



Doctoral Thesis

## Properties of the ATP-dependent protease La (Lon) from *Escherichia coli*

**Author(s):**

Fischer, Heinrich

**Publication Date:**

1995

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001448414> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 11090

**Properties of the ATP-dependent protease  
La (Lon) from *Escherichia coli***

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology Zürich  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
**Heinrich Fischer**

Diplombiochemiker (Universität Bayreuth, Germany)

born on December 16, 1966

Federal Republic of Germany

accepted on the recommendation of:  
Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner  
Prof. Dr. Theo Wallimann, co-examiner

## Abstract

The aim of this work was the biochemical characterization of the ATP-dependent protease La, the *lon* gene product, from *Escherichia coli*. Protease La is induced by heat stress and had been described as a homotetrameric enzyme of 87 kDa subunits. Each subunit of the enzyme contains an ATPase and a protease domain.

Protease La could be strongly overproduced in *E.coli* and purified in high yields as native and functional enzyme. To investigate its catalytic mechanism, two mutants of protease La were constructed: Ser-679 within the catalytic triad of the protease domain and the conserved Lys-362 in the nucleotide binding domain were mutated to alanine residues. The S679A mutation caused the complete loss of proteolytic activity, while the intrinsic ATPase activity of the enzyme was unaffected by the mutation. Also, the stimulation of the ATPase by protease substrates was found to be independent of simultaneous proteolysis in the S679A mutant. Therefore, ATP hydrolysis and peptide bond cleavage are not stoichiometrically linked in protease La. In contrast, *both* the ATPase and peptidase activities were strongly reduced in the K362A variant. Thus, the mechanistic linkage of the ATPase and the proteolytic activity in protease La is only one-directional.

The oligomerization of protease La was analyzed by analytical gel filtration and analytical ultracentrifugation. At low ionic strength, La forms large multimers (27 S particles) of at least 15-20 subunits, independent of nucleotide binding. The multimer is reversibly dissociated to monomers at moderate ionic strength (0.2 M). These monomers associate to oligomers (13 S particles) of about 6 subunits upon addition of adenosine nucleotides. High ionic strength (> 0.5 M) reversibly dissociates the oligomers, which are likely to represent the physiologically relevant association state of the protease.

Nucleotide binding and oligomer formation are tightly linked in protease La in that nucleotide binding of a subunit is the prerequisite for its incorporation into the oligomer. Therefore, no cooperative interactions occur between the subunits of a La oligomer. Since the La K362A mutant still binds nucleotides at high concentrations of ATP, but does not form oligomers, Lys-362 appears to be involved both in nucleotide binding and, directly or indirectly, in subunit interactions in the oligomer.

In accordance with the gel filtration studies, electron micrographs have revealed that the La oligomers are ring-shaped particles (6-7 subunits) with a central cavity, whereas the La multimers consist of several stacked rings which are clustered around an 'unstructured' core.

Protease La reversibly interacts with denatured or unstructured polypeptides like  $\alpha$ -casein or thermally unfolded aldolase, but it forms irreversible and inactive complexes with aggregating proteins like thermally unfolded  $\alpha$ -glucosidase. In addition, protease La forms stable and active complexes with the heat shock proteins DnaK and DnaJ *in vitro* and *in vivo*, albeit they do not affect La-catalyzed protein degradation *in vitro*. In contrast to complexes with DnaK, La/DnaJ complexes are not dissociated by ATP. DnaJ appears to be the most important heat shock cofactor which mediates the *in vivo* function of protease La.

## Kurzfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die biochemische Charakterisierung der ATP-abhängigen Protease La, dem *lon*-Genprodukt, aus *Escherichia coli*. Protease La wird durch Hitzestress induziert und wurde als ein homotetrameres Enzym mit einem Untereinheitengewicht von 87 kDa beschrieben. Jede Untereinheit des Enzyms besitzt eine ATPase- und eine Protease-Domäne.

Protease La konnte in *E. coli* stark überproduziert und in hohen Ausbeuten als natives und funktionales Enzym gereinigt werden. Um den katalytischen Mechanismus von Protease La zu untersuchen, wurden zwei Mutanten konstruiert: das Ser-679 als Bestandteil der katalytischen Triade der Protease-Domäne und das konservierte Lys-362 in der Nukleotidbindungs-Domäne wurden zu Alaninresten mutiert. Die S679A-Mutation führte zu einem kompletten Verlust der proteolytischen Aktivität, während die intrinsische ATPase-Aktivität des Enzyms durch die Mutation unbeeinflusst blieb. Auch die Stimulation der ATPase-Aktivität durch Protease-Substrate war unabhängig von einer gleichzeitigen Proteolyse in der S679A-Mutante. Daher sind ATP-Hydrolyse und die Spaltung von Peptidbindungen in Protease La nicht stöchiometrisch gekoppelt. Im Gegensatz dazu wurden in der K362A-Mutante sowohl die ATPase- als auch die Peptidase-Aktivität stark reduziert. Die mechanistische Kopplung der ATPase- und der Protease-Aktivität von Protease La ist daher nur uni-direktional.

Die Oligomerisierung von Protease La wurde mittels analytischer Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation analysiert. Bei niedriger Ionenstärke bildet Protease La, unabhängig von der Nukleotidbindung, große Multimeren (27S-Partikel) aus mindestens 15-20 Untereinheiten. Die Multimeren werden bei mäßiger Ionenstärke (0.2 M) reversibel in Monomeren dissoziiert. Diese Monomeren assoziieren zu Oligomeren (13 S-Partikel) von etwa 6 Untereinheiten durch Zugabe von Adenosinnukleotiden. Hohe Ionenstärken (>0.5 M) führen zu einer reversiblen Dissoziation dieser Oligomeren, die wahrscheinlich den physiologisch relevanten Assoziationszustand von Protease La repräsentieren.

Die Bindung von Nukleotiden und die Bildung von Oligomeren sind eng miteinander gekoppelt, insofern als die Nukleotidbindung einer Untereinheit die Voraussetzung ist für deren Einbau in das Oligomer. Deshalb treten keine kooperativen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Untereinheiten in einem Oligomeren auf. Da die K362A-Mutante bei hohen ATP-Konzentrationen noch Nukleotide bindet aber keine Oligomeren ausbildet, scheint das Lys-362 sowohl an der Nukleotidbindung als auch an der Wechselwirkung der Untereinheiten im Oligomeren in direkter oder indirekter Weise beteiligt zu sein.

In Übereinstimmung mit den Gelfiltrationsdaten haben elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt, daß die oligomere Form von La ein ringförmiges Partikel (6-7 Untereinheiten) mit einer zentralen Einkerbung ist, wohingegen die Multimeren aus mehreren aufeinanderliegenden Ringen bestehen, die einen 'unstrukturierten' Kern umgeben.

Protease La wechselwirkt reversibel mit denaturierten oder unstrukturierten Polypeptiden wie  $\alpha$ -Casein oder thermisch entfalteter Aldolase, bildet jedoch irreversible und inaktive Komplexe mit aggregierenden Proteinen wie der thermisch denaturierten  $\alpha$ -Glucosidase. Zusätzlich bildet Protease La stabile und aktive Komplexe mit den Hitzeschockproteinen DnaK und DnaJ *in vitro* und *in vivo*, die aber den durch Protease La katalysierten Abbau von Proteinen *in vitro* nicht beeinflussen. Im Gegensatz zu den Komplexen mit DnaK werden die La/DnaJ-Komplexe nicht durch ATP dissoziiert. DnaJ scheint der wichtigste Hitzeschock-Kofaktor zu sein, der die *in vivo*-Funktion von Protease La vermittelt.