



УДК 577.32.23:577.412.5

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА
ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА Р-450.
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОСТАТКА ЦИСТЕИНА, УЧАСТВУЮЩЕГО
В ОБРАЗОВАНИИ ПРОКСИМАЛЬНОГО ЛИГАНДА

Усанов С. А., Пикулева И. А., Ахреж А. А.,
Чащин В. Л.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Осуществлена селективная химическая модификация холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 сульфгидрильными реагентами. Показано, что химическими методами детектируется большее количество сульфгидрильных групп, чем следует из первичной структуры. Остатки цистеина в молекуле цитохрома Р-450 образуют два пула: доступный для сульфгидрильных реагентов и недоступный, определяемый только после инактивации гемопротейда. Модификация доступного остатка цистеина практически не сказывается на физико-химических и каталитических параметрах цитохрома Р-450. Осуществлена локализация в полипептидной цепи остатка цистеина, вовлекающегося в образование гем-тиолатной связи в молекуле цитохрома Р-450. Остаток Cys⁴²² координирован с атомом железа гема, а остаток Cys²⁶⁴ экзонирован и доступен модификации различными реагентами. Участок полипептидной цепи, содержащий Cys⁴²², гомологичен консервативным участкам других цитохромов Р-450. Обсуждается роль остатков цистеина в монооксигеназном катализе.

Холестерингидроксилирующая система митохондрий коры надпочечников локализована во внутренней мембране и состоит из белков трех типов: FAD-содержащего флавопротеида (адренородоксинредуктаза), ферредоксина Fe₂S₂-типа (адренородоксин) и гемопротейда (цитохром Р-450) [1—3]. По своим физико-химическим характеристикам данная система относится к типичным цитохром-Р-450-зависимым монооксигеназам.

Как и многие гемопротейды, цитохром Р-450 в качестве простетической группы содержит протопорфирин IX [4]. Этот факт заставляет, с одной стороны, искать те причины, которые отличают группу цитохромов Р-450 от всех других гемопротейдов, а с другой — найти то общее, что присуще всем цитохромам Р-450 независимо от типа.

Основная отличительная черта цитохромов Р-450, придающая им уникальные физико-химические свойства, определяется природой аксиальных лигандов и связана с наличием в пятом координационном положении, в отличие от всех других гемопротейдов, атома серы, принадлежащего остатку цистеина. Впервые на участие атома серы в качестве пятого аксиального лиганда молекулы цитохрома Р-450 было указано в работе [5]. В дальнейшем использование комплексов гемина с серосодержащими лигандами [6—13], а также комплексов гемоглобина и миоглобина с соединениями, содержащими атом серы [14, 15], позволило подтвердить высказанное предположение о том, что в качестве аксиального лиганда в пятом координационном положении молекулы цитохрома Р-450 выступает атом серы остатка цистеина. В последнее время получены данные, позволяющие не только подтвердить это предположение, но и оценить расстояние между атомом железа гема цитохрома Р-450 и атомом серы [16, 17], которое оказалось равным 2,6 Å.

Общность свойств всех типов цитохрома Р-450 независимо от их происхождения была интерпретирована с точки зрения наличия общей консервативной структуры вблизи активного центра, обеспечивающей ано-

Принятые сокращения: SDS — додецилсульфат натрия, FAD — флавинаденилдинуклеотид, тиопропилсефароза — 2-пиридилдисульфид-гидроксипропил-сефароза 6В.

мальные спектральные и каталитические свойства [18], которая включает остаток цистеина, выступающий в качестве проксимального лиганда. Важная функциональная значимость остатков цистеина в катализе с участием цитохрома P-450 привлекает пристальное внимание исследователей. Роль остатков цистеина в цитохроме P-450 исследовалась методом химической модификации различными сульфгидрильными реагентами [19—23], а также с помощью производных субстратов и ингибиторов [24]. Однако отсутствие данных о первичной структуре различных форм цитохрома P-450 и значительное содержание этой аминокислоты в исследованных формах гемопротейда не позволяло дать однозначный ответ о роли остатков цистеина в катализе и локализации проксимального лиганда в полипептидной цепи. Установление первичной структуры ряда цитохромов P-450 [25—29] показало наличие двух консервативных участков в молекуле белка [30, 31], один из которых может вовлекаться в образование гем-тиолатной связи.

Цель настоящей работы — исследование роли остатков цистеина в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 и локализация в полипептидной цепи гемопротейда остатка цистеина, взаимодействующего с атомом железа гема.

Обратимая модификация холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 сульфгидрильными реагентами

В молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450, как следует из данных по определению первичной структуры гемопротейда [27, 29], содержится только два остатка цистеина — Cys²⁶⁴ и Cys⁴²², находящиеся в центральной и С-концевой частях полипептидной цепи. Это в существенной степени отличает холестерингидроксилирующий цитохром P-450 митохондриальной коры надпочечников от других форм цитохрома P-450, которые содержат 4—10 остатков цистеина на молекулу гемопротейда (табл. 1). Единственным исключением из этого правила является цитохром P-450 из микроорганизмов *Rhizobium japonicum*, содержащий два остатка цистеина. Последний, однако, недостаточно хорошо структурно охарактеризован [37].

Тот факт, что холестерингидроксилирующий цитохром P-450 содержит только два остатка цистеина и в то же время обладает аномальными спектральными характеристиками, присущими группе цитохромов P-450, свидетельствует о том, что для осуществления монооксигеназного катализа необходимы как минимум два остатка цистеина, а остальные остатки этой аминокислоты, которые обнаруживаются у других представителей данной группы гемопротейдов, обеспечивают индивидуальные особенности, характерные для этих белков. С другой стороны, принципиальными становятся два вопроса: 1) какой остаток цистеина участвует в образовании связи с атомом железа гема и где он расположен в полипептидной цепи; 2) какова функциональная роль второго остатка цистеина?

Чтобы ответить на эти вопросы, в первой части работы мы использовали метод обратимой химической модификации такими сульфгидрильными реагентами, которые могут быть удалены из белка после модификации. Применять дипиридилдисульфиды и реагент Элмана для количественного определения SH-групп в гемопротейдах следует с определенной степенью осторожности в связи с тем, что максимум поглощения продуктов реакции модификации (тиопиридона и тионитробензоата) перекрывается с поглощением гемового хромофора. Поэтому для определения количества сульфгидрильных групп в холестерингидроксилирующем цитохроме P-450 мы использовали тандемные кюветы для нивелирования поглощения гемопротейда и реагента.

