



УДК 577.152.342*153.02

СОПРЯЖЕНИЕ ГИДРОЛИЗА АТФ И ПРОТЕОЛИЗА ПРИ ФУНКЦИОНИРОВАНИИ IN VITRO МУТАНТНЫХ ПО АТФ-АЗНОМУ ЦЕНТРУ ФОРМ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *E. coli*

© 1998 г. Э. Э. Мельников, К. Б. Цирульников, Л. М. Гинодман, Т. В. Ротанова[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 19.09.97 г. Принята к печати 27.10.97 г.

С целью идентификации аминокислотных остатков АТФ-азного домена Lon-протеиназы *E. coli*, участвующих в гидролизе АТФ и входящих в систему передачи сигнала с АТФ-азного домена на протеолитический, проведена модификация потенциально важных остатков АТФ-азного домена методом направленного мутагенеза и исследованы свойства полученных мутантных форм фермента. Установлено, что остатки K362, T363 (мотив А Уолкера) и D423 (мотив В) участвуют в катализе гидролиза АТФ. При этом K362 и T363 участвуют также в системе междоменного сопряжения, а D423, по-видимому, не играет существенной роли в функционировании этой системы. Остаток D387 важен для функционирования АТФ-азного центра, однако не является каталитически активным, как постулировано в литературе. Показано также, что определенную роль в системе междоменной передачи сигнала сопряжения играет остаток Y493.

Ключевые слова: АТФ-зависимый протеолиз; Lon-протеиназа; активный центр; АТФ-аза; ген lon; мутагенез; *E. coli*.

АТФ-зависимый протеолиз относится к числу универсальных внутриклеточных процессов [1]. Энергозависимые протеиназы играют ключевую роль в регуляции клеточных функций у прокариот и эукариот. Наиболее подробно АТФ-зависимый протеолиз изучен в клетках *Escherichia coli*. У этого микроорганизма главная роль в АТФ-зависимом расщеплении белков принадлежит Lon-протеиназе, относящейся к группе белков теплового шока [2–5].

В клетках *E. coli* Lon-протеиназа (КФ 3.4.21.53) осуществляет быстрое селективное расщепление дефектных и ряда короткоживущих регуляторных белков [6]. Известны некоторые из эндогенных субстратов Lon-протеиназы: SuiA, RcsA, CcdA [7–10]. К настоящему времени обнаружено около 10 представителей Lon-протеиназ из эволюционно удаленных источников [11].

Lon-протеиназа *E. coli* – гомотетрамерный белок с молекулярной массой субъединицы 87400 [12]. Субъединица Lon-протеиназы имеет доменную организацию (рис. 1) и включает:

Н-концевой домен, функция которого в настоящее время не определена;

центральный АТФ-азный домен, содержащий так называемые мотивы Уолкера А и В [13] – консервативные фрагменты первичной последовательности с аминокислотными остатками, участвующими в образовании каталитической области АТФ-азного центра, а также в связывании и продуктивной для гидролиза координации трифосфата нуклеотида и иона Mg^{2+} ;

С-концевой протеолитический домен с каталитически активным остатком S679 [14].

Фермент является уникальной сериновой протеиназой, активность которой сопряжена с гидролизом АТФ [15–19]. Гидролиз белковых субстратов осуществляется только в присутствии АТФ, как полагают, по процессивному механизму (без высвобождения промежуточных продуктов и с образованием конечных пептидов определенного размера). Lon-протеиназа гидролизует также некоторые низкомолекулярные пептидные субстраты, причем пептидазная активность может реализоваться в присутствии некоторых негидролизующих аналогов АТФ [20].

АТФ-азная активность Lon-протеиназы наблюдается и в отсутствие белкового субстрата (“базовая” АТФ-азная активность), но возрастает в несколько раз в его присутствии. При этом активация гидролиза АТФ осуществляется интактным белком-субстратом, а не продуктами его гидролиза, о чем свидетельствует увеличение АТФ-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-42-22; e-mail: Rotanova@enzyme.siocb.ras.ru).

