



УДК 577.112.5

© 1994 В. А. Гринкевич\*, В. Г. Зайцев, П. Ф. Павлов\*,  
И. В. Назимов, Е. Ф. Ильина

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ  
OSCP — СУБЪЕДИНИЦЫ  $H^+$ -АТФ-АЗЫ МИТОХОНДРИЙ  
СЕРДЦА СВИНЬИ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и  
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;*

*\*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет*

Ключевые слова:  $H^+$ -АТФ-аза митохондрий, OSCP, первичная структура, строение эпитопов, сравнительный анализ.

Проведены исчерпывающие гидролизы немодифицированного OSCP протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8 и предварительно цитраконилированного белка трипсином. Для выделения в индивидуальном состоянии полученных пептидов использовали различные виды ВЭЖХ и ковалентную хроматографию на SH-сефарозе. Автоматическим методом Эдмана определены полные или частичные аминокислотные последовательности выделенных пептидов, что позволило реконструировать первичную структуру OSCP  $H^+$ -АТФ-азы митохондрий сердца свиньи.

Локализована линейная антигенная детерминанта, узнаваемая моноклональным антителом A1, полученным против OSCP быка. Показано, что входящий в состав этого эпитопа остаток Gly<sup>43</sup> (OSCP быка) заменен на Ala<sup>43</sup> (OSCP свиньи).

Проведен сравнительный анализ первичных структур OSCP  $H^+$ -АТФ-аз митохондрий сердца свиньи и быка.

Митохондриальный  $H^+$ -АТФ-азный (АТФ-синтазный) комплекс состоит из гидрофильной каталитической части  $F_1$ , несущей фосфат- и нуклеотидсвязывающие центры и осуществляющей синтез или гидролиз АТФ, и гидрофобной мембранной части  $F_0$ , вовлеченной в трансмембранный перенос протонов. Каждая из этих

Сокращения: OSCP — oligomycin sensitivity conferring protein, или белок, придающий митохондриальному  $H^+$ -АТФ-азному комплексу чувствительность к олигомицину; bOSCP и pOSCP — OSCP, выделенный из митохондрий сердца быка и свиньи соответственно; Pth — 3-фенил-2-тиогидантоин; PMSF — фенилметилсульфонилфторид; TFA — трифторуксусная кислота; BSA — бычий сывороточный альбумин; трис — 2-амино-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол; МА — моноклональные антитела

Адрес: 119899, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоорганической химии.

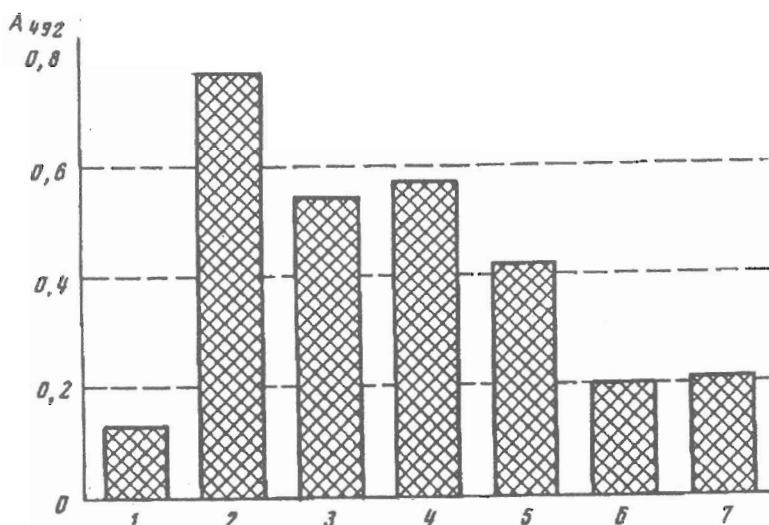


Рис. 1. Связывание МА А1, специфичных к линейному эпитопу bOSCP [7], с bOSCP (2) и pOSCP (3), суммарным препаратом пептидов бромцианового расщепления bOSCP (4) и pOSCP (5), триптических гидролизатами bOSCP (6) и pOSCP (7). 1 — контроль в отсутствие антигена. Для построения гистограмм взяты средние значения из трех измерений. В каждом случае исходно было взято по 1 мкг белка

частей имеет сложный полипептидный состав. Один из полипептидов, OSCP, участвует в связывании  $F_1$  и  $F_0$  и необходим для сообщения АТФ-азной активности мембраносвязанной  $F_1$ -чувствительности к олигомицину [1] и к дициклогексилкарбодиимиду [2]. АТФ-синтазный комплекс митохондрий содержит 2 моль OSCP на 1 моль  $F_1$  [3, 4]. Предполагается, что молекулы OSCP действуют как своеобразная шайба, поддерживающая  $F_1$  в конформации, необходимой для осуществления синтеза АТФ [5].

Ранее нами была определена первичная структура OSCP из  $H^+$ -АТФ-азного комплекса митохондрий сердца быка (bOSCP) [6]. Против этого белка были получены поли- и моноклональные антитела, с помощью которых было показано, что bOSCP не имеет иммунологического перекреста с другими субъединицами бычьей  $H^+$ -АТФ-азы, а также с гомологичными ему по структуре субъединицами из дрожжей, *E. coli* [4, 7, 8] и хлоропластов (данные не приводятся). Известно также, что моноклональные антитела, полученные против OSCP  $H^+$ -АТФ-азы митохондрий сердца свиньи (pOSCP), не взаимодействовали с субъединицами  $F_1F_0$ -комплекса митохондрий печени крыс [9]. Основываясь на вышеизложенных данных, мы предположили, что OSCP в составе  $F_1F_0$ -комплекса митохондрий помимо своих известных функций отвечает также за иммунологическое различие  $H^+$ -АТФ-аз из различных видов организмов [7].

С другой стороны, Гоудио и сотр. [10] на основании данных сравнительного анализа аминокислотного состава и последовательностей 18 N-концевых аминокислотных остатков bOSCP и pOSCP сделали вывод, что оба белка имеют идентичную структуру.

Одно из полученных нами моноклональных антител (МА А1, специфичное к линейному эпитопу bOSCP [7]) взаимодействовало с pOSCP, хотя и с несколько меньшей аффинностью (рис. 1). Это подтверждало предположение, что первичные структуры указанных белков несколько различаются.

