



УДК 577.152.342*153'.134

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ ДИАДА Ser–Lys В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ
АТФ-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *Escherichia coli*© 2003 г. Т. В. Ротанова[#], Э. Э. Мельников, К. Б. ЦирульниковИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 25.09.2002 г. Принято к печати 27.09.2002 г.

На основании сопоставления последовательностей более чем 60 Lon-протеиназ из отдаленных источников выявлено два подсемейства ферментов, различающихся строением фрагментов, включающих каталитически активный остаток серина. Получено подтверждение отсутствия классической каталитической триады в активных центрах Lon-протеиназ. Показано, что каталитический центр Lon-протеиназ представлен диадой Ser–Lys.

Ключевые слова: АТФ-зависимый протеолиз; протеиназа Lon; активный центр; гомологи; подсемейства; *E. coli*.

Контроль качества клеточных белков и освобождение клеток от дефектных и измененных белков, а также от регуляторных белков, выполнивших свои функции, осуществляется АТФ-зависимыми протеиназами – ферментами, относящимися к суперсемейству ААА-белков (АТФ-аз, ассоциированных с другими клеточными активностями) [1–5]. АТФ-зависимые протеиназы – это комплексные мультимерные ферменты, объединяющие в своей структуре АТФ-азные и протеолитические компоненты. Именно АТФ-азные составляющие этих ферментов (субъединицы или домены) производят селективный отбор белков-мишеней и регулируют активность протеолитических компонентов.

В клетках *Escherichia coli* к настоящему времени обнаружено пять различных АТФ-зависимых протеиназ: Lon, FtsH, ClpAP, ClpXP и HslVU (см. ссылки в обзорах [6–8]). Две из них (Lon и FtsH) – гомоолигомеры, их протеолитические и АТФ-азные центры локализованы в одной полипептидной цепи. ClpAP, ClpXP и HslVU – гетероолигомеры и состоят из протеолитических (ClpP и HslV) и АТФ-азных (ClpA, ClpX и HslU) субъединиц. АТФ-зависимые протеиназы *E. coli* различаются и по типу их активных центров. Так, ClpAP и ClpXP – сериновые протеиназы с классической каталитической триадой (Ser–His–Asp), FtsH – Zn-зависимая металлопротеиназа, а HslVU принадлежит к недавно обнаруженной группе протеиназ, каталитически активным остатком которых является N-концевой остаток Thr.

Несмотря на то что Lon-протеиназа (КФ 3.4.21.53; MEROPS: S16.001) явилась исторически первой обнаруженной АТФ-зависимой протеиназой, до последнего времени сохранялась неопределенность относительно типа ее активного центра. Принадлежность Lon-протеиназы (784 а.о.) к группе сериновых гидролаз была доказана ингибиторным анализом [9] и сайт-направленным мутагенезом [10]. Вместе с тем предпринятый нами поиск других, помимо серина, остатков каталитического центра привел к заключению, что наличие классической триады Ser–His–Asp в ферменте маловероятно, несмотря на то, что замена остатков His665, His667 и Asp676, консервативных для протеолитических доменов известных к тому времени Lon-протеиназ, вызывала потерю АТФ-зависимой протеолитической активности [11]. Основанием для такого заключения послужила непосредственная близость рассматриваемых остатков к каталитически активному Ser679 (в составе всего лишь 15-членного фрагмента H⁶⁶⁵VHVPEGATPKDGP⁶⁷⁹ полипептидной цепи фермента, протеолитический домен которого содержит около 200 а.о.). Поскольку подобного расположения каталитически активных остатков не отмечено ни для одного из известных подсемейств сериновых протеиназ, было высказано предположение об альтернативной возможности функционирования в активном центре Lon-протеиназы каталитической диады Ser–Lys [11]. Следует отметить, что подобная диада (Ser652–Lys692) была позднее обнаружена в отдаленном аналоге Lon-протеиназы *E. coli* – “неканонической” вирусной Lon-протеиназе, лишенной АТФ-азного домена [12].

В последнее время в связи с расшифровкой геномов целого ряда организмов круг первичных

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-42-22; эл. почта: rotanova@enzyme.siohc.ras.ru).

