



УДК 577.152.199.1'134 : 577.112.4 : 543.544

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ АДРЕНОДОКСИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ФРАГМЕНТА
ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА P-450
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ***Чащин В. Л., Турко И. В., Ахрем А. А., Усанов С. А.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

Холестерингидроксилирующая система митохондрий коры надпочечников включает в себя три белка: аденодоксинредуктазу, аденодоксин и цитохром P-450 [1]. Для понимания механизма электронного транспорта в процессе гидроксилирования и выяснения молекулярной организации системы в митохондриальной мембране большое значение имеют данные о расположении на молекуле цитохрома P-450 каталитического центра и «площадки» для связывания аденодоксина. Ранее [2] методом ограниченного протеолиза было показано, что молекула цитохрома P-450 состоит из двух структурных фрагментов — F₁ (27 000 Да) и F₂ (22 000 Да), — и установлено, что каталитический центр, содержащий протогем IX, локализован во фрагменте F₁, который представляет собой N-концевую часть полипептидной цепи гемопротеида [3].

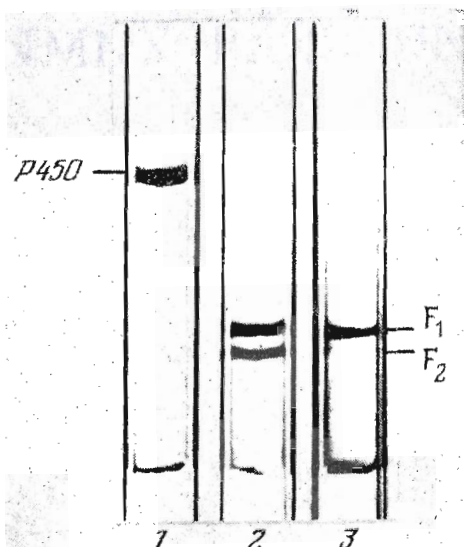
Целью настоящей работы явилась локализация фрагмента цитохрома P-450, ответственного за взаимодействие с аденодоксином. Для решения этой задачи необходимо было сорбировать цитохром P-450 за счет биоспецифического сродства на иммобилизованном аденодоксине и затем, используя бифункциональные реагенты,шить эти два белка. Последующая модификация до фрагментов F₁ и F₂ и их разделение должны были выявить аденодоксинсвязывающий фрагмент.

Поскольку ранее [4] было установлено, что цитохром P-450, расщепленный до фрагментов F₁ и F₂, сохраняет способность нативного гемопротеида взаимодействовать с аденодоксином, иммобилизованным на BrCN-сефарозе, с образованием функционально активного комплекса, в данной работе, чтобы избежать протеолиза иммобилизованного аденодоксина, цитохром P-450 расщепляли протеназой до фрагментов F₁ и F₂ перед взаимодействием с аденодоксин-сефарозой.

Цитохром P-450, аденодоксинредуктазу и аденодоксин выделяли как описано ранее [5].

Чтобы исключить нежелательные стерические эффекты, был использован аденодоксин, иммобилизованный на сефарозе через длинную спейсерную группу: сефароза — OCH₂CH(OH)CH₂NHCH₂CH₂NHC(O)CH₂SCH₂·CH₂CH₂C(NH)NH — аденодоксин.

Схема эксперимента состояла в следующем. Первоначально были заблокированы свободные SH-группы фрагмента F₂, чтобы в последующем избежать побочных реакций по ним. Обработка цитохрома P-450 (35 мкМ) в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) 35 мМ N-этилмалеимидом в течение 60 мин позволила модифицировать все три SH-группы фрагмента F₂ [3]. Затем к такому белку добавляли 7-кратный мольный избыток N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата и инкубировали 30 мин при 23°С [6]. Для удаления избытка реагента после окончания инкубации цитохром P-450 наносили на колонку с сефадексом G-25, уравновешенным 50 мМ фосфатным буфером (рН 7,4), и элюировали тем же буфером. Число введенных 2-пиридилдисульфидных групп, определенное по количеству высвободившегося 2-тиопиридона ($\lambda_{\text{макс}}$ 343 нм, ϵ 8,08·10³ М⁻¹·см⁻¹ [6]) после обработки модифицированного цитохрома P-450 50 мМ дитиотреи-



