



УДК 577.152.162.02 : 577.112.4

© 1991 г.

А. Г. Ланко, Г. Сметтал\*, К. Руктауль\*,  
С. А. Усанов

## ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ СТЕРОИДГИДРОКСИЛИРУЮЩИХ МОНООКСИГЕНАЗ ФЛУОРЕСЦЕИНИЗОТИОЦИАНАТОМ

Институт биоорганической химии АН БССР, Минск;

\*Центральный институт молекулярной биологии АН ГДР, Берлин — Бух

Проведена химическая модификация цитохромов P-450<sub>ssc</sub> и P-450<sub>11β</sub> флуоресцеин-, динодофлуоресцеин-, розин- и родаминизотиоцианатом. При незначительных избытках реагентов и рН, близком к нейтральному, наблюдается селективная модификация этих цитохромов без изменения их спектральных свойств. Наряду с ковалентным связыванием имеет место неспецифическая сорбция флуоресцентных реагентов цитохромом P-450. С помощью ковалентной хроматографии определена доля неспецифически сорбированных реагентов. Предложен метод разделения модифицированного и немодифицированного цитохрома P-450<sub>ssc</sub> с одновременным отделением неспецифически сорбированного реагента. Исследовано влияние модификации цитохрома P-450<sub>ssc</sub> на его взаимодействие с холестерином, адренодоксином, кинетику восстановления и на превращение холестерина в прегненолон в реконструированной системе. Структурным анализом продуктов протеолиза установлено, что модификация подвергается остаток лизина в С-концевой аминокислотной последовательности гемопротейда; его положение (Lys<sup>338</sup>) определено при исследовании химотриптического гидролизата фрагмента F<sub>2</sub> цитохрома P-450<sub>ssc</sub>. Обсуждается роль остатка (Lys<sup>338</sup>) в каталитическом превращении холестерина в прегненолон.

Стероидгидроксилирующие системы, локализованные во внутренней мембране митохондрий коры надпочечников, трансформируют холестерин в кортикостероиды [1—5]. В состав таких систем входят флавопротеид (адренодоксинредуктаза), железосеросодержащий белок (адренодоксин) и гемопротейды (цитохромы P-450<sub>ssc</sub> и P-450<sub>11β</sub>). Основная функция электронтранспортной цепи стероидгидроксилаз — перенос электронов от донора (NADPH) на цитохромы P-450<sub>ssc</sub> и P-450<sub>11β</sub>. В процессе электронного транспорта компоненты этих гидроксилаз образуют высокоспецифичные комплексы [4—7]. Аденодоксин переносит электроны с аденодоксинредуктазы на цитохромы P-450<sub>ssc</sub> и P-450<sub>11β</sub> [6—9]. Существенную роль в стабилизации комплексов аденодоксина с флавопротеидом и гемопротейдами играют электростатические взаимодействия [10]. Так, отрицательно заряженные группы аденодоксина (Asp<sup>86</sup>, Asp<sup>79</sup>, Glu<sup>74</sup>) взаимодействуют с положительными группами аденодоксинредуктазы [11—13]. Электростатические силы также участвуют во взаимодействии аденодоксина с цитохромом P-450<sub>ssc</sub>. Комплекс двух белков фиксируется в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида [14, 15]. Модификация остатков лизина в цитохроме P-450<sub>ssc</sub> янтарным ангидридом блокирует образование специфического комплекса с аденодоксином [16, 17].

Химические реагенты, содержащие флуоресцентные группы, в частности флуоресцеинизотиоцианат (FITC), позволяют не только модифицировать белки, но и облегчать локализацию меченых аминокислот в полипептидной цепи. FITC успешно использовался для выяснения функциональной нагрузки N-концевых аминокислотных остатков цитохрома P-450 LM<sub>2</sub> [18, 19]. Цель настоящей работы — химическая модификация цитохрома P-450<sub>ssc</sub> FITC и его аналогами, установление функциональной нагрузки и положения модифицируемых остатков в полипептидной цепи.

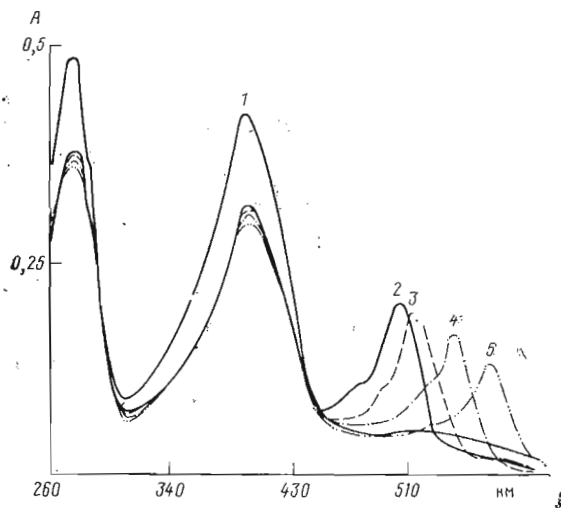


Рис. 1. Спектры поглощения исходного (1) и модифицированного с помощью FITC (2), DIFITC (3), EITC (4) и RITC (5) препаратов цитохрома P-450sc

Показано, что FITC специфично реагирует с остатками лизина внутри полипептидной цепи цитохрома P-450sc, но не с  $\alpha$ -аминогруппой N-концевой аминокислоты.

*Модификация субстратсвязанной формы цитохрома P-450sc FITC и его аналогами.* Очищенный цитохром P-450sc находится в высокоспиновом состоянии, так как содержит связанный эндогенный холестерин. При обработке такого цитохрома трехкратным избытком диодифлуоресцеин (DIFITC), эозин (EITC) или родаминизотиоцианатом (RITC) хромофорные группы реагентов вводятся в белок, не влияя на спектральные свойства самого гемопротейда (рис. 1). При включении в белок максимум поглощения хромофорных групп сдвигается в длинноволновую область приблизительно на 8 нм, что указывает на гидрофобный характер их окружения (табл. 1). Судя по разностным спектрам карбонильных комплексов, образуемых восстановленной формой модифицированного цитохрома P-450sc, он не инактивируется в процессе модификации. Меняя избыток FITC и время инкубации (3—40 мин), можно получить от 0,4 до 1,65 связанных молекул реагента на одну молекулу цитохрома P-450sc. Значительное увеличение времени инкубации и избытка реагента, как правило, не приводит к включению более 1,7 моль метки на 1 моль цитохрома P-450sc.