Ранее было показано, что в случае bOSCP эпитоп для МА А1 находится в районе 36—46-го аминокислотного остатка полипептидной цепи белка и непосредственно включает в себя последовательность Lys<sup>37</sup>-Glu-Leu-Leu-Arg-Val<sup>42</sup> [7]. Согласно рис. 1, в аминокислотную последовательность линейного эпитопа pOSCP для МА А1 также входят остатки аргинина или лизина и не входят остатки метионина.

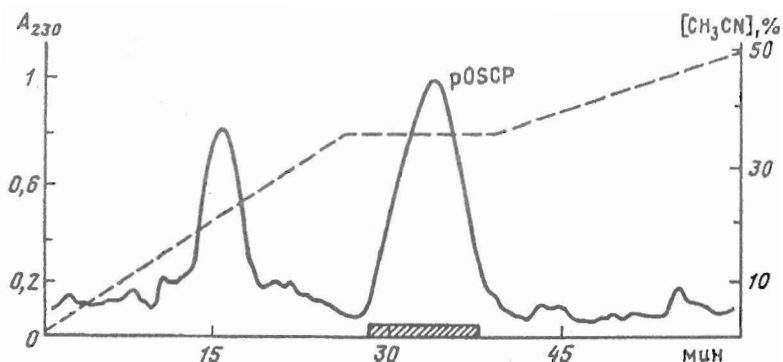


Рис. 2. Очистка рОSCP с помощью ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) Ultrosphere Octyl (Beckman, США) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA, pH 2,0. Скорость элюции 0,7 мл/мин. Здесь и на других рисунках штриховая линия обозначает изменение концентрации ацетонитрила, прямоугольники на оси абсцисс — границы объединенных целевых фракций

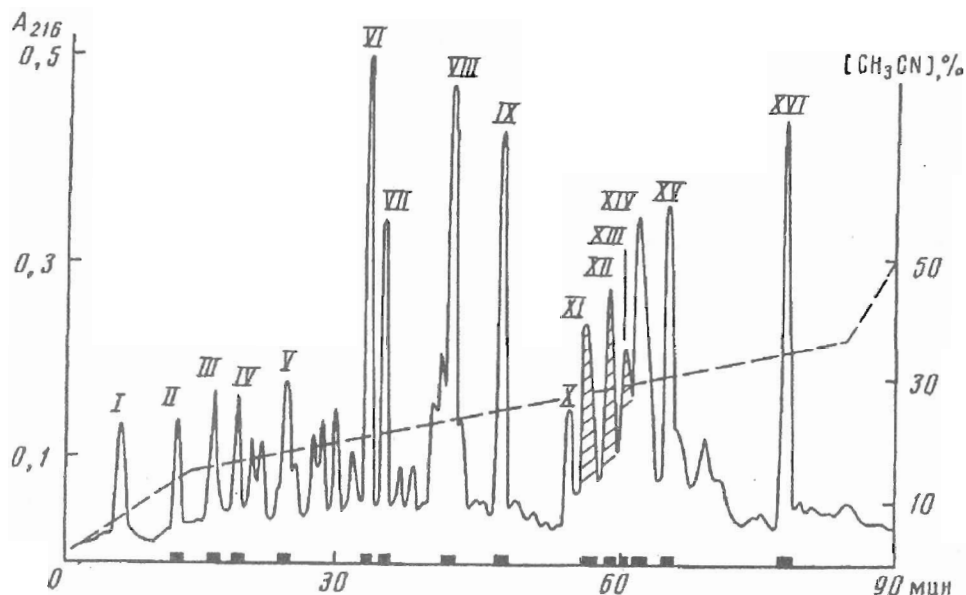
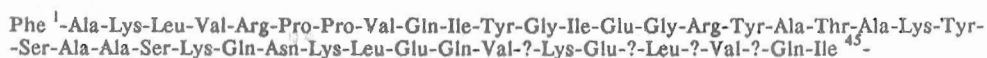


Рис. 3. Разделение продуктов гидролиза рОSCP протеиназой из *St. aureus* V8 при помощи ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) с носителем Ultrosphere ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA. Скорость элюции 0,7 мл/мин. Фракции, взаимодействующие с АМ А1, заштрихованы

Исследование первичной структуры рОSCP было начато с установления его N-концевой аминокислотной последовательности с помощью газофазного секвенатора. Для этого требовался белок более высокой степени чистоты, чем обычно получаемый после ионообменной хроматографии по методу [11]. С этой целью 1 нмоль рОSCP дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Ultrosphere Octyl (рис. 2). Полученный препарат рОSCP, согласно данным SDS-электрофореза и N-концевого анализа (не приводятся), не содержал детектируемых количеств примесей других белков. Автоматическим методом Эдмана для рОSCP была установлена последовательность 45 аминокислотных остатков:



Дополнительная информация была получена при анализе пептидов, выделенных из гидролизата рОSCP глутаминовой протеиназой из *Staphylococcus aureus*

Сравнение аминокислотных составов OSCP H<sup>+</sup>-АТФ-аз митохондрий сердца свиньи (pOSCSP) и быка (bOSCSP)

Аминокислота	bOSCSP *	pOSCSP **
Cys	1	0,69(1) ***
Asp + Asn	10	9,78(10)
Thr	13	9,51(10)
Ser	16	19,97(20)
Glu + Gln	19	19,32(19)
Pro	8	7,61(8)
Gly	9	8,49(8)
Ala	16	17,23(17)
Val	16	15,61(16)
Met	8	7,49(8)
Ile	11	12,59(13)
Leu	23	21,11(21)
Tyr	5	4,52(5)
Phe	4	4,00(4)
His	1	0,86(1)
Lys	21	20,03(20)
Arg	9	8,87(9)
Число остатков	190	191

\* Согласно [6].

\*\* Число остатков рассчитывали, принимая  $M_r$  21 000.

\*\*\* Определен как Cys(Cm).

V8. Эта протеиназа была выбрана потому, что, будучи столь же высокоспецифичным ферментом, как и трипсин, она в отличие от трипсина в данном типе гидролиза должна была образовать гораздо меньшее число пептидов (в pOSCSP содержится 19 остатков Glu + Gln и 29 остатков Lys + Arg (см. табл. 1)). Кроме того, пептиды данного типа гидролиза более прочно удерживаются на мембране ячейки газофазного секвенатора, так как C-концевой остаток Glu в этих пептидах в отличие от C-концевого остатка Lys в триптических пептидах не модифицируется фенилизотиоцианатом и, следовательно, не меняет своей гидрофильности и не вымывается гидрофобными растворителями при экстракции Pth-производных аминокислот. Гидролиз pOSCSP глутаминовой протеиназой проводили при соотношении фермент — субстрат 1 : 50. Разделение гидролизата осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Ultrosphere ODS (рис. 3).