Таблица 1. Консервативные фрагменты последовательностей Lon-протеиназ подсемейств А и В, включающие каталитически активный остаток Ser679 (АI и АII) и потенциально каталитически активный остаток Lys722 (ВI и ВII). Нумерация по последовательности Lon-протеиназы *E. coli* [6]

Подсемейство	Номера аминокислотных остатков																			
	Фрагмент I															Фрагмент II				
	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679*	680	681	682	719	720	721	722	723	
А	P	X	G	A/G/S	Ф	P/S	K/I/V	D	G	P	S	A	G	Ф	Ф	K/R/V	E/X	K	Ф	
В	Ф	Q/G	X	Y/G	X	X	V/I	E/D	G	D	S	A	S/T	Ф	V/L	T/N	X	K	I/V	

* Каталитически активный остаток серина; Ф – остатки гидрофобных аминокислот; X – остатки любых аминокислот; жирным шрифтом выделены абсолютно консервативные остатки; консервативность остатков A⁶⁷², P⁶⁷⁴ и K⁶⁷⁵ фрагмента АI составляет 94, 98 и 96% соответственно, остатков Q⁶⁷⁰, Y⁶⁷², V⁶⁷⁵, E⁶⁷⁶ и S⁶⁸¹ фрагмента ВI – 85, 93, 85, 62 и 93%, остатков K⁷²⁰ и E⁷²¹ фрагмента АII – 83 (R – 15%) и 88%, а остатков V⁷¹⁹, T⁷²⁰ и I⁷²³ фрагмента ВII – 90, 70 и 80%.

структур аналогов Lon-протеиназы *E. coli* значительно расширился: на настоящий момент в базах данных белковых последовательностей представлено более 60 структур Lon-протеиназ из разных источников. При сопоставлении строения их протеолитических доменов оказалось, что в семействе Lon-протеиназ можно выделить два подсемейства на основании строения консервативных фрагментов последовательностей, включающих каталитически активный остаток серина: в подсемействе А, охватывающее “классические” Lon-протеиназы, входит около 50 ферментов, содержащих фрагмент АI, а подсемейство В, первый представитель которого обнаружен только в 1995 г., состоит из 13 ферментов, содержащих фрагмент ВI (табл. 1).

Из табл. 1 следует, что фрагмент ВI содержит замены пяти строго консервативных для фрагмента АI остатков в положениях 669, 671, 676, 678 и 681, среди которых два остатка пролина и два глицина. Принимая во внимание важность остатков Pro и Gly для фолдинга белков, а также появление дополнительного отрицательного заряда в положении 678 фрагмента ВI, можно предположить, что подсемейства А и В Lon-протеиназ имеют разную пространственную структуру вблизи каталитически активного остатка Ser679.

Следует отметить, что исследование протеолиза в гипертермофильных микроорганизмах также привело авторов работы [13] к заключению о существовании двух подсемейств Lon-протеиназ. Основой такого заключения в данном случае послужило сопоставление строения АТР-азных доменов 13 ферментов, при этом авторы необоснованно, на наш взгляд, относят одну из двух рассматриваемых ими Lon-протеиназ из *Bacillus subtilis* к подсемейству В. По нашей классификации оба фермента принадлежат подсемейству А.

Данные табл. 1 свидетельствуют, что остаток Asp676 не консервативен для всего пула известных Lon-протеиназ. То же касается остатков His665 и His667, консервативных на 87 и 77% соот-

ветственно. Таким образом, эти остатки не могут претендовать на роль каталитически активных, то есть анализ первичных последовательностей Lon-протеиназ подтверждает сделанное нами предположение [11] об отсутствии классической каталитической триады Ser–His–Asp в их активных центрах.

В то же время для всех без исключения Lon-протеиназ обоих подсемейств строго консервативным оказался остаток Lys722, удаленный от каталитически активного Ser679 на 43 а.о. в сторону С-конца в последовательностях ферментов. Фрагменты АII и ВII последовательностей, включающие остаток Lys722, представлены в табл. 1. Видно, что общим для подсемейств А и В является наличие гидрофобных аминокислот в положении (–3) и (+1) относительно консервативного остатка лизина.