Изотиоцианаты реагируют с первичными аминогруппами белка, если последние депротонированы. Обычно изотиоцианаты модифицируют  $\alpha$ -аминогруппу N-концевой кислоты. Однако N-концевой анализ по Эдману показал, что N-концевую аминокислоту в цитохроме P-450sc (Ile) FITC и его аналоги не модифицируют.

SDS-электрофорез модифицированного цитохрома P-450sc показал, что наряду с ковалентно связанной меткой, которая мигрирует вместе с цитохромом P-450sc, часть реагента связана гидрофобно и при электрофорезе мигрирует вместе с красителем.

Чтобы оценить вклад неспецифической сорбции изотиоцианатов на цитохроме P-450sc, модифицированный гемопротейд наносили на колонку с тиопропил-сефарозой 6В. Цитохром P-450sc содержит один экспонированный наружу остаток цистеина, благодаря чему он обратимо связывается с этим носителем вследствие тиолдисульфидного обмена. Нековалентно связанный с белком реагент далее может быть удален промывкой колонки раствором 1% SDS. Цитохром P-450sc, содержащий ковалентно связанную метку, элюируется раствором 0,01% дитиотреита. Степень модификации цитохрома P-450sc зависит от строения изотиоцианата: она максимальна в случае FITC и минимальна для RITC (табл. 2). Количес-

## Модификация цитохрома P-450scs изотиоцианатами

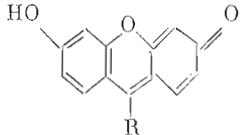
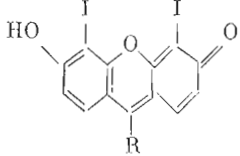
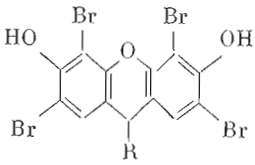
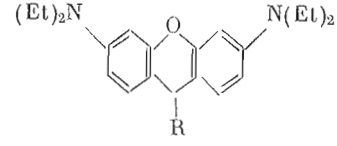
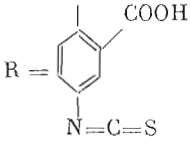
Реагент	Структура реагента	$\lambda_{\text{max}}$ хромофора реагента, нм	$\lambda_{\text{max}}$ хромофора метки, связанного с цито- хромом P-450, нм
FITC		491,0	499,0
DIFITC		510,0	518,0
EITC		520,0	528,0
RITC		557,6	565,0
			

Таблица 2

## Модификация изотиоцианатами субстратсвязанной формы цитохрома P-450scs \*

Реагент	FITC	DIFITC	EITC	RITC
Общее количество реагента, связанного с цитохромом P-450scs (моль/моль)	1,09	0,85	0,79	0,81
Количество ковалентно связанной метки (моль/моль)	0,57	0,35	0,31	0,19

\* Время инкубации цитохрома P-450scs с трехкратным количеством реагента 20 мин.

во неспецифически сорбированного реагента постоянно (0,4—0,5 моль/моль цитохрома P-450scs), тогда как количество ковалентно связанного хромофора увеличивается с увеличением времени инкубации от 0 до 40 мин.

Разделение модифицированной и немодифицированной форм цитохрома P-450scs с помощью ВЭЖХ. ВЭЖХ цитохрома P-450scs после его обработки FITC, проводимая на колонке Shim-pack HAC в градиенте фосфата, позволяет не только отделить модифицированный цитохром P-450scs от немодифицированного, но и удалить гидрофобно связанный реагент (рис. 2). Эффективность разделения подтверждается спектрально. Гомогенность цитохрома P-450scs, содержащего ковалентно связанный FITC, подтверждает селективность реакции.

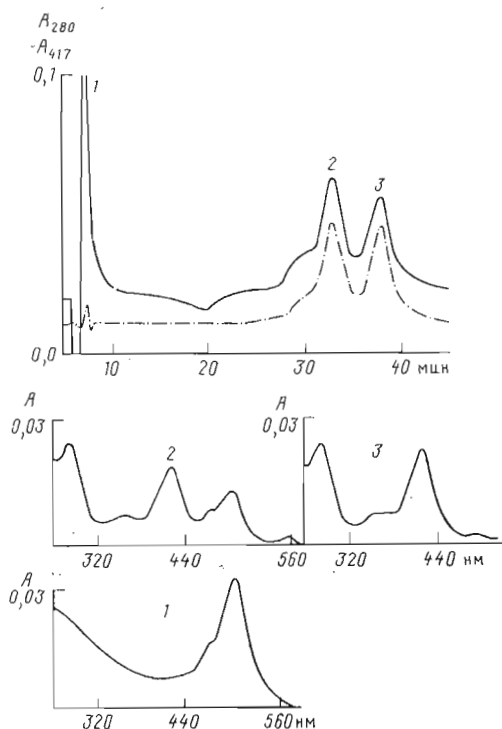


Рис. 2

Рис. 2. ВЭЖХ модифицированного FITC цитохрома P-450scs (степень включения метки 1,04) на колонке с Shim-pack HAC в условиях линейного градиента от 10 мМ до 60% 300 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,1% Tween 80 и 0,1% холата натрия. Скорость элюирования 0,8 мл/мин. 1—3 — поглощение соответствующих элюируемых фракций

