



УДК 577.152.342*153.02

СОПРЯЖЕНИЕ ПРОТЕОЛИЗА И ГИДРОЛИЗА АТФ ПРИ ФУНКЦИОНИРОВАНИИ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *Escherichia coli*.

I. КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГИДРОЛИЗА АТФ

© 2000 г. Э. Э. Мельников, К. Б. Цирульников, 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 24.01.2000 г. Принята к печати 02.03.2000 г.

Исследован ряд аспектов проявления АТФ-азной функции Lon-протеиназы *Escherichia coli* вблизи оптимального значения рН. Выявлено, что в отсутствие белкового субстрата максимальная АТФ-азная активность фермента наблюдается при эквимольном соотношении АТФ и ионов Mg^{2+} в области их миллимолярных концентраций. Свободные компоненты субстратного комплекса $(ATP-Mg)^{2-}$ ингибируют АТФ-азную активность фермента. Высказано предположение, что эффекторное действие свободных ионов Mg^{2+} вызывается образованием "ADP-Mg-формы" АТФ-азных центров. Показано, что активация гидролиза АТФ в присутствии белкового субстрата сопровождается увеличением сродства комплекса $(ATP-Mg)^{2-}$ к ферменту, устранением ингибирующего действия свободных ионов Mg^{2+} без изменения эффективности катализа гидролиза АТФ (по значению k_{cat}), а также изменением типа ингибирования гидролиза АТФ комплексом $(ADP-Mg)^-$ (без изменения значения K_i). Прямым экспериментом продемонстрировано взаимодействие белкового субстрата Lon-протеиназы с областью фермента, локализованной вне пептидгидролазного центра.

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

ВВЕДЕНИЕ

Биологическое значение внутриклеточных протеиназ определяется двумя функциями этих ферментов: регуляторной и деструктивной. В первом случае протеиназы осуществляют процессинг белков и контролируют содержание в клетке регуляторных белков. Во втором случае протеолиз позволяет устранять нефункциональные "балластные" белки, синтезирующиеся, например, при ошибочной экспрессии генов или в результате временного пребывания организма в состоянии стресса, а также чужеродные белки, образующиеся в инфицированных клетках. Деструктивный протеолиз носит защитный характер и обеспечивает организм аминокислотным и пептидным материалом.

Установлено, что ключевую роль и у прокариот, и у эукариот при внутриклеточном протеолизе играют энергозависимые ферменты, протеолитическая активность которых сопряжена с гидролизом АТФ. Эти протеиназы стиличаются сложной структурной организацией и исполняют, по-видимому, комплексную функцию – и деструктивную и регуляторную. Наиболее подробно АТФ-зависимый протеолиз изучен в клетках *Escherichia coli* [1–3]. У этого микроорганизма главная роль в

АТФ-зависимом расщеплении белков принадлежит Lon-протеиназе (КФ 3.4.21.53), относящейся к группе белков теплового шока [4–7].

В клетках *E. coli* Lon-протеиназа осуществляет быструю селективную деградацию дефектных и некоторых короткоживущих регуляторных белков. Известен ряд эндогенных субстратов Lon-протеиназы: SulA, RcsA, CcdA [8–11] и др. К настоящему времени обнаружено около 20 представителей Lon-протеиназ из эволюционно удаленных источников [12].

Lon-протеиназа *E. coli* (далее Lon-протеиназа, Lon) – гомотетраммерный белок с молекулярной массой субъединицы 87400 [13, 14]. Субъединица фермента имеет доменную организацию и включает: N-концевой домен (N), функция которого в настоящее время не определена; центральный АТФ-азный домен (A); C-концевой протеолитический домен (P) с каталитически активным остатком Ser679 [15].

Фермент является уникальной по строению протеолитического центра сериновой протеиназой, активность которой сопряжена с гидролизом АТФ [12, 16–20]. Гидролиз белковых субстратов ферментом осуществляется по процессивному механизму с образованием пептидов определенного размера без высвобождения промежуточных продуктов [17].

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

Несмотря на относительные успехи в изучении АТР-зависимых протеиназ методами биохимической генетики на клеточном уровне, основные молекулярно-энзимологические проблемы, общие для этих ферментов, во многом не решены и представляют собой актуальную научную задачу. Наиболее важное значение имеют вопросы, связанные с выяснением принципов узнавания этими ферментами своих субстратов (проблема селективности) и принципов сопряжения гидролиза АТР и протеолиза (проблема сопряжения).

Имеющиеся данные [1–3, 21] позволяют рассматривать АТР-азную функцию Lon-протеиназы как регуляторную. Однако исследования, устанавливающие закономерности этой регуляции [18, 22] единичны и недостаточны. Согласно одному из представлений, развиваемому в связи с проблемой селективности и утвердившемуся в настоящее время [23, 24], посредством гидролиза АТР регулируется протеолитическая активность фермента. При этом ключевым фактором такой регуляции является белковый субстрат, в отсутствие которого фермент находится в протеолитически неактивной “АДР-форме”. Связывание с Lon-протеиназой белка-субстрата не только обуславливает переход фермента в протеолитически активную “АТР-форму”, но и активирует гидролиз АТР. Таким образом деградации Lon-протеиназой будут подвергаться только те белки, которые способны активировать гидролиз АТР.

В настоящей работе с учетом принципиальной важности АТР-азной функции Lon-протеиназы исследованы причины понижения АТР-азной активности фермента в отсутствие белка-субстрата, характер активации гидролиза АТР при протеолизе, а также возможное ингибирующее действие продукта гидролиза АТР – аденозиндифосфата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных экспериментах для регистрации АТР-азной активности Lon-протеиназы был использован метод спектрофотометрического определения неорганического фосфата по образованию цинк-фосфомолибдатного комплекса [25].

