



УДК 577.152.1.03:577.112.4:543.42

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА P-450 МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ В ИССЛЕДОВАНИИ ОЛИГОМЕРНЫХ ФОРМ

Усанов С. А., Турко И. В., Чащин В. Л., Ахрем А. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

С помощью химической модификации бифункциональными имидами исследована молекулярная организация холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 митохондрий коры надпочечников. Показана олигомерная структура цитохрома P-450 в растворе. С использованием диметил-3,3'-дифенилпропиоимидата и расщепления модифицированных продуктов под действием восстанавливающих агентов доказано наличие двух типов межмолекулярных сшивок: «коротких» (на расстоянии 3,0 Å между аминогруппами остатков лизина белка) и «длинных» (на расстоянии 11,9 Å). Анализ продуктов ограниченного протеолиза олигомерных форм свиного цитохрома P-450 с помощью двумерного электрофореза показал, что образование межмолекулярных связей в белке осуществляется за счет сшивания функционального домена (фрагмент F₁) и домена, ответственного за взаимодействие с фосфолипидной мембраной (фрагмент F₂).

На основании полученных данных предложена модель организации холестерингидроксилирующего цитохрома P-450, согласно которой октамерные гетерологические замкнутые структуры гемопротеида образуются в результате взаимодействия фрагмента F₁ одной молекулы цитохрома P-450 с фрагментом F₂ — другой. Обсуждается возможность существования цитохрома P-450 в олигомерной форме в мембране митохондрий.

На внутренней, обращенной в матрикс, стороне митохондриальной мембраны коры надпочечников локализована ферментная система, содержащая в качестве терминальной оксидазы цитохром P-450, который катализирует реакцию окислительного расщепления боковой цепи холестерина с образованием прегненолона [1—4]. Реакция включает в себя три последовательные стадии гидроксилирования [5—6]. Каждый акт окисления требует двух электронов для активации молекулярного кислорода, которые поставляются от NADPH адриендоксинредуктазой и адриендоксином [5—7]. Первоначально гидроксилированию подвергается C22-атом молекулы стероида с образованием (22R)-оксистерина. Затем окисление осуществляется по C20-атому с образованием (20S, 22R)-диоксистерина. Наконец, в третьей стадии по неустановленному механизму происходит окислительное расщепление боковой цепи холестерина между C20- и C22-атомами с образованием прегненолона и изокапронового альдегида.

Несмотря на значительные успехи в выделении и очистке компонентов стероидгидроксилирующей системы, в настоящее время остается неясным, каким образом одна и та же молекула гемопротеида осуществляет три последовательные стадии процесса окисления и какая молекулярная организация системы необходима для выполнения такой сложной функции.

Так как цитохром P-450 — интегральный белок, для его выделения из митохондрий используются детергенты. Удаление детергентов из препаратов выделенного цитохрома P-450 сопровождается его агрегацией в

Использованы следующие сокращения: DMSI — диметилсубервмидат, DTPI — диметил-3,3'-дифенилпропиоимидат.

растворе. С помощью ультрацентрифугирования было показано, что цитохром P-450, выделенный из митохондрий коры надпочечников, существует в виде олигомера, состоящего из 16 субъединиц с M_r 850 000 [8]. Соответствующей обработкой могут быть получены формы, состоящие из 8 и 4 субъединиц. Наиболее активной в реакции превращения холестерина в прегненолон является форма, состоящая из 16 субъединиц [9]. Из 16 субъединиц, входящих в олигомер, только 8 содержат гемовую группу [10].

В нашей лаборатории методом гель-хроматографии получены данные, свидетельствующие о том, что цитохром P-450, лишенный детергента, существует в растворе в виде олигомера с M_r 400 000 [11, 12]. В присутствии 1 М KCl и 0,3% холата натрия олигомер диссоциирует до мономеров с M_r 50 000, при этом цитохром P-450 сохраняет высокоспиновое состояние и нативность. В экспериментах по гель-хроматографии в присутствии 0,3% твина-80 олигомер диссоциирует до комплексов с M_r 115 000. Однако до настоящего времени остается непонятным, является ли этот комплекс димерной формой цитохрома P-450 или это мономер, содержащий жестко связанные мицеллы неионного детергента.

Прямым химическим методом исследования организации полипептидных цепей в белках, основанным на выяснении природы внутри- и межмолекулярных связей, является химическая модификация бифункциональными реагентами. Химическое сшивание белков с помощью расщепляемых бифункциональных реагентов с последующим диагональным электрофорезом — достаточный информативный метод для исследования белок-белковых взаимодействий в растворе и мембране. Цель настоящей работы — исследование молекулярной организации холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 митохондрий коры надпочечников в разных олигомерных состояниях с помощью расщепляемых бифункциональных имидатов, двумерного электрофореза и ограниченного протеолиза.

Бифункциональные имидозфировые неоднократно использовались при исследовании олигомерной структуры ферментов и топологии мембранных белковых комплексов в таких сложных биологических структурах, как рибосомы, мембраны и другие надмолекулярные образования [13, 14]. В обратимо диссоциирующих белковых системах эти реагенты эффективно используются для получения важной информации о функциональных свойствах исследуемой системы, которая как бы фиксируется в определенных состояниях. Определение на поверхности реагирующей молекулы участков, ответственных за взаимодействие, позволяет оценить расстояние между взаимодействующими группами и открывает перспективу для последующих функциональных исследований.

В качестве бифункциональных реагентов для исследования молекулярной организации холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 мы избрали диметилсуберимидат (DMSI) и диметил-3,3'-дитиобиспропиоимидат (DTPI). Расстояние между реакционноспособными группами у них практически одинаково (11,0 и 11,9 Å), но DTPI может расщепляться по дисульфидной связи в присутствии дитиотрепта или 2-меркаптоэтанола. Оба реагента взаимодействуют преимущественно с первичными аминоклупами белков.

