БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 9 * №12 * 1983

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.1'13:577.112.083

РАЗДЕЛЕНИЕ ДОМЕНОВ ХОЛЕСТЕРИНСПЕЦИФИЧНОГО ЦИТОХРОМА Р-450 И ИХ ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Чащин В. Л., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Ахрем А. А.

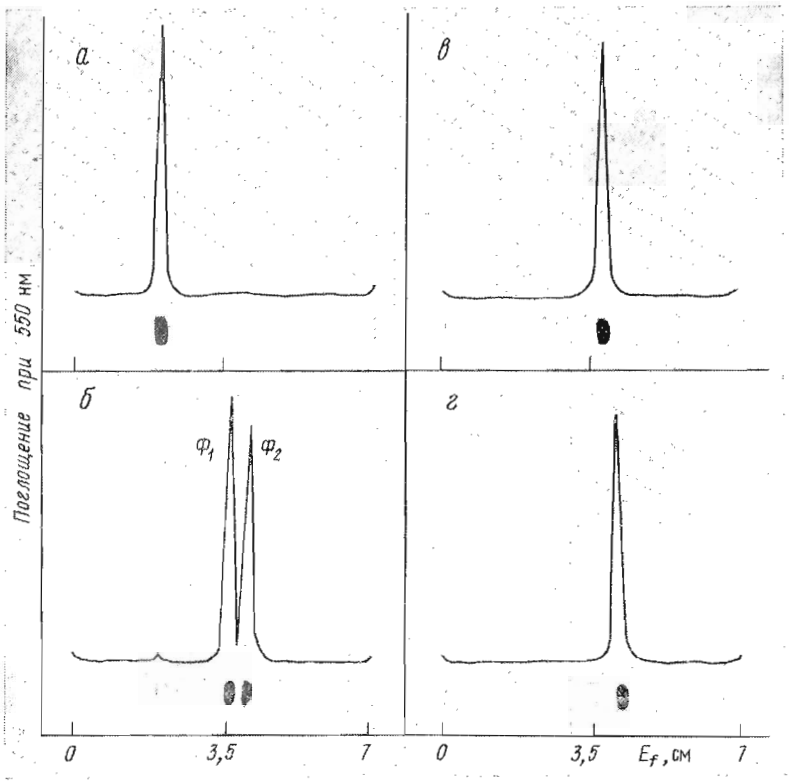
Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Ранее нами было показано, что контролируемый ограниченный трипсинолиз холестеринспецифичного цитохрома Р-450 из митохондрий коры надпочечников позволяет выявить его доменную организацию. Гемопротеид состоит из двух глобул (доменов), соответствующих фрагментам полипептидной цепи, $Ф_1$ (M_r 27 000) и $Ф_2$ (M_r 22 000) [1, 2]. Цитохром Р-450, модифицированный трипсином до эквимольной суммы доменов, сохранял основные спектральные и функциональные свойства нативного белка и обладал в нейтральных буферных системах характерным для этого белка электрофоретическим и хроматографическим поведением [3], что говорило в пользу прочного нековалентного взаимодействия между доменами. В качестве необходимого этапа исследования первичной структуры цитохрома Р-450 [4] и ее взаимосвязи с функцией в настоящей работе приведены данные по разделению фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ и их локализации в полипептидной цепи.

Применение для разделения фрагментов препаративного гель-электрофореза, ионообменной и гель-хроматографии в диссоциирующих условиях (буферы, содержащие мочевину, додецилсульфат натрия или хлоргидрат гуанидина) оказалось неэффективным как из-за незначительной разницы в их молекулярных массах, так и из-за сильной агрегации. Эффективным подходом для разделения могла оказаться селективная ковалентная, но обратимая иммобилизация одного из фрагментов. По результатам карбоксиметилирования иод[^{14}C]уксусной кислотой установлено, что фрагмент $Ф_1$ содержит один остаток цистеина, в то время как $Ф_2$ — три.

Ранее было установлено, что $Ф_1$ содержит гемовую группу [3], поэтому единственный остаток цистеина, вероятно, связан с железом гема. Поэтому вполне вероятной представлялась возможность селективной ковалентной иммобилизации фрагмента $Ф_2$ на активированной тиол-сефарозе.

Расщепление трипсином цитохрома Р-450 до фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ проводили в течение 30—40 мин в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 М NaCl, 0,3% холат натрия, 0,1 мМ EDTA (буфер А), при соотношении фермент — субстрат 1:50 [1]. Продукты более глубокой деградации белка отделяли с помощью аффинной хроматографии на адренодоксин-сефарозе [3]. В типичном эксперименте по разделению фрагментов использовали 1 мкмоль модифицированного трипсином цитохрома и 1,5 г тиопропил-сефарозы 6В (Pharmacia, Швеция), уравновешенной буфером А. Смесь фрагментов в объеме 20 мл пропускали при 20° С со скоростью 10 мл/ч через колонку, заполненную тиопропил-сефарозой. В этих условиях происходит ковалентное присоединение модифицированного трипсином белка к адсорбенту (степень иммобилизации 90—95%) в результате реакции тиол-дисульфидного обмена между доступными SH-группами белка и оксипропил-2-пиридилдисульфидом, связанным с сефаро-



Денситограммы гелей после электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия исходного цитохрома Р-450 (*а*), цитохрома Р-450, модифицированного трипсином до суммы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ (*б*), и индивидуальных фрагментов $Ф_1$ (*в*) и $Ф_2$ (*г*), выделенных хроматографией на тиопропил-сефарозе

зой. Гель промывали буфером А до исчезновения в элюате 2-тиопиридона и непрореагировавшего белка. Колонку уравновешивали 0,05 М фосфатным буфером (pH 7,4), промывали 50 мл буферного раствора, содержащего 7 М хлоргидрат гуанидина, и окончательно — этим же раствором с 0,1 М 2-меркаптоэтанолом.