Исходя из собственной гипотезы о возможности функционирования каталитической диады Ser–Lys в активном центре Lon-протеиназы [11], мы предположили, что именно остаток Lys722 является непосредственным участником каталитического акта. Для выяснения роли этого остатка он был заменен нами на остаток Gln методом сайт-направленного мутагенеза*, основанного на ПЦР [14].

Выделенный по методике, приведенной в работе [15], мутант Lon-K722Q полностью утрачивает активность по гидролизу как белкового субстрата (казеин), так и низкомолекулярного тизоэфирного субстрата (Suc–Phe–Leu–Phe–SBzl) независимо от наличия в реакционной среде комплекса АТР–Mg, вместе с тем АТР-азная активность мутанта мало отличается от активности нативного фермента (табл. 2). Следует отметить, что характеристики Lon-K722Q практически совпадают с таковыми для мутанта по каталитически активному остатку серина Lon-S679A [11] (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют в пользу

* Методика получения мутанта Lon-K722Q будет опубликована отдельно.

Таблица 2. Активность нативной Lon-протеиназы (Lon-w.t.) и мутантов Lon-S679A и Lon-K722Q

Фермент	Субстрат		
	казеин (±АТФ)	Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (±АТФ)	АТФ
Lon-w.t.	100	100	100
Lon-S679A [11]	0	0	100
Lon-K722Q	0	0	80

Приведены относительные активности ферментов в процентах, активность нативной Lon-протеиназы принята за 100%. Условия определения: 50 мМ Трис-HCl-буфер, pH 8.0, 0.1 М NaCl, 20 мМ MgCl₂.

существенного значения остатка Lys722 для Lon-протеиназы и являются подтверждением справедливости предположения о функционировании каталитической диады Ser-Lys в протеолитическом активном центре фермента.

Работа выполнена при поддержке фондов РФФИ (проект № 02-04-48481) и НАТО (LST.CLG 975208).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V.* // *Genome Res.* 1999. V. 9. P. 27–43.
2. *Patel S., Latterich M.* // *Trends Cell. Biol.* 1998. V. 8. P. 65–71.
3. *Maurizi M.R., Li C.C.H.* // *EMBO Rep.* 2001. V. 2. P. 980–985.
4. *Wickner S., Maurizi M.R., Gottesman S.* // *Science.* 1999. V. 286. P. 1888–1893.
5. *Maupin-Furlow J.A., Wilson H.L., Kaczowka S.J., Ou M.S.* // *Front. Biosci.* 2000. V. 5. P. D837–865.
6. *Ротанова Т.В.* // *Биоорган. химия.* 1999. Т. 25. С. 883–891.
7. *Старкова Н.Н., Королева Е.П., Ротанова Т.В.* // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. С. 83–97.
8. *Ротанова Т.В.* // *Вопр. мед. химии.* 2001. Т. 47. С. 3–19.
9. *Waxman L., Goldberg A.L.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 12022–12028.
10. *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.
11. *Starkova N.N., Koroleva E.P., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V.* // *FEBS Lett.* 1998. V. 422. P. 218–220.
12. *Birghan C., Mundt E., Gorbalenya A.E.* // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 114–123.
13. *Ward D.E., Shockley K.R., Chang L.S., Levy R.D., Michel J.K., Connors S.B., Kelly R.M.* // *Archaea.* 2002. V. 1. P. 63–74.
14. *Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R.* // *Gene.* 1989. V. 77. P. 61–68.
15. *Ротанова Т.В., Котова С.А., Америк А.Ю., Лыков И.П., Гинодман Л.М., Антонов В.К.* // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 114–125.

A Catalytic Ser-Lys Dyad in the Active Site of the ATP-Dependent Lon Protease from *Escherichia coli*

T. V. Rotanova[#], E. E. Mel'nikov, and K. B. Tsurulnikov

[#] Phone: +7 (095) 335-4222, e-mail: rotanova@enzyme.siohc.ras.ru

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

Two subfamilies of Lon proteases that differ in the structure of the fragments containing the catalytically active Ser residue were revealed by the comparison of more than sixty sequences of Lon proteases from various sources. The absence of the classic catalytic triad in the active site of Lon proteases was confirmed. The catalytic site of Lon proteases was shown to be represented by the Ser-Lys dyad. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: active site, ATP-dependent proteolysis, *Escherichia coli*, homologues, Lon protease subfamilies