В стандартных условиях (50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 7.8, 100 мМ NaCl, 5% глицерин – буфер А, 37°C) фермент проявляет свойства медленной АТР-азы с удельной активностью 20–30 моль Р_i мин⁻¹ моль⁻¹ белка (базовая активность). При насыщающей концентрации белка-субстрата в этих условиях АТР-азная активность фермента увеличивается примерно в 2.5 раза (удельная активность – 50–70 моль Р_i мин⁻¹ моль⁻¹ белка). При этом активация гидролиза АТР осуществляется в контакте с белком-субстратом, а не продуктами его гидролиза, и не связана с функционированием пептидгидролазных центров фермента: эффект

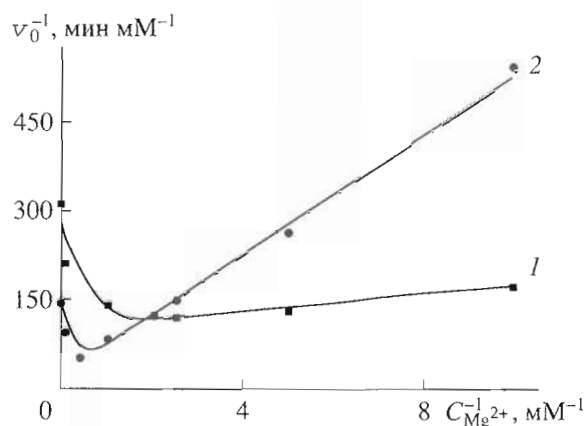


Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза АТР Lon-протеиназой от общей концентрации ионов Mg^{2+} в отсутствие белкового субстрата. Условия: буфер А, рН 7.8; 37°C. Концентрации: Lon – 0.64 мкМ; АТР – 0.4 (1) или 2.5 мМ (2).

наблюдается при взаимодействии белка-субстрата с протеолитически неактивной формой Lon-протеиназы с мутацией по каталитически активному остатку Ser679 в протеолитическом центре (Lon-S679A) [15, 26]. В то же время гидролиз ферментом низкомолекулярных пептидных субстратов не сопровождается изменением АТР-азной активности [16].

Вероятной причиной ускорения гидролиза АТР при связывании белка-субстрата с ферментом может быть увеличение эффективности нуклеотидного обмена и/или активация каталитического аппарата его АТР-азных центров.

Зависимость АТР-азной активности от содержания ионов Mg^{2+} . Ионы Mg^{2+} играют роль необходимого активатора гидролиза АТР Lon-протеиназой (в отсутствие этих ионов АТР не гидролизуется). Максимальная АТР-азная активность (рис. 1) наблюдается при соотношении $C_{АТР} : C_{Mg} 1 : 1$ ($K_{d(АТР-Mg)^{2-}} \approx 10^{-5}$ М). Наличие свободных ионов Mg^{2+} ($C_{Mg} > C_{АТР}$) или свободного АТР ($C_{Mg} < C_{АТР}$) приводит к ингибированию гидролиза АТР в отсутствие белка-субстрата.

Ингибирование как свободным нуклеотидом, так и ионами Mg^{2+} может быть объяснено тривиальной конкуренцией между субстратом (комплексом $(АТР-Mg)^{2-}$) и свободными компонентами при связывании в АТР-азном центре фермента (схема 1а).

С другой стороны, эффект ингибирования гидролиза АТР свободными ионами Mg^{2+} должен проявляться, если предположить возможность связывания этих ионов с промежуточной “АДР-формой” фермента ЕР (схема 1б). В этом случае высвобождение АДР из АТР-азного центра фермента – стадия, которой предшествует высвобождение ионов

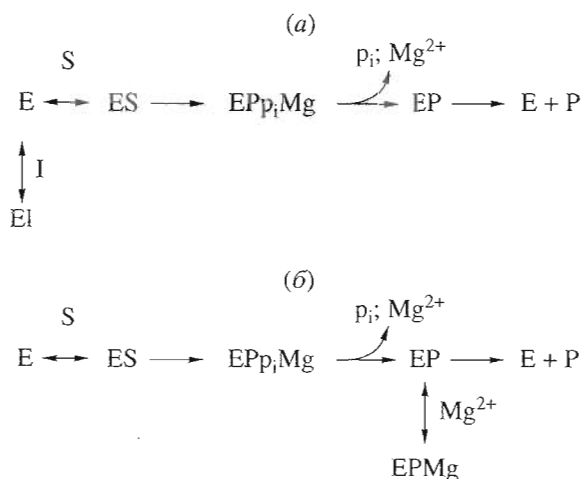


Схема 1. Ингибирование в отсутствие белка-активатора гидролиза АТФ Lоп-протеиназой при конкурентном (а) и бесконкурентном (б) связывании с ферментом компонентов комплекса (АТФ-Мg)²⁺. Обозначения: Е – фермент; S – субстрат (АТФ-Мg)²⁺; I – ингибитор (АТФ или Мg²⁺); Р – продукт (АДР); p_i – неорганический фосфат.

Мg²⁺, и торможение гидролиза АТФ происходит за счет ухудшения эффективности нуклеотидного обмена вследствие бесконкурентного ингибирующего действия свободных ионов Мg²⁺.