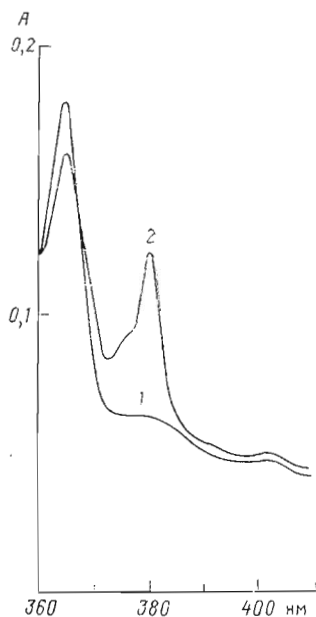


Рис. 3

Рис. 3. Спектры поглощения исходного (1) и модифицированного FITC (2) цитохрома P-450<sub>11β</sub>

*Модификация цитохрома P-450<sub>11β</sub> FITC.* Цитохром P-450<sub>11β</sub>, катализирующий гидроксирование стероидов в 11β-положении, находится во внутренней мембране митохондрий коры надпочечников. В отличие от цитохрома P-450scs цитохром P-450<sub>11β</sub> при обработке FITC в стандартных условиях теряет активность, агрегирует и выпадает в осадок. Однако, проводя эту реакцию при 0° С в течение не более 15 мин и применяя мягкие условия обессоливания, нам удалось добиться включения до 0,95 моль FITC на 1 моль цитохрома P-450<sub>11β</sub> практически без изменений спектральных свойств последнего (рис. 3).

*Модификация низкоспиновой формы цитохрома P-450scs.* При удалении холестерина из активного центра цитохрома P-450scs последний переходит из высоко- в низкоспиновое состояние. Модификация низкоспиновой формы цитохрома P-450scs FITC не изменяет его спектра (появляется новая полоса поглощения хромофора метки; данные не приведены).

*Влияние модификации цитохрома P-450scs FITC на ферментативную активность.* При введении флуоресцентной метки в цитохром P-450scs он теряет способность катализировать реакцию трансформации холестерина в прегненолон (рис. 4). Эффект возрастает при увеличении степени модификации. Поскольку при этом количество неспецифически сорбированного реагента постоянно, вводя поправку на эту величину (0,4—0,5 моль FITC/моль цитохрома P-450scs), можно утверждать, что ингибирование ферментативной активности — результат ковалентной модификации цитохрома P-450scs. Далее мы исследовали эффект модификации гемопротейда на каждую из стадий монооксигеназного цикла.

*Влияние модификации цитохрома P-450scs FITC на взаимодействие низкоспиновой формы с холестерином.* Первая стадия окисления холестерина в прегненолон — это взаимодействие цитохрома P-450scs с холестерином.

Рис. 4. Влияние степени модификации цитохрома P-450sc на его способность катализировать реакцию окисления холестерина

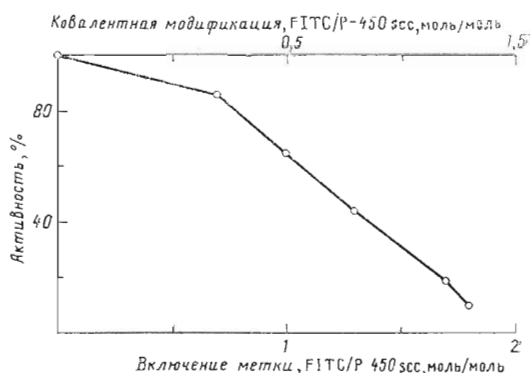


Рис. 4

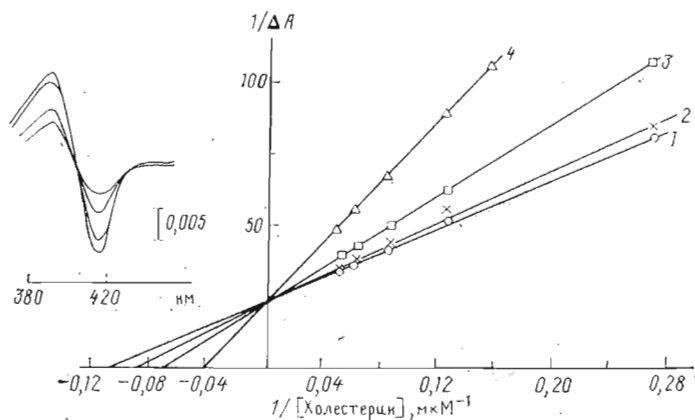


Рис. 5

ном. На рис. 5 в обратных координатах представлена зависимость амплитуды спектральных изменений от концентрации холестерина при различных степенях модификации цитохрома P-450sc. С увеличением степени модификации снижается сродство цитохрома P-450sc к субстрату. Ход кривых на рис. 5 напоминает конкурентное ингибирование: при значительных избытках субстрата амплитуда спектральных изменений не зависит от степени модификации цитохрома P-450sc. Это позволяет предположить конкуренцию модификатора и холестерина за связывание с одним или близко расположенными участками молекулы цитохрома P-450sc.

*Влияние модификации цитохрома P-450sc FITC на взаимодействие с адренодоксином.* После взаимодействия с холестерином следует стадия взаимодействия цитохрома P-450sc с адренодоксином, которое проявляется в спектральных изменениях первого типа в области полосы Core [20]. Согласно рис. 6a, модификация цитохрома P-450sc FITC приводит к снижению величины  $K_d$  (оцениваемой из зависимости амплитуды спектральных изменений от концентрации добавленного адренодоксина в обратных координатах) и уменьшению спектрального ответа.

Взаимодействие цитохрома P-450sc с адренодоксином может быть количественно охарактеризовано также с помощью второй производной ультрафиолетовых спектров поглощения, отражающих состояние ароматических хромофоров белка [21]. Если судить по этому параметру, модификация цитохрома P-450sc сопровождается увеличением  $K_d$  комплекса цитохрома P-450sc с ферредоксином. Можно предположить, что включение метки в молекулу цитохрома P-450sc изменяет микроокружение остатков тирозина и триптофана.

