



ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФРАГМЕНТОВ АТР-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *Escherichia coli*, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА

© 2004 г. О. В. Васильева, Н. Ю. Мартынова, Н. А. Потапенко, Т. В. Овчинникова[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 19.05.2003 г. Принята к печати 20.06.2003 г.

С целью исследования свойств функциональных доменов Lon-протеиназы *Escherichia coli* подобраны условия ограниченного протеолиза для получения фрагментов, примерно соответствующих доменам, разработан метод их выделения и проведен сравнительный анализ их функциональных характеристик. Показано, что изолированный протеолитический домен фермента (фрагмент LonP) обладает и пептидазной, и протеолитической активностями, однако скорость расщепления им крупных белковых субстратов существенно ниже, чем у полноразмерной Lon-протеиназы. Напротив, фрагмент LonAP, содержащий и АТР-азный, и протеолитический домены, почти полностью сохраняет ферментативные свойства полноразмерного белка. При этом оба фрагмента (LonP и LonAP) преимущественно образуют димеры, в отличие от нативной Lon-протеиназы, функционирующей в виде тетрамера. Полученные данные позволяют предположить, что *N*-концевой домен Lon-протеиназы играет существенную роль в процессе олигомеризации фермента.

Ключевые слова: АТР-зависимые протеиназы, Lon-протеиназа *E. coli*, ограниченный протеолиз, доменная структура.

ВВЕДЕНИЕ

Особую роль в поддержании гомеостаза и регуляции метаболизма в клетке играют олигомерные АТР-зависимые протеолитические комплексы, принадлежащие к семейству так называемых AAA-белков или АТР-аз, ассоциированных с различными активностями в клетке [1]. К настоящему времени в клетках *Escherichia coli* обнаружено пять различных АТР-зависимых протеиназ: Lon (La), ClpAP (Ti), ClpXP, FtsH (HflB) и HslVU (ClpQY) [2].

АТР-зависимая Lon-протеиназа, первая из описанных AAA-протеиназ *E. coli*, представляет собой сериновую протеиназу с химотрипсинподобной активностью [3, 4]. Фермент функционирует в виде тетрамера, образованного идентичными субъединицами, содержащими по 784 а. о. (*M* 87304 Да) [5]. Предполагается, что мономер Lon-протеиназы состоит из трех функциональных доменов [6, 7]: *N*-концевого, функция которого пока неизвестна, центрального АТР-азного, включающего участки, связывающие АТР и Mg^{2+} , так называемые мотивы Уолкера А и В [8], а также

S-концевого протеолитического, содержащего каталитически активный остаток Ser679 (рис. 1а) [9]. Наряду с этим был обнаружен участок Lon-протеиназы, ответственный за узнавание и связывание субстратов-мишеней фермента и названный субстратузнающим или SSD (sensor and substrate discrimination) доменом [10].

Согласно литературным данным, *in vivo* фермент проявляет селективность по отношению к двум типам субстратов. К первому типу относятся аномальные белки, образующиеся в результате ошибок транскрипции или трансляции, белки с третиной структурой, нарушенной в результате химического или теплового повреждения, а также чужеродные белки [6, 11, 12]. Ко второму типу относятся физиологические субстраты Lon-протеиназы, такие, как SulA, λ N-белок, RcsA, CcdA, Pem1 и UmuD – короткоживущие регуляторные белки, специфическое и быстрое расщепление которых важно для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки [13–19].

Специфичность Lon-протеиназы была исследована *in vitro* как для собственных физиологических субстратов (SulA, λ N-белок, CcdA), так и для модельных белков (глюкогон, окисленная В-цепь инсулина, казеин) [7, 14–17]. Однако механизмы узнавания субстрата и сопряжения АТР-азной и протеолитической активностей, а также другие

Сокращения: FPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография умеренного давления; ДТТ – 1,4-дитио-DL-треит; ИЭФ – изоэлектрическое фокусирование.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-44-44; факс: (095) 336-4333; эл. почта: ovch@ibch.ru).