Зависимости, характеризующие АТФ-азную активность фермента при различном содержании ионов Мg²⁺, представлены на рис. 2. В отсутствие свободных ионов Мg²⁺ (рис. 2, 1) гидролиз АТФ Lоп-протеиназой характеризуется параметрами: k_{cat} 100 мин⁻¹, K_m 0.54 мМ. При введении избытка

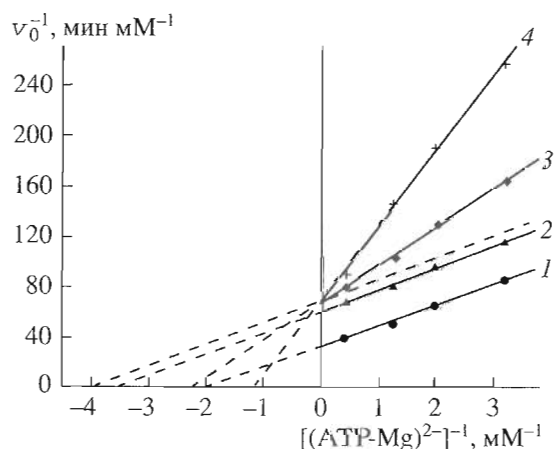


Рис. 2. Гидролиз АТФ Lоп-протеиназой в отсутствие белкового субстрата при фиксированных значениях концентрации свободных ионов Мg²⁺. Условия: буфер А, рН 8.2; 37°С. Концентрации: Lоп – 0.32 мкМ; Мg²⁺ – 0 (1), 10 (2), 20 (3), 30 мМ (4). Зависимость для переходной концентрации Мg²⁺ (10–15 мМ) обозначена штриховой линией.

свободных ионов Мg²⁺ в концентрациях, не превышающих значений 10–15 мМ, значения k_{cat} и K_m уменьшаются пропорционально (бесконкурентное ингибирование, прямые 1 и 2). Дальнейшее увеличение содержания магния в реакции приводит к изменению характера ингибирования (прямые 3 и 4): значения K_m увеличиваются при постоянстве k_{cat} (конкурентное ингибирование). Построение гипотетической зависимости (обозначена на рис. 2 штриховой линией), соответствующей критической концентрации свободных ионов Мg²⁺ (около 15 мМ), при которой осуществляется переход от бесконкурентного ингибирования к конкурентному, приводит к параметрам: k_{cat} 46 мин⁻¹, K_m 0.25 мМ (переходная зависимость параллельна прямым 1 и 2 и проходит через точку пересечения прямых 3 и 4). Следует отметить, что обнаруживаемая в этих экспериментах критическая концентрация ионов Мg²⁺ близка к их внутриклеточной концентрации.

Изменение характера ингибирующего действия свободных ионов Мg²⁺ на АТФ-азную активность Lоп-протеиназы может быть обусловлено олигомерным строением фермента и существованием выраженных кооперативных взаимодействий между АТФ-азными центрами в тетрамере. Не исключено, что торможение гидролиза АТФ, наблюдаемое при относительно низких концентрациях свободных ионов Мg²⁺ (до 15 мМ), предположительно контролирующее высвобождение АДР из АТФ-азных центров, приводит к определенному состоянию насыщения фермента комплексом аденозиндифосфат-магний. Достижение этого состояния в свою очередь вызывает либо действительное ослабление связывания субстрата (комплекса (АТФ-Мg)²⁺) в силу существования отрицательного гетеротропного кооперативного эффекта, либо кажущееся ухудшение сродства субстрата за счет, например, положительного гомотропного кооперативного эффекта по (АДР-Мg)⁻ (усиление сродства комплекса (АДР-Мg)⁻ в одних центрах при его наличии в других центрах фермента).

Таким образом, исследование базовой АТФ-азной активности Lоп-протеиназы позволяет сделать следующие общие заключения: (1) АТФ-азная активность фермента в области миллимолярных концентраций АТФ зависит от содержания ионов Мg²⁺ следующим образом: в условиях C_{АТФ} > C_{Мg} происходит ингибирование гидролиза АТФ свободным нуклеотидом, в условиях C_{АТФ} < C_{Мg} – ингибирование свободными ионами Мg²⁺; наиболее эффективно АТФ гидролизует при C_{АТФ} = C_{Мg}; (2) при ингибировании гидролиза АТФ свободными ионами Мg²⁺ различаются два состояния – бесконкурентное ингибирование при концентрации Мg²⁺ не более 10–15 мМ и конкурентное ингибирование при концентрации ионов Мg²⁺ выше 15 мМ.

Наличие в реакционной среде белкового субстрата (α - или β -казеина) изменяет чувствительность АТР-азной активности Lon-протеиназы к избыточному содержанию ионов Mg^{2+} (рис. 3): в этом случае зависимость, характеризующая гидролиз АТР (прямая 1), занимает фиксированное положение независимо к содержанию свободных ионов Mg^{2+} (от 0 до 40 мМ). Поэтому для условий, при которых все ионы Mg^{2+} находятся в комплексе с АТР ($C_{АТР} = C_{Mg}$), активирующее действие белкового субстрата, приводящее к улучшению связывания субстрата, носит синэргический характер (прямые 1, 2). Для переходной концентрации свободных ионов Mg^{2+} активация выглядит неконкурентной (прямые 1, 3).

Исследование АТР-азной активности Lon-протеиназы в присутствии белкового субстрата позволяет сделать следующие заключения: (1) активирующее влияние белкового субстрата при гидролизе АТР формально можно интерпретировать как устранение ингибирующего действия ионов Mg^{2+} на базовую АТР-азную активность Lon-протеиназы при $C_{Mg} > C_{АТР}$ (соотношение, соответствующее внутриклеточным условиям); (2) кинетические параметры гидролиза АТР в присутствии белкового субстрата не изменяются при значительном содержании свободных ионов Mg^{2+} (до 40 мМ) в реакционной среде; (3) белковый субстрат не оказывает аллостерического действия на каталитический аппарат АТР-азного центра, поскольку его присутствие не приводит к изменению значения k_{cat} реакции гидролиза АТР при $C_{АТР} = C_{Mg}$ (рис. 3, прямые 1 и 2).