На рис. 1 представлена кинетика реакции модификации высокоспиновой субстратсвязанной формы холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 100-кратным мольным избытком 4,4'-дипиридилдисульфидом. Реакция проходит интенсивно в первые 5 мин и практически завершается за 30 мин. Количество выделенного 4-тиопиридона соответствует моди-

Содержание остатков цистеина в полипептидной цепи различных представителей группы цитохромов P-450

Форма цитохрома P-450	Количество аминокислотных остатков	Количество остатков цистеина *	Литература
P-450 _c (крыса)	524	8	32
P-450 _b (крыса)	513	7 (7)	33
P-450 ₁ (мышь)	521	9	34
P-450 ₃ (мышь)	500	8	34
P-450 JM ₂ (кролик)	491	4 (6)	26
P-450 JM ₄ (кролик)	513	7 (7)	35
P-450 З _b (кролик)	490	9	36
P-450 _{b, e} (крыса)	491	6 (6)	28
P-450 _{кам} (<i>Ps. pulida</i>)	414	8 (6)	25
P-450 (<i>Rh. japonicum</i>)		2	37

* В скобках указано количество остатков цистеина, определяемое химическими методами.

фикации 3 остатков цистеина, что существенно превышает содержание этой аминокислоты в молекуле фермента. Модификация цитохрома P-450 100-кратным избытком 4,4'-дипиридилдисульфида не сопровождается спектральными изменениями в области гемового хромофора, что свидетельствует об отсутствии изменений в гем-белковых взаимодействиях. Наблюдается лишь некоторое увеличение поглощения в ультрафиолетовой части спектра за счет поглощения продукта реакции модификации, приводящее к снижению спектрофотометрического индекса A_{393}/A_{280} с 0,8 до 0,67.

Схожая картина наблюдается при модификации холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 2,2'-дипиридилдисульфидом. В результате модификации высвобождается количество 2-тиопиридона, эквивалентное модификации 3 остатков цистеина, без изменения спектральных параметров белка в области гемового хромофора.

Модификация цитохрома P-450 100-кратным мольным избытком 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) приводит к освобождению тионитробензоата в количестве, эквивалентном модификации 1,5 остатков цистеина, без изменения спектральных параметров гемопротейда (рис. 2). Несовпадение данных химического определения остатков цистеина и первичной структуры может быть объяснено тем, что реагент Элмана является наиболее неудачным реагентом для количественного определения сульфгидрильных групп в гемопротейдах, так как максимум поглощения продукта реакции (412 нм) практически полностью совпадает с максимумом поглощения белка в области полосы Soret, которое характеризуется более высоким коэффициентом молярной экстинкции.

В связи с тем что уникальные спектральные параметры и каталитические свойства цитохрома P-450 объясняются наличием гем-тиолатной связи в 5-м координационном положении [15—17], полученные результаты свидетельствуют о том, что либо остаток цистеина, участвующий в координировании атома железа гема, не подвергается обратимой химической модификации, либо модификация незначительно изменяет свойства тиолатного лиганда, не влияя на спектральные характеристики цитохрома P-450. Последнее предположение, однако, мало вероятно, так как показано, что изменение длины связи железо—сера в молекуле цитохрома P-450 на 0,2 Å приводит к инактивации гемопротейда [38]. Наконец, можно также предположить, что остаток цистеина не является аксиальным лигандом в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450, но это противоречит всем современным представлениям о структуре активного центра цитохрома P-450.

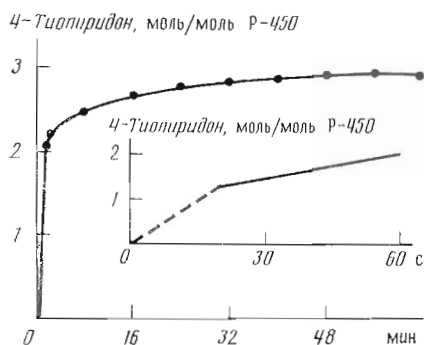


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика модификации высокоспиновой (субстратсвязанной) формы цитохрома P-450 100-кратным молярным избытком 4,4'-дипиридилдисульфида. Вставка: кинетика высвобождения 4-тиопиридона в начальный момент реакции. Условия реакции — см. «Экспер. часть»

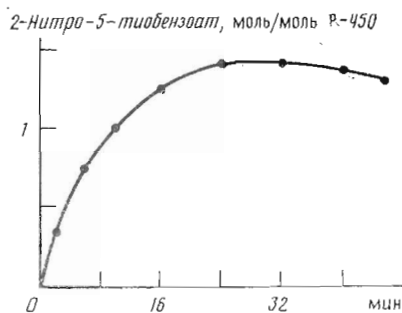


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика модификации высокоспиновой (субстратсвязанной) формы цитохрома P-450 100-кратным молярным избытком 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты). Условия реакции — см. «Экспер. часть»

Необратимая модификация холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 сульфгидрильными реагентами

В качестве сульфгидрильных реагентов для необратимой модификации SH-групп наибольшее применение нашли N-малеинимидные производные и галогидропроизводные кислот и амидов. Алкилирование цитохрома P-450 N-этилмалеинимидом (рис. 3), оцененное по изменению в разностных спектрах в области 305 нм, не сказывается на спектральных параметрах гемопротейда в области гемового хромофора, свидетельствуя о целостности гем-белковых контактов. При использовании 100- и 1000-кратных избытков реагента в течение 60 мин наблюдаются спектральные изменения, эквивалентные модификации 3 и 4 остатков цистеина соответственно. Завышенные количества остатков цистеина, определяемое с помощью N-этилмалеинимидом, может быть частично объяснено побочной реакцией реагента с аминогруппами остатков лизина молекулы цитохрома P-450 [39].

Модификация холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 100-кратным молярным избытком иодацетамида также не приводит к изменению спектральных характеристик белка. Данные аминокислотного анализа свидетельствуют, что при этом карбоксиметилированию подвергается одна SH-группа.

