

**Изучение роли некаталитической N-концевой области АТФ-зависимой LonA-протеазы *E. coli* в функционировании фермента****Научный руководитель – Ротанова Татьяна Васильевна***Дубовцева Е.С.<sup>1</sup>, Куджаев А.М.<sup>2</sup>*

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоорганической химии, Москва, Россия; 2 - Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

LonA-протеаза - цитозольный гомоолигомерный ДНК-связывающий фермент, который является первой АТФ-зависимой протеазой, обнаруженной в клетках *E. coli*. LonA-протеаза принадлежит суперсемейству AAA+-белков (АТФ-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями). Фермент является ключевым участником системы контроля качества (СКК) клеточного протеома и избирательно деградирует аномальные и некоторые регуляторные белки по процессивному механизму, т.е без высвобождения высокомолекулярных продуктов реакции.

Субъединица LonA-протеазы из *E. coli* (*Ec-Lon*) образована пятью доменами - N-концевым (N), первым  $\alpha$ -спирализованным, включающим участок с coiled-coil (CC)-конформацией (HI(CC)), нуклеотидсвязывающим (NB), вторым  $\alpha$ -спирализованным (H) и протеолитическим (P): N-HI(CC)-NB-H-P, где двухдоменный фрагмент N-HI(CC) формирует некаталитическую N-концевую область, а АТФ-азным компонентом является фрагмент NB-H (AAA<sup>+</sup>-модуль).

Наличие двухдоменной N-концевой области отличает LonA-протеазы от других АТФ-зависимых протеаз СКК, при этом архитектура этой области и ее роль в осуществлении процессивного протеолиза и/или в поддержании активной структуры ферментов до настоящего времени исследованы недостаточно.

Для изучения вклада N-концевой области в функционирование *Ec-Lon*-протеазы были получены три укороченные формы фермента: Lon-d106, Lon-d172 и Lon-d234, в которых отсутствуют фрагменты последовательности (1-106), (1-172) и (1-234), соответственно, а также делеционная форма Lon-dHI(CC), не содержащая фрагмента (124-305).

Проведено исследование АТФ-азной, протеолитической (субстрат -  $\beta$ -казеин) и пептидазной (субстрат - Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl) активностей модифицированных форм в сравнении со свойствами интактной *Ec-Lon*-протеазы. Изучено влияние нуклеотидов (Nu) и комплексов Nu-Mg на энзиматические свойства ферментов. Препараты ферментов получены путем аффинной хроматографии на Ni-сефарозе, а наличие в них связанной ДНК тестировано методом фенол-хлороформной экстракции.

Установлено, что N-концевой и HI(CC)-домены важны для корректного функционирования АТФ-азного и пептидазного центров *Ec-Lon*-протеазы. Показано, что HI(CC)-домен абсолютно необходим для проявления ферментом протеолитической активности. Обнаружено, что N-концевая область, и особенно ее вставочный домен, важны для поддержания конформационной стабильности *Ec-Lon*-протеазы. Показано, что для связывания ДНК ферментом N-концевая область не имеет существенного значения. Обнаружено, что модифицированные формы *Ec-Lon* проявляют склонность к самодеградации.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 14-50-00131).