Следует отметить, что сложное ингибирующее действие свободных ионов Mg^{2+} не может быть объяснено их неселективным влиянием, поскольку оно устраняется в присутствии белкового субстрата. С другой стороны, реализация бесконкурентного ингибирующего действия этих ионов (схема 1б), обсуждаемая в этом разделе, не может исключить возможности прямой конкуренции ионов Mg^{2+} с субстратом (комплексом $(АТР-Mg)^{2-}$) при связывании в АТР-азном центре Lon-протеиназы (схема 1а).

Ингибирование гидролиза АТР аденозиндифосфатом. Для проверки предположения о том, что белокзависимая активация гидролиза АТР Lon-протеиназой может быть обусловлена изменением сродства АДФ к АТР-азному центру фермента, было проведено исследование характера и эффективности ингибирующего действия АДФ на проявление базовой и активированной белковым субстратом АТР-азной активности фермента. В проведенных экспериментах (рис. 4) концентрация свободных ионов Mg^{2+} (20 мМ) была достаточно высокой для того, чтобы весь присутствующий в реакционной смеси аденозиндифосфат

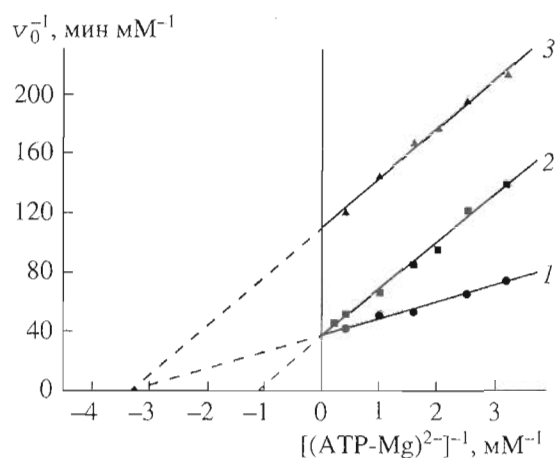


Рис. 3. Гидролиз АТР Lon-протеиназой в присутствии 1 мг/мл α -казеина (1) и в отсутствие белкового субстрата (2, 3). Условия: буфер А, рН 7.6; 37°C. Концентрации: Lon – 0.64 мкМ; свободные ионы Mg^{2+} – 0 – 40 (1); 0 (2) и 15 мМ (3).

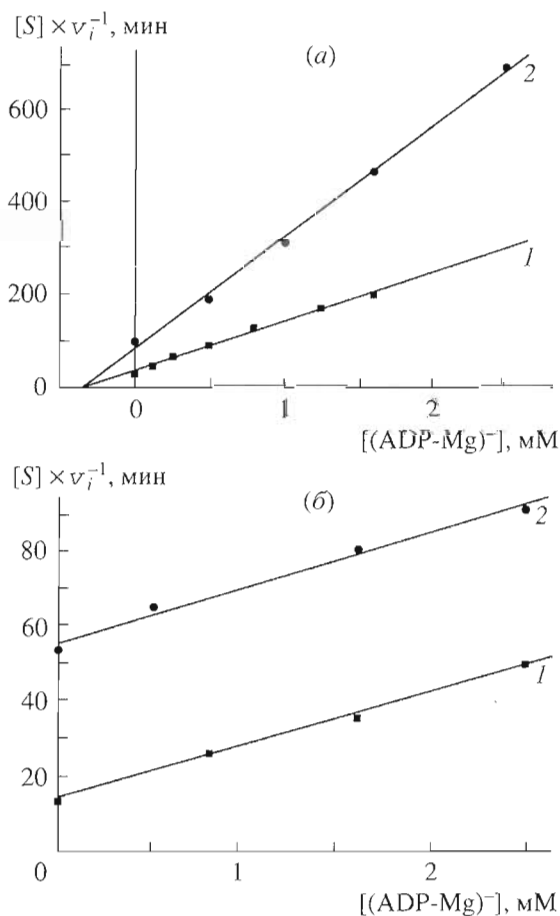


Рис. 4. Ингибирование аденозиндифосфатом гидролиза АТР Lon-протеиназой в отсутствие (а) и в присутствии (б) белкового субстрата (построения в координатах Корниш-Боудена). Условия: буфер А, рН 8.2; 37°C. Концентрации: Lon – 0.64 мкМ; Mg^{2+} – 20 мМ; АТР- Mg^{2-} – 0.5 (1) или 2.5 мМ (2); α -казеин – 1 мг/мл.

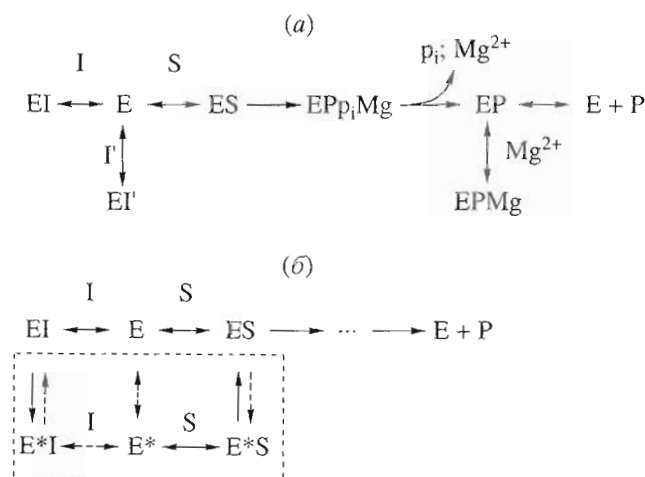


Схема 2. Ингибирование АТФ-азной активности Lon-протеиназы ионами Mg^{2+} и комплексом $(ADP-Mg)^-$. (а) – действие двух взаимозависимых конкурентных ингибиторов; (б) – изомеризация АТФ-азного центра при связывании комплекса $(ADP-Mg)^-$. Пунктирными стрелками обозначены кинетически медленные пути; E и E^* – продуктивная для гидролиза АТФ и непродуктивная (изомеризованная) формы фермента соответственно; S – субстрат (комплекс $(ATP-Mg)^{2-}$); I – ингибитор (комплекс $(ADP-Mg)^-$); I' – второй ингибитор (ионы Mg^{2+} , схема а); P – продукт реакции (ADP); p_i – неорганический фосфат.