Добавление DMSI или DTPI к цитохрому P-450, находящемуся в разных агрегатных состояниях, приводит к образованию олигомерных форм гемопротеида, которые легко проявляются при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия. Основная форма — белок, соответствующий по молекулярной массе димеру цитохрома P-450 (рис. 1). Количество олигомерных белков увеличивается с возрастанием концентрации добавленного реагента. Наряду с кратными олигомерными формами цитохрома P-450 на электрофореграммах появляются полосы, соответствующие белкам с молекулярной массой, промежуточной между мономером и димером. Видимо, это объясняется тем, что повышенная электрофоретическая подвижность связана с образованием внутримолекулярных связей, приводящих к повышению компактности молекулы белка в растворе детергента, а следовательно, к уменьшению ее радиуса Стокса. Правильность этого

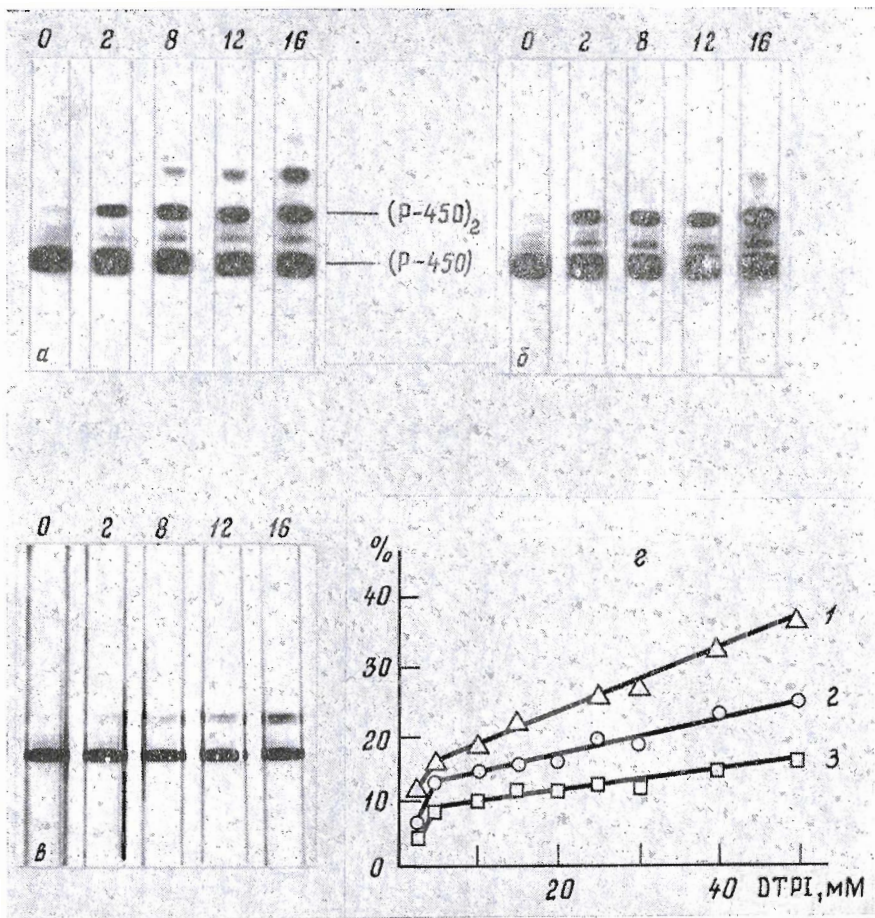


Рис. 1. Анализ олигомерных форм цитохрома Р-450 в реакции с ДТРИ различной концентрации: а, б, в — электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле, г — образование димерной формы (% от общего количества цитохрома Р-450). Реакцию с ДТРИ проводили в течение 20 мин в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4: с 200 мкМ твином-20 (а, 1), без твина (б, 2), с 1 М NaCl и 0,3% холатом натрия (в, 3). Над гелями указана концентрация ДТРИ (мМ)

предположения будет показана далее при использовании расщепляющего бифункционального имидата и двумерного электрофореза.

Согласно рис. 1, картины шивки цитохрома Р-450 в фосфатном буфере, когда гемопротейд существует в виде олигомера с M_r 400 000 [11], и в присутствии твина-20 (M_r 115 000) очень схожи между собой, но существенно отличаются от таковой для белка, находящегося в диссоциированном виде. В последнем случае образуется намного меньше димерной формы цитохрома Р-450. На электрофореграмме наблюдается расщепление полосы, характерной для димерного белка, по-видимому, за счет образования наряду с межмолекулярными еще и внутримолекулярными шивков. В случае мономерной формы цитохрома Р-450 вклад внутримолекулярных шивков по отношению к межмолекулярным возрастает.

Таким образом, количество образующихся олигомерных форм цитохрома Р-450 зависит от исходного состояния гемопротейда и отражает его молекулярную организацию, а не является вероятностной характеристикой. Полученные данные — прямое доказательство олигомерной структуры цитохрома Р-450 в фосфатном буфере и в присутствии детергента.

