



УДК 577.152.191'13+546.11.027'3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА *c*
С ЦИТОХРОМОКСИДАЗОЙ МЕТОДОМ ТРИТИЕВОЙ ПЛАНИГРАФИИФилатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф.,
Ножевникова Е. В.,* Нейман Л. А.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;*** Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Действием термически активированного трития на цитохромоксидазу сердечной мышцы быка и ее комплекс с цитохромом *c* (в виде молекулярных кристаллов) получены соответствующие меченые препараты с высокой удельной радиоактивностью (9 Ки/моль). По распределению радиоактивности между субъединицами в том и другом препарате фермента количественно определена степень экранирования отдельных участков поверхности цитохромоксидазы цитохромом *c*.

Цитохромоксидаза (ферроцитохром *c*: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.9.3.1) — трансмембранный белок, состоящий у высших млекопитающих из 12 различных полипептидов, которые имеют молекулярную массу от 5000 до 50 000 Да. Простетическими группами этого фермента являются два гема *a* и два атома меди, а его биологическая функция заключается в обеспечении передачи электронов от цитохрома *c* к молекулярному кислороду, непосредственно взаимодействующему с одним из гемов *a*.

Исследование таких многокомпонентных мембранных белков, как цитохромоксидаза, представляет собой сложную и трудоемкую задачу. Расположение цитохромоксидазы в мембране, взаимное положение субъединиц и простетических групп в молекуле интенсивно изучались в последние годы различными методами, включая модификацию аминокислотных остатков на поверхности субъединиц и использование бифункциональных сшивающих реагентов. Реконструкция возможного вида цитохромоксидазы в комплексе с цитохромом *c* приведена на рис. 1 [1].

Одним из новых подходов, используемых для выяснения структуры сложных биологических объектов, является тритиевая планиграфия — обработка поверхности исследуемого объекта активированными атомами трития [2]. Преимущества трития как модифицирующего агента состоят в низкой специфичности и в малых размерах атома трития, что исключает возмущающие воздействия на структуру исследуемого объекта. Поскольку замещение атомов водорода на тритий протекает только в поверхностном слое толщиной до 3 Å, по распределению радиоактивности можно судить о пространственном расположении участков объекта. Для белков, в частности для лизоцима, показано [3] хорошее соответствие данных по пространственной структуре, полученных с помощью тритиевой планиграфии, и результатов сделанного ранее рентгеноструктурного анализа. По-видимому, очень перспективна тритиевая планиграфия для исследования структуры биополимерных комплексов, например липопротеинов [4] и нуклеопротеидов [5].

В настоящей работе метод тритиевой планиграфии впервые применен нами для изучения пространственного расположения субъединиц цитохромоксидазы и определения участков взаимодействия фермента с цитохромом *c* (предварительное сообщение см. [6]). Для этого были приготовлены молекулярные кристаллы цитохромоксидазы и ее комплекса с цитохромом *c* (молярное соотношение 1:1), использование которых позволяет обеспечить высокий уровень включения трития и уменьшить экранирующее влияние детергентов. Образование кристаллов цитохромоксидазы происходит при медленном удалении хлата натрия из раствора

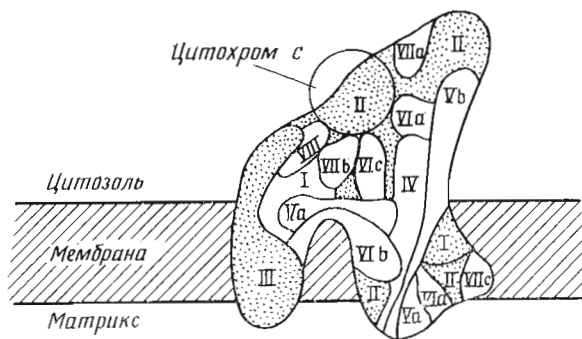


Рис. 1. Модель структурной и функциональной организации полипептидов в цитохромоксидазе из печени крысы [1]

фермента. Предварительно из препарата цитохромоксидазы, полученного с применением гидрофобной хроматографии [7], был удален тритон X-100, для чего использовался адсорбент XAD-2. После однократного пропускания раствора фермента через колонку со смолой XAD-2, уравновешенной 1%-ным холатом натрия, содержание тритона X-100 уменьшалось в 30–40 раз. Выход белка при этом составлял 80–85%. Полученный раствор цитохромоксидазы подвергали диализу, в результате чего образовывались молекулярные кристаллы фермента, которые и использовались в дальнейшей работе. Кристаллы комплекса цитохрома с с цитохромоксидазой получены аналогичным образом.