Неизменность спектральных свойств модифицированного различными сульфгидрильными реагентами цитохрома P-450, согласно общепринятой точке зрения, указывает на недоступность для модификации остатка цистеина, участвующего в координировании атома железа гема. Полученные данные свидетельствуют также о различной реакционной способности и функциональной значимости 2 остатков цистеина молекулы холестерингидроксилирующего цитохрома P-450.

Модификация холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 твердофазным сульфгидрильным реагентом

Для того чтобы оценить справедливость предположения о существовании двух пулов остатков цистеина в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450, доступного и недоступного для модификации, мы применили модификацию твердофазным реагентом — тиопропил-сефарозой 6В. Последняя реагирует только с экспонированными сульфгидрильными группами и неспособна взаимодействовать с экранированными остатками цистеина. Этот реагент по своей природе аналогичен дипиридилдисульфидам.

N-Этилмаленимид, моль/моль P-450

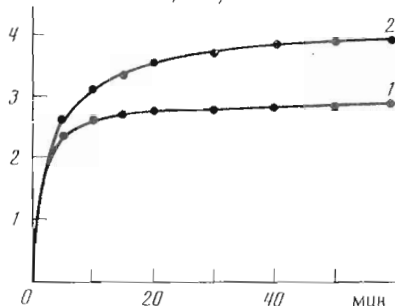


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика модификации высокоспinoвой (субстратсвязанной) формы цитохрома P-450 100- (1) и 1000-кратным (2) избытком N-этилмаленимида. Условия реакции — см. «Экспер. часть»

4-Тиопиридон, моль/моль P-450

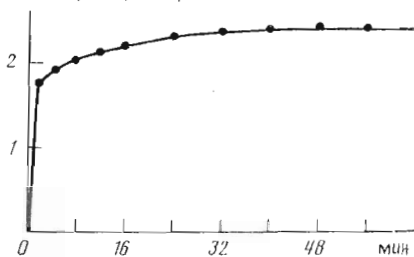


Рис. 5

Рис. 4. Спектры поглощения цитохрома P-450, иммобилизованного на тиопропил-сефарозе (а), и карбоксильного комплекса восстановленного гемопротейда, иммобилизованного на тиопропил-сефарозе (б). Условия — см. «Экспер. часть»

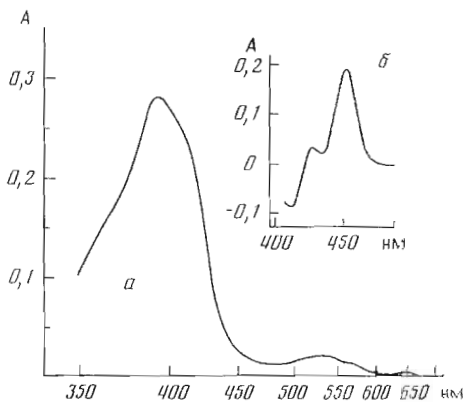


Рис. 4

Рис. 5. Кинетика модификации низкоспinoвой (бессубстратной) формы цитохрома P-450 100-кратным мольным избытком 4,4'-дипиридилдисульфида. Условия реакции — см. «Экспер. часть»

В результате взаимодействия субстратсвязанной формы холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 с тиопропил-сефарозой происходит иммобилизация гемопротейда, что находится в соответствии с ранее полученными данными [40]. Иммобилизация сопровождается выделением 1 моль тиопиридона/моль иммобилизованного цитохрома P-450. Полученные результаты позволяют сделать ряд выводов: 1) как минимум один остаток цистеина гемопротейда вовлекается во взаимодействие с тиопропил-сефарозой, 2) в случае модификации фермента дипиридилдисульфидами как минимум одна из трех определяемых сульфгидрильных групп принадлежит поверхностному остатку цистеина.

Модификация цитохрома P-450 тиопропил-сефарозой, сопровождаемая иммобилизацией цитохрома P-450, практически не сказывается на спектральных параметрах гемопротейда (рис. 4). Следует отметить, что в разностном спектре появляется поглощение в области 420 нм, свидетельствующее об образовании неактивной формы гемопротейда — цитохрома P-420. Количество последнего, однако, не превышает 30%.

Условия проведения реакции модификации цитохрома P-450 твердофазным реагентом в существенной степени влияют на результаты модификации. Так, модификация гемопротейда в присутствии 1 M NaCl и 0.3% холата Na приводит к тому, что модифицированный белок оказывается практически полностью инактивированным, что позволяет в определенных условиях, используя тиопропил-сефарозу, выделить два цистеинсодержащих пептида [41].

Таким образом, эксперименты с использованием твердофазного реагента подтвердили вывод о том, что в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 2 остатка цистеина неравноценны: один из них расположен на поверхности молекулы, доступен для модификации различными сульфгидрильными реагентами, которая не сопровождается потерей гемопротейдом спектральных параметров, присущих нативному

Химическая модификация цитохрома Р-450 сульфгидрильными реагентами *

Модификатор	Количество SH-групп, определяемых в денатурирующих условиях **	Количество SH-групп, определяемых в нативных условиях	Влияние модификации в нативных условиях на активность и лативность цитохрома Р-450, % по отношению к контролю
5,5'-Дитиобис(2-нитробензойная кислота)	4,0	1,5	100
4,4'-Дипиридилдисульфид	4,0	3,0	100
2,2'-Дипиридилдисульфид	4,0	3,0	100
N-Этилмаленимид	5,0	4,0	100

* Модификацию проводили 1 ч, используя 100-кратные мольные избытки сульфгидрильных реагентов.

** Результаты аминокислотного анализа (определение цистеина в виде цистеиновой кислоты) 3,5 моль/моль, исходя из первичной структуры — 2 моль/моль.

белку; второй остаток цистеина недоступен для большинства сульфгидрильных реагентов, и его модификация возможна только после инактивации гемопротейда, сопровождающейся потерей спектральных характеристик, обусловленных целостностью связи железо—сера.

