



УДК 577.152.191.3'13 + 546.11*3

© 1991 г.

*Н. Г. Котлова, Е. С. Рубцов, Г. А. Бадун,
М. А. Кулиш, А. Ф. Миронов*

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СУБЪЕДИНИЦЫ II ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

С использованием метода тритиевой планиграфии с последующим гидролизом субъединицы II цитохромоксидазы изучена степень экранирования различных участков этого белка. На основании полученных данных предложена возможная пространственная организация гидрофильной части субъединицы II.

В последнее время предложено несколько моделей пространственной организации цитохромоксидазы (ферроцитохром-с: кислород—оксидоредуктазы, КФ 1.9.3.1) — терминального фермента дыхательной цепи, а также ее отдельных субъединиц. Особое место среди них занимает субъединица II, которая содержит молекулу гема *a* и ион меди.

Субъединица II цитохромоксидазы из сердца быка относится к гидрофобным белкам, имеет молекулярную массу 26 049 Да и состоит из 227 аминокислотных остатков, последовательность которых известна [1]. Интенсивное изучение субъединицы (II) позволило установить пространственную организацию части этого полипептида, расположенной в фосфолипидном бислое [1]. С целью дальнейшего изучения топологии субъединицы II нами был использован метод тритиевой планиграфии. Этот метод хорошо зарекомендовал себя при исследовании пространственной организации бактериородопсина, лизоцима, альбумина и некоторых других высокомолекулярных систем [2], в том числе и цитохромоксидазы [3].

В данной работе полученные нами молекулярные кристаллы цитохромоксидазы сердца быка были обработаны активированным тритием (см. «Экспер. часть»), затем из них выделялась радиоактивно меченная субъединица II. Следует отметить, что выделение субъединицы II представляет собой достаточно сложную задачу и включает в себя гель-фильтрацию на колонке с биогелем ACA-54 с последующей ВЭЖХ на колонке TSK G-3000 SW [4]. При этом серьезные трудности возникают при отделении додецилсульфата натрия (SDS) и солей, входящих в подвижную фазу. С целью усовершенствования методики очистки субъединицы II после гель-фильтрации нами была применена ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой. Проведенные эксперименты показали, что наиболее подходящей для этих целей является колонка Ultrasphere XL C-18 (Beckman, США) [5].

Выделенную субъединицу II гидролизовали ТРСК-трипсином по методике [6]. Из триптического гидролизата нам удалось выделить 9 фрагментов (рис. 1а, б) в отличие от работы [6], где было идентифицировано лишь 7 фрагментов.

Поскольку связи Lys^{49} — Leu^{50} , Arg^{82} — Ile^{83} , Lys^{129} — Pro^{130} , Arg^{188} — Pro^{189} , согласно работе [6], не гидролизуются трипсином в данных условиях (рис. 2), полученные результаты указывали на то, что в нашем случае разделение проведено более эффективно и нам удалось выделить в индивидуальном состоянии все 9 образовавшихся пептидов.

Для идентификации выделенных пептидов на хроматограмме (рис. 1а, б) мы сопоставили теоретические молярные коэффициенты поглощения соответствующих пептидов (обозначенных в порядке их расположения в поли-