Модификация цитохрома P-450sc не сказывается на его сродстве к иммобилизованному адренодоксину. Модифицированный цитохром P-450sc сорбируется в виде узкой полосы на колонке с адренодоксин-сефарозой,

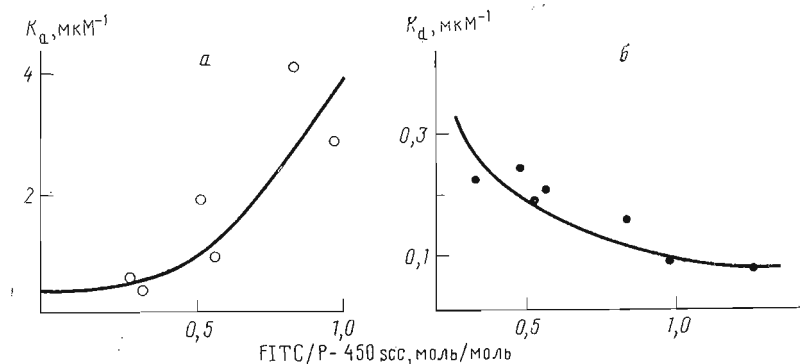


Рис. 6

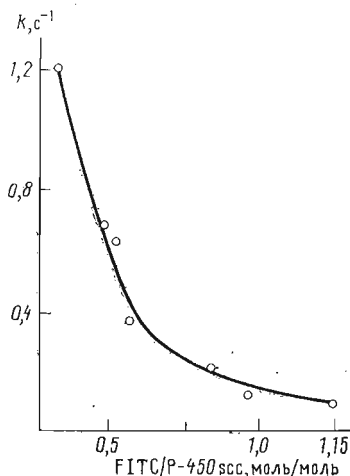


Рис. 7

Рис. 6. Влияние модификации цитохрома P-450scс FITC на взаимодействие с аденодоксином: *a* — изменения поглощения в области Soret; *b* — изменения амплитуды второй производной УФ-спектров поглощения

Рис. 7. Влияние модификации цитохрома P-450scс FITC на константу скорости быстрой фазы восстановления

а время его элюции такое же, как у немодифицированного цитохрома P-450scс.

*Влияние модификации цитохрома P-450scс FITC на кинетику его восстановления.* Модификация цитохрома P-450scс FITC сопровождается снижением константы скорости NADPH-зависимого восстановления цитохрома P-450scс (рис. 7). Как следует из данных по быстрой кинетике, восстановление бифазно. Это свидетельствует о прямом или косвенном вовлечении остатков лизина, модифицируемых FITC, во взаимодействие с аденодоксином, об их расположении в участках белок-белковых контактов и участии в электронном транспорте.

*Ограниченный протеолиз модифицированного FITC цитохрома P-450.* При трипсинолизе цитохрома P-450scс, модифицированного FITC, как и в случае нативного белка, образуются два основных фрагмента. SDS-электрофорез показал, что вся метка локализована во фрагменте F<sub>2</sub>, содержащем С-концевую последовательность. После продолжительного трипсинолиза метка оказывается в дочернем фрагменте F<sub>3</sub>, образующемся из фрагмента F<sub>2</sub> при расщеплении связи у Trp<sup>399</sup>.

*Локализация лизина, модифицированного FITC, в полипептидной цепи цитохрома P-450.* Цитохром P-450scс (степень модификации 1,65) после трипсинолиза отделяли от трипсина и низкомолекулярных продуктов гидролиза хроматографией на холат-сефарозе 4В. Смесь фрагментов подвергали хроматографии тиол-дисульфидного обмена. Фрагмент F<sub>1</sub>, не содержащий сульфгидрильные группы, легко удалялся промывкой колонки раствором 6 М хлоргидрата гуанидина. Фрагмент F<sub>2</sub> элюируется раствором 0,01% меркаптоэтанола. При разделении на колонке с биогеом P-4 химотриптического гидролизата карбоксиметилированного цитохрома

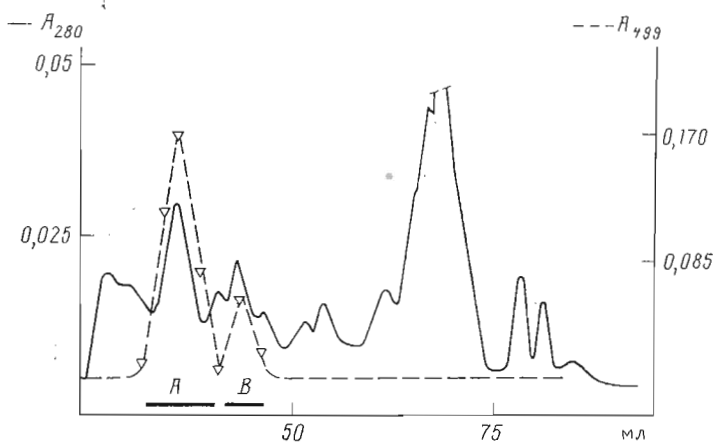


Рис. 8. Разделение химотриптического гидролизата  $F_2$ , полученного из модифицированного FITC цитохрома P-450scs на колонке ( $0,9 \times 120$  см) с биогелем P-4 в 0,2 М бикарбонате аммония. Скорость элюирования 2,5 мл/ч. Показаны границы объединенных фракций А и Б

P-450scs выделены две основные фракции — А и Б, содержащие метку (рис. 8). Пептиды, входящие в эти фракции, затем разделяли ВЭЖХ на колонках с Ultrasil<sup>TM</sup>-Сх в градиенте концентрации триэтиламина и с Ultrasphere ODS в градиенте концентрации ацетонитрила. В результате выделены в чистом виде два пептида, содержащие флуоресцентную метку. Структура пептидов, определенная ручным вариантом метода Эдмана, идентична:  $\text{Leu}^{337}\text{-Lys}^*\text{-Ala-Ser-Ile-Lys-Glu-Thr-Leu}^{345}$  ( $\text{Lys}^*\text{-Lys}^{338}$ -меченый FITC). Присутствие одинаковых по составу и строению пептидов в разных фракциях связано, по-видимому, с различной степенью их модификации (во второй фракции содержался пептид с двумя модифицированными лизинами). Модификации в основном подвергается остаток лизина —  $\text{Lys}^{338}$  (85%); доля пептида, содержащего одновременно модифицированные  $\text{Lys}^{338}$  и  $\text{Lys}^{342}$ , не превышала 15% и снижалась с уменьшением количества частично инактивированного белка в исходном препарате.