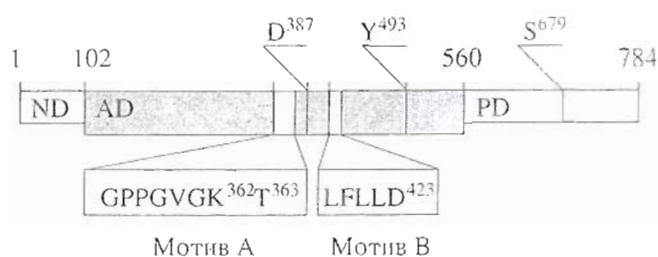


Рис. 1. Схема строения Lon-протеиназы *E. coli*. Указаны предполагаемые границы доменов (ND, AD, PD: N-концевой, АТР-азный и протеолитический соответственно), каталитический остаток протеолитического центра S679 и аминокислотные остатки АТР-азного домена, исследованные в настоящей работе (обозначены номерами).



Рис. 2. Схема функционирования Lon-протеиназы *E. coli* (по работе [1]).

азной активности в присутствии белкового субстрата у протеолитически неактивного мутанта Lon-протеиназы (Lon-S679A) [21].

Современные представления о функционировании Lon-протеиназы при гидролизе белковых субстратов изложены в работах [1, 22]. В основу модели положены следующие принципы:

а) АТР и АDР связываются по АТР-азному центру фермента и аллостерически влияют на конформацию протеолитического центра;

б) белковый субстрат связывается в двух центрах — аллостерическом и протеолитическом, при этом связывание белкового субстрата в аллостерическом центре влияет как на конформацию протеолитического центра, так и на связывание нуклеотидов в АТР-азном центре (“хороший” белковый субстрат вызывает обмен прочно связанного АDР на АТР);

в) субъединицы Lon-протеиназы функционируют кооперативно, и расщепление пептидных связей белкового субстрата происходит поочередно в активных центрах взаимодействующих субъединиц.

Простейшая схема, описывающая каталитический цикл Lon-протеиназы, представлена на рис. 2. Как полагают, при функционировании фермента

АТР выступает в качестве модифицируемого аллостерического эффектора: связывание и гидролиз АТР влияют на взаимодействие белка с аллостерическим и/или протеолитическим центрами на ферменте [22].

Основными принципиально важными проблемами при изучении АТР-зависимого протеолиза остаются: выявление природы селективности действия АТР-зависимых протеиназ, реализуемой в результате гидролиза АТР, и исследование сопряжения гидролиза АТР и протеолиза.

Можно полагать, что сопряжение протеолиза с гидролизом АТР в значительной степени определяется междоменными взаимодействиями в ферменте. При исследовании такого рода взаимодействий перспективно изучение модифицированной Lon-протеиназы, утратившей сопряжения между АТР-азным и протеолитическим доменами (функциональное разобщение доменов при сохранении целостности полипептидной цепи). Такие формы Lon-протеиназы можно получить направленным мутагенезом остатков, вовлеченных в систему передачи сигнала между центрами. Компонентами этой системы следует считать также и активные центры фермента — АТР-азный и протеолитический (донор и акцептор сигнала соответственно).

В связи с этим в настоящей работе решалась задача идентификации аминокислотных остатков АТР-азного домена Lon-протеиназы, участвующих в гидролизе АТР и, возможно, в передаче сигнала с АТР-азного центра на протеолитический (т.е. входящих в систему междоменного сопряжения), с помощью модификации потенциально важных аминокислотных остатков методом направленного мутагенеза и изучения свойств полученных мутантных форм Lon-протеиназы.

При идентификации функционально важных остатков АТР-азного домена мы учитывали предложенную в литературе гипотезу о том, что различные белки, содержащие мотивы Уолкера А и В (в том числе и Lon-протеиназы), обладают сходной топологией нуклеотид-триггерных доменов даже в отсутствие высокой гомологии первичных структур [23]. Используя данные рентгеноструктурного анализа, полученные для некоторых нуклеотид-триггерных белков, авторы гипотезы предложили обобщенную модель строения нуклеотид-триггерных доменов и схему взаимодействия остатков мотивов Уолкера с фосфатной частью нуклеотида в активных центрах ферментов. Авторы полагают, что наряду с аминокислотными остатками, принадлежащими мотивам Уолкера [13, 24], ключевую роль в катализе гидролиза нуклеотидов играет определенный остаток дикарбоновой аминокислоты, локализованный между мотивами А и В (для Lon-протеи-