Распределение пептидов pOSCSP по фракциям, их аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки приведены в табл. 2. Было выделено 9 индивидуальных пептидов из 10, образовавшихся в результате гидролиза pOSCSP протеиназой из *St. aureus*. Один из пептидов (S-6), содержащий 37 аминокислотных остатков, в том числе и единственный в белке остаток цистеина, необратимо сорбировался на колонке в процессе ВЭЖХ. Фракции XIV и XV (рис. 3), как было показано их последующим секвенированием (данные не приводятся), содержали пептидные фрагменты глутаминовой протеиназы. Некоторые пептиды с одинаковым аминокислотным составом при хроматографии на колонке с обращенной фазой элюировались при различных концентрациях ацетонитрила. Причиной, вызывающей anomальное поведение пептидов, по-видимому, следует считать их частичную модификацию, происходящую спонтанно в процессе выделения и очистки. Так, в случае пептида S-3 (рис. 3, фракции II, III) было показано, что пептидный материал, выходящий при меньшей концентрации ацетонитрила, имеет в качестве N-концевого остатка глутамин, а

Аминокислотный состав пептидов\*, образовавшихся при гидролизе рОСРР протеиназой из *St. aureus* V8

Аминокислота	S-3 (II, III)	S-7 (IV)	S-2 (VI)	S-(2+3)** (VII)		S-9 (X, VIII)	S-1 (IX)	S-8 (XI-2)	S-4 (XII, XI-1, XIII-1)	S-5 (XVI)
				S-10	S-(2+3)**					
Asp + Asn	—	—	0,93(1)	0,98(1)	0,96(1)	1,12(1)	—	—	2,17(2)	2,11(2)
Thr	—	1,85(2)	0,95(1)	0,82(1)	0,85(1)	—	—	0,70(1)	1,07(1)	0,93(1)
Ser	—	—	2,01(2)	2,15(2)	2,10(2)	1,12(1)	—	2,23(2)	3,98(4)	2,15(2)
Glu + Gln	3,05(3)	1,01(1)	2,10(2)	2,25(2)	5,20(5)	1,09(1)	2,05(2)	2,10(2)	3,21(3)	1,10(1)
Pro	—	—	—	—	—	0,84(1)	1,76(2)	—	1,94(2)	0,97(1)
Gly	—	—	1,31(1)	—	1,21(1)	3,05(3)	1,30(1)	1,37(1)	—	—
Ala	—	1,22(1)	4,08(4)	2,05(2)	3,98(4)	—	1,10(1)	—	4,03(4)	1,13(1)
Val	1,10(1)	—	—	0,95(1)	0,90(1)	2,72(3)	1,62(2)	0,73(1)	4,51(5)	—
Met	—	—	—	1,76(2)	—	1,76(2)	—	—	1,42(2)	—
Ile	—	—	—	2,02(2)	—	2,74(3)	1,71(2)	0,77(1)	1,68(2)	1,00(1)
Leu	—	1,05(1)	2,02(2)	1,82(2)	1,95(2)	—	1,12(1)	4,71(5)	3,93(4)	3,74(4)
Tyr	—	—	1,72(2)	0,78(1)	1,65(2)	—	0,70(1)	—	0,71(1)	—
Phe	—	—	—	—	—	—	1,02(1)	1,02(1)	—	1,00(1)
Lys	0,95(1)	—	1,89(2)	3,86(4)	2,78(3)	0,95(1)	0,82(1)	3,89(4)	5,53(6)	0,83(1)
Arg	—	—	0,93(1)	2,10(2)	0,90(1)	1,02(1)	1,00(1)	—	1,92(2)	—
Число остатков	5	5	18	22	23	17	15	18	38	15
N-концевая	Glx	Ala	Gly	Lys	Gly	Val	Phe	Leu	Leu	Lys
Выход, %	60	62	57	45	9	63	75	47	37	44

\* Цифровая маркировка пептидов приведена в соответствии с их расположением в полипептидной цепи рОСРР. В скобках — фракции, из которых эти пептиды были выделены (см. рис. 3).

\*\* Рассчитаны после вычитания из анализа фракции VII пептида S-10.

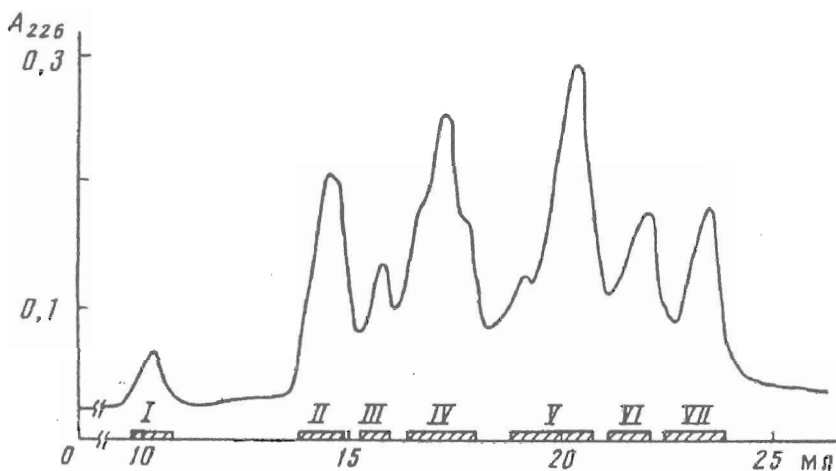


Рис. 4. Фракционирование смеси пептидов ограниченного триптического гидролиза rOSCP при помощи гель-проникающей ВЭЖХ на колонке (7 × 600 мм) Ultracrap TSK 2000 SW в 0,05 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,3. Скорость элюции 0,3 мл/мин