Так как имидаты наиболее стабильны при высоких значениях рН, при которых также происходит депротонизация аминогрупп белка и возрастает скорость реакции имидата с аминами, обычно реакцию проводят при рН выше 9,0 [13]. Поскольку цитохром Р-450 нестабилен при значениях

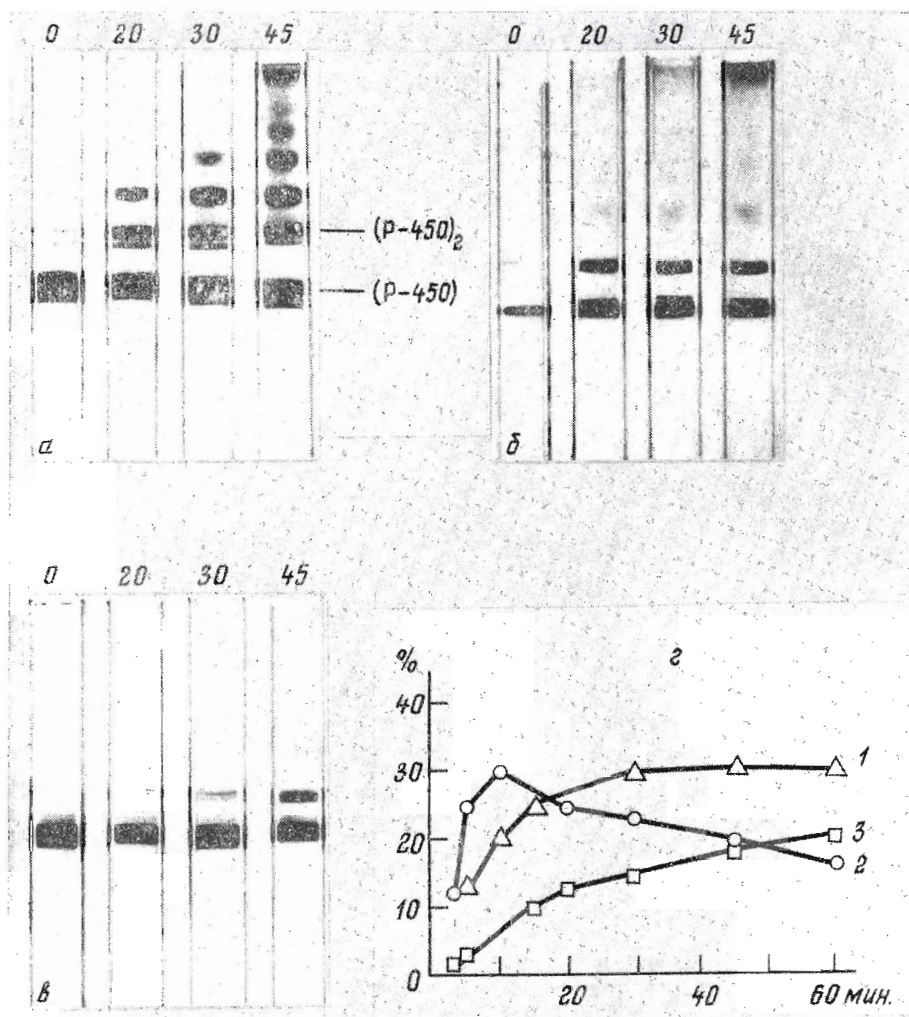


Рис. 2. Кинетика образования олигомерных форм цитохрома Р-450 в реакции с 12 мМ ДТРІ. Условия и обозначения — см. подпись к рис. 1. Над гелями указано время реакции с ДТРІ в минутах

рН, оптимальных для реакции, и превращается в неактивную форму — цитохром Р-420, реакцию проводили при рН 7,4.

На рис. 2 представлены результаты исследования кинетики процесса модификации цитохрома Р-450 ДТРІ. Максимальное количество димера цитохрома Р-450, находящегося в фосфатном буфере, наблюдается через 10 мин, затем его содержание несколько снижается вследствие вовлечения части димера в образование олигомерных форм более высокого порядка. Вместе с тем в присутствии твина-20 наблюдается постоянное увеличение процентного содержания олигомерных форм цитохрома Р-450 вплоть до октамера в течение 60 мин (рис. 2). Такое влияние твина-20 может быть связано с воздействием на условия электрофореза, окрашивания белков или условия проведения реакции. Однако в контрольных экспериментах было показано, что твин-20 не влияет на электрофорез и на окрашивание белков. В последующем было установлено, что детергент оказывает стабилизирующий эффект на имидаты, препятствуя их гидролизу, таким образом пролонгируя их действие.

Для доказательства этого факта к двум равным аликвотам фосфатного буфера рН 7,5, одна из которых содержала 200 мкМ твин-20, добавляли ДТРІ, а через 40 мин — цитохром Р-450. В пробе, не содержащей детергента, образовывалось 11% димера цитохрома Р-450, тогда как в присут-