Действие термически активированного трития на препараты цитохромоксидазы и ее комплекса с цитохромом с проводили в описанной ранее установке [8] в стандартных условиях (давление трития 0,65 Па ($5 \cdot 10^{-2}$ Торр), температура вольфрамовой нити 2000 К, экспозиция 20 с), обеспечивающих свободный пролет атомов трития от нити до стенок реакционного сосуда. Водную суспензию кристаллических препаратов наносили на внутренние стенки сосуда и воду удаляли лиофилизацией, создавая тем самым тонкую пленку вещества. Нанесение препаратов на бумажную подложку (а не на стенки сосуда) — способ, позволяющий, как правило, получать меченые соединения с лучшим выходом и более высокой удельной радиоактивностью (см., например, [9]) — в данном случае оказалось менее удобным из-за трудностей, связанных с элюированием меченых препаратов цитохромоксидазы с бумаги.

Из полученных таким образом меченых препаратов лабильный тритий удаляли, многократно промывая кристаллы водой. Разделение субъединиц меченой цитохромоксидазы после инкубирования в присутствии додецилсульфата натрия проводили с помощью ВЭЖХ [10], контролируя радиоактивность в процессе разделения (рис. 2а, б). Для лучшего разделения малых субъединиц цитохромоксидазу или ее комплекс обрабатывали смесью вода — ацетонитрил — трифторэтанол в присутствии трифторуксусной кислоты и экстракт хроматографировали в тех же условиях (рис. 3а, б). Из рис. 2а, б видно, что в обоих препаратах присутствуют низкомолекулярные соединения, обладающие высокой удельной радиоактивностью, — вероятно, детергенты и липиды. Повышенная радиоактивность в области больших молекулярных масс, по-видимому, связана с агрегатами субъединиц фермента. Общая молярная радиоактивность препарата [^3H]цитохромоксидазы, рассчитанная по приведенной кривой (без учета радиоактивности продуктов низких молекулярных масс), составила 9 Ки/ммоль, что вполне достаточно для изучения топографии фермента. При этом все полипептиды цитохромоксидазы и ее комплекса с цитохромом с в кристаллах, имеющие, по-видимому, как цитоплазматическую, так и матриксную ориентацию [11], оказались мечеными тритием.

Сравнение хроматографических профилей цитохромоксидазы и ее комплекса с цитохромом с показывает, что между ними существуют различия в распределении радиоактивной метки, обусловленные окрашиванием

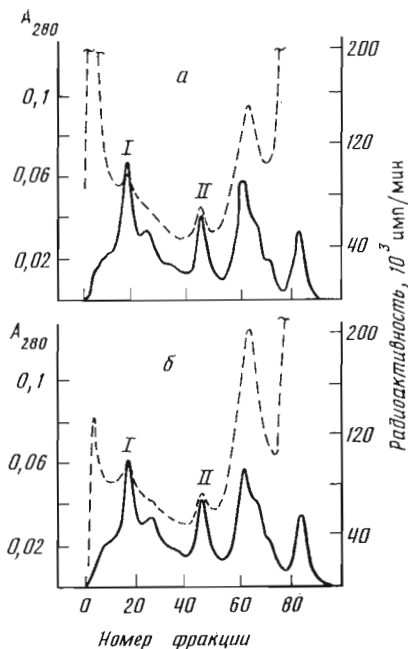


Рис. 2

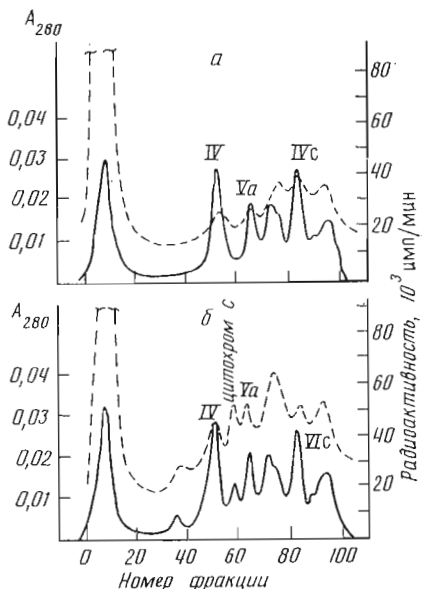


Рис. 3

Рис. 2. ВЭЖХ полипептидов меченной тритием цитохромоксидазы (а) и ее комплекса с цитохромом с (б). Римскими цифрами здесь и на рис. 3 обозначены субъединицы цитохромоксидазы. Радиоактивность показана штриховой линией. Колонка TSK-G3000 SW. Объем фракций 100 мкл. Условия хроматографии см. в тексте

Рис. 3. ВЭЖХ полипептидов меченной тритием цитохромоксидазы (экстракт) (а) и ее комплекса с цитохромом с (экстракт) (б). Колонка TSK-G2000 SW. Условия см. в тексте