был представлен в виде нуклеотид-магниевого комплекса ($K_{d(ADP-Mg)^-} \approx 4 \times 10^{-4} - 10^{-3}$ М).

Логично было ожидать, что ADP конкурирует с АТФ за связывание с ферментом. Действительно, в присутствии казеина (рис. 4б) ингибирование происходит конкурентным образом, однако ингибирование базовой АТФ-азной активности (рис. 4а) происходит неконкурентно. При этом эффективность ингибирования, определяемая значением K_i , в обоих случаях оказалась одинаковой (0.3 мМ), т.е. присутствие белкового субстрата не изменяет сродства комплекса $(ADP-Mg)^-$ к ферменту.

Вероятная причина необычного эффекта неконкурентного ингибирования базовой АТФ-азной активности комплексом $(ADP-Mg)^-$ заключается, по-видимому, в сложной картине ингибирования базового гидролиза АТФ свободными ионами Mg^{2+} (см. рис. 2). В первом приближении можно допустить, что в тетрамере Lon-протеиназы АТФ-азные центры функционируют независимо (схема 2), причем в условиях избытка свободных ионов Mg^{2+} последние способны самостоятельно связываться с АТФ-азным центром фермента (схема 2а), конкурируя, таким образом, и с субстратом, и с $(ADP-Mg)^-$ (вариант двух взаимозависимых конкурентных ингибиторов). В этом случае изменение концентрации одного из ингибиторов

(комплекса $(ADP-Mg)^-$) при фиксированной концентрации другого (ионов Mg^{2+}) должно приводить к изменению значения K_m , что противоречит наблюдаемому неконкурентному характеру ингибирования (рис. 4а).

Таким образом, предположенную выше возможность конкуренции между свободными ионами Mg^{2+} и магниевыми комплексами нуклеотидов (как АТФ, так и ADP) следует исключить. По-видимому, при ингибировании базового гидролиза АТФ аденозиндифосфатом проявляются либо кооперативные взаимодействия между АТФ-азными центрами различных субъединиц, либо способность АТФ-азных центров изомеризоваться при связывании комплекса $(ADP-Mg)^-$ (схема 2б). В этом случае ингибитор не только конкурирует с субстратом, но и индуцирует образование конформации АТФ-азного центра, непродуктивной для катализа гидролиза АТФ (происходит эффективное уменьшение концентрации каталитически продуктивных центров фермента). Тогда эффект активации гидролиза АТФ белковым субстратом можно трактовать как устранение относительно медленных кинетических путей (выделены пунктирной рамкой на схеме 2б), связанных с изомеризацией фермента.

В качестве примера фермента, для которого продукт ферментативной реакции оказывается неконкурентным ингибитором, можно привести люциферазу светляков (предположительно димерный фермент с функционально активной субъединицей), осуществляющую превращение люциферина в оксилуциферин при участии другого субстрата – АТФ (в присутствии ионов магния). Ингибирующее действие оксилуциферина выглядит неконкурентным по отношению к любому из субстратов этого фермента [27].

Активирующее действие белкового субстрата Lon-протеиназы, приводящее к устранению эффекта ингибирования гидролиза АТФ свободными ионами Mg^{2+} и изменению типа ингибирования АТФ-азной активности комплексом $(ADP-Mg)^-$, не исключает возможности связывания ионов Mg^{2+} с “АДР-формой” АТФ-азных центров. Такая возможность сохраняется, если предположить, что связывание белкового субстрата способствует ускорению (промотирует) высвобождения $(ADP-Mg)^-$ из АТФ-азных центров фермента.

Подобная трактовка активирующего действия белковых субстратов Lon-протеиназы уже обсуждалась в работах [18, 22] при изучении связывания с ферментом нуклеотидов и в целом согласуется с наблюдениями, полученными в этой работе. Однако следует отметить, что закономерности нуклеотидного обмена и сродство нуклеотидов к АТФ-азным центрам фермента при гидролизе АТФ и в его отсутствие могут существенно различаться. По-видимому, именно по этой причине зна-

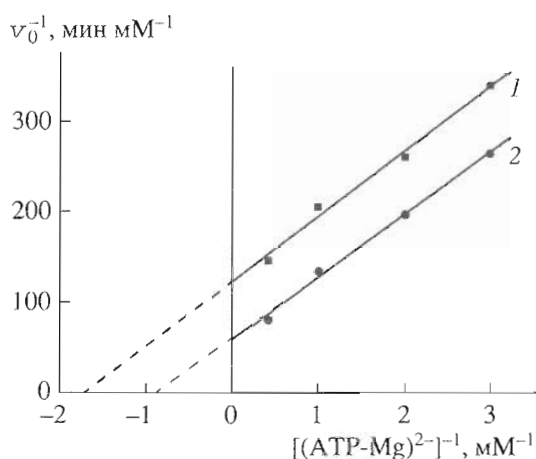


Рис. 5. Гидролиз АТР укороченной формой Lon-протеиназы с удаленным С-концевым доменом (Lon-NA) в отсутствие (1) и в присутствии 1 мг/мл α -казеина (2). Условия: буфер А, рН 7.8; 37°C. Концентрации: Lon-NA – 3 мкМ; $MgCl_2$ – 20 мМ.