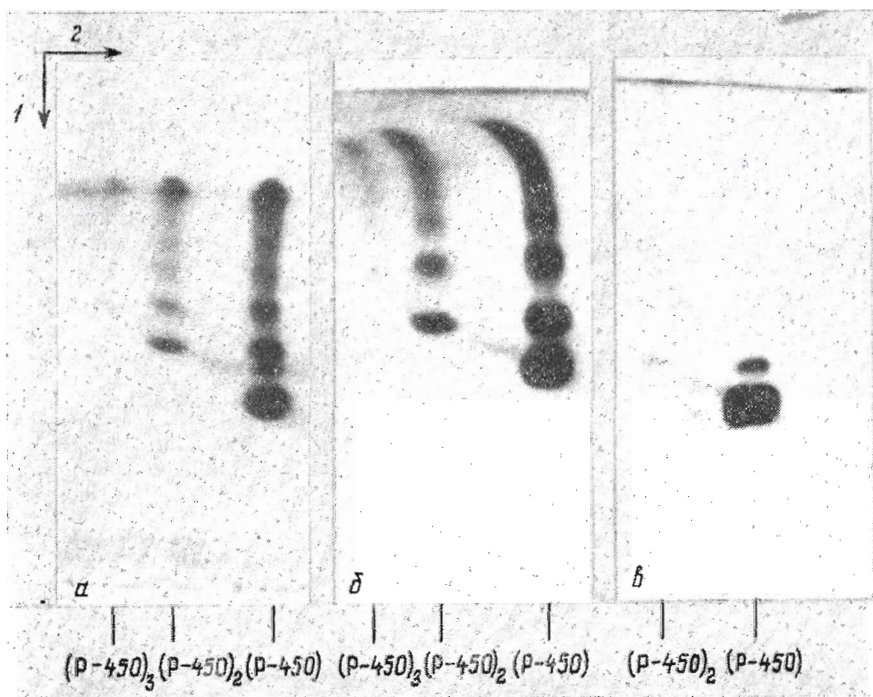


Рис. 3. Двумерный электрофорез в 5% полиакриламидном геле олигомерных форм цитохрома P-450: направление 1 — до обработки, направление 2 — после обработки дитиотреитом. Цитохром P-450 (20 мкМ) спшивали 16 мМ DTPI 45 мин в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, без добавок (а), в присутствии 200 мкМ твина-20 (б) и 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия (в)

ствии твина-20 — 35%. Пролонгирование действия DTPI детергентами, по-видимому, достигается благодаря тому, что твин-20, добавленный в концентрации 200 мкМ, которая существенно выше критической константы мицеллообразования (50 мкМ), образует мицеллы, в которые включаются молекулы реагента, а это препятствует гидролизу имидата.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что кинетика процесса модификации цитохрома P-450 в фосфатном буфере и в присутствии детергента схожи, а в условиях диссоциации образуется лишь незначительное количество димера цитохрома P-450.

Для выяснения природы межмолекулярных связей, приводящих к образованию олигомерных форм цитохрома P-450, применен подход, заключающийся в использовании для модификации расщепляющегося под действием восстанавливающих агентов бифункционального имидата. Обработка цитохрома P-450, находящегося в разных агрегатных состояниях, 800-кратным мольным избытком DTPI, разделение образовавшихся форм цитохрома P-450 в первом направлении в присутствии додецилсульфата натрия и расщепление прореагировавшего имидата дитиотреитом с последующим электрофорезом во втором направлении в тех же условиях, но в присутствии 2-меркаптоэтанола, позволяет получить картину, представленную на рис. 3. Если для цитохрома P-450, находящегося в диссоциирующих условиях, картина относительно проста (расщепление сопровождается практически полным исчезновением олигомерных форм цитохрома P-450 и появлением мономера цитохрома P-450 вне диагонали), то в фосфатном буфере и в присутствии твина-20 она гораздо сложнее.

После расщепления S — S-связи прореагировавшего имидата в этом случае большая часть олигомерных форм цитохрома P-450 исчезает и появляются вне диагонали мономеры цитохрома P-450. Однако наряду с этим на диагонали остаются олигомерные формы гемопротеида, которые не расщепляются дитиотреитом и соответствуют димеру, тримеру и т. д. Над этими формами вне диагонали появляются полосы, указывающие на

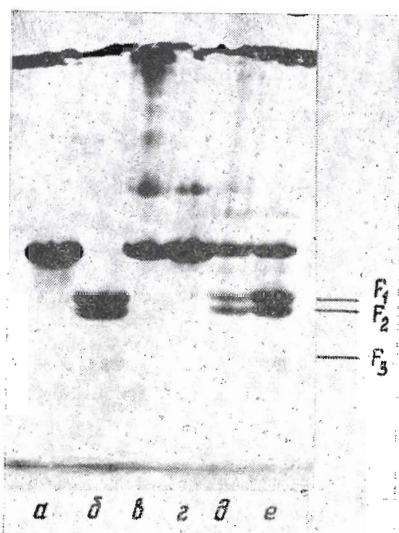


Рис. 4

Рис. 4. Электрофорез в градиентном полиакриламидном геле (5–25%) цитохрома Р-450 исходного (а), обработанного трипсином (б) при соотношении фермент – субстрат 1 : 50 или в течение 45 мин 16 мМ ДТФИ (в), а также образца (г), обработанного 50 мМ дитиотреитом (г) или трипсином без восстановления (д) или восстановленного 50 мМ дитиотреитом (е)

Рис. 5. Двумерный электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле продуктов ограниченного трипсинолиза ковалентно сшитого цитохрома Р-450 до (1) и после (2) обработки дитиотреитом. Цитохром Р-450 (20 мкМ) сшивали 16 мМ ДТФИ в течение 45 мин, а затем обрабатывали трипсином (10 : 1) в течение 60 мин. Условия модификации ДТФИ (а–в) – см. подпись к рис. 1