назы, по мнению авторов, это D387). Кроме того, в той же работе [23] постулируется существование в структурах АТР-аз и GTP-аз, сопрягающих гидролиз нуклеотида с другой функцией, аминокислотных остатков тирозина или глутамина, имеющих ключевое значение в передаче конформационных изменений, т.е. сигнала, с нуклеотид-триггерного центра к функциональному домену (в случае Lon-протеиназы – протеолитическому). Такой остаток должен был бы располагаться на расстоянии приблизительно 50 а.о. от мотива В в сторону С-концевой области молекулы. В указанной области Lon-протеиназа не содержит ни глутамин, ни тирозина. Ближайшие консервативные остатки тирозина – это Y456 и Y493, а глутамин – Q448. Можно было полагать, что один из этих остатков входит в систему передачи сигнала.

Для исследования функциональной роли остатков K362 и T363 из мотива А, D423 из мотива В, потенциального каталитического остатка D387 и одного из возможных переносчиков сигнала, Y493, были получены мутантные формы Lon-протеиназы с заменами по указанным остаткам (табл. 1).

Материалом для проведения мутагенеза послужила векторная конструкция pBR-Lon, полученная ранее в результате клонирования гена *lon* с собственной регуляторной областью в плазмиде pBR327 [12]. Введение мутаций, приводящих к заменам T363A, D423N, D387N, Y493F в аминокислотной последовательности Lon-протеиназы, было осуществлено при использовании четырехпраймерного метода мутагенеза, основанного на ПЦР. Мутация, приводящая к замене K362Q, была введена ранее методом, описанным в работе [14]. Аминокислотные замены произведены с учетом частоты встречаемости естественных мутаций в белках [25]. Структура олигонуклеотидных праймеров, использованных в мутагенезе, приведена в "Экспериментальной части". Введение мутаций подтверждено секвенированием.

Выделение мутантных форм фермента проводили по методике, разработанной для нативного белка [26]. Чистота препаратов ферментов во всех случаях была близка к 90%, по данным гелеэлектрофореза. Эксперименты по определению активности воспроизводили не менее трех раз, используя препараты ферментов из различных выделений.

Результаты определения АТР-азной (в присутствии и в отсутствие казеина) и АТР-зависимой протеолитической активностей нативного фермента и его мутантных форм приведены в табл. 1.

Прежде всего следует отметить, что нативная Lon-протеиназа обладает базовой АТР-азной активностью, которая характеризуется значением k_{cat}/K_m , равным $95 \text{ mM}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ (табл. 1). Присутствие белкового субстрата приводит к переходу

Таблица 1. Ферментативные свойства Lon-протеиназы *E. coli* и ее мутантных форм*

Фермент	АТР-азная активность							P(A), %	ФСС
	Базовая			В присутствии казеина					
	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{cat}/K_m, \text{мМ}^{-1} \text{мин}^{-1}$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{cat}/K_m, \text{мМ}^{-1} \text{мин}^{-1}$	A(P)		
Lon	19	0.20	95	48	0.18	267	+	100	+
Lon-K362Q	3.8	0.35	11	3.5	0.30	12	-	-	-
Lon-T363A	3.5	0.44	8	3.2	0.45	7	-	-	-
Lon-D423N	3.6	0.45	8	3.5	0.40	9	-	30	±
Lon-D387N	4.5	0.65	7	25	0.60	42	+	80	+
Lon-Y493F	48	0.20	240	48	0.20	240	-	50	±

* Условия проведения реакций описаны в "Экспериментальной части". Кинетические параметры определены с точностью 10% для k_{cat} и 25% для K_m . A(P) – способность фермента увеличивать АТР-азную активность в присутствии казеина; P(A) – АТР-зависимая протеолитическая активность; ФСС – функционирование системы сопряжения.

АТР-азного центра Lon-протеиназы в активированную форму, при этом K_m остается неизменной, а k_{cat} возрастает примерно в 2.5 раза.