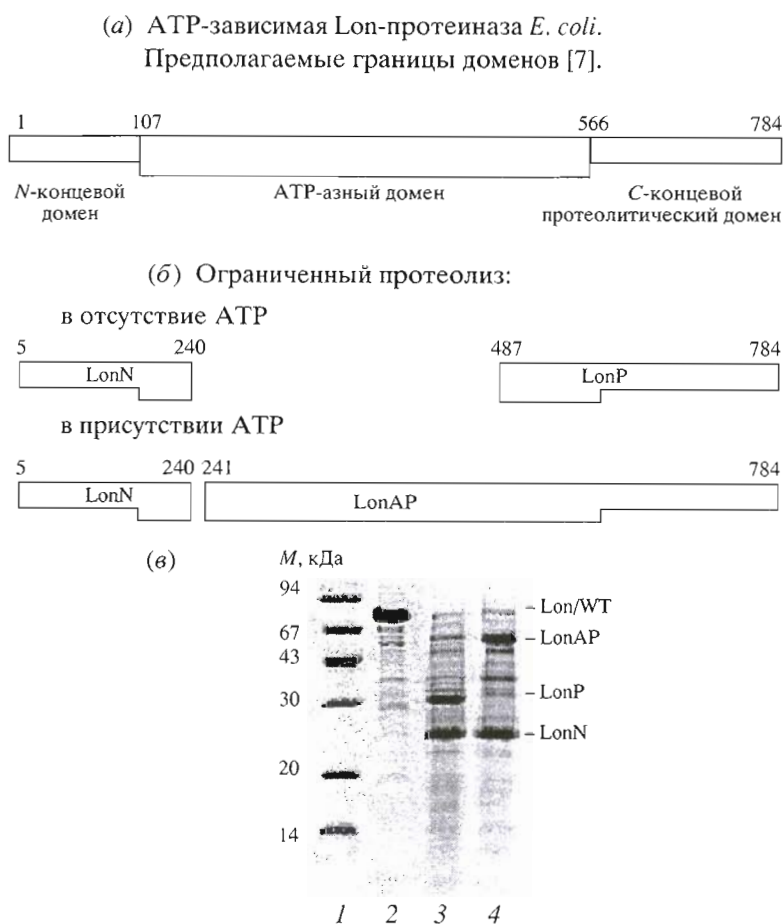


Рис. 1. Доменная структура Lon-протеиназы *E. coli*. Предполагаемые границы доменов фермента [7] (а); схема результатов ограниченного протеолиза (б); SDS-электрофорез в 15% ПААГ продуктов ограниченного протеолиза Lon-протеиназы *E. coli* (в) в отсутствие АТФ (3) и в присутствии 4 мМ АТФ (4); 1 – стандартная смесь белков-маркеров молекулярной массы для электрофореза; 2 – препарат Lon-протеиназы *E. coli*.

структурно-функциональные особенности Lon-протеиназы пока еще детально не выяснены.

Ранее нами были подобраны условия ограниченного протеолиза Lon-протеиназы, при которых молекула фермента расщепляется с образованием крупных фрагментов, соответствующих ее функциональным доменам [20]. Целью настоящей работы являлось выделение и функциональная характеристика фрагментов АТФ-зависимой Lon-протеиназы *E. coli*, полученных методом ограниченного протеолиза. Для решения поставленной задачи были использованы нативная Lon-протеиназа и ее мутантные формы, получены изолированные домены фермента и проведен сравнительный анализ их функциональных свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были найдены условия для ограниченного протеолиза нативной Lon-протеиназы (Lon/WT) протеиназой V8 из *Staphylococcus aureus* в отсутствие АТФ с образованием N-концевого

(LonN, 27 кДа) и C-концевого протеолитического (LonP, 33 кДа) доменов фермента [20]. Наряду с этим было показано, что ограниченный протеолиз Lon-протеиназы в присутствии АТФ в аналогичных условиях приводит к образованию более крупного фрагмента полипептидной цепи (LonAP, 60 кДа), содержащего как АТФ-азный, так и протеолитический домены, а также N-концевого фрагмента (LonN, 27 кДа), идентичного образующемуся при гидролизе в отсутствие АТФ (рис. 1). Аналогичные результаты были получены для мутантных форм фермента, содержащих аминокислотную замену каталитически активного Ser679 на Ala (Lon/SA), приводящую к утрате пептидгидролазной активности, и/или имеющих дополнительный C-концевой гексагистидиновый участок (Lon/SA/H6, Lon/WT/H6) [20].

Для выделения фрагментов, полученных при ограниченном протеолизе нативной Lon-протеиназы и ее мутантных форм, были использованы методы препаративного изоэлектрического фо-

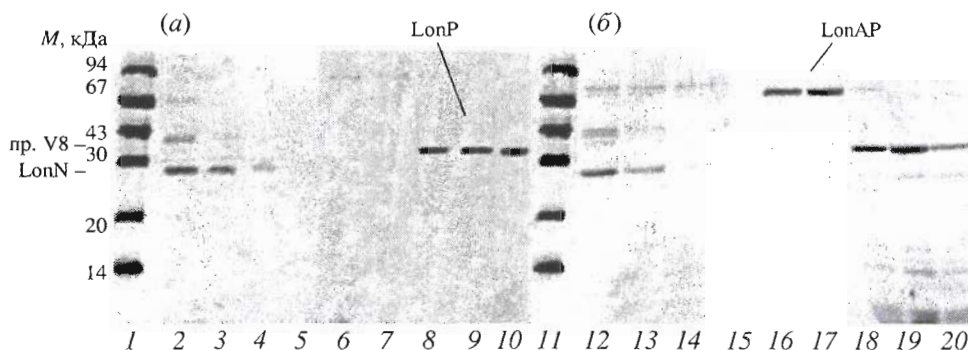


Рис. 2. SDS-электрофорез в 15% ПААГ последовательных фракций, полученных после разделения методом препаративного ИЭФ продуктов ограниченного протеолиза Lon-протеиназы *E. coli*, проведенного в отсутствие АТФ (а) и в присутствии 4 мМ АТФ (б): 8–10 – LonP/WT; 16, 17 – LonAP/WT; 1, 11 – стандартная смесь белков-маркеров молекулярной массы для электрофореза.

кусирования в растворе, катионообменной и металл-хелатной хроматографий.