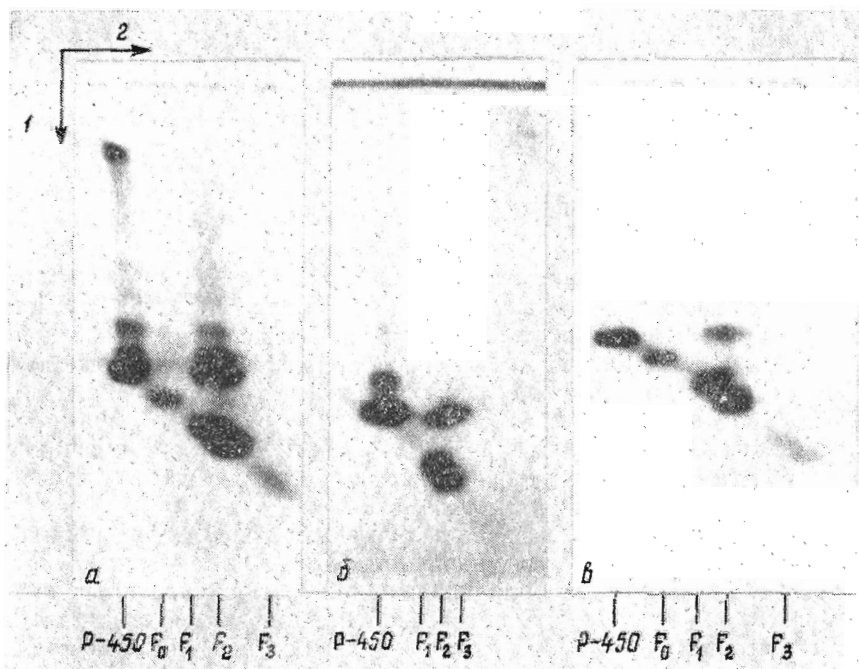


Рис. 5

участие таких нерасщепляющихся форм цитохрома Р-450 в образовании олигомерных форм более высокого порядка. Наличие нерасщепленных форм цитохрома Р-450 не может быть связано с методическими погрешностями, поскольку увеличение времени инкубации в присутствии дитиотреита или его замена на 2-меркаптоэтанол не влияют на картину электрофореза. Это означает, что в нашем случае реализуется ситуация, при которой сама имидатная группа ДТФИ выступает в качестве бифункциональной [15, 16], как результат взаимодействия N-алкилимидата с другой аминогруппой, находящейся на расстоянии 3,0 Å. Этот факт предполагает наличие близко расположенных аминогрупп в местах контакта молекул гемопротенда. Кроме того, из данных, представленных на рис. 3 а, б, следует, что олигомерные формы цитохрома Р-450 могут образовываться как за счет последовательного присоединения молекул гемопротенда, так и в

результате взаимодействия уже образовавшихся димеров, тримеров и т. д. Из рис. 3 вытекает также, что форма цитохрома Р-450 с молекулярной массой, промежуточной между димером и мономером, при восстановлении распадается до мономера, подтверждая высказанное предположение о возможности изменения электрофоретической подвижности в результате образования внутримолекулярных сшивок.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе модификации цитохрома Р-450 бифункциональными имидатами последние образуют с белком два типа сшивок: «длинные» сшивки, расщепляемые под действием восстанавливающих агентов (11,9 Å) и «короткие», нерасщепляемые сшивки (3,0 Å), возникающие за счет собственной потенции имидатной группы бифункционального реагента, что предполагает, таким образом, наличие близлежащих доступных аминокрупп цитохрома.

Ранее, с использованием ограниченного протеолиза трипсином, было показано, что молекула холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 гидролизуеться до двух структурных фрагментов (F_1 и F_2), представляющих каталитический, гемсодержащий домен и домен, ответственный за взаимодействие с фосфолипидной мембраной [17]. Чтобы установить, каким образом ориентированы мономерные молекулы цитохрома Р-450 в олигомерных формах гемопротеида и какие структурные фрагменты молекулы цитохрома Р-450 вовлекаются в образование межмолекулярных связей с соседними молекулами, был использован подход, заключающийся в применении расщепляемых бифункциональных реагентов, двумерного электрофореза и ограниченного протеолиза олигомерных форм цитохрома Р-450 трипсином.

На рис. 4 представлено электрофоретическое разделение продуктов протеолиза сшитых ДТPI олигомерных форм цитохрома Р-450 трипсином при соотношении фермент — субстрат 1 : 50. Исходный цитохром Р-450 (рис. 4а) при обработке трипсином дает два фрагмента — F_1 и F_2 (рис. 4б). При использовании избытка трипсина (1 : 10), в соответствии с ранее полученными данными [18], образуется также некоторое количество фрагмента F_3 . Ограниченный протеолиз сшитого ДТPI цитохрома Р-450 сопровождается образованием фрагментов F_1 и F_2 (рис. 4в) за счет протеолиза мономерной и части олигомерных форм гемопротеида. Вместе с тем в отличие от результатов трипсинолиза цитохрома Р-450, не подвергнувшегося модификации бифункциональными реагентами, в случае модифицированного цитохрома значительное количество мономерной формы не подвергается воздействию трипсина, что указывает на наличие наряду с межмолекулярными сшивками между фрагментами F_1 и F_2 , принадлежащими разным молекулам цитохрома Р-450, также внутримолекулярных связей, препятствующих диссоциации фрагментов одной молекулы гемопротеида.

Восстановление дисульфидной связи сшитого ДТPI цитохрома с помощью дитиотреита приводит к практически полному исчезновению олигомерных форм гемопротеида (рис. 4е), что подтверждает их происхождение за счет образования межмолекулярных связей между фрагментами разных молекул цитохрома Р-450. Одновременно происходит резкое увеличение количества фрагментов F_1 и F_2 . Однако восстановление существенно не влияет на количество мономерной формы цитохрома Р-450. Этот факт можно объяснить лишь высказанным ранее предположением о существовании ковалентной межмолекулярной сшивки между фрагментом F_1 одной молекулы цитохрома Р-450 и фрагментом F_2 — другой.