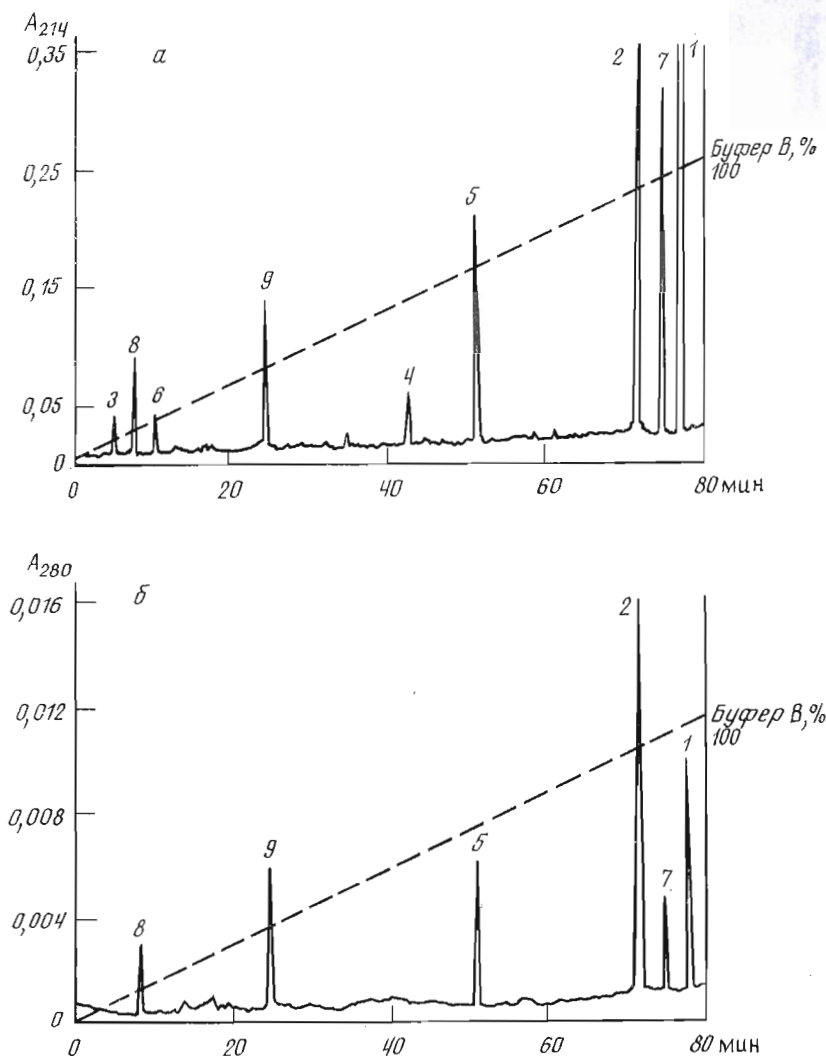


Рис. 1. ВЭЖХ пептидов триптического гидролизата субъединицы II цитохромоксидазы на колонке Aquaroge Phenyl ($2,1 \times 220$ мм). Подвижная фаза: буфер А — 10 мМ триэтиламоний-фосфатный буфер (рН 2,1), содержащий 0,1 М LiClO_4 ; буфер Б — 60% ацетонитрил в буфере А. Время создания градиента концентрации ацетонитрила 80 мин. Скорость элюции 1 мл/мин. Поглощение при 214 (а) и 280 нм (б). Пептиды обозначены в соответствии с их порядком расположения в полипептидной цепи белка. Штриховая линия показывает изменение концентрации буфера Б

пептидной цепи белка) с данными хроматографии при длинах волн 214 и 280 нм (табл. 1). Расчет теоретических молярных коэффициентов поглощения был выполнен в соответствии с работой [7]. Сравнение соотношений высот пиков (рис. 1а, б) и рассчитанных молярных коэффициентов поглощения (табл. 1) позволило отнести пики пептидов 1, 2, 7 и 8. Для других триптических пептидов этот метод не давал надежных результатов, поэтому мы использовали другой прием, основанный на известной зависимости времен удерживания пептидов на колонке с обращенной фазой от суммарной гидрофобности аминокислот, входящих в их состав [8]. Это правило справедливо для пептидов длиной не более 30 аминокислот. Для уточнения расчетных значений времени удерживания мы провели серию анализов смеси пептидных стандартов на колонке Aquaroge Phenyl (Applied Biosystem, США), на которой проводили разделение пептидов триптического гидролизата меченной тритием субъединицы II. Это позволило скорректировать результаты нашего разделения с результатами Мика [8] и рассчитать теоретическое время удерживания данных триптических пеп-