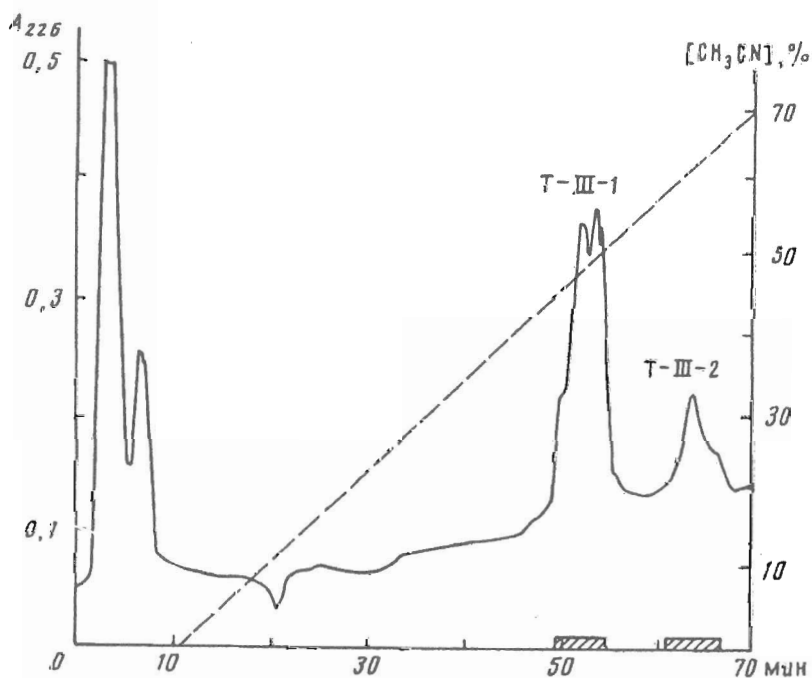


Рис. 5. Разделение фракции III (см. рис. 4) с помощью ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) MN ET Nucleosil 300.5 C4 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA. Скорость элюции 0,5 мл/мин

второй пик (III) соответствует тому же пептиду с N-концевой пироглутаминовой кислотой. Необычное поведение при хроматографии пептидов S-4 и S-9 (рис. 3, фракции XI—XIII и VIII, X соответственно), по-видимому, объясняется частичным окислением содержащихся в этих пептидах двух остатков метионина.

При исчерпывающем гидролизе rOSCP протеиназой из *St. aureus* V8 эффективность взаимодействия образующего гидролизата с МА А1 заметно уменьшалась по сравнению с эффективностью взаимодействия этого антитела с целой молекулой белка или с rOSCP, расщепленным бромцианом (данные не приводятся). Анализ пептидов, выделенных из гидролизата данного типа, показал, что небольшим

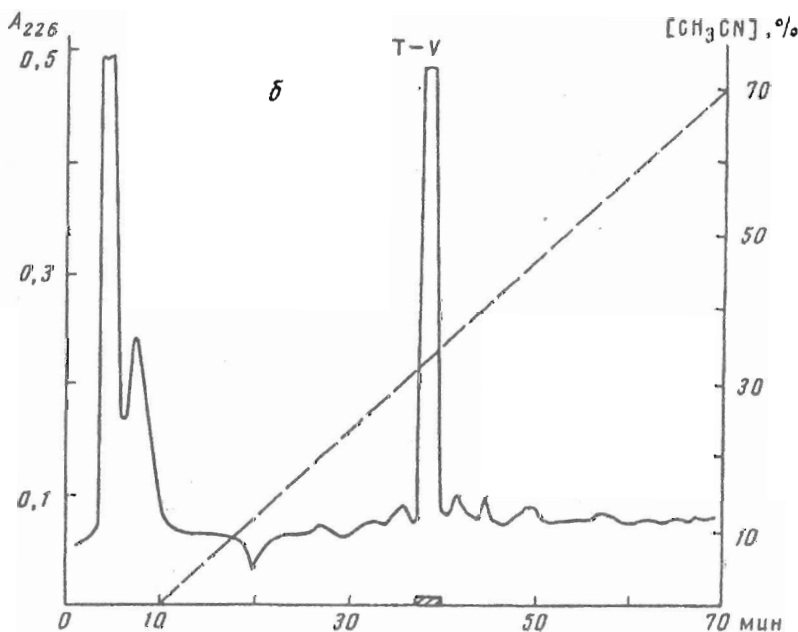
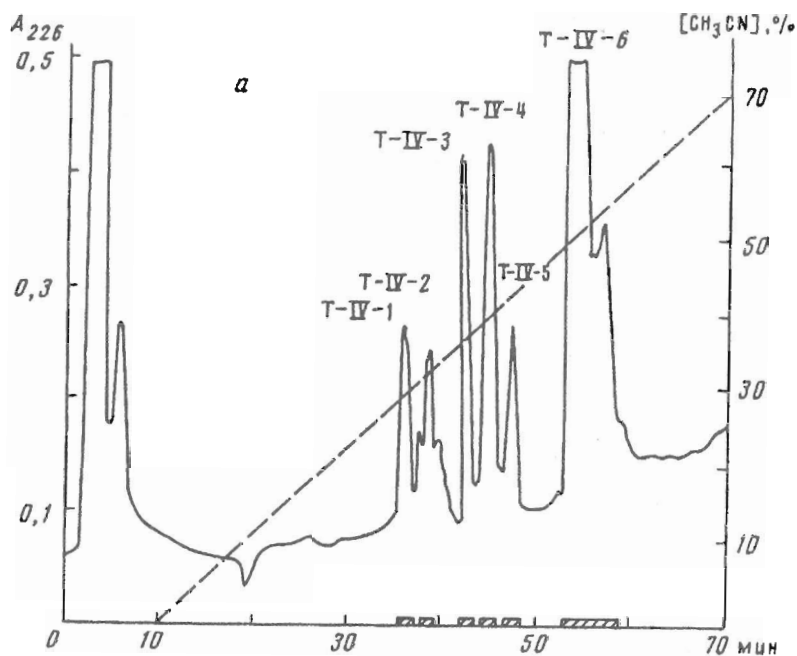


Рис. 6. Разделение фракции IV (а) и V (б) (см. рис. 4) с помощью ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) с носителем Nucleosil 7 C8 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA. Скорость элюции 0,5 мл/мин

средством к МА А1 обладали пептиды фракций XI, XII и XIII. Фракция XII содержала индивидуальный пептид S-4, который вместе с пептидом S-8 (30 и 70% соответственно) был обнаружен также во фракции XI. Индивидуальные пептиды S-4, S-8 были получены из фракции XI с помощью гель-проникающей ВЭЖХ на колонке (7 × 600 мм) Ultropac TSK 2000 SW (фракции XI-1 и XI-2 соответственно). N-Концевой анализ показал, что фракция XIII содержит не-

Аминокислотный состав пептидов \* триптического гидролизата цитраконилированного рОСР