Результаты ограниченного протеолиза сшитого ДТPI цитохрома Р-450 более наглядно проявляются при использовании двумерного электрофореза после восстановления дисульфидной связи (рис. 5). Для мономерной формы цитохрома Р-450 (рис. 5в) трипсинолиз сопровождается образованием составляющих фрагментов F_1 и F_2 , хотя значительное количество цитохрома Р-450 устойчиво по отношению к трипсину, свидетельствуя о том, что кроме расщепляемых связей между фрагментами одной и той же молекулы гемопротеида присутствуют и нерасщепляемые «короткие» связи. Не совсем, однако, понятен факт образования незначительного коли-

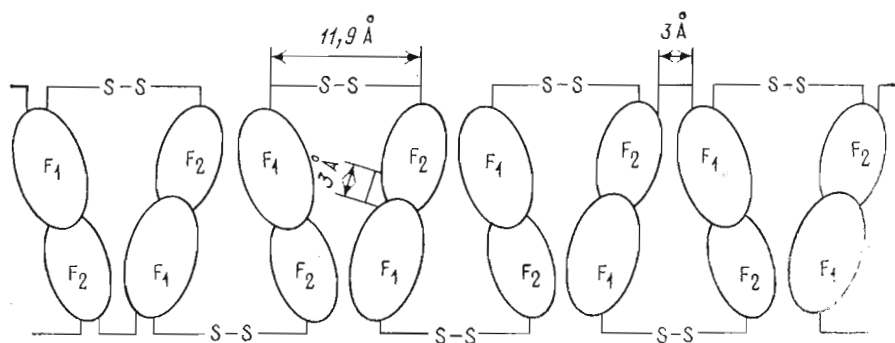


Рис. 6. Гипотетическая модель организации цитохрома Р-450 в растворе. «Короткая» сшивка — 3 Å, «длинная» — 11,9 Å

чества фрагмента F_0 с M_r 40 000, образующегося при трипсинолизе цитохрома Р-420.

Аналогичная картина наблюдается при ограниченном трипсинолизе олигомерной формы цитохрома Р-450 и гемопротеида в присутствии твина-20 (рис. 5 а, б). В этих случаях олигомерные формы цитохрома Р-450 распадаются до мономера, устойчивого по отношению к трипсину за счет «короткой» связи, и фрагментов F_1 и F_2 , образующихся при разрыве дисульфидной связи сшитых белков. Для цитохрома Р-450, находящегося в олигомерном состоянии в фосфатном буфере, характерно отсутствие после протеолиза фрагмента F_0 .

Таким образом, результаты, полученные с помощью ограниченного протеолиза цитохрома Р-450, модифицированного ДТPI, подтвердили существование межмолекулярных расщепляемых и не расщепляемых дитиотреитом связей между фрагментами F_1 и F_2 и показали, что кроме расщепляемых внутримолекулярных связей между фрагментами F_1 и F_2 одной молекулы образуются еще «короткие», не расщепляемые дитиотреитом связи, за счет взаимодействия имидатной группы с близлежащими остатками лизина белка. Кроме того, анализ полученных нами данных по исследованию молекулярной организации холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 с помощью бифункциональных имидатов позволяет предположить, что цитохром Р-450 способен образовывать олигомерные, замкнутые комплексы гетерологического типа [19], в которых смежные домены соседних молекул гемопротеида соединены благодаря образованию ковалентных, расщепляемых дитиотреитом связей на расстоянии 11,9 Å и нерасщепляемых «коротких» связей длиной 3,0 Å (рис. 6).

Предложенная модель хорошо объясняет полученные нами результаты. Так, при восстановлении с помощью дитиотреита дисульфидной связи комплексов, сшитых реагентом, образуются мономеры цитохрома Р-450 из тех участков белкового октамера, где отсутствуют «короткие», нерасщепляемые связи, а также димеры, тримеры и т. д. из участков, где они присутствуют (рис. 3 а, б). Использование ограниченного протеолиза трипсином дало возможность показать, что связи между соседними молекулами цитохрома Р-450 образуются только в результате сшивания фрагментов F_1 и F_2 . Мы ни разу не смогли наблюдать межмолекулярных сшивок типа F_1-F_1 или F_2-F_2 . В отдельных экспериментах (данные не приведены) проводилась модификация бифункциональными имидатами цитохрома Р-450, предварительно расщепленного до фрагментов F_1 и F_2 . В присутствии реагента происходит восстановление мономерной молекулы цитохрома Р-450 из ее структурных фрагментов F_1 и F_2 , но никогда не образуются связи между одинаковыми фрагментами.

Ограниченный протеолиз позволил установить наличие нерасщепляющихся «коротких» внутримолекулярных сшивок, благодаря которым гемопроteid становится устойчивым по отношению к трипсину (рис. 4 д, е). Для понимания молекулярной организации холестерингидроксилирующе-

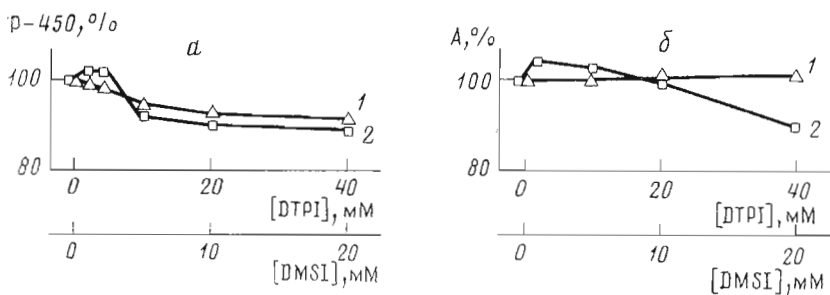


Рис. 7. Карбонильные комплексы восстановленной формы цитохрома P-450 (а) и холестерингидроксилирующая активность гемопротеидов в реконструированной системе (б) после обработки DMSI (1) и DTPI (2)

то цитохрома P-450 важна реализация ситуации, при которой монофункциональная группа имидата выступает в качестве бифункциональной, что предполагает наличие близко расположенных экспонированных остатков лизина на фрагментах молекулы цитохрома P-450 в области перекрытия фрагментов и в участках контакта с соседними молекулами. Такая организация отражает жесткую и селективную упорядоченность белковых молекул в олигомере.