Влияние модификации на функциональные свойства холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450

Прежде чем перейти к исследованию функциональных свойств модифицированного цитохрома Р-450, нами было проведено сопоставление количественного определения остатков цистеина в нативных и денатурирующих условиях. Как следует из табл. 2, независимо от типа сульфгидрильного реагента, количество определяемых групп всегда выше на 1 при выполнении экспериментов в денатурирующих условиях. Это означает, что дополнительная реакционноспособная группа появляется только после инактивации цитохрома Р-450, что в свою очередь свидетельствует об участии данного остатка цистеина в координировании атома железа гема, подтверждая ранее полученные результаты о недоступности проксимального остатка цистеина сульфгидрильным реагентам.

В связи с тем что большинство экспериментов было выполнено с использованием субстратсвязанной формы цитохрома Р-450, необходимо было выяснить, какую роль играет холестерин в процессе модификации. Как и в случае субстратсвязанной формы цитохрома Р-450, модификация низкоспиновой (бессубстратной) формы гемопротейда сопровождается выделением в первые минуты реакции 2 экв. 4-тиопиридона, а затем медленным освобождением третьего (рис. 5). В денатурирующих условиях общее количество выделенного 4-тиопиридона соответствует модификации 4 остатков цистеина. Полученные данные позволяют заключить, что холестерин не оказывает существенного влияния на процесс модификации, а сульфгидрильные группы не участвуют в процессе стабилизации субстрата в активном центре цитохрома Р-450, как это было предположено в случае цитохрома Р-450, гидроксилирующего камфору [24].

Чтобы определить, участвует ли локализованный на поверхности остаток цистеина и окружающий его участок полипептидной цепи цитохрома Р-450 в комплексообразовании с аденодоксипом, нами было исследовано взаимодействие иммобилизованного на тиопропил-сефарозе гемопротейда с ферредоксином. Установлено, что обратимая иммобилизация цитохрома Р-450 не лишает его способности образовывать комплекс с аденодоксипом; следовательно, поверхностный остаток цистеина и участок полипептидной цепи вблизи этого остатка не вовлекаются во взаимодействие с аденодоксипом.

Модификация поверхностной сульфгидрильной группы не изменяет каталитическую активность цитохрома Р-450 в реконструированной си-

стеме по отношению к реакции трансформации холестерина в прегненолон (табл. 2).

Таким образом, приведенные в этом разделе результаты подтверждают принципиальную значимость одного остатка цистеина в молекуле цитохрома P-450 для поддержания нативной структуры белка и проявления его функциональных свойств, в то время как второй остаток цистеина фермента может быть модифицирован различными реагентами без оказания существенного эффекта на гемопроteid.

Локализация в полипептидной цепи холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 поверхностного остатка цистеина

Для того чтобы установить, какой из двух остатков цистеина холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 доступен в неденатурирующих условиях модификации сульфгидрильными реагентами, нативный гемопроteid модифицировали иод[1-¹⁴C]ацетамидом. Карбоксиметилирование радиоактивным иодацетамидом не приводит к изменению спектральных характеристик белка. После удаления гема цитохром P-450 подвергали повторному карбоксиметилированию, но уже «холодным» иодацетамидом. В результате последующего гидролиза белка химотрипсином и разделения растворимой при кислых значениях pH части химотриптического гидролизата высокоэффективной жидкостной хроматографией (рис. 6) были получены две фракции, содержащие радиоактивную метку. Разделение пептидов этих фракций, осуществленное хроматографией в тонком слое целлюлозы, позволило выделить из фракции 2 в гомогенном состоянии и охарактеризовать пептид Cys(Cm)-Leu-Leu, содержащий Cys²⁶⁴. Так как удельная радиоактивность этого пептида составила 90% от удельной радиоактивности цитохрома P-450 после первого карбоксиметилирования, выделение второго цистеинсодержащего пептида было, на наш взгляд, нецелесообразным.

Полученные данные позволили сделать вывод, что в неденатурирующих условиях модификации подвергается остаток Cys²⁶⁴ и что именно этот остаток не должен вовлекаться в образование гем-тиолатной связи.

Локализация в полипептидной цепи холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 остатка цистеина, участвующего в образовании гем-тиолатной связи

Общая стратегия эксперимента по локализации в полипептидной цепи цитохрома P-450 остатка цистеина, участвующего в образовании проксимального лиганда, определена на основании данных по химической модификации гемопротеида. Первоначально для блокирования поверхностной сульфгидрильной группы цитохром P-450 обрабатывался 1000-кратным мольным избытком N-этилмалеинида. По своим спектральным и функциональным характеристикам модифицированный гемопроteid не отличается от исходного. Для расщепления цитохрома P-450 на фрагменты гемопроteid обрабатывался трипсином. На отсутствие серьезных конформационных перестроек в молекуле белка в результате модификации указывает тот факт, что картина ограниченного трипсинолиза модифицированного N-этилмалеинимидом цитохрома P-450 не отличается от таковой для исходного белка.

Удаление трипсина, ингибитора трипсина и низкомолекулярных продуктов трипсинолиза осуществляли хроматографией смеси фрагментов на аденодоксин-сефарозе. Модифицированный гемопроteid взаимодействует с аденодоксином, иммобилизованным на сефарозе, подтверждая ранее полученные данные о том, что поверхностная сульфгидрильная группа холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 не участвует в процессе комплексообразования с аденодоксином. После удаления гема (в присутствии додецилсульфата Na) фрагмент F₂, содержащий оба остатка цистеина, взаимодействует с тиопропил-сефарозой, а фрагмент F₁ остается в супернатанте. В качестве протеолитического фермента для

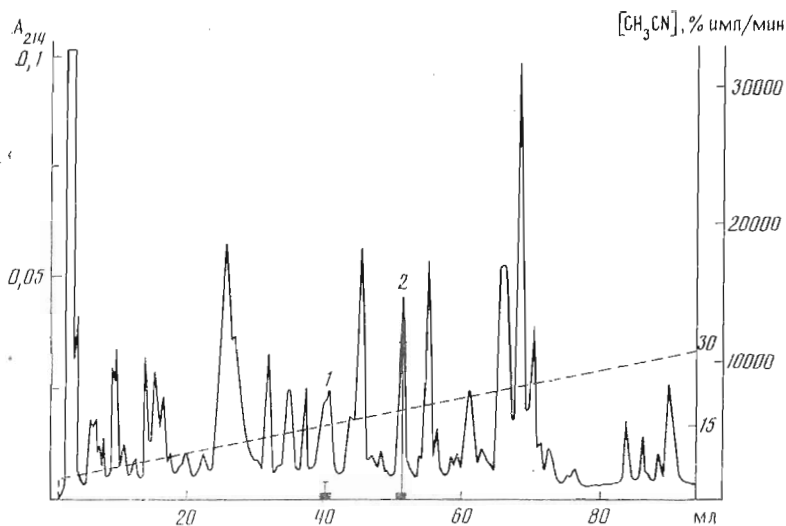


Рис. 6. Разделение растворимой при кислых значениях pH части химотриптического гидролизата с помощью высокоэффективной хроматографии на носителе Ultrasphere-ODS. 1 и 2 — фракции, содержащие радиоактивную метку. Условия — см. «Экспер. часть»