Электрофорез в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия цитохрома P-450 (1); цитохрома P-450, модифицированного трипсином до фрагментов F₁ и F₂ (2); фрагмента цитохрома P-450, взаимодействующего с аденодоксином (3)

том, составляет в данных условиях 3,28 (3) на молекулу гемопротейда. Далее цитохром P-450 обрабатывали 30 мин трипсином в соотношении цитохром P-450 — трипсин 50:1. Реакцию останавливали добавлением 3-кратного по отношению к трипсину избытка соевого ингибитора трипсина.

Так как у взятого в работу иммобилизованного аденодоксина не оказалось SH-группы, доступной для реакции с 2-пиридилдисульфидными группами цитохрома P-450, аденодоксин-сефарозу обрабатывали 30 мин 10 мМ метил-4-меркаптобутиримидатом [7], что позволило ввести 1,22 (1) SH-группу на молекулу аденодоксина. Число SH-групп определено по реакции с 4,4'-дипиридилдисульфидом [6].

На заключительном этапе модифицированный трипсином цитохром P-450 биоспецифически сорбировался на предварительно тиолированную аденодоксин-сефарозу. Одновременно с этим должно было происходить образование ковалентной S—S-связи между аденодоксином и белком, биоспецифически с ним взаимодействующим. Подтверждением того, что был получен именно биоспецифически сшитый комплекс модифицированного до фрагментов цитохрома P-450 с аденодоксином, является сохранение цитохромом P-450 в данных условиях способности ферментативно восстанавливаться в присутствии стехиометрических количеств аденодоксин-редуктазы и NADPH.

Для удаления фрагмента, не соединенного с аденодоксином ковалентной связью, сорбент промывали 50 мМ фосфатным буфером (pH 8,0) с 7 М гуанидинхлоридом. Фрагмент цитохрома P-450, взаимодействующий с аденодоксином и ковалентно сшитый с ним, элюировали 5% 2-меркаптоэтанолом с 2% додецилсульфатом натрия. Полученный образец был подвергнут электрофорезу в полиакриламидном геле.

Анализ электрофореграмм (рисунок) показал, что исходный препарат цитохрома P-450, модифицированного трипсином, содержит эквимольные количества фрагментов F₁ и F₂, тогда как образец, полученный после аденодоксин-сефарозы, содержит 92% фрагмента F₁ и только 8% фрагмента F₂.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что «площадка» связывания аденодоксина находится в N-концевом гемсодержащем фрагменте F₁ холестерингидроксилирующего цитохрома P-450.

Авторы приносят благодарность С. Н. Гилевичу за синтез аденодоксин-сефарозы, использованной в данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Omura T., Sanders E., Estabrook R. W. Arch. Biochem. and Biophys., 1966, v. 117, № 3, p. 660-673.
2. Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 2, p. 285-295.
3. Akhrem A. A., Vasilevsky V. I., Adamovich T. B., Lapko A. G., Schkumatov V. M., Chashchin V. L. In: Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450/Eds Gustafsson J.-Å. et al. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 57-64.
4. Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 6, с. 892-900.
5. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 6, с. 780-786.
6. Carlsson J., Drevin H., Axén R. Biochem. J., 1978, v. 173, № 3, p. 723-737.
7. Sun T.-T., Bollen A., Kahan L., Traut R. R. Biochemistry, 1974, v. 13, № 11, p. 2334-2340.

Поступило в редакцию
18.VI.1984

LOCALIZATION OF ADRENODOXIN BINDING FRAGMENT OF CYTOCHROME
P-450_{SCC} FROM ADRENOCORTICAL MITOCHONDRIA

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

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

The interaction between cytochrome P-450_{SCC} and adrenodoxin has been studied using cleavable cross-linking reagents and limited trypsinolysis. The data obtained indicate that the site responsible for adrenodoxin binding is located on the NH₂-terminal fragment F₁ of cytochrome P-450_{SCC}.