Значительный интерес представляет выяснение влияния химической модификации цитохрома P-450 бифункциональными реагентами на функциональные характеристики гемопротеида. Это объясняется тем, что до настоящего времени не установлено, в каком виде функционирует цитохром P-450 в стероидгидроксилирующей системе — в виде мономера или в олигомерной форме, образуются ли олигомеры цитохрома P-450 в процессе его выделения, или гемопротеид изначально существует в мембране в виде олигомера.

Впервые возможность диссоциации олигомеров цитохрома P-450 до мономеров была показана нами посредством использования буферных растворов, содержащих ионные детергенты и имеющих высокую ионную силу. В присутствии 0,3% холата натрия и 1 М хлористого натрия цитохром P-450 существует в мономерной форме с сохранением нативных характеристик [12]. Однако остается неясным, взаимодействует ли адренодоксин с олигомером цитохрома P-450, или агрегация цитохрома P-450 сопровождается экранированием на молекуле гемопротеида «площадки», отвечающей за комплексообразование с адренодоксином, а добавленный адренодоксин вызывает диссоциацию олигомерной формы гемопротеида. В том случае, если адренодоксин способен взаимодействовать с олигомером цитохрома P-450 и агрегация не оказывает влияния на функциональную активность, в качестве рабочей модели можно предположить кластерную организацию холестерингидроксилирующей системы в митохондриальной мембране.

Модификация холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 значительными избытками DMSI или DTPI практически не влияет на способность к образованию карбонильных комплексов восстановленных форм сшитого цитохрома P-450, которые являются критерием нативности гемопротеида (рис. 7а). Исследование ферментативного превращения холестерина в прегненолон модифицированным DMSI или DTPI цитохромом P-450 показало, что образование ковалентных сшивок практически не сказывается на каталитической активности гемопротеида (рис. 7б). При низких концентрациях реагента наблюдается даже некоторая активация холестерингидроксилазной активности. Такой эффект используемых бифункциональных имидатов свидетельствует о том, что модификация лишь фиксирует естественную конформацию гемопротеида, отражая истинную организацию цитохрома P-450, и существенно не влияет на другие физико-химические характеристики. Кроме того, полученные результаты указывают на то, что фиксация олигомерных структур цитохрома

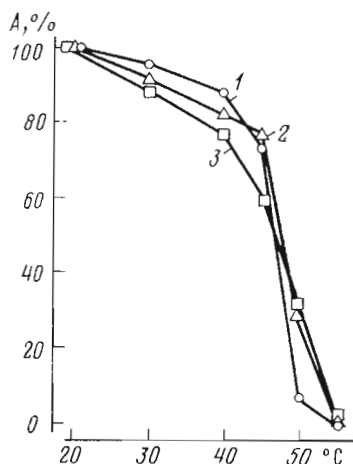


Рис. 8. Температурная инактивация цитохрома P-450 (1) и продуктов его модификации DMSI (2) и DTPI (3). Цитохром P-450 (30 мкМ) в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, обрабатывали 20 мин 6 мМ DMSI или DTPI, затем белок инкубировали 10 мин в интервале температур 20–55° С. После окончания инкубации пробы белка охлаждали до 4° С и измеряли активность (20 S, 22 R)-холестерингидроксилирующей системы

P-450 бифункциональными реагентами не сказывается на средстве гемопротейда по отношению к аденодоксину.

Известно, что бифункциональные реагенты часто стабилизируют белки-ферменты, препятствуя разворачиванию полипептидной цепи и повышая жесткость структуры белков [20]. Мы изучали термостабильность цитохрома P-450, сшитого DMSI или DTPI. Как следует из рис. 8, обработка цитохрома P-450 200-кратными избытками реагента существенно не сказывается на термостабильности гемопротейда.

Таким образом, анализ полученных данных по исследованию молекулярной организации холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 митохондрией коры надпочечников с помощью бифункциональных имидатов показывает эффективность используемого в работе подхода и позволяет предположить, что цитохром P-450 существует в виде олигомеров (октамеров) гетерологического типа. Окончательный ответ на вопрос о механизме самосборки цитохрома P-450 требует понимания структурных особенностей молекулы гемопротейда и идентификации участков полипептидной цепи, вовлекающихся во взаимодействие с белками-партнерами. Такая работа проводится в настоящее время в нашей лаборатории.

Экспериментальная часть

В работе использовали холестерин, прегненолон, холат натрия, дитиотреит, 2-меркаптоэтанол, диметилсуберимидат, диметил-3,3'-дитиобиспропиоимидат, трипсин, кумаси R-250, трис, N-этилmaleимид (Serva, ФРГ), сефарозу 4В, активированную бромцианом (Pharmacia, Швеция), кумаси G-250, сшитый альбумин для определения молекулярного веса (Sigma, США). Другие реактивы — отечественного производства.

Цитохром P-450 из митохондрией коры надпочечников выделяли как описано ранее [12], используя на заключительных стадиях аффинную хроматографию на аденодоксин-сефарозе 4В. По данным электрофореза, белок гомогенен в присутствии додецилсульфата натрия, имеет M_r 49 000 ± 1000, содержит 15–16 нмоль гема на 1 мг белка и характеризуется спектрофотометрическим индексом $A_{393}/A_{280} = 0,83$ и $(A_{393} - A_{470}) - (A_{417} - A_{470}) = 1,5 - 1,7$. По данным двойной иммунодиффузии, белок гомогенен в присутствии моноспецифической антисыворотки. Концентрацию цитохрома P-450 определяли из разностных спектров карбонильного комплекса восстановленной формы гемопротейда [21], используя коэффициент молярного поглощения 91 мМ⁻¹·см⁻¹.

