2. Раствор-1 для окрашивания белковых полос: 0.1 % Кумасси R-250, 50 % метанол.
3. Раствор-2 для отмывки геля: 10 % уксусная кислота, 50 % метанол.

– *растворы для выделения плазмидной ДНК*

Раствор-1: 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7.5; 10 мМ EDTA, 100 мкг/мл РНКазы А.

Раствор-2: 0.2 М NaOH, 1 % SDS.

Раствор-3: 3 М CH₃COOK, pH 5.2.

– *растворы для проведения электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле*

1. TAE-буфер (50х): 200 мМ Tris-HCl, pH 8.3, 50 мМ EDTA, 100 мМ уксусная кислота.
2. Буфер для приготовления образцов (6х): 10 мМ Tris-HCl (pH 7.6) 0.03 % бромфеноловый синий, 0.03 % ксиленианол FF, 60 % глицерин 60 мМ EDTA.

4.2. Методы

4.2.1. Получение компетентных клеток BL21(DE3) / TOP10 *E. coli*

Клоны соответствующих клеток культивировали в 100 мл среды LB (в присутствии стрептомицина в случае TOP10) до оптического поглощения $A_{600} = 0.4-0.5$ о.е., центрифугировали 10 мин (4000 об/мин, 4 °С), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 40 мл 100 мМ CaCl₂, выдерживали 30 мин во льду и

центрифугировали 10 мин (4000 об/мин, 4 °С). Повторяли процедуру 2 раза. Осадок клеток ресуспендировали в 2 мл 100 мМ CaCl₂ с добавлением глицерина до 10 %, фасовали в стерилизованные и охлажденные пробирки по 50 мкл и хранили при -55 °С.

4.2.2. Получение генно-инженерных плазмидных конструкций

4.2.2.1. Получение базовой плазмидной конструкции *pET28a-lon-C-His*

Для клонирования полноразмерной Ec-Lon-протеазы с His-tag на С-конце белка в высокопродуктивный вектор *pET28a(+)* проводили амплификацию гена *lon* с помощью ПЦР, используя векторную плазмиду *pBR327lon* в качестве матрицы. С применением олигонуклеотидных праймеров f1 и f2 (табл. 3) получили ДНК-фрагмент длиной около

Таблица 3. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов (ЗАО Евrogen, Россия), использованных в работе.

Модификация EcLon	Праймер	Структура праймера, (5' - 3')*	Рестриктазы
Ec-Lon	f1	AATCCTGAGCGTTCTGAACGC	
	f2	GGGCTCGAGTTTTGCAGTCACAACCTGCATG	<i>XhoI</i>
Lon-dHI(CC)	Lon_d_124-304	TTTTTTGACCTTGCTGCGCGCATCAATGGTCGGCGACTCCAG	
	f3	CGCAGAAAGAAGCTTCAACGG	<i>HindIII</i>
	f4	GTTCTGCTCTGGATCCAGCAC	<i>BamHI</i>
Lon-d(CC)	f3	CGCAGAAAGAAGCTTCAACGG	<i>HindIII</i>
	f4	GTTCTGCTCTGGATCCAGCAC	<i>BamHI</i>
	Lon_d[173-280]-G5_rev	CATGCCGCCGCCGCCCATGTGCAGCAATGGTATCCGCC	
	Lon_d[173-280]-G5_fw	CATGGCGGCGGCGGCGGCATGTCTCCGATGTCCGCAGAAG	
Lon-d106	Lon_G107	CGCCCATGGGCGAACACTTTTCTGCGAAG	<i>NcoI</i>
	f2	GGGCTCGAGTTTTGCAGTCACAACCTGCATG	<i>XhoI</i>
Lon-d172	f5	AAGAGAGAGCCATATGAATCCTGAGCGT	<i>NdeI</i>
	f6	TGCATTTTGCTCGAGGTCACATTTTGC	<i>XhoI</i>
Lon-R164A	Lon_R-164	CAGCAATGGTATCCGCCAGAGCGGCCGGATCGTTCGATGCTATT	
	f3	CGCAGAAAGAAGCTTCAACGG	<i>HindIII</i>
	f7	CGCATTCCACGGTACCTGTAC	<i>Acc65I</i>
Lon-R192A	f3	CGCAGAAAGAAGCTTCAACGG	<i>HindIII</i>
	f7	CGCATTCCACGGTACCTGTAC	<i>Acc65I</i>
	Lon_R192A_XbaI	GAGATGTCCGACGTTAACGAAGCTCTAGAATATCTGATGGCAATGATGG	<i>XbaI</i>
Lon-Y294A	f3	CGCAGAAAGAAGCTTCAACGG	<i>HindIII</i>
	Lon_Y294A_MunI	GAAGCGACCGTAGTGCCTGGTGCAATTGACTGGATGGTACAGGTACC	<i>MunI</i>
	f4	GTTCTGCTCTGGATCCAGCAC	<i>BamHI</i>
Lon-R542A	f2	GGGCTCGAGTTTTGCAGTCACAACCTGCATG	<i>XhoI</i>
	f8	CTGACCGTCGACGATAGCGC	<i>Sall</i>
	Lon_R542A	CAGTTTGGAGATTTACCGCTCTAGACCAGCCACGCCCGCTCACGGGT	<i>XbaI</i>
Lon ^{EKR}	Lon_E34K35R38/AAA	CCATCGCCGCTCCAGACAAGCGATAGATGCTGCCCGCCCGACAAATAAGGGG	
	T7 promoter	TTAATACGACTCACTATAGGGGA	
	f9	CGTTTACACCCGGCTCATCC	

* Курсивом и подчеркиванием отмечены сайты узнавания рестриктаз.

2400 п.о. Продукт ПЦР обрабатывали рестриктазами *NcoI* и *XhoI* и клонировали в вектор *pET28a(+)*, предварительно обработанный теми же рестриктазами. Полученную плазмиду *pET28a-lon-C-His* использовали далее в работе в качестве матрицы для получения модифицированных форм Ec-Lon.

4.2.2.2. Получение плазмидных конструкций, кодирующих делеционные и укороченные формы Ec-Lon-протеазы

– плазида *pET28a-lon-dHI(CC)*

Для получения модифицированной формы Lon-dHI(CC) с делецией остатков 124-304 методом мегапраймера сконструировали праймеры Lon_delta124-304, f3 и f4 (табл. 3). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК *pET28a-lon-C-His*. На первом этапе с помощью праймеров Lon_delta124-304 и f3 получили ПЦР-фрагмент размером около 220 п.о., который использовали в качестве праймера на втором этапе вместе с праймером f4. Полученный фрагмент ДНК длиной около 625 п.о. клонировали в вектор *pET28a-lon-C-His* при использовании уникальных сайтов рестрикции *HindIII* и *BamHI*.

– плазида *pET28a-lon-d(CC)*

Для получения плазмидной конструкции *pET28a-lon-d(CC)*, кодирующей делеционную форму Ec-Lon-протеазы (Lon-d(CC)), в которой CC-участок (M173–M280) заменен на пентаглициновый фрагмент, использовали метод мегапраймеров. Были сконструированы праймеры f3, Lon_d_173-280_G5_rev, f4 и Lon_d_173-280_G5_fw (табл. 3). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа. На первом этапе с использованием в качестве матрицы плазмидной ДНК *pET28a-lon-C-His* параллельно получили фрагменты ПЦР-1 и ПЦР-2 с помощью пар праймеров f3/Lon_d_173-280_G5_rev и f4/Lon_d_173-280_G5_fw, размером 380 и 530 п.о., соответственно. Полученные фрагменты ПЦР-1 и ПЦР-2 на втором этапе служили матрицей, а в качестве праймеров выступали f3 и f4. Амплифицированный фрагмент ДНК длиной около 870 п.о. клонировали в вектор *pET28a-lon-C-His* при использовании уникальных сайтов рестрикции *HindIII* и *BamHI*.

– плазида *pET28a-lon-d106*

Плазмиду *pET28a-lon-d106* получили клонированием фрагмента длиной около 2000 п.о., являющегося продуктом ПЦР с участием праймеров Lon_G107 и f2 (табл. 3) и

матрицы *pET28a-lon-C-His*, в вектор *pET28a(+)* при использовании уникальных сайтов рестрикции *NcoI* и *XhoI*.

– **плазмида *pET28b-lon-d172***

Для получения плазмидной конструкции *pET28b-lon-d172*, кодирующей белок Lon-d172, продукт рестрикции NdeI-XhoI векторной конструкции *pET28a-lon* был переклонирован в вектор *pET28b(+)* под контроль T7 промотора. Рестрикция проводилась по внутреннему сайту NdeI, локализованному в N-терминальной области гена *lon*, и по сайту XhoI, находящемуся в полилинкере вектора. Полученный фрагмент лигировали с фрагментом вектора *pET28b(+)* (Novagen, США), обработанным соответствующими рестриктазами. Структура вектора такова, что в состав белкового продукта гена, клонированного по сайту NdeI, входит гекса-His-пептид, локализованный в дополнительном N-концевом 20-членном пептиде строения MGSSHHHHHSSGLVPRGSH.

4.2.2.3. Получение плазмидных конструкций, кодирующих мутантные формы *Ec-Lon-протеазы*

– **плазмида *pET28a-lon-R164A***

Плазмидную конструкцию мутантной формы Lon-R164A получали мегапраймерным методом. Для этого были сконструированы праймеры Lon_R164, f3 и f7 (табл. 3). Фрагмент гена, ограниченный праймерами, амплифицировали в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК *pET28a-lon-C-His*. На первом этапе с помощью праймеров Lon_R164A и f7 получили ПЦР-фрагмент размером около 300 п.о., который использовали в качестве праймера на втором этапе вместе с праймером f3. Полученный ДНК-фрагмент длиной около 730 п.о. клонировали в вектор *pET28a-lon-C-His* при использовании уникальных сайтов рестрикции *HindIII* и *Acc65I*.

– **плазмида *pET28a-lon-R192A***

Для получения мутанта *Ec-Lon-протеазы* с заменой R192A методом мегапраймера сконструировали праймеры Lon_R192A_XbaI, f3 и f7 (табл. 3). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК *pET28a-lon-C-His*. На первом этапе с помощью праймеров Lon_R192A_XbaI и f8 получили ПЦР-фрагмент, который использовали в качестве праймера на втором этапе вместе с праймером f3. Полученный фрагмент ДНК длиной около 730 п.о. клонировали в вектор *pET28a-lon-C-His* при использовании уникальных сайтов рестрикции *HindIII* и *Acc65I*.

– плазмида *pET28a-lon-Y294A*

Аналогично предыдущей форме получили плазмидную ДНК (*pET28a-lon-Y294A*) для наработки мутанта Ec-Lon-протеазы с заменой Y294A. При этом использовали праймеры Lon_Y294A_MunI, f3 и f4 (табл. 3), а также матричную ДНК *pET28a-lon-C-His*. На первом этапе проводили ПЦР с праймерами Lon_Y294A_MunI и f3, получали продукт размером около 430 п.о., который использовали в качестве праймера на втором этапе ПЦР вместе с праймером f4, получали фрагмент длиной около 1100 п.о. Целевой фрагмент ДНК клонировали в вектор *pET28a-lon-C-His*, используя уникальные сайты рестрикции *BamHI* и *HindIII*.

– плазмида *pET28a-lon-R542A*

Плазмидную конструкцию *pET28a-lon-R542A* получали мегапраймерным методом, аналогично плазмиде *pET28a-lon-R164A*, с использованием праймеров Lon_R542A, f2 и f8 (табл. 3). Клонирование целевого фрагмента ДНК длиной около 770 п.о. осуществляли, используя уникальные сайты рестрикции *Sall* и *XhoI*.

– плазмида *pET28a-lon^{EKR}*

Плазмидную конструкцию *pET28a-lon^{EKR}*, кодирующую тройной мутант Ec-Lon-протеазы получали мегапраймерным подходом. Для этого были использованы праймеры Lon_E34K35R38/AAA, T7 promoter и f9 (табл. 3). В качестве матрицы использовали *pET28a-lon-C-His*. Фрагмент гена, ограниченный праймерами T7 промотор и Lon_E34K35R38/AAA, амплифицировали. Продукт ПЦР размером около 170 п.о., полученный на первом этапе, использовали в качестве мегапраймера на втором этапе ПЦР вместе с праймером f9. В результате ПЦР-2 получили продукт размером около 250 п.о., который подвергали рестрикции по сайтам *XbaI* и *HindIII* и полученный продукт вводили в плазмиду *pET28a-lon-C-His*, обработанную теми же рестриктазами.

4.2.3. Трансформация компетентных клеток плазмидной ДНК и индукция экспрессии целевого белка

50 мкл компетентных клеток BL21(DE3) смешивали с 2 мкл плазмидной ДНК. Полученную суспензию выдерживали 40 мин при 4 °С, затем подвергали «тепловому шоку» (42 °С, 2 мин) и снова охлаждали при 4 °С в течение 5 мин. После этого к суспензии клеток добавляли 1 мл среды LB (без антибиотика), клетки ресуспендировали и выдерживали в течение 1–1.5 ч при 37 °С. Затем 100 мкл суспензии высевали на чашки Петри с антибиотиком и инкубировали в течение 14–16 ч при 37 °С.

Колонию клеток с чашки Петри переносили в пробирки с 15 мл жидкой стерилизованной среды LB с антибиотиком и инкубировали в термостатируемом шейкере при 37 °С в течение 14–16 ч.

Полученную «ночную культуру» (по 10 мл) пересевали в колбы на 2 л, содержащие по 800 мл среды LB (соотношение 1:80) с антибиотиком и инкубировали в термостатируемом шейкере в течение 2–2.5 ч до значения оптического поглощения $A_{600} = 0.5–0.7$ о.е., после чего клеточную культуру охлаждали до комнатной температуры, добавляли IPTG до конечной концентрации 0.1–0.5 мМ и продолжали инкубацию в шейкере при комнатной температуре в течение 3–5 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием при 3000–3500 об/мин в течение 10–12 мин и использовали для получения бесклеточного экстракта. Выход клеток составил 2–3 г/л.

4.2.4. Выделение и очистка Lon-протеазы и её модифицированных форм

– *Получение бесклеточных экстрактов, содержащих целевые белки*

Клетки (1 г) суспендировали в 30 мл буфера (2) для хроматографии на Ni-сефарозе, добавляли лизоцим (3 мг на 1 г клеток), инкубировали 1 ч при комнатной температуре, а затем озвучивали (6х1мин, 8 кГц) на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-А, поместив пробирки в ледяную баню. Лизат центрифугировали при 4 °С и 11 000 об/мин в течение 30 мин. Собирали бесклеточный экстракт и подвергали его хроматографическим стадиям очистки.

– *Обработка бесклеточного экстракта бензоназой*

Освобождение Ec-Lon-протеазы (или ее модифицированных форм) от эндогенной нуклеиновой кислоты проводили путем инкубации 30 мл бесклеточного экстракта в течение 30–40 мин при 4 °С с 2 мкл бензоназы (250 ед/мкл); полученный препарат подвергали дальнейшей очистке согласно разработанной схеме.

– *Хроматография на Ni-сефарозе*

Хроматографию проводили на колонке HiTrapTM Chelating FF в буфере (2). Бесклеточный экстракт наносили на колонку со скоростью 0.3–0.5 мл/мин. Затем колонку последовательно промывали буфером (2) и буфером (3) (в случае интактной Ec-Lon-протеазы). Связавшиеся белки элюировали со скоростью 1 мл/мин в условиях линейного градиента концентрации имидазола (0.02–1.0 М) за 10 объемов колонки, используя буферы (2 и 4), собирая фракции по 2 мл. Фракции анализировали с помощью гель-

электрофореза в ПААГ. Фракции с максимальным содержанием целевого белка объединяли и использовали для проведения следующей стадии хроматографической очистки.

Колонку регенерировали последовательной промывкой 10 объемами 1.5 М NaCl и 8–10 объемами H₂O и хранили в 20 % этаноле при 4 °С.

– Хроматография на Q-сефарозе

Объединенные элюаты после Ni-сефарозы разбавляли буфером (1) до конечной концентрации NaCl 100 мМ и наносили на колонку с Q-сефарозой (HiTrapTM Q Sepharose HP), уравновешенной буфером (1), со скоростью 0.3 мл/мин. Колонку промывали стартовым буфером (1). Связавшиеся белки элюировали в условиях линейного градиента концентрации NaCl (0–1.0 М) за 10 объемов колонки (буферы 1 и 5), собирая фракции по 2 мл. Фракции анализировали спектрофотометрически по значению оптического поглощения при 280 и 260 нм и с помощью гель-электрофореза. Фракции с максимальным содержанием целевого белка объединяли и использовали для проведения следующей стадии хроматографической очистки.

Колонку регенерировали последовательной промывкой 10 объемами колонки 0.1 н раствора HCl и 10 объемами колонки 0.1 н NaOH и хранили в 20 % этаноле при 4 °С.

– Хроматография на гепарин-сефарозе

Объединенный элюат после хроматографии на Q-сефарозе разбавляли в 2 раза буфером (1) и наносили на колонку с гепарин-сефарозой (HiTrapTM Heparin HP), предварительно уравновешенной буфером (1). Колонку промывали 10 объемами стартового буфера. Связавшиеся белки элюировали в условиях линейного градиента концентрации хлорида натрия (0–1 М) (буферы 1 и 5), собирая фракции по 2 мл. Фракции анализировали спектрофотометрически по значению оптического поглощения при 280 нм и с помощью гель-электрофореза. Фракции с максимальным содержанием целевого белка объединяли и использовали для проведения следующей стадии хроматографической очистки.

Колонку регенерировали последовательной промывкой 10 объемами колонки 0.1 н раствора NaOH и 10 объемами колонки 0.1 н раствора HCl или 6 М мочевиной с 1 % β-меркаптоэтанолом, хранили в 20 % этаноле при 4 °С.

– Гель-фильтрация

Гель-фильтрацию проводили в одну (А) и в две (Б) стадии на колонке HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (объем 120 мл) со скоростью 1 мл/мин.

А) Одностадийную гель-фильтрацию проводили в буфере (6).

Б) Двухстадийная гель-фильтрация включает в себя два этапа. Первый этап гель-фильтрации проводили в буфере (7), а второй в буфере (6).

Детекцию белков в элюатах проводили спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Для определения олигомерного состояния белков использовали калибровочную зависимость коэффициента доступности K_{av} от логарифма молекулярной массы белка. Для построения этой зависимости проводили гель-фильтрацию белков-стандартов с известной молекулярной массой (рис. 37).

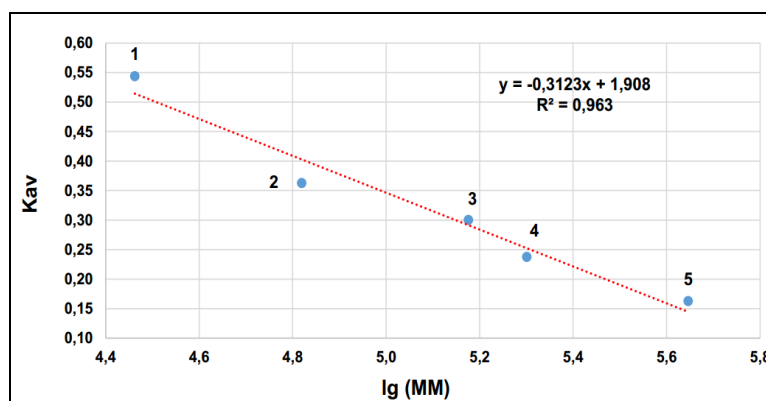


Рисунок 37. Калибровочная зависимость для белков-стандартов на Sephacryl S-300.

Условия эксперимента: 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 0.5 М NaCl; 4 °С.

Характеристики колонки: V_0 (свободный объем колонки) = 42 мл; V_t (полный объем колонки) = 120 мл.

Стандарты: 1 – карбоангидраза, 29 кДа; 2 – БСА, 66 кДа; 3 – алкогольдегидрогеназа, 150 кДа; 4 – β -амилаза, 200 кДа; 5 – апоферритин, 443 кДа.

Исходные образцы предварительно центрифугировали (5 мин, 15 000 об/мин). Фракции элюатов Es-Lon-протеаза или ее модифицированных форм анализировали с помощью гель-электрофореза и использовали для определения ферментативной активности.

4.2.5. Тестирование ферментативной активности

– АТФ-азная активность

Гидролиз АТФ тестировали по накоплению в реакции неорганического фосфата [139]. Реакцию проводили при 37 °С в 1200 мкл реакционной смеси состава:

Компоненты	Концентрация в реакции
GFB (pH 8.5)	
АТФ	2.5 мМ
MgCl ₂	2.5–20 мМ
Фермент	0.2–1.5 мкМ

В контрольном опыте аликвоту фермента заменяли буфером GFB. При определении начальных скоростей реакций гидролиза АТФ аликвоты реакционной и контрольной смеси (по 200 мкл) отбирали через равные промежутки времени в кварцевые кюветы, содержащие по 600 мкл реагента для определения неорганического фосфата. Кюветы встряхивали и определяли оптическое поглощение при длине волны 350 нм ($\epsilon_{350} = 8052 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

– *Тиоэстеразная активность*

Гидролиз тиобензилового эфира N-замещенного трипептида Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (ПерТВЕ) регистрировали спектрофотометрически по величине оптического поглощения 4-тиопиридона ($\epsilon_{324} = 16\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолата, Bzl-S⁻) с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP), используя непрерывную регистрацию сигнала [140]. Реакцию проводили при 37°C в 1000 мкл реакционной смеси состава:

Компоненты	Концентрация в реакции
GFB (pH 8.5); 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP	
ПерТВЕ	0.1 мМ
Nu	2.5 мМ
MgCl ₂	20 мМ
Фермент	0.1-0.5 мкМ

При проведении реакции в отсутствие эффекторов аликвоты последних заменяли аликвотами буфера. Кварцевая кювета с реакционной смесью находилась в термостатируемой ячейке (37 °C). Через равные промежутки времени определяли оптическое поглощение при длине волны 324 нм.

– *Определение температурной и pH-зависимостей активности ферментов*

Определение температурной зависимости АТФ-азной и пептидазной активностей для Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм проводили в диапазоне температур от 25 до 60 °C с интервалом 5 °C в буфере, соответствующем pH-оптимуму активности исследуемого фермента. pH-Оптимумы определяли при температуре 37 °C в 50 мМ Tris-HCl-буфере (для значений pH 7.5–9.0), 0.15 М NaCl, ±10 % DMSO или в 13 мМ Na₂BO₇ (для значений pH 8.1–10.7), 0.15 М NaCl, ±10 % DMSO.

– *Протеолитическая активность*

Протеолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически. Реакции гидролиза β -казеина проводили при 37 °С в отсутствие или в присутствии эффекторов в 100 мкл реакционной смеси состава:

Компоненты	Концентрация в реакции
GFB (pH 8.5)	
β -казеин	20–40 мкМ
Nu	2.5 мМ
MgCl ₂	20 мМ
Фермент	2.6–16 мкМ

В контрольных экспериментах аликвоты эффекторов и фермента заменяли буфером GFB. Аликвоты реакционной и контрольной смеси по 10 мкл отбирали в пробирки, содержащие по 4 мкл лизирующего буфера-1, денатурировали кипячением в течение 5–10 мин, использовали для проведения гель-электрофореза.

– *Тестирование ферментативной активности Ec-Lon-протеазы и химотрипсина по гидролизу FITC-казеина*

Протеолитическую активность ферментов по гидролизу FITC-казеина тестировали флуориметрически. Реакции проводили в черных 96-луночных микропланшетах при 37 °С в отсутствие или в присутствии эффекторов в 100 мкл реакционной смеси состава:

Компоненты	Концентрация в реакции
GFB (pH 8.5)	
FITC-казеин	3.0 мкМ
Nu (АТР, АМРРNP)	2.5 мМ
MgCl ₂	20 мМ
Фермент (Ec-Lon / химотрипсин)	0.6–2.0 мкМ / 0.02–0.2 мкМ

В контрольных экспериментах аликвоты фермента заменяли буфером GFB. Планшет с реакционной смесью (без фермента) предварительно инкубировали в течение 30 мин при 37 °С без доступа света. Затем добавляли фермент (Ec-Lon / химотрипсин) и измеряли интенсивность флуоресценции (RFU) каждые 20 сек в течение 3 ч при длинах волн возбуждения и испускания 480 нм и 530 нм, соответственно.

– *Автолитическая активность*

Автолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически. Реакции проводили при 37 °С в отсутствие или в присутствии эффекторов в 100 мкл реакционной смеси состава:

Компоненты	Концентрация в реакции
GFB (pH 8.5)	
Nu	2.5 мМ
MgCl ₂	20 мМ
Фермент	2.8–16 мкМ

В контрольных экспериментах аликвоты эффекторов заменяли буфером GFB. Аликвоты реакционной и контрольной смеси по 10 мкл отбирали в пробирки, содержащие по 4 мкл лизирующего буфера-1, денатурировали кипячением в течение 5–10 мин, использовали для проведения гель-электрофореза.

4.2.6. Процедуры, использованные при работе с белками

– Спектрофотометрическое определение концентрации белков

А. Наличие белка в растворе определяли спектрофотометрически по значению оптического поглощения при 280 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции (ϵ , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$), рассчитанного согласно аминокислотному составу с помощью онлайн сервера ProtParam [141].

Б. При определении белка по методу Брэдфорд [142] использовали 1X реагент фирмы Bio-Rad: к 20 мкл раствора, содержащего от 2 до 10 мкг белка, добавляли 1000 мкл реагента, инкубировали 10-20 мин и измеряли оптическое поглощение при 595 нм против контрольного образца, не содержащего белок. Концентрацию белка определяли по калибровочной зависимости для БСА (рис. 38).

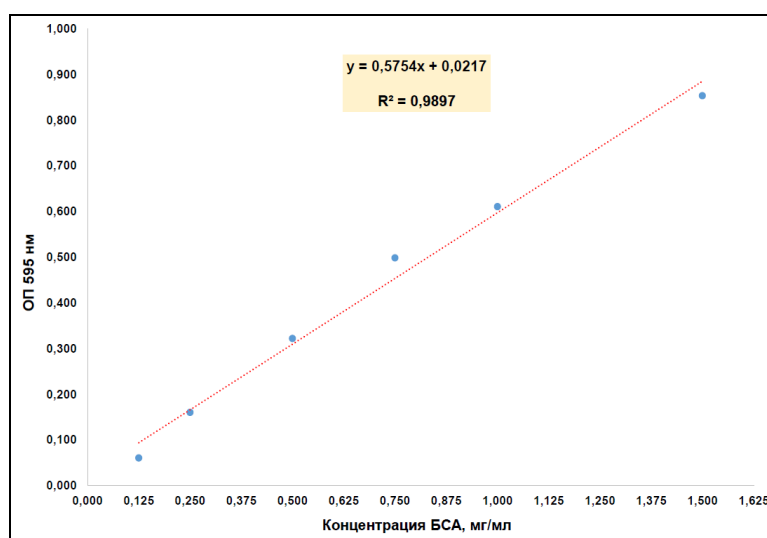


Рисунок 38. Калибровочная зависимость оптического поглощения растворов от концентрации БСА.

– *Гель-электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS*

Гель-электрофорез белков в присутствии SDS проводили по методу Леммли [143]. Образцы для электрофореза готовили путем добавления 4 мкл буфера-1 к 10–15 мкл раствора исследуемого белка с последующей денатурацией в твердотельном термостате (95 °С) в течение 5 мин.

<i>Разделяющий 10 % гель (нижний)</i>		<i>Концентрирующий 5 % гель (верхний)</i>	
Компоненты	Объем, мкл	Компоненты	Объем, мкл
H ₂ O	2 500	H ₂ O	1 150
Stock (30 %)	2 000	Stock (30 %)	350
БНГ (4x)	1 500	БВГ (4x)	500
TEMED	20	TEMED	10
PSA (25 %)	20	PSA (25 %)	10

При приготовлении пластины геля в промежуток между двумя стеклами заливали 3.5 мл нижнего (разделяющего) геля и для выравнивания границ геля сверху наслаивали 200 мкл этанола. После полимеризации геля спирт удаляли, заливали верхний (концентрирующий) гель и формировали «карманы». Стекла помещали в электрофорезную ячейку с ЭБ-буфером (1x), наносили приготовленные образцы белков и проводили электрофорез при постоянном значении силы тока (30 мА). Окрашивание геля проводили в растворе-1 в течение 10–20 мин; гель отмывали раствором-2.

– *Блоттинг*

С целью проведения N-концевого секвенирования продуктов автолиза Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм проводили блоттинг соответствующих образцов. После электрофоретического разделения белков в ПААГ проводили электроперенос белков на PVDF-мембрану (0.45 мкм) в течение 2 ч при силе тока 200 мА и температуре 4 °С. Для электропереноса использовали БЭ-буфер. После переноса мембрану отмывали 5 мин в дистиллированной воде, затем в течение 2-3 мин окрашивали раствором-1. Далее гель отмывали от краски в течение 3–4 мин раствором-2. Целевые белковые полосы вырезали и использовали для N-концевого секвенирования.

– *Аналитическое ультрацентрифугирование*

Эксперименты по аналитическому ультрацентрифугированию проводили в отделе физических методов измерений НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ на аналитической ультрацентрифуге Beckman (модель E) с фотоэлектронной сканирующей абсорбционной системой. Скоростную седиментацию проводили при 34 000 об/мин и температуре 20 °С. Концентрация ферментов составляла 0.7–1.0 мг/мл. Результаты обрабатывали с помощью программы SEDFIT (НИН, США, <http://analyticalultracentrifugation.com/default.htm>).

– Дифференциальная сканирующая калориметрия

Микрокалориметрическое исследование Ес-Lon-протеазы и ее модифицированных форм проведено совместно с лабораторией физической химии полимеров Института элементоорганических соединений РАН.

Эксперименты проводили на дифференциальном сканирующем калориметре ДАСМ-4А с объемом ячейки 0.47 мл. Растворы белков нагревали от 20 до 80 °С при постоянном давлении со скоростью 1 °С/мин. В качестве рабочего буфера использовали 50 мМ имидазол, рН 7.5, содержащий 0.5 М NaCl, 1 мМ ADP, 20 мМ MgCl₂. Образцы белков с концентрацией 2–3 мг/мл центрифугировали перед измерениями.

Кривые плавления белков анализировали с помощью программы OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, США).

– Получение флуоресцентного субстрата – FITC-казеина

К раствору β-казеина (10 мг/мл в 0.2 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9.9) по каплям добавляли раствор изотиоцианата флуоресцеина (FITC) (1 мг/мл в 100 % ДМСО) в молярном соотношении 50:1 (FITC : β-казеин) и инкубировали в течение ночи при 4 °С без доступа света. Несвязавшийся FITC отделяли хроматографией реакционной смеси на колонке PD-10 (GE Healthcare, США) с Сефадексом G-25М, уравновешенным 50 мМ Tris-HCl-буфером, рН 8.5, 0.15 М NaCl. Концентрацию и степень маркировки меченого субстрата (FITC-казеин) рассчитывали по следующим формулам:

Концентрация FITC-казеина, C (М) = $[A_{280} - (A_{\max} * CF)] * DF / \epsilon$, где A_{\max} – поглощение меченого белка при λ_{\max} FITC (495 нм), CF – корреляционный фактор для FITC ($A_{280} / A_{\max} = 0.3$), DF – фактор разбавления, ϵ – коэффициент молярной экстинкции казеина ($11\,460 \text{ М}^{-1} * \text{см}^{-1}$).

Молярное соотношение (FITC/казеин) = $(A_{\max} * DF) / (\epsilon' * C(M))$, где ϵ' – коэффициент молярной экстинкции FITC ($68\,000 \text{ М}^{-1} * \text{см}^{-1}$), C (М) – концентрация FITC-казеина.

Полученный раствор FITC-казеина хранили в небольших аликвотах при -20 °С в защищенном от света месте.

Калибровочная зависимость для FITC

Для преобразования относительных флуоресцентных единиц (RFU) в величины концентраций использовали калибровочную зависимость, представленную на рис. 39.

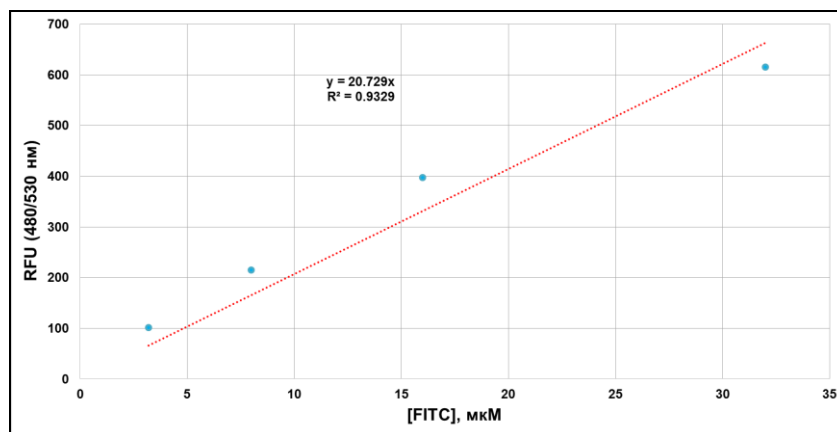


Рисунок 39. Зависимость значений RFU от концентрации FITC.

4.2.7. Процедуры, использованные при работе с нуклеиновыми кислотами

– Выделение плазмидной ДНК

10 мл «ночной культуры» (см. раздел 4.2.3) центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин, супернатант декантировали, а осадок клеток ресуспендировали в 1 мл раствора-1 и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Затем к суспензии клеток добавляли 1 мл раствора-2, перемешивали и сразу же вносили 1 мл раствора-3. Смесь инкубировали во льду (15 мин), центрифугировали 15 мин при 11 000 об/мин и аккуратно собирали супернатант. Последний смешивали с 0.7 объема изопропанола, инкубировали 1 ч при -20°C , после чего центрифугировали 20 мин при 11 000 об/мин. Осадок промывали 2–4 мл 70 % этилового спирта и центрифугировали (10 мин, 11 000 об/мин). После удаления надосадочной жидкости осадок высушивали, растворяли в деионизированной воде (или в рабочем буфере). Наличие плазмидной ДНК детектировали электрофорезом в 1.0 % агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

– Экстракция нуклеиновых кислот из белковых растворов смесью фенол-хлороформ

1 объем раствора белка встряхивали с 1 объемом фенола и центрифугировали 10 мин со скоростью 13000 об/мин. Отбирали верхнюю фазу, добавляли к ней равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1), встряхивали и центрифугировали (10 мин, 13000 об/мин). Верхнюю фазу перемешивали с равным объемом хлороформа и центрифугировали 5 мин

при 13000 об/мин. Верхнюю фазу собирали, добавляли 1/10 объема 3.5 М ацетата калия (рН 5.2) и 2.5 объема 96 % этилового спирта. После инкубации в течение часа (или ночи) при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ смесь центрифугировали (10 мин, 13000 об/мин), раствор удаляли, осадок промывали 70 % этиловым спиртом, высушивали и растворяли в деионизированной воде.

– ***Гель-электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле***

1 г агарозы растворяли в ТАЕ-буфере (1X), содержащем 0.2 % бромистого этидия, доводили до кипения, охлаждали до $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ и заливали раствор в электрофорезную ячейку с гребенкой. После застывания геля заполняли электрофорезную камеру 1X ТАЕ-буфером, удаляли гребенку и наносили образцы. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 90 В.

– ***Детектирование комплексов Lon-протеазы с плазмидной ДНК***

За образованием комплексов фермент-ДНК следили по торможению ДНК в агарозном геле (метод GMSA) [108]. 2.8 нМ Lon-протеазы инкубировали 30 мин при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ с 1.1–14 мкМ плазмидной ДНК (*pET28a*) в 25 мкл 20 мМ Трис-НСl-буфера, рН 7.5, содержащего 60 мМ NaCl. Комплексы белок-ДНК детектировали электрофорезом в стандартном 1.0 % агарозном геле. Полосы ДНК визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

– ***Полимеразная цепная реакция***

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли на амплификаторе Applied Biosystems 2720 Thermal Cyclер (ThermoFisher scientific, США). ПЦР-смесь объемом 50 мкл содержала 20 мМ Tris-НСl (рН 8.8), 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 мМ KCl, 0.1 мг/мл БСА, 0.1 % Triton X-100, 2 мМ MgSO_4 , 2.5 ед. Pfu-DNA-полимеразы, 100 нг матричной ДНК, 0.4 мкмоль каждого праймера, 0.2 мМ каждого из dNTP. Результаты ПЦР детектировали при помощи гель-электрофореза в 0.8–2.0 % агарозном геле.

Амплификацию выполняли по схеме, включающей следующие стадии: 1) предварительная денатурация при 95°C – 3 мин; 2) денатурация при 95°C – 45 сек; 3) отжиг праймеров при $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$ – 45 сек; 4) элонгация при 72°C – 15–290 сек, 20–25 циклов; 5) заключительная элонгация при 72°C – 7 мин.

Для расчета температуры отжига праймеров (Т) использовали формулу:

$$T = 2 \times N(A+T) + 4 \times N(G+C) \text{ }^{\circ}\text{C},$$

где N - количество соответствующих нуклеотидов в праймере.

Экстракцию целевых фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

– ***Реакция рестрикции***

Рестрикцию ДНК проводили в 35 мкл смеси, содержащей 33 мМ Tris-ацетат (рН 7.9), 10 мМ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 66 мМ CH_3COOK , 0.1 мг/мл БСА, 1–2 мкг ДНК, соответствующие эндонуклеазы рестрикции. Реакцию проводили при 37 °С в течение 1.5–2 ч. В случае использования векторной плазмиды по окончании реакции добавляли 1 ед. щелочной фосфатазы FastAP и инкубировали еще в течение 15–20 мин. Результаты рестрикции детектировали при помощи гель-электрофореза в 0.8–2.0 % агарозном геле.

– ***Реакция лигирования***

Реакцию лигирования проводили в 20 мкл смеси, содержащей 40 мМ Tris-HCl (рН 7.8), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ DTT, 0.5 мМ АТР, по 50–100 нг плазмидного вектора и амплифицированного фрагмента, предварительно обработанных соответствующими эндонуклеазами рестрикции, 1 ед. T4 ДНК лигазы. Реакцию проводили при 10 °С в течение 12–14 ч.

– ***Секвенирование плазмид и синтез праймеров***

Секвенирование клонированной ДНК из нескольких первичных клонов и синтез праймеров были осуществлены компанией ЗАО ЕВРОГЕН (www.evrogen.ru).

5. Результаты работы и их обсуждение

Объект исследования в настоящей работе – LonA-протеаза *E. coli* (*EcLon*, КФ 3.4.21.53; MEROPS: клан SJ, семейство S16, ID S16.001 [112]), которая, как следует из Обзора литературы, является АТФ-зависимой бифункциональной пептидгидролазой, относящейся к AAA⁺-белкам и имеющей уникальное для этого суперсемейства строение N-концевой некаталитической области.

5.1. Структурный анализ N-концевой области *EcLon*-протеазы

Согласно Обзору литературы (раздел 3.2), субъединицы протеаз подсемейства LonA формируются пятью доменами (N, HI(CC), NB, H и P), которые связаны тремя пептидными линкерами:

N—linker 1—HI(CC)—linker 2—NB—H—linker 3—P,

где некаталитическая N-концевая область представлена доменами N и HI(CC) (CC – coiled-coil участок), АТФ-азный (AAA⁺) модуль образован доменами NB и H, и протеолитический домен P является серин–лизиновой пептидгидролазой.

Такая архитектура LonA-протеаз (далее Lon) была предложена в нашей лаборатории на основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей представителей подсемейства из отдаленных источников [144, 145]. На настоящий момент проведено уточнение полученных ранее данных (в частности, относительно С-концевой области N-доменов Lon-протеаз) (рис. 40) и подтверждена высокая степень сходства в группах полноразмерных бактериальных и эукариотических ферментов (53.5 и 62.9 %, соответственно, табл. 4). Для общего пула ферментов степень сходства понижается до 39.3 %, хотя при попарном сравнении Lon-протеаз из различных источников с модельным ферментом (*EcLon*) уровень подобия ферментов не опускается ниже 60 %. Интересно отметить, что консервативность эукариотических Lon-протеаз (как полноразмерных ферментов, так и их отдельных доменов), в целом, выше, чем консервативность в группе бактериальных ферментов (табл. 4).

Сопоставление последовательностей пяти Lon-протеаз из *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus thermoruber*, *Meiothermus taiwanensis* и *Homo sapiens* (соответственно: *EcLon*, *BsLon*, *BtLon*, *MtLon* и *HumLon*), для ряда фрагментов которых вторичные структуры были экспериментально определены в результате рентгеноструктурного анализа (включая данные, полученные в настоящей работе) [99-101, 125, 146-150], позволило нам уточнить границы доменов и междоменных линкеров в полноразмерных ферментах и внести необходимые изменения в постулированные ранее параметры этих фрагментов [150].