С помощью препаративного изоэлектрического фокусирования в растворе были выделены фрагменты LonP/WT и LonAP/WT из гидролизата нативной протеиназы Lon/WT, а также фрагменты LonP/SA и LonAP/SA из гидролизата мутантной формы фермента Lon/SA. Условия для разделения продуктов гидролиза были подобраны с помощью аналитического ИЭФ в ПААГ, исходя из теоретически рассчитанных изоэлектрических точек фрагментов, подлежащих разделению (LonP – *pI* 7.51, LonAP – *pI* 7.27, LonN – *pI* 5.22). При этом учитывалось, что *pI* протеиназы V8 из *S. aureus*, использованной для ограниченного протеолиза фермента, составляет 4.91. При создании градиента в узком диапазоне pH от 6.0 до 7.2 удалось достичь хорошего разделения продуктов гидролиза. Препаративное ИЭФ было проведено в растворе в условиях, аналогичных аналитическому разделению. Полученные после препаративного ИЭФ фракции анализировали методом SDS-электрофореза в 15% ПААГ. При этом протеиназа V8 из *S. aureus* (*pI* 4.91) и N-концевой фрагмент Lon-протеиназы LonN (*pI* 5.22), как и следовало ожидать, были обнаружены в первых фракциях, тогда как интересующие нас фрагменты LonP (*pI* 7.51) и LonAP (*pI* 7.27) фокусировались в более поздних фракциях (рис. 2а, б). Однако при этом искомые фрагменты, концентрируясь в области значений pH, близких к собственной изоэлектрической точке, частично выпадали в осадок, что существенно снижало их выход.

В качестве альтернативного метода разделения продуктов гидролиза Lon-протеиназы (нативной Lon/WT и мутантной Lon/SA) была использована ионообменная FPLC-хроматография. Были найдены условия хроматографического разделения на колонке HR5/5 с катионообменником Mono S (рис. 3а), при которых ~95% белков выходили со свободным объемом колонки, а искомые

белки удерживались на колонке и затем элюировались градиентом концентрации соли от 0 до 0.5 М NaCl. Степень чистоты выделенных этим методом фрагментов LonP и LonAP составляла не менее 99% (рис. 3б).

Наряду с этим из мутантных форм фермента, имеющих дополнительные C-концевые гексагистидиновые участки (Lon/WT/H6), методом ограниченного протеолиза в отсутствие и в присутствии АТФ были получены и выделены фрагменты LonP/WT/H6 и LonAP/WT/H6, соответствующие фрагментам LonP/WT и LonAP/WT нативного фермента. Разделение проводили с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе по стандартной методике [21, 22]. Контроль за разделением осуществляли с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ (рис. 4).

Молекулярную массу и гомогенность выделенных фрагментов оценивали с помощью масс-спектрометрии (рис. 5) и определения N-концевой аминокислотной последовательности.

Сравнение эффективности методов, использованных для выделения искомых фрагментов Lon-протеиназы, свидетельствовало в пользу катионообменной хроматографии (табл. 1). Этот метод и был выбран для препаративного выделения

Таблица 1. Выход фрагментов Lon-протеиназы при использовании различных методов выделения

Метод выделения	Фрагмент Lon-протеиназы	Выход, %
Препаративное изоэлектрофокусирование в растворе	LonP/WT	7
	LonAP/WT	9
Ионообменная хроматография	LonP/WT	15
	LonAP/WT	18
Металл-хелатная хроматография	LonP/WT/H6	10
	LonAP/WT/H6	12

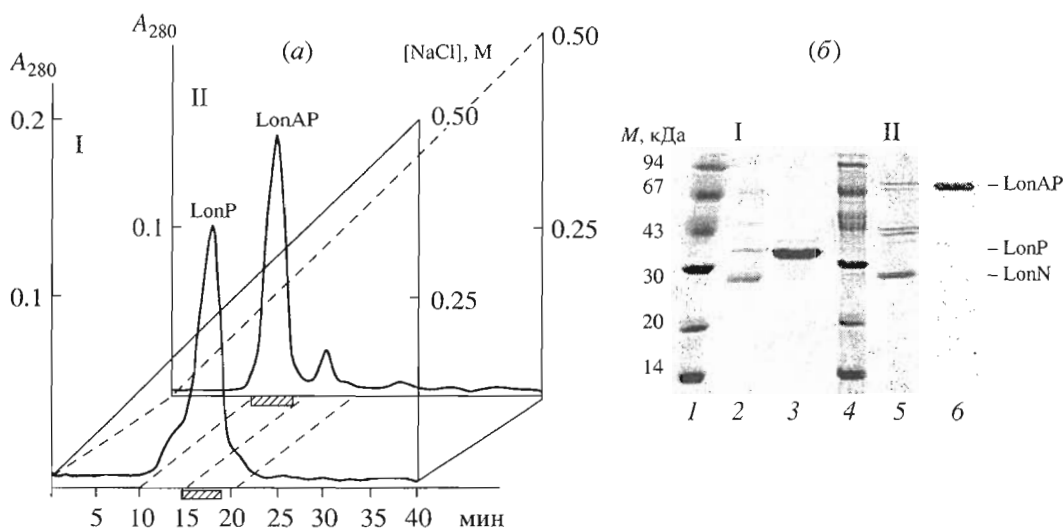


Рис. 3. FPLC-хроматография на колонке Mono S HR5/5 продуктов ограниченного протеолиза Lon-протеиназы *E. coli* (а), проведенного в отсутствие АТФ (I) и в присутствии 4 мМ АТФ (II). Фракции, содержащие LonP/WT (I) и LonAP/WT (II), заштрихованы. SDS-электрофорез в 15% ПААГ полученных белковых фракций (б); 2, 5 – проскок; 3 – LonP/WT; 6 – LonAP/WT; 1, 4 – стандартная смесь белков-маркеров молекулярной массы для электрофореза.

фрагментов, соответствующих функциональным доменам фермента.