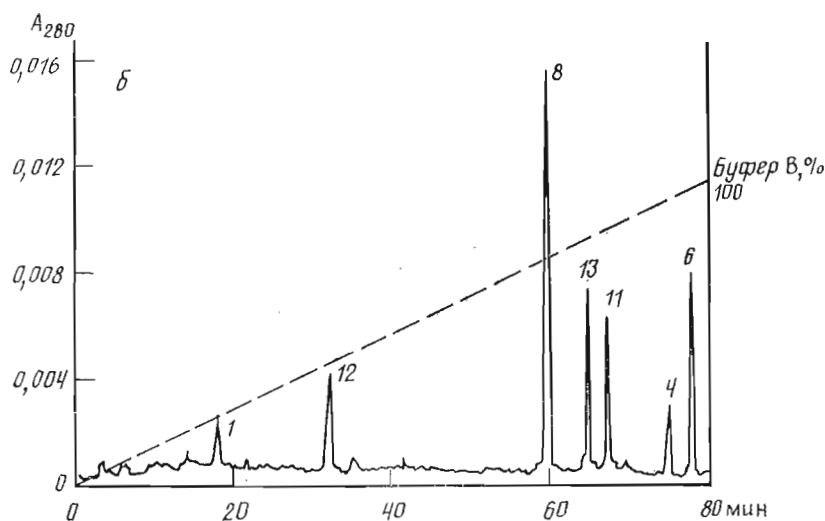
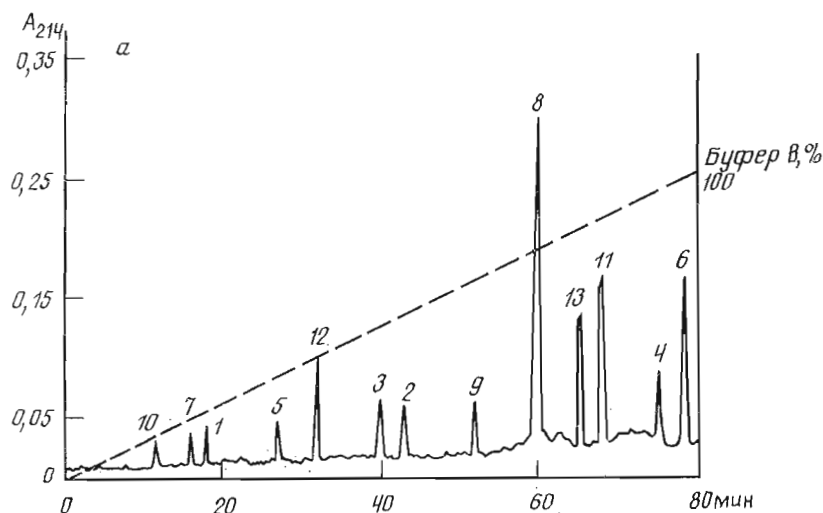


Рис. 3. ВЭЖХ пептидов бромцианового расщепления субъединицы II цитохромоксидазы на колонке Aquarogel Phenyl (2,1 × 220 мм). Условия разделения как на рис. 1

Измерение радиоактивности полученных триптических и бромциановых пептидов проводили в процессе их разделения с помощью проточного радиоизотопного детектора Beckman 171 (США) (табл. 3, 4).

С использованием данных о величинах относительной радиоактивности триптических и бромциановых пептидов были построены соответствующие гистограммы радиоактивности полипептидной цепи субъединицы II (рис. 4а, б), а на их основе была построена совмещенная гистограмма (рис. 4в), дающая более полное представление о доступности отдельных участков полипептидов атомам трития и соответственно о расположении этих участков на поверхности молекулярных кристаллов. Анализ совмещенной гистограммы показал, что наименее доступными для бомбардировки атомов трития являются четыре участка полипептида: I (30—45), II (88—100), III (152—174), IV (186—207). Снижение радиоактивности на этих участках полипептидной цепи свидетельствует об их экранировании в кристаллах цитохромоксидазы.

