

Структурно-функциональное исследование тройного мутанта АТР-зависимой Lon-протеазы *E. coli* по N-концевому домену

Научный руководитель – Ротанова Татьяна Васильевна

Абрикосова Виктория Александровна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоорганической химии, Москва, Россия

E-mail: abrikosova_victoria@rambler.ru

Бифункциональная гомоолигомерная АТР-зависимая Lon-протеаза *E. coli* (Ec-Lon) - один из ключевых участников системы контроля качества клеточного протеома. Фермент селективно гидролизует неправильно свёрнутые, мутантные и короткоживущие регуляторные белки по процессивному механизму в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТР. Субъединица Ec-Lon состоит из двухдоменной некаталитической N-концевой области, C-концевого протеолитического домена (серин-лизиновая пептидаза) и центрального АТР-азного модуля, принадлежащего к суперсемейству AAA+-белков (АТР-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) и образованного нуклеотидсвязывающим и α -спирализованным доменами.

Кристаллическая структура полноразмерной Ec-Lon не определена, однако известна пространственная укладка ряда укороченных форм и изолированных доменов фермента. На основании рентгеноструктурного анализа N-концевого домена (N) выявлено три аминокислотных остатка (E34, K35 и R38) Ec-Lon, предположительно участвующих в межсубъединичных взаимодействиях в олигомере. С целью оценки вклада этих остатков в образование функционально активного фермента получен тройной мутант с заменами E34,K35,R38/AAA (далее Lon-EKR), потенциально перспективный для использования в экспериментах по кристаллизации. Целью настоящей работы явилось проведение сравнительного структурно-функционального исследования мутанта Lon-EKR и интактной Ec-Lon-протеазы.

Lon-EKR выделяли по методике, включающей стадии аффинной хроматографии на Ni-сефарозе и гель-фильтрации на Sephacryl S-300. Установлено, что как и Ec-Lon мутант в растворе представлен гексамерами. Характер ограниченного протеолиза химоทริปсином позволяет сделать заключение о сходстве конформаций доменов в мутантной форме Lon-EKR и в интактном белке.

Мутант Lon-EKR гидролизует (хотя и с пониженной эффективностью) модельный белковый субстрат, β -казеин, по процессивному механизму в присутствии комплекса АТР-Mg и по непроцессивному - при наличии АМРPNP-Mg. Вместе с тем, в отличие от интактного фермента форма Lon-EKR способна деградировать белок-мишень также и в отсутствие эффекторов. Другим отличием мутантного фермента от Ec-Lon служит повышенная склонность Lon-EKR к автолитической деградации. Показано стабилизирующее влияние нуклеотидов и нуклеотид-магниевых комплексов на автолитическую активность мутанта.

Установлено, что мутации трех остатков N-домена приводят к понижению АТР-азной и пептидазной активностей Ec-Lon при сохранении основных тенденций, обусловленных влиянием нуклеотидных эффекторов и/или ионов магния. Оценено влияние белкового субстрата на пептидазную и АТР-азную функции Lon-EKR.

Таким образом, несмотря на сохранение способности к образованию гексамерной структуры, мутантная форма Lon-EKR в значительной мере утрачивает функциональную активность и конформационную стабильность, свойственные интактной Ec-Lon-протеазе.