Выделенные фрагменты LonP/WT и LonAP/WT были протестированы на наличие протеолитической и пептидазной активностей, а для фрагмента LonAP/WT определялась также и АТФ-азная активность. Результаты сравнительной функциональной характеристики нативной и мутантных форм исходных полноразмерных ферментов и их фрагментов представлены в табл. 2. Очевидно, что удаление *N*-концевого домена практически не оказывает влияния на ферментативные свойства укороченной Lon-протеиназы, поскольку фрагмент LonAP практически полностью сохраняет АТФ-азную активность

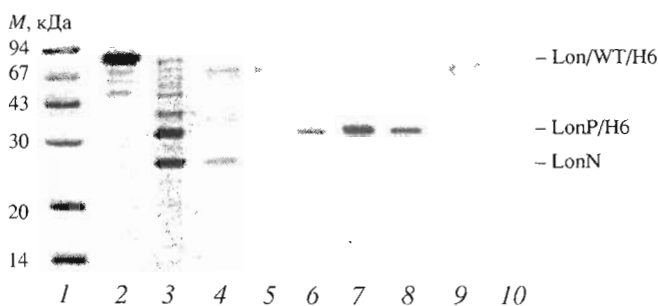


Рис. 4. SDS-электрофоретический анализ в 15% ПААГ фракций, полученных после разделения на Ni-NTA-агарозе продуктов ограниченного протеолиза мутантной Lon-протеиназы LonP/WT/H6 в отсутствие АТФ: 1 – стандартная смесь белков-маркеров молекулярной массы для электрофореза; 2 – препарат LonP/WT/H6; 3 – исходный гидролизат; 4 – проскок; 5–10 – фракции, последовательно элюируемые с колонки.

(рис. 6а), характерную для нативного фермента, а также сравнительно близкую протеолитическую (рис. 6б, 7б) и пептидазную активности.

Исследование олигомерной структуры фрагмента LonAP/WT показало, что он в основном образует димер (рис. 8, табл. 3), в отличие от полноразмерной Lon-протеиназы, для которой характерно преимущественное образование тетрамера. Полученные данные позволяют предположить, что *N*-концевой домен Lon-протеиназы играет существенную роль в процессе олигомеризации фермента. Нарушение олигомерной структуры при отщеплении *N*-концевого домена может являться причиной некоторого снижения протеолитической активности LonAP/WT по сравнению с полноразмерным ферментом.

Одновременное удаление *N*-концевого и АТФ-азного доменов из молекулы фермента LonP/WT с образованием *C*-концевого фрагмента LonP/WT приводит к значительному снижению его протеолитической активности. Количество β -казеина, расщепленного фрагментом LonP/WT, составило не более 13% от количества β -казеина, расщепленного в аналогичных условиях полноразмерным ферментом LonP/WT (табл. 2, рис. 7а). Очевидно, что протеолитические свойства изолированного LonP-домена значительно ослаблены. Пептидазная же активность фрагмента LonP/WT при этом сохраняется (табл. 2). Данные по изучению олигомерной структуры LonP/WT показывают, что фрагмент также преимущественно склонен к образованию димерных комплексов в отличие от полноразмерного фермента, образующего в основном тетрамеры (рис. 8, табл. 3). Таким образом, нарушение олигомерной структуры не