Расположение первых двух участков согласуется с данными работы [1] и подтверждает выводы авторов о том, что эти участки включают в себя аминокислоты, расположенные в мембране. О наличии еще двух экранированных участков ранее не сообщалось. Однако обработка с помощью ЭВМ данных аминокислотной последовательности субъединицы II с использованием программы прогнозирования структуры белка Predict 7 [9]

Таблица 2

**Характеристика пептидов бромцианового расщепления субъединицы
II цитохромоксидазы**

Номер пептида	Положение в полипептидной цепи	Количество аминокислотных остатков	Теоретический молярный коэффициент поглощения, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ для λ , нм		Время удерживания, мин	
			280	214	теоретическое	фактическое
1	2—5	4	1 300	10 100	17,4	17,37
2	6—17	12	0	14 100	43,1	42,53
3	18—29	12	0	18 700	40,7	40,48
4	30—45	16	1 300	23 500	83,0	75,11
5	46—56	11	0	9 000	27,7	27,57
6	57—86	30	7 000	53 000	103,4	78,15
7	88—100	13	0	9 800	16,7	15,94
8	101—122	22	17 900	110 400	67,3	60,15
9	123—146	24	0	16 800	54,5	52,18
10	149—152	4	0	2 800	11,9	11,52
11	153—185	33	5 700	49 800	68,7	66,81
12	186—207	22	2 600	34 800	33,8	32,11
13	208—226	18	7 000	48 900	66,7	65,17

Таблица 3

**Абсолютная и относительная радиоактивность
триптических пептидов субъединицы
II цитохромоксидазы**

Номер пептида	Положение в полипептидной цепи	Молекулярная масса пептида, Да	Радиоактивность	
			абсолютная, имп/мин	относительная, имп/(мин·моль фрагмента)
1	1—98	11 187	67 987	6,08
2	99—134	4 440	72 108	16,24
3	135—141	858	14 421	16,81
4	142—151	1 188	20 602	17,34
5	152—171	2 168	18 542	8,50
6	172—178	729	14 422	19,78
7	179—217	4 122	47 385	11,50
8	218—221	586	8 240	14,06
9	222—227	693	12 361	17,81

Таблица 4

**Абсолютная и относительная радиоактивность бромциановых
пептидов субъединицы II цитохромоксидазы**

Номер пептида	Положение в полипептидной цепи	Молекулярная масса пептида, Да	Радиоактивность	
			абсолютная, имп/мин	относительная, имп/(мин·моль фрагмента)
1	2—5	481	8 240	17,13
2	6—17	1307	24 722	18,91
3	18—29	1522	10 301	6,77
4	30—45	1822	—	—
5	46—56	1234	4 120	3,34
6	57—86	3400	18 542	5,45
7	88—100	1462	—	—
8	101—122	2886	45 325	15,71
9	123—146	2719	49 445	18,18
10	149—152	520	8 210	15,79
11	153—185	3550	47 385	13,35
12	186—207	2218	1 854	8,36
13	208—226	2251	30 903	13,73