Такой же структурный анализ проведен и с цитохромом P-450scs, модифицированным FITC (данные не приведены). Картина модификации и распределения хромофорных групп в молекуле цитохрома P-450scs в этом случае аналогична, хотя степень модификации значительно ниже.

Таким образом, в цитохроме P-450scs FITC и его аналоги селективно модифицируют  $\text{Lys}^{338}$ , что говорит об аномально низком рК аминокислоты этого остатка. Снижение рК  $\epsilon$ -аминогруппы  $\text{Lys}^{338}$  указывает на его гидрофобное окружение, что подтверждается сдвигом максимума поглощения хромофоров метки на 8 нм (табл. 1) по сравнению со свободными реагентами [22].

Ингибирование при модификации FITC способности цитохрома P-450scs катализировать реакцию трансформации холестерина в прегненолон может быть результатом нарушения: 1) взаимодействия цитохрома P-450scs с холестерином; 2) взаимодействия цитохрома P-450scs с аденодоксином; 3) взаимодействия цитохрома с кислородом; 4) внутримолекулярного переноса электронов; 5) активной конформации; 6) удаления продукта реакции из активного центра.

Модификация цитохрома P-450scs сказывается на взаимодействии с холестерином не непосредственно, а, по-видимому, косвенно за счет конформационных изменений. Вместе с тем остаток  $\text{Lys}^{338}$  расположен в таком участке полипептидной цепи цитохромов P-450scs и P-450<sub>11 $\beta$</sub>

330

P-450scs M L Q M V P L L K \* A S I K E T L R L N P I S V T

P-450<sub>11 $\beta$</sub>  A I T E L P L L R \* A A L K E T L R L Y P V G I T

который высококонсервативен у различных типов стероидсвязывающих белков [23], что предполагает его непосредственное участие во взаимодействии с холестерином.

Ингибирование ферментативной активности, однако, трудно отнести только за счет нарушения взаимодействия холестерина с цитохромом P-450<sub>scs</sub>. На это указывают эксперименты по ферментативному восстановлению цитохрома P-450<sub>scs</sub>, моделирующему транспорт первого электрона: при введении метки в цитохром P-450<sub>scs</sub> снижается константа скорости быстрой фазы восстановления. Восстановление цитохрома P-450<sub>scs</sub> включает его взаимодействие с аденодоксином и собственно перенос электрона на цитохром P-450<sub>scs</sub>. Взаимодействие цитохрома P-450<sub>scs</sub> с аденодоксином имеет сложную природу и реализуется при участии электростатических взаимодействий. Ранее, селективно модифицируя цитохром P-450<sub>scs</sub>, мы показали, что остатки Lys<sup>338</sup> и Lys<sup>342</sup> вовлекаются в электростатическое взаимодействие с аденодоксином [16, 17, 24]. Участие Lys<sup>342</sup> во взаимодействии с аденодоксином показано при химической модификации цитохрома P-450<sub>scs</sub> пиридоксаль-5'-фосфатом [25]. При подготовке настоящей работы к публикации появилось сообщение о модификации цитохрома P-450<sub>scs</sub> FITC [26], в котором указывается на участие Lys<sup>338</sup> только во взаимодействии цитохрома P-450<sub>scs</sub> с аденодоксином.

Если влияние модификации цитохрома P-450<sub>scs</sub> на взаимодействие его с аденодоксином оценивать по изменению поглощения в области полосы Core, роль Lys<sup>338</sup> в этом взаимодействии очевидна [24—26]. По-видимому, модификация этого остатка приводит при взаимодействии двух белков к нарушению трансформации конформационных изменений в изменении спинового состояния. Если же в качестве критерия рассматривать изменения микроокружения ароматических аминокислотных остатков, серьезных нарушений конформации после модификации цитохрома P-450 FITC не наблюдается (рис. 6б).

Знание первичной структуры цитохрома P-450<sub>scs</sub> [27, 28] и цитохрома P-450<sub>11β</sub> [29] из митохондрий коры надпочечников позволяет оценить окружение Lys<sup>338</sup> и сделать ряд предположений относительно его участия в формировании высших структур цитохрома P-450<sub>scs</sub>. Модифицируемый FITC остаток Lys<sup>338</sup> находится в α-спиральном участке полипептидной цепи, обладающем высокой гидрофобностью. Кроме того, Lys<sup>338</sup> при pH 7,2—7,4 практически не заряжен, и трудно представить, каким образом он участвует в электростатическом взаимодействии с отрицательно заряженными группами аденодоксина. На отсутствие серьезных нарушений взаимодействия аденодоксина с модифицированным FITC цитохромом P-450<sub>scs</sub> указывает сохранение гемопротеидом после модификации сродства к иммобилизованному аденодоксину (см. выше). Это не согласуется с выводами, сделанными в работах [25, 26], о том, что модификация Lys<sup>338</sup> сопровождается полным нарушением взаимодействия цитохрома P-450<sub>scs</sub> с аденодоксином. Добавление аденодоксина к модифицированному FITC цитохрому P-450<sub>scs</sub> практически не сказывается на флуоресцентных свойствах хромофора: аденодоксин не тушит, а даже несколько усиливает флуоресценцию метки (данные не приведены), что отражает изменения в состоянии гемовой группы, которая является сильным тушителем флуоресценции. Вместе с тем остатки Lys<sup>338</sup> и Lys<sup>342</sup> находятся, по-видимому, в непосредственной близости от аденодоксинсвязывающего участка молекулы цитохрома P-450<sub>scs</sub>, так как аденодоксин делает эти остатки недоступными для низкомолекулярных химических реагентов [24—26].