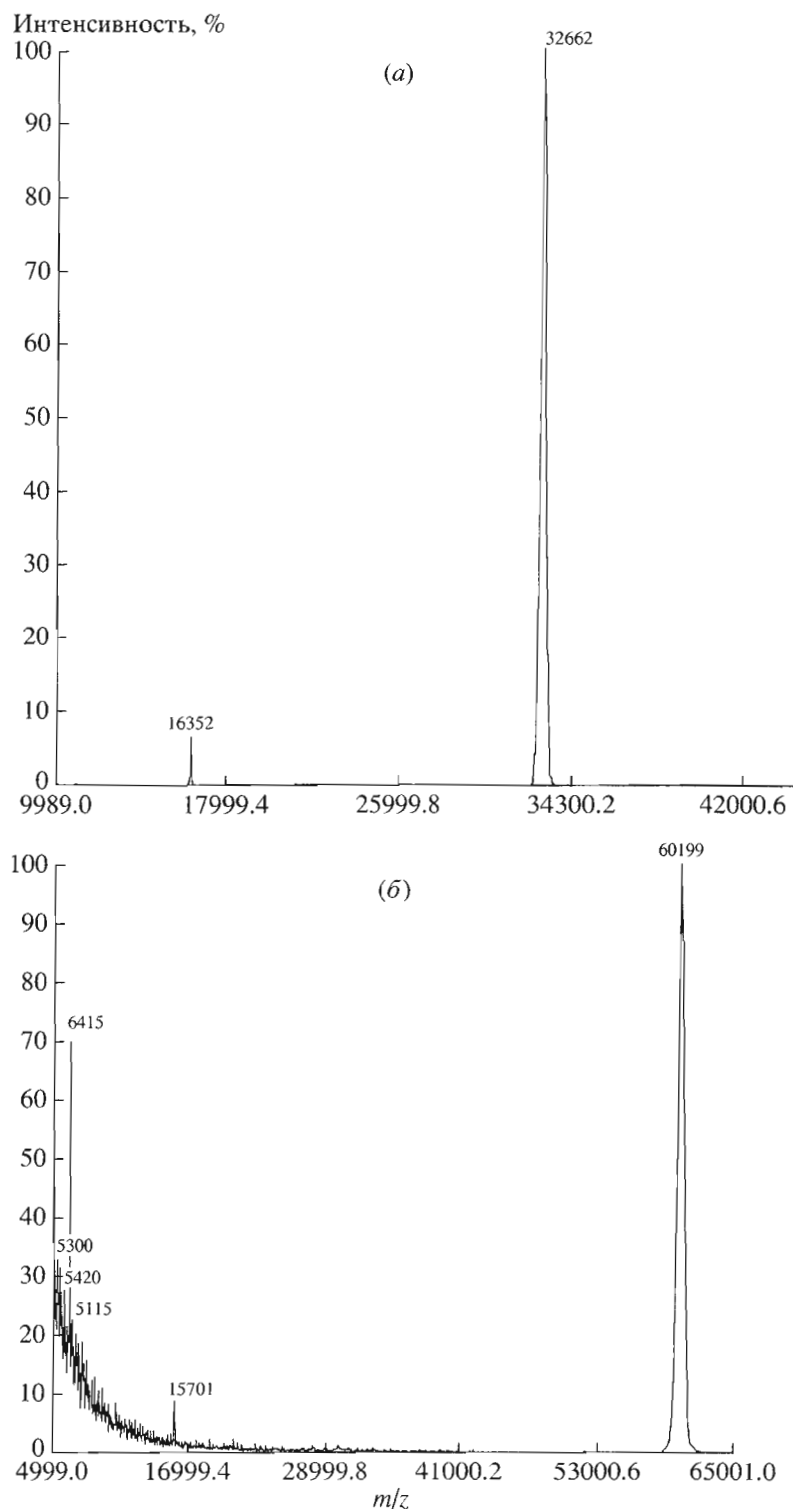


Рис. 5. Масс-спектры выделенных фрагментов Lon-протеиназы *E. coli*, полученные на приборе Applied Biosystems MALDI-TOF Voyager System 122: (а) – LonP/WT (32662 Да); (б) – LonAP/WT (60199 Да).

оказывает существенного влияния на проявление пептидазной активности фермента.

Интересно отметить, что ни полноразмерный фермент Lon/WT, ни фрагмент LonAP/WT не про-

являют протеолитическую активность в отсутствие АТФ в отличие от изолированного домена LonP/WT, обладающего в отсутствие АТФ высокой протеолитической активностью (табл. 2,

Таблица 2. Ферментативная активность Lon-протеиназы *E. coli* и ее фрагментов

Препарат	Протеолитическая активность (субстрат – β -казеин), кол-во расщепленного казеина, %		Пептидазная активность (субстрат – мелиттин)		АТФ-азная активность, мкМ/мин. P_i
	+АТФ	-АТФ	+АТФ	-АТФ	
Lon/WT	100	0	+	+	17.1 ± 0.2
Lon/SA	0	0	-	-	16.9 ± 0.2
LonAP/WT	76	0	+	+	13.4 ± 0.2
LonAP/SA	0	0	-	-	13.2 ± 0.2
LonP/WT	13	13	+	+	-
LonP/SA	0	0	-	-	-

рис. 6б). Это может быть связано с тем, что пространственная структура как полноразмерного фермента, так и фрагмента LonAP/WT претерпевает конформационную перестройку в ответ на введение в систему АТФ, что было показано нами ранее [20]. Можно предположить, что при АТФ-индуцированном изменении конформации фермента протеолитический центр переходит в активную форму, становясь более доступным для крупных белковых субстратов. Изолированный же протеолитический домен (LonP/WT), по-видимому, не обладает подобной системой “разблокировки” протеолитического центра, поэтому расщепление белковых субстратов идет малоэффективно, с низкой скоростью как в присутствии, так и в отсутствие АТФ без изменения конформации протеолитического домена. В пользу этого предположения косвенно свидетельствует тот факт, что значение протеолитической активности изолированного фрагмента LonP/WT является постоянной величиной и не зависит от наличия или отсутствия в системе АТФ (табл. 2).

Совокупность полученных данных позволяет сделать ряд предположений о роли каждого из

функциональных доменов Lon-протеиназы. Поскольку изолированный протеолитический домен полностью не утрачивает способности гидролизовать белковые субстраты не только в присутствии, но и в отсутствие АТФ, можно сделать вывод, что ни *N*-концевой, ни АТФ-азный домены, ни наличие в системе АТФ не являются абсолютными необходимыми для проявления протеолитической активности фермента. Это может означать, что *C*-концевой домен фермента обладает свойствами слабой протеиназы, а *N*-концевой и АТФ-азный домены обеспечивают тонкую регуляцию его активности. Поскольку изменение конформации АТФ-азного домена в ответ на введение в систему АТФ оказывает влияние на эффективность работы протеолитического центра, очевидно, что АТФ выполняет регуляторную функцию при проявлении ферментом протеолитической активности. Такое АТФ-индуцированное изменение конформации фермента проявляется в увеличении скорости расщепления крупных белковых субстратов. Роль АТФ при расщеплении белковых субстратов остается невыясненной. Так как гидролиз пептидной связи термодинамически выгоден и не