Введение любой из рассматриваемых мутаций в АТР-азный домен Lon-протеиназы приводит к изменению базовой АТР-азной активности фермента. При этом у мутантов K362Q, T363A, D387N и D423N активность по k_{cat}/K_m понижается более чем на порядок относительно активности нативного фермента. Полученные результаты свидетельствуют о важности мутированных остатков для функционирования АТР-азного центра. Неожиданным оказалось увеличение базовой АТР-азной активности у мутанта Y493F до уровня АТР-азной активности нативного фермента в присутствии белкового субстрата.

Далее была исследована способность полученных мутантов к АТР-зависимому протеолизу и охарактеризована наблюдаемая в условиях протеолиза АТР-азная активность (в присутствии белкового субстрата). Эти характеристики существенно различались у разных мутантов.

АТР-зависимый протеолиз не был обнаружен только у ферментов, содержащих мутации в мотиве А. Введение других мутаций привело к понижению протеолитической активности мутантных форм Lon-протеиназы.

Сопоставление АТР-азной активности препаратов ферментов в присутствии казеина с данными по определению протеолитической активности позволяет заключить, что эффективность обнаруживаемого АТР-зависимого протеолиза не

определяется уровнем гидролиза АТФ. При этом протеолиз наблюдается и при значительно пониженной АТФ-азной функции (Lon-D423N), и при отсутствии активации гидролиза АТФ белковым субстратом (Lon-D423N и Lon-Y493F). Более того, при различии почти в 30 раз k_{cat}/K_m по АТФ в случае Lon-D423N и Lon-Y493F уровень протеолитической активности для данных мутантных форм оказывается близким.

АТФ-азная активность мутантов по мотиву А (K362Q и T363A) не увеличивается в присутствии белкового субстрата, и эти мутанты не гидролизуют казеин. АТФ-азная активность мутанта D423N (мотив В) также не возрастает в присутствии белкового субстрата, однако протеолиз этим мутантом осуществляется с эффективностью, составляющей 30% эффективности протеолиза нативной Lon-протеиназой.

Полученные результаты позволяют сделать следующие заключения: 1) все три рассматриваемых остатка участвуют в катализе гидролиза АТФ; 2) само по себе снижение активности АТФ-азного центра (в присутствии казеина) более чем на порядок по сравнению с активностью нативного фермента не препятствует проявлению АТФ-зависимой протеолитической активности (мутант по D423 гидролизует казеин); 3) остатки K362 и T363 участвуют в передаче сигнала сопряжения с АТФ-азного домена на протеолитический (соответствующие мутанты утрачивают протеолитическую активность). Остаток D423, по-видимому, не играет существенной роли в системе сопряжения, а невысокая протеолитическая активность мутанта Lon-D423N может быть обусловлена пониженной АТФ-азной активностью.

Следует отметить, что в литературе имеются данные относительно свойств Lon-протеиназы, содержащей замену K362A [27]. В целом результаты работы [27] согласуются с нашими результатами: мутантный фермент не проявляет протеолитической функции, обладает пониженной АТФ-азной активностью и не способен активироваться при добавлении казеина. При этом существенное понижение величины k_{cat} гидролиза АТФ для Lon-K362A сопровождается значительным увеличением константы Михаэлиса K_m по АТФ (на порядок), чего не наблюдается при замене K362Q (табл. 1). По-видимому, замена остатка лизина на аланин приводит к более существенным искажениям структуры АТФ-азного центра, чем замена на "разрешенный" остаток глутамин.

Летальность мутаций в мотивах А для функциональной активности нуклеотид-триггерных белков продемонстрирована и на других примерах. Так, протоонкогенный белок Ras-p21 (GTP-аза), несущий мутацию в данном мотиве, характеризуется низкой базовой активностью и неспособностью к активации гидролиза нуклеотида в присут-

ствии белка-активатора GTP-азной функции (GAP), что, как было показано, обусловлено нарушением взаимодействия между мутантным p21 и GAP [28].