			*		← P domain		
Ec	697	VRADVAMTGEITLRGVLPVGGI	KEKLLA	HRGGIKTVLIEFE-NKRDL	EIPDNVIADLDIHPVKRIE	EVLTLA	Q NEPSGMQVVTAK 784
Bs	695	VSREVMGTGEITLRGVLPVGGI	KEKALGA	HRAGLTIIIAEKD-NEKDIE	DIPESVREGTFFILASHLD	EVLHATV	GEKK 774
Brth	696	VRKEVMGTGEITLRGVLPVGGI	KEKALS	HRAGLTTVILEKE-NEKDIE	DIPESVRKEKLLITVEHMD	EVLRHAT	RQAVGETR 779
Thth	701	VRMDIAMTGEITLRGVLPVGGI	KEKLLA	AHQAGIHRVILEKE-NAAEL	KEVPEIILKDEIHFVEEVG	EVLKLLTL	PPPPPPAVQDRPQPGVGA 795
Brsu	707	VRKDIAMTGEITLRGVLPVGGI	KEKLLA	ALRGGIKKVLIEFE-NAKDL	EIPDNVKNNEIVPVS	RVGEVLKHTV	RQPEPIEWTEQENPTAVPPVEDEAGASLAH 812
Neme	714	VRADVAMTGEITLRGVLPVGGI	KEKLLA	ALRGGIKHVLIEKD-NVKDL	EIPENVKGTITHPVKWID	EVLALGIE	SQPEPWAEPGAEAAAESASKPKPRSRATKH 820
Hepy	759	TRSEVAMTGEITLTLSEVLPVGGI	KEKLLA	AFKAGIKTALIEVKNYER	DLDEIPAEVRENINIVAVKNIA	EVLKHTL	835
Mt	696	ARMDIAMTGEVSLRCKVMPVGGI	KEKLLA	AHQAGIHKVILEKD-NEAQL	EELPKVEVLEGLIKLVEDV	GEVLEYLTL	PEPTMPFVVQPSDNRQPGAGA 793
b		.	***	***	***	***	***
Hum	873	VRQNLAMTGEVSLTKVLPVGGI	KEKTI	IAAKRAGVTCIVLEPAE-NKDF	YDLAFAFITEGLEVHFV	VEHYREIFDIAEP	DEQAEALAVER 959
Rat	863	VLQNLAMTGEVSLTKVLPVGGI	KEKTI	IAAKRAGVTCIILEPAE-NRKDF	SDLAPFITEGLEVHFV	EHYRDLIFRIASP	LRHQEALAVER 950
Cae	896	VVQDLAMTGEISLTKVLPVGGI	KEKVI	AARRVGAQRVLENE-NRDF	DDLPPEFMKSELDIRFV	SHYDELYEHLQ	971
Drm	896	VRQDIAMTGEVSLTKVLPVGGI	KEKTI	IAARRSGVNLILEVD-NKDF	EELPTYITDGLEVHFV	ATTYEDVYKIAET	DVTETTTNNVEEQEPLQKLSAAAKSETWPYS 1006
Salm	937	VRENVAMTGEVSLTKVLPVGGI	KEKTI	IAAKRAGVTCMILEPAE-NKDF	SDLPEFITEGLEVHFV	DHYSKMYPIVEP	QQ 1014
Sac	1033	IDPTVAMTGEITLTKVLRIGGL	REKAVA	ARRSGARTIILEKD-NLND	WEELPDNVKLEPLAADW	YNDIFQKLEK	DVNTKEGNSVWKAEFEILDAKKEK 1133
Zema	897	VKKDILAMTGEVTLTKRILP	VGGI	KEKTI	AARRSAIKTLILEPAA-NKDF	EELASNVKLEGLEVHFV	DTYSEIYDLAQ 980
e		.	***	***	***	***	***
b/e		.	***	***	***	***	***

Рисунок 40. Выравнивание последовательностей 8 бактериальных и 7 эукариотических LonA-протеаз

Источники бактериальных LonA-протеаз: *Escherichia coli* (MER0000485, **Ec**), *Bacillus subtilis* (MER0000487, **Bs**), *Brevibacillus thermoruber* (MER0028409, **Brth**), *Thermus thermophilus* (MER0006064, **Thth**), *Brucella suis* (MER0022170, **Brsu**), *Neisseria meningitidis* (MER011561, **Neme**), *Helicobacter pylori* (MER0003852, **Hepy**) и *Meiothermus taiwanensis* (MER1037479, **Mt**). Источники эукариотических LonA-протеаз (без препоследовательностей): *Homo sapiens* (MER0000495, **Hum**), *Rattus norvegicus* (MER0017098, **Rat**), *Caenorhabditis elegans* (MER0004130, **Cae**), *Drosophila melanogaster* (MER0011218, **Drm**), *Salmo salar* (MER0164996, **Salm**), *Saccharomyces cerevisiae* (MER0000496, **Sac**) и *Zea mays* (MER0004077, **Zema**). Подобные остатки (.) показаны синим цветом, идентичные (*) – красным, консервативные остатки (*) выделены красным фоном. Подобие бактериальных ферментов показано в строке «b», эукариотических – в строке «e», а всего пула ферментов – в строке «b/e».

Таблица 4. Степени подобия (%) фрагментов последовательностей восьми бактериальных и семи эукариотических LonA-протеаз
 Последовательности LonA-протеаз, отобранных для сопоставления, представлены на рис. 40. Вставочные фрагменты (в доменах N, NB, H и P), а также С-концевые фрагменты не рассматривались. В отдельной строке приведены границы доменов и линкеров в последовательности LonA-протеазы из *E. coli* (см. рис. 40).
 В скобках приведены отношения количества подобных аминокислотных остатков к общему количеству остатков в субъединицах, доменах или фрагментах ферментов.

Источники LonA-протеаз	Полноразмерные послед-ти	Домены / фрагменты / линкеры							
		N domain	Linker-1	HI(CC) domain	Linker-2	NB domain	H domain	Linker-3	P domain
<i>E. coli</i>	M ¹ -Q ⁷⁷²	M ¹ -Y ¹¹⁶	L ¹¹⁷ -D ¹²³	E ¹²⁴ -V ³⁰¹	P ³⁰² -Y ³²⁵	G ³²⁶ -L ⁴⁹⁰	S ⁴⁹¹ -L ⁵⁷⁹	G ⁵⁸⁰ -V ⁵⁹⁵	G ⁵⁹⁶ -Q ⁷⁷²
Бактерии	53.5 (417 / 780)	37.6 (44 / 117)	0.0 (0 / 7)	43.4 (79 / 182)	33.3 (8 / 24)	75.3 (125 / 166)	48.3 (43 / 89)	50.0 (8 / 16)	61.8 (110 / 178)
Эукариоты	62.9 (495 / 787)	40.2 47 / 117	0.0 (0 / 8)	55.6 (105 / 189)	58.3 (14 / 24)	85.6 (143 / 167)	61.8 (55 / 89)	50.0 (8 / 16)	69.5 (123 / 177)
Общий пул 15 протеаз	39.3 (310 / 788)	12.8 15 / 117	0.0 (0 / 8)	27.5 (52 / 189)	29.2 (7 / 24)	70.1 (117 / 167)	34.8 (31 / 89)	12.5 (2 / 16)	48.3 (86 / 178)

Уровень подобия индивидуальных доменов Lon-протеаз снижается в ряду $NB > P > H > HI(CC) > N$. Наименее консервативными являются N-домены (табл. 4), причем у большинства эукариотических ферментов в С-концевой области N-доменов между их шестым и седьмым β -тяжами содержатся пептидные вставки значительного размера (до 100 аминокислотных остатков, а.о.) (рис. 40, 41). Инсерционные HI(CC)-домены обладают повышенным по сравнению с N-доменами сходством (табл. 4), которое еще более выражено у их CC-участков (48.2 и 58.3 % в группах бактериальных и эукариотических ферментов) и достигает максимума (более 69 % для обеих групп Lon-протеаз) у так называемых «длинных» спиралей (спирали $\alpha 7$ или CC-2 на рис. 41).

Функциональные компоненты ферментов – AAA⁺-модули и протеолитические домены являются наиболее консервативными (табл. 4). Линкеры (1–3), имеющие постоянные размеры во всем пуле Lon-протеаз (7-8, 24 и 16 а.о., соответственно), значительно различаются по степени подобия. В то время как в обеих группах ферментов линкеры-1 не проявляют никакого сходства, линкеры-2 показывают 33.3 % подобия среди бактериальных и 58.3 % подобия среди эукариотических протеаз. Линкеры-3 обладают 50 %-ным сходством в каждой из групп Lon-протеаз, однако, в значительной мере утрачивают его в общем пуле ферментов (табл. 4).

Как было отмечено в Обзоре литературы, пространственное строение полноразмерных Lon-протеаз до сих пор не известно. До настоящей работы были определены третичные структуры только четырех из пяти доменов Lon-протеаз из разных организмов. К ним относятся функциональные домены (NB, H, P) и N-домен некаталитической области. При этом пространственная структура NB-домена *EcLon*-протеазы не была установлена. Укладка же инсерционного HI(CC)-домена не определена еще ни для одной из Lon-протеаз. Частично этот домен представлен в структурах фрагментов *EcLon*(1-245) [101], *BsLon*(1-209) и *BsLon*(240-774) [99], а также *MtLon*(207-492) и *MtLon*(242-793) [148].

В рамках настоящей работы совместно с лабораторией кристаллографии макромолекул Национального Института Рака, руководимой проф. А. Влодавером (Фредерик, США), нами установлена третичная структура фрагмента *EcLon*(235-584) (PDB ID 6N2I, разрешение 3.5 Å), объединяющего С-концевую часть HI(CC)-домена и полноразмерный AAA⁺-модуль *EcLon*-протеазы (рис. 42 А). Начальные остатки этого фрагмента (K²³⁵–E²⁴³) представляют С-конец «длинной» спирали $\alpha 7$ (рис. 41), однако они не проявляются на картах электронной плотности. Видимые элементы структуры *EcLon*(235-584) обнаруживаются с остатка Ala²⁴⁷, предшествующего спирали $\alpha 8$ (рис. 41).

	← N domain →																																																																																																				
	β1		β2		α1		β3		α2		β4		β5																																																																																								
Ec	MN	P	S	E	R	E	I	E	I	P	V	L	P	L	R	D	V	V	V	P	H	M	V	I	P	L	F	V	G	---	R	E	K	S	I	E	C	L	E	A	A	M	D	H	D	K	K	I	M	L	V	A	Q	K	E	A	S	T	D	E	P	G	V	-	N	D	L	F	T	V	G	T	V	A	S	I	L	Q	M	L	K	L	P	D	G	T	V	K	V	L	V	E	G	L	Q	R	A	R		99	
Bs	M	A	E	E	L	K	R	S	I	P	L	L	P	L	R	G	L	L	V	Y	P	T	M	V	L	H	L	D	V	G	---	R	D	K	S	V	Q	A	L	E	Q	A	M	M	H	D	H	I	F	L	A	T	Q	D	I	S	I	D	E	P	G	E	-	D	E	I	F	T	V	G	T	Y	T	K	I	Q	M	L	K	L	P	N	G	T	I	R	V	L	V	E	G	L	K	R	A	H		97			
Bt	M	G	E	R	S	G	K	R	E	I	P	L	L	P	L	R	G	L	L	V	Y	P	S	M	V	L	H	L	D	V	G	---	R	E	K	S	V	R	A	L	E	Q	A	M	V	D	N	Q	I	L	L	A	T	Q	E	V	H	I	E	E	E	P	S	A	-	E	Q	I	F	S	V	G	T	V	A	R	V	K	Q	M	L	K	L	P	N	G	T	I	R	V	L	V	E	G	L	Q	R	A		98	
Mt	M	R	L	E	L	P	V	I	P	L	R	N	T	V	I	L	P	H	T	T	P	V	D	V	G	---	R	A	K	S	K	R	A	V	E	E	A	M	G	A	D	R	L	I	F	L	V	A	Q	R	D	P	E	V	D	D	P	A	P	-	D	D	L	Y	T	W	G	V	Q	A	V	V	K	Q	A	M	R	L	P	D	G	T	L	Q	V	M	V	E	A	R	A	Q		93							
Hum 115	M	T	I	-	P	D	V	F	P	H	L	P	L	I	A	I	T	R	N	P	V	F	P	R	F	I	K	I	E	V	K	N	K	L	V	E	L	L	R	K	V	R	L	A	Q	P	Y	V	G	V	F	L	K	R	D	S	N	E	S	D	V	V	E	S	L	D	E	I	Y	H	T	G	T	F	A	Q	I	H	E	M	Q	D	L	-	G	D	K	L	R	M	I	V	M	G	H	R	R	V	H		215

	← N domain linker 1 HI (CC) domain →										CC region, underlined →																																																																																							
	β6		β7		α3		α4		α5		α6 (CC-1)		α7 (CC-2)																																																																																					
Ec	I	S	A	L	S	D	N	G	E	H	F	S	A	K	A	E	Y	L	E	S	P	T	I	D	-	E	R	E	Q	E	V	L	V	R	T	A	I	S	Q	F	E	G	Y	I	K	L	N	K	I	P	P	E	V	L	T	--	S	L	N	S	--	I	D	D	P	A	L	A	D	T	I	A	A	H	M	P	L	K	L	A	D	K	Q	S	V	L	E	M	S	D	V	N		190				
Bs	I	V	K	Y	N	E	H	E		D	Y	T	S	V	D	I	Q	L	I	H	E	D	D	S	K	-	D	T	E	D	E	A	L	M	R	T	L	D	H	F	D	Q	Y	I	K	I	S	K	K	I	S	A	E	T	Y	A	--	A	V	T	D	--	I	E	E	P	G	R	M	A	D	I	V	A	S	H	L	P	L	K	L	K	D	K	Q	D	I	L	E	T	A	D	V	K		188		
Bt	I	D	E	Y	I	R	Q	D		D	F	F	Q	V	S	I	T	Y	L	E	E	E	K	A	D	-	E	N	E	V	E	A	L	M	R	A	V	L	S	H	F	E	Q	Y	I	K	L	S	K	K	I	S	P	E	A	L	T	--	S	V	S	D	--	I	E	E	P	G	R	L	A	D	V	I	A	S	H	L	P	L	K	M	K	D	K	Q	E	I	L	E	T	N	I	K		189		
Mt	V	T	D	Y	I	P	G	P		Y	L	R	A	R	G	E	V	F	S	E	I	F	P	I	D	-	E	A	V	V	R	V	L	V	E	E	L	K	E	A	F	E	K	Y	V	A	N	H	K	S	L	R	L	D	R	Y	Q	L	E	A	V	K	G	--	T	S	D	P	A	M	L	A	D	T	I	A	Y	H	A	T	W	T	V	A	E	K	Q	E	I	L	E	L	T	D	L	E		186
Hum	I	S	R	Q	L	E	V	E		46	V	L	M	V	E	V	E	N	V	H	E	D	F	Q	V	T	-	E	-	V	K	A	L	T	A	E	I	V	K	T	I	R	D	I	I	A	L	N	P	L	Y	R	E	S	V	L	Q	M	Q	A	G	Q	R	V	V	D	N	P	I	Y	L	S	D	M	G	A	L	T	G	A	E	S	H	E	L	Q	D	V	L	E	E	T	N	I	P		356	

	← CC-region																																																																																																				
	α7 (CC-2)		α8 (CC-3)		α9 (CC-4)		α10																																																																																														
Ec	E	L	E	L	M	A	M	M	E	S	E	I	D	L	L	Q	V	E	K	R	I	R	N	R	V	K	K	Q	M	E	K	S	Q	R	E	Y	L	N	E	Q	M	K	A	I	Q	K	E	L	G	E	M	D	D	A	P	D	E	N	E	A	L	K	R	K	I	D	A	A	K	-	M	P	K	E	A	K	E	A	E	L	Q	L	K	M	M	S	P	M	S	A	E	A	T	V	V		291				
Bs	D	R	L	N	K	V	I	D	F	I	N	N	E	K	V	L	E	I	E	K	I	G	O	R	V	K	R	S	M	E	R	T	Q	K	E	Y	L	R	E	Q	M	K	A	I	Q	K	E	L	G	E	K	D	G	R	Q	S	E	V	D	E	L	R	A	Q	L	E	K	S	D	-	A	P	E	R	I	K	N	K	I	E	K	E	L	E	R	L	E	K	M	P	T	T	S	A	E	G	A	V	I		289
Bt	E	R	L	N	I	L	D	I	L	N	N	E	R	E	V	L	E	L	E	R	K	I	S	N	R	V	K	Q	M	E	R	T	Q	K	E	Y	L	R	E	Q	M	K	A	I	Q	K	E	L	G	E	K	D	G	R	Q	S	E	V	D	E	L	R	A	Q	L	E	K	S	D	-	A	P	E	R	I	K	N	K	I	E	K	E	L	E	R	L	E	K	M	P	T	T	S	A	E	G	A	V	I		290
Mt	A	R	L	K	K	V	L	G	L	S	R	D	L	R	F	E	L	D	K	R	V	A	Q	R	V	K	E	Q	M	D	T	N	Q	R	E	Y	L	R	E	Q	M	K	A	I	Q	K	E	L	G	G	E	D	G	L	S	-	D	L	E	A	L	R	K	K	I	E	E	V	G	-	M	P	E	A	V	K	T	K	A	L	K	E	L	D	R	L	E	R	M	Q	Q	G	S	P	E	A	T	V	A		286
Hum	K	R	L	Y	K	A	L	S	L	L	K	K	E	F	E	L	S	K	L	Q	Q	R	L	G	R	E	V	E	E	K	I	K	Q	T	H	R	K	Y	L	L	Q	E	Q	L	K	I	K	K	E	L	G	L	E	K	D	D	K	D	A	I	E	E	K	F	R	E	R	L	K	E	L	V	P	K	H	V	M	D	V	D	E	E	L	S	K	L	G	L	D	N	H	S	S	E	F	N	V	T		458	

	← HI (CC) domain			linker 2			→ NB domain →			Walker A motif																																																																																												
	α10		α11		α12		β8		α13		β9																																																																																											
Ec	R	G	I	D	W	M	V	Q	V	P	W	N	A	R	S	K	V	K	K	D	L	R	Q	A	Q	E	I	L	D	T	H	Y	G	L	E	R	V	K	D	R	I	L	E	Y	L	A	V	Q	S	R	V	N	---	K	I	K	G	P	I	L	C	L	V	G	P	P	G	V	G	K	T	S	L	G	Q	S	I	A	K	A	T	G	R	K	Y	V	R	M	A	L	G	G	V	R	D	E		388				
Bs	R	N	Y	I	D	W	L	V	A	L	P	W	T	D	E	T	D	D	K	L	D	L	K	E	A	G	R	L	L	D	E	E	H	H	G	L	E	K	V	K	E	R	I	L	E	Y	L	A	V	Q	K	L	T	K	---	S	L	K	G	P	I	L	C	L	A	G	P	P	G	V	G	K	T	S	L	A	K	S	I	A	K	S	L	G	R	K	F	V	R	I	S	L	G	G	V	R	D	E		386		
Bt	R	T	Y	I	D	T	L	L	S	L	P	W	T	R	R	T	V	D	N	L	D	I	H	H	A	E	Q	V	L	N	E	D	H	Y	G	L	E	K	P	K	E	R	V	L	E	Y	L	A	V	Q	K	L	V	N	---	S	M	R	G	P	I	L	C	L	V	G	P	P	G	V	G	K	T	S	L	A	R	S	I	A	R	A	L	E	R	E	F	V	R	I	S	L	G	G	V	R	D	E		387		
Mt	R	T	Y	L	D	W	L	T	E	V	P	W	S	K	A	D	P	E	V	L	D	I	N	H	T	R	Q	V	L	E	D	H	Y	G	L	K	D	V	K	E	R	I	L	E	Y	L	A	V	R	Q	L	T	Q	G	L	D	V	R	N	K	A	P	I	L	V	L	V	G	P	P	G	V	G	K	T	S	L	G	R	S	I	A	R	S	M	N	R	K	F	H	R	I	S	L	G	G	V	R	D	E		387
Hum	R	N	Y	L	D	W	L	T	S	I	P	W	G	K	Y	S	N	E	N	L	D	L	A	R	A	Q	A	V	L	E	E	D	H	Y	G	M	E	D	V	K	R	I	L	E	F	I	A	V	S	Q	L	R	G	---	S	T	Q	G	K	I	L	C	F	Y	G	P	P	G	V	G	K	T	S	I	A	R	S	I	A	R	L	N	R	E	Y	F	R	F	S	V	G	G	M	T	D	V		555				

	Walker B motif										← NB domain		
	α14	β10	α15	β11	β12	β13	s1	α16	Rf	β14			
Ec	AEIRGHRRTYIGSMPG KLIQKMAK VGVKNP LFL LD E IDKMSSDMRGD PASALLE VLDPEQNVAFSDHYLEV DYD LDSDV MFVATSN -SMNIP APLLDR M EV IRL	490											
Bs	SEIRGHRRTYVGAMP GRIIQGMK KAGKLN VFL LD E IDKMS SDFR GDP SAMLE VLDPEQNSSFSFDHYIEETF FDLSK V LF IATANNLATIP GPLRDR M E IINI	489											
Bt	AEIRGHRRTYVGALPGRIIQGMKQAGTIN VFL LD E IDK LASDFR GDPASALLEVLD PNQ NDKFS DHYIEET YDLTNV MFIT TAN STHT IPR PLDR M E VI SI	490											
Mt	AEIRGHRRTYIGAMP KLIHAMKQV GVIN VILL LD E IDKMS SDWR GD PASAMLE VLDPEQNT FTD HYLDV PYD LSKV FFIT TANTL QTI PR PLDR M E VI EI	490											
Hum	AEIKGHRRTYVGAMP GKIIQCL KKT TENP L LIL LD E VDKIGRGYQGD PSSALLE LLDPEQ NANFL DHYLDV VPD LSKV LFI CTAN VTD TIPE PLDR M E MINV	658											

	H domain →							← H domain		linker 3 →		
	S491	α17	β15	α18	s2	α19	β16	α20	F584			
Ec	SGY TEDE KLNI AKRHLL PKQ IERN AL KKGE L TV DD SAI IG IIR YYT REAGV GL ERE IS KL CR KA VK QL LLDKSLKH IE INGDN LHD YLGV QRF DYGRADNE	592										
Bs	AGY TEIE KLE IVKD HLLPKQ IKEH LK KS N LQ LRD QA ILDI IR YYT REAGV RS LER QL AAI CR KA AK IV AEER-KRI TV TE KN LQ DFI G KR IFRYG QAE TE	590										
Bt	AGY TELE KLHIMRDY LLPK Q ME EHGLGRD LQ M NEE AM LK VI ROY T REAGV R NLN REA ANIC R KA AR LV SGEK-KR VV TP KT VES LL G KP RYRYGL AERE	591										
Mt	PGY TNME Q AIA RQ YL WP KQ VRE-S GME GR IEV T DA AIL LR VI SEY T REAGV R GLER EL GK IAR KG AK FW LE GAW EGL RTD AS DI PT YL G IP RYR PD KAETE	591										
Hum	SGYVA QEK LAI AERY LVP QAR ALCGL DES KAKLSSD VLT LLIK QY CR ES GV RNL Q KQ VE KV LR KS AY KI VS GEA -ES VE VT PE N LQ DFV GK PV FT VERMYDV	759										

	← linker 3		P domain →										
	G596	β17	β18	β19	α21	α22	β20	β21	*	α23			
Ec	NRV GQ VTGLAW TE VGG DL LT IE TAC VP G KG K LY TG SL GE VM Q ESI Q AAL TV VRA RAEK LGIN PD FYE K RDI H VH V PE GAT PKD GP SAG IAM CTAL V SC	691											
Bs	DQV GV VTGLAY TT VGG DT LS IE VS LS P GK G KL IL TG KL GD VM RESA Q AA FS YV RS KTE ELGI EP DF HE KY DI HI HV PEGAV PKD GP SAG IT MATAL V SA	689											
Bt	DQV GA VTGLAW TQ AGGD T LN VE VS IL P GK G KL TL TG QL GD VM ESA Q AA FS YI RS R AA AW NI D EF FHE KNDI HI H V PEGAI PKD GP SAG IT IATAL V SA	690											
Mt	PQV GTA QGLAW TP VGG T LL TI E VAA VP G SG KLS L TG QL GE VM KESA Q AAL TY LRA H TQ DY GL PE DF YN KV DL HV H V PDGAT PKD GP SAG IT MATA I ASA	690											
Hum	TPP G VM GL AW TAM GG S TL F V ET SLRR 9 KD GS L EV T G QL GE VM KES ARI AY TF ARA FI LQ H AP AND YLV T SHI HL HV PEGAT PKD GP SAG CT IV T ALL SL	867											

											← P domain		
	β22#	β23	β24	*α24	β25	α25	α26	β26	α27				
Ec	L T GN P VR AD VAM TE IT LR G Q VLPIGG LKE K LLA HR G GI K TV LIP F EN K R DL E IP DN VI AD L DI H P V K RI EE V L TL LQ NE PS GM Q V V TAK (LE HHHHHH)	784											
Bs	L T GRA V S R EV GM TE IT LR GR VLPIGG LKE K AL GA HR AG L T TI AP K DN E K D IED IP ES V REG L TF IL ASH L DEV LE HALV GE KK	774											
Bt	LT G IP V R K EV GM TE IT LR GR VLPIGG LKE K AL SA HR AG L TT V IL P K EN E K D IED IP ES V R KE L KL IT VE HM DEV LR HALT RQ AV GE TR	779											
Mt	L S RR PAR MD I AM TE GV SL R G K V MP IG G VKE K LLA A HQ AG I H K IV L PK D NE AQ LE EL P KE V LE GLE IK LV ED V GE V LE Y LLL PE PT MP P V VQ PS DN R Q Q PG AGA	793											
Hum	AM GR P V R Q N L AM TE GV S LT GK IL P VGG IK E K TI AA K R AG V TC IV L PA EN K K D F Y DL A FI TE GLE V H F VE H Y RE I F DI A FP DE Q AE LA V ER	959											

Рисунок 41. Выравнивание первичных и вторичных структур протеаз *EcLon* (Ec), *BsLon* (Bs), *BtLon* (Bt), *MtLon* (Mt) и *HumLon* (Hum).

Для сопоставления фрагментов первичных структур использована программа http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/clustalw_parser, границы доменов и линкеров определены согласно данным по вторичной структуре. Границы фрагмента *EcLon*(235-584) и остаток A247 выделены голубым цветом.

Элементы вторичной структуры, выявленные согласно данным рентгеноструктурного анализа, показаны жирным шрифтом; аминокислоты, образующие α-спирали, показаны красными буквами, 3/10 спирали – малиновыми, β-тяжи – синими, остатки, не включенные в элементы вторичной структуры, – черными; остатки, не видимые в кристаллических структурах, выделены курсивом; знак ▼ показывает вставочный сайт в N-домене. Желтым цветом выделены консенсусные элементы последовательностей: мотивы Уолкера А и В (*Walker A/B motifs*), остатки сенсор-1 (s1), сенсор-2 (s2), «аргининовый палец» (Rf), каталитические остатки – серин (S*) и лизин (K*), важный для активности остаток треонина (T#). C-Концевой октапептид рекомбинантной формы *EcLon*-протеазы заключен в скобки и выделен курсивом. Остатки, подвергнутые мутации в настоящей работе (E34, K35, R38, R164, R192, Y294 и R542), выделены зеленым цветом.

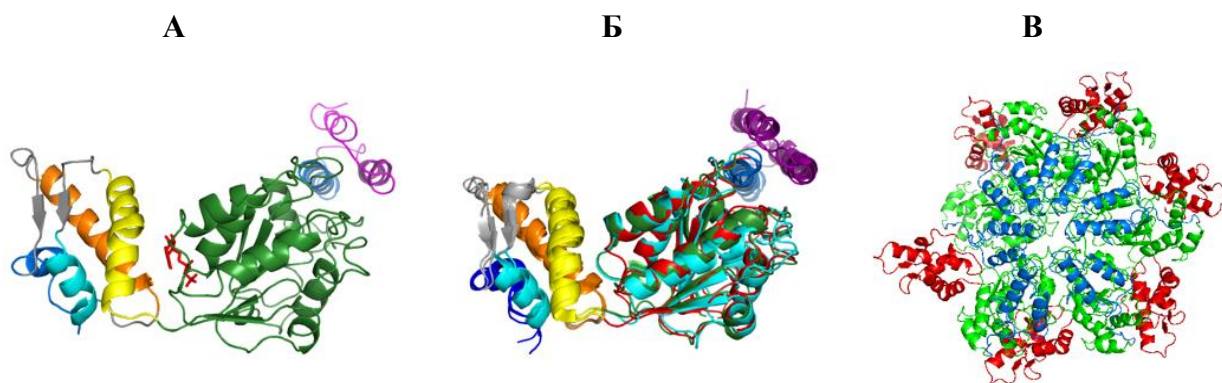


Рисунок 42. Кристаллическая структура фрагмента *EcLon*(235-584).

(А) Мономер *EcLon*(235-584): три N-концевые спирали (фрагмент N²⁵¹-M²⁹⁸) являются спиралями $\alpha 8$, $\alpha 9$ (фиолетовые) и $\alpha 10$ (синяя) HI(CC)-домена; линкерная спираль $\alpha 11$ (L³¹³-D³²¹) и NB-домен – темно-зеленые; спирали ($\alpha 17$ - $\alpha 20$) H-домена (S⁴⁹¹-F⁵⁸⁴) показаны желтым, голубым, оранжевым и синим цветами, соответственно. Связанная молекула ADP показана красным цветом.

(Б) Совмещение структур *EcLon*(235-584) (PDB ID 6N2I), *BsLon*(240-582) (PDB ID 3M6A) и *MtLon*(244-584) (PDB ID 4YPL). Спирали HI(CC)- и H-доменов окрашены как на рис. (А); NB-домены: красный – *EcLon*, темно-зеленый – *BsLon*, голубой – *MtLon*.

(В) Гексамер *EcLon*(235-584): N-концевые трехспиральные пучки каждого мономера показаны синим цветом, NB-домены – зеленые, H-домены – красные.

Полученные рентгеноструктурные данные позволили впервые охарактеризовать вторичную структуру как C-концевой части (A²⁴⁷-V³⁰¹) HI(CC)-домена, включающей три α -спирали, так и NB-домена (G³²⁶-L⁴⁹⁰) и связывающего их линкера-2 (P³⁰²-Y³²⁵) в субъединице *EcLon*. Суперпозиция кристаллических структур *EcLon*(235-584) и соответствующих фрагментов *BsLon* [99] и *MtLon* [148] демонстрирует их высокое топологическое подобие (рис. 42 Б), что согласуется с высоким сходством (69.2 %) их первичных структур. Несмотря на значительную гибкость N-концевой части фрагмента *EcLon*(235-584), данные электронной плотности однозначно определяют как общий фолд NB- и H-доменов, так и упаковку индивидуальных протомеров в открытые спиральные гексамерные кольца (рис. 42 В).

Важно подчеркнуть, что полученные результаты позволяют рассматривать *EcLon* как единственную на настоящий момент LonA-протеазу, для которой известны пространственные структуры фрагментов, в совокупности покрывающих полную последовательность фермента: это – *EcLon*(1-245) (N-домен и N-концевая часть HI(CC)-домена), *EcLon*(235-584) (C-концевая часть HI(CC)-домена и AAA⁺-модуль), *EcLon*(491-584) (H-домен) и *EcLon*(585-784) (P-домен) (рис. 43 А-Г). Совмещение этих фрагментов (с учетом их перекрываний) могло бы дать представление о структуре полноразмерного фермента. Вместе с тем, аналоги объединенной структуры, включающей три последних фрагмента *EcLon*-протеазы, уже известны: это топологически подобные структуры *BsLon*(240-774) (рис. 43 Д) и *MtLon*(242-793) [99, 148]. При этом ни для *BsLon*, ни для

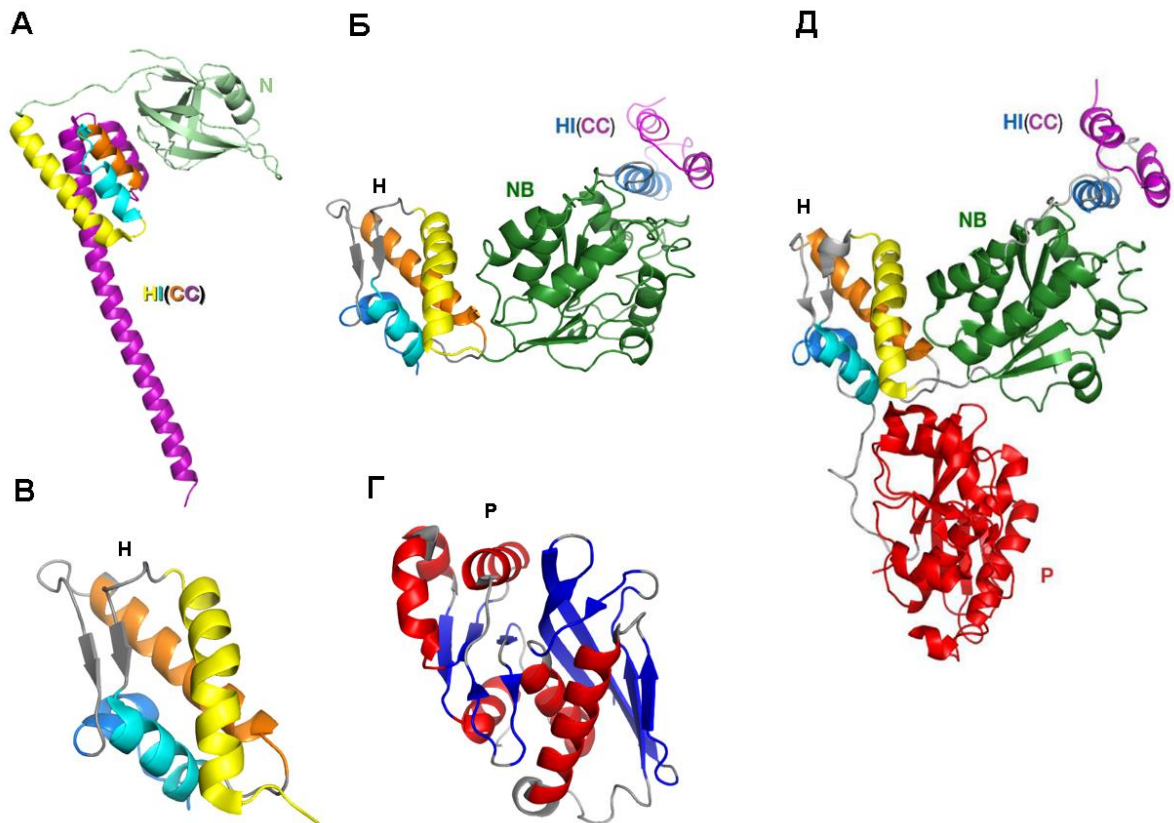


Рисунок 43. Кристаллические структуры фрагментов протеаз *EcLon*(1–245) [101] (А), *EcLon*(235–584) (Б), *EcLon*(491–584) [147] (В), *EcLon*(585–784) [146] (Г) и *BsLon*(240–774) [99] (Д).

(А) *EcLon*(M¹–D²⁴⁵) (PDB ID 3LJC): N-домен (M¹–Y¹¹⁶) показан оливковым цветом; спирали HI(CC)-домена показаны соответственно желтым (α 3, E¹²⁴–N¹⁴⁵), голубым (α 4, P¹⁴⁹–I¹⁵⁹), оранжевым (α 5, P¹⁶²–H¹⁷²) и фиолетовым (α 6 и α 7, Q¹⁸¹–E¹⁸⁵ и V¹⁸⁹–E²⁴³) цветами. (Б) *EcLon*(A²⁴⁷–F⁵⁸⁴) (PDB ID 6N2I): N-концевые спирали, относящиеся к HI(CC)-домену, показаны фиолетовым (α 8, α 9) и темно-синим (α 10) цветами; линкер-2 и NB-домен – темно-зеленые; спирали H-домена (α 17– α 20) окрашены как спирали α (3–5) и α 10 HI(CC)-домена. (В) H-домен (S⁴⁹¹–F⁵⁸⁴) (PDB ID 1QZM): цвета спиралей как в (Б); (Г) P-домен (D⁵⁸⁵–K⁷⁸⁴) (PDB ID 1RRE): α -спирали – красные, β -тяжи – синие. (Д) *BsLon*(G²⁴⁰–K⁷⁷⁴) (PDB ID 3M6A): спирали HI(CC)- и H-доменов окрашены как в (Б); линкер-2 и NB-домен – темно-зеленые; P-домен – красный.

MtLon до сих пор не определена структура N-концевых фрагментов, предстоящих спиралью α 8 (рис. 41). Таким образом, для получения информации о возможной трехмерной структуре полноразмерных бактериальных LonA-протеаз оптимальным явилось бы корректное совмещение фрагментов *EcLon*(1–245) и *BsLon*(240–774) (структуры А и Д на рис. 43).

Однако в действительности такое моделирование оказалось невыполнимым вследствие чрезвычайной гибкости региона, включающего HI(CC)-домен, что до известной степени объясняет трудности, возникающие при выращивании кристаллов полноразмерных ферментов.

В последнее время для изучения структуры полноразмерной *EcLon*-протеазы нами были использованы возможности электронной микроскопии (ЭМ). Методом негативного контрастирования обнаружены популяции додекамеров и, в меньшей степени, гексамеров

в протеолитически неактивном мутанте *EcLon-S679A* (рис. 44 А). В результате 3D-реконструкции и уточнения (разрешение ~ 20 Å) установлено, что додекамеры фермента представляют асимметричные V-образные комплексы из двух гексамеров, взаимодействующих своими N-концевыми областями. При этом форма гибких N-концевых доменов в отдельных протомерах остается неясной (рис. 44 А).

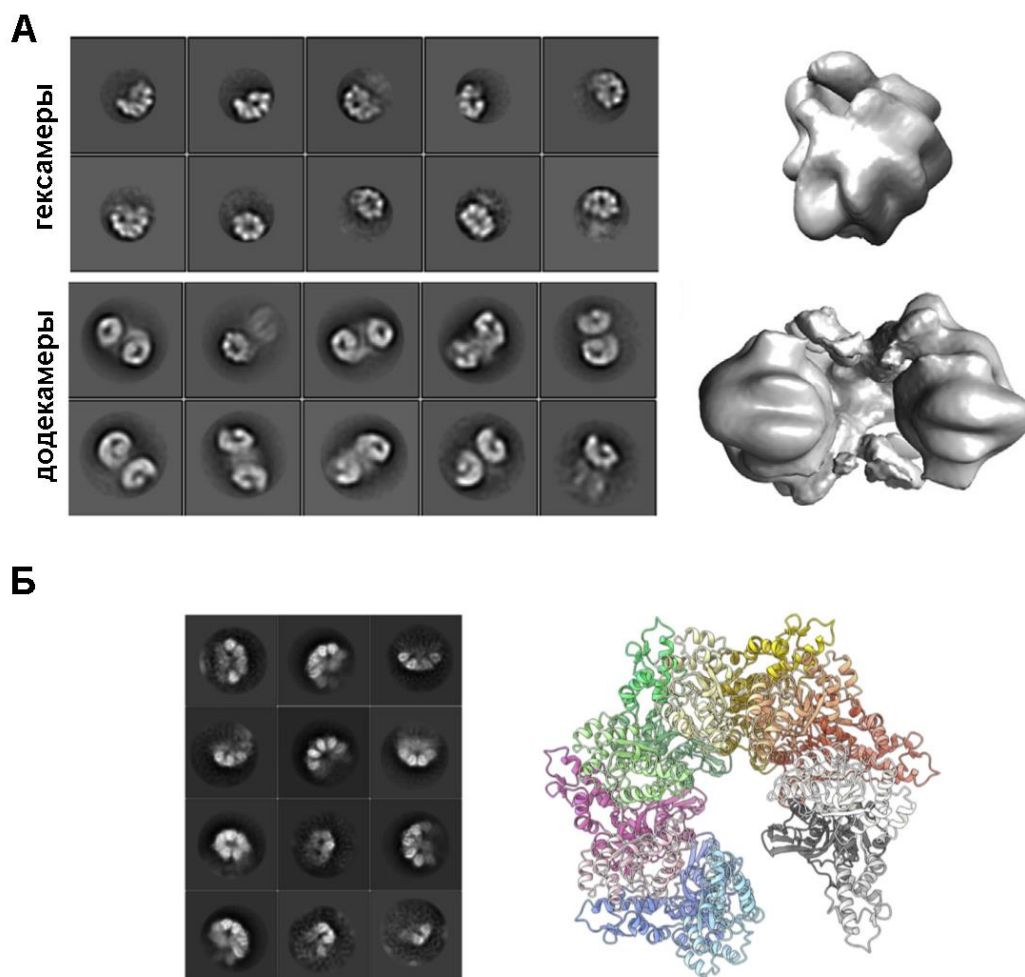


Рисунок 44. Результаты определения структуры *EcLon-S679A* (PDB ID 6U5Z) с использованием ЭМ с негативным контрастированием (А) и крио-ЭМ (Б).

Использование крио-ЭМ позволило увеличить разрешение до 3.5 Å и определить структуру гексамера *EcLon-S679A* (PDB ID 6U5Z), формирующего открытые спиральные кольца с пятью четко определенными протомерами и с более гибким шестым протомером на периферии (рис. 44 Б). Таким образом, укладка *EcLon-S679A* соответствует спиральной четвертичной структуре, характерной для AAA^+ -транслоказ [151]. Показано, что определенная рентгеноструктурным анализом конформация фрагмента *EcLon*(235–584) сохраняется в составе *EcLon-S679A*. Однако, в связи с тем, что гибкий N-концевой

фрагмент (1-244) оказался невидимым на картах электронной плотности, структура полного HI(CC)-домена *EcLon* не была определена и в этом случае. Таким образом, вопрос об упаковке инсерционного HI(CC)-домена остается открытым.

Тем не менее, совокупность полученных результатов позволила экспериментально подтвердить факт формирования HI(CC)-домена *EcLon* восемью α -спиралями и, кроме того, провести сравнительный анализ охарактеризованных кристаллических структур фрагментов HI(CC)-доменов Lon-протеаз и молекулярных шаперонов семейства ClpB для проверки гипотезы о LonA-протеазах как об особом подклассе AAA⁺-белков, обладающих структурными характеристиками как белков класса I, так и белков класса II (см. Обзор литературы, раздел 3.2.2). Согласно этой гипотезе, инсерционный HI(CC)-домен LonA-протеаз (AAA⁺-белки класса II) можно рассматривать как α -спирализованный компонент потенциального AAA⁺-модуля, гипотетически локализованного аналогично D1-модулю ClpB-шаперонов (AAA⁺-белки класса I), но утратившего свой нуклеотидсвязывающий домен (рис. 45).