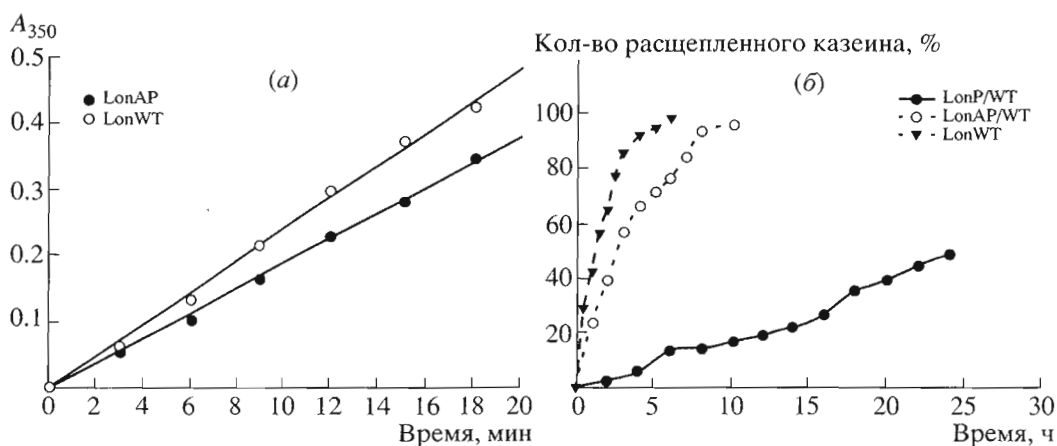


Рис. 6. АТФ-азная (а) и протеолитическая активности (б) Lon-протеиназы и ее фрагментов.

требует затраты энергии, можно предположить, что гидролиз АТР необходим для разворачивания молекулы субстрата и обеспечения его оптимального взаимодействия с протеолитическим центром. В пользу этого предположения свидетельствуют недавно опубликованные данные о проявлении АТР-независимой протеолитической активности Lon-протеиназы *Archaea* по отношению к развернутым белкам и АТР-зависимой активности этого же фермента по отношению к свернутым белкам с нормальным фолдингом [23].

Что касается роли *N*-концевого домена, нами было показано, что его отсутствие незначительно снижает протеолитическую активность фермента, но существенно влияет на олигомерную структуру фермента. Таким образом, *N*-концевой домен предположительно участвует в формировании и стабилизации тетрамерного комплекса полноразмерной Lon-протеиназы, обеспечивающего наиболее эффективную работу фермента.

Полученные данные показывают, насколько сложна система междоменных взаимодействий при функционировании Lon-протеиназы. Детальное выяснение роли каждого функционального домена фермента открывает путь к пониманию сложного механизма АТР-регулируемого протеолиза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы реактивы: акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, SDS, β-меркаптоэтанол, TEMED, глицин, буферные растворы RotoLytes pH 6.0–7.2 (Bio-Rad, США); калий фосфорнокислый одно- и двузамещенный, хлорид натрия, хлорид магния, Трис, DTT (Fluka, Швейцария); АТР, протеиназа V8 из *S. aureus*, β-казеин, BSA, ацетат цинка, молибдат аммония (Sigma, США); стандартная смесь белков для электрофореза (Amersham Biosciences, Великобритания). Все остальные реагенты – отечественного производства квалификации не ниже “х. ч.”.

Для получения Lon-протеиназы (Lon/WT) клетки штамма *E. coli* BL21, в которых отсутствует ген *lon*, трансформировали плазмидным вектором pLON, содержащим полноразмерный ген *lon* с собственными регуляторными элементами [24]. Биосинтез мутантных форм Lon-протеиназы: Lon/SA, Lon/SA/H6 и Lon/WT/H6, содержащих аминокислотную замену Ser679Ala и/или гексагистидиновый пептид в *C*-концевой части молекулы, осуществляли в клетках *E. coli* BL21, трансформированных плазмидными векторами pLON/SA, pLON/SA/H6 и pLON/WT/H6 соответственно по описанной ранее методике [20]. Плазмиды были любезно предоставлены проф. Р. Глоксубером, Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Цюрих, Швейцария.

Выделение и очистку препаратов Lon/WT и Lon/SA проводили по описанной ранее методике

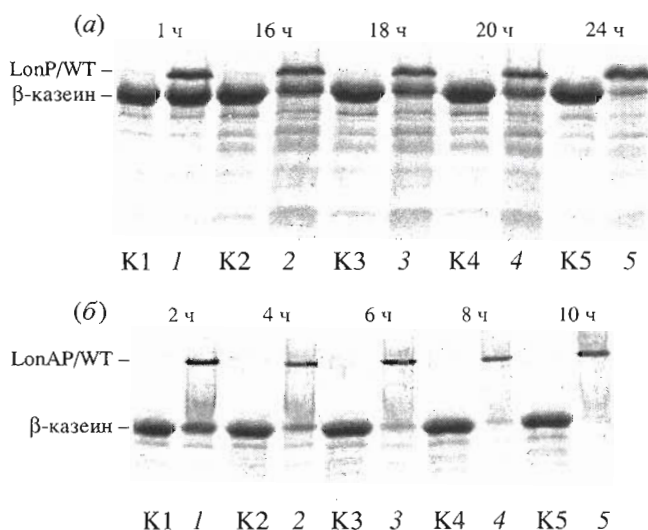


Рис. 7. Протеолитическая активность фрагментов LonP/WT (а) и LonAP/WT (б), определенная по степени гидролиза β-казеина. Гидролиз β-казеина фрагментом LonP/WT в течение 1–24 ч (а, 1–5). Гидролиз β-казеина фрагментом LonAP/WT в течение 2–10 ч (б, 1–5). K1–K5 – контроль по инкубации β-казеина в аналогичных условиях без добавления исследуемых фрагментов Lon-протеиназы.

[20]. Мутантные формы Lon/WT/H6 и Lon/SA/H6 выделяли с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе [21, 22].

Концентрацию очищенного препарата белка измеряли по методу Бредфорд [25], используя в качестве стандарта BSA.