АТФ-азная активность мутанта D387N значительно возрастает в присутствии белкового субстрата, что не позволяет считать остаток D387 критически важным для катализа гидролиза АТФ. Таким образом, постулированное в литературе [23] положение о том, что D387 выполняет роль каталитически активного остатка АТФ-азного центра Lon-протеиназы, не нашло подтверждения. Мутация D387N не влияет также и на междоменное сопряжение (мутант проявляет высокую АТФ-зависимую протеолитическую активность). В то же время данный остаток важен для функционирования АТФ-азного центра, поскольку мутация, как отмечено выше, приводит к существенному понижению базовой активности фермента.

Мутант Lon-Y493F, как уже было упомянуто, характеризуется максимально высоким уровнем базовой АТФ-азной активности. В присутствии белкового субстрата АТФ-азная активность не увеличивается, по-видимому, вследствие того, что максимально высокий уровень в выбранных условиях был достигнут уже в результате мутации. Однако протеолитическая активность этого мутанта составляла только 50% активности нативного фермента, т.е. мутация Y493F приводит к частичному функциональному разобщению АТФ-азного и протеолитического центров. Эти результаты позволяют предположить, что остаток Y493 играет определенную роль в системе передачи сигнала сопряжения.

Таким образом, исследование свойств полученных мутантных форм фермента позволило выявить роль ряда остатков АТФ-азного домена в катализе гидролиза АТФ и в передаче сигнала сопряжения на протеолитический центр Lon-протеиназы. Учитывая олигомерную организацию фермента, можно рассматривать следующие варианты передачи сигнала: в пределах одной субъединицы и/или на уровне олигомера (сопряжение АТФ-азного и протеолитического доменов разных субъединиц). Осуществление последнего варианта возможно при участии АТФ-азного центра в формировании четвертичной структуры фермента, как показано для другой АТФ-зависимой протеиназы из *E. coli* – Clp [29]. В настоящее время проводятся исследования по установлению олигомерной организации представленных в работе мутантных форм Lon-протеиназы, и не исключено, что полученные результаты позволят в перспективе сделать более конкретные заключения о взаимодействии АТФ-азного и протеолитического доменов фермента и осуществить выбор

Таблица 2. Структура олигонуклеотидных праймеров, использованных в мутагенезе

Мутация	Тип праймера*	Структура праймера**	Сайт узнавания рестриктазы
T363A, D387N, D423N	f1	(5') TGG ATG GTA CAG <i>GTA CCG</i> TGG	<i>KpnI</i>
	f2	(5') AC GTT CTG CTC TGG <i>ATC CAG C</i>	<i>BamHI</i>
T363A	m1	(5') GGT AAA <i>gCt TCT CTT</i> GGT CAG TCC	<i>HindIII</i>
	m2	(3') CCA <i>TTT cGa</i> AGA GAA CCA GTC AGG	
D387N	m1	(5') GGC GGC <i>GTc CGg aAT</i> GAA GCG G	<i>Kpn2I</i>
	m2	(3') CG CCG <i>CAG GCc tTA</i> CTT CGC CTT	
D423N	m1	(5') CG CTG TTC <i>Ctt tTa aAT</i> GAG ATC GAC	<i>DraI</i>
	m2	(3') C GAC AAG <i>Gaa aAt tTA</i> CTC TAG CTG TT	
Y493F	f1	(5') A GTG CTG <i>GAT CCA</i> GAG CAG	<i>BamHI</i>
	f2	(5') AAC CTG <i>CAT GCC</i> AGA CGG TTC	<i>SphI</i>
Y493F	m1	(5') T CGC CTC <i>TCC GGa</i> TtT ACC G	<i>Kpn2I</i>
	m2	(3') CG GAG <i>AGG CCt</i> AaA TGG CTT CT	

* Праймеры типа f – фланкирующие, m – мутагенные; индексы "1" и "2" относятся к прямым и обратным праймерам соответственно.

** Выделены курсивом сайты узнавания рестриктаз; нуклеотиды, некомплементарные матричной цепи, обозначены строчным шрифтом.

между упомянутыми выше вариантами междомовой передачи сигнала.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы реактивы, соответствующие квалификации ос.ч. или х.ч.

Ферменты: эндонуклеазы рестрикции (МБИ, Литва; Boehringer Mannheim, Германия); ДНК-лигаза фага T4, РНКазы А (Boehringer Mannheim, Германия); фрагмент Кленова, *Taq*-полимераза, бактериальная щелочная фосфатаза, лизоцим яичного белка – отечественного производства.