дальнейшей деградации фрагмента F₂ был избран химотрипсин, который позволяет получать небольшие растворимые пептиды. После удаления продуктов химотриптического гидролиза, не связанных ковалентно с сорбентом, десорбцию ковалентно иммобилизованного пептидного материала осуществили 0,1 М меркаптоэтанолом. N-концевой анализ предварительно карбоксиметилированного элюированного материала показал, что он представлен одним пептидом, для которого установлена следующая аминокислотная последовательность: Cys(Cm)-Val-Gly-Arg-Arg-Ile-Ala-Glu-Leu. Это позволило локализовать его в молекуле цитохрома P-450 и показать, что он содержит остаток Cys⁴²². Таким образом, с учетом данных по химической модификации холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 можно заключить, что если остаток цистеина действительно участвует в формировании проксимального лиганда атома железа гема, то этим остатком является Cys⁴²².

Общность свойств различных цитохромов P-450 объясняется наличием общей консервативной аминокислотной последовательности в области активного центра [18]. Сопоставление C-концевых цистеинсодержащих участков полипептидной цепи различных форм цитохрома P-450 (рис. 7) позволяет обнаружить гомологию, хотя и не абсолютную, в области проксимального лиганда.

Таким образом, используя химическую модификацию наряду со структурным подходом, удалось однозначно определить местоположение в полипептидной цепи цитохрома P-450 остатка цистеина, участвующего в формировании активного центра с проксимальной стороны. Полученные данные подтверждаются результатами рентгеноструктурных исследований цитохрома P-450, гидроксилирующего камфору [42], из которых следует, что лигандом в положении 5 является остаток Cys³⁵⁷.

Интерес к сульфгидрильным группам в цитохроме P-450 обусловлен той важной функцией, которую выполняют эти остатки: фиксация молекулы субстрата в активном центре [24]; формирование олигомерных структур [21]; участие в лигандировании атома железа гема [42]. В результате установления первичной структуры холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 [27] и настоящей работы ясно, что для осуществления монооксигеназного катализа достаточно лишь 2 остатков цистеина в молекуле белка; роль одного из них заключается в лигандировании атома железа гема, роль другого еще не установлена. Факт завышения количества остатков цистеина в холестерингидроксилирующем цитохро-

P-450 [*] _{XI}	Phe-Gly-Trp-Gly-Val-Arg-Gln-Cys ⁴²²	Val-Gly-Arg-Arg-Ile-Ala-Glu-Leu-Glu-Met-Thr-Leu-Phe	[27]
P-450 _{b,e}	Phe-Ser-Thr-Gly-Lys-Arg-Ile-Cys ⁴³⁶	Leu-Gly-Glu-Gly-Ile-Ala-Arg-Asn-Glu-Leu-Phe-Leu-Phe	[28]
P-450 _{3b}	Phe-Ser-Thr-Gly-Lys-Arg-Ala-Cys ⁴³⁶	Val-Gly-Glu-Gly-Ala-Arg-Met-Glu-Leu-Phe-Leu-Leu	[36]
P-450 _{IM₂}	Phe-Ser-Leu-Gly-Lys-Arg-Ile-Cys ⁴³⁶	Leu-Gly-Glu-Gly-Ile-Ala-Arg-Thr-Glu-Leu-Phe-Leu-Phe	[26]
P-450 _c	Phe-Gly-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Cys ⁴⁶¹	Ile-Gly-Glu-Thr-Ile-Gly-Arg-Leu-Glu-Val-Phe-Leu-Phe	[32]
P-450 _d	Phe-Gly-Leu-Gly-Lys-Arg-Arg-Cys ⁴⁵⁶	Ile-Gly-Glu-Ile-Pro-Ala-Lys-Trp-Glu-Val-Phe-Leu-Phe	[33]
P-450 _{IM₄}	Phe-Gly-Leu-Gly-Lys-Arg-Arg-Cys ⁴⁵⁶	Ile-Gly-Glu-Thr-Leu-Ala-Arg-Trp-Glu-Val-Phe-Leu-Phe	[35]
P-450 ₁	Phe-Gly-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Cys ⁴⁵⁸	Ile-Gly-Glu-Thr-Ile-Gly-Arg-Ser-Glu-Val-Phe-Leu-Phe	[34]
P-450 _{кам}	Phe-Gly-His-Gly-Ser-His-Leu-Cys ³⁵⁷	Leu-Gly-Gln-Ser-Leu-Ala-Arg-Glu-Ile-Val-Thr	[25]

Рис. 7. Сопоставление аминокислотных последовательностей различных форм цитохрома P-450 вблизи остатка цистеина, вовлекающегося в координирование атома железа гема молекулы цитохрома P-450. Гомологичные аминокислотные последовательности заключены в рамку. P-450^{*} — холестерингидроксилирующий цитохром P-450

ме P-450 при определении их содержания химическими методами, известный и для других форм цитохрома P-450, в настоящее время труднообъясним. Так, модификация микросомального цитохрома P-450 ЛМ₂ 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) позволила установить наличие 6 остатков цистеина [43], что значительно выше содержания этой аминокислоты, определенного из первичной структуры [26]. В то же время количество остатков цистеина в цитохроме P-450 ЛМ₄, установленное химическим методом [43] и из первичной структуры [35], совпадает. Наоборот, количество остатков цистеина в цитохроме P-450, гидроксилирующем камфору, определенное с помощью N-этилмалеинимида [21] и *n*-хлормеркурибензоата [19], равно 6, что существенно ниже количества остатков цистеина (8), определенных из первичной структуры [25].