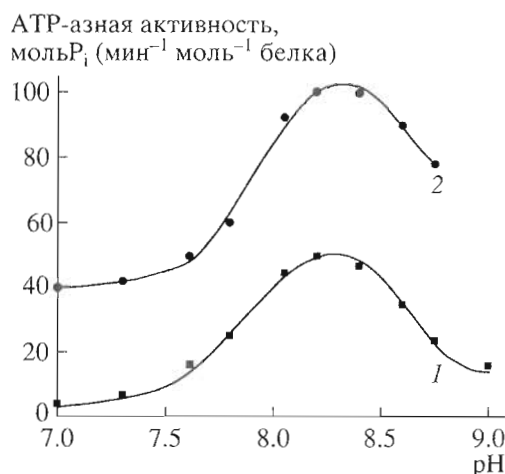


Рис. 6. Зависимость АТР-азной активности Lon-протеиназы от рН в отсутствие (1) и в присутствии 0.5 мг/мл α -казеина (2). Условия: 150 мМ Трис-НСI-буфер; 37°C. Концентрации: АТР – 1 мМ; $MgCl_2$ – 10 мМ.

чение K_i (0.3 мМ), установленное нами при ингибировании базовой АТР-азной активности комплексом $(ADP-Mg)^-$, существенно выше равновесной константы сродства ADP к Lon-протеиназе (менее 1 мкМ, независимо от присутствия Mg^{2+}), оценка которой произведена авторами работ [18, 22].

Эффективность нуклеотидного обмена, осуществляющегося при функционировании Lon-протеиназы, зависит не только от присутствия или отсутствия белкового субстрата, но и от наличия свободных ионов Mg^{2+} . Кроме результатов, представленных выше (см. рис. 2), на важную роль этих ионов указывает также обстоятельство, обнаруженное в работе [22]: если в отсутствие ионов Mg^{2+} связывание белкового субстрата приводит к повышению скорости высвобождения ADP из АТР-азных центров фермента, то в присутствии физиологических концентраций этих ионов (около 10 мМ) промотирующее действие белкового субстрата утрачивается.

К сожалению, совокупность имеющихся данных не позволяет в настоящее время представить общую картину нуклеотидного обмена в АТР-азных центрах Lon-протеиназы, происходящего в условиях гидролиза АТР. Однако очевидно, что факторами, определяющими закономерности этого обмена, выступают: четвертичная структура фермента и кооперативный характер функционирования АТР-азных центров в олигомере; белковый субстрат; свободные ионы Mg^{2+} , определяющие, по-видимому, “ADP”- или “ADP-Mg-состояния” АТР-азных центров.

Существование в структуре Lon-протеиназы дополнительных центров связывания белкового субстрата. Субстратами Lon-протеиназы *in vitro* оказываются, как правило, глубоко денатуриро-

ванные белки. Природа селективности Lon-протеиназы – одна из центральных проблем исследования фермента. Ряд косвенных экспериментальных наблюдений, наряду с результатами структурного анализа [28], позволили предположить, что взаимодействие белкового субстрата с ферментом должно происходить не только в области пептидгидролазного центра.

С целью изучения способности белкового субстрата связываться в области субъединицы фермента, локализованной вне пептидгидролазного центра, была исследована морфологически измененная форма Lon-протеиназы, не содержащая протеолитического домена P (форма Lon-NA [29], фрагмент 1–544 по последовательности Lon-протеиназы). Гидролиз АТР под действием Lon-NA и влияние на него белкового субстрата представлены на рис. 5; значения кинетических параметров: k_{cat} 3 $мин^{-1}$, K_m 0.58 мМ (в отсутствие казеина, прямая 1) и k_{cat} 6 $мин^{-1}$, K_m 1.16 мМ (в присутствии казеина, прямая 2).

Полученные результаты свидетельствуют о способности белкового субстрата специфически взаимодействовать с элементами структуры фермента в NA-фрагменте Lon-протеиназы, т.е. являются прямым подтверждением ранее высказанного предположения [3] о существовании дополнительного центра связывания белкового субстрата (аллостерического центра).

Эффект активации гидролиза АТР в присутствии белкового субстрата и его функциональное значение. Как было отмечено выше, способностью активировать гидролиз АТР обладают только полипептидные субстраты Lon-протеиназы. Этот эффект существенно зависит от рН (рис. 6). При фиксированном значении рН фактором, определя-