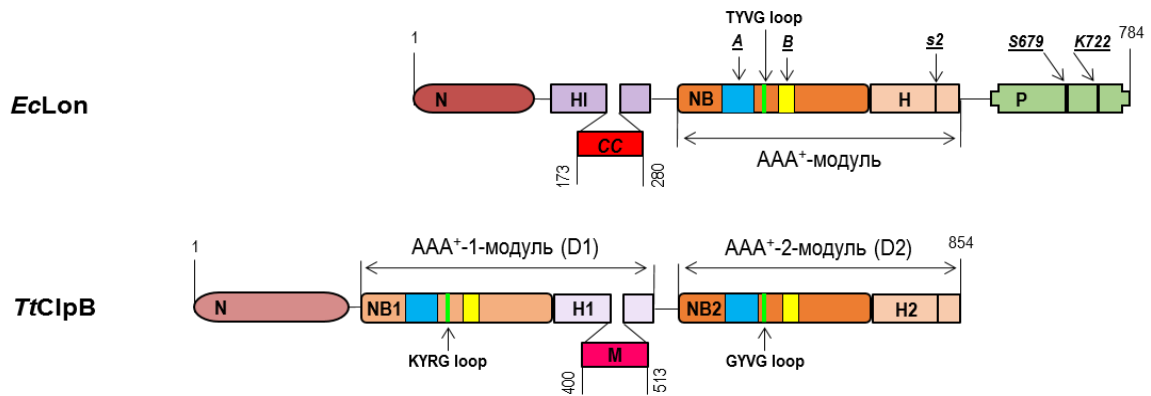


Рисунок 45. Доменная организация Lon-протеазы *E. coli* (*EcLon*) и ClpB-шаперона *Thermus thermophilus* (*TtClpB*). Обозначения структурных фрагментов: N – N-концевые домены; NB, NB1 и NB2 – нуклеотидсвязывающие домены; HI, H, H1 и H2 – α -спирализованные домены; CC – coiled-coil-участок; M – вставочный домен с CC-конформацией; P – протеолитический домен. A и B – консенсусные мотивы Уолкера, TYVG, KYRG и GYVG – петли “pore-1”; s2 – сенсорный остаток; Ser679 и Lys722 – каталитические остатки.

Основанием для выдвинутой гипотезы послужило обнаруженное сходство первичных и вторичных структур HI(CC)-доменов протеаз *EcLon*, *BsLon* и *MtLon* и H1-доменов D1-модулей шаперонов ClpB из *E. coli* и *Thermus thermophilus* (*EcClpB* и *TtClpB*), включающих M-домены с CC-структурой. Результаты выравнивания последовательностей (рис. 46) позволяют полагать, что восемь спиралей HI(CC)-доменов, включающих пять спиралей ($\alpha 3$ – $\alpha 7$) фрагмента *EcLon*(1–245), и три спирали ($\alpha 8$ – $\alpha 10$), локализованные в N-концевых частях фрагментов *EcLon*(246–584), *BsLon*(240–774) и *MtLon*(242–793), действительно соответствуют спиральям C1–C4 H1-доменов шаперонов с внедренными

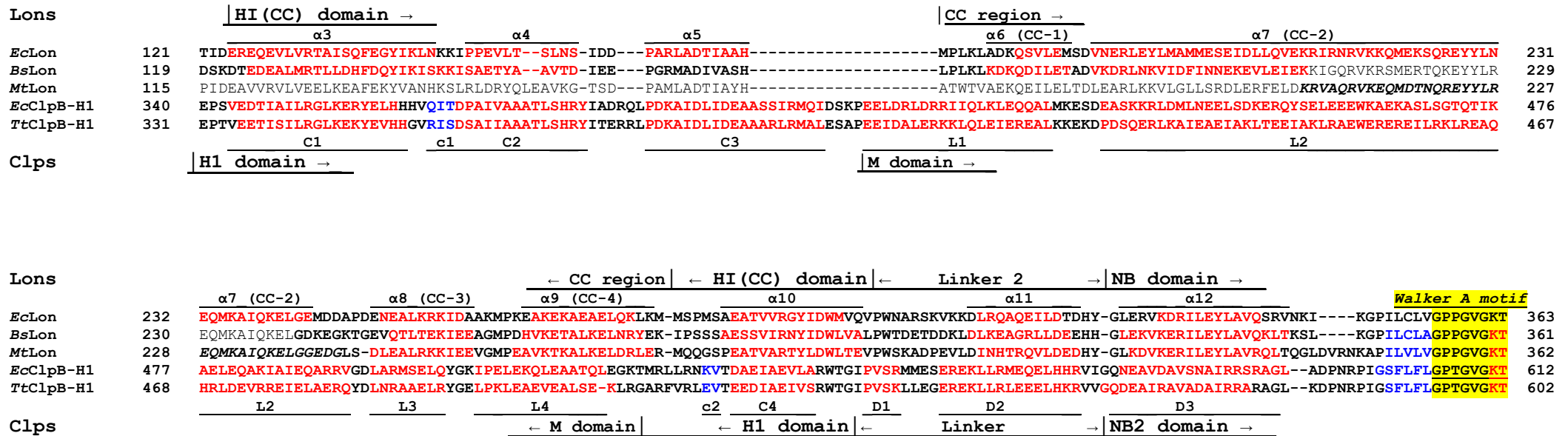


Рисунок 46. Выравнивание первичных и вторичных структур HI(CC)-доменов протеаз *EcLon*, *BsLon* и *MtLon* относительно H1(M)-фрагментов шаперонов *EcClpB* и *TtClpB*.

Элементы вторичной структуры, полученные согласно данным рентгеноструктурного анализа, показаны жирным шрифтом; аминокислоты, образующие α-спирали, показаны красными буквами, β-тяжи – синими, остатки, не включенные в элементы вторичной структуры, – черными; остатки, не видимые в кристаллических структурах, показаны курсивом. Структурные элементы ClpB-шаперонов маркированы согласно работе [84].

между спиралями C3 и C4 вставочными М-доменами (спирали L1–L4). Кроме того, видно, что линкерные фрагменты (P³⁰²–Y³²⁵) *EcLon*, (P³⁰⁰–Y³²³) *BsLon* и (P²⁹⁸–Y³²²) *MtLon*, включающие спирали $\alpha 11$, также соответствуют линкерной области, которая соединяет домены H1 и NB2 в последовательностях шаперонов *EcClpV* и *TtClpV*. Общими структурными элементами протеаз и шаперонов оказались «длинные» спирали – $\alpha 7$ в СС-участке Lon-протеаз и L2 в М-доме ClpV-шаперонов (рис. 46).

Спираль L2, состоящая из 58 а.о., является ключевым элементом пропеллерообразного М-домена, внедренного в H1-домен шаперона *TtClpV* (рис. 47 А). Близкая ей по размеру С-концевая спираль $\alpha 7$ (55 а.о.) служит отличительной чертой фрагмента *EcLon*(1–245) (рис. 43 А). Принимая во внимание выраженное подобие длинных спиралей (около 50 % для пары $\alpha 7$ *EcLon* и L2 *EcClpV*), мы провели структурное сопоставление α -спирализованной составляющей D1-модуля *TtClpV* (фрагменты H1 и М, рис. 47 Б) и фрагментов *EcLon*, потенциально формирующих H1(СС)-домены полноразмерных LonA-протеаз (рис. 47 В, Г – участки, объединенные серым фоном).

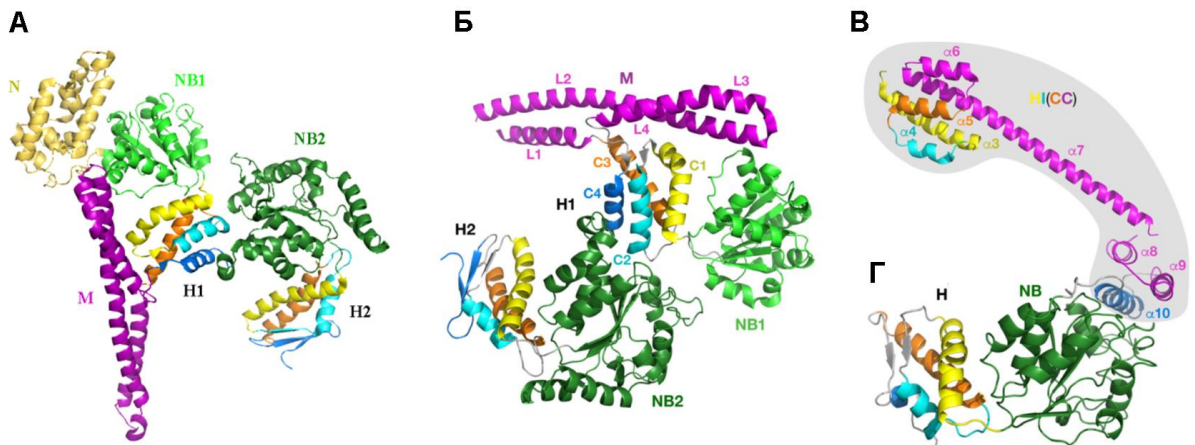


Рисунок 47. Кристаллические структуры шаперона *TtClpV* [84] (А), его фрагмента (Y¹⁵⁰–A⁸⁵⁴) (Б) и фрагментов *EcLon*-протеазы (E¹²⁴–D²⁴⁵) (В) и (A²⁴⁷–F⁵⁸⁴) (Г).

(А) Мономер *TtClpV* (PDB ID 1QVR): N-домен показан золотистым цветом, NB1-домен – светло-зеленым, NB2-домен – темно-зеленым, вставочный М-домен – фиолетовым цветом. (Б) *TtClpV*, лишенный N-концевого домена, (Y¹⁵⁰–A⁸⁵⁴). (В) фрагмент H1(СС)-домена *EcLon*-протеазы (E¹²⁴–D²⁴⁵) (PDB ID 3LJC). (Г) фрагмент *EcLon*(A²⁴⁷–F⁵⁸⁴) (PDB ID 6N2I), включающий С-концевую часть H1(СС)-домена и AAA⁺-модуль (домены NB и H). Спирали доменов H1, H2 (*TtClpV*), H1(СС) и H (*EcLon*) окрашены как на рис. 43. Серым фоном объединены фрагменты *EcLon*, составляющие H1(СС)-домен.

Наличие структурно эквивалентных «длинных» спиралей в СС-областях ($\alpha 7$ и L2) при совпадении общего количества спиралей и сходстве их топологического расположения можно рассматривать как указание на то, что

не только первичная и вторичная структура, но и архитектура уникального H1(CC)-домена Lon-протеаз может проявлять подобие архитектуре H1-домена первого AAA⁺-модуля (D1) ClpB-шаперонов. Вместе с тем, уменьшенные размеры спиралей $\alpha 5$ и $\alpha 6$ по сравнению с соответствующими спиральями C3 и L1 (рис. 46) могут привести к различию упаковки сопоставляемых доменов и, как следствие, к их различной роли в функционировании Lon-протеаз и ClpB-шаперонов.

Дополнительное подтверждение в пользу сходства H1(CC)-домена и H1(M)-фрагмента было найдено при сопоставлении кристаллических структур NB-доменов Lon-протеаз и нуклеотидсвязывающих доменов NB1 и NB2 первого и второго АТФ-азных модулей (D1 и D2) шаперонов ClpA и ClpB. Оба шаперона относятся к AAA⁺-белкам класса I, однако в структуре ClpA отсутствует вставочный M-домен, который в ClpB-шапероне отвечает за его дезагрегационную функцию (см. Обзор литературы, раздел 3.1.2.3; рис. 18).

Согласно работе [58], началом NB-доменов в AAA⁺-белках считаются α -спирали, предстоящие мотиву А Уолкера ($\alpha 12$ у LonA-протеаз и D3 у ClpB-шаперонов, рис. 46). NB-домены AAA⁺-белков содержат специфические фрагменты последовательности, которые формируют петли трех типов, обращенные внутрь аксиального (осевого) канала гексамера белка [152]. Это так называемые петли RKN, GYVG (или pore-1) и pore-2, которые участвуют в связывании, разворачивании и перемещении молекулы белка-мишени внутри полости канала вплоть до протеолитической камеры (в случае AAA⁺-протеаз). При этом петля RKN локализуется у входа в осевой канал, наиболее консервативная петля GYVG – в центральной части канала, а петля pore-2 – на выходе из канала (рис. 48).

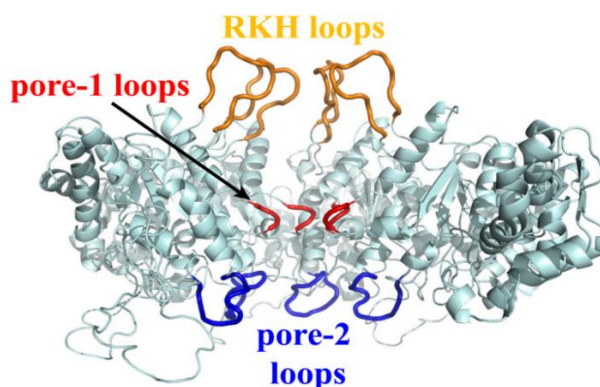


Рисунок 48. Петли центрального канала в шапероне ClpX, вовлеченные в связывание белкового субстрата.

Представлена локализация петель RKN (желто-коричневый цвет), pore-1 (или GYVG) (красный цвет) и pore-2 (синий цвет) в осевом канале модельного гексамера ClpX, основанная на данных по кристаллической структуре субъединиц ClpX *H. pylori* и гексамера HslU *H. pylori* (для удобства визуализации петель показаны только три субъединицы гексамера) [152]. Приведенные конформации являются гипотетическими, поскольку петли не видны в кристаллических структурах белков.

Считается, что именно GYVG-петли играют ведущую роль в разворачивании и транслокации белка-субстрата. Петли RKN осуществляют «захват» мишени и стабилизацию образовавшегося комплекса, а петли *roge-2* регулируют продвижение мишени внутри гексамера AAA⁺-белка. Показано, что в некоторых AAA⁺-белках петли RKN и *roge-2* могут вообще отсутствовать [152].

Исходя из представления о том, что LonA-протеазы, подобно другим AAA⁺-АТФ-азам, функционируют в форме циклических гексамеров, были проанализированы топологические характеристики петель GYVG, *roge-2* и RKN, локализованных в Lon-протеазах и в шаперонах ClpA и ClpB. Для этого было проведено основанное на структурных данных уточненное выравнивание последовательностей NB-доменов Lon-протеаз по отношению к NB1- и NB2-доменам шаперонов ClpA и ClpB (рис. 49). Из рис. 49 видно, что ключевые GYVG-петли располагаются между А- и В-мотивами Уолкера, а петли *roge-2* и RKN – в С-концевой области нуклеотидсвязывающих доменов.

В результате наложения соответствующих структурных фрагментов белков обнаружилось как сходство, так и различия в расположении петель GYVG, RKN и *roge-2* в аксиальных каналах шаперонов и протеаз.

Из рис. 50 видно, что фрагменты, включающие GYVG-петлю, в структурах как обоих NB-доменов *TtClpB*, так и в NB1-домене ClpA целиком не визуализируются. Однако это обстоятельство не помешало впервые выявить важное отличие шаперонов ClpA от шаперонов ClpB, которое заключается в различной ориентации GYVG-петель нуклеотидсвязывающих доменов в каждом из их AAA⁺-модулей. Это отличие однозначно обнаруживается при сравнении позиций петель GYVG и их ключевых остатков тирозина в NB1-доменах *EcClpB*, *TtClpB* и *EcClpA* (ср. рис. 50А – желтый и оранжевый цвета и 50В – розовый и пурпурный цвета), а также в NB2-доменах тех же шаперонов (рис. 50 Б, Г).

Подоменное наложение структурных фрагментов протеаз *EcLon*, *BsLon* и *MtLon* и шаперонов ClpA и ClpB, содержащих петли GYVG, выявило поразительное сходство в расположении петель и остатков тирозина только для NB-доменов Lon и NB2-доменов ClpB (рис. 50Б). Ориентация GYVG-петель в Lon-протеазах никоим образом не совпадает с их ориентацией ни в NB1-доменах ClpB (рис. 50А), ни в обоих NB-доменах ClpA (рис. 50В, Г). Можно отметить, что (1) локализация GYVG-содержащих фрагментов в NB1-доменах *EcClpB* и *TtClpB*, напоминает локализацию этой петли в NB2-домене шаперона *EcClpA*, хотя расположение в них остатков тирозина несомненно различается (ср. рис. 50А, Г), и (2) позиция GYVG-петли в NB1-домене *EcClpA* (рис. 50 В) отличается от всех остальных.

porc-2 и RKH Clp-шаперонов демонстрирует высокое сходство размеров и ориентации одноименных петель в протеазах и шаперонах (рис. 51Б, В).

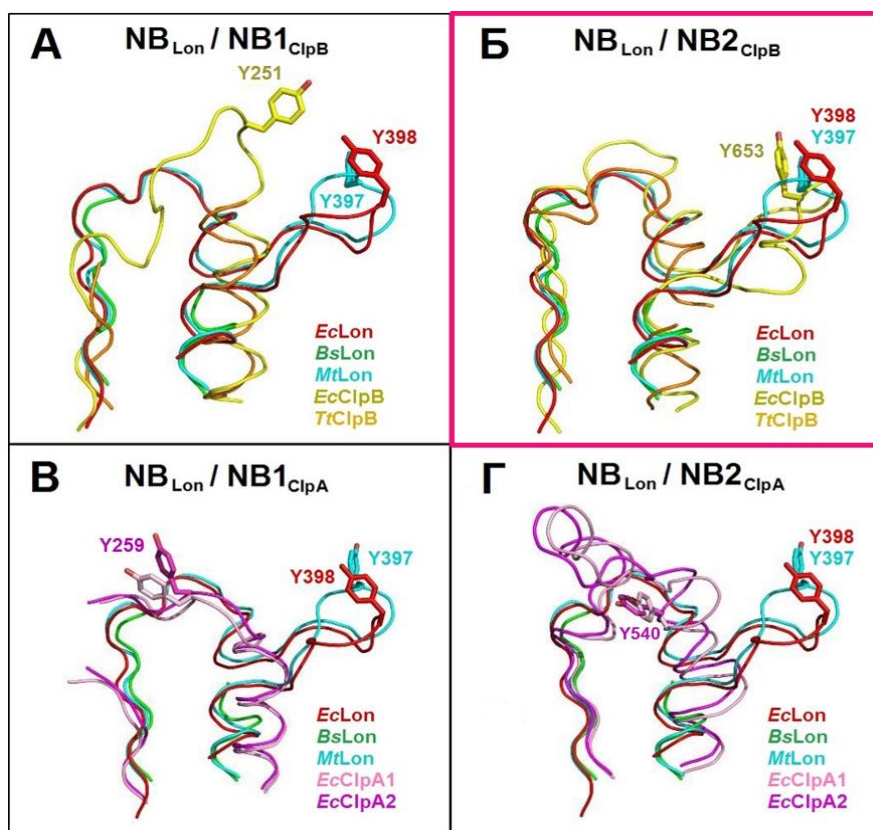


Рисунок 50. Сопоставление фрагментов, содержащих аксиальную петлю “GYVG” (porc-1), в кристаллических структурах NB-доменов LonA-протеаз и NB(1-2)-доменов ClpA- и ClpB-шаперонов.

Цвета фрагментов последовательностей: *EcLon* – красный, *BsLon* – ярко-зеленый, *MtLon* – голубой, *EcClpB* – желтый, *TtClpB* – оранжевый, *EcClpA-1* – розовый и *EcClpA-2* – пурпурный.

Для суперпозиции GYVG-петель использованы фрагменты *EcLon* (V³⁷⁸–K⁴⁰⁹, показан Tyr³⁹⁸), *BsLon* (V³⁷⁶–M⁴⁰⁸, разрыв между G³⁸² и R⁴⁰³) и *MtLon* (H³⁷⁷–M⁴⁰⁹, показан Tyr³⁹⁷) (А–Г), фрагменты NB1-доменов *EcClpB* (L²³⁷–A²⁶⁷, показан Tyr²⁵¹) и *TtClpB* (V²³⁰–V²⁵⁹, разрыв между M²³⁴ и E²⁴⁶) (А), *EcClpA-1* (Y²⁴⁶–Q²⁷³, разрыв между G²⁵¹ и A²⁵⁵, показан Tyr²⁵⁹) и *EcClpA-2* (Y²⁴⁶–Q²⁷³, разрыв между G²⁵¹ и A²⁵⁵, показан Tyr²⁵⁹) (В), а также фрагменты NB2-доменов *EcClpB* (A⁶²⁸–R⁶⁶⁸, показан Tyr⁶⁵³) и *TtClpB* (I⁶²⁰–V⁶⁵⁶, разрыв между L⁶³⁶ и Q⁶⁵¹) (Б), *EcClpA-1* (L⁵¹⁷–A⁵⁵², показан Tyr⁵⁴⁰) и *EcClpA-2* (L⁵¹⁷–A⁵⁵², показан Tyr⁵⁴⁰) (Г).

Использованы следующие кристаллические структуры: *EcLon* (PDB ID 6N2I), *BsLon* (PDB ID 3M6A), *MtLon* (PDB ID 4YPL), *EcClpB* (PDB ID 5OFO), *TtClpB* (PDB ID 1QVR), *EcClpA-1* (PDB ID 1KSF) и *EcClpA-2* (PDB ID 1R6B).

Таким образом, установлено, что NB-домены LonA-протеаз по топологии сходны не с «обобщенным» NB2-доменом AAA⁺-белков класса I, а с NB2-доменом именно шаперонов ClpB. Выявленное соответствие позволяет полагать, что и предстоящие сопоставленным доменам α-спирализованные домены H(CC) (LonA-протеазы) и H1 с внедренным M-доменом (ClpB-шапероны) также могут проявлять топологическое сходство.

Суммируя представленные данные по сравнительному анализу кристаллических структур фрагментов LonA-протеаз и Clp-шаперонов, можно констатировать, что получены достаточно веские аргументы в пользу справедливости гипотезы о том, что LonA-протеазы,

имеющие один классический AAA⁺-модуль, содержат также часть гипотетического второго AAA⁺-модуля, сходного с соответствующим фрагментом D1-модуля шаперонов ClpB. Это позволяет предполагать, что LonA-протеазы могут представлять собой особый подкласс AAA⁺-белков, в котором сочетаются структурные характеристики как белков класса I, так и белков класса II.

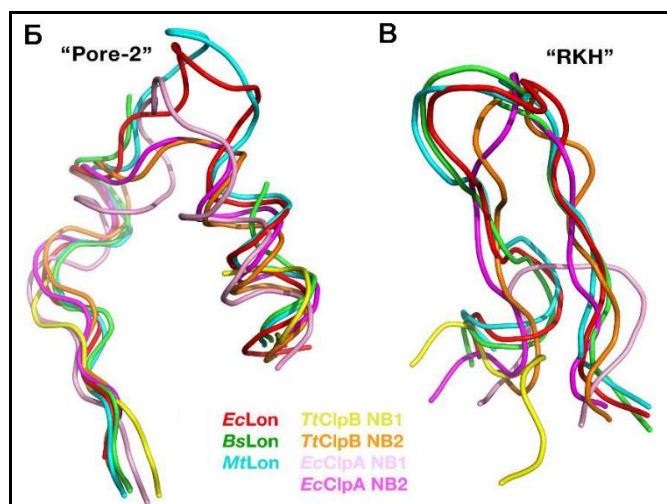
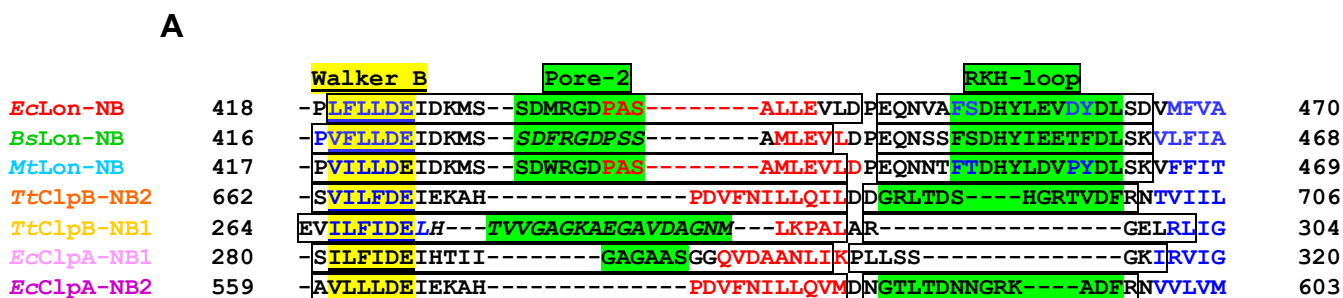


Рисунок 51. Сопоставление фрагментов последовательностей NB-доменов LonA-протеаз и NB(1-2)-доменов ClpA- и ClpB-шаперонов, включающих петли “pore-2” и “RKH” (А), и суперпозиции соответствующих структурных фрагментов (Б и В).

Цвета фрагментов последовательностей: *EcLon* – красный, *BsLon* – ярко-зеленый, *MtLon* – голубой, NB1-домен *TtClpB* – желтый, NB2-домен *TtClpB* – оранжевый, NB1-домен *EcClpA*-2 – розовый и NB2-домен *EcClpA*-2 – пурпурный.

(А) Рамками выделены сопоставляемые фрагменты последовательностей, включающие петли pore-2 и RKH.

(Б) Для суперпозиции петель pore-2 использованы фрагменты *EcLon* (L⁴¹⁹–D⁴⁴⁵), *BsLon* (P⁴¹⁶–L⁴⁴², разрыв между S⁴²⁷ и A⁴³⁷), *MtLon* (P⁴¹⁷–L⁴⁴³), *TtClpB* (E²⁶⁴–L²⁹⁵ (разрыв между E²⁷¹ и L²⁹¹) и S⁶⁶²–L⁶⁸⁴) и *EcClpA*-2 (S²⁸⁰–I³⁰⁷ и A⁵⁵⁹–M⁵⁸¹). (В) Для суперпозиции петель RKH использованы фрагменты *EcLon* (E⁴⁴⁷–D⁴⁶⁵), *BsLon* (E⁴⁴⁵–K⁴⁶³), *MtLon* (E⁴⁴⁶–K⁴⁶⁴), *TtClpB* (A²⁹⁶–L³⁰² и D⁶⁸⁶–R⁷⁰⁰) и *EcClpA*-2 (K³⁰⁸–I³¹⁶ и D⁵⁸²–R⁵⁹⁷).

Использованы следующие кристаллические структуры: *EcLon* (PDB ID 6N2I), *BsLon* (PDB ID 3M6A), *MtLon* (PDB ID 4YPL), *TtClpB* (PDB ID 1QVR) и *EcClpA*-2 (PDB ID 1R6B).

Вместе с тем, отсутствие кристаллической структуры полноразмерной LonA-протеазы не позволяет получить однозначное доказательство степени соответствия между структурными элементами, обеспечивающими функциональные или регуляторные свойства

сопоставляемых представителей системы контроля качества белков. Основной задачей будущих исследований LonA-протеаз должно служить определение трехмерной структуры полноразмерного фермента или, по крайней мере, фрагмента его последовательности, включающего полноценный HI(CC)-домен.

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

EcLon-протеаза – это цитозольный гомоолигомерный фермент, субъединица которого образована 784 аминокислотными остатками (рис. 40, 45). Целью настоящей работы явилось исследование участия уникального инсерционного домена HI(CC), локализованного между N-концевым доменом и AAA⁺-модулем фермента, в его функционировании путем сравнительного изучения свойств интактной *EcLon* и ряда ее форм, модифицированных в N-концевой области.

Для достижения поставленной цели на основе рекомбинантной формы *EcLon*, содержащей гексагистидиновый тэг на C-конце белка (далее – *EcLon*), были получены и охарактеризованы следующие модификации *EcLon* (рис. 52, табл. 5): делеционные формы Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC), лишенные, соответственно, полного инсерционного HI(CC)-домена (остатки E¹²⁴–N³⁰⁴) и его coiled-coil участка (CC, остатки M¹⁷³–M²⁸⁰); форма Lon-d106, лишенная фрагмента (M¹–N¹⁰⁶) – наиболее консервативной части N-концевых доменов в общем пуле LonA-протеаз, и форма Lon-d172, укороченная с N-конца фермента до начала CC-участка (остаток M¹⁷³) (рис. 40, 41). Следует отметить, что в форму Lon-d(CC) вместо удаленного фрагмента введен пентаглициновый пептид, а в форме Lon-d172 гексагистидиновый тэг локализован в дополнительном N-концевом 20-членном пептиде строения MGSSHHHHHSSGLVPRGSH (табл. 5). Наличие гексагистидиновых фрагментов позволило использовать при очистке белков метод металлохелатной хроматографии.

Для сравнения были использованы также две полученные ранее укороченные формы *EcLon*: (1) Lon-d234 – фермент, лишенный фрагмента (M¹–M²³⁴), продукт ограниченного протеолиза нативной *EcLon*-протеазы химотрипсином по связи M²³⁴-K²³⁵, локализованной в центральной части CC-участка [105], и (2) Lon283, представляющий фрагмент (M¹–P²⁸³) – модель N-концевой области фермента, не содержащая функциональных составляющих (AAA⁺-модуля и P-домена) (табл. 5).

Кроме того, на основании обнаруженных сходства и различий между HI(CC)-доменом LonA и M-доменом ClpB, были получены и охарактеризованы три точечных мутанта *EcLon*-протеазы, несущих замены потенциально важных остатков вставочного домена: Lon-R164A (мутация остатка Arg спирали $\alpha 5$ – аналога остатка «s2» (Arg⁵⁴²) в N-

домене AAA⁺-модуля, в ClpB ему соответствует остаток Lys), Lon-R192A (строго консервативный для LonA-протеаз остаток Arg длинной α 7-спирали, в ClpB – Ser) и Lon-Y294A (строго консервативный остаток Tyr α 10-спирали, в ClpB – Val/Leu). Для сравнения с формой Lon-R164A был получен мутант Lon-R542A с заменой остатка «s2» N-домена, а для характеристики N-домена – тройной мутант Lon^{EKR} с потенциально ослабленными межсубъединичными/междоменными взаимодействиями (замены: Glu34Ala, Lys35Ala и Arg38Ala) (рис. 41, 52, табл. 5).

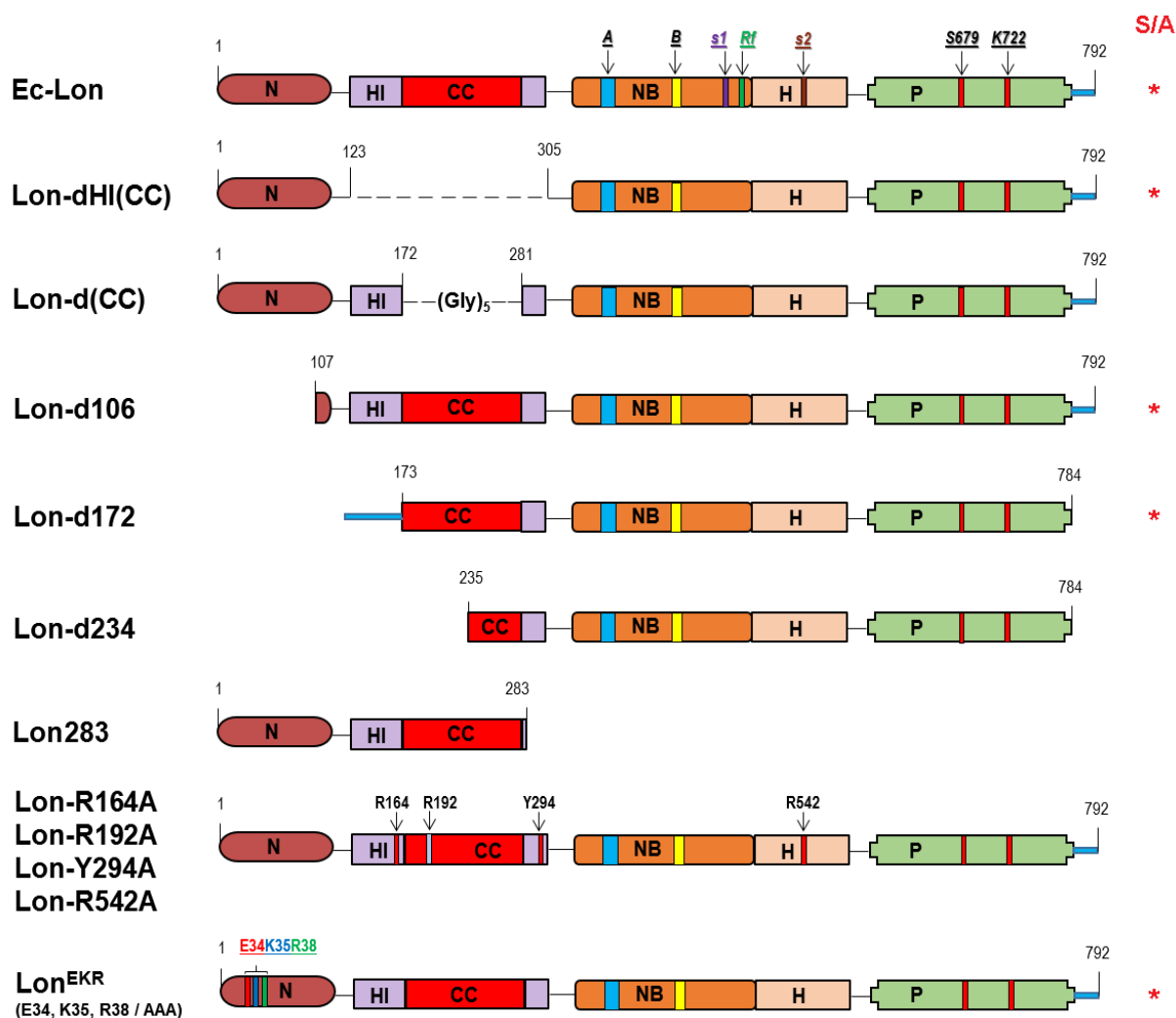


Рисунок 52. Модифицированные и мутантные формы Eс-Lon-протеазы, использованные для изучения N-концевой области.

Консервативные элементы: A и B – мотивы Уолкера, s1 и s2 – сенсорные остатки, Rf – остаток «аргининовый палец», Ser679 и Lys722 – каталитические остатки.

Исходя из предположения о вероятности проявления модифицированными формами Eс-Lon-протеазы повышенной склонности к самодеградации, интактный фермент и его формы Lon-dHI(CC), Lon-d106, Lon-d172 и Lon^{EKR} были получены также в протеолитически

неактивных вариантах путем замены каталитически активного остатка серина-679 на аланин (отмечены звездочками на рис. 5).

Таблица 5. Характеристика Ес-Lon-протеазы и её модифицированных и мутантных форм

№№	Белок	Границы	Мм, Да*	pI*	ε, М ⁻¹ см ⁻¹ *
1	Ес-Lon	(M ¹ -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	88 503	6.13	46 675
2	Lon-dHI(CC)	(M ¹ -D ¹²³)-(A ³⁰⁵ -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	67 522	6.47	28 225
3	Lon-d(CC)	(M ¹ -H ¹⁷²)-G ₅ -(M ²⁸¹ -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	75 830	6.17	42 205
4	Lon-d106	(G ¹⁰⁷ -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	76 756	6.21	45 060
5	Lon-d172	(M ¹ -H ₆ -H ²⁰)-(M ¹⁷³ -K ⁷⁸⁴)	70 505	7.01	42 080
6	Lon-d234**	(K ²³⁵ -K ⁷⁸⁴)	60 778	6.90	37 610
7	Lon283	(M ¹ -P ²⁸³)	32 318	5.25	8 940
8	Lon-R164A	(M ¹ -A ¹⁶⁴ -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	88 418	6.07	46 675
9	Lon-R192A	(M ¹ -A ¹⁹² -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	88 418	6.07	46 675
10	Lon-Y294A	(M ¹ -A ²⁹⁴ -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	88 411	6.13	45 185
11	Lon-R542A	(M ¹ -A ⁵⁴² -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	88 418	6.07	46 675
12	Lon ^{EKR}	(M ¹ -A ³⁴ -A ³⁵ -A ³⁸ -K ⁷⁸⁴)-LE-H ₆	88 303	6.07	46 675

* – рассчитаны с помощью программного обеспечения, доступного по адресу: <http://web.expasy.org/protparam/>;

** – получено в рамках работы [105].

5.3. Выделение Ес-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Наработку и выделение Ес-Lon-протеазы и её модифицированных и мутантных форм в препаративных количествах проводили согласно схеме, представленной на рис. 53. Стадию хроматографии на Q-сефарозе вводили в случае необходимости. При получении формы Lon283 использовали хроматографическую очистку белка на Q-сефарозе, гепарин-сефарозе и последующую гель-фильтрацию на Сефакриле S-300.

С целью получения штаммов-продуцентов использовали соответствующие плазмидные конструкции на основе векторов *pET28a* или *pET28b*, несущие либо ген полноразмерного фермента, содержащего гексагистидиновый тэг на С-конце белка, либо гены его модифицированных форм. Компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) подвергали трансформации каждой из векторных конструкций методом «теплового шока». Для индукции гена устойчивости к канамицину – селективного маркера вектора *pET28a* и его производных – трансформированные клетки инкубировали в культуральной среде LB в течение 1.5 ч при 37 °С. Затем аликвоту суспензии клеток высевали на агаризованную среду с канамицином и инкубировали 12 ч при 37 °С. Отобранные колонии выращивали в малых объемах среды LB в термостатируемом воздушном шейкере при 37°С в течение ночи.

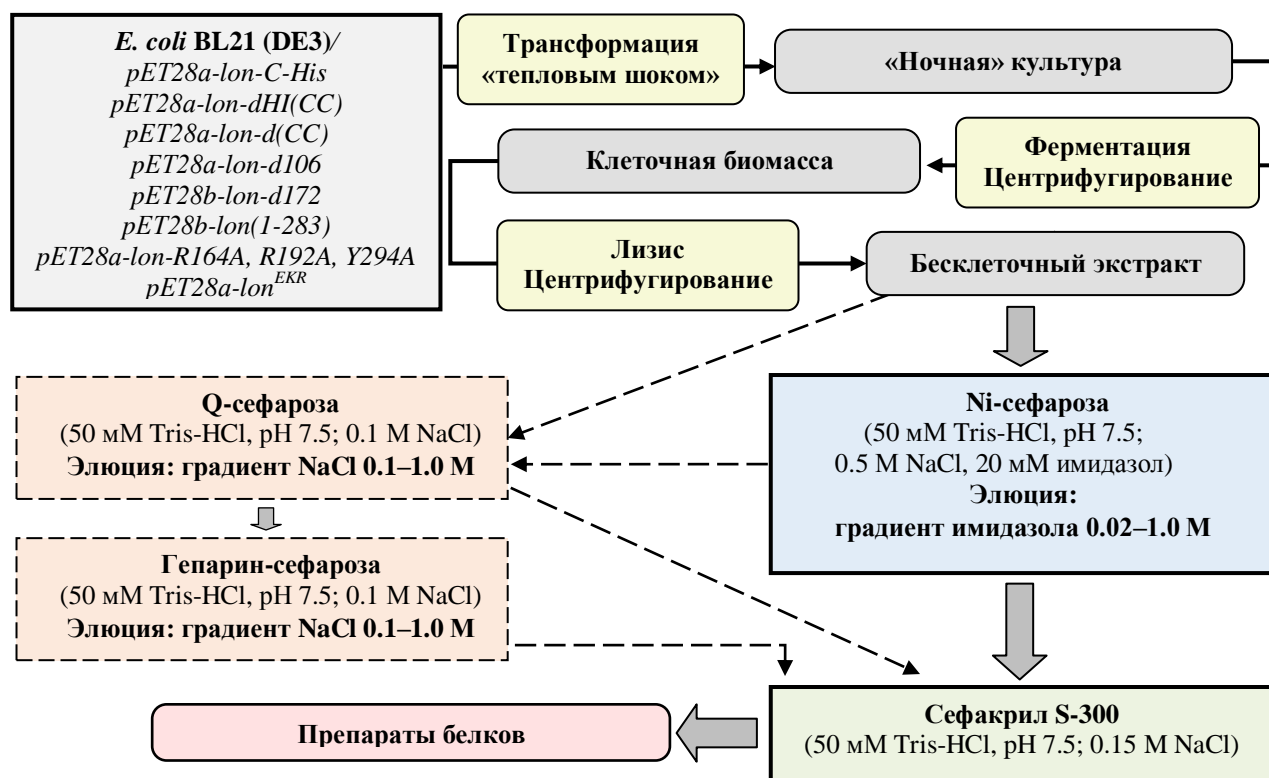


Рисунок 53. Схема выделения *Ec-Lon*-протеазы и ее модифицированных форм.

Полученные культуры в больших объемах среды, содержащей канамицин, выращивали в микробиологических колбах до достижения величины оптического поглощения 0.5 о.е. при длине волны 600 нм (A_{600}). На следующем этапе в течение 3-5 ч проводили индукцию целевого гена при выбранной температуре (25–27 °C) добавлением IPTG до конечной концентрации от 0.1 до 0.5 мМ. На рис. 54 представлены результаты индукции. Полученную биомассу осаждали центрифугированием. Выход клеток составлял от 2.5 до 3.3 г/л среды.

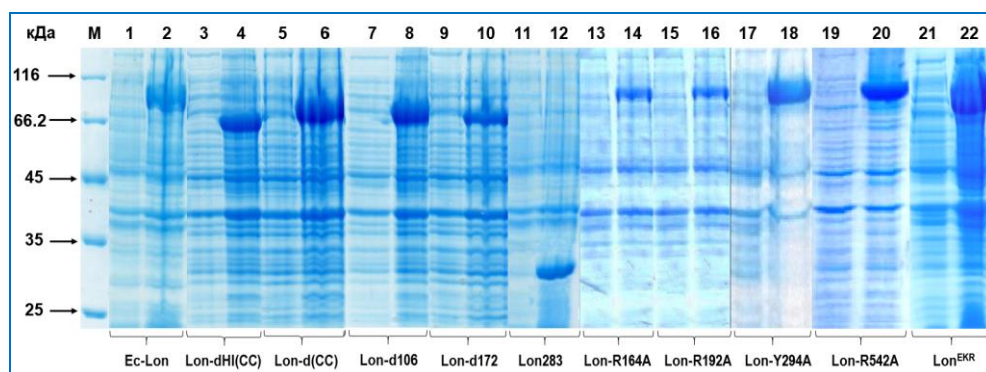


Рисунок 54. Индукция целевых рекомбинантных белков *Ec-Lon*, *Lon-dHI(CC)*, *Lon-d(CC)*, *Lon-d106*, *Lon-d172*, *Lon283*, *Lon-R164A*, *Lon-R192A*, *Lon-Y294A*, *Lon-R542A* и *Lon^{EKR}*.

Электрофорез в 10% ПААГ в присутствии SDS. М – маркеры, (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21) – лизаты клеток до индукции (0 ч), (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22) – лизаты клеток через 3-5 ч индукции.

Клетки, содержащие целевые белки, обрабатывали лизоцимом, разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора и центрифугировали. Полученные бесклеточные экстракты подвергали хроматографической очистке (рис. 53), которая на первом этапе включала аффинную хроматографию на Ni-сефарозе для форм Ec-Lon, Lon-dHI(CC), Lon-d(CC), Lon-d106, Lon-d172 и всех мутантных форм фермента (примеры результатов аффинной хроматографии представлены на рис. 55).