Протеолитическую активность Lon-протеиназы и ее мутантных форм измеряли по степени гидролиза β-казеина, которую контролировали с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ по методу Лэммли [26]. Полученные электрофореграммы сканировали с помощью лазерного денситометра “Ultrosan Laser Densitometer” (LKB, Швеция). Условия проведения экспериментов: 50 мМ Трис-НСl-буфер, pH 8.0, 37°C, [АТР] 2.5 мМ; [Mg²⁺] 15 мМ; [S] 1.6 × 10⁻⁵ М; [E] 1.5 × 10⁻⁶ М. Время инкубации до 24 ч, пробы отбирали через каждые 30 мин.

Пептидазную активность оценивали методом масс-спектрометрии продуктов гидролиза мелиттина. Условия проведения экспериментов: 50 мМ Трис-НСl-буфер, pH 8.0, 37°C, [АТР] 2.5 мМ; [Mg²⁺] 15 мМ; [S] 1.7 × 10⁻⁴ М; [E] 1.15 × 10⁻⁶ М. Время инкубации до 24 ч, пробы отбирали через каждые 30 мин.

АТР-азную активность определяли по количеству высвобождающегося при гидролизе АТР неорганического фосфата, детектируемого спектрофотометрически (λ 350 нм) с помощью реакции с молибдатом аммония и ацетатом цинка [27]. Условия проведения экспериментов: 50 мМ Трис-НСl-буфер, pH 8.0, 37°C, [АТР] 2.5 мМ; [Mg²⁺]

Таблица 3. Определение олигомерной структуры Lon-протеиназы и ее фрагментов методом гель-фильтрации

Препарат	Мол. масса субъединицы, кДа	Время выхода, мин	lg(M, кДа)	M, кДа	Число субъединиц
LonWT	87	26	2.58	380.18	~4 (4.3)
LonP	33	40	1.82	66.07	2 (2.0)
LonAP	60	34	2.16	134.5	~2 (2.2)

15 мМ; [E] 0.3×10^{-6} М. Время инкубации до 20 мин, пробы отбирали через каждые 3 мин.

Ограниченный протеолиз Lon-протеиназы и ее мутантных форм был осуществлен с использованием протеиназы V8 из *S. aureus* в подобранных ранее условиях [20, 28] при соотношении фермент-субстрат 1 : 50, температуре 30°C в течение 18 ч в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ DTT, 5% глицерина (рН 8.0), в отсутствие и в присутствии 4 мМ АТФ и 15 мМ MgCl₂.

Контроль за ходом ограниченного протеолиза Lon-протеиназы и ее мутантных форм осуществляли с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ по методу Лэммли [26].

Препаративное изоэлектрическое фокусирование в растворе проводили на приборе Rotofor (Bio-Rad) в системе буферных растворов Rotolytes (Bio-Rad) диапазона рН 6.0–7.2. Процесс вели при постоянной мощности 15 Вт в течение 4 ч. Полученные фракции анализировали с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ по методу Лэммли [26].

Ионообменную FPLC-хроматографию проводили на колонке Mono S HR5/5 (Pharmacia, Швеция). Гидролизат наносили в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 6.8 с 1 мМ DTT и 5% глицерина. Белок смывали линейным градиентом 0–0.5 М NaCl в описанном буфере в течение 30 мин, при скорости потока 1 мл/мин, и собранные фракции анализировали с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ по методу Лэммли [26].

Разделение гидролизата мутантных форм фермента Lon/WT/H6 и Lon/SA/H6 осуществляли на Ni-NTA-агарозе по стандартной методике [21, 22].

Определение N-концевых аминокислотных последовательностей. Выделенные фрагменты Lon-протеиназы переносили на мембраны иммобилона-Р электроблоттингом в 0.025 М NaHCO₃ буферном растворе (рН 9.0), содержащем 20% метанола и 0.1% SDS, в течение 2 ч при 15°C и постоянном токе 400 мА. Мембрану промывали метанолом, а белковые полосы детектировали окрашиванием 0.1% раствором амидочерного 10Б в 45% метаноле. Аминокислотную последовательность выделенных фрагментов определяли с помощью автоматического секвенатора Procise 491 cLC Protein Sequencing System, Applied Biosystems (США).

Исследование олигомерной структуры Lon-протеиназы и ее фрагментов проводили методом гель-фильтрации на колонке Superose 6 (Pharmacia, Швеция) в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.0, содержащем 1 мМ DTT, 5% глицерина. Колонку калибровали смесью стандартных маркеров (кДа): гемоглобин (65), альдолаза (158), каталаза (232), ферритин (440), тиреоглобулин (669), голубой декстран (2000).