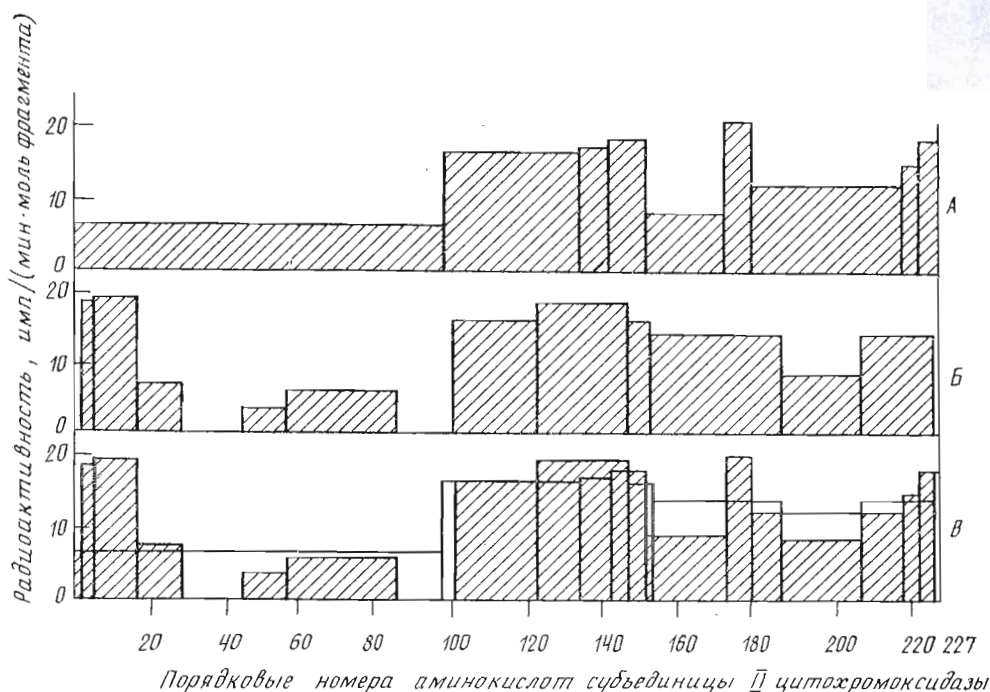


Рис. 4. Гистограммы радиоактивности фрагментов субъединицы II цитохромоксидазы, полученных в результате расщепления трипсином (А), бромцеллазом (Б). В — совмещенная гистограмма

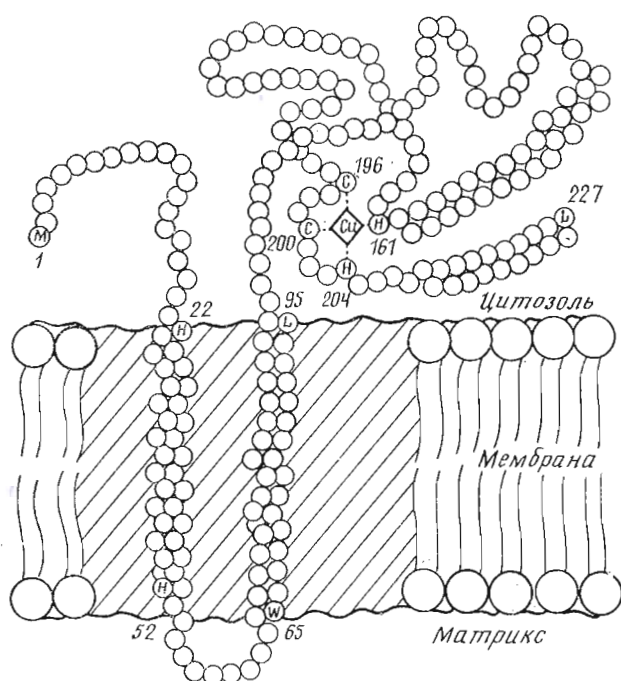


Рис. 5. Модель пространственного расположения субъединицы II по работе [1] с уточненной третичной структурой гидрофильной части молекулы согласно результатам обработки тритием и данным программы Predict-7

указывает на возможное наличие пяти малодоступных участков (25—42, 59—74, 163—171, 196—204, 207—213), что косвенно подтверждает полученные нами результаты. Кроме того, из результатов прогнозирования следует, что аминокислотные остатки в последовательности 140—160 и 210—227 могут участвовать в образовании α -спиралей в гидрофильной части молекулы.