На рисунке представлены результаты гель-электрофореза в денатурирующих условиях [5] отдельных фракций, а также исходного и модифицированного цитохромов Р-450. Видно, что хроматография на тиопропилсефарозе позволила разделить фрагменты $Ф_1$ и $Ф_2$ (электрофореграммы *в* и *г* соответственно); при этом $Ф_1$ элюировался буфером, содержащим 7 М хлоргидрат гуанидина, вызывающим диссоциацию комплекса фрагментов, а $Ф_2$ — после добавления в буфер 2-меркаптоэтанола. Выходы фрагментов составляли 80—90% в расчете на взятый в опыт модифицированный трипсином белок. Так как выход модифицированного до суммы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ цитохрома Р-450 составляет 70—80%, после разделения можно получать из 1 мкмоль нативного цитохрома Р-450 0,72—0,56 мкмоль индивидуальных фрагментов. Спектрофотометрический анализ [6] показал, что в процессе иммобилизации высвобождается 1,9—2,1 мкмоль 2-тиопиридона. Следовательно, ковалентная иммобилизация $Ф_2$ осуществляется за счет двух экспонированных SH-групп.

Согласно таблице, аминокислотный состав нативного белка и сумма аминокислотных составов $Ф_1$ и $Ф_2$ различаются незначительно, что подтверждает наше предположение о небольшой протяженности трипсинчувствительной зоны, соединяющей фрагменты [2]. При изучении первичной структуры цитохрома Р-450 нами была установлено N-концевая аминокислотная последовательность белка [4]. Изучение индивидуальных фрагментов показало, что N-концевая последовательность $Ф_1$ и С-концевой остаток $Ф_2$ идентичны аналогичным характеристикам нативного цитохро-

Аминокислотный состав цитохрома Р-450 и его индивидуальных фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$

Аминокислотный остаток	Р-450	$Ф_1$	$Ф_2$	$Ф_1+Ф_2$
Asx	36,60(37)	20,18(20)	18,02(18)	38
Thr	22,01(22)	10,02(10)	9,94(10)	20
Ser	23,83(24)	12,11(12)	9,72(10)	22
Glx	48,71(49)	27,70(28)	20,64(21)	49
Pro	24,95(25)	17,12(17)	9,94(10)	27
Gly	21,62(22)	12,67(13)	9,19(9)	22
Ala	20,43(20)	10,30(10)	10,05(10)	20
$^1/_2$Cys	3,66(4)	1,11(1)	3,49(3)	4
Met	8,79(9)	3,53(4)	8,85(9)	13
Ile	25,42(25)	12,25(12)	11,03(11)	23
Leu	42,06(42)	21,16(21)	22,50(23)	44
Tyr	14,97(15)	11,55(12)	5,24(5)	17
Phe	25,42(25)	14,62(15)	9,17(9)	24
Lys	26,61(27)	14,50(15)	10,59(11)	26
His	11,17(11)	6,82(7)	4,37(4)	11
Trp	8,08(8)	5,62(6)	2,40(2)	8
Arg	23,76(24)	13,92(14)	10,92(11)	25
Val	26,14(26)	12,53(13)	12,01(12)	25
N-Концевой	Ile	Ile	–	–
С-Концевой	Ala	Arg	Ala	–
Общее количество остатков	415	230	188	418
Молекулярная масса M_r	49 000	27 000	22 000	–

ма Р-450. Таким образом, $Ф_1$, содержащий гемовую группу [3], образует каталитический домен нативной молекулы цитохрома Р-450 и составляет N-концевую часть полипептидной цепи, а $Ф_2$ представляет собой домен, локализованный в С-концевой части.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 285–295.
2. *Akhrem A. A., Vasilevsky V. I., Shkumatov V. M., Chashchin V. L.* In: Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis/Eds Coon M. J. et al. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 77–84.
3. *Akhrem A. A., Vasilevsky V. I., Adamovich T. B., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L.* In: Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450/Eds Gustafsson J.-A. et al. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 57–64.
4. *Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Лапко А. Г., Куприна Н. С., Ахрем А. А.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1307–1320.
5. *Weber K., Osborn M. J.* J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406–4412.
6. *Grassetti D. R., Murray J. F.* Arch. Biochem. and Biophys., 1967, v. 119, № 1, p. 41–49.

Поступило в редакцию
16.V.1983

SEPARATION AND LOCALIZATION TO THE POLYPEPTIDE CHAIN OF DOMAIN IN THE CHOLESTEROL-SPECIFIC CYTOCHROME P-450

CHASHCHIN V. L., VASILEVSKY V. I., SHKUMATOV V. M., AKHREM A. A.

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

The separation of the two domains, disclosed by limited trypsinolysis in the cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450, by covalent chromatography on thiopropyl-Sepharose 6B is described. The domains F_1 (MW 27 000) and F_2 (MW 22 000) are shown to belong to the N-terminal and C-terminal regions of the polypeptide chain, respectively.