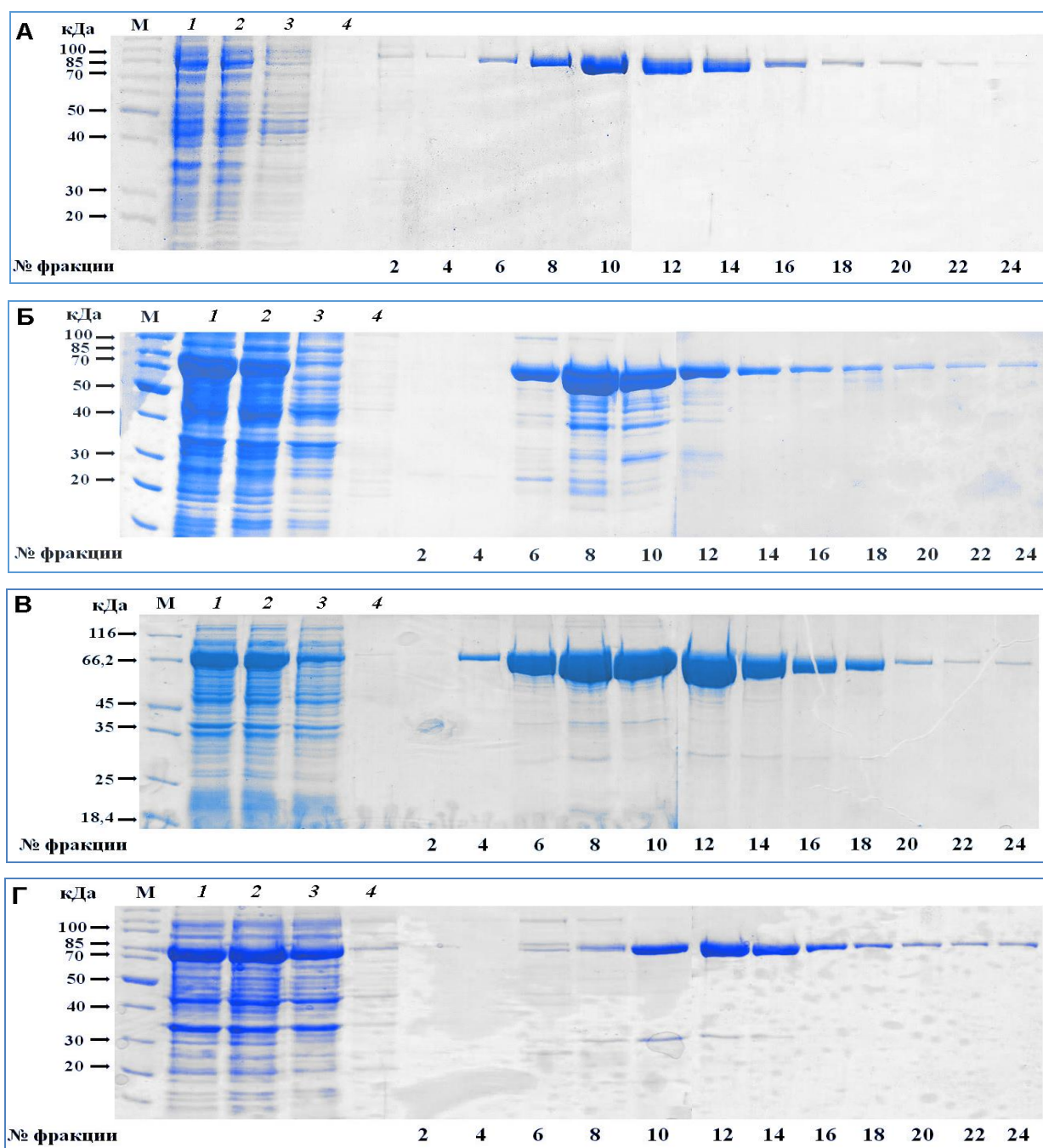


Рисунок 55. Хроматография Ec-Lon-протеазы (А), Lon-dHI(CC) (Б), Lon-d106 (В) и Lon-d172 (Г) на Ni-сефарозе (электрофорез элюатов в 10% ПААГ в присутствии SDS).

М – маркеры, 1, 2 – бесклеточные экстракты до (1) и после (2) центрифугирования, 3 – фракция несвязавшихся с носителем белков, 4 – отмывка, 2–24 – фракции элюатов, содержащие Ec-Lon-протеазу или ее модифицированную форму. *Условия эксперимента:* 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7.5; 0.5 М NaCl, 20 мМ имидазол, 4-6°C. Градиент: 0.02 – 1 М имидазол в том же буфере.

В случае необходимости вводили анионообменную хроматографию на Q-сефарозе. Для этого объединенные элюаты, разбавленные 50 мМ Tris-HCl-буфером (pH 7.5) для снижения концентрации NaCl до 0.1 М, наносили на Q-сефарозу, промывали тем же буфером и элюировали связавшиеся белки в условиях градиента концентрации (0.1–1.0 М) хлорида натрия (рис. 56, показано на примере Ec-Lon и Lon-d106).

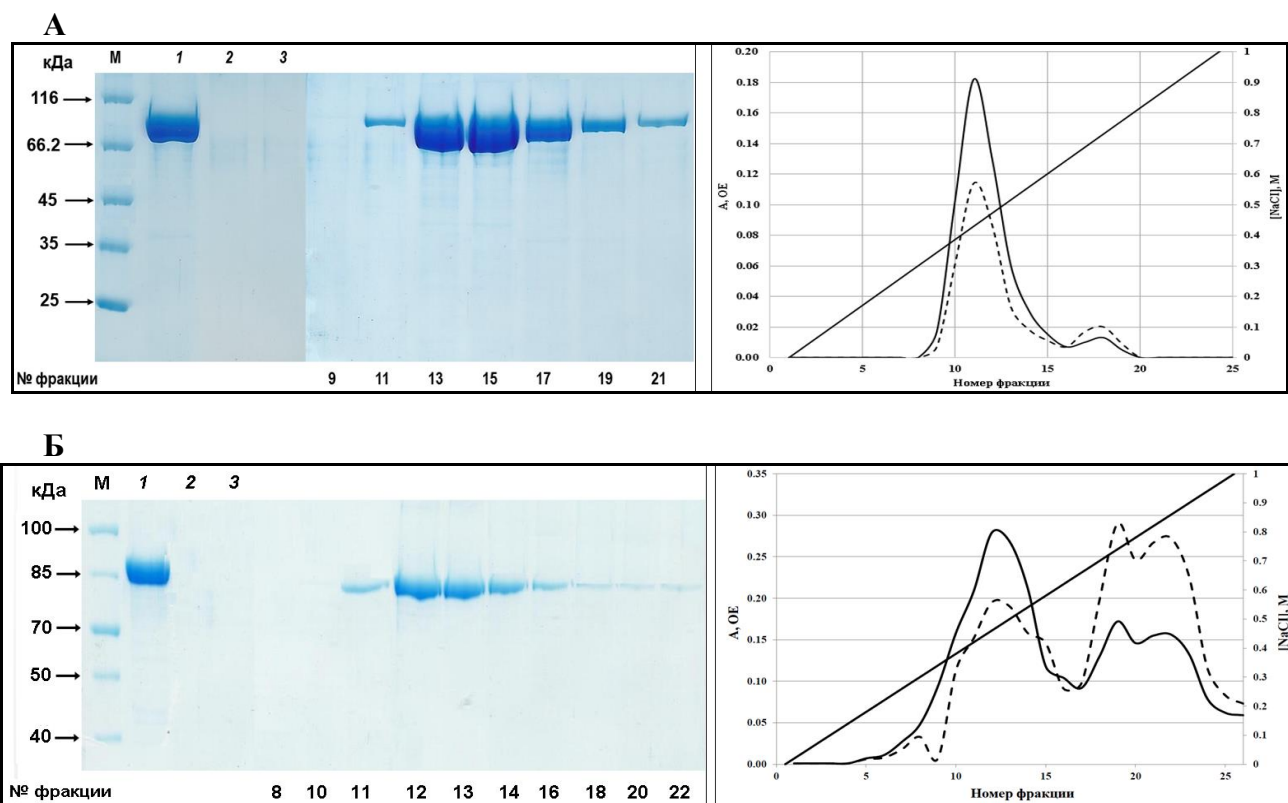


Рисунок 56. Хроматография на Q-сефарозе препаратов Ec-Lon (А) и Lon-d106 (Б) (электрофорез в 10 % ПААГ в присутствии SDS).

М – маркеры, 1 – объединенные элюаты белков после хроматографии на Ni-сефарозе, 2 – несвязавшиеся фракции («проскок»), 3 – отмывка, 9–21 (А) и 8–22 (Б) – фракции элюатов, содержащих Ec-Lon и Lon-d106, соответственно.

Условия эксперимента: 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7.5; 0.1 М NaCl. Элюция градиентом NaCl (0.1–1.0 М) в том же буфере. Сплошные линии – оптическое поглощение элюатов при 280 нм (A_{280}), пунктирные – при 260 нм (A_{260}).

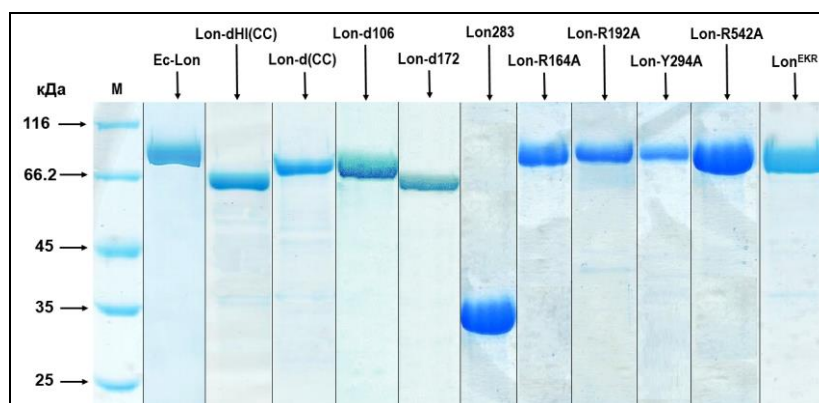


Рисунок 57. Образцы очищенных препаратов Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных и мутантных форм (электрофорез в 10% ПААГ в присутствии SDS). М – маркеры.

Фракции, содержащие целевые белки, объединяли, концентрировали с помощью центрифужных ультрафильтров (Amicon Ultra) и подвергали гель-фильтрации на носителе Сефакрил S-300. В результате степень очистки белковых препаратов достигала 95 %. Гомогенность полученных препаратов *EcLon*-протеазы и её модифицированных форм оценивали электрофоретически (рис. 57).

5.4. Олигомерное состояние *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм

Функционально активной формой большинства AAA^+ -белков является гексамерная кольцевая структура, способная формироваться в отсутствие нуклеотидов. Вместе с тем отмечено образование и других структур – пента-, гепта- и октамеров, спиральных филаментов, двойных колец переменной стехиометрии и пр. [153]. Само существование негексамерных состояний с очевидностью иллюстрирует гибкость упаковки AAA^+ -кольцевых структур. Наличие нуклеотидов может стабилизировать гексамеры, но также может приводить к изменению четвертичной структуры AAA^+ -белка [153, 154]. В этом аспекте имеющиеся в литературе данные в отношении олигомерного состояния *LonA*-протеаз в большой степени противоречивы.

На начальных этапах исследования первого представителя *LonA*-протеаз (*EcLon*) считалось, что фермент функционирует в форме тетрамеров или октамеров [155-158]. В дальнейшем седиментационным анализом *Lon*-протеазы из *Mycobacterium smegmatis* [159], а также эксклюзионной хроматографией фермента из *Brevibacillus thermoruber* [108] были получены данные в пользу существования равновесия между димерами, тетрамерами и гексамерами этих *LonA*-протеаз. Методом электронной микроскопии *Lon*-протеазы из *E. coli* было показано [160], что фермент имеет тенденцию к образованию мономеров, димеров и гексамеров. Кроме того, по данным седиментационного анализа *EcLon*-протеаза была охарактеризована как смесь гексамеров и додекамеров [161]. В то же время при электронной микроскопии митохондриальной *LonA*-протеазы из *Saccharomyces cerevisiae* были обнаружены гептамерные формы белка [162], что противоречило более ранним данным о наблюдавшихся гексамерах фермента [163] или о его переменных формах (от мономера до гексамера) [164].

В настоящей работе олигомерное состояние *EcLon*-протеазы и ее модифицированных и мутантных форм в растворе определяли методами гель-фильтрации на Sephacryl S-300 и аналитического ультрацентрифугирования (табл. 6). При этом данные по интактному ферменту и его укороченным и делеционным формам получали с

использованием соответствующих мутантов, несущих замену каталитически активного остатка серина (S679A) и остающихся стабильными в процессе длительных экспериментов.

Как отмечено в разделе 5.1, в популяции полноразмерной Lon-протеазы по данным электронной микроскопии идентифицируются, в основном, гексамерные и додекамерные формы. В то же время по данным гель-фильтрации в отсутствие эффекторов *интактная Ec-Lon-протеаза* представлена смесью ди-, тетра- и гексамеров, а также ассоциатами. Взаимодействие с ADP приводит к стабилизации тетрамерной формы. Согласно седиментационному анализу в тех же условиях, раствор фермента представляет смесь мономеров, димеров, тримеров и ассоциатов (табл. 6). Присутствие ионов магния практически не влияет на олигомерность фермента. В то же время наличие в растворе свободных нуклеотидов приводит к стабилизации олигомеров, представленных тримерами и гексамерами (в случае ATP) или тетрамерами (в случае ADP и AMPPNP). В присутствии нуклеотид-магниевых комплексов преимущественно выявляется тетрамерная форма белка (табл. 6).

Можно полагать, что формирование ассоциатов Ec-Lon в представленных экспериментах обусловлено использованием высоких концентраций фермента (≥ 1 мг/мл). При этом ассоциаты могут быть образованы различными олигомерными формами, включая додекамеры, которые были достоверно выявлены при структурном анализе Ec-Lon методом ЭМ, проводимом при значительно более низких концентрациях белка (0.01 мг/мл) (рис. 44 А).

Модифицированные в N-концевой области формы Ec-Lon-протеазы в условиях гель-фильтрации также проявляют высокую склонность к образованию ассоциатов в отсутствие эффекторов (табл. 6, №№ 2–5). При этом в растворах Lon-dHI(CC) (№ 2) наряду с ассоциатами обнаруживается еще и мономерная форма белка, у Lon-d106 (№ 4) тестируются тримеры, а у Lon-d172 (№ 5) – димеры. Согласно ранее полученным данным [105], для Lon-d234 в условиях гель-фильтрации характерны ди- и тетрамеры (табл. 6, № 6), а при ультраседиментации обнаруживаются также мономер и ассоциированная форма. Некаталитический N-концевой фрагмент Ec-Lon-протеазы – форма Lon283, у которой отсутствуют AAA⁺-модуль и протеолитический домен, – по результатам гель-фильтрации однозначно является димером (табл. 6, № 7).

Исследования скорости седиментации модифицированных форм Ec-Lon демонстрируют сложную картину состояния белка в растворе при комнатной температуре, где практически не детектируются высокомолекулярные ассоциаты, но присутствуют наборы различных олигомеров.

Таблица 6. Олигомерное состояние Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

№	Белок	Мм, Да	Эффектор	Гель-фильтрация*		Седиментация**	
				Мм, кДа	n	Мм, кДа	n
1	Ec-Lon-S679A	88 503	–	177.4	2.0	58	1
				388.3	4.4	215	2.4
				615.6	6.9	305	3.5
			Ассоциаты		Ассоциаты		
			10 mM Mg	ND		61	1
				ND		152	1.7
				ND		337	3.8
			Ассоциаты		Ассоциаты		
			0.1 mM ATP	ND		297	3.4
				ND		583	6.6
0.1 mM ADP	388.3	4.4	340	3.8			
0.1 mM AMPPNP	ND		314	3.6			
0.1 mM ATP, 1 mM Mg	ND		346	3.9			
0.1 mM ADP, 1 mM Mg	ND		314	3.6			
	ND		353	4			
0.1 mM AMPPNP, 1 mM Mg	ND		302	3.4			
	ND		336	3.8			
2	Lon-dHI(CC)-S679A	67 451	–	97.4	1.4	ND	
				Ассоциаты		ND	
			0.1 mM ADP	ND		131	1.9
				ND		251	3.7
0.1 mM ADP, 1 mM Mg	ND		121	1.8			
	ND		206	3			
	ND		305	4.5			
3	Lon-d(CC)	75 830	–	Ассоциаты		ND	
4	Lon-d106-S679A	76 756	–	244.9	3.2	246	3.2
				Ассоциаты		464	6
			10 mM Mg	ND		266	3.5
				ND		513	6.7
			0.1 mM ATP	ND		307	4
				ND		489	6.4
				ND		590	7.7
0.1 mM AMPPNP	ND		246	3.2			
	ND		538	7			
0.1 mM ATP, 1 mM Mg	ND		246	3.2			
	ND		489	6.4			
0.1 mM AMPPNP, 1 mM Mg	ND		227	3			
	ND		513	6.7			
5	Lon-d172	70 505	–	165.6	2.3	ND	

			Ассоциаты				
6	Lon-d234^{***}	60 778	–	125	2	64 230 880	1 4 Acc
			1 mM ADP	220	4	ND	
7	Lon283	32 318	–	64.5	2	ND	
8	Lon-R164A	88 418	–	Ассоциаты		ND	
			0.1 mM ADP, 1 mM Mg	ND		69.5 179 288	1 2 3.3
9	Lon-R192A	88 418	–	Ассоциаты		ND	
			0.1 mM ADP, 1 mM Mg	ND		165 387 721	1.9 4.4 8.1
						Ассоциаты	
10	Lon-Y294A	88 411	–	Ассоциаты		ND	
			0.1 mM ADP	ND		77.8 325 913	1 3.7 10.3
			0.1 mM ADP, 1 mM Mg	ND		NI	
11	Lon^{EKR}	88 303	–	561.4	6	ND	

n – количество субъединиц, Асс – ассоциаты, ND – не определяли, NI – не интерпретируется; * – условия хроматографии: 50 mM Tris-HCl-буфер, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 4 °C, 1-3 мг/мл фермент; ** – условия седиментации: 50 mM Tris-HCl-буфер, pH 7.5, 0.15 M NaCl; 20°C; 0.7-1.0 мг/мл фермент; *** – по данным работы [105].

Так, у делеционной формы Lon-dHI(CC) в присутствии ADP наряду с тетрамерами фермента (как у интактной Ec-Lon) обнаруживается также димерная форма, а при добавлении ионов магния наблюдаются еще и тримеры белка (табл. 6). Укороченная форма Lon-d106 как в отсутствие эффекторов, так и при наличии нуклеотид-магниевых комплексов представлена, в основном, смесью тримеров и гексамеров с преимущественным содержанием последних (табл. 6, рис. 58). В присутствии свободного АТФ кроме гексамеров тестируются также тетра- и, возможно, октамеры Lon-d106.

В целом, результаты седиментационного анализа интактной Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм позволяют сделать заключение, что присутствие эффекторов не оказывает кардинального воздействия на олигомерное состояние каждого из ферментов.

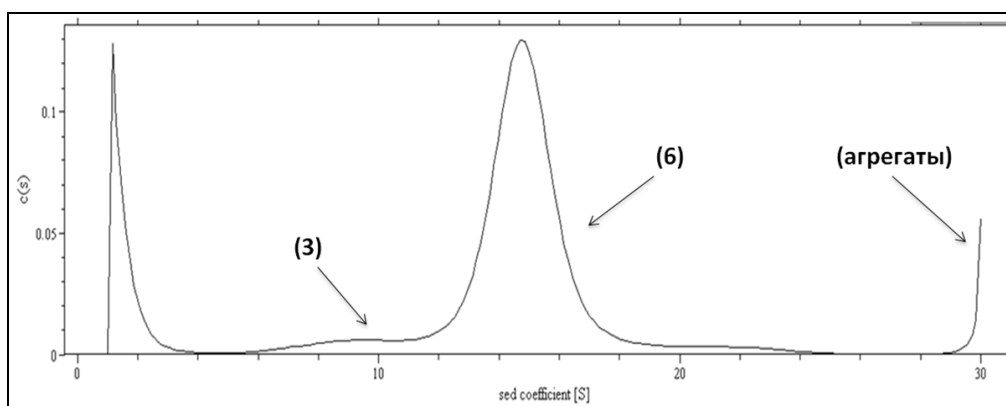


Рисунок 58. Седиментационный анализ укороченной формы Lon-d106-S679A в отсутствие эффекторов.

Цифры в скобках соответствуют числу субъединиц в олигомерах.

Условия определения: 50 mM Tris-HCl-буфер, pH 7.5, 0.15 M NaCl; 20 °C; 12 мкМ фермент.

Вместе с тем, сохранение формой Lon-d106 гексамерной организации, характерной для интактного фермента, а также понижение степени олигомеризации делеционной формы Lon-dHI(CC) до димеров в присутствии нуклеотидов указывают на то, что вставочный домен некаталитической N-концевой области принимает участие в формировании активных олигомеров Ec-Lon.

Наряду с этим следует учитывать, что функциональные компоненты Ec-Lon-протеазы также вносят свой вклад в формирование олигомеров полноразмерного фермента. В настоящей работе показано, что фрагмент EcLon(235-584), состоящий из C-концевой части вставочного домена и AAA⁺-модуля, формирует в кристалле типичный гексамерный структурный кор (Раздел 5.1, рис. 42B), несмотря на то, что как было показано ранее [105], в растворе он обнаруживается как мономер. Протеолитический домен EcLon(585-784) также является мономером в растворе и циклическим гексамером в кристалле. Объединенный полипептид EcLon(235-784) в противоположность своим мономерным составляющим существует в растворе преимущественно в виде димеров и тетрамеров [105], но, как показано в разделе 5.1, также способен формировать спиральные гексамеры (рис. 44 Б).

Мутантные формы Ec-Lon-протеазы, несущие точечные замены потенциально важных аминокислотных остатков (Lon-R164A, Lon-R192A и Lon-Y294A), подобно интактному ферменту, в условиях гель-фильтрации формируют высокомолекулярные ассоциаты (табл. 6, №№ 8–10). В то же время седиментационным анализом показано, что в присутствии комплекса ADP-Mg форма Lon-R164A представляет смесь мономеров, димеров и тримеров, то есть проявляет пониженную степень олигомеризации по сравнению с интактной тетрамерной Ec-Lon-протеазой (табл. 6). В этих же условиях в форме Lon-R192A наряду с тетрамерами представлены димеры, октамеры и ассоциаты. Для мутанта

Lon-Y294A данные, полученные в присутствии комплекса ADP-Mg, не поддаются интерпретации, однако установлено, что при наличии в растворе свободного ADP мутант существует в виде смеси, содержащей кроме тетрамеров (как у интактной Ec-Lon) мономерную и декамерную формы (табл. 6).

Тройной мутант по N-домену Lon^{EKR}, в отличие от интактной Ec-Lon, представлен, в основном, гексамерами, а не додекамерами, из чего следует, что мутированные остатки Glu³⁴, Lys³⁵ и Arg³⁸ могут быть вовлечены в межсубъединичные взаимодействия, приводящие к формированию додекамерных форм фермента.

Таким образом, точечные мутации как собственно в HI-домене (R164A и Y294A), так и в его coiled-coil-фрагменте (R192A) вызывают заметные изменения в олигомерном состоянии Ec-Lon-протеазы. Эти результаты в совокупности с вышеприведенными данными по олигомерному состоянию укороченных и делеционных форм фермента позволяют сделать вывод о важности N-концевой области, и в особенности ее инсерционного HI(CC)-домена, для мультимеризации фермента, необходимой для полноценного проявления Ec-Lon-протеазой функциональной активности.

В заключение необходимо отметить, что по современным представлениям [153] у AAA⁺-моторных белков, превращающих химическую энергию в механическую работу, реализуется множество различных конформационных состояний, которые, по сути, отражают архитектуру олигомера в процессе функционального цикла белка, с учетом положения и состояния активных центров в межсубъединичном пространстве, перемещения консервативных петель в молекуле, наличия нуклеотида в активном центре, а также взаимодействия с субстратом. Несмотря на то, что симметричные гексамерные структуры являются одними из наиболее стабильных и самыми распространенными в AAA⁺-семействе, белки этого семейства представляют собой в растворе гетерогенные популяции олигомеров с различной конформацией и стехиометрией [154, 165, 166], смещение равновесия в которых зависит от присутствия нуклеотидов и макромолекулярных субстратов (полученные в настоящей работе данные по олигомерному состоянию Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных и мутантных форм полностью согласуются с этой концепцией). Надо отметить, что в настоящее время практически ни для одного из представителей семейства AAA⁺-моторов функциональный цикл не описан полностью [153, 154].

Особо следует подчеркнуть, что основная функция AAA⁺-протеаз – процессивный протеолиз – может быть реализована только при функционировании их в виде цилиндрических олигомерных структур, поскольку именно при таких условиях

достигается постепенное перемещение развернутой молекулы белкового субстрата вдоль внутренней полости цилиндра в протеолитическую камеру для последующего гидролиза пептидных связей с образованием небольших продуктов [167]. В случае Ec-Lon-протеазы, как будет показано далее, процессивный гидролиз белкового субстрата способны осуществлять формирующие гексамеры интактный фермент и форма Lon-d106. Прочие укороченные и делеционные формы фермента, которые характеризуются пониженной степенью олигомеризации, утрачивают процессивный механизм протеолиза. Для таких случаев, когда в олигомере не формируется центральная пора требуемого размера, можно предположить атипичное связывание субстрата с ферментом, например, латеральное. Сведения о вариантах «бокового» связывания субстратов с AAA⁺-моторами также представлены в литературе [153].

5.5. Микрокалориметрическое исследование Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Для характеристики участия N-концевой области в образовании функционально активной структуры Ec-Lon-протеазы был использован также метод микрокалориметрии, который позволяет дать оценку структурной организации белковой молекулы и проследить влияние эффекторов на трехмерную структуру [168]. Процесс тепловой денатурации белков, лежащий в основе сканирующей микрокалориметрии, в случае мультидоменных структур происходит в несколько этапов, соответствующих плавлению отдельных доменов. Микрокалориметрическое исследование Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм было проведено совместно с лабораторией физической химии полимеров Института элементоорганических соединений РАН (руководитель – проф. В.Я. Гринберг).

В настоящей работе термоденатурации были подвергнуты следующие формы Ec-Lon-протеазы: полноразмерный фермент (табл. 5, № 1), несущий замену по каталитически активному остатку серина в положении 679 (Lon-S679A); форма Lon-d106 (табл. 5, № 4), содержащая ту же замену (Lon-d106-S679A); N-концевой фрагмент фермента Lon283 (табл. 5, № 7), состоящий из N-домена и большей части вставочного HI(CC)-домена, включая coiled-coil область. Кроме того, был использован C-концевой двухдоменный фрагмент Lon-протеазы с гексагистиридиновым тэгом (Lon-HP), включающий α -спирализованный (H, S⁴⁹¹–F⁵⁸⁴) и протеолитический (P, D⁵⁸⁵–K⁷⁸⁴) домены.

Термоденатурацию Ec-Lon-протеазы и ее укороченных форм проводили в отсутствие и в присутствии нуклеотидного эффектора фермента – комплекса ADP-Mg. Плавление полноразмерного фермента Lon-S679A происходит в два этапа (рис. 59A), из

чего следует, что пять структурных доменов *EcLon*-протеазы (см. раздел 5.1) формируют в пределах субъединицы две глобулы (аналогичные результаты характеризуют плавление

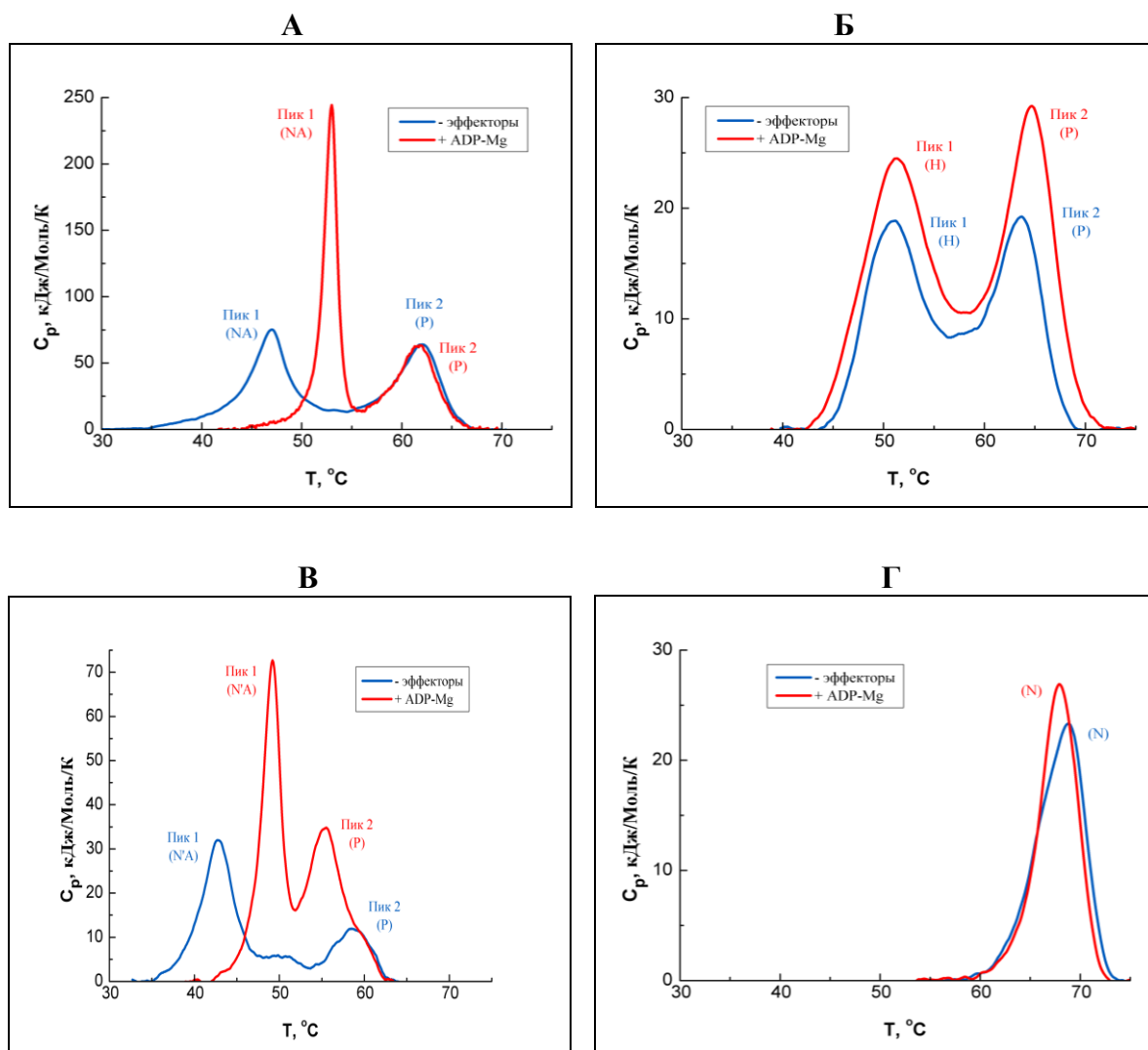


Рисунок 59. Зависимость парциальной теплоемкости от температуры для полноразмерного фермента *Lon-S679A* (А) и его укороченных форм *Lon-HP* (Б), *Lon-d106-S679A* (В) и *Lon283* (Г). Условия определения: 150 мМ имидазол, рН 7.5, 0.5 М NaCl, концентрация белка 2 – 3 мг/мл, 1 мМ ADP, 20 мМ MgCl₂. Обозначения: NA – фрагмент, включающий N-концевую область (N) и AAA⁺-модуль (A); N' – укороченная N-область; H – α -спирализованный домен; P – протеолитический домен.

Lon-протеазы человека [169]). В образовании первой глобулы (пик 1) участвует АТР-азный модуль. Об этом свидетельствует влияние комплекса ADP-Mg, приводящее к сдвигу температуры денатурации (T_d) первого пика на 6°C в высокотемпературную область и к изменению его формы на острую и симметричную, что соответствует образованию более компактной и устойчивой структуры (рис. 59А, табл. 7, зеленый цвет). Подтверждением корректности соотнесения пика 1 с конформационным состоянием АТР-азного компонента *Lon*-протеазы служат результаты проведенного ранее в нашей лаборатории исследования *Lon*-протеазы дикого типа (*EcLon*) и ряда ее изолированных доменов [170].

Таблица 7. Тепловая денатурация Lon-протеазы и ее укороченных форм.Условия определения: 150 мМ имидазол, pH 7.5, 0.5 М NaCl, концентрация белка 2 – 3 мг/мл, 1 мМ ADP, 20 мМ MgCl₂.

Форма рекомбинантной Eс-Lon	Эффектор	Td, °C			Форма EсLon-протеазы дикого типа*	Эффектор	Td, °C		
		Пик 1		Пик 2, Р-домен			Пик 1		Пик 2, Р-домен
		Н-область	AAA ⁺ -модуль				Н-область	AAA ⁺ -модуль	
Lon-S679A (1–784-H ₆ -tag)	–	47.0		62.0	EсLon-протеаза (1–784)	–	47.6 57.4 (плечо)		68.2
	ADP-Mg	53.0		61.8		ADP	57.5		68.0 (плечо)
Lon-d106-S679A (107–784-H ₆ -tag)	–	42.7 49.9 (плечо)		58.5					
	ADP-Mg	49.2		55.5					
					EсLon-(235–584) (HI(CC)-(235-301) + AAA ⁺ -модуль)	–	–	44.9	–
						ADP	–	52.1	–
Lon-HP (491–784-H ₆ -tag)	–	–	51.2	63.7	EсLon-P (585–784)	–	–	–	65.8
	ADP-Mg	–	51.3	64.7		Mg	–	–	67.3
Lon283 (1–283)	–	68.8	–	–	EсLon207 (1–207)	–	70.4	–	–
	ADP-Mg	67.9	–	–		Mg	71.2	–	–

* – по данным работы [170]

Полученные данные показали, что объект структурного исследования в этой работе – фрагмент *EcLon*(235–584), включающий AAA⁺-модуль (P³⁰²–F⁵⁸⁴), – характеризуется T_d около 45 °С, которая в присутствии ADP также повышается до 52 °С (табл. 7).

Можно полагать, что второй пик на рис. 59А (T_d ~ 62 °С) описывает поведение протеолитического домена. Это заключение подтверждается сопоставлением данных по микрокалориметрии полноразмерного фермента, двухдоменной формы фермента Lon-HP и индивидуального протеолитического домена (*EcLon*-P) (табл. 7, красный цвет). Согласно ранее полученным данным изолированный Р-домен фермента имеет температуру перехода около 66°С. В двухдоменной структуре Lon-HP α-спирализованный и протеолитический домены плавятся независимо друг от друга, при этом нуклеотидный эффектор не влияет на характер плавления белка (рис. 59Б). Для этого фрагмента *EcLon*-протеазы пик 2 (T_d ~ 64 °С) со всей очевидностью отражает денатурацию Р-домена, а первый пик с температурой плавления около 51 °С следует отнести к превращениям Н-домена. В структуре полноразмерного фермента Lon-S679А Н-домен участвует в формировании глобулы, включающей AAA⁺-модуль, в составе которой он подвергается тепловой денатурации при температуре около 50 °С (табл. 7). Из сопоставления данных по термоденатурации полноразмерных форм Lon-S679А и *EcLon* (табл. 7) следует, что наличие С-концевого гексагистидинового тэга приводит к некоторому снижению стабильности фермента (смещение пиков в область пониженных температур).

Исследование формы фермента, лишенной 106 N-концевых остатков, Lon-d106-S679А, свидетельствует о том, что данная форма менее стабильна, чем полноразмерная Lon-S679А-протеаза. Так, плавление Lon-d106-S679А начинается при пониженной по сравнению с Lon-S679А температуре – уже при 42.7 °С (рис. 59В, табл. 7). Кроме того, у первого пика обнаруживается “плечо” с T_d ~ 50 °С. При этом присутствие нуклеотид-магниевого комплекса так же, как и в случае полноразмерного фермента, приводит к формированию более компактной структуры, характеризующейся повышенной стабильностью. Особенностью укороченного фермента является тот факт, что при наличии ADP-Mg наблюдается смещение пика 2 примерно на 3 °С в низкотемпературную область. Это позволяет предположить, что в отсутствие N-домена трехмерная структура С-концевой протеолитической области фермента становится термодинамически менее стабильной.

Микрокалориметрическое исследование изолированного N-концевого двухдоменного фрагмента Lon-протеазы, Lon283, показало, что в отсутствие остальных доменов фермента этот фрагмент способен формировать в растворе стабильную структуру с высокой температурой плавления (около 68 °С), на которую нуклеотидный эффектор

влияния не оказывает (рис. 59Г, табл. 7, синий цвет). Надо подчеркнуть, что эти результаты полностью совпадают с результатами, полученными ранее для более короткого фрагмента Lon-протеазы дикого типа, включающего 207 N-концевых остатков (*EcLon207*, табл. 7). Таким образом, можно полагать, что исследуемая в данной работе N-концевая область Lon-протеазы, в отсутствие других доменов фермента, способна к образованию высокостабильной трехмерной структуры. В то же время в составе полноразмерной молекулы фрагмент Lon283 находится в тесной кооперации с АТР-азной составляющей фермента, что выражается в плавлении такой структуры как единого целого при пониженной температуре.

Из представленных результатов следует, что (1) некаталитическая N-концевая область и каталитически активные AAA⁺-модуль и Р-домен *EcLon*-протеазы в изолированном состоянии проявляют различную термостабильность, которая понижается в ряду: N-концевая область > Р-домен > AAA⁺-модуль; (2) в полноразмерной Lon-протеазе N-концевая область тесно ассоциирована с АТР-азным модулем, что приводит с одной стороны к утрате ее высокой стабильности, а с другой стороны – к заметному возрастанию стабильности AAA⁺-модуля; (3) отсутствие N-концевого домена вызывает понижение стабильности как AAA⁺-модуля, так и Р-домена; (4) взаимодействие с нуклеотидными эффекторами (ADP или ADP-Mg) стабилизирует как полноразмерный фермент, так и его AAA⁺-модуль-содержащие фрагменты.

Совокупность данных по микрокалориметрии Lon-протеазы и ее укороченных форм позволяет сделать заключение о сложности междоменных взаимодействий в белке, результатом которых является формирование глобулярных структур, подвергающихся тепловой денатурации независимо друг от друга. При этом взаимодействие АТР-азного модуля – структурного ядра любого AAA⁺-белка – с нуклеотидом приводит к образованию высокоупорядоченной стабильной структуры фермента.

5.6. Функциональная характеристика *EcLon*-протеазы и её модифицированных форм

Отличительным свойством всех АТР-зависимых протеаз системы контроля качества клеточных белков и, в том числе *EcLon*-протеазы, является процессивный механизм гидролиза белкового субстрата (без высвобождения крупных промежуточных фрагментов), который реализуется исключительно при сопряжении протеолиза с гидролизом АТР. При этом взаимодействие ферментов с субстратами носит мультицентровой характер: белок-мишень связывается с протеазой, по крайней мере, в двух участках – это активный пептидгидролазный центр и так называемый

аллостерический центр(ы) фермента, заполнение которого приводит к увеличению протеолитической активности [171].

Для изучения вклада инсерционного HI(CC)-домена в функционирование Ec-Lon-протеазы было проведено сравнительное исследование энзиматических характеристик интактного фермента и его делеционных, укороченных и мутантных форм. При этом было изучено функционирование обоих активных центров (АТФ-азного и пептидгидролазного) как по отдельности, так и в условиях сопряжения. Исследовано влияние различных нуклеотидных эффекторов на гидролиз пептидного и белкового субстратов под действием Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм. В качестве стандартных условий при определении всех видов активности ферментов были выбраны 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.5, содержащий 150 мМ NaCl (буфер GFB) и температура 37 °С.

5.6.1. Функционирование АТФ-азных центров Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Очередной этап работы был посвящен исследованию влияния изменений в некаталитической N-концевой области Ec-Lon-протеазы на функционирование ее АТФ-азного центра, локализованного в центральном ААА⁺-модуле.

АТФ-азную активность ферментов тестировали по накоплению продукта реакции – неорганического фосфата – в реакции гидролиза АТФ согласно методике, предложенной в работе [139].

Изучение температурного и рН-оптимумов функционирования АТФ-азных центров показало, что оптимальные параметры проявления максимальной АТФ-азной активности модифицированными формами Ec-Lon-протеазы незначительно изменяются по сравнению с соответствующими характеристиками нативного фермента (табл. 8).

Таблица 8. рН- и температурный оптимумы АТФ-азной активности Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Форма фермента	рН _{опт} (при 37 °С)	Т _{опт} , °С (при рН _{опт})
Ec-Lon	8.2-8.3	50
Lon-dHI(CC)	7.9	55
Lon-d106	8.0	55
Lon-d172	8.9	50
Lon-d234*	8.4	55

Условия эксперимента: 50 мМ Tris-НСl-буфер, (рН 7.5 – 9.0) или 13 мМ Na₂ВO₇ (рН 8.1 – 10.7), 0.1 М NaCl.
Концентрации: АТФ – 2.5 мМ; MgCl₂ – 2.5 мМ; фермент – 1.0–10 мкМ.

* – данные работы [105].

Интakтная *Ec-Lon-протеаза* проявляет значительную базовую АТР-азную активность в условиях, близких к физиологическим (концентрации АТР и ионов Mg^{2+} – 2.5 и 20 мМ, соответственно) (рис. 60 А, зависимость 1). При эквимоллярных концентрациях АТР и ионов магния (по 2.5 мМ) скорость гидролиза АТР увеличивается (зависимость 3 на рис. 60 А). Присутствие белкового субстрата в обоих случаях приводит к значительному повышению эффективности гидролиза АТР, достигающей близких значений (рис. 60 А, зависимости 2 и 4).