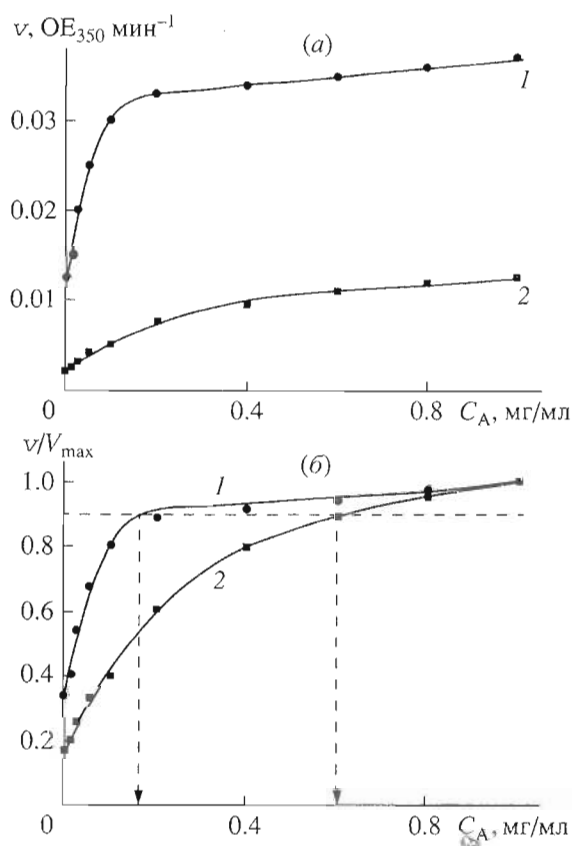


Рис. 7. Активация гидролиза АТФ белковым субстратом в отсутствие (1) и в присутствии (2) аденозиндифосфата. Приведены зависимости начальной (а) и относительной (б) скорости гидролиза АТФ от концентрации дефосфорилированного α -казеина (C_A). Условия: 70 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.2 (при 25°C); 100 мМ NaCl; 5% глицерин; 37°C. Концентрации: Lon – 0.64 мкМ; АТФ- Mg^{2+} – 0.5 мМ; ADP- Mg^{2+} – 1.6 мМ; Mg^{2+} – 20 мМ.

ющим степень активации фермента, оказывается концентрация свободных ионов Mg^{2+} (см. рис. 2). Наконец, активация гидролиза АТФ зависит от содержания в системе белка-субстрата (рис. 7).

Видно, что связывание белкового субстрата с ферментом (рис. 7, кривые 1) характеризуется высоким сродством: достижение значения начальной скорости гидролиза АТФ, отличающегося от максимального на 10% ($v/V_{\text{max}} = 0.9$), наблюдается при концентрации белка-активатора ~ 0.15 мг/мл (~ 6 мкМ), насыщающей концентрации, которая на порядок превышает содержание в реакции фермента. При этом гидролиз АТФ ускоряется примерно в 3 раза.

Введение в реакцию значительного количества комплекса $(ADP-Mg)^-$ (рис. 7, кривые 2) приводит к незначительному ухудшению связывания белкового субстрата: насыщающая концентрация белка-активатора увеличивается до ~ 0.6 мг/мл

(~ 24 мкМ). Гидролиз АТФ в этих условиях ускоряется примерно в 6 раз.

Таким образом, при существенном превышении содержания ADP по отношению к содержанию АТФ в условиях реакции *in vitro* сродство белка-активатора к ферменту остается относительно высоким, т.е. значительное насыщение фермента аденозиндифосфатом не препятствует взаимодействию фермента и белкового субстрата в условиях гидролиза АТФ. В то же время следует отметить, что некоторое ухудшение связывания белка-активатора в условиях высокого содержания ADP не может иметь значения для фермента, функционирующего в условиях клетки, поскольку внутриклеточное содержание АТФ (1–5 мМ) примерно на порядок выше, чем содержание ADP.

Каково же функциональное значение эффекта активации гидролиза АТФ в присутствии белкового субстрата?

Общая схема функционирования Lon-протеиназы неоднократно обсуждалась в литературе [3, 22]. Согласно имеющимся представлениям, пониженная АТФ-азная функция фермента в отсутствие белка-активатора обусловлена тем, что стадией, лимитирующей гидролиз АТФ, является высвобождение из АТФ-азных центров продукта его гидролиза аденозиндифосфата (фермент находится преимущественно в “ADP-форме”). С другой стороны, как показано в работе [20], присутствие ADP приводит к ингибированию гидролиза субстратов в пептидгидролазных центрах фермента. Следовательно, как постулировано в работах [17, 20, 22, 23, 30], повышение АТФ-азной активности фермента вызывает увеличение активности его пептидгидролазных центров, т.е. существует прямая корреляция между гидролизом АТФ и протеолизом.

С учетом результатов, представленных в этой работе, маловероятно, чтобы отсутствие белкового субстрата приводило к переходу Lon-протеиназы в некую “ADP-форму”, поскольку при физиологических концентрациях АТФ, ADP и ионов Mg^{2+} *in vitro* фермент проявляет АТФ-азную активность. При этом ингибирующее действие продукта его гидролиза весьма незначительно, а эффект активации гидролиза АТФ белковым субстратом относительно невелик.

Тем не менее вполне допустимо, что *in vivo* дезактивация гидролиза АТФ под влиянием ряда факторов может быть намного более существенной, чем в системе *in vitro*, и действительно направленной на подавление активности пептидгидролазных центров. При этом АТФ-зависимость функционирования Lon-протеиназы связана именно с селективным отбором ферментом субстрата: активация АТФ-азной функции при связывании специфического белка-мишени приводит к актива-

ции фермента и к последующей деградации белка. Однако установить, каков уровень "базового" гидролиза АТР Lon-протеиназой внутри клетки не представляется возможным.

В то же время принципиально важным фактором дезактивации гидролиза АТР является обнаруженное ингибирующее действие свободных ионов Mg^{2+} . Устранение именно этого действия, согласно имеющимся представлениям, должно активировать пептидгидролазную функцию фермента. Это положение, равно как и обсуждаемая здесь возможность регуляции активности Lon-протеиназы посредством гидролиза АТР и связывания специфического белка-субстрата, могут быть легко проверены при дальнейшем исследовании пептидгидролазной функции фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы реактивы, соответствующие квалификации "ос. ч." или "х. ч.". Укороченная форма Lon-протеиназы (Lon-NA) любезно предоставлена д-ром М. Мауризи (Национальный институт рака, Бетесда, США).

Выделение и очистка Lon-протеиназы. Векторная конструкция pBR-lon была экспрессирована в lon-дефицитном штамме *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]. Фермент выделяли с помощью последовательной хроматографии бесклеточного экстракта на фосфоцеллюлозе P-11 и DEAE-целлюлозе как описано в работе [13]. Условия хранения препарата фермента: 25 мМ Трис-НСI-буфер, рН 7.5; 0.5 М NaCl; 50 % глицерин; 1 мМ дитиотреит; -20°C.