Принципиальным является вопрос о реакционной способности остатка цистеина, участвующего в лигандировании атома железа гема. Так, в настоящей работе нами показано, что проксимальный лиганд недоступен для сульфгидрильных реагентов. Однако остаток Cys³⁵⁷ в цитохроме P-450, гидроксилирующем камфору, наиболее реакционноспособен по отношению к 2-бромацетиамидо-4-нитрофенолу [22] и иодуксусной кислоте [23]. Следует отметить, что в этих работах не приводятся данные о влиянии модификации на процесс инактивации гемопротейда.

Реакционная способность остатка цистеина, лигандирующего гем, определяется его *pK*, доступностью реагентам и микроокружением, а также прочностью связи железо—сера. Как следует из данных рентгеноструктурного анализа [42], гемовая группа спрятана внутри молекулы цитохрома P-450. Связь между атомами серы и железа в молекуле цитохрома P-450, определенная физико-химическими методами, является самой прочной из всех известных для гемопротейдов [44]. Факторы, вызывающие снижение *pK* (близость аминогруппы), увеличивают скорость реакции алкилирования сульфгидрильной группы, и, наоборот, факторы, вызывающие повышение *pK* (близость карбоксильной группы или удаление аминогруппы), снижают скорость реакции. Таким образом, реакционная способность проксимального остатка цистеина находится под контролем индивидуальных особенностей, присущих различным цитохромам P-450.

Локализация остатка цистеина, лигандирующего атом железа гема, позволяет сделать некоторые выводы относительно топологии полипептидной цепи в фосфолипидной мембране. Так как гем расположен в фосфолипидной мембране [45], а длина связи железо—сера составляет 2,6 Å [17], можно предположить, что остаток Cys⁴²² также находится в мембране. Это предположение согласуется с результатами теоретического предсказания элементов вторичной структуры холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 [46], согласно которому остаток Cys⁴²² находится в спиральном участке полипептидной цепи. Остаток Cys²⁶⁴, наоборот, находится на поверхности фосфолипидной мембраны и доступен для модификации.

Сделанные в настоящей работе выводы нашли подтверждение в недавно опубликованной статье, в которой на основании данных о недоступности остатка Cys⁴³⁶ химической модификации 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) сделан вывод о том, что этот остаток цистеина в молекуле цитохрома P-450 ЛМ₂ вовлечен в координирование атома железа гема [47].

Экспериментальная часть

В работе использовали холат натрия, β-меркаптоэтанол, 2,2'-дипиридилдисульфид, 4,4'-дипиридилдисульфид, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту), N-этилмалеинимид, α-химотрипсин из поджелудочной железы быка, трипсин из поджелудочной железы быка, Dns-хлорид, Dns-аминокислоты, холестерин, прегненолон (Serva, ФРГ), сефадекс G-25 (тонкий), сефарозу 4В, активированную бромцианом, тиропропил-сефарозу 6В (Pharmacia, Швеция), биогель P-2 (—200—400 меш; Bio-Rad, США).

Цитохром P-450 из митохондрий коры надпочечников быка выделяли как описано ранее [48].

Модификация сульфгидрильными реагентами. Модификацию цитохрома P-450 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой), дипиридилди-сульфидами и иодацетамидом проводили при 25° С в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, а N-этилмаленимидом — в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0; концентрация гемопротейда составляла 10 мкМ. Для стабилизации окраски при использовании 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) в инкубационную среду добавляли EDTA до конечной концентрации 1 мМ. Степень модификации определяли из разностных спектров взаимодействия реагента с цитохромом P-450 с помощью тандемных кювет: концентрированный раствор модификатора добавляли в кювету, содержащую раствор гемопротейда, и в кювету сравнения, содержащую фосфатный буфер. Одновременно в контрольную кювету с цитохромом P-450 добавляли одинаковый объем буферного раствора. Были использованы следующие значения коэффициентов молярной экстинкции (в $M^{-1} \cdot cm^{-1}$): для 2-нитро-5-тиобензоата — 13 600 при 412 нм [49], для 4-тиопиридона — 19 800 при 324 нм, для 2-тиопиридона — 7060 при 343 нм [50], для N-этилмаленимида — 620 при 305 нм [51]. В случае использования иодацетамида степень модификации определяли аминокислотным анализом. По окончании реакции избыток модификатора и побочные продукты реакции удаляли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 (тонкий).

Модификация тиопропил-сефарозой 6В. К 1 мл уплотненного геля тиопропил-сефарозы 6В, уравновешенного 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, добавляли 2 мл 15 мкМ раствора цитохрома P-450 в том же буфере. Реакцию проводили при 4° С при периодическом перемешивании. За ходом процесса следили спектрофотометрически по уменьшению в супернатанте пика поглощения гемопротейда при 393 нм вплоть до его полного исчезновения, после чего всю надосадочную жидкость отбирали, а тиопропил-сефарозу дважды промывали 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, объемами по 6 мл. В объединенном супернатанте спектрофотометрически определяли количество выделившихся эквивалентов 2-тиопиридона (на 1 моль цитохрома P-450).

Локализация в полипептидной цепи цитохрома P-450 поверхностного остатка цистеина. 967 нмоль цитохрома P-450 в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, обрабатывали 15 мин 100-кратным мольным избытком иодацетамида, содержащего 50 мкКи иод[1-¹⁴C]ацетамида (53 мкКи/ммоль). Реакцию останавливали добавлением двукратного по отношению к модификатору избытка дитиотрепта. Затем белок обессоливали на колонке (2,5 × 30 см) с сефадексом G-25 (тонкий), диализовали против H₂O и лиофилизировали. Повторное карбоксиметилирование цитохрома P-450 проводили в 0,1 М трис-HCl-буфере, рН 8,3, содержащем 6 М хлоридат гуанидина, используя 1,2-кратный избыток иодацетамида. После диализа белка против H₂O его лиофилизировали, затем суспендировали в 3 мл H₂O и подвергали термоденатурации (90° С, 10 мин). Гидролиз цитохрома P-450 химотрипсином проводили в 0,2 М NH₄HCO₃, рН 8,3, в атмосфере аргона при 37° С в течение 24 ч, используя фермент-субстратное весовое соотношение, равное 1 : 50. По окончании гидролиза белок лиофилизировали и растворимую в 10% уксусной кислоте (рН 2,5) часть гидролизата подвергли высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Altex 340 (США) с проточным детектором Altex 160 (США) на колонке (0,46 × 25 см) с носителем Ultrasphere-ODS (5 мкм) в градиенте концентраций ацетонитрила (0—30%) в 0,1% трифторуксусной кислоте, рН 2,2. Скорость элюирования составляла 0,8 мл/мин. Пептиды детектировались при длине волны 214 нм. Фракции, в которых была обнаружена радиоактивность, подвергали хроматографии на пластинке (20 × 20 см) с тонким слоем целлюлозы MN-300 в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — H₂O, 10 : 15 : 3 : 12. Пептиды обнаруживали после обработки пластинки 0,025% раствором флуорескамина в ацетоне, содержащем 2,5% пиридина, а затем элюировали 50% уксусной кислотой.