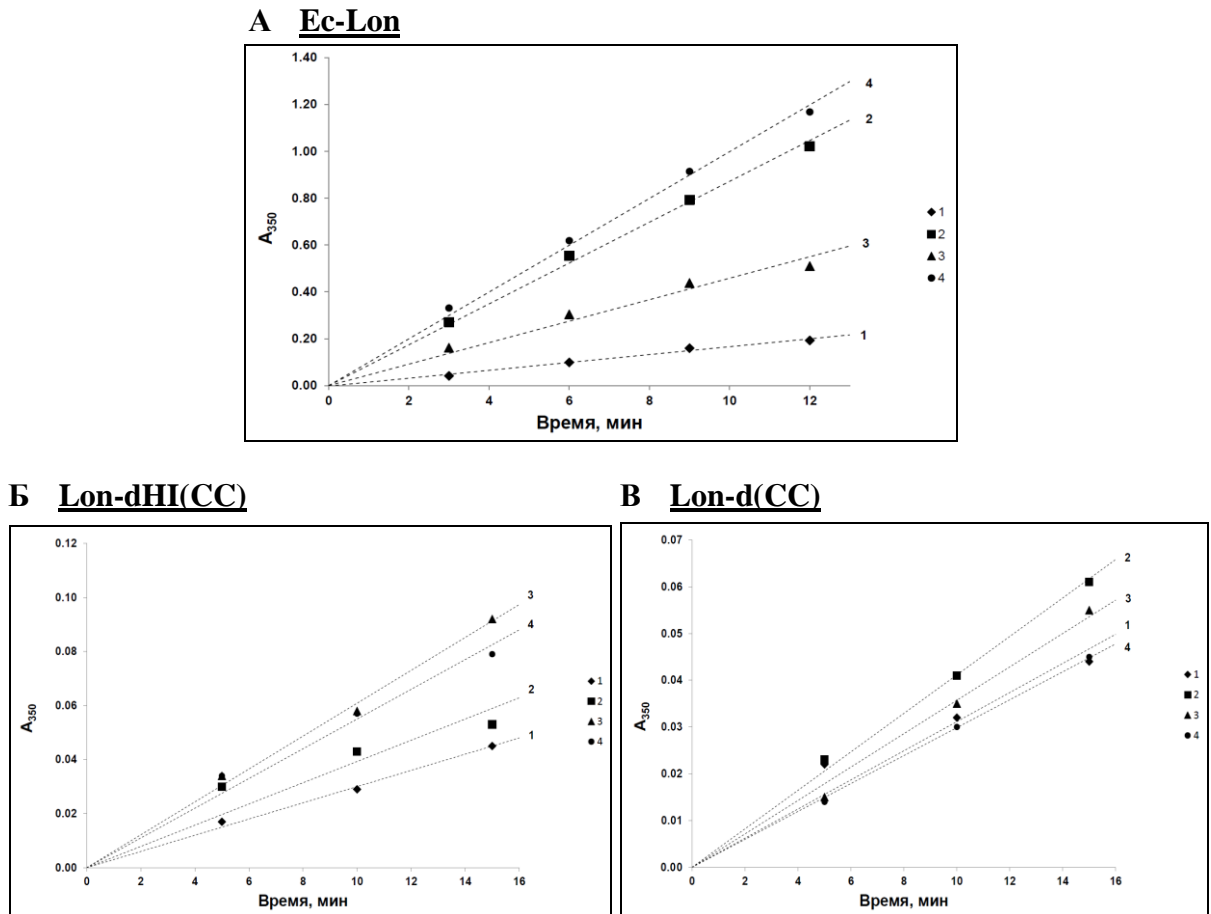


Рисунок 60. Гидролиз АТР интактной *Ec-Lon-протеазой* (А) и делеционными формами *Lon-dHI(CC)* (Б) и *Lon-d(CC)* (В).

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: АТР – 2.5 мМ (1–4); $MgCl_2$ – 20 (1, 2) или 2.5 мМ (3, 4); β -казеин – 0.5 мг/мл (2, 4); *Ec-Lon* – 0.5 мкМ (А); *Lon-dHI(CC)* – 1.0 мкМ (Б); *Lon-d(CC)* – 1.5 мкМ (В).

Делеционные формы *Lon-dHI(CC)* и *Lon-d(CC)* кардинально отличаются от интактного фермента тем, что они гораздо менее эффективно гидролизуют АТР (рис. 60Б, В). Удельные базовые активности интактной *Ec-Lon-протеазы* и форм *Lon-dHI(CC)* и *Lon-d(CC)* различаются более чем на порядок (табл. 9). Кроме того, варьирование концентрации ионов магния и добавление белкового субстрата вызывают лишь незначительные изменения АТР-азной активности модифицированных ферментов (рис.

60Б и В, табл. 9). Причем, при эквимольном соотношении АТФ и ионов Mg^{2+} казеин даже в некоторой степени ингибирует АТФ-азные центры делеционных форм.

Таблица 9. Сопоставление АТФ-азной активности интактной Ec-Lon-протеазы и делеционных форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC)

Условия определения			Удельная активность фермента *					
			Ec-Lon		Lon-dHI(CC)		Lon-d(CC)	
[АТФ], мМ	[Mg ²⁺], мМ	β-казеин (№ прямой)	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>
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
		+ (2)	21.3 ± 0.58	5.10	0.49 ± 0.09	1.16	0.30 ± 0.01	1.43
2.5	2.5	– (3)	10.8 ± 0.80	2.57	0.70 ± 0.03	1.67	0.28 ± 0.01	1.33
		+ (4)	24.3 ± 1.26	5.80	0.64 ± 0.05	1.52	0.19 ± 0.02	0.90

* – 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 β-казеина, v_1) к базовой скорости гидролиза АТФ (выделена светло-зеленым фоном, v_0); в скобках приведены доли базовой удельной активности Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) по отношению к активности Ec-Lon.

Условия эксперимента: буфер GFB; 37°C; концентрации: АТФ – 2.5 мМ; MgCl₂ – 2.5 или 20 мМ; β-казеин – 0.5 мг/мл; Ec-Lon – 0.5 мкМ; Lon-dHI(CC) – 1.0 мкМ; Lon-d(CC) – 1.5 мкМ. Ошибки рассчитаны с помощью программы OriginPro 8.0.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что инсерционный α-спирализованный HI(CC)-домен и его coiled-coil-фрагмент играют существенную роль в эффективном функционировании АТФ-азного центра Ec-Lon-протеазы. Утрата высокого активирующего действия белкового субстрата позволяет сделать заключение об участии вставочного домена также в осуществлении корректного связывания белка-мишени Ec-Lon-протеазой и в реализации регуляторного влияния протеолитического центра на АТФ-азный.

АТФ-азная активность *укороченных форм Ec-Lon-протеазы (Lon-d106 и Lon-d172)* тоже понижена в сравнении с активностью интактного фермента (рис. 61). Их удельные базовые активности составляют около 15 % от активности Ec-Lon (табл. 10). При этом изменение концентрации ионов магния так же мало влияет на АТФ-азную функцию укороченных форм, как и делеционных (ср. табл. 9 и 10). Подобные характеристики получены и для формы Lon-d234, базовая АТФ-азная активность которой (20 % от активности EcLon) не меняется при варьировании концентрации ионов Mg^{2+} [170]. Однако добавление белка-субстрата оказывает разное воздействие на укороченные ферменты, которое в случае формы Lon-d106 соизмеримо с активацией интактного фермента,

невелико при влиянии на форму Lon-d172 (рис. 61, табл. 10) и вообще отсутствует в отношении формы Lon-d234 [170].

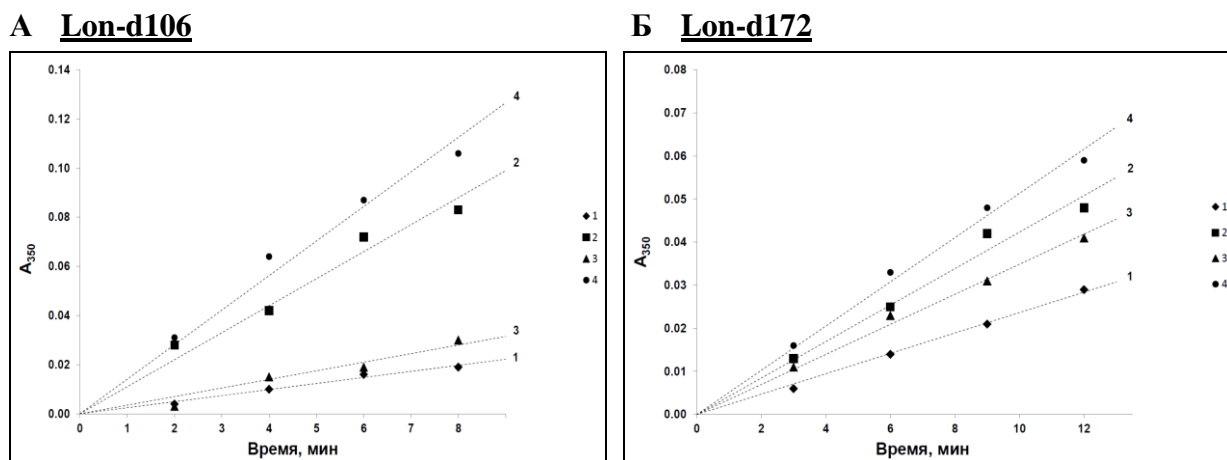


Рисунок 61. Гидролиз АТФ укороченными формами Lon-d106 (А) и Lon-d172 (Б).

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: АТФ – 2.5 мМ (1–4); MgCl₂ – 20 (1, 2) или 2.5 мМ (3, 4); β-казеин – 0.5 мг/мл (2, 4); Lon-d106 – 0.5 мкМ (А); Lon-d172 – 0.5 мкМ (Б).

Таблица 10. Сопоставление АТФ-азной активности интактной Ec-Lon-протеазы и укороченных форм Lon-d106 и Lon-d172

Условия определения			Удельная активность фермента *					
			Ec-Lon		Lon-d106		Lon-d172	
[АТФ], мМ	[Mg ²⁺], мМ	β-казеин (№ прямой)	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>
2.5	20	– (1)	4.20 ± 0.11 (100 %)	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	2.60 ± 0.21	4.20	1.10 ± 0.07	1.80
2.5	2.5	– (3)	10.8 ± 0.80	2.57	0.95 ± 0.10	1.53	0.87 ± 0.03	1.45
		+ (4)	24.3 ± 1.26	5.80	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 β-казеина, *v*₁) к базовой скорости гидролиза АТФ (выделена светло-зеленым фоном, *v*₀); в скобках приведены доли базовой удельной активности Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) по отношению к активности Ec-Lon.

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: АТФ – 2.5 мМ; MgCl₂ – 2.5 или 20 мМ; β-казеин – 0.5 мг/мл; Ec-Lon – 0.5 мкМ; Lon-d106 – 0.5 мкМ; Lon-d172 – 0.5 мкМ. Ошибки рассчитаны с помощью программы OriginPro 8.0.

Из полученных данных следует, что наличие фрагмента (M¹-N¹⁷²) N-концевой области так же важно для проявления Ec-Lon-протеазой полноценной АТФ-азной активности, как и присутствие HI(CC)-домена. При этом фрагмент (M¹-N¹⁰⁶) не является необходимым для связывания белка-субстрата. Однако, только у формы Lon-d106

сохраняется характерное для нативного фермента регуляторное влияние протеолитического центра на АТР-азный, утраченное как в делеционных формах, не содержащих фрагментов ($E^{124}-N^{304}$) и ($M^{173}-M^{280}$), так и в укороченных формах Lon-d172 и Lon-d234. Таким образом, получено еще одно подтверждение, что именно HI(CC)-домен ($E^{124}-N^{304}$) участвует в реализации аллостерических взаимодействий в Ec-Lon-протеазе. Результаты изучения АТР-азной активности модифицированных форм фермента суммированы на рис. 62А.

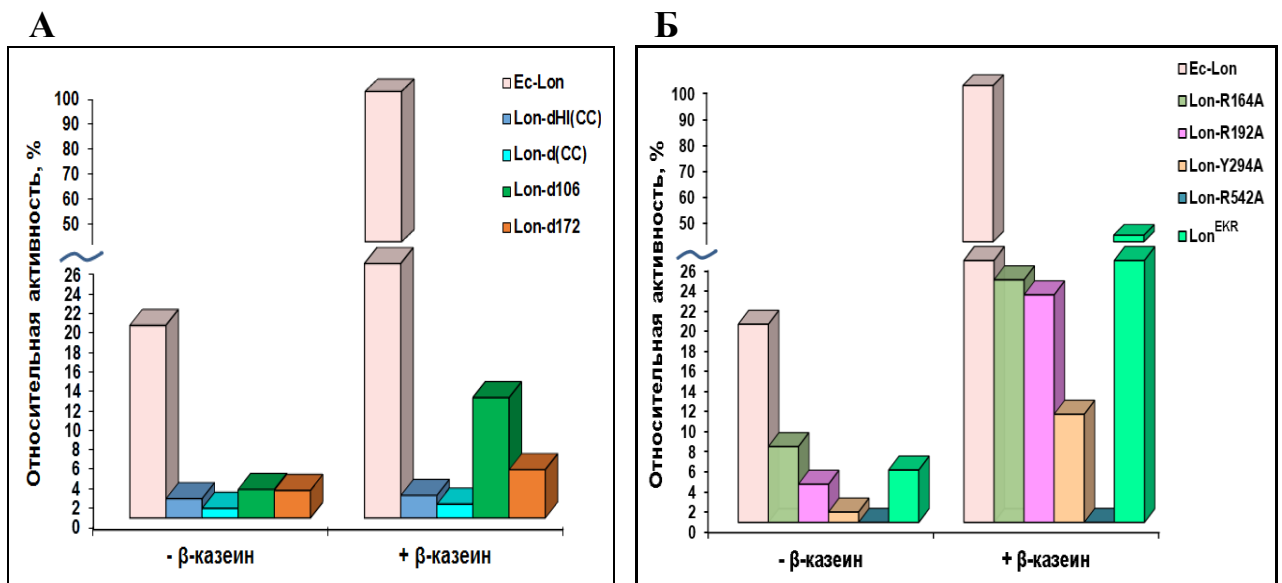


Рисунок 62. Относительная АТР-азная активность модифицированных форм Ec-Lon-протеазы.

А – делеционные и укороченные формы, **Б** – мутантные формы.

Условия эксперимента: буфер GFB; 37°C. Концентрации: АТР – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β-казеин – 0.5 мг/мл; фермент – 0.2-1.5 мкМ. Погрешность определения не превышает 15 %.

Изучение АТР-азной активности *мутантных форм Ec-Lon-протеазы* с заменами потенциально важных остатков в HI(CC)-домене показало, что все три формы (Lon-R164A, Lon-R192A и Lon-Y294A) сохраняют способность к гидролизу АТР. При этом любая мутация приводит к снижению базовой активности фермента (рис. 62Б, табл. 11), наиболее выраженному у формы Lon-Y294A (потеря активности составляет ≈ 95%). Эти результаты свидетельствуют о важности сохранения конформации вставочного домена и особенно его С-концевой спирали ($E^{287}-Q^{300}$), включающей остаток Tyr²⁹⁴, для функционирования АТР-азного центра фермента. В присутствии белкового субстрата АТР-азная активность мутантных форм возрастает, соответственно, в 3.2, 6.0 и 10 раз. Таким образом, у всех трех мутантных форм сохраняются тенденции, характерные для интактного фермента.

Таблица 11. Сопоставление АТР-азной активности интактной Ес-Lon-протеазы и ее мутантных форм

Казеин	Относительная АТР-азная активность, %					
	Ес-Lon	Lon-R164A	Lon-R192A	Lon-Y294A	Lon-R542A	Lon ^{EKR}
—	19.7	7.50	3.80	1.00	0.00	5.20
+	100	24.1	22.6	10.7	0.00	42.5
Активация	5.10 p	3.20 p	6.00 p	10.4 p	—	8.20 p

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: АТР – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β-казеин – 0.5 мг/мл; Ес-Lon – 0.5 мкМ; мутантные ферменты – 0.2-1.0 мкМ. Погрешность определения не превышает 15 %.

Особо надо отметить, что замена остатка Arg¹⁶⁴ не сказывается критичным образом на свойствах мутанта Lon-R164A, хотя замена предполагаемого его топологического аналога – остатка sensor-2 Н-домена фермента (Arg⁵⁴²), участвующего в формировании АТР-азного центра – приводит к полной утрате АТР-азной активности вне зависимости от наличия или отсутствия белкового субстрата (рис. 62Б, табл. 11). Из этого следует, что несмотря на формальное подобие локализации остатков Arg¹⁶⁴ и Arg⁵⁴² в α-спирализованных доменах HI(CC) и H, фрагменты, включающие эти остатки, имеют различную функциональную значимость для Ес-Lon-протеазы.

Базовая АТР-азная активность тройного мутанта Lon^{EKR} с потенциально ослабленными междоменными взаимодействиями составляет около 26 % от активности интактного фермента, и этот мутант сохраняет все тенденции, характерные для Ес-Lon-протеазы (в частности, в присутствии белкового субстрата активность Lon^{EKR} достигает почти половины активности Ес-Lon в этих условиях) (рис. 62Б, табл. 11). Сопоставление результатов изучения АТР-азной активности форм Lon-d106 и Lon^{EKR} позволяет сделать заключение о том, что для корректного функционирования АТР-азного центра Ес-Lon-протеазы необходимо не только наличие N-концевого домена, но и сохранение его нативной конформации.

Суммарные данные по влиянию присутствия белкового субстрата на АТР-азную активность модифицированных и мутантных форм Ес-Lon-протеазы (табл. 12) однозначно показывают, что инсерционный HI(CC)-домен и его coiled-coil-фрагмент являются необходимыми компонентами реализации аллостерического влияния протеолитического центра фермента на его АТР-азный центр.

Кроме того, неспособность АТР-азных центров форм Lon-dHI(CC), Lon-d(CC) и Lon-d172 к активации казеином на фоне высокой активированности формы Lon-Y294A

свидетельствует об участии фрагмента (E¹²⁴-M²⁸⁰) HI(CC)-домена во взаимодействии с белком-субстратом. N-концевой домен не вовлечен в связывание белковой мишени.

Таблица 12. Обобщенные данные по влиянию белкового субстрата на АТФ-азную активность модифицированных и мутантных форм Ec-Lon-протеазы

Каз*	Ак-ть	Формы Ec-Lon-протеазы**									
		Ec-Lon	dHI(CC)	d(CC)	d106	d172	R164A	R192A	Y294A	R542A	Lon ^{EKR}
–	БА	100	10.0	5.00	14.8	14.3	38.2	19.2	5.20	0.00	26.3
+	% _{БА}	507	11.6	7.10	62.5	25.1	122	115	54.3	–	216
	<i>n</i>	5.10	1.16	1.43	4.20	1.80	3.20	6.00	10.4	–	8.20
	ОА	100	2.30	1.40	12.3	4.90	24.1	22.6	10.7	0.00	42.5
АВПЦ		++	–	–	++	–	+	++	+++	–	+++

* – казеин, ** – 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; БА – базовая активность, %; %_{БА} – активность по отношению к БА, %; ОА – относительная активность, %; *n* – степень активации.

Сокращения: Ак-ть – активность, АВПЦ – аллостерическое влияние протеолитического центра.

Повышенную степень активации белком АТФ-азной функции форм Lon-Y294A и Lon^{EKR} по сравнению с интактным ферментом можно рассматривать как указание на то, что в результате взаимодействия с белком-мишенью происходит частичное восстановление конформации Ec-Lon-протеазы, нарушенной при мутации либо остатка Tyr²⁹⁴ (С-концевая спираль α10 вставочного домена) либо остатков Glu³⁴, Lys³⁵ и Arg³⁸ (N-домен Ec-Lon).

5.6.2. Функционирование пептидгидролазных центров Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Пептидазную активность Ec-Lon-протеазы и её модифицированных форм тестировали по гидролизу тиобензилового эфира N-защищенного трипептида (Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, РерТВЕ). Степень превращения субстрата определяли спектрофотометрически по накоплению продукта реакции – бензилтиолата, взаимодействие которого с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP) приводит к образованию 4-тиопиридона, обладающего максимальным оптическим поглощением при длине волны 324 нм [140]. Использование низкомолекулярного субстрата позволяет количественно характеризовать эффективность функционирования пептидгидролазного центра фермента.

Установлено, что оптимальное значение температуры при функционировании пептидазных центров модифицированных форм Lon-протеазы сохраняется практически неизменным (50 °С) по сравнению с нативным ферментом (табл. 13), в то же время рН-оптимум пептидазной активности смещается (в пределах от 0.4 до 1 единицы рН) в сторону кислой области.

Таблица 13. рН- и температурный оптимумы тиоэстеразной активности Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Форма фермента	рН _{опт} (при 37 °С)	Т _{опт} , °С (при рН _{опт})
Ec-Lon	9.0	50
Lon-dHI(CC)	8.3	50
Lon-d106	8.0	50
Lon-d172	8.6	50
Lon-d234*	8.2-8.4	46

Условия эксперимента: 50 мМ Tris-HCl-буфер (рН 7.5 – 9.0) или 13 мМ Na₂BO₇ (рН 8.1 – 10.7), 0.15 М NaCl, 10% DMSO. Концентрации: фермент – 0.1 мкМ, ПерТВЕ – 0.1 мМ, дитиодипиридин (DTDP) – 0.2 мМ.

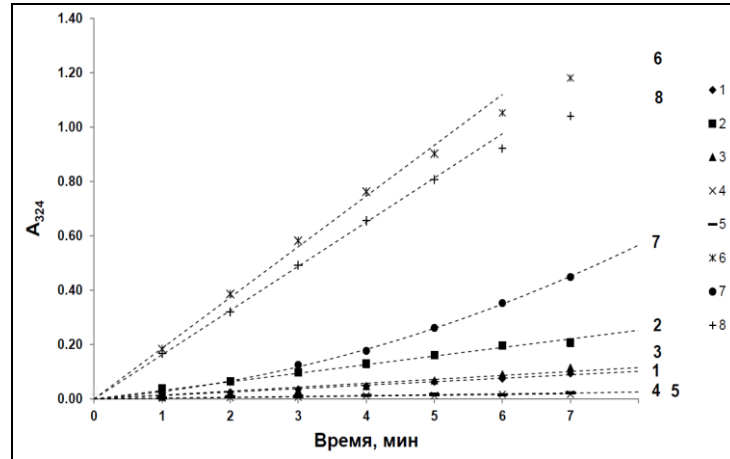
* – данные работы [105].

Все модифицированные и мутантные формы Ec-Lon-протеазы в разной степени сохраняют способность к гидролизу трипептидного субстрата в отсутствие эффекторов (базовая пептидазная активность). Из этого следует, что N-концевая область фермента не является критически необходимой для формирования каталитического пептидгидролазного центра, но оказывает влияние на эффективность его функционирования.

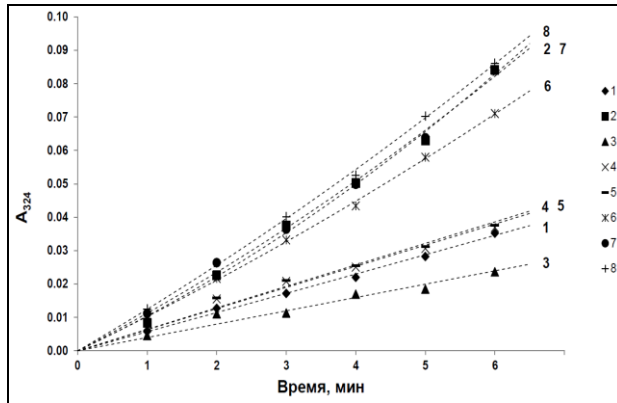
Из рис. 63 видно, что по эффективности гидролиза ПерТВЕ *Ec-Lon-протеаза* намного превосходит *делеционные формы Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC)*, базовая пептидазная активность которых понижена соответственно в 12 и 15 раз по сравнению с активностью интактного фермента (табл. 14). Полученные результаты свидетельствуют о том, что HI(CC)-домен и его coiled-coil-фрагмент играют существенную роль в корректном функционировании пептидазного центра Ec-Lon-протеазы.

Ec-Lon и ее делеционные формы коренным образом различаются также по влиянию эффекторов на пептидазные центры. Из рис. 63А и табл. 14 видно, что свободный АТР, ионы Mg²⁺ и комплексы Nu-Mg в разной степени активируют гидролиз ПерТВЕ интактным ферментом, причем, максимальный стимулирующий эффект оказывают АТР-Mg и АМРРNP-Mg. Нуклеотиды ADP и АМРРNP являются ингибиторами гидролиза ПерТВЕ Ec-Lon-протеазой.

А Ec-Lon



Б Lon-dHI(CC)



В Lon-d(CC)

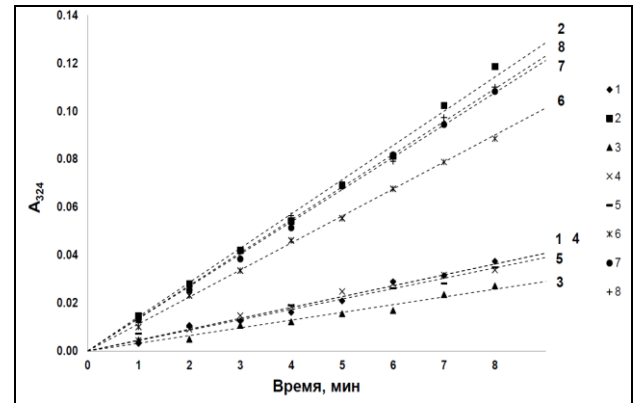


Рисунок 63. Гидролиз PепТВЕ интактной Ec-Lon-протеазой (А) и делеционными формами Lon-dHI(CC) (Б) и Lon-d(CC) (В). Условия эксперимента: буфер GFB; 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C; концентрации: PепТВЕ – 0.1 мМ; Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Ec-Lon – 0.1 мкМ (А); Lon-dHI(CC) – 0.5 мкМ (Б); Lon-d(CC) – 0.5 мкМ (В). Эффекторы: 1 – отсутствуют, 2 – Mg²⁺, 3 – АТР, 4 – АDР, 5 – АМРРNР, 6 – АТР-Mg, 7 – АDР-Mg, 8 – АМРРNР-Mg.

В то же время на пептидазную функцию Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) свободные нуклеотиды влияют мало, тогда как комплексы Nu-Mg проявляют умеренное активирующее действие, близкое по величине к активационному эффекту ионов Mg²⁺ (рис. 63Б, В, табл. 14). Эти результаты можно рассматривать как свидетельство в пользу того, что в делеционных формах нарушено регуляторное влияние АТР-азного центра на пептидазный центр, в связи с чем стимуляция пептидазной активности, в основном, обусловлена связыванием ионов магния. Кроме того, сходное влияние различных нуклеотидов или их комплексов с магнием на пептидазную активность Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) позволяет полагать, что инсерционный домен, по-видимому, вовлечен также в формирование области фермента, ответственной за распознавание природы нуклеотидов, связывающихся в АТР-азном центре.

Таблица 14. Сопоставление пептидазной активности интактной Ес-Lon-протеазы и делеционных форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC)

Эффектор		Удельная активность фермента *					
		Ес-Lon		Lon-dHI(CC)		Lon-d(CC)	
		ν	n	ν	n	ν	n
1	Без эффектора (базовая активность)	8.40 ± 0.21 (100 %)	1.00	0.70 ± 0.02 (8.3 %)	1.00	0.56 ± 0.01 (6.7 %)	1.00
2	Mg ²⁺	18.8 ± 0.53	2.23	1.50 ± 0.09	2.14	1.80 ± 0.03	3.25
3	АТФ	12.4 ± 0.41	1.47	<i>0.48 ± 0.03</i>	<i>0.69</i>	<i>0.41 ± 0.01</i>	<i>0.73</i>
4	ADP	<i>1.94 ± 0.03</i>	<i>0.23</i>	<i>0.75 ± 0.02</i>	<i>1.07</i>	<i>0.52 ± 0.01</i>	<i>0.93</i>
5	АМРРNP	<i>2.24 ± 0.12</i>	<i>0.27</i>	<i>0.75 ± 0.02</i>	<i>1.07</i>	<i>0.47 ± 0.01</i>	<i>0.84</i>
6	АТФ-Mg	106 ± 1.79	12.6	1.30 ± 0.03	1.88	1.40 ± 0.04	2.43
7	ADP-Mg	52.7 ± 3.10	6.26	1.50 ± 0.06	2.14	1.70 ± 0.07	3.04
8	АМРРNP-Mg	93.6 ± 5.52	11.1	1.70 ± 0.05	2.40	1.70 ± 0.08	3.04

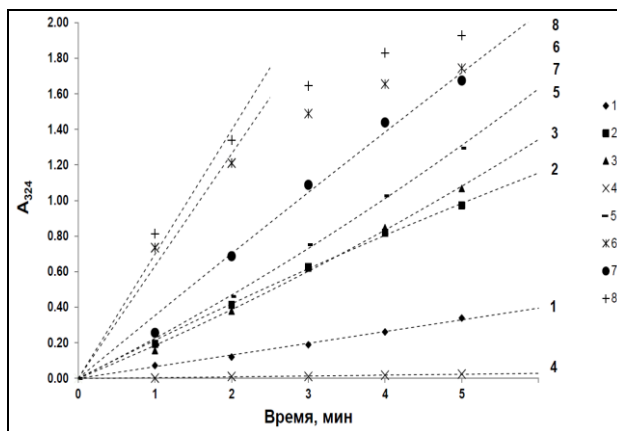
* – Приведены значения удельных скоростей гидролиза ПерТВЕ (ν , ([P], мкМ)/([E], мкМ)·мин) и n – отношение скоростей гидролиза субстрата в присутствии и в отсутствие эффектора ($\nu_{эф}/\nu_0$), где $n < 1$ соответствует ингибированию (показано курсивом), а $n > 1$ – активации гидролиза (показано **жирным шрифтом**); в скобках приведены доли базовой удельной активности Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) по отношению к активности Ес-Lon.

Условия эксперимента: буфер GFB; 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C. Концентрации: ПерТВЕ – 0.1 мМ; Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Ес-Lon – 0.1 мкМ; Lon-dHI(CC) – 0.5 мкМ; Lon-d(CC) – 0.5 мкМ.

Погрешности рассчитаны с помощью программы OriginPro 8.0.

В отношении **укороченных форм** установлено, что базовая пептидазная активность формы Lon-d106 практически не отличается от активности интактной Ес-Lon-протеазы, а активность формы Lon-d172 понижена незначительно (рис. 64, табл. 15).

А Lon-d106



Б Lon-d172

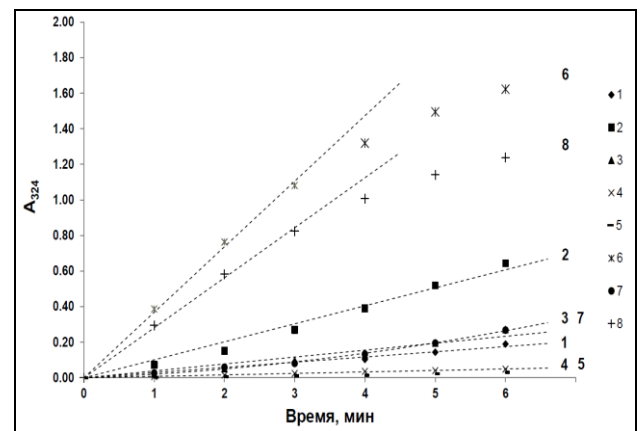


Рисунок 64. Гидролиз ПерТВЕ укороченными формами Lon-d106 (А) и Lon-d172 (Б).

Условия эксперимента: буфер GFB; 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C; концентрации: ПерТВЕ – 0.1 мМ; Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Lon-d106 – 0.5 мкМ (А) Lon-d172 – 0.5 мкМ (Б). Эффекторы: 1 – отсутствуют, 2 – Mg²⁺, 3 – АТФ, 4 – ADP, 5 – АМРРNP, 6 – АТФ-Mg, 7 – ADP-Mg, 8 – АМРРNP-Mg.

Таблица 15. Сопоставление пептидазной активности интактной Ec-Lon-протеазы и укороченных форм Lon-d106 и Lon-d172

Эффектор		Удельная активность фермента *					
		Ec-Lon		Lon-d106		Lon-d172	
		<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>
1	Без эффектора (базовая активность)	8.40 ± 0.21 (100 %)	1.00	8.50 ± 0.10 (101 %)	1.00	3.40 ± 0.14 (40.9 %)	1.00
2	Mg ²⁺	18.8 ± 0.53	2.23	23.2 ± 0.69	2.71	12.8 ± 0.25	3.73
3	АТФ	12.4 ± 0.41	1.47	26.3 ± 0.53	3.09	3.78 ± 0.26	1.10
4	ADP	<i>1.94 ± 0.03</i>	<i>0.23</i>	<i>0.74 ± 0.02</i>	<i>0.09</i>	<i>0.96 ± 0.03</i>	<i>0.28</i>
5	АМРРNP	<i>2.24 ± 0.12</i>	<i>0.27</i>	29.2 ± 1.11	3.42	<i>0.47 ± 0.04</i>	<i>0.14</i>
6	АТФ-Mg	106 ± 1.79	12.6	82.1 ± 2.80	9.62	43.6 ± 2.35	12.7
7	ADP-Mg	52.7 ± 3.10	6.26	42.7 ± 1.81	5.00	3.82 ± 0.33	1.11
8	АМРРNP-Mg	93.6 ± 5.52	11.1	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 – отношение скоростей гидролиза субстрата в присутствии и в отсутствие эффектора ($v_{эф}/v_0$), где $n < 1$ соответствует ингибированию (показано курсивом), а $n > 1$ – активации гидролиза (показано **жирным шрифтом**); в скобках приведены доли базовой удельной активности Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) по отношению к активности Ec-Lon. *Условия эксперимента:* буфер GFB; 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C. Концентрации: ПерТВЕ – 0.1 мМ; Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Ec-Lon – 0.1 мкМ; Lon-d106 – 0.5 мкМ; Lon-d172 – 0.5 мкМ. Ошибки рассчитаны с помощью программы OriginPro 8.0.

Из сопоставления данных рис. 63А, 64 и табл. 15 следует, что для укороченных форм полностью сохраняются тенденции, характеризующие влияние эффекторов на интактный фермент: в частности, комплексы АТФ-Mg и АМРРNP-Mg проявляют максимальное активирующее действие, соизмеримое с эффектом активации Ec-Lon. Аналогичные результаты были также получены ранее для формы Lon-d234 [170]. Таким образом, можно констатировать, что N-домен Ec-Lon-протеазы, а также N-концевая часть HI(CC)-домена (E¹²⁴-H¹⁷²) не оказывают существенного влияния на функционирование пептидазного центра фермента и на реализацию аллостерического воздействия АТФ-азного центра на пептидазный.

Все **мутантные формы Ec-Lon-протеазы** с заменами в N-концевой области проявляют пониженную базовую пептидазную активность (рис. 65, табл. 16), причем в случае мутантов Lon-Y294A и Lon^{EKR} скорость гидролиза ПерТВЕ уменьшается более чем на порядок. Поскольку полное удаление N-домена (форма Lon-d106) не влияет на эффективность гидролиза ПерТВЕ Ec-Lon-протеазой (табл. 15), а по олигомерному состоянию форма Lon^{EKR} не отличается от интактного фермента (раздел 5.4), можно полагать, что в обеспечении максимальной функциональности пептидгидролазных

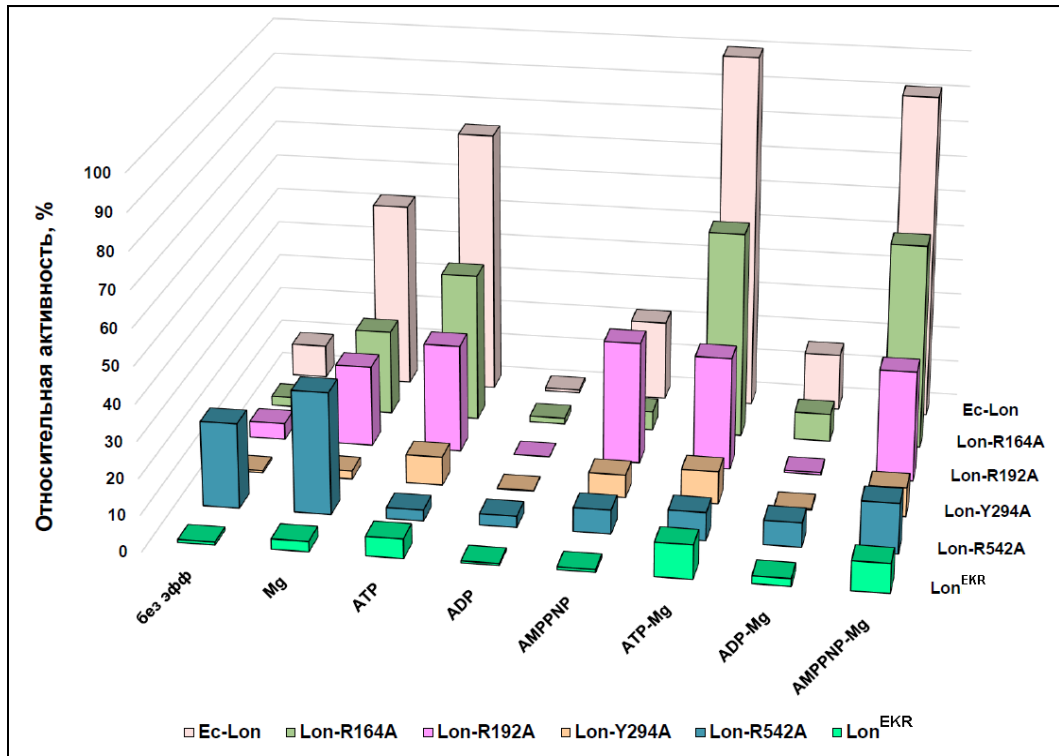


Рисунок 65. Относительная пептидазная активность мутантных форм Ec-Lon-протеазы.

Условия эксперимента: буфер GFB; 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C. Концентрации: ПерТВЕ – 0.1 мМ; ATP – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; фермент – 0.2-0.5 мкМ. Погрешность определения не превышает 15 %.

Таблица 16. Сопоставление пептидазной активности интактной Ec-Lon-протеазы и ее мутантных форм

Эффектор	Относительная удельная пептидазная активность, %					
	Ec-Lon	Lon-R164A	Lon-R192A	Lon-Y294A	Lon-R542A	Lon ^{EKR}
--- (базовая акт-ь)	7.90	2.30	3.90	0.53	20.1	0.70
Mg	17.7	20.4	19.2	1.90	29.0	2.40
ATP	11.7	35.6	25.8	6.80	2.60	4.58
ADP	1.83	1.42	0	0.12	2.67	0.45
AMPPNP	2.11	4.45	29.2	5.44	5.62	0.65
ATP-Mg	100	49.4	26.7	7.70	6.60	7.90
ADP-Mg	46.9	6.68	0.55	0.33	5.60	1.80
AMPPNP-Mg	88.3	49.2	26.3	6.80	11.9	6.90
Активация ATP-Mg	12.6 p	21.5 p	6.90 p	14.5 p	0.33 p	11.3 p
Активация AMPPNP-Mg	11.2 p	21.4 p	6.80 p	12.8 p	0.59 p	9.80 p

Условия эксперимента: буфер GFB; 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C; концентрации: ПерТВЕ – 0.1 мМ; ATP – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; фермент – 0.2–0.5 мкМ. Данные, соответствующие ингибирующему действию эффекторов, показаны курсивом. Погрешность определения не превышает 15 %.

центров Ес-Lon-протеазы важную роль играет сохранение конформационных характеристик как N-домена, так и вставочного HI(CC)-домена (особенно его С-концевой части, включающей остаток Y²⁹⁴).

Изучение влияния эффекторов на пептидгидролазные свойства мутантов показало, что ионы Mg²⁺ служат активаторами пептидазных центров всех мутантных форм Ес-Lon-протеазы (табл. 16). Действие нуклеотидов и комплексов Nu-Mg на мутанты по N-концевой области Lon, в целом, согласуются с их действием на интактный фермент (ингибирование или слабая активация в присутствии ADP и ADP-Mg, максимальная активация при действии ATP-Mg и AMPPNP-Mg). Полученные результаты свидетельствуют о том, что у этих точечных мутантов сохраняется сопряженное функционирование ATP-азного и пептидазного центров, характерное для интактного фермента.

Неожиданные свойства проявил не способный к гидролизу ATP мутант Lon-R542A, несущий замену сенсорного остатка s2 в ATP-азном модуле Ес-Lon-протеазы. Оказалось, что Lon-R542A не только гидролизует пептидный субстрат, но и проявляет базовую пептидазную активность более чем вдвое превосходящую активность интактного фермента (рис. 65, табл. 16). Поскольку активность укороченных и делеционных форм (а также изолированного протеолитического домена [105]) не превышает базовой активности интактной Ес-Lon-протеазы (табл. 14 и 15), следует полагать, что максимально эффективное функционирование пептидазного центра может реализоваться только при полной утрате полноразмерным ферментом способности к гидролизу ATP.

Активирующее влияние на пептидазный центр Lon-R542A оказывают лишь ионы магния, тогда как нуклеотидные эффекторы (свободные нуклеотиды и Nu-Mg-комплексы) ингибируют его. Из этих результатов следует, что, несмотря на отсутствие ATP-азной активности (см. раздел 5.6.1), мутант Lon-R542A сохранил способность к связыванию нуклеотидов, утратив, однако, при этом активирующее влияние ATP-азного центра на функционирование пептидазного центра, характерное для интактного фермента (табл. 16). Принимая во внимание, что мутация гомологичного сенсорного остатка s2 в гетероолигомерной протеазе ClpXP нарушает взаимодействие между ATP-азной и протеолитической субъединицами фермента [172], можно ожидать, что и в случае Ес-Lon-протеазы замена остатка Arg⁵⁴² на аланин приводит к изменению междоменных и/или межсубъединичных контактов в ферменте.

Из обобщенных данных по влиянию классического активатора Ес-Lon-протеазы – комплекса ATP-Mg – на гидролиз пептидного субстрата модифицированными и мутантными формами фермента, представленных в табл. 17, следует, что активность

пептидазного центра Ec-Lon-протеазы зависит от состояния ее АТР-азного центра и может достичь максимума при утрате ферментом способности к гидролизу АТР (мутант Lon-R542A). При этом для реализации аллостерического влияния АТР-азного центра фермента на его пептидазный центр необходимо наличие инсерционного HI(CC)-домена и его coiled-coil-фрагмента.