Аденодоксинредуктазу и аденодоксин выделяли по методике, описанной ранее [12]. Концентрацию белков определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярного поглощения 11 и 10 мМ⁻¹·см⁻¹ при 450 и 414 нм соответственно. Ферментативную активность определяли в реконструированной системе, содержащей 1,25 нмоль аденодоксинредуктазы, 6,25 нмоль аденодоксина и 1,25 нмоль цитохрома P-450. Радио-

активный субстрат и продукт реакции разделяли хроматографией в тонком слое и количество образовавшегося прегненолона определяли радиометрически [22].

Ограниченный протеолиз цитохрома P-450 трипсином осуществляли при 20° С в течение 60 мин, используя весовое соотношение фермент — субстрат 1:50 или 1:10. Реакцию останавливали, добавляя ингибитор трипсина, и аликвоты анализировали электрофорезом в присутствии додецилсульфата натрия.

Модификацию холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 бифункциональными имидатами осуществляли при 25° С в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4. Концентрация гемопротеида и имидата составляла 15—30 мкМ и 2—20 мМ соответственно. Реакцию останавливали добавлением 50 мМ уксуснокислого аммония. Для предотвращения образования дисульфидных связей в процессе электрофореза образцы цитохрома P-450 обрабатывали 10 мМ N-этилмаленимидом.

Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [23]. Электрофорез в блоках осуществляли на приборе ПЭФА-1, а в пластинках полиакриламидного геля (8×8 см) — на приборе GE-2/4 (Pharmacia, Швеция).

При двумерном электрофорезе после разделения белков в первом направлении в отсутствие 2-меркаптоэтанола гели выдерживали 60 мин в электродном буфере, содержащем 0,1 М дитиотреит при 20° С, а затем проводили электрофорез во втором, перпендикулярном, направлении в присутствии 2-меркаптоэтанола.

После электрофореза гели помещали в раствор изопропанол — вода — уксусная кислота (5:5:1), фиксировали в течение 1 ч при 60° С и окрашивали 0,04% раствором кумасси G-250 в 3,5% хлорной кислоте в течение 60 мин при 60° С. Гели отмывали 7,5% уксусной кислотой. В случае прокрашивания кумасси R-250 процедуру проводили согласно [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Churchill P. F., de Alvare L. R., Kimura T. J. *Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 14, p. 4924—4929.
2. Simpson E. R., Boyd G. S. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1966, v. 24, № 1, p. 10—17.
3. Burstein S., Gut N. *Steroids*, 1976, v. 28, № 1, p. 115—131.
4. Churchill P. F., Kimura T. J. *Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 20, p. 10443—10448.
5. Shikita M., Hall P. F. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, № 4, p. 1441—1445.
6. Dugue C., Morisaki M., Ikekawa N., Shikita M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 82, № 1, p. 179—187.
7. Hume R., Boyd G. S. *Biochem. Soc. Trans.*, 1978, v. 6, № 3, p. 693—698.
8. Shikita M., Hall P. F. *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 16, p. 5605—5609.
9. Tagaki Y., Shikita M., Hall P. F. *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 21, p. 8445—8448.
10. Tilley B. E., Watanuki M., Hall P. F. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 70, № 4, p. 1303—1307.
11. Ахрем А. А., Лапко В. И., Лапко А. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 8, с. 1201—1209.
12. Akhrem A. A., Lapko V. N., Lapko A. G., Schkumatov V. M., Chashchin V. *Acta biol. et med. Germ.*, 1979, v. 38, № 2—3, p. 257—273.
13. Peters K., Richards F. M. *Ann. Rev. Biochem.*, 1977, v. 46, p. 523—551.
14. Ji T. H. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 559, № 1, p. 39—69.
15. Sweadner K. J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 78, № 3, p. 962—969.
16. Browne D. T., Kent S. B. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 67, № 1, p. 133—138.
17. Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 5, с. 789—791.
18. Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 2, с. 285—295.
19. Friedrich P., Hadji J., Bartha P. In: *Protein structure, function and application*. FEBS Fed. Eur. Biochem. Soc. 12 Mit., Dresden, 1978, № 52, p. 239—248.
20. Маргинек К., Березин И. В. *Успехи химии*, 1980, т. XLIX, вып. 5, с. 737—764.
21. Omita T., Sato R. *J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, № 7, p. 2370—2379.
22. Ахрем А. А., Марцев С. И., Чащин В. Л. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 5, с. 786—788.
23. Davis G. E., Stark G. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, v. 66, № 3, p. 651—656.
24. Weber K., Osborn M. J. *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, № 16, p. 4406—4412.

Поступила в редакцию
10.II.1984

MOLECULAR ORGANIZATION OF ADRENOCORTICAL CYTOCHROME P-450_{sc}
CHEMICAL MODIFICATION
WITH BIFUNCTIONAL REAGENTS IN THE STUDY
OF OLIGOMERIC FORMS

USANOV S. A., TURKO I. V., CHASHCHIN V. L., AKHREM A. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk*

The molecular organization of adrenocortical cytochrome P-450_{sc} has been investigated using chemical modification with bifunctional imidates. The oligomeric organization of cytochrome P-450_{sc} in solution has been shown. The application of dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidate and subsequent cleavage of the modified products by reducing agents revealed the presence of two types of intramolecular cross-links: «short» at the distance of 3,0 Å between the amino groups of lysine residues and «long» ones at a distance of 11,9 Å. The analysis of the products, obtained by limited proteolysis of the oligomeric forms of the cross-linked cytochrome P-450, by two-dimensional electrophoresis has shown that the cross-links are formed between the functional domain (fragment F₁) and domain responsible for the interaction with the phospholipid membrane (fragment F₂). A model for cytochrome P-450_{sc} molecular organization has been suggested on the basis of the obtained results.