Локализация в полипептидной цепи цитохрома P-450 остатка цистеина, выполняющего функции пятого аксиального лиганда. 750 нмоль цитохрома P-450 в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0, обрабатывали 1 ч 1000

кратным мольным избытком N-этилмалеинимида и после обессоливания на сефадексе G-25 (тонкий) подвергали трипсинолизу, который проводили согласно работе [52] в течение 50 мин. Реакцию останавливали добавлением двукратного по отношению к трипсину избытка соевого ингибитора трипсина. От трипсина, ингибитора трипсина и низкомолекулярных продуктов трипсинолиза избавлялись хроматографией на аденодоксин-сефарозе. Десорбцию фрагментов F₁ и F₂ с аденодоксин-сефарозы осуществляли 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 1 М NaCl и 0,3% холат Na, и в 13,7 мл этого же буфера смесь фрагментов инкубировали с 5 мл тиопропил-сефарозы. Для удаления гема и разворачивания полипептидной цепи фрагментов в инкубационную среду был добавлен додецилсульфат Na в конечной концентрации 2%. Имобилизацию проводили при 25° С в течение 16 ч при постоянном перемешивании в атмосфере аргона, после чего сорбент промывали следующими растворами: 100 мл 10% додецилсульфата Na, 100 мл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,3), 1 л H₂O, 50 мл 6 М хлоргидрата гуанидина и 1 л H₂O. После тепловой денатурации иммобилизованного материала (90° С, 10 мин) его гидролиз химотрипсином (1 мкг фермента на 50 мкг белка из расчета полной иммобилизации фрагмента F₂) осуществляли в 0,1 М NH₄HCO₃, рН 8,3, при 37° С в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Затем сорбент промывали следующими растворами: 100 мл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,3), 100 мл 10% додецилсульфата Na, 1 л H₂O, 50 мл 0,1 М трис-HCl-буфера, рН 8,3, содержащего 6 М хлоргидрат гуанидина. Десорбцию ковалентно иммобилизованного пептидного материала проводили последним буфером, содержащим 0,1 М меркаптоэтанол. В этом же буфере осуществляли и его карбоксиметилирование. Обессоливание карбоксиметилированного пептидного материала проводилось на колонке (1 × 50 см) с биогеом P-2 (200—400 меш), уравновешенным 50% уксусной кислотой.

Определение N-концевых аминокислот проводили согласно [53]. Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали как описано в работе [54].

Аминокислотный анализ проводили согласно [55] с помощью аминокислотного анализатора ЛКВ-3201 (Швеция).

Все оптические измерения были выполнены на спектрофотометре Spersord M-40 (Karl Zeiss, ГДР).

Электрофорез в присутствии додецилсульфата Na проводили в 12% ПААГ согласно [56].

Авторы выражают благодарность Т. Б. Адамович и Н. М. Кирилловой за структурный анализ цистеинсодержащих пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mitani F.* // *Mol. Cell. Biochem.* 1979. V. 24. P. 21—34.
2. *Kimura T.* // *Mol. Cell. Biochem.* 1981. V. 36. P. 105—122.
3. *Lambeth J. D., Seybert D. H., Lancaster J. R., Salerno J. C., Kamin H.* // *Mol. Cell. Biochem.* 1982. V. 75. P. 13—33.
4. *Omura T., Sato R.* // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 239. № 7. P. 2370—2379.
5. *Mason H. S., North J. C., Vanneste M.* // *Fed. Proc.* 1965. V. 24. № 5. P. 1172—1180.
6. *Tang S. C., Koch S., Papaefthymiou G. C., Foner S., Frankel R. B., Ibers J. A., Holm R. H.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1976. V. 98. № 9. P. 2414—2434.
7. *Holm R. H., Tang S. C., Koch S., Papaefthymiou G. C., Foner S., Frankel R. B., Ibers J. A.* // *Adv. Exp. Biol. Med.* 1976. V. 74. P. 321—334.
8. *Dawson J. H., Holm R. H., Trudell J. R., Barth G., Linder R. E., Bunnenberg E., Djerassie C., Tang S. C.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1976. V. 98. № 12. P. 3704—3709.
9. *Collman J. P., Sorrell T. N., Dawson J. H., Trudell J. R., Bunnenberg E., Djerassie C.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1976. V. 73. № 1. P. 6—10.
10. *Chang C. V., Dolphin D.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1976. V. 73. № 10. P. 3338—3342.
11. *Mincey T., Traylor T. G.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1979. V. 101. № 3. P. 765—766.
12. *Berzins A. P., Traylor T. G.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1979. V. 87. № 1. P. 229—235.
13. *Traylor T. G., Mincey T.* // *Acta biol. et med. Germ.* 1979. V. 38. № 2—3. P. 351—355.