Таблица 17. Обобщенные данные по влиянию комплекса АТР-Mg на пептидазную активность модифицированных и мутантных форм Ec-Lon-протеазы

АТР-Mg	Ак-ть	Формы Ec-Lon-протеазы*									
		Ec-Lon	dHI(CC)	d(CC)	d106	d172	R164A	R192A	Y294A	R542A	Lon ^{EKR}
—	БА	100	8.30	6.70	101	40.9	29.1	48.9	6.65	253	8.82
+	% _{БА}	1260	15.6	16.3	972	520	626	337	96.4	83.5	100
	<i>n</i>	12.6	1.88	2.43	9.62	12.7	21.5	6.90	14.5	0.33	11.3
	ОА	100	1.20	1.30	77.1	41.3	49.4	26.8	8.10	6.60	7.90
АВАЦ		++	—	—	++	++	+++	+	++	ИНГ	++

* – формы Ec-Lon-протеазы см. в подписи к табл. 12; БА – базовая активность, %; %_{БА} – активность по отношению к БА, %; ОА – относительная активность, %; *n* – степень активации.

Сокращения: Ак-ть – активность, АВАЦ – аллостерическое влияние АТР-азного центра, ИНГ – ингибирование.

По результатам, полученным при изучении АТР-азной и пептидгидролазной активности модифицированных и мутантных форм Ec-Lon-протеазы, можно сделать следующие общие заключения:

- (1) инсерционный HI(CC)-домен необходим для эффективного функционирования АТР-азного и пептидазного центров Ec-Lon-протеазы, для реализации аллостерических взаимодействий между каталитическими центрами, для взаимодействия с белковыми мишенями и распознавания природы нуклеотидов, связывающихся в АТР-азном центре;
- (2) изменение конформации N- и HI(CC)-доменов (особенно в области С-концевой спирали $\alpha 10$ (E²⁸⁷–Q³⁰⁰) последнего) влияет на эффективность функционирования обоих каталитических центров Ec-Lon-протеазы;
- (3) N-домен и точечные мутации в N-концевой области не оказывают влияния на способность фермента к реализации аллостерических межцентровых взаимодействий;
- (4) максимальную базовую АТР-азную активность проявляет интактная Ec-Lon-протеаза, а пептидазную – мутант Lon-R542A, неспособный к гидролизу АТР.

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

Протеолитическую активность Ес-Lon-протеазы и ее модифицированных форм тестировали электрофоретически по гидролизу модельного белкового субстрата – β -казеина (далее – казеин), а также флуориметрически (в случае интактной Ес-Lon) с использованием казеина, меченного изотиоцианатом флуоресцеина (FITC-казеин). Для сравнения в качестве модельного фермента был использован химотрипсин.

Как отмечалось выше, характерной особенностью *интактной Ес-Lon-протеазы* является способность к высокоэффективному гидролизу белковых субстратов по процессивному механизму в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТР. Действительно, как следует из рис. 66А, интактная Ес-Lon в присутствии комплекса АТР-Mg процессивно и с высокой скоростью деградирует модельный белковый субстрат β -казеин (50 %-ное расщепление субстрата происходит в пределах 10 мин). Замена АТР его негидролизуемым аналогом (АМРРNP) приводит к изменению механизма гидролиза казеина на неprocessивный и к заметному снижению скорости превращения субстрата (рис. 66А). В отсутствие нуклеотидных эффекторов, а также при наличии свободных нуклеотидов или комплекса АDР-Mg гидролиза казеина Lon-протеазой не наблюдается даже при многократном увеличении продолжительности эксперимента (рис. 66Б).

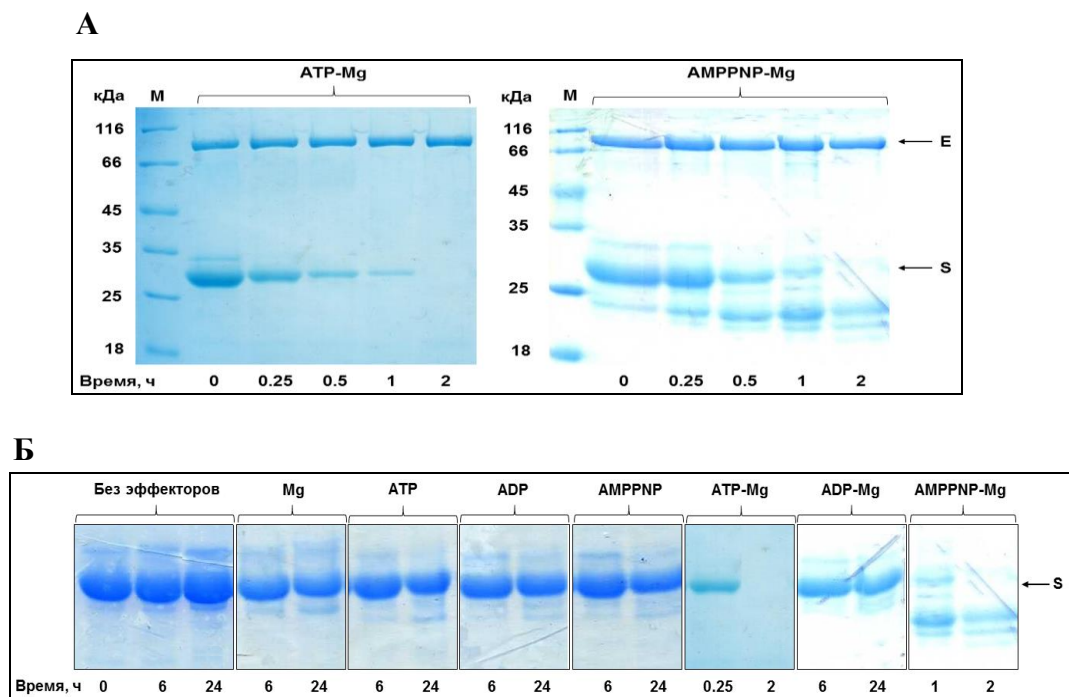


Рисунок 66. Гидролиз β -казеина интактной Ес-Lon-протеазой (электрофорез в 10 % ПААГ). **А** – деградация субстрата во времени в присутствии комплексов АТР-Mg или АМРРNP-Mg, **Б** – влияние эффекторов на деградацию субстрата.

Условия эксперимента: буфер GFB; 37°C; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β -казеин – 0.5 мг/мл; Ес-Lon – 2.8 мкМ. М – маркеры. Здесь и далее Е – фермент, S – β -казеин.

Полученные данные подтверждаются результатами гидролиза Ес-Lon-протеазой чувствительного флуоресцентного субстрата FITC-казеина: в отсутствие нуклеотидов фермент не проявляет «базовой» активности, однако способен деградировать белковый субстрат при наличии комплексов АТР-Mg или АМРРNP-Mg (рис. 67). При этом активность фермента зависит от природы эффектора (скорости гидролиза FITC-казеина в присутствии АТР-Mg и АМРРNP-Mg различаются в 6.5 раз).

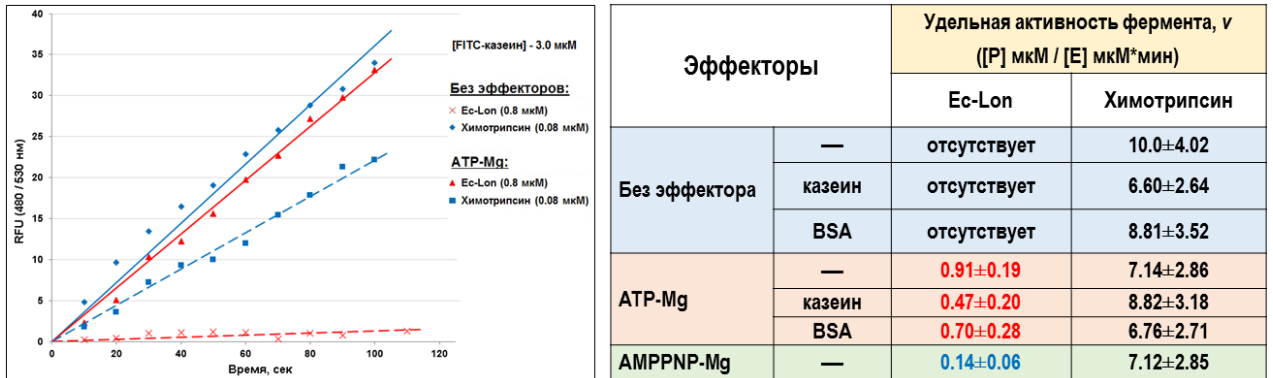


Рисунок 67. Гидролиз FITC-казеина интактной Ес-Lon-протеазой и химотрипсином.

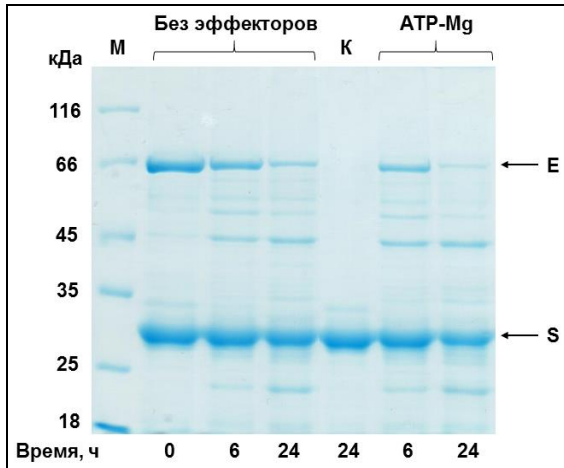
Условия эксперимента: буфер GFB; 37°C. Концентрации: FITC-казеин – 3.0 мкМ; Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Ес-Lon – 0.8 мкМ; химотрипсин – 80 нМ; казеин – 20 мкМ; BSA – 1.5 мкМ. Ошибки рассчитаны с помощью программы OriginPro 8.0.

В противоположность Ес-Lon-протеазе химотрипсин практически с одинаковой скоростью гидролизует FITC-казеин независимо от наличия/отсутствия нуклеотид-магниевого комплекса (рис. 67). Необходимо подчеркнуть, что по отношению к модельному белковому субстрату Ес-Lon-протеаза является значительно менее активным ферментом, чем химотрипсин (в оптимальных для Ес-Lon-протеазы условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТР она более чем в 10 раз уступает химотрипсину по эффективности деградации FITC-казеина). Можно отметить, что присутствие балластных белков (казеина или BSA) мало влияет на соотношение активностей Ес-Lon и химотрипсина.

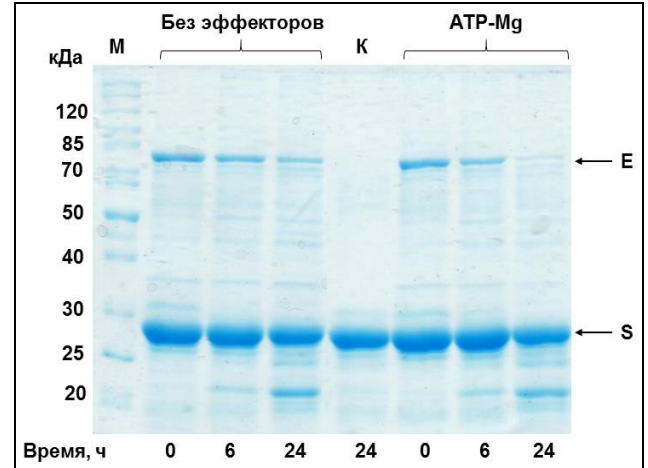
Обе *делеционные формы Ес-Lon (Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC))* не способны гидролизовать казеин в том временном интервале, в котором тестируется протеолитическая активность полноразмерной Ес-Lon-протеазы. Вместе с тем, при увеличении времени реакции до 24 ч (или более) обнаруживаются продукты непроецессивной деградации белкового субстрата обеими формами как в присутствии комплексов АТР-Mg, так и в отсутствие эффекторов (рис. 68А, Б). При этом степень превращения белковой мишени за 24 ч в случае Lon-dHI(CC) (рис. 68А) составляет

примерно 20 %, а в случае Lon-d(CC) (рис. 68Б) – около 30 % (рассчитано с помощью программ ImageJ 1.48v и JMP 2.8).

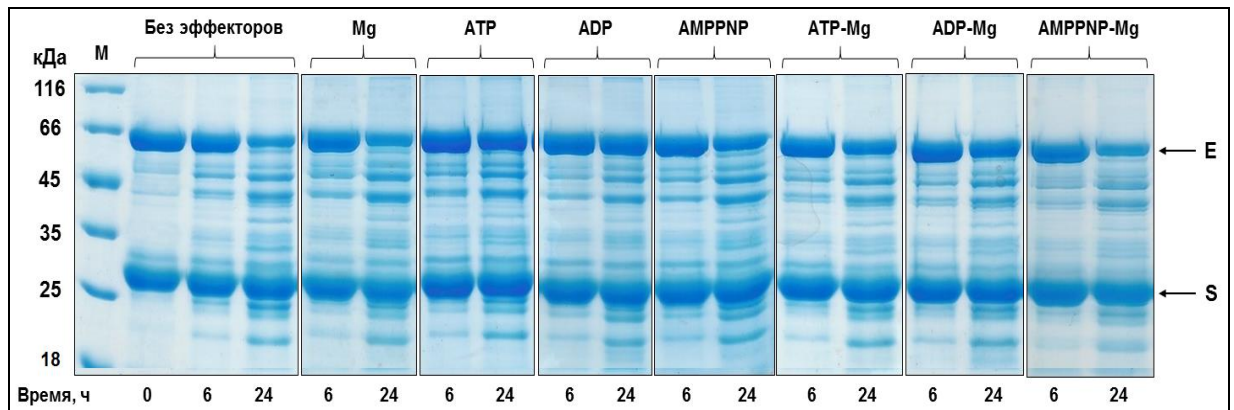
А Lon-dHI(CC)



Б Lon-d(CC)



В Lon-dHI(CC)



Г Lon-d(CC)

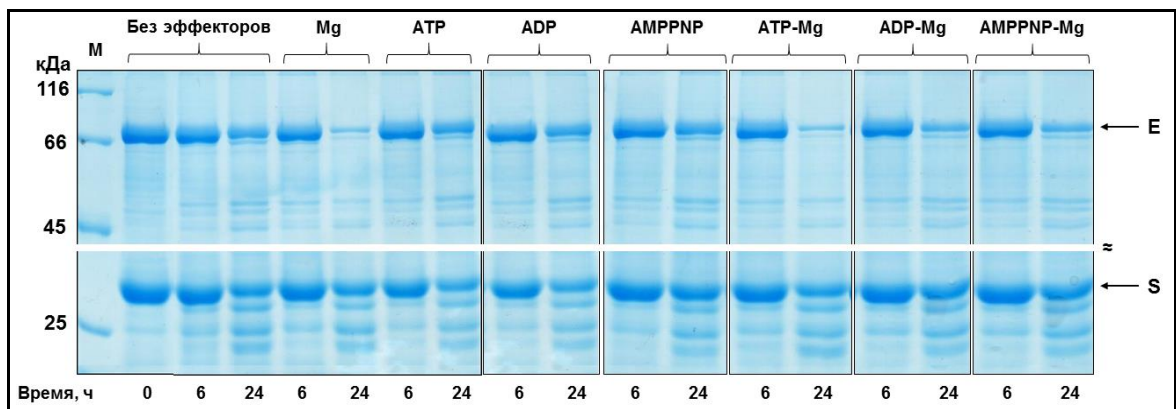


Рисунок 68. Гидролиз β -казеина делеционными формами **Lon-dHI(CC)** и **Lon-d(CC)** (электрофорез в 10 % ПААГ). А, Б – деградация субстрата во времени; В, Г – влияние эффикторов на деградацию субстрата. Условия эксперимента: буфер GFB; 37°C; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β -казеин (S) – 0.5 мг/мл; Lon-dHI(CC) – 3.0 (А) и 7.4 (В) мкМ; Lon-d(CC) – 2.6 (Б) и 6.6 (Г) мкМ. М – маркеры; К – контроль казеина.

Таким образом, в рассматриваемых условиях (рис. 68А, Б) время 50 %-ного расщепления казеина делеционными формами Ес-Lon-протеазы составляет не менее 36 ч, из чего следует, что скорость гидролиза белкового субстрата этими формами не превышает 1-2 % от скорости его гидролиза полноразмерным ферментом (ср. рис. 66А), несмотря на то, что эффективность функционирования собственно пептидгидролазных центров Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) в сравнении с центрами Ес-Lon составляет 7-8 %. Эти результаты в очередной раз подтверждают необходимость сохранения инсерционного HI(CC)-домена в структуре фермента для реализации его корректного взаимодействия с белком-мишенью. В свете представленных выше данных о понижении степени олигомеризации делеционных форм и об утрате ими способности к аллостерическим взаимодействиям между каталитическими центрами (табл. 12 и 17) не вызывает удивления и потеря формами Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) механизма процессивности при гидролизе белкового субстрата в присутствии комплекса АТФ-Mg (рис. 68А, Б).

В отличие от интактной Ес-Lon-протеазы обе делеционные формы осуществляют медленный непроцессивный гидролиз белкового субстрата при наличии любых нуклеотидов или комплексов Nu-Mg (рис. 68 В, Г). При этом по эффективности гидролиза казеина форма Lon-d(CC) заметно превышает форму Lon-dHI(CC) (табл. 18), что

Таблица 18. Степени превращения β -казеина и делеционных форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) в реакциях протеолиза (рис. 68В, Г) и автолиза (рис. 69А, Б).

Эффектор	Lon-dHI(CC)			Lon-d(CC)		
	Реакция протеолиза, [E] = 7.40 мкМ		Реакция автолиза, [E] = 11.9 мкМ	Реакция протеолиза, [E] = 6.60 мкМ		Реакция автолиза, [E] = 12.5 мкМ
	Продукты гидролиза β -казеина, %	Продукты автолиза фермента, %	Продукты автолиза фермента, %	Продукты гидролиза β -казеина, %	Продукты автолиза фермента, %	Продукты автолиза фермента, %
Без эффекторов	19	61	37	42	56	64
Mg	24	47	65	46	93	77
АТФ	24	8	11	59	48	78
ADP	29	6	8	55	43	62
AMPPNP	29	28	15	16	41	79
АТФ-Mg	22	28	16	41	92	70
ADP-Mg	26	16	21	29	69	75
AMPPNP-Mg	16	49	33	23	69	63

Жирным шрифтом и курсивом выделены максимальные уровни превращения субстрата или фермента. Голубым фоном показаны условия, при которых в реакции гидролиза казеина автолиз фермента превалирует над протеолизом. Рассчитано с помощью программ ImageJ 1.48v и ЛИМР 2.8. Эффективность протеолиза оценивали, исходя из интенсивностей окрашивания белковых зон на рис. 68 и 69 (время реакции –24 ч). Степень протеолиза определяли как разность между интенсивностями белковых полос в начальный и конечный моменты времени и выражали в %.

свидетельствует о важности фрагментов (E¹²⁴-H¹⁷²) и (M²⁸¹-N³⁰⁴), фланкирующих СС-участок и отсутствующих в Lon-dHI(CC), для взаимодействия с белком-субстратом. Вместе с тем ни для одной, ни для другой формы не проявляются какие-либо закономерности влияния эффекторов на протеолитическую активность, которых можно было ожидать, исходя из того, что на пептидазные центры Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) ионы Mg²⁺ и комплексы Nu-Mg оказывают умеренное активирующее воздействие (табл. 14).

Еще одно важное отличие делеционных форм от полноразмерной Ec-Lon-протеазы заключается в том, что при любых условиях гидролиз белковой мишени сопровождается самодеградацией модифицированных ферментов, более выраженной у Lon-d(CC) (рис. 68А-Г), причем, в ряде случаев автолиз даже преобладает над гидролизом белка (табл. 18). Автолиз Lon-dHI(CC) максимален в отсутствие эффекторов, в то время как автолиз Lon-d(CC) активируется присутствием ионов Mg²⁺ и комплексов Nu-Mg, достигая максимального уровня при наличии АТФ-Mg (рис. 68 В, Г, табл. 18). Проявление автолитической активности Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) в условиях гидролиза белкового субстрата свидетельствует об утрате делеционными формами конформационной стабильности, присущей интактной Ec-Lon-протеазе.

Сравнительный анализ собственно автолитической функции полноразмерной и делеционных форм Ec-Lon (рис. 69) показывает, что интактная Ec-Lon-протеаза подвергается медленному автолизу (**около 60 % за 36 ч**) исключительно в отсутствие нуклеотидных эффекторов, причем ионы Mg²⁺ оказывают слабое активирующее влияние на процесс самодеградации, в то время как наличие свободных нуклеотидов или комплексов Nu-Mg способствует сохранению стабильности фермента (рис. 69 А).

Обе делеционные формы и в отсутствие белка-субстрата автолизуются при любых условиях (рис. 69 Б, В) с образованием широкого спектра фрагментов с молекулярными массами от 25 до более чем 50 кДа. Эти результаты свидетельствуют об участии вставочного домена с его СС-областью в поддержании стабильной конформации фермента. Сопоставление рис. 68 Г и 69 В (с учетом разницы в концентрациях фермента) показывает, что при наличии ионов Mg²⁺ белковый субстрат проявляет свойства активатора саморасщепления Lon-d(CC) (табл. 18), чего не наблюдается для формы Lon-dHI(CC) (рис. 68 В и 69 Б, табл. 18). Принимая во внимание, что в этих условиях эффективность автолиза Lon-d(CC) становится зависимой от присутствия в среде комплексов Nu-Mg, можно предположить, что связывание белкового субстрата и ионов магния, происходящее в том числе с участием фрагментов (E¹²⁴-H¹⁷²) и (M²⁸¹-N³⁰⁴) HI(CC)-домена, вызывает конформационные изменения формы Lon-d(CC), которые

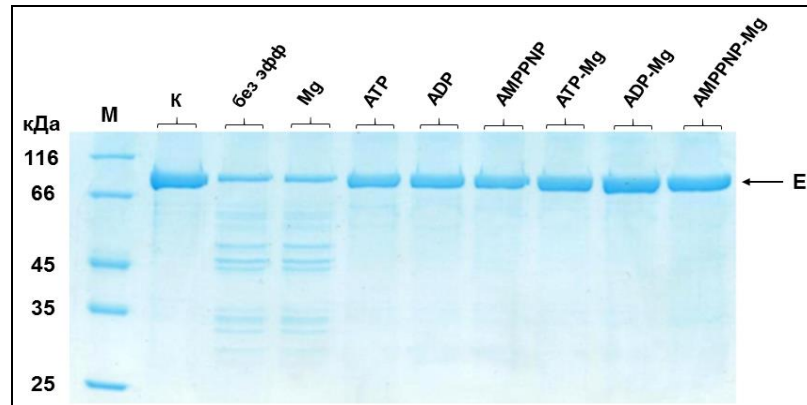
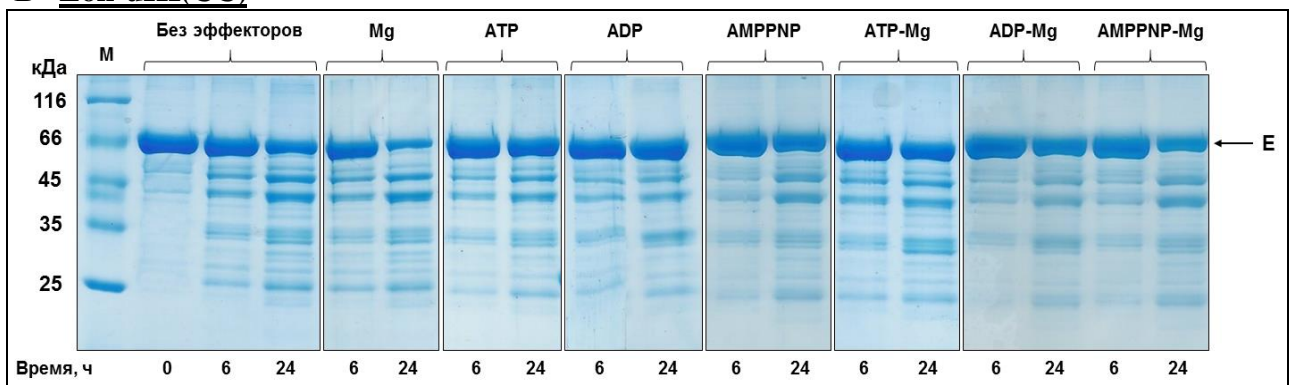
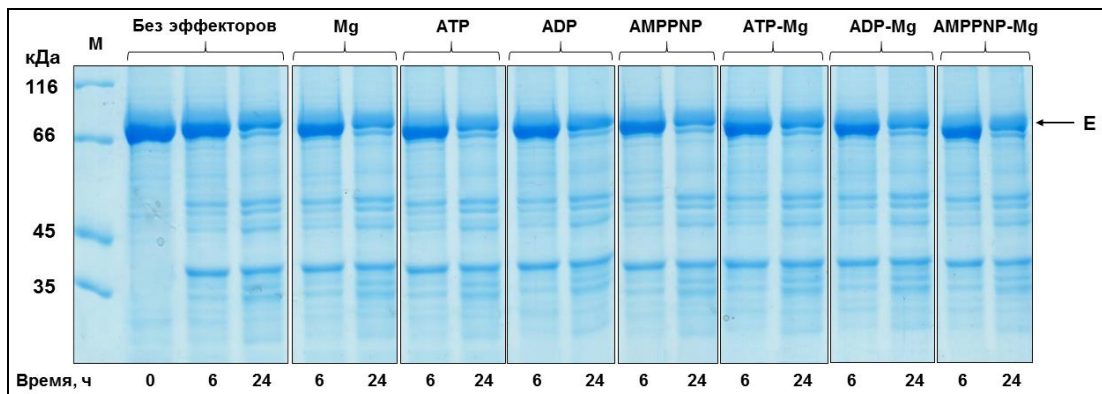
A Ec-Lon**Б Lon-dHI(CC)****В Lon-d(CC)**

Рисунок 69. Автолитическая активность полноразмерной Ec-Lon-протеазы (А) и ее делеционных форм Lon-dHI(CC) (Б) и Lon-d(CC) (В) (электрофорез в 10 % ПААГ).

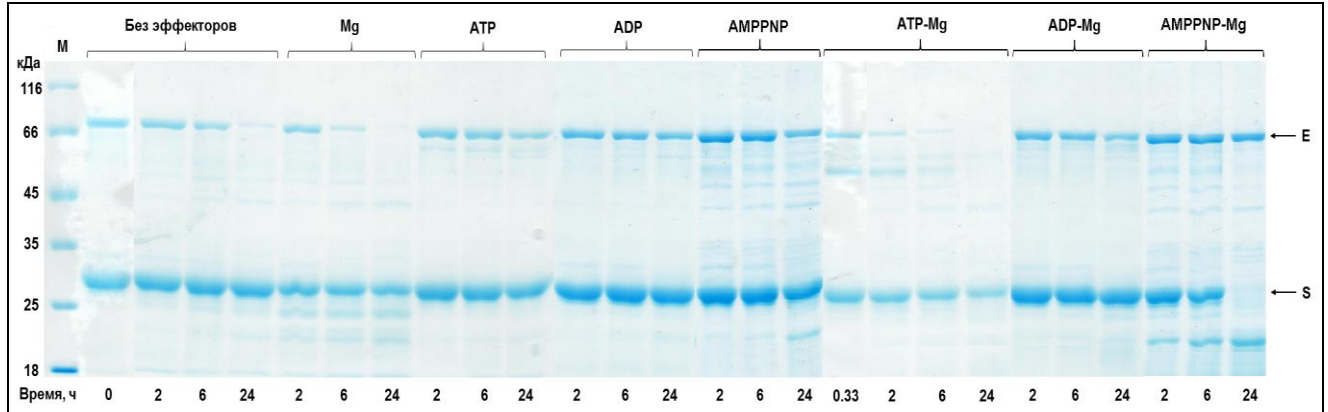
Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Ec-Lon – 2.8 мкМ (время реакции 36 ч, К – контроль, время 0 ч); Lon-dHI(CC) – 12 мкМ; Lon-d(CC) – 12 мкМ. М – маркеры.

приводят к частичному восстановлению аллостерического взаимодействия АТР-азного и протеолитического центров фермента, утраченного в результате делеции СС-участка.

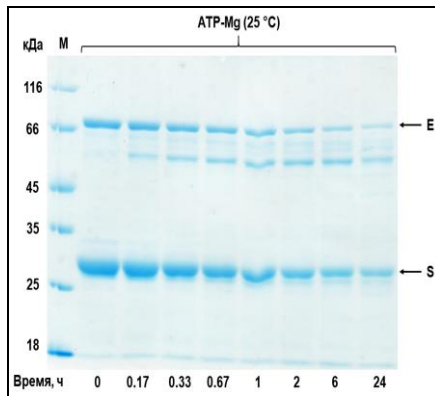
Укороченные формы Ec-Lon (Lon-d106 и Lon-d172) также способны гидролизовать белковые субстраты, причем, степень превращения субстрата зависит от

наличия и природы эффектора (рис. 70 А, 71). При этом по скорости гидролиза белка-мишени эти формы Ec-Lon заметно превосходят делеционные формы (ср. с рис. 68), что согласуется с более высокой эффективностью функционирования их каталитических центров – АТР-азного и, в особенности, пептидазного (табл. 12 и 17).

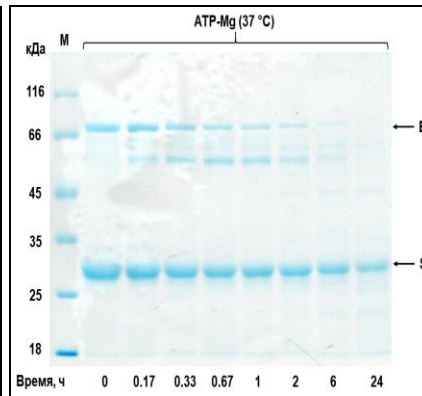
А



Б



В



Г

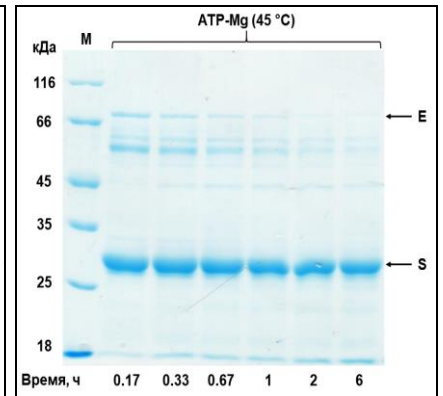


Рисунок 70. Влияние эффекторов на гидролиз казеина укороченной формой Lon-d106 (электрофорез в 10 % ПААГ).

Условия эксперимента: буфер GFB; температура – 37 °С (А и В), 25°С (Б) и 45°С (Г); концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β-казеин (S) – 0.5 мг/мл; Lon-d106 – 2.2 мкМ. М – маркеры.

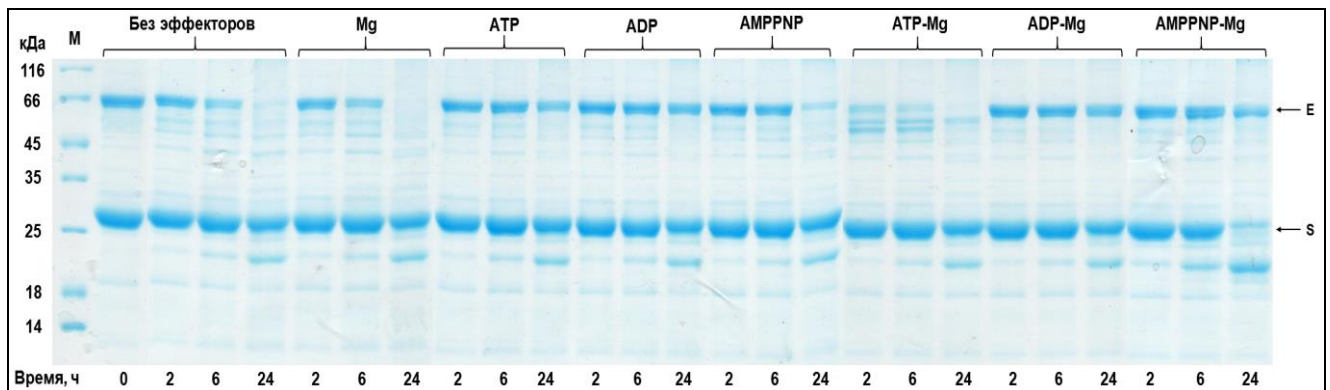


Рисунок 71. Влияние эффекторов на гидролиз β-казеина укороченной формой Lon-d172 (электрофорез в 12 % ПААГ).

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β-казеин (S) – 0.5 мг/мл; Lon-d172 – 2.8 мкМ. М – маркеры.

Протеолитические свойства формы Lon-d106, способной, как и Ec-Lon, формировать гексамерные структуры (см. Раздел 5.4), в целом, подобны свойствам интактной Ec-Lon-протеазы: укороченный фермент эффективно гидролизует казеин по процессивному механизму в присутствии комплекса АТФ-Mg и по неprocessивному – в присутствии АМРРNP-Mg. Кроме того, слабая протеолитическая активность Lon-d106 наблюдается также при наличии ионов Mg^{2+} (рис. 70 А). Форма Lon-d172, лишенная N-домена и N-концевого фрагмента ($E^{124}-H^{172}$) HI(CC)-домена, гидролизует белок только неprocessивно и в присутствии любых эффекторов, однако ее максимальная активность проявляется при наличии комплекса АМРРNP-Mg (рис. 71). При этом для каждой формы обнаруживаются условия, при которых процесс протеолиза сопровождается автолизом, что свидетельствует о пониженной конформационной стабильности обеих укороченных форм.

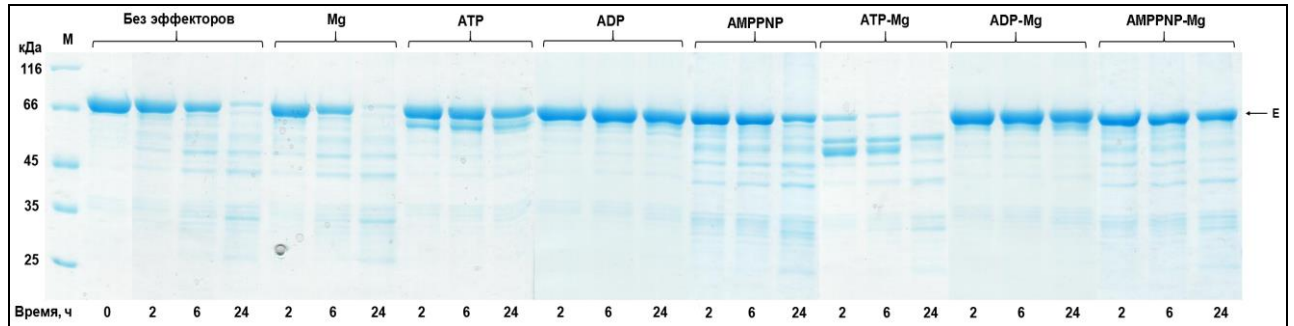
Сохранение способности к процессивному протеолизу в условиях сопряжения с гидролизом АТФ является уникальным свойством формы Lon-d106, отличающим ее как от укороченных форм Lon-d172 и Lon-d234, так и от делеционных форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC). Вместе с тем, следует признать, что данные рис. 70 А недостаточно очевидны для такого утверждения. Однако из этого же рисунка следует, что в выбранных условиях укороченная форма Lon-d106 подвергается наиболее интенсивному автолизу, и этот фактор становится определяющим при гидролизе белка-субстрата.

Processивный характер протеолиза, осуществляемого Lon-d106-протеазой, однозначно подтверждается проведением реакции гидролиза казеина при 25 °С (рис. 70 Б), где автолиз фермента сильно замедлен. С другой стороны, повышение температуры до 45 °С приводит к значительному ускорению автолиза Lon-d106 и к практически полной утрате ферментом протеолитической активности (рис. 70 Г). Таким образом, температура среды оказывает существенное влияние на соотношение скоростей автолиза и гидролиза казеина, характеризующих укороченный фермент. Следует заметить, что для полноразмерной Ec-Lon-протеазы температурный оптимум протеолиза детектирован при 37 °С, при этом в изучаемом температурном и временном интервале никаких признаков самодеградации интактного фермента не наблюдается (рис. 66 А).

Обнаруженное сохранение формой Lon-d106 способности к процессивному гидролизу белковой мишени на фоне интенсивного автолиза свидетельствует о том, что N-домен Ec-Lon-протеазы не участвует в реализации механизма процессивного протеолиза, но обеспечивает конформационную стабильность фермента в классических условиях его функционирования (при сопряжении протеолиза с гидролизом АТФ).

Собственно автолиз укороченных форм Ec-Lon зависит от наличия/отсутствия эффекторов и происходит с относительно высокими скоростями (рис. 72А, Б), приводя к образованию существенно меньшего набора продуктов расщепления, чем в случае автолиза делеционных форм (ср. с рис. 69).

А Lon-d106



Б Lon-d172

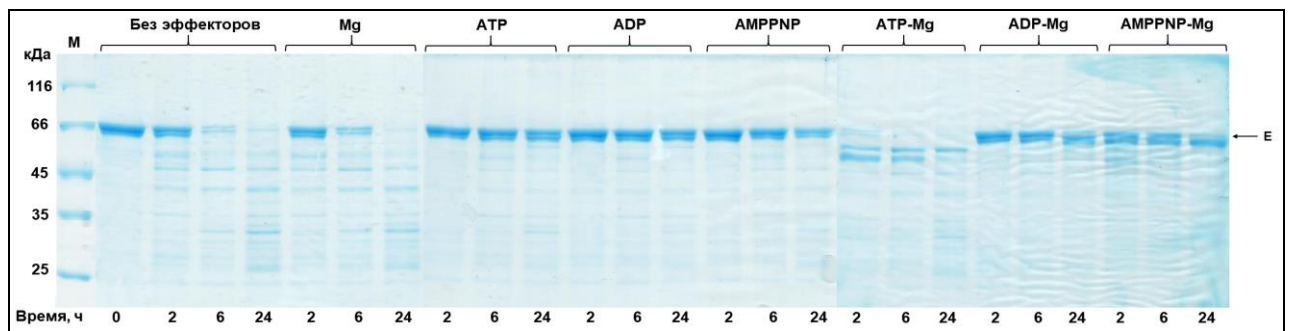


Рисунок 72. Автолитическая активность укороченных форм Lon-d106 (А) и Lon-d172 (Б) (электрофорез в 10 % ПААГ).

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Lon-d106 – 6.5 мкМ, Lon-d172 – 4.3 мкМ. М – маркеры.

Подобно интактному ферменту формы Lon-d106 и Lon-d172 подвергаются автолизу в отсутствие нуклеотидов со скоростями, соизмеримыми со скоростью автолиза Ec-Lon-протеазы. Однако максимальный уровень самодеградации укороченных форм наблюдается в присутствии комплекса ATP-Mg, который по отношению Ec-Lon, напротив, проявляет стабилизирующее действие (рис. 68 А). При этом обе укороченные формы образуют 1-2 основных стабильных промежуточных фрагмента с высокой Мм. В этих условиях время полудеградациии формы Lon-d106 составляет всего 10 мин после начала инкубации реакционной смеси (рис. 72 А). С таким же временем происходит 50 %-ное расщепление формы Lon-d172 (рис. 72 Б), и около 20 мин определено для образования первого промежуточного продукта при автолизе формы Lon-d234 [170]. Именно автолитическим расщеплением объясняются наблюдаемые в эксперименте низкие степени

превращения белкового субстрата при его гидролизе укороченными формами *Ec*-Lon-протеазы в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ.

Ряд сайтов самодеградации в интактной *Ec*-Lon-протеазе и в ее модифицированных формах был определен с помощью N-концевого секвенирования стабильных фрагментов автолиза. Эта часть работы была проведена совместно с Учебно-Научным Центром ИБХ (руководитель – проф. Т.В. Овчинникова). Показано (рис. 73, табл. 19), что для всех форм фермента (кроме Lon-d172) сайты автолиза соответствуют «химотрипсиноподобной» специфичности Lon-протеазы: расщеплению подвергаются связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных (Leu, Ala, Phe, Met) или полярных незаряженных (Thr, Ser, Cys) аминокислот [173].

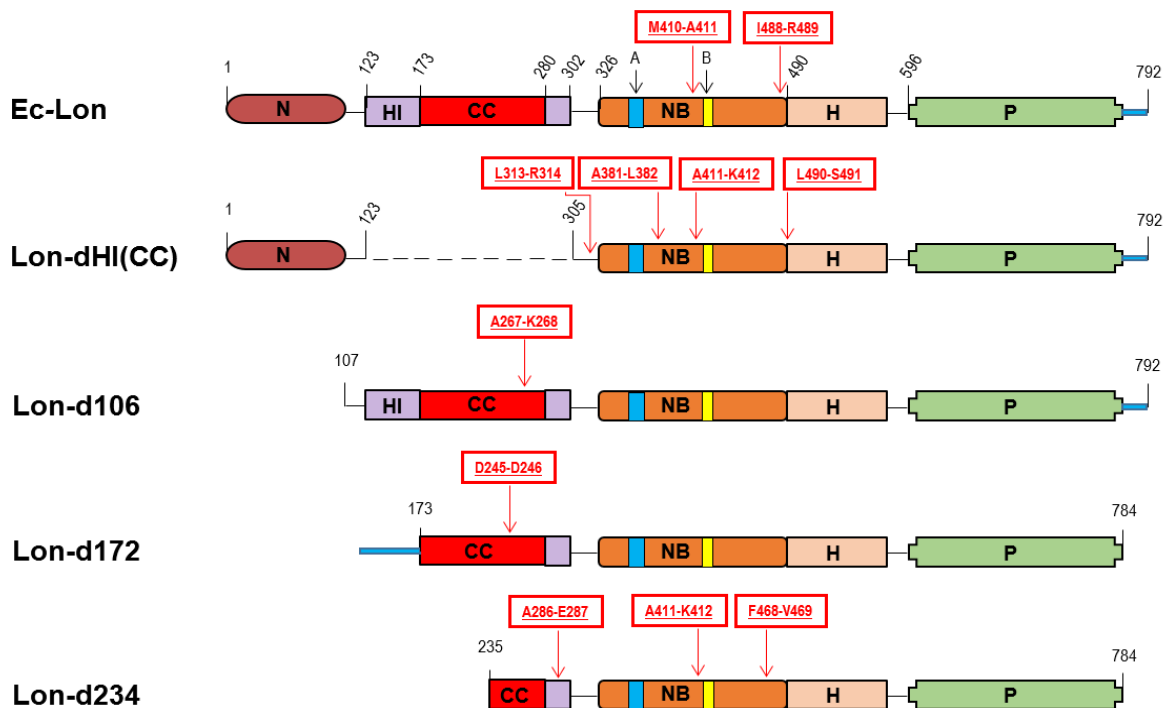


Рисунок 73. Локализация сайтов автолиза в интактной *Ec*-Lon-протеазе и ее модифицированных формах.