Аминокислота	Т-6 (Т-II, Т-III-2)	Т-4 (Т-III-1)	Т-7 (Т-IV-1, Т-IV-2)	Т-3 (Т-IV-3— Т-IV-5)	Т-2 (Т-IV-6)	Т-1**		Т-8 (Т-VI-1)	Т-9 (Т-VI-2)
						Т-5**	(Т-V)		
Cys(Cm)	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp + Asn	2	4	1	1	1	1	—	—	—
Thr	5	2	1	—	1	—	—	—	—
Ser	5	5	2	1	2	—	—	—	—
Glu + Gln	5	2	2	2	5	—	2	—	1
Pro	2	1	—	2	—	—	2	—	—
Gly	4	1	1	—	—	—	2	—	—
Ala	3	2	1	3	4	—	1	1	—
Val	6	2	1	3	1	—	2	—	—
Met	2	1	1	1	—	—	—	1	—
Ile	3	1	2	2	—	—	2	—	1
Leu	7	5	1	1	4	—	1	—	1
Tyr	—	—	1	1	2	—	1	—	—
Phe	1	1	—	—	—	—	1	—	—
His	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Lys	5	4	4	3	3	—	—	—	—
Arg	1	1	1	1	1	—	1	1	—
Всего остатков	52	32	19	21	24	19	17	3	3
N-Концевая	Gly	Ser	Ile	Val	Tyr	Leu	Phe	Ala	Glu
Выход, %	91	82	63	53	57	83	87	78	77

\* Цифровая маркировка пептидов приведена в соответствии с их расположением в полипептидной цепи рОСР. В скобках — фракции, из которых эти пептиды были выделены.

\*\* Пептиды не были выделены в индивидуальном состоянии. Аминокислотные составы и выходы этих пептидов рассчитаны из данных автоматического секвенирования смеси двух пептидов Т-1 и Т-5 (фр. Т-V) и общего аминокислотного анализа фракции Т-V (рис. 6б).



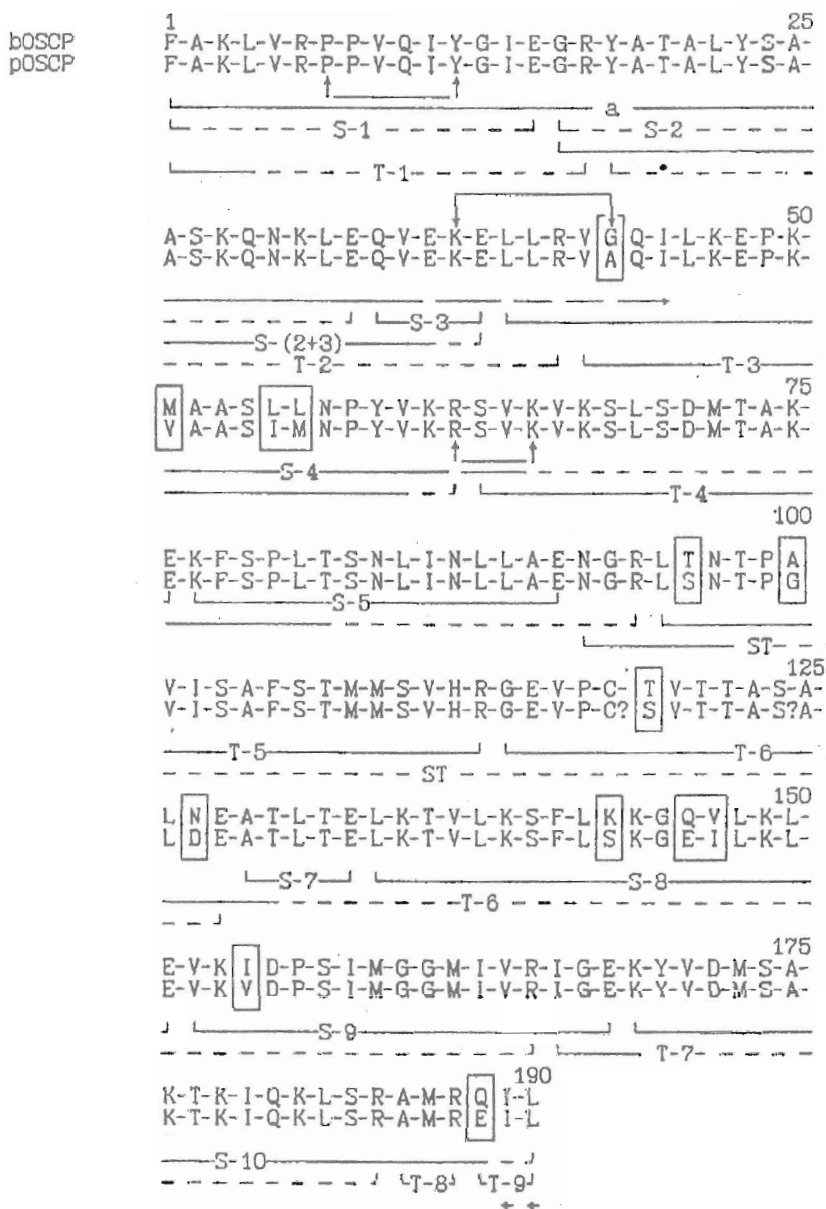


Рис. 7. Сравнение первичных структур bOSCP [6] и pOSCP. Различающиеся аминокислоты взяты в рамки. S — пептиды, полученные при гидролизе pOSCP протеиназой из *St. aureus* V8; T — пептиды ограниченного триптического гидролиза белка; ST — пептид, выделенный с помощью ковалентной хроматографии на активированной тиолсефарозе 4B; a — аминокислотная последовательность, определенная при автоматическом секвенировании pOSCP. Неустановленные последовательности подчеркнуты штриховой линией; ? — данные аминокислотные остатки расположены в полипептидной цепи pOSCP по аналогии с первичной структурой bOSCP (подробнее см. текст). ← — аминокислотные остатки, определенные с помощью карбоксипептидазы Y; ⇓ — линейная антигенная детерминанта bOSCP для MA A1 [7]; ↑↑ — предполагаемая пространственная антигенная детерминанта pOSCP для MA 2B<sub>1</sub> [10]

сколько пептидов. С помощью вышеупомянутой гель-проникающей хроматографии из этой фракции были выделены пептид S-4 (фракция XIII-1) и фрагмент глутаминовой протеиназы (фракция XIII-2), аналогичный пептиду фракции XIV. Таким образом, MA A1 (так же как и в случае с BOSCP [7]) специфически взаимодействовал только с одним пептидом S-4.

Определение автоматическим методом полной или частичной последовательности пептидов S-3 — S-5, S-7 — S-9 и S-10 позволило определить примерно 70% первичной структуры рОSCP (см. ниже рис. 7).