На основании полученных нами результатов, используя ранее известные данные о пространственном расположении субъединицы II [1], мы предлагаем модель с уточненным пространственным расположением гидрофильной части этой субъединицы, в которой полипептидная цепь белка дважды пронизывает липидный бислой, причем N- и C-концевые участки молекулы экспонированы в цитозоль [10]. При этом C-концевой фрагмент (аминокислотные остатки 96—227), по-видимому, свернут в клубок таким образом, что фрагменты аминокислотной последовательности, включающие в себя His¹⁶¹, Cys¹⁹⁶, Cys²⁰⁰ и His²⁰⁴, участвующие в связывании атома меди, расположены внутри этого клубка (рис. 5).

Экспериментальная часть

В работе использовали холиевокислый натрий, додецилсульфат натрия, ТРСК-трипсин, бромциан (Serva, ФРГ), биогель АСА-54 (Pharmacia, Швеция), ацетонитрил (Merck, ФРГ).

Остальные реагенты — отечественного производства, х. ч. или ос. ч. Газообразный тритий — фасовка по 100 мКи (Изотоп, СССР).

ВЭЖХ проводили на приборах Gold System (Beckman, США) и Waters (США) с использованием колонок TSK G 3000 SW (0,75 × 50 см, Altex, США), МПС-300 (4 × 500 мм, НПО АН СССР, Ленинград) SGX, PTFE (4,6 × 250 мм, Tessek, ЧСФР), Ultrasphere XL C-18, 3 мкм (Beckman, США), Aquapore Phenyl, 300 А, 7 мкм (Applied Biosystem, США) и радиоизотопного детектора Beckman 171. Лиофилизацию образцов проводили на приборе Alpha 1-5 (Christ, ФРГ).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [11]. При проведении электрофореза использовали методику [12].

Цитохромоксидазу получали из субмитохондриальных частиц с использованием солюбилизации холатом натрия, фракционирования сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой на октилсефарозе CL-4В в присутствии тритона X-100 [13].

Препарат кристаллов цитохромоксидазы готовили медленным удалением холата натрия из раствора цитохромоксидазы с помощью диализа при 4° С, последующим замораживанием и многократным промыванием [3]. Для введения тритиевой метки препарат кристаллов цитохромоксидазы (40 мг) в 2 мл дистиллированной воды равномерно распределяли по стенкам реакционного сосуда, замораживали жидким азотом и лиофилизовали [3]. Систему вакуумировали до 0,065 Па. Реакционный сосуд, охлажденный снаружи жидким азотом, заполняли тритием (4 ГБк, 100 мКи) до давления 0,65 Па, и, подавая напряжение на вольфрамовую нить, нагревали ее до 2000 К трижды по 15 с [14]. Для удаления лабильного трития меченый препарат цитохромоксидазы, растворенный в 0,05 М трис-НСl-буфере, pH 8,2, содержащем 3% SDS, трижды лиофилизовали. Для измерения радиоактивности к аликвоте меченого препарата добавляли по 5 мл сцинтиллятора Unisolve-1 (Koch-Light, Англия), через 1—2 ч определяли радиоактивность на приборе Beckman LS 7000 (Австрия).

Для протеолитического расщепления субъединицы II цитохромоксидазы с помощью ТРСК-трипсина полипептид (2 мг), растворенный в 0,1% натрий-гидрокарбонатном буфере, pH 8,0, содержащем 0,1% SDS, инкубировали в присутствии 40 мкг ТРСК-трипсина при 37° С в течение 4 ч [6]. Гидролиз останавливали лиофилизацией.

Химическое расщепление субъединицы II цитохромоксидазы бромцианом проводили на стеклянном фильтре в газовой фазе. Для этого полипептид (1 мг), растворенный в 30 мкл 70% трифторуксусной кислоты (TFA), наносили на фильтр из стекловолокна (марки GF/C, Whatman, Англия), который помещали в герметично закрывающуюся ампулу над 1 мл 70% TFA, содержащей 1% муравьиной кислоты и 3 мг бромциана. Термостатировали 25 ч при 20° С. Фрагменты расщепления экстрагировали со стеклянного фильтра 30% TFA.