В полноразмерном ферменте, автолиз которого происходит исключительно в отсутствие нуклеотидных эффикторов, центры самодеградации локализованы в NB-домене – между мотивами Уолкера (в области петли GYVG), а также вблизи границы с H-доменом (табл. 19). Эти данные согласуются с результатами ограниченного протеолиза *Ec*-Lon-протеазы [105], согласно которым при отсутствии нуклеотидов доступным действием химотрипсина оказывается прежде всего AAA⁺-модуль фермента. В этих же условиях форма Lon-dHI(CC) расщепляется по связям, смещенным на один или два

остатка от связей в интактном ферменте, и кроме того, дополнительно по связям, расположенным в N-концевой части GYVG-петли и в предстоящем NB-домену линкере-2 (табл. 19). Множественность центров деградации Lon-dHI(CC) подтверждает сделанное выше заключение о пониженной стабильности делеционных форм Ec-Lon-протеазы.

Таблица 19. Стабильные фрагменты автолитического расщепления Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм

Форма фермента	Мм, кДа	Эффектор	Время инкубации	Фрагмент		Локализация сайта автолиза (см. рис. 40)
				Мм, кДа	Расщепл. связь	
Ec-Lon	88.5	Без эффекторов	36 ч	42.0	M410-A411	NB-домен, GYVG-loop (C-term)
				33.4	I488-R489	Граница NB и H-доменов
Lon-dHI(CC)	67.5	Mg	48 ч	52.7	L313-R314	Linker 2, helix α 11
				45.2	A381-L382	NB-домен, GYVG-loop (N-term)
				41.9	A411-K412	GYVG-loop (C-term)
				33.2	L490-S491	Граница NB и H-доменов
Lon-d106	76.8	АТР-Mg	45 мин	57.7	A267-K268	СС-участок, helix α 9
Lon-d172	70.5	АТР-Mg	20 мин	59.3	D245-D246	СС-участок, helix α 7 (C-term)
Lon-d234*	60.8	Mg	12 ч	41.9	A411-K412	NB-домен, GYVG-loop (C-term)
				34.8	F468-V469	RKH-loop (C-term)
		АТР-Mg	1 ч	54.8	A286-E287	HI(CC)-домен, helix α 10
				54.8	A286-E287	HI(CC)-домен, helix α 10
			12 ч	41.9	A411-K412	NB-домен, GYVG-loop (C-term)
				34.8	F468-V469	RKH-loop (C-term)

* – данные работы [170].

Крайне нестабильные в присутствии комплекса АТР-Mg укороченные формы Lon-d106 и Lon-d172 в процессе интенсивного автолиза образуют промежуточные фрагменты путем расщепления связей, локализованных в СС-участках их HI(CC)-доменов (табл. 19). У значительно более стабильной формы Lon-d234 кроме первичного сайта автолиза в С-концевой спирали HI(CC)-домена (табл. 19) обнаружены также сайты расщепления в петлях GYVG и RKH NB-домена [170]. Полученные результаты можно рассматривать как указание на менее компактную укладку AAA⁺-модуля в укороченных формах по сравнению с интактным ферментом. С этим заключением хорошо согласуются данные

микрокалориметрического анализа (Раздел 5.5), свидетельствующие о том, что форма Lon-d106-679 менее стабильна, чем полноразмерная Lon-S679A-протеаза.

Из представленных данных следует, что любые делеции в N-концевой области Ec-Lon-протеазы неизбежно приводят к конформационным изменениям, проявляющимся в снижении устойчивости фермента к самодеградации. При этом различие первичных сайтов автолиза в модифицированных формах свидетельствует о том, что разные делеции вызывают различающиеся конформационные изменения в Ec-Lon.

Мутантные по N-концевой области формы Ec-Lon-протеазы подобно интактному ферменту в отсутствие нуклеотидных эффекторов не проявляют протеолитической активности. Исключение составляет тройной мутант Lon^{EKR}, непротессивно гидролизующий казеин в этих условиях. Однако при сопряжении протеолиза с гидролизом АТФ все эти мутанты деградируют белковый субстрат, как и Ec-Lon по процессивному механизму (рис. 74). Эти результаты свидетельствуют о том, что формы с точечными мутациями, несмотря на конформационные изменения в их N-концевых областях, сохраняют, как и укороченная форма Lon-d106, способность формировать бочкообразные структуры, необходимые для реализации процессивного протеолиза. При этом активность мутантных форм возрастает в ряду:

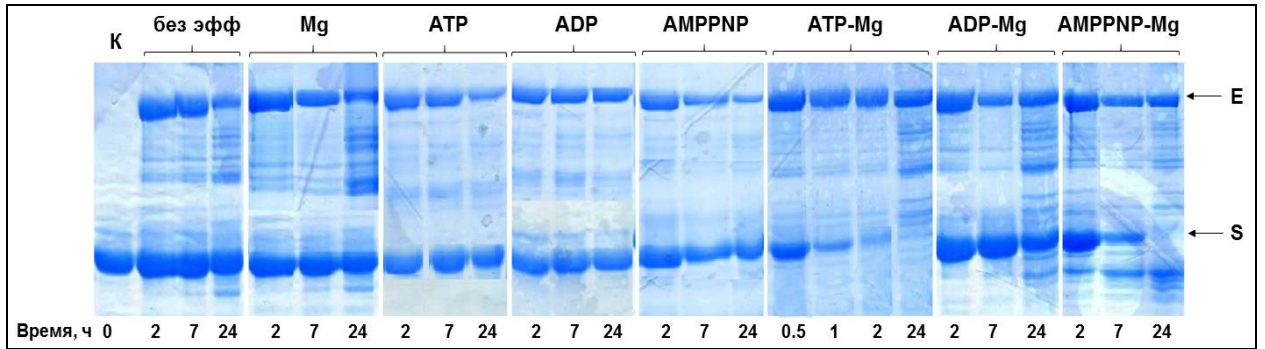
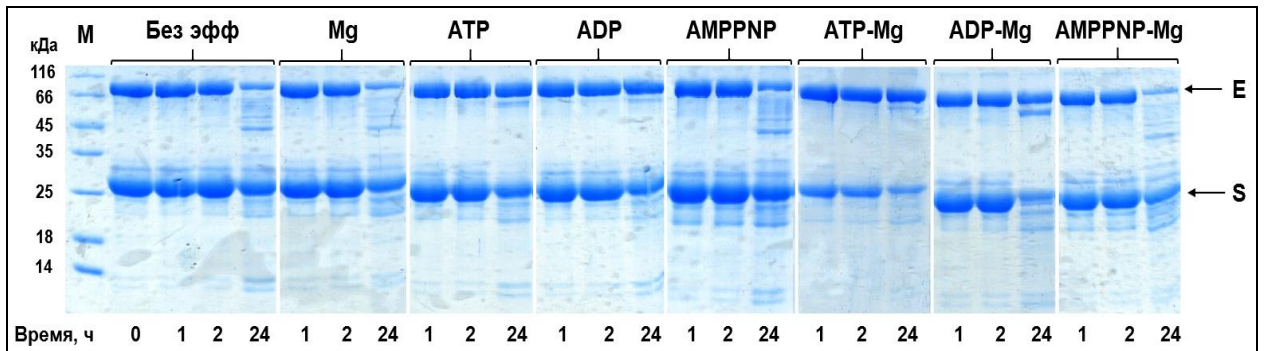
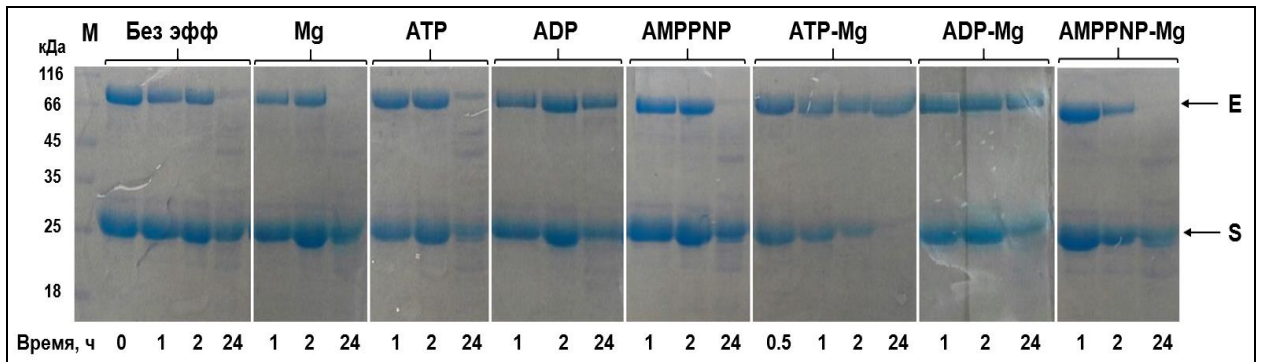
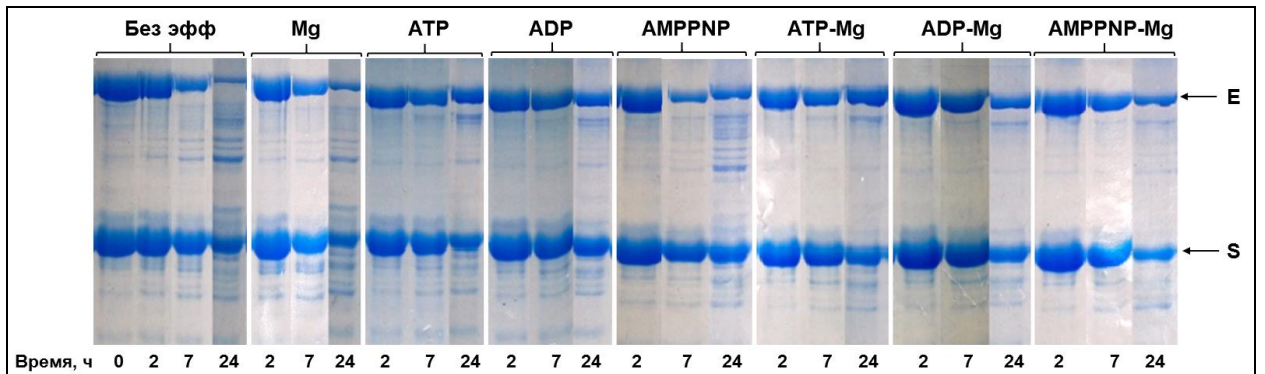


Интересно, что наименее активным оказался мутант Lon-R192A, несмотря на то, что его пептидазный и АТФ-азный центры по эффективности заметно превалируют над соответствующими центрами других, протеолитически более активных мутантов (см. табл. 12 и 17): для сравнения ниже приведены ряды мутантных форм, выстроенные согласно их пептидазной активности в присутствии АТФ-Mg (I) и АТФ-азной активности в присутствии белкового субстрата (II):



Из представленных данных следует, что мутант Lon-R192A испытывает затруднения при связывании казеина, то есть можно полагать, что локализованный в начале «длинной спирали» $\alpha 7$ фрагмент СС-области HI(СС)-домена, включающий остаток Arg¹⁹², участвует во взаимодействии с белковым субстратом.

Характерный для Ec-Lon-протеазы непротессивный гидролиз казеина в присутствии комплекса АМРРNP-Mg (рис. 66А) обнаружен у двух мутантных форм – Lon-R164A и Lon^{EKR} (рис. 74), но их активность значительно понижена в сравнении с активностью интактного фермента. Очень слабый протеолиз наблюдается также у форм

A Lon-R164A**Б Lon-R192A****В Lon-Y294A****Г Lon-R542A**

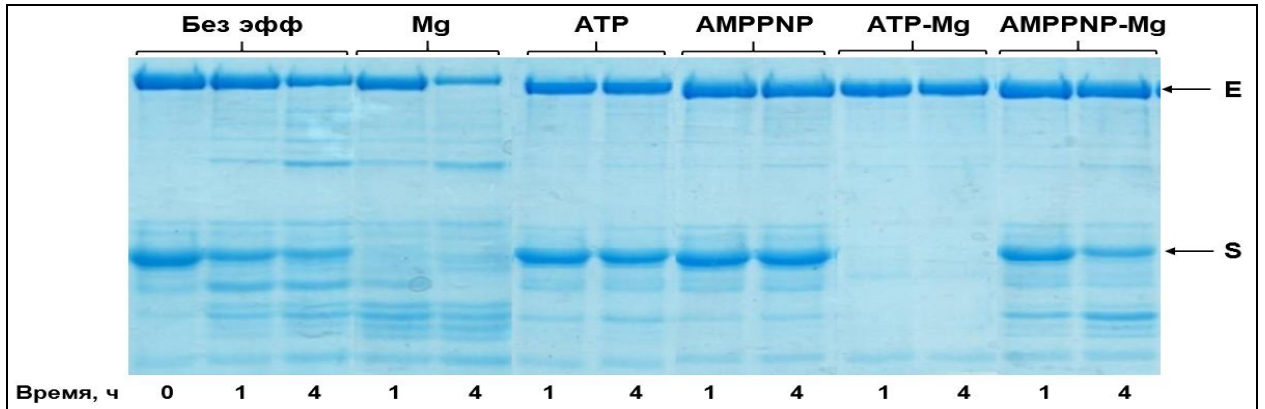
Д Lon^{EKR}

Рисунок 74. Протеолитическая активность мутантных форм Ec-Lon-протеазы (электрофорез в 10 % ПААГ).

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °C; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β-казеин (S) – 0.5-1.0 мг/мл; Lon-R164A – 10 мкМ; Lon-R192A – 5.0 мкМ; Lon-Y294A – 5.1 мкМ; Lon-R542A – 16 мкМ; Lon^{EKR} – 5.1 мкМ. М – маркеры; К – контроль казеина.

Lon-R192A и Lon-Y294A. Интересно отметить, что заметный протеолиз в этих условиях обнаруживает *мутант по H-домену Lon-R542A*, не обладающий АТР-азной активностью и не проявляющий выраженной протеолитической активности ни в присутствии АТР-Мg, ни в отсутствие нуклеотидов, несмотря на максимальную базовую эффективность его пептидазного центра (табл. 17). Эти данные в очередной раз показывают, что процессивный гидролиз белкового субстрата Ec-Lon-протеазой реализуется только в условиях динамической активации протеолитического центра за счет гидролиза АТР в АТР-азном центре фермента.

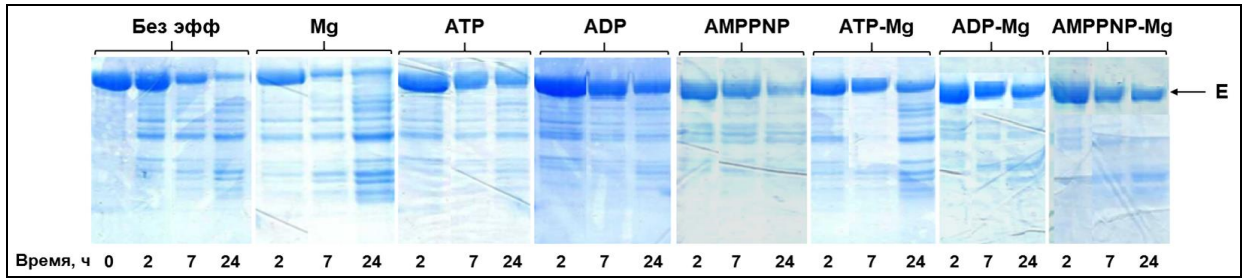
По сравнению с делеционными и укороченными формами мутанты Ec-Lon, в целом, остаются более стабильными в процессе гидролиза белкового субстрата (рис. 74). Повышенный уровень автолиза в отсутствие нуклеотидных эффекторов отмечен у тройного мутанта Lon^{EKR}, а также у форм Lon-R164A и Lon-R192A. Кроме того, две последние формы, наряду с мутантом Lon-R542A, подвержены слабому автолизу при наличии АМРРNP или комплекса АМРРNP-Mg (рис. 74).

Собственно автолитическое расщепление мутантных форм Ec-Lon-протеазы наблюдается, главным образом, в отсутствие нуклеотидов (рис. 75), при этом эффективность автолиза возрастает в ряду:

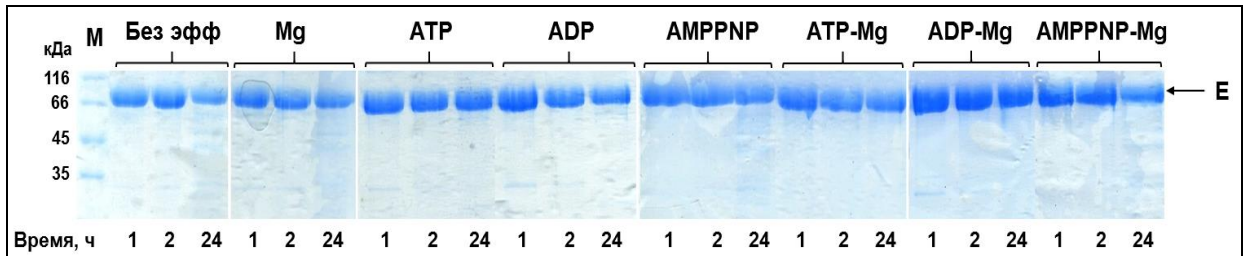


Наличие нуклеотид-магниевых комплексов стабилизирует формы Lon^{EKR} и Lon-R542A подобно интактному ферменту. В то же время в присутствии АМРРNP-Mg

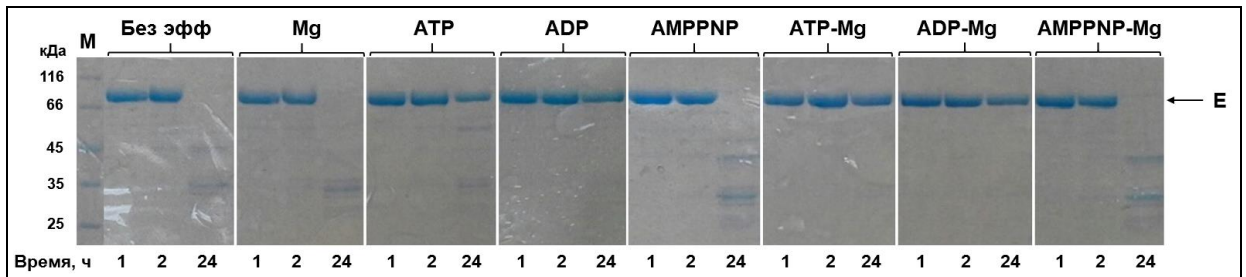
А Lon-R164A



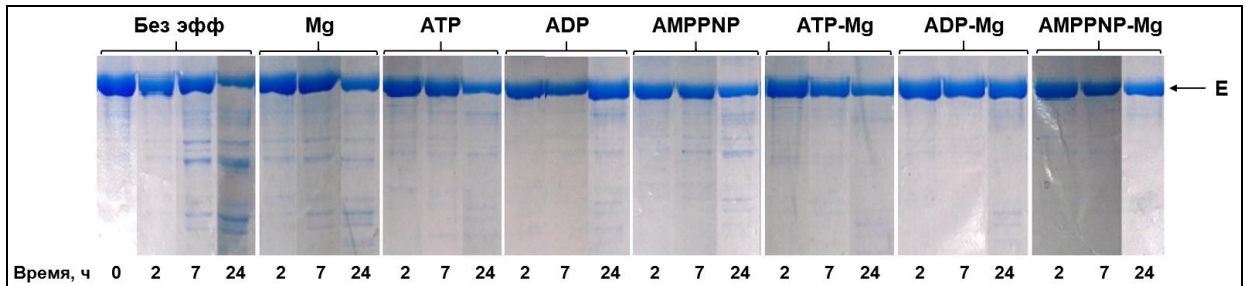
Б Lon-R192A



В Lon-Y294A



Г Lon-R542A



Д Lon^{EKR}

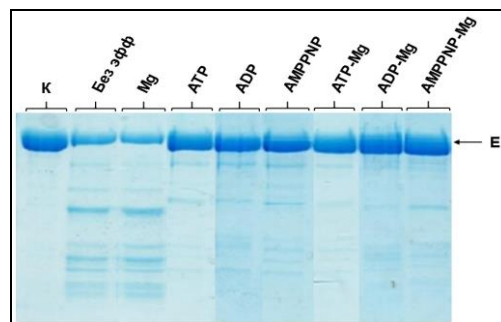


Рисунок 75. Автолиз мутантных форм Ес-Lon-протеазы (электрофорез в 10 % ПААГ).

Условия эксперимента: буфер GFB; 37°C; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; Lon-R164A – 10 мкМ; Lon-R192A – 5.0 мкМ; Lon-Y294A – 5.1 мкМ; Lon-R542A – 16 мкМ; Lon^{EKR} – 13 мкМ (24 ч). М – маркеры; К – контроль фермента (0 ч).

слабому автолизу подвергаются мутанты Lon-R164A и Lon-Y294A, а в присутствии АТФ-Mg автолизуется только форма Lon-R164A. Единственным мутантом, который не проявляет в отсутствие белкового субстрата выраженной склонности к автолизу ни при каких условиях, является форма Lon-R192A (рис. 75).

Из сопоставления рис. 74 и 75 видно, что присутствие казеина мало влияет на автолитические свойства модифицированных форм Ес-Lon-протеазы: при некоторых условиях (наличие/отсутствие определенных нуклеотидных эффекторов) белковый субстрат может проявлять активирующее (при автолизе форм Lon-R192A и Lon^{ЕКR}) или ингибирующее (автолиз формы Lon-R164A) действие. В случае форм Lon-Y294A и Lon-R542A казеин незначительно влияет на автолиз.

Таким образом, из всех мутантных форм Ес-Lon-протеазы наиболее близким к интактному ферменту по эффективности протеолиза и по влиянию эффекторов на деградацию белка-субстрата оказался тройной мутант Lon^{ЕКR}. Этот же мутант наиболее сходен с Ес-Lon и в отношении автолитического расщепления. Вместе с тем, из представленных результатов следует, что введение замен Glu34Ala, Lys35Ala и Arg38Ala приводит к некоторому изменению конформационного состояния фермента, которое проявляется в реализации Lon^{ЕКR}-мутантом свойств, нехарактерных для интактной Ес-Lon, а именно – проявления протеолитической и автолитической активности в отсутствие нуклеотидных эффекторов.

Подытоживая результаты изучения протеолитической активности Ес-Lon-протеазы и ее модифицированных форм, прежде всего надо отметить, что наряду с интактным ферментом классический эффективный процессивный гидролиз белкового субстрата способны осуществлять подвергающаяся интенсивному автолизу укороченная форма Lon-d106 и устойчивые к самодеградации мутанты по N-концевой области фермента (табл. 20).

Степень гидролиза белка формами Lon-dHI(CC), Lon-d(CC) и Lon-d172 оказалась исключительно низкой, а механизм – непроцессивным. Эти данные согласуются с результатами изучения АТФ-азной активности модифицированных форм Ес-Lon (табл. 12), согласно которым именно у форм Lon-dHI(CC), Lon-d(CC) и Lon-d172 нарушено связывание белкового субстрата и утрачено аллостерическое взаимовлияние протеолитического и АТФ-азного центров.

Вместе с тем полученные результаты показывают, что инсерционный HI(CC)-домен играет важнейшую роль в структуре Ес-Lon-протеазы: он необходим не только для корректного связывания белка-субстрата и для его гидролиза, но и для реализации характеристического для АТФ-зависимых протеаз процессивного механизма протеолиза.

Таблица 20. Сопоставление данных по влиянию эффекторов на протеолитическую активность модифицированных и мутантных форм *EcLon*-протеазы

Эффектор	T ₅₀ – время 50%-ной деградации казеина*									
	Формы <i>EcLon</i> -протеазы**									
	<i>EcLon</i>	dHI(CC)	d(CC)	d106	d172	R164A	R192A	Y294A	R542A	Lon ^{EKR}
—	0	>24 ч (н/пр)	>24 ч (н/пр)	0	>24 ч (н/пр)	0	>>24 ч* (н/пр)	0	0	3.5 ч (н/пр)
АТР-Mg /межцентр. взаимод./	<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) /+/	0 /–/	<10 мин (пр) /++++/
АМРPNP-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)	6.5 ч (н/пр)	2 ч (н/пр)

* – В скобках указан механизм протеолиза: процессивный (красный цвет) или непроцессивный (черный цвет);

** – формы *EcLon*-протеазы см. в подписи к табл. 12;

Фоновым цветом показан уровень сопровождающего автолиза: низкий уровень – голубой, средний – светло-зеленый, высокий – желтый; обозначения «+» и «–» отражают соответственно наличие или отсутствие межцентральных взаимодействий в ферментах.

Основная роль N-концевого домена заключается в сохранении конформационной стабильности *EcLon*-протеазы при сопряженном функционировании ее протеолитического и АТР-азного центров.

5.7. Взаимодействие *EcLon*-протеазы и её модифицированных форм с нуклеиновой кислотой

Из литературного обзора следует, что *LonA*-протеазы, в отличие от других AAA⁺-пептидгидролаз СКК, обладают способностью связывать ДНК [122, 174]. Сведения о влиянии образования комплексов *Lon*-ДНК на функциональные свойства ферментов отрывочны и противоречивы [175, 176]. Вместе с тем, взаимодействие с ДНК рассматривается как важная дополнительная биохимическая характеристика полифункциональных *Lon*-протеаз [121].

Ранее для *EcLon*-протеазы было обнаружено [121], что фермент может связывать TG-богатые промотерные элементы ДНК. В то же время было показано, что в отличие от бактериальных ферментов *Lon*-протеаза человека связывает преимущественно одноцепочечные TG-богатые и G-квадруплексные последовательности ДНК, а также UG-богатые фрагменты РНК [177, 178]. Аналогичные свойства проявляет *Lon*-протеаза мыши [179].

В ходе начальных исследований *EcLon*-протеазы было выдвинуто предположение о том, что ДНК может связываться с потенциальной coiled-coil-зоной в N-концевой области

фермента [180]. Авторы работы [108] исследовали взаимодействие плазмидной ДНК (pET21a) с близким аналогом *EcLon* – Lon-протеазой *Brevibacillus thermoruber* (*BtLon*) и ее фрагментами и выявили Н-домен AAA⁺-модуля в качестве ДНК-связывающей области фермента. В дальнейшем было показано, что Н-домен *BtLon* эффективно связывает также дуплексную нуклеотидную последовательность 5'-CTGTTAGCGGGC-3' (*ms1*) [124]. Однако одновременно выяснилось, что аффинность высокомолекулярных Н-доменов других Lon-протеаз к *ms1* либо значительно понижена (фермент из *Bacillus subtilis*, *BsLon*), либо исчезающе мала (*EcLon*). То есть Н-домены не являются специфическими областями связывания ДНК для общего пула Lon-протеаз.

В самое последнее время появились данные [126], согласно которым ДНК-связывающей областью *EcLon* может служить AAA⁺-модуль фермента. При этом был выявлен ряд остатков, локализованных в NB-домене и в линкере-2 (рис. 41), которые, как полагают, могут быть вовлечены во взаимодействие с плазмидной ДНК (фрагмент плазмиды pUC19). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о том, что полифосфаты и фрагменты ДНК способны связываться с фрагментом (Leu³²⁰–Ala⁴³⁷), включающим 2/3 последовательности NB-домена *EcLon*-протеазы [181].

Таким образом, следует констатировать, что до настоящего времени среди исследователей не сложилось однозначного представления ни о специфичности связывания ДНК с Lon-протеазами, ни о сайтах взаимодействия ферментов с нуклеиновыми кислотами, ни о взаимовлиянии связывания ДНК и реализации энзиматических функций.

Основываясь на том, что другие АТР-зависимые протеазы системы контроля качества клеточных белков не обладают ДНК-связывающими свойствами [122] и в то же время не содержат характеристического для LonA-протеаз инсерционного HI(CC)-домена, можно было ожидать, что именно HI(CC)-домен вовлечен в связывание нуклеиновой кислоты. В связи с этим в настоящей работе было проведено изучение ДНК-связывающей способности *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм с целью возможного выявления потенциальных участков фермента с повышенной аффинностью к нуклеиновым кислотам.

На начальном этапе работы была проведена оценка содержания нуклеиновой кислоты в выделяемых препаратах *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм. Связанную с ферментами эндогенную нуклеиновую кислоту (eNA) выделяли из препаратов белка методом фенол-хлороформной экстракции. Путем обработки полученных экстрактов неспецифической нуклеазой (бензоназа из *Serratia marcescens*) или РНК-азой А установлено, что и интактный фермент и его модифицированные формы

выделяются из клеток *E. coli* в виде комплексов с ДНК. Электрофорезом в агарозном геле показано, что все формы Ес-Lon содержат фрагменты еNA размером 150-200 пар оснований (рис. 76 – продемонстрировано на примере Ес-Lon и Lon-dHI(CC)). Содержание еNA в препаратах Ес-Lon-протеазы, определенное по соотношению оптического поглощения (A_{260}/A_{280}), не превышало 5%.

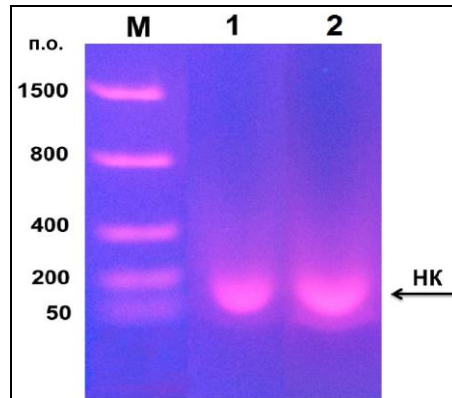


Рисунок 76. Образцы фенол-хлороформных экстрактов Ес-Lon-протеазы (1) и Lon-dHI(CC) (2).
М – маркеры; НК – нуклеиновая кислота; п.о. – пар оснований.

Для выявления влияния связанной еNA на функционирование Ес-Lon-протеазы проведено сопоставление АТФ-азной, пептидазной и протеолитической активностей интактной Ес-Lon и препарата фермента, лишённого еNA (d-eNA-Lon). При выделении последнего был использован экстракт продуцента Ес-Lon-протеазы, обработанный бензоной.

Показано, что фермент, утративший еNA, проявляет значительно пониженную (в 3.4 раза) в сравнении с Ес-Lon базовую АТФ-азную активность (рис. 77, 1). При этом форма d-eNA-Lon сохраняет способность интактного фермента к активации АТФ-азной функции при наличии белка-субстрата (рис. 77, 1, 2). Отличительной характеристикой d-eNA-Lon служит слабая зависимость скорости гидролиза АТФ от молярного соотношения концентраций нуклеотида и ионов Mg^{2+} (рис. 77, пары (1, 3) и (2, 4)).

В отношении пептидазной активности установлено, что форма d-eNA-Lon как и интактная Ес-Lon способна к гидролизу модельного пептидного субстрата Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (ПерТВЕ). При этом базовая активность пептидазного центра d-eNA-Lon и влияние на нее ионов магния мало отличаются от соответствующих характеристик Ес-Lon-протеазы (табл. 21). Однако нуклеотид-магниевые комплексы АТФ-Mg и АМPPNP-Mg, оказывающие значительное активирующее воздействие на интактный фермент, являются весьма умеренными активаторами формы, утратившей эндогенную нуклеиновую кислоту (табл. 21).

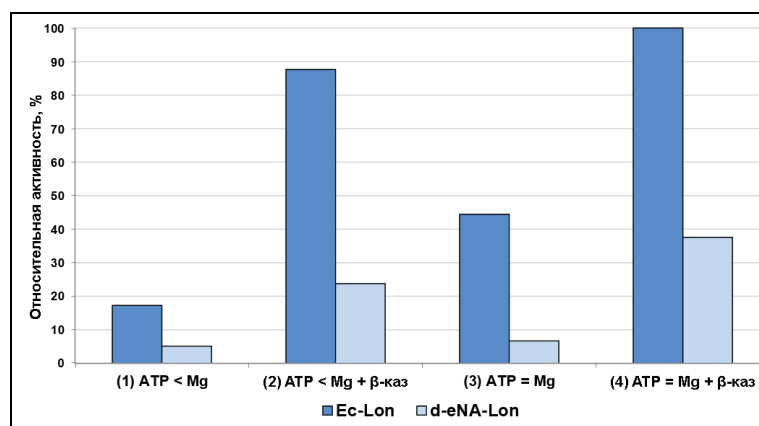


Рисунок 77. Относительная АТР-азная активность Ec-Lon-протеазы и d-eNA-Lon.

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: АТР – 2.5 мМ; MgCl₂ – 2.5 (3, 4) или 20 мМ (1, 2); β-казеин – 0.5 мг/мл (1, 4); фермент – 0.5 мкМ.

Таблица 21. Относительная пептидазная активность Ec-Lon и d-eNA-Lon (%)

Фермент	Эффектор							
	—		Mg ²⁺		АТР-Mg		АМРРNP-Mg	
	%	n*	%	n*	%	n*	%	n*
Ec-Lon	7.90	1.00	17.7	2.23	100	12.6	88.3	11.2
d-eNA-Lon	8.80	1.00	17.8	2.02	20.7	2.35	26.3	2.99

* n – степень активации базовой пептидазной активности.

Условия эксперимента: буфер GFB; 10 % DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37 °С; концентрации: 0.1 мМ ПерТВЕ; 0.1 мкМ фермент; Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ.

В отличие от интактной Ec-Lon-протеазы форма d-eNA-Lon расщепляет белковый субстрат только в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТР (процессивный механизм) и практически не проявляет протеолитической активности в присутствии комплекса АМРРNP-Mg (рис. 78). По скорости гидролиза казеина d-eNA-Lon примерно вдвое уступает интактной Ec-Lon-протеазе (ср. рис. 66 и 78). В отсутствие эффекторов или при наличии ионов магния форма d-eNA-Lon подвергается медленному автолизу, который по эффективности мало отличается от автолиза интактного фермента (данные не приведены).

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

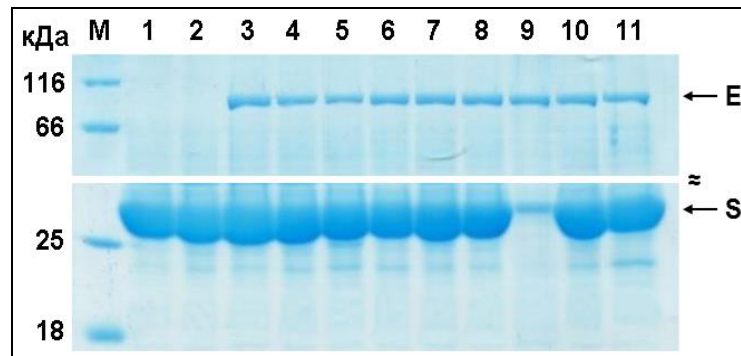


Рисунок 78. Протеолитическая активность d-eNA-Lon-протеазы (электрофорез в 10 % ПААГ).

Условия эксперимента: буфер GFB; 37 °С; концентрации: Nu – 2.5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β-казеин (S) – 1 мг/мл; d-eNA-Lon (E) – 2.3 мкМ. Время реакции 3 ч. М – маркеры, 1, 2 – контроль S (0 и 3 ч), 3 – контроль (фермент, казеин, 0 ч); Эффекторы: 4 – отсут., 5 – Mg²⁺, 6 – АТФ, 7 – АДР, 8 – АМРРNP, 9 – АТФ-Mg, 10 – АДР-Mg, 11 – АМРРNP-Mg.

Как упоминалось выше, препараты Ес-Lon-протеазы способны образовывать комплексы с добавленной (экзогенной) нуклеиновой кислотой (exNA). В связи с этим на следующем этапе работы было изучено влияние exNA на энзиматические характеристики Ес-Lon-протеазы.

В качестве модельных экзогенных нуклеиновых кислот были использованы одноцепочечная и дуплексная формы синтетического 36-членного олигонуклеотида (олигоNu, 5'-GATCCAGCTATACTTGGTCAGGGCGAATTCTAACTA-3'), который, как предполагалось в работах [121 и 127], обладает высокой специфичностью к Ес-Lon-протеазе, а также плазмидный вектор рЕТ28а (5369 п.о.).

Изучение влияния олигонуклеотидов на функции Ес-Lon-протеазы проводили при оптимальном молярном соотношении фермент : олигоNu, равном 1 : 10 (определено экспериментально).

В отношении АТФ-азной активности показано, что при эквимольных концентрациях АТФ и ионов Mg²⁺ одноцепочечная форма олигонуклеотида (ss-olig) оказывает слабое ингибирующее (в 1.5 раза) действие на гидролиз АТФ Ес-Lon-протеазой (рис. 79 А). Влияния двухцепочечного олигоNu (ds-olig) на функционирование АТФ-азного центра Ес-Lon в этих условиях обнаружено не было.

Базовая пептидазная активность Ес-Lon-протеазы также снижается под действием формы ss-olig, в то время как присутствие дуплексной формы ds-olig, напротив, приводит к двукратному возрастанию скорости гидролиза пептидного субстрата (рис. 79 Б). Характер влияния ss-olig и ds-olig на фермент сохраняется и в условиях аллостерической активации пептидазного центра комплексом АТФ-Mg (рис. 79 Б). Эффективного воздействия олигонуклеотидов на протеолитическую активность Ес-Lon-протеазы не наблюдалось.

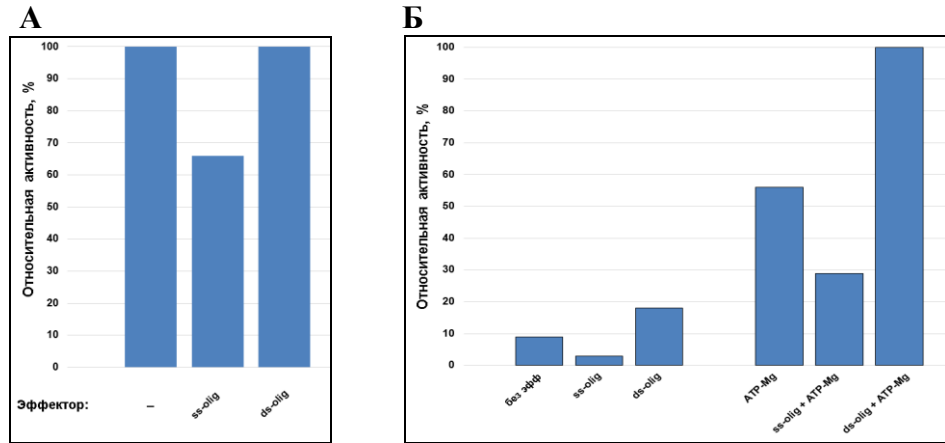


Рисунок 79. Влияние олигоNu на АТФ-азную (А) и пептидазную (Б) активности *Ec-Lon*-протеазы.

Условия экспериментов: буфер GFB; 37 °С. Концентрации: (А) АТФ – 2.5 мМ; MgCl₂ – 2.5 мМ; фермент – 0.5 мкМ; олигоNu – 10 мкМ; (Б) РерТВЕ – 0.1 мМ; DTDP – 0.2 мМ; DMSO – 10 %; АТФ – 2.5 мМ, MgCl₂ – 2.5 мМ, фермент – 0.1 мкМ, олигоNu – 1.0 мкМ.

Полученные результаты, в целом, подтверждают известные из литературы данные об активирующем действии двухцепочечных олигонуклеотидов на бактериальные *Lon*-протеазы.

С целью выявления потенциальных участков фермента, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, была исследована способность *Ec-Lon*-протеазы и ее укороченных и делеционных форм к связыванию плазмидной ДНК рЕТ28а. Образование комплексов белок-ДНК детектировали методом GMSA (Gel Mobility Shift Assays) [108]. Показано, что инкубация интактного фермента с ДНК при молярных соотношениях *Ec-Lon* : рЕТ28а \geq 1000 : 1 приводит к изменению подвижности нуклеиновой кислоты в агарозном геле вследствие образования комплексов *Ec-Lon*-рЕТ28а (рис. 80). В контрольном эксперименте установлено, что с модельным белком β -казеином рЕТ28а не взаимодействует (рис. 80).

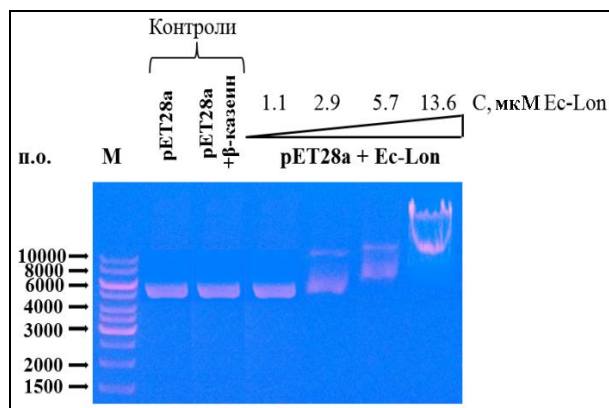


Рисунок 80. ДНК-связывающая способность *Ec-Lon*-протеазы.

Условия эксперимента: 20 мМ Трис-НСl-буфер, pH 7.5; 60 мМ NaCl; 25 °С; рЕТ28а – 2.8 нМ; β -казеин – 12 мкМ. М – маркеры; п.о. – пар оснований.

Взаимодействие модифицированных форм Eс-Lon-протеазы с рЕТ28а изучали в условиях выявленного оптимального диапазона соотношения их концентраций. Ожидалось, что фермент, который утратил фрагмент последовательности, обладающий высоким сродством к ДНК, потеряет способность к связыванию рЕТ28а. Однако оказалось, что и делеционная и укороченные формы Eс-Lon образуют комплексы с плазмидной нуклеиновой кислотой (рис. 81 А). Поскольку каждый из утраченных фрагментов модифицированных форм Eс-Lon-протеазы локализуется внутри N-концевой области фермента (M^1-N^{304}), можно было предположить, что сайт/ы связывания нуклеиновых кислот расположены в AAA⁺-модуле (или, может быть, в протеолитическом домене) фермента. Но было установлено, что и форма Lon283 (фрагмент (M^1-P^{283}) Eс-Lon, не содержащий AAA⁺-модуля и Р-домена) также способна к связыванию рЕТ28а (рис. 81 Б).