Таким образом, оценка роли остатков Lys<sup>338</sup> и Lys<sup>342</sup> цитохрома P-450<sub>scs</sub> в монооксигеназном катализе затруднена и в существенной степени определяется ограничениями используемых методических подходов. Вместе с тем можно заключить, что эти остатки участвуют в спиновых переходах железа гема и внутримолекулярном электронном переносе. Для выявления роли Lys<sup>338</sup> и Lys<sup>342</sup> перспективен направленный мутагенез.

Сравнительный анализ первичных структур цитохромов P-450<sub>scs</sub> и P-450<sub>11β</sub> показывает, что они проявляют невысокую степень гомологии (36%), но содержат несколько высококонсервативных участков и должны



иметь сходные области, ответственные за взаимодействие с аденодоксинном. Консервативный участок полипептидной цепи цитохромов P-450<sub>scc</sub> и P-450<sub>11β</sub>, включающий в себя остатки Lys<sup>338</sup> (Arg в молекуле цитохрома P-450<sub>11β</sub>) и Lys<sup>342</sup>, участвует во взаимодействии с аденодоксинном, межбелковым переносе электронов и спиновых переходах. Интересно сопоставить приведенные данные с результатами, полученными для другого представителя ферредоксинзависимых монооксигеназ прокариот — цитохрома P-450<sub>cam</sub>. Остатки Lys<sup>344</sup> и Arg<sup>364</sup> цитохрома P-450<sub>cam</sub> участвуют в электростатическом взаимодействии с путидаредоксинном и цитохромом *b*<sub>5</sub> [30]. Нами показано, что цитохром P-450<sub>scc</sub> взаимодействует с аденодоксинном и цитохромом *b*<sub>5</sub> посредством одних и тех же участков [31]. Это свидетельствует о существовании общих механизмов высокоспецифичных взаимодействий в ферредоксинзависимых монооксигеназных системах.

### Экспериментальная часть

В работе использовали холестерин, холат натрия, прегненолон, додецилсульфат натрия (SDS), трипсин, ингибитор трипсина, кумасси G-250 (Serva, ФРГ), BrCN-активированную сефарозу 4B (Pharmacia, Швеция), FITC, EITC, RITC, конъюгат «щелочная фосфатаза—антиIgG кролика», 5-бromo-4-хлор-3-индолилфосфат, альбумин (Sigma, St. Louis, США), нитроцеллюлозу (Schleicher und Schüll, ФРГ), Emulgen 911, Emulgen 913 (Kao Atlas, Япония). DIFITC был любезно предоставлен проф. А. Стиром (Max-Planck-Institute für Biophysikalische Chemie, ФРГ). ВЭЖХ проводили на колонках с Ultrasil<sup>TM</sup>-C<sub>x</sub> и Ultrasphere ODS (Beckman, Австрия) и Shim-pack HAC (Shimadzu, Япония).

*Выделение цитохрома P-450<sub>scc</sub>, цитохрома P-450<sub>11β</sub>, аденодоксинредуктазы и аденодоксина из митохондрий коры надпочечников.* Аденодоксин выделяли из супернатанта озвученных митохондрий с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, как описано ранее [32]. Белок гомогенен по данным SDS-электрофореза и иммунодиффузии в присутствии моноспецифических антител и характеризуется соотношением  $A_{414}/A_{280}$ , равным 0,86. Иммунизацию аденодоксина на BrCN-активированной сефарозе проводили согласно прописи фирмы. Аденодоксинредуктазу и цитохром P-450<sub>scc</sub> выделяли как описано ранее [33], используя аффинную хроматографию на 2',5'-ADP-сефарозе и аденодоксин-сефарозе соответственно. Белки гомогенны по данным электрофореза, иммунодиффузии и анализа N-концевых аминокислот и характеризуются спектрофотометрическим индексом  $A_{280}/A_{450}$ , равным 7,7, и  $A_{393}/A_{280}$ , равным 0,86. Цитохром P-450<sub>11β</sub> после его отделения от цитохрома P-450<sub>scc</sub> выделяли хроматографией на аденодоксин-сефарозе [34].

*Протеолиз цитохрома P-450<sub>scc</sub>.* Ограниченный протеолиз цитохрома P-450<sub>scc</sub> осуществляли как описано ранее [35], используя различные соотношения цитохром P-450 — трипсин. Реакцию останавливали добавлением 2-кратного избытка ингибитора трипсина. Продукты модификации анализировали SDS-электрофорезом и иммуноблоттингом.

*Аналитические методы.* Для SDS-электрофореза использовали прибор Fast System (Pharmacia, Швеция). Гели окрашивали либо серебром, либо кумасси G-250. В последнем случае гели отмывали 7,5% уксусной кислотой. Концентрацию цитохрома P-450<sub>scc</sub> определяли из разностных спектров поглощения при образовании карбонильного комплекса восстановленной формы гемопротейда, используя молярный коэффициент поглощения  $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [36]. Концентрацию аденодоксинредуктазы и аденодоксина определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения  $11 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 450 нм и  $10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 414 нм соответственно [37, 38].

*Химическая модификация цитохрома P-450<sub>scc</sub> FITC и его аналогами.* Цитохром P-450<sub>scc</sub> обрабатывали 3-кратным избытком реагента при 20° С в 50 mM фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 1 M NaCl, 0,3% холат натрия и 20% глицерин. Степень модификации контролировали, изменяя время реакции от 10 до 40 мин. Содержание метки в цитохроме P-450<sub>scc</sub>

определяли, используя молярный коэффициент поглощения  $74,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 496 нм для FITC,  $12,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 560 нм для RITC и  $86,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 532 нм для EITC,  $75,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 510 нм для DIFITC.

*Спектрофотометрическое титрование цитохрома P-450scс аденодоксинном и холестерином.* Спектрофотометрическое исследование взаимодействия цитохрома P-450scс с холестерином и аденодоксином проводили на приборах Shimadzu UV-3000 (Япония) и Specord M-40 (Carl Zeiss, ГДР), используя тандемный режим регистрации. При титровании цитохрома P-450scс холестерином использовали низкоспиновую форму гемопротейда, полученную с помощью ферментативного превращения связанного эндогенного холестерина. К раствору цитохрома P-450scс (0,5 мкМ) добавляли аликвоты 1 мМ спиртового раствора холестерина, измеряя увеличение поглощения при 390/420 нм.