Штаммы *E. coli*:

AB1899 [*F*⁻, *recA99*, *thr-1*, *leu-6*, *thi-1*, *lacY1*, *galK2*, *ara-12*, *xyl-5*, *mtl-1*, *proA2*, *his-4*, *argE3*, *str-31*, *tsx-33*, *lon-100*];

HB101 [*F*⁻, *hds20* (*rb*⁻, *mb*⁺), *recA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (*Smr*), *xyl-5*, *mtl-1*, *surE44*].

Мутагенез. Мутации в гене, приводящие к заменам T363A, D387N, D423N, Y493F, были введены с помощью метода [30], основанного на использовании ПЦР. Структура праймеров приведена в табл. 2.

Параллельно с мутацией в каждом случае вводили дополнительные сайты узнавания рестриктаз, что использовалось при скрининге клонов, несущих мутантные плазмиды.

Приготовление компетентных клеток, трансформацию, выделение и очистку плазмидной ДНК, обработку ДНК ферментами, электрофорез ДНК в агарозном геле проводили по стан-

дартным методикам [31]. Условия проведения ПЦР подбирали экспериментально.

Введение мутаций подтверждено секвенированием по методу Сэнгера [32].

Выделение и очистка белков. Векторные конструкции были экспрессированы в *lon*-дефицитном штамме *E. coli* AB1899. Все белки получены по общей схеме с помощью последовательной хроматографии бесклеточного экстракта на фосфоцеллюлозе P-11 и DEAE-целлюлозе как описано в работе [26].

Контроль за выделением белка осуществлялся с помощью диск-электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях [33]. Концентрацию белков в препаратах определяли по методу Брэдфорд с помощью реагента фирмы Bio-Rad.

Определение АТР-азной активности. Скорости гидролиза АТР препаратами ферментов определяли по количеству высвобождающегося в реакции свободного неорганического фосфата, детектируя поглощение при 350 нм цинк-фосфомолибдатного комплекса, образующегося после смешения реакционной смеси с реагентом [34].

Состав реагента: 15 мМ молибдат аммония, 100 мМ ацетат цинка, 1% SDS, pH 4.5.

Условия проведения реакции: 0.3–3 мМ АТР, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7.8), 20–80 мкг/мл фермента, 37°С. При изучении гидролиза АТР в присутствии белкового субстрата вводили дефосфорилированный α-казеин до концентрации 0.3 мг/мл.

Протеолитическую активность препаратов ферментов определяли по их способности гидро-

лизовать [^{14}C]ацетил- α -казеин. Условия проведения реакции были полностью идентичны условиям при определении АТР-азной активности в присутствии белкового субстрата (во всех протеолитических тестах использовали фиксированную концентрацию АТР – 2.5 мМ). Содержание фермента в реакции соответствовало области линейной зависимости скорости накопления низкомолекулярных продуктов гидролиза белкового субстрата, растворимых в 10% трихлоруксусной кислоте, от концентрации фермента.

Уровень гидролиза казеина определяли, используя стандартизованную процедуру: через равные интервалы времени из реакционной смеси отбирали аликвоты по 150 мкл, смешивали с 50 мкл 5% бычьего сывороточного альбумина и осаждали негидролизированный казеин 500 мкл 14% трихлоруксусной кислоты. После осаждения в течение ночи при 4°C осадок центрифугировали и использовали 600 мкл супернатанта для определения его радиоактивности методом жидкостного сцинтилляционного счета. В параллельном эксперименте аналогичным образом тестировали протеолитическую активность, не зависящую от присутствия АТР. По разности скоростей накопления радиоактивных продуктов в присутствии и в отсутствие АТР, с учетом удельной радиоактивности препарата субстрата, определяли скорость АТР-зависимого гидролиза казеина при данной концентрации фермента. Полученной величиной, определенной для различных концентраций фермента и отнесенной к этой концентрации, характеризовали удельную активность препаратов ферментов как количество прогидролизованного субстрата в единицу времени, приходящееся на 1 моль субъединиц фермента.