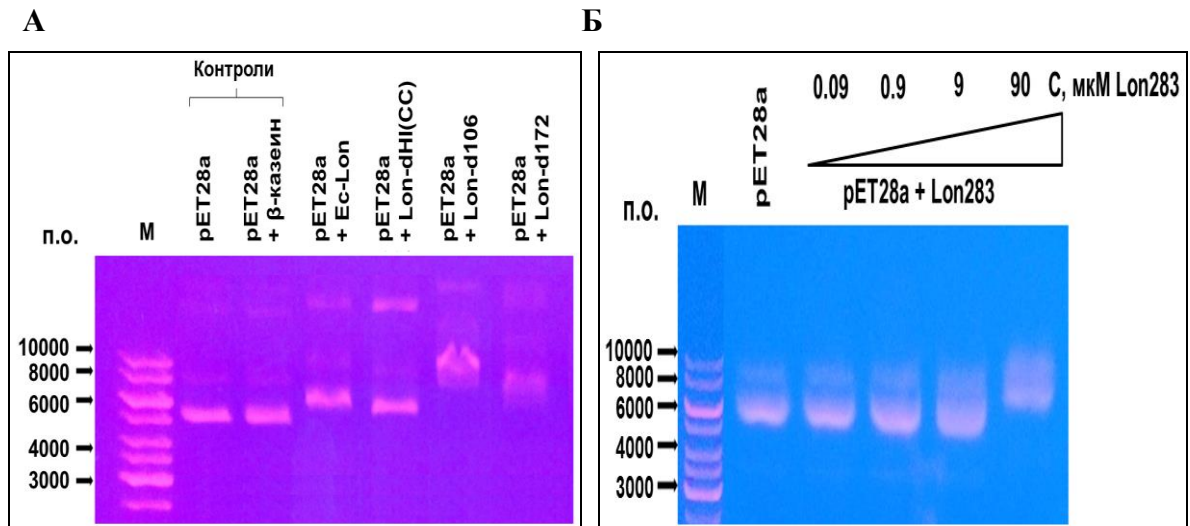


Рисунок 81. ДНК-связывающая способность Eс-Lon-протеазы и её модифицированных форм Lon-dHI(CC), Lon-d106, Lon-d172 (А) и Lon283 (Б).

Условия экспериментов: 20 мМ Трис-НСl-буфер, рН 7.5; 60 мМ NaCl; 25 °С; рЕТ28а – 5.4 (А) и 90 нМ (Б), формы Eс-Lon по 6.0 мкМ (А). М – маркеры; п.о. – пар оснований.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что различные домены вносят совместный вклад во взаимодействие Eс-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.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном в настоящей работе исследовании получены экспериментальные данные, подтверждающие справедливость выдвинутого ранее предположения о том, что АТР-зависимые Lon-протеазы подсемейства А имеют уникальное для AAA⁺-белков системы контроля качества двухдоменное строение N-концевой области.

Путем сравнительного анализа кристаллических структур бактериальных LonA-протеаз и молекулярных шаперонов семейств ClpA и ClpB установлено, что локализованный между собственно N-концевым доменом и АТР-азным модулем протеаз фрагмент последовательности, сформированный восемью α -спиралями (инсерционный HI(CC)-домен), проявляет выраженное топологическое подобие с α -спирализованным доменом первого AAA⁺-модуля ClpB-шаперонов (H1(M)-домен). И хотя вследствие расхождения в размерах отдельных спиралей общая упаковка индивидуальных доменов ферментов и шаперонов должна некоторым образом различаться, есть все основания рассматривать LonA-протеазы как AAA⁺-белки, в структуре которых классическому AAA⁺-модулю предшествует С-концевой домен (HI(CC)-домен) гипотетического второго AAA⁺-модуля, утратившего свой нуклеотид-связывающий домен. Из этого следует, что в иерархии AAA⁺-белков LonA-протеазы представляют особый подкласс, который занимает промежуточное положение между белками классов I и II.

Участие инсерционного HI(CC)-домена в формировании активной структуры и функционировании фермента исследовано на примере Lon-протеазы из *E. coli*. Для проведения экспериментальной работы сконструировано и получено девять новых укороченных, делеционных и мутантных форм *EcLon*-протеазы. Пять форм фермента получены также в протеолитически неактивном состоянии путем замены каталитически активного остатка серина-679 на аланин.

Обнаружено, что интактная *EcLon*-протеаза и ее модифицированные формы существуют в растворах в виде множественных форм олигомеров. При этом формы *EcLon*, проявляющие способность к процессивному протеолизу, образуют, в том числе, и гексамеры. Показано, что именно HI(CC)-домен необходим для сохранения гексамерной структуры, в то время как наличие или отсутствие N-концевого домена не оказывает влияния на гексамерную организацию фермента.

Сравнительным изучением энзиматических свойств интактной *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм выявлено существенное значение HI(CC)-домена для корректного функционирования АТР-азного и протеолитического центров фермента и для реализации аллостерических взаимодействий между ними. Обнаружено, что для

распознавания природы нуклеотидов важно наличие всего HI(CC)-домена, а во взаимодействии с белковым субстратом преимущественную роль играют фрагменты, фланкирующие coiled-coil-участок, и N-концевая часть последнего. Изменения конформации фермента, вызванные точечными мутациями в HI(CC)-домене, не влияют на сопряженное функционирование каталитических центров, несмотря на снижение их базовых активностей. Появляющаяся при этом у мутантов склонность к автолизу свидетельствует об участии HI(CC)-домена в поддержании конформационной стабильности фермента.

Совокупность определяющего вклада HI(CC)-домена в энзиматические свойства и межцентровые взаимодействия в *EcLon*-протеазе с его участием в гексамерной организации и поддержании стабильности позволяют сделать вывод об исключительном значении HI(CC)-домена для реализации процессивного механизма протеолиза.

Относительно N-домена, формирующего вместе с HI(CC)-доменом нехарактерную для AAA⁺-белков N-концевую область LonA-протеаз, можно утверждать, что он не участвует в олигомеризации фермента, не является необходимым для связывания белка-субстрата и для реализации аллостерических межцентровых взаимодействий и, самое главное, не влияет на механизм протеолиза белковых субстратов. N-домен важен для корректного функционирования АТР-азного центра *EcLon*-протеазы, но основной его функцией является обеспечение конформационной стабильности фермента в классических условиях функционирования (при сопряжении протеолиза с гидролизом АТР). Направленные мутации N-домена не влияют на способность *EcLon*-протеазы к процессивному протеолизу, но снижают активность пептидгидролазных центров и повышают склонность фермента к автолизу (потеря конформационной стабильности).

Показано, что N-концевая область LonA-протеаз способна связывать нуклеиновую кислоту, однако предполагавшееся специфическое взаимодействие этой области с нуклеиновыми кислотами не получило подтверждения.

Выявленное различие функций, выполняемых N- и HI(CC)-доменами в полноразмерной *EcLon*-протеазе, можно рассматривать как дополнительное подтверждение гипотезы о двухдоменной организации N-концевой области фермента.

7. ВЫВОДЫ

1. Установлена трехмерная структура фрагмента (K²³⁵-F⁵⁸⁴), включающего С-концевую часть инсерционного домена и AAA⁺-модуль *EcLon*-протеазы. Показано, что полноразмерный мутант *EcLon*-S679A представлен смесью гексамеров и додекамеров. Установлено, что гексамеры *EcLon*-S679A и фрагмента (K²³⁵-F⁵⁸⁴) 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 АТР-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 АТР;
- инсерционный и N-концевой домены *EcLon*-протеазы содержат неспецифические сайты связывания ДНК.

4. Полученные результаты позволяют рассматривать LonA-протеазы как особый подкласс AAA⁺-белков, в N-концевой области которых локализован инсерционный α -спирализованный домен – вероятный компонент добавочного AAA⁺-модуля, утратившего свой нуклеотидсвязывающий домен.

8. Список литературы

1. Amm I., Sommer T., Wolf D.H. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system // *Biochim. Biophys. Acta* – 2014. – V. 1843. – № 1. – P. 182–196.
2. Priya S., Sharma S.K., Goloubinoff P. Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides // *FEBS Lett.* – 2013. – V. 587. – P. 1981–1987.
3. Barral J.M., Broadley S.A., Schaffar G., Hartl, F.U. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2004. – V. 15. – P. 17–29.
4. Hinault M.P., Ben-Zvi A. and Goloubinoff P. Chaperones and proteases - Cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging // *J. Mol. Neurosci.* – 2006. – V. 30. – P. 249–265.
5. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease // *Ann. Rev. Biochem.* – 2006. – V. 75. – P. 333–366.
6. Hinault M.P., Farina-Henriquez-Cuendet A., Goloubinoff P. Molecular chaperones and associated cellular clearance mechanisms against toxic protein conformers in Parkinson’s disease // *Neurodegener. Dis.* – 2011. – V. 8. – P. 397–412.
7. Pinney J.H., Hawkins P.N. Amyloidosis // *Ann. Clin. Biochem.* – 2012. – V. 49. – P. 229–241.
8. Uversky V.N. Alpha-synuclein misfolding and neurodegenerative diseases // *Curr. Prot. Pept. Sci.* – 2008. – V. 9. – P. 507–540.
9. Calderwood S.K., Khaleque M.A., Sawyer D.B., Ciocca, D.R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis // *Trends Biochem. Sci.* – 2006. – V. 31. – P. 164–172.
10. Mogk A., Huber D., Bukau B. Integrating Protein Homeostasis Strategies in Prokaryotes // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3. – № 4.
11. Wong P., Houry W.A. Chaperone networks in bacteria: analysis of protein homeostasis in minimal cells // *J. Struct. Biol.* – 2004. – V. 146. – P. 79–89.
12. Jeng W., Lee S., Sung N., Lee J., Tsai F.T.F. Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states // *F1000Research.* – 2015. – V. 4 (F1000 Faculty Rev-1448).
13. Stetter, K.O. Hyperthermophiles in the history of life // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 2006. – V. 361. – P. 1837–1843.
14. Richter K., Haslbeck M., Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death // *Molecular Cell* – 2010. – V. 40. – P. 253–266.
15. Matsuura H., Ishibashi Y., Shinmyo A., Kanaya S., Kato K. Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* – 2010. – V. 51. – P. 448–462.
16. Jantschitsch C., Trautinger F. Heat shock and UV-B-induced DNA damage and mutagenesis in skin // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2003. – V. 2. – P. 899–903.
17. Bügl H., Fauman E.B., Staker B.L., Zheng F., Kushner S.R., Saper M.A., Bardwell J.C., Jakob U. RNA methylation under heat shock control // *Mol. Cell.* – 2000. – V. 6. – P. 349–360.
18. Malmendal A., Overgaard J., Bundy J.G., Sørensen J.G., Nielsen N.C., Loeschcke V., Holmstrup M. Metabolomic profiling of heat stress: hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila* // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2006. – V. 291. – P. 205–212.
19. Al Refaii A., Alix J.H. Ribosome biogenesis is temperature dependent and delayed in *Escherichia coli* lacking the chaperones DnaK or DnaJ // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V. 71. – P. 748–762.

20. Welker S., Rudolph B., Frenzel E., Hagn F., Liebisch G., Schmitz G., Scheuring J., Kerth A., Blume A., Weinkauff S., et al. Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function // *Mol. Cell* – 2010. – V. 39. – P. 507–520.
21. Schubert U., Anton L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W., Bennink J.R. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes // *Nature* – 2000. V. 404. – P. 770–774.
22. Patterson C., Höhfeld J. Molecular chaperones and the Ubiquitin-Proteasome System // *Protein Degradation* – 2006. – V. 2.
23. Klionsky D.J., Emr S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation // *Science* – 2000. – V. 290. – P. 1717–1721.
24. Shiber A., Ravid T. Chaperoning Proteins for Destruction: Diverse Roles of Hsp70 Chaperones and their Co-Chaperones in Targeting Misfolded Proteins to the Proteasome // *Biomolecules* – 2014. – V. 4. – P. 704–724.
25. Мельников Э. Э., Ротанова Т. В. Молекулярные шапероны // *Биоорг. химия* – 2010. – т. 36. – № 1. – с. 5–14.
26. Hoffmann A., Bukau B., Kramer G. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor // *Biochimica et Biophysica Acta* – 2010. – V. 1803. – P. 650–661.
27. Voos W. Chaperone–protease networks in mitochondrial protein homeostasis // *Biochimica et Biophysica Acta* – 2013. – V. 1833. – P. 388–399.
28. Mayer M.P., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – V. 62. – P. 670–684.
29. Kampinga H.H., Craig E.A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – V. 11. – P. 579–592.
30. Goloubinoff P., De Los Rios P. The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together // *Trends Biochem. Sci.* - 2007. – V. 32. - № 8. – P. 372–380.
31. Walter S. Structure and function of the GroE chaperone // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – V. 59. – P. 1589–1597.
32. Bar-Lavan Y., Shemesh N., Ben-Zvi A. Chaperone families and interactions in metazoan // *Essays In Biochemistry* – 2016. – V. 60. – № 2. – P. 237–253.
33. Taguchi H. Reaction Cycle of Chaperonin GroEL via Symmetric "Football" Intermediate // *J. Mol. Biol.* – 2015. – V. 427. – № 18. – P. 2912–2918.
34. Chaudhuri T.K., Verma V.K., Maheshwari A. GroEL assisted folding of large polypeptide substrates in *Escherichia coli*: Present scenario and assignments for the future // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2009. – V. 99. – P. 42–50.
35. Hayer-Hartl M., Bracher A., Hartl F.U. The GroEL–GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding // *Trends Biochem.* – 2016. – V. 41. – № 1. – P. 62–76.
36. Yamamoto D., Ando T. Chaperonin GroEL–GroES Functions as both Alternating and Non-Alternating Engines // *J. Mol. Biol.* – 2016. – V. 428. – № 15. – P. 3090–3101.
37. Pratt W.B., Toft D.O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery // *Exp. Biol. Med.* – 2003. – V. 228. – P. 111–133.
38. Jakob U., Lilie H., Meyer I., Buchner J. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 7288–7294.
39. Li J., Richter K., Buchner J. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2011. – V. 18. – № 1. – P. 61–67.

40. Meyer P., Prodromou C., Liao C., Hu B., Roe S.M., Vaughan C.K., et al. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – P. 1402–1410.
41. Li J., Buchner J. Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery // *Biomed. J.* – 2013. – V. 36. – P. 106–117.
42. Park C.J., Seo Y.S. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity // *Plant Pathol. J.* – 2015. – V. 31. – № 4. – P. 323–333.
43. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – V. 12. – P. 842–846.
44. Van Montfort R., Slingsby C., Vierling, E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones // *Adv. Protein Chem.* – 2001. – V. 59. – P. 105–156.
45. Haslbeck M. sHsps and their role in the chaperone network // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – V.59. – № 10. – P. 1649–1657.
46. Mogk A., Kummer E., Bukau B. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation // *Front Mol Biosci.* – 2015. – V. 2. – P. 1-10.
47. Doyle S.M., Wickner S. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines // *Trends Biochem. Sci.* – 2009. – V. 34. – № 1. – P. 40–48.
48. Zolkiewski M., Zhang T., Nagy M. Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – V. 520. – № 1. – P. 1–6.
49. Gottesman S. Proteolysis in bacterial regulatory circuits // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2003. – V. 19. – P. 565–587.
50. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M. R. Protein quality control: triage by chaperones and proteases // *Genes Dev.* – 1997. – V. 11. – P. 815–823.
51. Wickner S., Maurizi M. R., Gottesman S. Posttranslational Quality Control: Folding, Refolding, and Degrading Proteins // *Science* – 1999. – V. 286. – P. 1888–1893.
52. Benaroudj N., Goldberg A. L. PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – V. 2. – P. 833–839.
53. Glickman M. H., Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction // *Physiol. Rev.* – 2002. – V. 82. – P. 373–428.
54. Koodathingal P., Jaffe N.E., Kraut D.A., Prakash S., Fishbain S., Herman C., Matouschek A. ATP-dependent Proteases Differ Substantially in Their Ability to Unfold Globular Proteins // *The Journal of Biological Chemistry* – 2009. – V. 284. – № 28. – P. 18674–18684.
55. Bittner L.M., Arends J., Narberhaus F. ATP-dependent proteases in bacteria (mini-review) // *Biopolymers* – 2016. – V. 105. – № 8. – P. 505–517.
56. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. АТФ-Зависимые протеиназы и протеолитические комплексы внутриклеточной деградации белков // *Биомед. химия* – 2008. – т. 54. – № 5. – с. 512–530.
57. Swamy K.S., Goldberg A.L. *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent // *Nature* – 1981. – V. 292. – P. 652–654.
58. Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases // *J. Struct. Biol.* – 2004. – V. 146. – P. 11–31.
59. Wendler P., Ciniawsky S., Kock M., Kube S. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket // *BBA* – 2012. – V. 1823. – P. 2–14.

60. Ammelburg M., Frickey T., Lupas A.N. Classification of AAA+ proteins // *J. Struct. Biol.* – 2006. – V. 156. – P. 2–11.
61. Grimm I., Erdmann R., Girzalsky W. Role of AAA+-proteins in peroxisome biogenesis and function // *Biochim. Biophys. Acta* – 2016. – V. 1863. – № 5. – P. 828–37.
62. Lupas A.N., Martin J. AAA proteins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2002. – V. 12. – № 6. – P. 746–753.
63. Erzberger J.P., Berger J.M. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2006. – V. 35. – P. 93–114.
64. Dougan D.A., Mogk A., Zeth K., Turgay K., Bukau B. AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime // *FEBS Lett.* – 2002. – V. 529. – P. 6–10.
65. Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions // *Trends Biochem. Sci.* – 1996. – V. 21. – P. 289–296.
66. Frickey T., Lupas A.N. Phylogenetic analysis of AAA proteins // *J. Struct. Biol.* – 2004. – V. 146. – P. 2–10.
67. Sauer R.T., Baker T.A. AAA+ Proteases: ATP-Fueled Machines of Protein Destruction // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. – V. 80. – P. 587–612.
68. Gur E., Ottofueling R., Dougan D.A. Machines of Destruction – AAA+ proteases and the adaptors that control them. In: *Regulated proteolysis in microorganisms* (Ed. Dougan D.A.) // Springer, *Subcell. Biochem.* – 2013. – V. 66. – P. 3–33.
69. Kirstein J., Schlothauer T., Dougan D.A., Lilie H. Tischendorf G., Mogk A., Bukau B., Turgay K. Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC // *EMBO J.* – 2006. – V. 25. – № 7. – P. 1481–1491.
70. Mogk A., Bukau B. Molecular Chaperones: Structure of a Protein Disaggregase // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14. – P. 78–80.
71. Weibezahn J., Bukau B., Mogk A. Unscrambling an egg: Protein disaggregation by AAA+ proteins // *Microbial Cell Factories* – 2004. – V. 3. – № 1.
72. Sauer R.T., Bolon D.N., Burton B.M., Burton R.E., Flynn J.M., Grant R.A., Hersch G.L., Joshi S.A., Kenniston J.A., Levchenko I., Neher S.B., Oakes E.S., Siddiqui S.M., Wah D.A., Baker T.A. Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines // *Cell* – 2004. – V. 119. – № 1. – P. 9–18.
73. Olivares A.O., Baker T.A., Sauer R.T. Mechanistic insights into bacterial AAA+ proteases and protein-remodelling machines // *Nature Reviews Microbiology* – 2016. – V. 14. – P. 33–44.
74. Malinak D., Gonda J., Korabecny J., Dolezal R., Honegr J., Soukup O., Buzga M., Kuca K. A Review of the Total Synthesis of (+)-Lactacystin and its Analogs // *Current Organic Chemistry* – 2015. – V. 19. – № 20. – P. 1980–2001.
75. Lo J.H., Baker T.A., Sauer R.T. Characterization of the N-terminal repeat domain of *Escherichia coli* ClpA – A class I Clp/HSP100 ATPase // *Protein Science* – 2001. – V. 10. – № 3. – P. 551–559.
76. Kojetin D.J., McLaughlin P.D., Thompson R.J., Dubnau D., Prepiak P., Rance1 M., Cavanagh J. Structural and motional contributions of the *Bacillus subtilis* ClpC N-domain to adaptor protein interactions // *J. Mol. Biol.* – 2009. – V. 387. – № 3. – P. 639–652.
77. Elsholz A.K.W., Birk M.S., Charpentier E., Turgay K. Functional Diversity of AAA+ Protease Complexes in *Bacillus subtilis* // *Front Mol. Biosci.* – 2017. – V. 4. – article 44.
78. Hinnerwisch J., Reid B.G., Fenton W.A., Horwich A.L. Roles of the N-domains of the ClpA Unfoldase in Binding Substrate Proteins and in Stable Complex Formation with the ClpP Protease // *The Journal of Biological Chemistry* – 2005. – V. 280. – № 49. – P. 40838–40844.

79. Kirstein J., Moliere N., Dougan D.A., Turgay K. Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2009. – V. 7. – № 8. – P. 589–599.
80. Dougan D.A., Reid B.G., Horwich A.L., Bukau B. ClpS, a Substrate Modulator of the ClpAP Machine // *Molecular Cell* – 2002. – V. 9. – P. 673–683.
81. Wang F., Mei Z., Qi Y., Yan C. et al. Structure and mechanism of the hexameric MecA-ClpC molecular machine // *Nature* – 2011. – V. 471. – № 7338. – P. 331–335.
82. Mogk A., Schlieker C., Strub C., Rist W., Weibezahn J., Bukau B. Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP-hydrolysis and chaperone activity // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 15–24.
83. Cashikar A.G., Schirmer E.C., Hattendorf D.A., Glover J.R., Ramakrishnan M.S., Ware D.M., Lindquist S.L. Defining a pathway of communication from the C-terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein // *Mol. Cell* – 2002. – V. 9. – P. 751–760.
84. Lee S., Sowa M.E., Watanabe Y.H., Sigler P.B., Chiu W., Yoshida M., Tsai F.T. The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state // *Cell* – 2003. – V. 115. – № 2. – P. 229–240.
85. Kim Y.I., Levchenko I., Fraczkowska K., Woodruff R.V., Sauer R.T., Baker T.A. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – V. 8. – P. 230–233.
86. Donaldson L.W., Wojtyra U., Houry W.A. Solution structure of the dimeric zinc binding domain of the chaperone ClpX // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 49. – P. 48991–48996.
87. Miethke M., Hecker M., Gerth U. Involvement of *Bacillus subtilis* ClpE in CtsR degradation and protein quality control // *J. Bacteriol.* – 2006. – V. 188. – № 13. – P. 4610–4619.
88. Tomko RJ Jr., Hochstrasser M. Order of the proteasomal ATPases and eukaryotic proteasome assembly // *Cell Biochem. Biophys.* – 2011. – V. 60. – № 1-2. – P. 13–20.
89. Zhang F., Hu M., Tian G., Zhang P., Finley D., Jeffrey P.D., Shi Y. Structural insights into the regulatory particle of the proteasome from *Methanocaldococcus jannaschii* // *Mol. Cell* – 2009. – V. 34. – № 4. – P. 473–484.
90. Djuranovic S., Hartmann M.D., Habeck M., Ursinus A., Zwickl P., Martin J., Lupas A.N., Zeth K. Structure and Activity of the N-Terminal Substrate Recognition Domains in Proteasomal ATPases // *Mol. Cell* – 2009. – V. 34. – № 5. – P. 580–590.
91. Zhang F., Wu Z., Zhang P., Tian G., Finley D., Shi Y. Mechanism of substrate unfolding and translocation by the regulatory particle of the proteasome from *Methanocaldococcus jannaschii* // *Mol. Cell* – 2009. – V. 34. – № 4. – P. 485–496.
92. Scharfenberg F., Serek-Heuberger J., Coles M., Hartmann M.D., Habeck M., Martin J., Lupas A.N., Alva V. Structure and Evolution of N-domains in AAA Metalloproteases // *J. Mol. Biol.* – 2015. – V. 427. – № 4. – P. 910–23.
93. Ramelot T.A., Yang Y., Sahu I.D., Lee H.W., Xiao R., Lorigan G.A., Montelione G.T., Kennedy M.A. NMR structure and MD simulations of the AAA protease intermembrane space domain indicates peripheral membrane localization within the hexaoligomer // *FEBS Lett.* – 2013. – V. 587. – № 21. – P. 3522–3528.
94. Langklotz S., Baumann U., Narberhaus F. Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH // *Biochim. Biophys. Acta* – 2012. – V. 1823. – № 1. – P. 40–48.
95. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – V. 271. – P. 4865–4871.
96. Sousa M.C., Trame C.B., Tsuruta H., Wilbanks S.M., Reddy V.S., McKay D.B. Crystal and Solution Structures of an HslUV Protease-Chaperone Complex // *Cell* – 2000. – V. 103. – P. 633–643.

97. Sundar S., Baker T.A., Sauer R.T. The I domain of the AAA+ HslUV protease coordinates substrate binding, ATP hydrolysis, and protein degradation // *Protein Sci.* – 2012. – V. 21. – № 2. – P. 188–198.
98. Rotanova T. V., Melnikov E. E. A Novel View on the Architecture of the Non-Catalytic N-Terminal Region of ATP-Dependent LonA Proteases // *Biomed Khim.* – 2010. – V. 4. – № 4. – P. 404–408.
99. Duman R.E., Löwe J. Crystal Structures of *Bacillus subtilis* Lon Protease // *J. Mol. Biol.* – 2010. – V. 401. – P. 653–670.
100. Li M., Rasulova F., Melnikov E.E., Rotanova T.V., Gustchina A., Maurizi M.R., Wlodawer A. Crystal structure of the N-terminal domain of *E. coli* Lon protease // *Protein Sci.* – 2005. – V. 14. – № 11. – P. 2895–2900.
101. Li M., Gustchina A., Rasulova F. S., Melnikov E. E., Maurizi M. R., Rotanova T. V., Dauter Z., Wlodawer A. Structure of the N-terminal fragment of *Escherichia coli* Lon protease // *Acta Cryst.* – 2010. – V. D66. – P. 865–873.
102. Rotanova T.V., Dergousova N.I., Morozkin A.D. Unique structural organization of ATP-dependent LonA proteases // *Rus. J. Bioorgan. Chem.* – 2013. – V. 39. – № 3. – P. 268–282.
103. Roudiak S.G., Shrader T.E. Functional role of the N-terminal region of the Lon protease from *Mycobacterium smegmatis* // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37. – № 32. – P. 11255–11263.
104. Vasilyeva O.V., Martynova N. Iu., Potapenko N.A., Ovchinnikova T.V. Isolation and characterization of fragments of ATP-dependent protease Lon from *Escherichia coli* obtained by limited proteolysis // *J. Bioorgan. Chem.* – 2004. – V. 30. – № 3. – P. 264–272.
105. Melnikov E.E., Andrianova A.G., Morozkin A.D., Stepnov A.A., Makhovskaya O.V., Botos I., Gustchina A., Wlodawer A., Rotanova T.V. Limited proteolysis of *E. coli* ATP-dependent protease Lon – a unified view of the subunit architecture and characterization of isolated enzyme fragments // *Acta Biochim. Pol.* – 2008. – V. 55. – P. 281–296.
106. Wohlever M.L., Baker T.A., Sauer R.T. Roles of the N domain of the AAA+ Lon protease in substrate recognition, allosteric regulation and chaperone activity // *Mol. Microbiol.* – 2014. – V. 91. – № 1. – P. 66–78.
107. Vieux E.F., Wohlever M.L., Chen J.Z., Sauer R.T., Baker T.A. Distinct quaternary structures of the AAA+ Lon protease control substrate degradation // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* – 2013. – V. 110. – № 22. – P. 2002–2008.
108. Lee A.Y.L., Hsu C.H., Wu S.H. Functional domains of *Brevibacillus thermoruber* Lon protease for oligomerization and DNA binding. Role of N-terminal and sensor and substrate discrimination domains // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 33. – P. 34903–34912.
109. Chir J.L., Liao J.H., Lin Y.C., Wu S.H. The N-terminal sequence after residue 247 plays an important role in structure and function of Lon protease from *Brevibacillus thermoruber* WR-249 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 382. – P. 762–765.
110. Cheng I., Mikita N., Fishovitz J., Frase H., Wintrode P., Lee I. Identification of a region in the N-terminus of *Escherichia coli* Lon that affects ATPase, substrate translocation and proteolytic activity // *J. Mol. Biol.* – 2012. – V. 418. – P. 208–225.
111. Kudzhaev A.M., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Andrianova A.G., Rotanova T.V. Influence of the (1–106) Fragment of *Escherichia coli* Lon Protease on the Enzyme Function and DNA Binding // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* – 2016. – V. 42. – № 4. – P. 381–388.
112. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. MEROPS: the peptidase database // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – P. 160–164.
113. Bukau B., Weissman J., Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control // *Cell* – 2006. – V. 125. – P. 443–451.
114. Saibil H.R. Chaperone machines in action // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2008. – V. 18. – P. 35–42.

115. Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. In vivo aspects of protein folding and quality control // *Science* – 2016. – V. 353. – № 6294.
116. Buchberger A., Bukau B., Sommer T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: Brothers in Arms // *Mol. Cell* – 2010. – V. 40. – P. 238–252.
117. Xie F., Li G., Zhang Y., Zhou L., Liu S., Liu S., Wang C. The Lon protease homologue LonA, not LonC, contributes to the stress tolerance and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* // *Microb. Pathog.* – 2016. – V. 93. – P. 38–43.
118. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Kozlov S., Makhovskaya O.V. Atomic-resolution crystal structure of the proteolytic domain of *Archaeoglobus fulgidus* Lon reveals the conformational variability in the active sites of Lon proteases // *Mol. Biol.* – 2005. – V. 351. – P. 144–157.
119. Bertonati C., Punta M., Fischer M., Yachdav G., Forouhar F., Zhou W., Kuzin A.P., Seetharaman J., Abashidze M., Ramelot T.A., Kennedy M.A., Cort J.R., Belachew A., Hunt J.F., Tong L., Montelione G.T., Rost B. Structural genomics reveals EVE as a new ASCH/PUA-related domain // *Proteins* – 2009. – V. 75. – № 3. – P. 760–773.
120. Mogk A., Haslberger T., Tessarz P., Bukau B. Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – V. 36. – P. 120–125.
121. Fu G.K., Smith M.J., Markovitz D.M. Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein // *Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 534–538.
122. Ambro L., Pevala V., Bauer J., Kutejová E. The influence of ATP-dependent proteases on a variety of nucleoid-associated processes // *J. Struct. Biol.* – 2012. – V. 179. – № 2. – P. 181–192.
123. Venkatesh S., Lee J., Singh K., Lee I., Suzuki C.K. Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease // *Biochim. Biophys. Acta* – 2012. – V. 1823. – P. 56–66.
124. Lin Y.C., Lee H.C., Wang I., Hsu C.H., Liao J.H., Lee A.Y., Chen C., Wu S.H. DNA-binding specificity of the Lon protease alpha-domain from *Brevibacillus thermoruber* WR-249 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 388. – № 1. – P. 62–66.
125. Lee A.Y., Chen Y.D., Chang Y.Y., Lin Y.C., Chang C.F., Huang S.J., Wu S.H., Hsu C.H. Structural basis for DNA-mediated allosteric regulation facilitated by the AAA+ module of Lon protease // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2014. – V. 70. – P. 218–230.
126. Karłowicz A., Węgrzyn K., Gross M., Kaczynska D., Ropelewska M., Siemiątkowska M., Bujnicki J.M., Konieczny I. Defining the Crucial Domain and Amino Acid Residues in Bacterial Lon Protease for DNA Binding and Processing of DNA-interacting Substrates // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292. – № 18. – P. 7507–7518.
127. Nomura K., Kato J., Takiguchi N., Ohtake H., Kuroda A. Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 33. – P. 34406–34410.
128. Van Melderen L., Aertsen A. Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis // *Res. Microbiol.* – 2009. – V. 160. – P. 645–651.
129. Tsilibaris V., Maenhaut-Michel G., Melderen L. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease // *Res. Microbiol.* – 2006. – V. 157. – P. 701–713.
130. Mascarenhas J., Volkov A.V., Rinn C., Schiener J., Guckenberger R., Graumann P.L. Dynamic assembly, localization and proteolysis of the *Bacillus subtilis* SMC complex // *BMC Cell Biol.* – 2005. – V. 6. – № 28.
131. Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., Kornberg A. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli* // *Science* – 2001. – V. 293. – № 5530. – P. 705–708.

132. Lu B., Yadav S., Shah P.G., Liu T., Tian B., Puksza S., Villaluna N., Kutejová E., Newlon C.S., Santos J.H., Suzuki C.K. Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – № 24. – P. 17363–17374.
133. Bota D.A., Davies K.J. Mitochondrial Lon protease in human disease and aging: Including an etiologic classification of Lon-related diseases and disorders // *Free Radical Biology and Medicine* – 2016. – V. 100. – P. 188–198.
134. Cheng C.W., Kuo C.Y., Fan C.C., Fang W.C., Jiang S.S., Lo Y.K., Wang T.Y., Kao M.C., Lee A.Y. Overexpression of Lon contributes to survival and aggressive phenotype of cancer cells through mitochondrial complex I-mediated generation of reactive oxygen species // *Cell Death Dis.* – 2013. – V. 4, e681.
135. Luo B., Wang M., Hou N., Hu X., Jia G., Qin X., Zuo X., Liu Y., Luo K., Song W., Wang K., Pang M. ATP-Dependent Lon Protease Contributes to *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Carcinogenesis // *Neoplasia* – 2016. – V. 18. – № 4. – P. 242–252.
136. Liu Y., Lan L., Huang K., Wang R., Xu C., Shi Y., Wu X., Wu Z., Zhang J., Chen L., Wang L., Yu X., Zhu H., Lu B. Inhibition of Lon blocks cell proliferation, enhances chemosensitivity by promoting apoptosis and decreases cellular bioenergetics of bladder cancer: potential roles of Lon as a prognostic marker and therapeutic target in bladder cancer // *Oncotarget* – 2014. – V. 5. – № 22. – P. 11209–11224.
137. Lu B. Mitochondrial Lon Protease and Cancer // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – V. 1038. – P. 173–182.
138. Bernstein S.H., Venkatesh S., Li M., Lee J., Lu B., Hilchey S.P., Morse K.M., Metcalfe H.M., Skalska J., Andreeff M., Brookes P.S., Suzuki C.K. The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: a novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives // *Blood* – 2012. – V. 119. – № 14. – P. 3321–3329.
139. Bencini D.A., Wild J.R., O'Donovan G.A. Linear one-step assay for the determination of orthophosphate // *Anal. Biochem.* – 1983. – V. 132. – P. 254–258.
140. Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. Sensitive substrates for human leukocyte and porcine pancreatic elastase: a study of the merits of the various chromophoric and fluorogenic leaving groups in assays for serine proteases // *Anal. Biochem.* – 1979. – V. 99. – P. 53–64.
141. Walker J.M. *The Proteomics Protocols Handbook* // Humana Press. – 2005.
142. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
143. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature* – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
144. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. Новый взгляд на строение некаталитической N-концевой области АТР-зависимых LonA-протеиназ // *Биомед. Химия.* – 2010. – V. 56. – P. 412–419.
145. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. Уникальная структурная организация АТР-зависимых Lon-протеиназ подсемейства А // *Биоорган. химия* – 2013. – V. 39. – P. 309–319.
146. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A. The catalytic domain of *E. coli* Lon protease has a unique fold and a Ser–Lys dyad in the active site // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 8140–8148.
147. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Tropea J.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Gustchina A., Wlodawer A. Crystal structure of the AAA+ α domain of *E. coli* Lon protease at 1.9 Å resolution // *J. Struct. Biol.* – 2004. – V. 146. – P. 113–122.
148. Lin C.C., Su S.C., Su M.Y., Liang P.H., Feng C.C., Wu S.H., Chang C.I. Structural insights into the allosteric operation of the Lon AAA+ protease // *Structure.* – 2016. – V. 24. – № 5. – P.667–675.

149. Garcia-Nafria J., Ondrovicova G., Blagova E., Levdikov V.M., Bauer J.A., Suzuki C.K., Kutejova E., Wilkinson A.J., Wilson K.S. Structure of the catalytic domain of the human mitochondrial Lon protease: Proposed relation of oligomer formation and activity // *Protein Sci.* – 2010. – V. 19. – P. 987-999.
150. Rotanova T.V., Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Li M., Botos I., Wlodawer A. Gustchina A. New insights into structural and functional relationships between LonA proteases and ClpB chaperones // *FEBS Open Bio* – 2019. V. 9. – P. 1536-1551.
151. Gates S.N., Martin A. Stairway to translocation: AAA+ motor structures reveal the mechanisms of ATP-dependent substrate translocation // *Protein Science* – 2019. – V. 29. – P. 407-419.
152. Martin A., Baker T.A., Sauer R.T. Diverse pore loops of the AAA+ ClpX machine mediate unassisted and adaptor-dependent recognition of *ssrA*-tagged substrates // *Mol. Cell* – 2008. – V. 29. – P. 441-450.
153. Sysoeva T.A. Assessing heterogeneity in oligomeric AAA+ machines // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2017. – V. 74. – № 6. – P. 1001-1018.
154. Duran E.C., Weaver C.L., Lucius A.L. Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: common threads and disparate functions // *Front. Mol. Biosci.* – 2017. – V. 4. – № 54. – P. 1-19.
155. Chung C.H., Goldberg A.L. The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* – 1981. – V. 78. – P. 4931-4935.
156. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. ATP-dependent protease La (*lon*) from *Escherichia coli* // *Methods Enzymol.* – 1994. – V. 244. – P. 350-375.
157. Rivett A.J. High molecular mass intracellular proteases // *Biochem. J.* – 1989. – V. 263. – P. 625-633.
158. Chung C.H., Waxman L., Goldberg A.L. Studies of the protein encoded by the *lon* mutation, *capR9*, in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1983. – V. 258. – P. 215-221.
159. Rudyak S.G., Brenowitz M., Shrader T.E. Mg^{2+} -linked oligomerization modulates the catalytic activity of the Lon (La) protease from *Mycobacterium smegmatis* // *Biochemistry* – 2001. – V. 40. – P. 9317-9323.
160. Park S.C., Jia B., Yang J.K., Van D.L., Shao Y.G., Han S.W., Jeon Y.J., Chung C.H., Cheong G.W. Oligomeric structure of the ATP-dependent protease La (Lon) of *Escherichia coli* // *Mol. Cells* – 2006. – V. 21. – P. 129-134.
161. Wohlever M.L., Baker T.A., Sauer R.T. A mutation in the N domain of *E. coli* Lon stabilizes dodecamers and selectively alters degradation of model substrates // *J. Bacteriol.* – 2013. – V. 195. – P. 5622-5628.
162. Stahlberg H., Kutejova E., Suda K., Wolpensinger B., Lustig A., Schatz G., Engel A., Suzuki C.K. Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* – 1999. – V. 96. – P. 6787-6790.
163. Kutejova E., Durcova G., Surovkova E., Kuzela S. Yeast mitochondrial ATP-dependent protease: purification and comparison with the homologous rat enzyme and the bacterial ATP-dependent protease La // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 329. – P. 47-50.
164. van Dijl J. M., Kutejova E., Suda K., Wolpensinger B., Lustig A., Schatz G., Engel A., Suzuki C.K. The ATPase and protease domains of yeast mitochondrial Lon: Roles in proteolysis and respiration-dependent growth // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* – 1998. – V. 95. – P. 10584-10589.
165. Lin J., Lucius A.L. Analysis of Linked Equilibria // *Meth. Enzymol.* – 2015. – V. 562. – P. 161-186.
166. Lin J., Lucius A.L. Examination of ClpB quaternary structure and linkage to nucleotide binding // *Biochemistry.* – 2016. – V. 55. – P. 1758-1771.
167. Gur E. The Lon AAA+ protease // *Subcell Biochem.* – 2013. – V. 66. – P. 35-51.

168. Джоунс М., Фрэнкс Ф., Пфайль В., Привалов П., Хинц Г.-И., Джилл С., Монти М., Вадсо И., Крешек Г., Лоув А., Крэбтри Б., Тейлор Д. Биохимическая термодинамика / Пер. с англ./ Под ред. Л.А. Блюменфельда. – Москва: Мир, 1982. – 440 с.
169. Chen S.H., Suzuki C.K., Wu S.H. Thermodynamic characterization of specific interactions between the human Lon protease and G-quartet DNA // *Nucl. Acids Res.* – 2008. – V. 36. – № 4. – P. 1273-1287.
170. Андрианова А.Г. Структурно-функциональное исследование изолированных доменов АТФ-зависимой Lon-протеиназы *Escherichia coli*: дисс. канд. хим. наук: 03.00.04 / Андрианова Анна Говардовна. – М., 2007. – 141 с.
171. Waxman L., Goldberg A.L. Selectivity of intracellular proteolysis: protein substrates activate the ATP-dependent protease (La) // *Science* – 1986. – V. 232. – № 4749. – P. 500-503.
172. Joshi S.A., Hersch G.L., Baker T.A., Sauer R.T. Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2004. – V. 11. – P. 404-411.
173. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database // *Nucl. Acid. Res.* – 2018. – V. 46. – P. 624-632.
174. Zehnbaauer B.A., Foley E.C., Henderson G.W., Markovitz A. Identification and purification of the Lon' (capR+) gene product, a DNA-binding protein // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* – 1981. – V. 78. – P. 2043-2047.
175. Chung C.H., Goldberg A.L. DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* – 1982. – V. 79. – P. 795-799.
176. Lee I., Suzuki C.K. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates // *Biochim. Biophys. Acta* – 2008. – V. 1784. – № 5. – P. 727-735.
177. Fu G.K., Markovitz D.M. The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner // *Biochemistry* – 1998. – V. 37. – № 7. – P. 1905-1909.
178. Liu T., Lu B., Lee I., Ondrovicová G., Kutejová E., Suzuki C.K. DNA and RNA binding by the mitochondrial LON protease is regulated by nucleotide and protein substrate // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – V. 14. – P. 13902-13910.
179. Lu B., Liu T., Crosby J.A., Thomas-Wohlever J., Lee I., Suzuki C.K. The ATP-dependent LON protease of *Mus musculus* is a DNA-binding protein that is functionally conserved between yeast and mammals // *Gene* – 2003. – V. 306. – P. 45-55.
180. Ebel W., Skinner M.M., Dierksen K.P., Scott J.M., Trempy J.E. A conserved domain in *Escherichia coli* Lon protease is involved in substrate discriminator activity // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – № 7. – P. 2236-2243.
181. Kuroda A. A polyphosphate-Lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2006. – V. 70. – № 2. – P. 325-33.