В целом гидролиз рОSCP глутаминовой протеиназой прошел достаточно специфично. Все выделенные пептиды, кроме S-10, содержали в качестве С-концевого остатка глутаминовую кислоту. В соответствии со специфичностью действия фермента связи Glu-Pro (48—49), Glu-Val-Pro (115—117) не подверглись гидролизу. В последовательности Glu-Lys-Glu-Leu (36—39) гидролиз прошел только по второму остатку глутаминовой кислоты. Не наблюдалось отщепления дипептида в последовательности -Glu(Ile, Leu) (188—190). В результате неполного расщепления связи Glu-Gln (33—34) образовался пептид S-(2 + 3).

Недостающие данные о первичной структуре рОSCP наиболее быстро, на наш взгляд, могли быть получены из анализа аминокислотной последовательности пептидов ограниченного триптического гидролиза белка по остаткам аргинина. Как видно из табл. 1, следовало ожидать появления 9 пептидов ограниченного триптического гидролиза.

Так как полипептидная цепь рОSCP содержит одну свободную SH-группу (табл. 1), предварительно было осуществлено карбоксиметилирование белка иодуксусной кислотой. Химическую модификацию карбоксиметилированного белка цитраконовым ангидридом проводили при pH 8,5, поскольку при более низких pH среды данная защитная группа неустойчива. N-Концевой анализ показал, что модифицированы были все аминокислоты белка. Карбоксиметилированный и цитраконалированный рОSCP был подвергнут триптическому гидролизу. В качестве N-концевых аминокислотных остатков полученных пептидов были идентифицированы Phe, Tyr, Val, Ser, Leu, Gly, Ile, Ala, Glu.

Первичное разделение пептидов ограниченного триптического гидролиза вели методом гель-проникающей ВЭЖХ на колонке Ultropac TSK 2000 SW (рис. 4).

Анализ N-концевых аминокислот пептидов объединенных фракций (не приводится) показал, что только фракция II содержала пептид, достаточно чистый для определения его аминокислотной последовательности с помощью газофазного секвенатора. Фракция I представляла собой негидролизированный рОSCP, фракция VII не содержала пептидного материала.

Выделение индивидуальных децитраконалированных пептидов осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонках с носителем Nucleosil 300 5 C4, для фракции II (см. «Экспериментальную часть»), III (рис. 5), Nucleosil 7 C8 для фракций IV (рис. 6а), V (рис. 6б) и Nucleosil 7 C18 для фракции VI (см. «Экспериментальную часть»). Для удаления цитраконовой защиты перед проведением обращенно-фазовой хроматографии пептиды фракций III—V обрабатывали 50% уксусной кислотой, содержащей 6 М гуанидингидрохлорид. В общей сложности было выделено 7 индивидуальных пептидов из 9 образовавшихся при гидролизе рОSCP трипсином по остаткам аргинина (табл. 3).

Некоторые пептиды с одинаковым аминокислотным составом при хроматографии на колонке с обращенной фазой элюировались при различных концентрациях ацетонитрила. Причиной, вызывающей аномальное поведение таких пептидов, по-видимому, следует считать их частичную модификацию, происходящую спонтанно в процессе выделения и очистки. Как правило, таким аномальным поведением обладали пептиды, содержащие в своем составе остатки Tyr и/или Met.

Так как при изучении аминокислотной последовательности пептидов S-1—S-10,

выделенных из гидролизата рОСРР глутаминовой протеиназой, было определено примерно 70% первичной структуры этого белка (см. рис. 7), то для завершения работы по установлению первичной структуры рОСРР не было необходимости в определении полной аминокислотной последовательности всех пептидов, полученных при триптическом гидролизе белка. Для локализации большинства пептидов в молекуле рОСРР достаточно было данных по их аминокислотному составу и N-концевым аминокислотным остаткам и только в некоторых случаях (пептиды Т-3, Т-4, Т-5, Т-6) необходимо было определить их частичную или полную аминокислотную последовательность.

Из фракции Т-V (рис. 6б, табл. 3), представляющей собой смесь пептидов Т-1 и Т-5, N-концевыми аминокислотами которых являлись Phe и Leu соответственно, ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой не удалось выделить индивидуального пептида с N-концевым остатком Leu (пептид Т-5). Поскольку аминокислотная последовательность одного из пептидов (Т-1, N-концевая аминокислота — Phe) была установлена ранее при автоматическом секвенировании молекулы рОСРР, аминокислотную последовательность пептида Т-5 определяли на смеси двух пептидов. При этом после четырех циклов отщепления пептиды фракции Т-V прямо на фильтре секвенаторной ячейки обрабатывались флуорескаминном. Это приводило к тому, что в пептиде Т-1  $\alpha$ -аминогруппа Val<sup>5</sup> модифицировалась флуорескаминном. Такой модифицированный остаток не мог далее вступать в реакцию с фенилизотиоцианатом, и дальнейшая деградация этого пептида по Эдману прекращалась. В пептиде же Т-5 иминогруппа остатка Pro<sup>5</sup> не взаимодействовала с флуорескаминном, и он подвергался дальнейшей деградации. Таким образом, с помощью автоматического газофазного секвенатора была определена полная аминокислотная последовательность пептида Т-5. Секвенирование пептидов Т-5 и Т-6 дало возможность практически полностью определить аминокислотную последовательность утерянного ранее пептида S-6 (рис. 7).

Однако полученная информация не позволяла определить полную первичную структуру рОСРР, так как не была известна последовательность аминокислотных остатков 92—94 и 189—190 в полипептидной цепи белка. С-Концевая последовательность белка (остатки 189—190) была определена с помощью карбоксипептидазы Y как -He-Leu.

Информация, необходимая для завершения реконструкции полипептидной цепи белка, была получена при исследовании пептида ST. Этот пептид, соответствующий утерянному ранее пептиду S-6, был выделен из гидролизата немодифицированного рОСРР глутаминовой протеиназой с помощью ковалентной хроматографии на колонке с активированной тиол-сефарозой 4В. О количестве пептида, ковалентно связавшегося с носителем, судили по высвобождению 2-тиопиридона (молярный коэффициент поглощения  $7,06 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). В нашем случае оно составило 5 нмоль (80% от взятого в гидролиз белка). Снятие пептида с колонки осуществляли конкурентным вытеснением его  $\beta$ -меркаптоэтанолом. Затем пептид обессоливали с помощью гель-проникающей хроматографии высокого давления на колонке (7·600 мм) Ultropac TSK 2000 SW. Ручным методом Эдмана для пептида ST была определена последовательность первых четырех аминокислотных остатков Asn-Gly-Arg-Leu-, что позволило завершить установление полной аминокислотной последовательности исследуемого белка.