молекулой цитохрома с ряда субъединиц цитохромоксидазы. Чтобы правильно оценить эти различия, следует иметь в виду, что общая радиоактивность меченых препаратов цитохромоксидазы и ее комплекса с цитохромом с, полученных в параллельных опытах (т. е. при одинаковых значениях давления трития, температуры вольфрамовой нити и экспозиции), может тем не менее оказаться неодинаковой. Это связано, во-первых, с неточным соответствием использовавшихся стандартных фасовок газообразного трития и их номинальной (паспортной) радиоактивности (100 мКи), а во-вторых, разной толщиной слоя препарата на стенках реакционного сосуда, которая плохо воспроизводится при нанесении вещества непосредственно на стекло. Учитывая вышесказанное, мы выбрали в качестве «внутреннего стандарта» полипептид IV цитохромоксидазы, который, по имеющимся литературным данным [1], расположен с матриксной стороны и не имеет выхода на цитоплазматическую сторону. Общая радиоактивность этого полипептида, таким образом, не должна зависеть от образования комплекса цитохромоксидазы с цитохромом с. Из данных, приведенных на рис. 3а, б следует, что величина «удельной» радиоактивности (отношение радиоактивности фракции к УФ-поглощению) субъединицы IV для комплекса цитохромоксидаза—цитохром с на 40% больше, чем для цитохромоксидазы, что свидетельствует о большем включении трития в препарат фермент-субстратного комплекса в конкретных условиях нашего эксперимента.

С учетом этой разницы в общем уровне радиоактивности было вычислено, что при образовании фермент-субстратного комплекса происходит уменьшение удельной радиоактивности полипептидов I и II на 40%, полипептида VIc на 30% и полипептидов VIIa — VIIc на 20%. При этом доступность для активированного трития полипептидов Va, Vb, VIa, VIb не зависит от присоединения цитохрома с. Следовательно, при образовании комплекса цитохромоксидазы с цитохромом с молекула цитохрома с частично экранирует субъединицы I, II, VIc и VIIa — VIIc цитохромокси-

дазы от воздействия активированных атомов трития. Эти результаты согласуются с работой [12], в которой показано, что в связывании с цитохромом с цитохромоксидазы из печени свиньи участвуют карбоксильные группы ее субъединиц II, VIc и VIIb.

Экспериментальная часть

В работе использовали твин-80, тритон X-100, холат натрия, додецилсульфат натрия, амберлит XAD-2 (Serva, ФРГ), реагент Фолина (ВДН, Англия), ацетонитрил (Merck, ФРГ).

Остальные реагенты отечественного производства марок х.ч. или ос.ч. Газооб-разный тритий — фасовка по 100 мКи («Изотон»).

ВЖХ проводили на приборе Клауег (ФРГ) с использованием колонки TSK-G2000 SW (0,75×60 см, LKB, Швеция) и TSK-G3000 SW (0,75×50 см, Alltech, США) при скорости потока подвижной фазы 0,2 мл/мин. Измерение радиоактивности проводили на приборе Beckman LS 7000 (Австрия).

Содержание тритона X-100 определяли по поглощению раствора цитохромоксидазы в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 1% холата натрия, при 277 нм, используя коэффициент молярного поглощения $1465 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Вклад белка в поглощение рассчитан по соотношению $A_{277}/A_{422}=2,4$ [13]. Спектрофотометр — Shimadzu 240 (Япония).

Высокоэффективная жидкостная хроматография. При использовании хроматографических систем с додецилсульфатом натрия образец цитохромоксидазы (10 мг/мл) инкубировали в 0,05 М трис-НСl (рН 7,2), содержащем 5% додецилсульфата натрия, не менее 12 ч при 20° С. На колонку наносили 20 мкл раствора и использовали элюирующий буфер: 0,5 М трис-НСl (рН 7,2), 0,5 М хлорид лития и 3% додецилсульфат натрия. Для экстракции малых субъединиц 5 мг фермента обрабатывали 0,5 мл смеси вода — ацетонитрил — трифторэтанол (11:8:1), содержащей 0,5% трифторуксусной кислоты. Через 3 ч осадок отделяли (12000 g, 15 мин) и экстракт подвергали разделению в буфере: 6 М мочевины, 30 мМ NaCl, 2% муравьиная кислота. На колонку наносили 20 мкл раствора. Детектирование осуществляли при 280 нм. Субъединицы во фракциях идентифицировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в условиях работы [7].

Удаление тритона X-100. Раствор цитохромоксидазы (50 мг белка) в 3 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,0) после добавления холата натрия до концентрации 1% пропускали через колонку с XAD-2 (5 мл), уравновешенную тем же буфером с 1% холатом натрия. Регенерацию колонки проводили промыванием 50% этанолом (20 мл).