Разделение субъединиц цитохромоксидазы с помощью гель-фильтрации по работе [15]. Образец цитохромоксидазы (40 мг) в 0,05 М трис-H₂SO₄-

буфере, pH 8,2, инкубировали 16 ч при 20° С в присутствии SDS (5 мг/мг белка) и 4% 2-меркаптоэтанола и наносили на колонку (2,6 × 90 см) с ACA-54, уравновешенной 0,05 М трис-H₂SO₄-буфером (pH 8,2), содержащим 3% SDS, 0,01% азид натрия, 1 мМ EDTA. Элюировали этим же буфером со скоростью 6 мл/ч.

ВЭЖХ субъединицы II цитохромоксидазы, содержащей некоторые при-
месные субъединицы (200—500 мкг, 1—2 нмоль), хроматографировали на колонке (4,6 × 75 мм) Ultrasphere XL C-18. Использовали ступенчатый градиент подвижной фазы: 0—6 мин 1 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 3,0; 6—30 мин ацетонитрил — муравьиная кислота (1 : 1) с 5% хлористого метилена; скорость потока 1 мл/мин. Чистоту субъединицы II контролировали по данным электрофореза в полиакриламидном геле.

ВЭЖХ фрагментов протеолитического и химического расщепления субъединицы II цитохромоксидазы (100—300 мкг) осуществляли на колонке Aquapore Phenyl.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steffen G. J., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. B. 350. № 4. S. 613—619.
2. Радионуклидные методы в физико-химической биологии. Использование реакций атомарного трития // Итоги науки и техники. Серия «Общие проблемы физико-химической биологии». М.: ВИНТИ, 1985. Т. 2. С. 132—182.
3. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф., Ножневникова Е. В., Нейман Л. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 623—627.
4. Котлова Н. Г., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. // Биоорг. химия. 1989. Т. 14. № 12. С. 1695—1697.
5. Котлова Н. Г., Кулиш М. А., Миронов А. Ф., Рубцов К. С. // Тез. доклада на V Всес. симпозиум по молекулярной жидкостной хроматографии. Рига, 1990. С. 187.
6. Mitochondria: A Practical Approach / Eds Rickwords M. T. V., Darley-Usmar V. M. Oxford, Washington: IRL Press, 1987. 321 P.
7. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. Т. 2. М.: Мир, 1984. С. 32—34.
8. Meek I. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 3. P. 1632—1638.
9. Carmens R. S., Freije J. P., Molina M. M., Martin J. M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1989. V. 159. № 2. P. 687—693.
10. Capaldi R. A., Malatesta F., Darley-Usmar V. M. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 726. № 2. P. 135—148.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
12. Kadenbach B., Jarausch J., Hartmann R., Merle P. // Anal. Biochem. 1983. V. 129. № 2. P. 135—148.
13. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 192—195.
14. Шишков А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С. // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 7. С. 1125—1151.
15. Verheul F. E. A. M., Boonman J. C. P., Draijer J. W., Muijsers A. O., Borden D., Tarr G. E., Margoliasch E. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 548. № 2. P. 397—416.

Поступила в редакцию
26.XII.1990

После доработки
29.III.1991

N. G. KOTLOVA, K. S. RUBTSOV, G. A. BADUN, M. A. KULISH,
A. F. MIRONOV

STUDIES OF SECONDARY STRUCTURE OF SUBUNIT II FROM BOVINE CYTOCHROME OXIDASE

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

We have studied the tryptic digestion and cyanogen bromide cleavage of the tritium-labelled subunit II from bovine cytochrome oxidase. Basing on the radioactivity distribution in the peptides obtained we suggest a model for the spatial structure of the title subunit.