Титрование высокоспиновой формы цитохрома P-450scс аденодоксинном осуществляли в присутствии неионного детергента Tween 20 и с использованием дополнительной пары кювет для компенсации поглощения аденодоксина в видимой области спектра.

Разностные спектры второй производной регистрировали, используя приставку DES 1. Стандартные условия для записи спектров второй производной: скорость сканирования 75 нм/мин,  $\Delta\lambda$  2 нм. От 5 до 10 разностных спектров второй производной аккумулировались и усреднялись с помощью микропроцессора SAPCOM 1. Все спектрофотометрические измерения проводили в термостатированных тандемных кюветах при 25° С.

*Ферментативную активность* определяли в реконструированной системе, содержащей 1 нмоль цитохрома P-450scс, 5 нмоль аденодоксина и 1 нмоль аденодоксинредуктазы. Цитохром P-450scс предварительно инкубировали с антителами 15 мин при 20° С, затем добавляли аденодоксинредуктазу и аденодоксин и инкубировали еще 15 мин. Далее добавляли Tween 20 до 0,2 мМ, холестерин до 50 мкМ и [ $^3\text{H}$ ]холестерин (Amersham, Англия) 137 000 имп/мин на 1 пробу. Через 20 мин начинали реакцию добавлением 0,1 мл NADPH-регенерирующей системы, содержащей 10 мкМ NADPH, 2 мМ глюкозо-6-фосфат и 2 МЕ/мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (конечный объем пробы 0,9 мл). После разделения продуктов реакции их радиоактивность измеряли на счетчике Mark III (Tracor, Голландия).

Скорость восстановления цитохрома P-450scс оценивали, измеряя разность поглощения карбонильного комплекса восстановленной формы при 450 и 500 нм на спектрофотометре D-110, предназначенном для регистрации быстрых процессов и оснащенный системой постоянного контроля D-137 (Duglum, США). Из растворов перед экспериментом удаляли кислород пропусканием смеси чистого азота и СО в течение 30 мин. Для удаления остатков кислорода использовалась система, состоящая из глюкозы (60 мМ), глюкозооксидазы (46 МЕ/мл) и каталазы (4680 МЕ/мл) (Serva, ФРГ). После дополнительного насыщения раствора окисью углерода в течение 15 мин его помещали в шприц прибора. Другой раствор, содержащий NADPH (1 мМ) в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, и кислородпоглощающую смесь (глюкоза, глюкозооксидаза, каталаза), обрабатывали сходным образом и помещали в другой шприц. Реакционную камеру и шприцы инкубировали при 20° С. Реакцию начинали быстрым смешением равных объемов (150 мкл) из двух шприцев. Обработку результатов, аккумуляцию и сглаживание кривых осуществляли с помощью самописца DL 905 (Datalab, Англия) и микрокомпьютера (MPS 4944, ГДР). Выходные данные дальше обрабатывали на БЭСМ 6.

Кинетику восстановления описывали суммой трех экспонент. Независимые константы скорости реакции  $k$  рассчитывали по уравнению [39]

$$Y = b_0 + a_i e^{-k_i t}$$

*Локализация модифицированных остатков лизина в полипептидной цепи цитохрома P-450 scс.* Карбоксиметилирование иодацетамидом фрагмента F<sub>2</sub>, полученного из модифицированного FIT цитохрома P-450, осуществляли в 0,2 М трис-HCl-буфере, рН 8,1, содержащем 6 М хлоридат