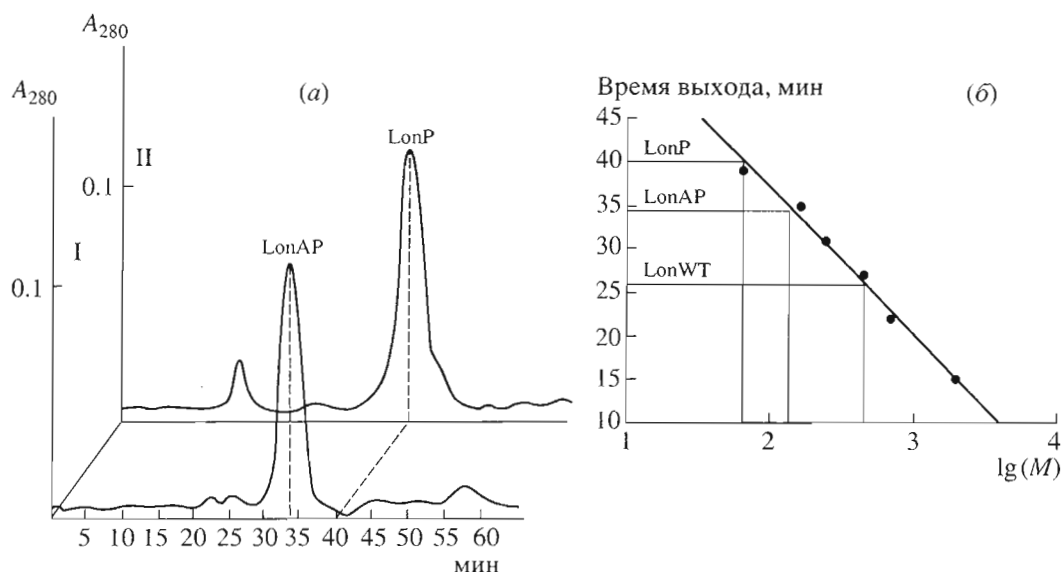


Рис. 8. Исследование олигомеризации фрагментов Lon-протеиназы методом гель-фильтрации на колонке с Superose 6 (а): LonAP/WT (I) и LonP/WT (II). Калибровочный график для определения молекулярной массы методом гель-фильтрации на колонке с Superose 6 (б).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность к.х.н. Т.В. Ротановой за сотрудничество при освоении методики выделения Lon-протеиназы, д.х.н. Л.М. Гиноману за постоянное внимание к данной работе, а также проф. Р. Глоксуберу (Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Цюрих, Швейцария) за предоставленные плазмиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. // *Genome Res.* 1999. V. 9(1). P. 27–43.
2. Gottesman S. // *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli* / Eds E.C.C. Lin, A. Simon Lynch. RG Landers Co., 1996. P. 503–519.
3. Goldberg A.L., Swamy K., Chung C., Larimore F. // *Meth. Enzymol.* 1981. V. 80. P. 680–702.
4. Goldberg A.L., Morschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 244. P. 350–375.
5. Chin D.T., Goff S.A., Webster T., Smith T., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263(24). P. 11718–11728.
6. Maurizi M.R. // *Experientia.* 1992. V. 48. P. 178–201.
7. 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.
8. Yoshida M., Amano T. // *FEBS Lett.* 1995. V. 359(1). P. 1–5.
9. Amerik A.Yu., Antonov V.K., Gorbalenya A.E., Kotova S.A., Rotanova T.V., Shimbarevich E.V. // *FEBS Lett.* 1991. V. 287(1–2). P. 211–214.
10. Smith C.K., Baker T.A., Sauer R.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 6678–6682.
11. Goldberg A.L. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 203. P. 9–23.
12. Gottesman S., Maurizi M.R. // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56(4). P. 592–621.
13. Mizusawa S., Gottesman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. P. 358–362.
14. Melderer L.V., Thi M.H.D., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 27730–27738.
15. Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 2696–2703.
16. Tsuchimoto S., Nishimura Y., Ohtsubo E. // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 4205–4211.
17. Nishii W., Maruyama T., Matsuoka R., Muramatsu T., Takahashi K. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269(2). P. 451–457.
18. Torres-Cabbasa A.S., Gottesman S. // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 981–989.
19. Gonzales M., Frank E.G., Levine A.S., Woodgate R. // *Genes & Development.* 1998. V. 12. P. 3889–3899.
20. Vasilyeva O.V., Kolygo K.B., Leonova Y.F., Potapenko N.A., Ovchinnikova T.V. // *FEBS Lett.* 2002. V. 526. P. 66–70.
21. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A. // *J. Chromatography.* 1987. V. 411. P. 177–184.
22. Lu T., van Dyke M., Sawadogo M. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 213. P. 318–322.
23. Fukui T., Eguchi T., Atomi H., Imanaki T. // *J. Bacteriology.* 2002. V. 184. P. 3689–3698.
24. Fischer H., Glockshuber R. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 30. P. 22502–22507.
25. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 73. P. 248–254.
26. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Мельников Э.Э., Цирюльников К.Б., Гиноман Л.М., Ротанова Т.В. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. С. 293–299.
28. Vasilyeva O.V., Potapenko N.A., Ovchinnikova T.V. // *Vestnik MSU. Ser. 2. Chemistry.* 2000. V. 41. P. 124–126.

Isolation and Characterization of Fragments of the ATP-Dependent Protease Lon from *Escherichia coli* Obtained by Limited Proteolysis

O. V. Vasil'eva, N. Yu. Martynova, N. A. Potapenko, and T. V. Ovchinnikova[#]

[#]Phone: +7 (095) 336-4444; fax: +7 (095) 336-4333; e-mail: ovch@ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Conditions of limited proteolysis of the protease Lon from *Escherichia coli* that provided the formation of fragments approximately corresponding to the enzyme domains were found for studying the domain functioning. A method of isolation of the domains was developed, and their functional characteristics were compared. The isolated proteolytic domain (LonP fragment) of the enzyme was shown to exhibit both peptidase and proteolytic activities; however, it cleaved large protein substrates at a significantly lower rate than the full-size protease Lon. On the other hand, the LonAP fragment, containing both the ATPase and the proteolytic domains, retained almost all of the enzymatic properties of the full-size protein. Both LonP and LonAP predominantly form dimers unlike the native protease Lon functioning as a tetramer. These results suggest that the N-terminal domain of protease Lon plays a considerable role in the process of the enzyme oligomerization. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: ATP-dependent proteases, protease Lon from E. coli, limited proteolysis, domain structure