14. *Jefcoate C. R. E., Gaylor Y. L.* // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 8. P. 3464—3472.
15. *Sono M., Andersson L. A., Dawson J. H.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 14. P. 8308—8320.
16. *Cramer S. P., Dawson J. H., Hodgson K. O., Hager L. P.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1978. V. 100. № 23. P. 7282—7290.
17. *Dawson J. H., Andersson L. A., Hodgson K. O., Hahn J. F.* // *Dev. Biochem.* 1980. V. 13. P. 565—572.
18. *Dus K. M.* // *Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450* / Ed. Gustafsson J.-A. Amsterdam: North Holland Biomed. Press, 1980. P. 129—132.
19. *Yu C. A., Gunsalus I. C.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 1. P. 102—106.
20. *Kawalek J. C., Levin W., Ryan D., Lu A. H. Y.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1977. V. 183. № 2. P. 732—741.
21. *Lipscomb J. D., Harrison J. E., Dus K. M., Gunsalus I. C.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978. V. 83. № 3. P. 774—778.
22. *Haniu M., Yasunobu K. T., Gunsalus I. C.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 107. № 3. P. 1075—1081.
23. *Haniu M., Yasunobu K. T., Gunsalus I. C.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 116. № 1. P. 30—38.
24. *Murray R. I., Gunsalus I. C., Dus K. M.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 21. P. 12517—12525.
25. *Haniu M., Armes L. G., Tanaka M., Yasunobu K. T., Shasty B. S., Wagner G. C., Gunsalus I. C.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 105. № 3. P. 889—894.
26. *Tarr G. E., Black S. D., Fujita V. S., Coon M. J.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. № 21. P. 6552—6556.
27. *Чащун В. Л., Ланко В. Н., Адамович Т. Б., Ланко А. Г., Куприна Н. С., Кириллова Н. М., Берикбаева Т. М., Ахрем А. А., Золотарев А. С.* // *Биоорган. химия*. 1985. Т. 11. № 8. С. 1048—1067.
28. *Fujii-Kuriayama Y., Mizukami Y., Kawajiri K., Sogawa K., Muramatsu M.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 9. P. 2793—2797.
29. *Morohashi K., Fujii-Kuriayama Y., Okada Y., Sogawa K., Hirose T., Inayama S., Omura T.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 15. P. 4647—4651.
30. *Goton O., Tagashira Y., Iizuka T., Fujii-Kuriayama Y.* // *J. Biochem.* 1983. V. 93. № 3. P. 807—817.
31. *Black S. D., Tarr G. E., Coon M. J.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 24. P. 1416—1419.
32. *Sogawa K., Goton O., Kawajiri K., Fujii-Kuriayama Y.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 16. P. 5066—5070.
33. *Kawajiri K., Goton O., Sogawa K., Tagashira Y., Maramatsu M., Fujii-Kuriayama Y.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. № 6. P. 1649—1653.
34. *Kimura S., Gonzalez F. J., Nebert D. W.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 17. P. 10705—10713.
35. *Fujita V. S., Black S. D., Tarr G. E., Koop D. R., Coon M. J.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 14. P. 4260—4264.
36. *Ozols J., Heineman F. S., Johnson E. F.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 9. P. 5427—5434.
37. *Dus K. M., Goewert R., Weaver C. C., Carrey D., Appleby C. A.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 69. № 2. P. 437—445.
38. *Jung C., Friederich J., Ristau O.* // *Acta biol. et med. Germ.* 1979. V. 38. № 2—3. P. 363—377.
39. *Smyth D. G., Blumenfeld O. O., Konigsberg W.* // *Biochem. J.* 1964. V. 91. № 3. P. 589.
40. *Чащун В. Л., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Ахрем А. А.* // *Биоорган. химия*, 1983. Т. 9. № 12. С. 1690—1692.
41. *Chashchin V. L., Vasilevsky V. I., Shkumatov V. M., Lapko V. N., Adamovich T. B., Berikbaeva T. M., Akhrem A. A.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 791. № 3. P. 375—383.
42. *Poulos T. L.* // *Abstracts of the 5th international conference on biochemistry, biophysics and induction of cytochrome P-450.* Budapest, 1985. P. 4.
43. *Haugen D. A., Coon M. J.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 24. P. 7229—7239.
44. *Silver J., Lukas B.* // *Inorg. chim. acta.* 1984. V. 91. № 4. P. 279—283.
45. *Blum H., Leigh J. S., Salerno J. C., Ohnishi T.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1978. V. 187. № 1. P. 153—157.
46. *Akhrem A. A., Adamovich T. B., Lapko V. N., Sherman S. A., Usanov S. A., Shkumatov V. M., Chashchin V. L.* // *Biochemistry, biophysics and induction of cytochrome P-450* / Eds Vereczky L., Magyar K. Budapest: Akad. Kiado, 1985. P. 113—120.
47. *Black S. D., Coon M. J.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1985. V. 128. № 1. P. 82—89.
48. *Усанов С. А., Пикунева И. А., Чащун В. Л., Ахрем А. А.* // *Биоорган. химия*. 1984. Т. 10. № 1. С. 32—45.
49. *Ellman G. L.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1959. V. 82. № 1. P. 70—77.
50. *Grassetti D. R., Murray J. F.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1967. V. 119. № 1. P. 41—49.
51. *Gregory J. D.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1955. V. 77. № 14. P. 3922.

52. Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. № 5. С. 789—791.
53. Gray W. R., Hartley B. C. // Biochem. J. 1963. V. 89. № 1. P. 235.
54. Bruton C. J., Hartley B. C. // J. Mol. Biol. 1970. V. 52. № 2. P. 165—178.
55. Spraman D. H., Stein W. H., Moore S. // Anal. Biochem. 1958. V. 30. № 7. P. 1190—1205.
56. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступила в редакцию
2.VI.1986
После доработки
8.X.1986

CHEMICAL MODIFICATION OF CYSTEINE RESIDUES IN MITOCHONDRIAL
CYTOCHROME P-450_{sc} FROM ADRENAL CORTEX. IDENTIFICATION OF THE
PROXIMAL LIGAND

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

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

A chemical modification of cysteine residues in mitochondrial cytochrome P-450_{sc} from adrenal cortex has been carried out. Cysteine residues in this hemoprotein were shown to form two pools: one available to the chemical modification, which does not affect spectral and functional properties of the cytochrome and another accessible for the modification only after the protein inactivation and the heme removal. The proximal ligand in the polypeptide chain of cytochrome P-450_{sc} was localized. Cys⁴²² was shown to be involved in the heme coordination and Cys²⁶⁴ was found to be exposed and accessible to sulfhydryl reagents. The data obtained are discussed in terms of the functional role of cysteine residues in monooxygenase catalysis.