гуанидина согласно [40]. Карбоксиметилированный фрагмент F<sub>2</sub> подвергали исчерпывающему химотриптическому гидролизу в течение 24 ч при 37° С в растворе 0,2 М бикарбоната аммония, рН 8,1, при соотношении фермент — субстрат 1 : 50. Первоначальное фракционирование гидролизата проводили на колонке с биогеом Р-4 (0,9×120 см) в растворе 0,2М бикарбоната аммония при скорости элюции 2,5 мл/ч. Фракции, содержащие флуоресцентную метку, разделяли с помощью ВЭЖХ на колонках с Ultrasil™-Сх в градиенте триэтиламина в воде, рН 4,5, с последующей обращенно-фазовой хроматографией на Ultrasphere ODS (Beckman, Австрия) в градиенте ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kimura T.* // *Mol. and Cell. Biochem.* 1981. V. 36. P. 105—122.
2. *Lambeth D. J., Seybert D. W., Lancaster J. R., Salerno J. C., Kamin H.* // *Mol. and Cell. Biochem.* 1982. V. 45. P. 13—31.
3. *Hall P.* // *Int. Rev. Biochem.* 1984. V. 45. P. 53—95.
4. *Shkumatov V. M., Usanov S. A., Chashchin V. L., Akhrem A. A.* // *Pharmazie*, 1985. V. 40. № 11. P. 757—766.
5. *Usanov S. A., Chashchin V. L., Akhrem A. A.* // *Frontiers in biotransformation / Ed. Ruckpaul K. B.: Akad. Verlag*, 1990. V. 3. P. 1—57.
6. *Katagiri M., Takikawa O., Sato H., Suhara K.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 77. № 2. P. 804—809.
7. *Lambeth J. D., Seybert D. W., Kamin H.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 1. P. 138—143.
8. *Sugiyama T., Miura P., Yamano T.* // *Iron and Cooper Proteins / Eds Yasunobu K., Mower H. F., Hayaishi O. N. Y.: Acad. Press*, 1976. P. 290—302.
9. *Chu J.-W., Kimura T.* // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. № 14. P. 5183—5187.
10. *Lambeth J. D., Kriengsiri S.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 15. P. 8810—8816.
11. *Ахрем А. А., Шкumatов В. М., Чащин В. Л.* // *Биоорган. химия*. 1977. Т. 3. № 8. С. 1064—1069.
12. *Geren L., Tuls J., O'Brien P., Millet F., Peterson J. A.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 33. P. 15491—15496.
13. *Geren L. M., O'Brien P., Stronchuerner J., Millet F.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 4. P. 2155—2160.
14. *Усанов С. А., Турко И. В., Чащин В. Л., Ахрем А. А.* // *Докл. АН СССР*. 1985. Т. 280. № 6. С. 1487—1492.
15. *Chashchin V. L., Turko I. V., Akhrem A. A., Usanov S. A.* // *Biochim. et biophys. acta*. 1985. V. 828. № 2. P. 313—324.
16. *Адамович Т. Б., Пикулева И. А., Усанов С. А., Чащин В. Л.* // *Биохимия*. 1989. Т. 54. № 7. С. 1216—1226.
17. *Adamovich T. B., Pikuleva I. A., Chashchin V. L., Usanov S. A.* // *Biochim. et biophys. acta*. 1989. V. 996. № 2. P. 247—253.
18. *Bernhardt R., Ngoc Dao N. T., Stiel H., Schwarze W., Friedrich J., Janig G.-R., Ruckpaul K.* // *Biochim. et biophys. acta*. 1983. V. 745. № 1. P. 140—143.
19. *Makower A., Bernhardt R., Rabe H., Janig G.-R., Ruckpaul K.* // *Biomed. et biochim. acta*. 1984. V. 42. № 2. P. 1333—1341.
20. *Kido T., Kimura T.* // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 23. P. 11806—11815.
21. *Shkumatov V. M., Smettan G., Ristau O., Rein H., Ruckpaul K., Chashchin V. L., Akhrem A. A.* // *Chem. Biol. Interactions*. 1988. V. 68. № 1. P. 71—83.
22. *Dimitropoulos C. G., Oikonomakos N. G., Karnii-Katsadima I. A., Kalogerakos T. G., Evangelopoulos A. E.* // *Eur. J. Biochem.* 1973. V. 38. № 2. P. 537—552.
23. *Picado-Leonard J., Miller W. L.* // *Mol. Endocrinol.* 1988. V. 2. № 11. P. 1145—1150.
24. *Usanov S. A., Chernogolov A. A., Adamovich T. B., Turko I. V., Pikuleva I. A., Chashchin V. L.* // *Cytochrom P-450: Biochemistry and Biophysics / Ed. Shuster I. London — New York — Philadelphia: Taylor and Francis*, 1989. P. 121—124.
25. *Tsubaki M., Iwamoto Y., Hiwatahi A., Ichikawa Y.* // *Biochemistry*. 1989. V. 28. № 17. P. 6899—6907.
26. *Tuls J., Millett F.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 28. P. 16421—16425.
27. *Morohashi K., Fujii-Kuriyama Y., Okada Y., Sogawa K., Hirose T., Inayama S., Omura T.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 15. P. 4647—4651.
28. *Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Лапко А. Г., Курпана Н. С., Кириллова Н. М., Берикбаева Т. М., Ахрем А. А., Золотарев А. С.* // *Биоорган. химия*. 1985. Т. 11. № 8. С. 1048—1067.
29. *Morohashi K., Yoshioka H., Gotoh O., Okada Y., Yamamoto K., Miyata T., Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y., Omura T.* // *J. Biochem.* 1987. V. 102. № 2. P. 553—568.
30. *Усанов С. А., Пикулева И. А., Ахрем А. А., Чащин В. Л.* // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 6. С. 725—738.
31. *Stayton P. S., Poulos T. L., Sligar S. G.* // *Biochemistry*. 1989. V. 28. № 20. P. 8201—8205.
32. *Усанов С. А., Чащин В. Л., Ахрем А. А.* // *Биохимия*. 1989. Т. 54. № 3. С. 472—486.

33. Усанов С. А., Пукалева И. А., Чащин В. Л., Ахрем А. А. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 1. С. 32—45.
34. Ахрем А. А., Марцев С. П., Чащин В. Л. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 5. С. 786—788.
35. Chashchin V. L., Vasilevsky V. I., Shkumatov V. M., Akhrem A. A., // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 787. № 1. P. 27—38.
36. Omura T., Sato R. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. № 7. P. 2370—2379.
37. Hiwatashi A., Ichikawa Y., Yamano T., Maruya N. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 2. P. 3091—3097.
38. Huang J., Kimura T. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 2. P. 406—409.
39. Ingelman-Sundberg M., Blanck J., Smettan G., Ruckpaul K. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 134. № 1. P. 157—162.
40. Усанов С. А., Пукалева И. А., Ахрем А. А., Чащин В. Л. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 725—738.

Поступила в редакцию  
19.III.1990

После доработки  
29.I.1991

A. G. LAPKO, G. SMETTAN\*, K. RUCKPAUL\*, S. A. USANOV

#### CHEMICAL MODIFICATION OF STEROID-TRANSFORMING MONOOXYGENASES WITH FLUORESCINE ISOTHIOCYANATE

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk;  
\*Central Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the GDR, Berlin-Buck*

Chemical modifications of cytochrome P-450<sub>scc</sub> and cytochrome P-450<sub>11β</sub> with fluoresceine-, diiodofluoresceine-, eosine- and rhodamine isothiocyanate have been carried out. At a low reagent / protein ratio and neutral pH, a selective chemical modification was shown to take place which did not affect the spectral properties of cytochrome P-450<sub>scc</sub>. Covalent chromatography was found useful to discriminate between covalent modification of cytochrome P-450<sub>scc</sub> and non-specific binding of FITC with cytochrome P-450<sub>scc</sub>. Proteolytic modification of cytochrome P-450<sub>scc</sub> and structural analysis indicate that a lysine residue of the C-terminal sequence of cytochrome P-450<sub>scc</sub> is accessible to FITC. The residue was shown, by the analysis of the chymotryptic hydrolysate of the fragment F<sub>2</sub>, to be Lys<sup>338</sup>. Effect of modification with FITC on the interaction of cytochrome P-450<sub>scc</sub> with cholesterol or adrenodoxin, on the reduction kinetics and on the conversion of cholesterol to pregnenolone was also studied.