Контроль за выделением белка осуществляли с помощью диск-электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях [31]. Концентрацию белков в препаратах определяли по методу Брэдфорд [32] с помощью реагента фирмы Bio-Rad.

Определение АТР-азной активности. Скорости гидролиза АТР препаратами фермента определяли по количеству высвобождающегося во времени свободного неорганического фосфата, детектируя поглощение при 350 нм цинк-фосфо-молибдатного комплекса, образующегося после смешения аликвоты реакционной смеси с реагентом 15 мМ молибдат аммония, 100 мМ ацетат цинка, 1% SDS, рН 4.5 [25].

Условия проведения реакции: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 7.8-8.4 (при 25°C); 100 мМ NaCl; 37°C. Реакцию инициировали введением концентрированного раствора фермента в реакционную смесь (конечная концентрация фермента - 20-80 мкг/мл). При изучении гидролиза АТР в присутствии белкового субстрата использовали дефосфорилированный α -казеин (Sigma).

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-48829) и Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" (Белковая инженерия, грант № 3-05).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottesman S., Maurizi M.R. // Microbiol. Rev. 1992. V. 56. P. 592-621.
2. Gottesman S. // Ann. Rev. Genet. 1996. V. 30. P. 465-506.
3. Goldberg A.L. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 203. P. 9-23.
4. Grossman A. D., Erickson J. W., Gross C. A. // Cell. 1984. V. 38. P. 383-390.
5. Goff S. A., Casson L. P., Goldberg A. L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6647-6651.
6. Phillips T. A., van Bogelen R. A., Neidhardt F. C. // J. Bacteriol. 1984. V. 159. P. 283-287.
7. Baker T. A., Grossman A. D., Gross C. A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6779-6783.
8. Misuzawa S., Gottesman S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 358-362.
9. Stout V., Torres-Cabassa A. S., Maurizi M. R., Gutnick D., Gottesman S. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 1738-1747.
10. Dierksen K. P., Marks J., Chen D. D., Trempy J. E. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 5126-5130.
11. Van Melder L., Thi M. H. D., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M. R. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 27730-27738.
12. Ротанова Т.В. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 883-891.
13. Америк А. Ю., Антонов В. К., Остроумова Н. И., Ротанова Т. В., Чистякова Л. Г. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 869-881.
14. Charette M. F., Henderson G. W., Kezdy F. J., Markovitz A. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. P. 503-510.
15. 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.
16. Goldberg A. L., Waxman L. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 12029-12034.
17. Edmunds T., Goldberg A. L. // J. Cell. Biochem. 1986. V. 32. P. 186-191.
18. Menon A. S., Goldberg A. L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 14921-14928.
19. Waxman L., Goldberg A. L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 4883-4887.
20. Menon A. S., Waxman L., Goldberg A. L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 722-726.
21. Gottesman S., Maurizi M.R., Wickner S. // Cell. 1997. V. 91. P. 435-438.
22. Menon A.S., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 14929-14934.
23. Waxman L., Goldberg A.L. // Science. 1986. V. 232. P. 500-503.
24. Maurizi M.R. // Experientia. 1992. V. 48. P. 178-200.

25. *Bencini D. A., Wild J. R., O'Donovan G. A.* // *Anal. Biochem.* 1983. V. 132. P. 254–258.
26. *Fisher H., Glockshuber R.* // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 22502–22507.
27. *Lemasters J. J., Hackenbrock Ch. R.* // *Biochemistry.* 1977. V. 16. P. 445–447.
28. *Smith C. K., Baker T. A., Sauer R. T.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 6678–6682.
29. *Leffers G., Rasulova F., Kessel M., Steven A. C., Leapman R., Gottesman S., Maurizi M.R.* // *Meeting on Biology of Proteolysis. Abst. N. Y., Cold Spring Harbor, May 5–9. 1999.* P. 52.
30. *Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R.* // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 244. P. 350–375.
31. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
32. *Bradford M.M.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

Coupling of Proteolysis to ATP Hydrolysis upon *Escherichia coli* Lon Protease Functioning. I. Kinetic Aspects of ATP Hydrolysis

E. E. Melnikov, K. B. Tsurulnikov, and T. V. Rotanova[#]

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

Some aspects of the ATPase function of the *Escherichia coli* Lon protease were studied around the optimum pH value. It was revealed that, in the absence of the protein substrate, the maximum ATPase activity of the enzyme is observed at an equimolar ratio of ATP and Mg²⁺ ions in the area of their millimolar concentrations. Free components of the substrate complex (ATP-Mg)²⁻ inhibit the enzyme ATPase activity. It is hypothesized that the effector activity of free Mg²⁺ ions is caused by the formation of the “ADP-Mg-form” of the ATPase centers. It was shown that the activation of ATP hydrolysis in the presence of the protein substrate is accompanied by an increase in the affinity of the (ATP-Mg)²⁻ complex to the enzyme, by the elimination of the inhibiting action of free Mg²⁺ ions without altering the efficiency of catalysis of ATP hydrolysis (based on the k_{cat} value), and by a change in the type of inhibition of ATP hydrolysis by the (ADP-Mg)⁻ complex (without changing the K_i value). Interaction of the Lon protease protein substrate with the enzyme area located outside the peptide hydrolase center was demonstrated by a direct experiment.

Key words: ATPase; ATP-dependent proteolysis; lon gene, *E. coli*; Lon protease

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 335-4222;
e-mail: rotanova@enzyme.siobc.ras.ru.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 7. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.