Кристаллизация цитохромоксидазы и комплекса с цитохромом с. После удаления тритона X-100 раствор цитохромоксидазы (40 мг белка) в 4 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 1% холата натрия, диализовали без перемешивания против 400 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,0) при 4° С. Через 12 ч буфер заменяли на аналогичный с концентрацией 0,03 М и еще через 12 ч на буфер с концентрацией 0,01 М. Еще через 12 ч суспензию замораживали при -10° С. Полученный после оттаивания кристаллический препарат промывали сначала 0,01 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,0), а затем дистиллированной водой.

Кристаллы комплекса цитохромоксидаза—цитохром с получали аналогичным образом, добавляя к раствору фермента перед диализом 10 мг цитохрома с на 40 мг фермента. Для спектрофотометрического контроля полученные кристаллы растворяли в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,0), содержащем 1% твин-80, при обработке ультразвуком в течение 15—20 мин на диспергаторе УЗДН-1.

Введение тритиевой метки. Суспензию кристаллической цитохромоксидазы (20 мг) в 1,5 мл дистиллированной воды равномерно распределяли по стенкам реакционного сосуда, замораживали жидким азотом и лиофилизировали в установке для введения тритиевой метки [8]. Систему вакуумировали до 0,065 Па ($5 \cdot 10^{-3}$ Торр). Реакционный сосуд (охлажденный спаружки жидким азотом) заполняли 4 ГБк (100 мКи) $^3\text{H}_2$ до давления 0,65 Па ($5 \cdot 10^{-2}$ Торр) и, подавая напряжение на вольфрамовую нить,

нагревали ее до 2000 К в течение 20 с. После откачивания избыточного $^3\text{H}_2$ и образовавшегося H^3H снимали охлаждение. Обработку комплекса цитохромоксидаза—цитохром *c* проводили аналогичным образом.

Меченые препараты суспендировали в 6 мл дистиллированной воды и центрифугировали 5 мин при 6000 *g*. Супернатант удаляли и операцию повторяли 15–20 раз для отделения лабильного трития, после чего препараты лиофилизировали. При разделении и анализе меченых полипептидов собирали фракции по 100 мкл и к каждой фракции добавляли по 5 мл сцинтиллятора Unisolve-1 (Koch-Light, Англия). Радиоактивность измеряли через 3 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jarausch J., Kadenbach B. Eur. J. Biochem., 1985, v. 146, № 1, p. 219–225.
2. Нейман Л. А., Смоляков В. С., Шишков А. В. Радиоизотопные методы в физико-химической биологии. Использование реакций атомарного трития. М.: ВИНТИ (Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии, т. 2), 1985.
3. Волынская А. В., Шишков А. В., Скрипкин А. Ю., Джафаров Э. С., Румянцев Ю. М., Гольданский В. И. Молекулярн. биология, 1985, т. 19, № 5, с. 1294–1300.
4. Курятов А. Б., Шемякин В. В., Антропова Л. П. 16-я Конференция ФЕБО. Тез. докл. М., 1984, с. 335.
5. Нейман Л. А., Антропова Л. П., Залеская М. А., Будовский Э. И. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 8, с. 1070–1072.
6. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф., Ножевникова Е. В., Нейман Л. А. I Всесоюзное совещание по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами». Тез. докл. М., 1985, с. 41.
7. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 2, с. 192–195.
8. Шишков А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С. Успехи химии, 1984, т. 53, № 7, с. 1125–1151.
9. Нейман Л. А., Оноприенко В. В., Смоляков В. С., Сойфер В. С., Третякова С. Ю., Хохлов А. С. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 116–120.
10. Филатов И. А., Нефедова И. В., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1675–1676.
11. Fuller S. D., Capaldi R. A., Henderson R. J. J. Mol. Biol., 1979, v. 134, № 2, p. 305–327.
12. Kadenbach B., Stroh A. FEBS Lett., 1984, v. 173, № 2, p. 374–380.
13. Robinson N. C., Wiginton D., Talbert L. Biochemistry, 1984, v. 23, № 25, p. 6121–6126.

Поступила в редакцию
23.VI.1986
После доработки
17.IX.1986

STUDY OF THE CYTOCHROME *c* - CYTOCHROME OXIDASE INTERACTION BY THE TRITIUM PLANIGRAPHY METHOD

FILATOV I. A., KULISH M. A., MIRONOV A. F., NOZHEVNIKOVA E. V.*,
NEIMAN L. A.*

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology Moscow;
* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of
Sciences of the USSR, Moscow*

Treatment of molecular crystals of the bovine cytochrome oxidase and the cytochrome oxidase – cytochrome *c* complex with thermally activated tritium leads to highly labelled cytochrome oxidase preparations. HPLC separation of its subunits and measurements of radioactivity of each polypeptide allow to determine the shielding of cytochrome oxidase surface sites by cytochrome *c* in the complex.