Работа была выполнена при финансовой поддержке International Science Foundation (гранты NF 8000 и NF 8300), Российского фонда фундаментальных исследований (грант 96-04-50239) и ГНТП "Новейшие методы биоинженерии" (грант 03.0004Н-342).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goldberg A.L. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 203. P. 9–23.
- Grossman A.D., Erickson J.W., Gross C.A. // Cell. 1984. V. 38. P. 383–390.
- Goff S.A., Casson L.P., Goldberg A.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6647–6651.
- Philips T.A., Van Bogelen R.A., Neidhardt F.C. // J. Bacteriol. 1984. V. 159. P. 283–287.
- Baker T.A., Grossman A.D., Gross C.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6779–6783.
- Goff S.A., Goldberg A.L. // Cell. 1985. V. 41. P. 587–595.
- Misuzawa S., Gottesman S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 358–362.
- Stout V., Torres-Cabassa A.S., Maurizi M.R., Gutton D., Gottesman S. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 1738–1747.
- Dierksen K.P., Marks J., Chen D.D., Trempy J.E. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 5126–5130.
- Van Melderen L., Thi M.H.D., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M.R. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 27730–27738.
- Gottesman S., Wickner S., Jubete Y., Singh S.K., Kessel M., Maurizi M. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1995. V. 60. P. 533–548.
- Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 869–881.
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. // EMBO J. 1982. V. 1. P. 945–951.
- Amerik A.Yu., Antonov V.K., Gorbalenya A.E., Kotova S.A., Rotanova T.V., Shimbarevich E.V. // FEBS Lett. 1991. V. 287. P. 211–214.
- Goldberg A.L., Waxman L. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 12029–12034.
- Edmunds T., Goldberg A.L. // J. Cell. Biochem. 1986. V. 32. P. 186–191.
- Menon A.S., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 14921–14928.
- Waxman L., Goldberg A.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 4883–4887.
- Menon A.S., Waxman L., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 722–726.
- Waxman L., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 12022–12028.
- Fischer H., Glockshuber R. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 22502–22507.
- Maurizi M.R. // Experientia. 1992. V. 48. P. 178–201.
- Yoshida M., Amano T. // FEBS Lett. 1995. V. 359. P. 1–5.
- Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A. // Trends Biochem. Sci. 1990. V. 15. P. 430–434.
- Dayhoff M.O. Atlas of Protein Sequence and Structure. Natl. Biom. Res. Foundation, Washington D.C., 1972.
- Ротанова Т.В., Котова С.А., Америк А.Ю., Лыков И.П., Гиноман Л.М., Антонов В.К. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 114–125.
- Fischer H., Glockshuber R. // FEBS Lett. 1994. V. 356. P. 101–103.
- Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Nakafuku M., Satoh T. // Annu. Rev. Biochem. 1991. V. 60. P. 349–400.
- Seol J.H., Baek S.H., Kang M.-S., Ha D.B., Chung C.H. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 8087–8092.
- Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K., Pease L.R. // Gene. 1989. V. 77. P. 61–68.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
- Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Bencini D.A., Wild J.R., O'Donovan G.A. // Anal. Biochem. 1983. V. 132. P. 254–258.

***In vitro* Coupling of ATP Hydrolysis to Proteolysis
in the *Escherichia coli* Protease Lon Forms Mutant in the ATPase Site**

E. E. Mel'nikov, K. B. Tsirul'nikov, L. M. Ginodman, and T. V. Rotanova

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

In order to identify amino acid residues involved in ATP hydrolysis by *Escherichia coli* protease Lon or participating in the signal transduction from the ATPase domain to the proteolytic one, potentially important residues of the ATPase domain were substituted using site-directed mutagenesis, and the properties of the resulting mutant enzymes were studied. It was found that residues K362, T363 (Walker's motif A), and D423 (motif B) are involved in the catalysis of ATP hydrolysis. K362 and T363 also participate in the system of domain-domain coupling, whereas D423 does not play a significant role in this process. Residue D387 is important for ATPase activity; however, it is not a catalytically active residue, as was earlier postulated in the literature. Residue Y493 is also involved in the signal transduction from the ATPase domain to the proteolytic one.

Key words: ATP-dependent proteolysis, protease Lon, active site, lon gene, mutagenesis, E. coli