В целом гидролиз цитраконилированного рОСРР трипсином прошел специфично по пептидным связям, в образовании которых участвуют карбоксильные группы остатков аргинина. В соответствии со специфичностью фермента связь Arg-Pro (6—7) не была гидролизована. Пептиды Т-1 — Т-9 в сумме составляют полипептидную цепь молекулы белка.

На рис. 7 представлена первичная структура молекулы ОСРР H<sup>+</sup>-АТФ-азы митохондрий сердца свиньи. Белок содержит 190 аминокислотных остатков ( $M_r$  20 901) и имеет следующий аминокислотный состав: Asp — 4, Asn — 6, Thr — 11,



Ser — 19, Glu — 14, Gln — 5, Gly — 9, Pro — 8, Ala — 16, Met — 8, Val — 17, Cys — 1, Ile — 12, Leu — 21, Tyr — 5, Phe — 4, His — 1, Lys — 20, Arg — 9.

При идентификации остатков 118 и 124 полипептидной цепи рОSCP мы получили противоречивые данные, и нам не удалось их четко идентифицировать. По аналогии с бОSCP мы все-таки расположили в положении 118 остаток Cys, а в положении 124 — Ser. Однако не исключена полностью возможность того, что отнесение этих остатков может быть обратным (Cys<sup>124</sup>, Ser<sup>118</sup>) (рис. 7).

Сравнение первичных структур рОSCP и бОSCP показало, что эти белки обладают высокой степенью гомологии (93,2%), причем из имеющихся 13 замен 9 консервативны. Некоторые из выявленных замен либо входят в состав определенных ранее эпитопов для моноклональных антител, полученных против бОSCP [7] или рОSCP [10] (Gly<sup>43</sup> (бОSCP) — Ala<sup>43</sup> (рОSCP)), либо локализованы вблизи них (Met<sup>51</sup>, Leu<sup>55</sup>, Leu<sup>56</sup> (бОSCP) — Val<sup>51</sup>, Ile<sup>55</sup>, Met<sup>56</sup> (рОSCP)). Это, на наш взгляд, может служить прямым подтверждением выдвинутого ранее предположения [7], что ОSCP в составе митохондриальных H<sup>+</sup>-АТФ-азных комплексов, выделенных из разных организмов, может быть ответственным за иммунологические различия этих ферментных систем.

Строение иммунореактивного к МА А1 участка полипептидной цепи рОSCP показало, что в отличие от антигенной детерминанты бОSCP быка он содержит остаток Ala<sup>43</sup> вместо Gly<sup>43</sup> (рис. 7). Так как выше было показано, что МА А1 взаимодействует с рОSCP с заметно меньшей эффективностью, чем с бОSCP (рис. 1), можно сделать следующие выводы: 1) аминокислотный остаток 43 в полипептидной цепи бОSCP существен для формирования эпитопа против мкАТ А1; 2) введение метильной группы (CH<sub>3</sub>) вместо атома водорода в этот остаток вызывает заметное изменение в аффинности эпитопа к антителу.

Следует отметить также, что в работе [10] указывалось, что один из фрагментов бромцианового расщепления рОSCP, имеющий молекулярную массу 15 кДа и включающий в себя остатки 52—190, имел N-концевую аминокислотную последовательность Ala-Ala-Ser-Leu-Leu-(?)-Asn-. Как видно из рис. 7, пептид с такой N-концевой аминокислотной последовательностью может образоваться только при расщеплении бромцианом бОSCP, но ни в коем случае не рОSCP. Полипептидная цепь рОSCP в положении 51 содержит остаток Val, а не Met, как в случае бОSCP.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Worthington, США), протеиназу из *St. aureus* V8 (Miles, Англия), ацетонитрил (Merck, ФРГ), трифторуксусную кислоту (Pierce, США). Остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч.

Митохондрии из сердца свиньи выделяли по методу Крейна и соавт. [12], субмитохондриальные частицы — согласно [13]. рОSCP выделяли и хранили согласно Расселу и соавт. [11].

*Получение моноклональных антител* — см. [7].

*Твердофазный иммуоферментный анализ.* В каждую лунку 96-луночных планшет с плоским дном (Nunc, Дания) помещали 50—100 мкл 20 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 1—2 мкг белка или пептида, и инкубировали в течение ночи при 4° С. После трехкратной промывки планшета PBS (20 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, содержащий 0,15 М NaCl) в лунку вносили 200 мкл 3% BSA в TPBS (PBS, содержащий 0,1% Tween 20) и инкубировали 1 ч при 20° С. Затем планшеты 4 раза промывали TPBS, в лунку добавляли 100 мкл раствора МА А1 [7] в TPBS в разведении 1 : 100 (для белка) или 1 : 150 (для пептидов) и инкубировали 1,5 ч при 20° С. После 6-кратной промывки TPBS в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора конъюгата антимышиных IgG-антител и пероксидазы хрена (Bio-Rad, США) в разведении 1 : 250 в TPBS и инкубировали 1,5 ч при 20° С. Затем планшеты промывали 6 раз TPBS и 3 раза 50 мМ фосфат-цитратным буфером, рН 5,0, добавляли в каждую лунку по 50 мкл реакционной смеси, содержащей 0,04% о-фениленди-

амин (Sigma, США) и 0,003%  $H_2O_2$  в 50 мМ фосфат-цитратном буфере, pH 5,0. Реакцию останавливали добавлением в лунку 50 мкл 12,5%  $H_2SO_4$ . Оптическое поглощение измеряли при 492 нм на приборе Multiscan Titertek (Финляндия). Отрицательным контролем служили лунки с адсорбированным BSA.

*Гидролиз рОSCP протеиназой из St. aureus V8.* К 1,5 мл 0,1 М раствора  $NH_4HCO_3$ , pH 8,3, содержащего примерно 10 нмоль белка, добавляли фермент в соотношении 1 : 50 (по массе) и инкубировали 12 ч при 37° С. Протеолиз останавливали добавлением PMSF (Serva, ФРГ) до концентрации 1 мМ, после чего реакционную смесь лиофилизовали.

*Фракционирование смеси образовавшихся пептидов* проводили методом ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) с обращенной фазой Ultrosphere ODS (Beckman, США) (рис. 3). Примерно 10 нмоль образца наносили на колонку в виде раствора в исходном буфере (0,1% TFA, pH 2,0). Объем образца не превышал 100 мкл. Элюцию пептида осуществляли градиентом ацетонитрила в 0,1% TFA. Пептиды детектировали спектрофотометрически ( $\lambda$  216 нм). Для подбора оптимальных условий разделения ставили аналитические опыты с использованием 200—300 пмоль пептидного материала.

*Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS* проводили согласно Лэммли [14].

*N-Концевые аминокислотные остатки* белка и пептидов идентифицировали в виде дансильных производных, как описано в работе [15].

*Аминокислотный состав* белка и пептидов определяли на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

*Автоматическую деградацию* белка и пептидов осуществляли на секвенаторе фирмы Applied Biosystems, модель 477A, снабженном анализатором Pth-аминокислот, модель 120A (США). Отщепление и хроматографию Pth-аминокислот проводили по стандартным программам.

*Концентрацию* белка определяли по методу Брэдфорд [16], используя BSA в качестве стандарта.

*Карбоксиметилирование OSCP* моноiodуксусной кислотой осуществляли согласно методике работы [17], цитракоилирование — согласно [18].

*Ограниченный триптический гидролиз модифицированного рОSCP.* Модифицированный цитраконовым ангидридом карбоксиметилированный рОSCP (50 нмоль) растворяли в 4 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, pH 8,3. Трипсин растворяли в том же буфере и добавляли к раствору белка в весовом соотношении 1 : 50. Триптический гидролиз проводили при перемешивании в термостатированной ячейке (4 ч, 37° С). Все растворы предварительно дегазировали. Гидролиз останавливали добавлением PMSF. Гидролизат лиофилизовали и хранили при -4° С.

*Разделение триптических пептидов.* Предварительное разделение пептидов ограниченного триптического гидролиза проводилось методом гель-фильтрации на колонке (7 × 600 мм) Ultropac TSK 2000 SW (LKB, Швеция) (рис. 4). Полученные фракции пептидов собирали и лиофилизовали. О гомогенности пептидов каждой фракции судили по данным N-концевого аминокислотного анализа.

Для снятия цитракоильной защиты пептиды фракций II—V растворяли в 1 мл 50%  $CH_3COOH$ , содержащей 6 М гуанидин · HCl, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре.

Для выделения индивидуальных пептидов примерно 200—250 мкл такого раствора фракций III, IV и V наносили на колонку с обращенной фазой, уравновешенную 0,1% TFA. Пептиды с колонки элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила (0—70%) в 0,1% TFA. Скорость элюции 0,5 мл/мин. Контроль за выходом пептидов вели спектрофотометрически при 226 нм. Пептиды фракции III разделяли на колонке (4,6 × 250 мм) MN ET Nucleosil 300 5 C4 (Macherey-Nagel, ФРГ) (рис. 5), фракций IV, V — на колонке (4,6 × 250 мм) Nucleosil 7 C8 (рис. 6а, б).

Обессоливание, а также одновременное концентрирование пептида T-II про-

водили на колонке (4,6 × 250 мм) MN ET Nucleosil 300 5 C4, уравновешенной 0,1% TFA в вышеуказанных условиях.

Пептиды из фракции VI выделяли с помощью ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) Nucleosil 7 C18 в тех же условиях.

Индивидуальность выделенных пептидов подтверждали с помощью N-концевого анализа.

*Выделение пептида ST.* Гидролиз рОSCP протеиназой из *St. aureus* V8 проводили в термостатированной ячейке при 37° С. Белок (6 нмоль) растворяли в 2 мл 0,1 М аммоний-ацетатного буфера, рН 7,2. Глутаминовую протеиназу растворяли в этом же буфере и добавляли к белку в весовом соотношении 1 : 20. Все растворы предварительно дегазировали. Раствор инкубировали при перемешивании в течение 8 ч, гидролиз останавливали добавлением PMSF. Полученный препарат лиофилизировали.

Леофилизированный гидролизат растворяли в 5 мл 0,1 М трис-НСI-буфера (рН 7,0), содержащего 0,1 М NaCl и 1 мМ EDTA (буфер А). Затем наносили на колонку (1 × 1 см) с активированной тиол-сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция), предварительно уравновешенную буфером А. Все буферные растворы тщательно деаэрировали. Нанесение осуществляли в течение 3 ч с помощью рециклинга. Скорость нанесения 0,5 мл/мин. Контроль за нанесением вели спектрофотометрически, определяя с помощью проточного денситометра оптическое поглощение прокачиваемого через колонку раствора при λ 343 нм. Затем колонку промывали буфером А до нулевого поглощения и элюировали пептид ST буфером А, содержащим 0,1 М β-меркаптоэтанол. Контроль за выходом пептида вели при λ 226 нм. Полученный пептид ST обессоливали, проверяли его гомогенность с помощью N-концевого аминокислотного анализа, лиофилизировали и хранили при -4° С.

Авторы искренне благодарны Г. И. Белогрудову за помощь в проведении иммунохимических экспериментов, Ю. В. Смирнову за помощь в выполнении аминокислотных анализов белка и пептидов, Н. И. Хорошиловой за определение N-концевых аминокислот и N-концевых аминокислотных последовательностей пептидов, Т. И. Муравьевой за помощь в выделении митохондрий и рОSCP.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacLennan D. H., Tzagaloff A. // *Biochemistry*. 1968. V. 7. № 4. P. 1603—1609.
2. Joshi S., Huang Y. G. // *Biochim. et biophys. acta*. 1991. V. 1067. № 2. P. 255—258.
3. Penin F., Archinard P., Moradi-Ameli M., Godinot C. // *Biochim. et biophys. acta*. 1985. V. 810. № 3. P. 346—353.
4. Белогрудов Г. И., Ильина Е. Ф., Гринкевич В. А., Модянов Н. Н. // *Биол. мембраны*. 1988. Т. 5. № 7. С. 677—687.
5. Penin F., Deleage G., Godinot C., Gautheron D. C. // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. V. 852. № 1. P. 55—67.
6. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Trubetskaya O. E., Nazimov I. V., Hundal T., Ernster L. // *FEBS Lett*. 1984. V. 166. № 1. P. 19—22.
7. Белогрудов Г. И., Кан Е. С., Ильина Е. Ф., Муравьева Т. И., Гринкевич В. А. // *Биол. мембраны*. 1990. Т. 7. № 3. С. 213—221.
8. Белогрудов Г. И., Гринкевич В. А., Модянов Н. Н. // *Биол. мембраны*. 1988. Т. 5. № 5. С. 435—458.
9. Archinard P., Godinot C., Comte J., Gautheron D. C. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 11. P. 3397—3404.
10. Godinot C., Colorio S., Cretin F., Incauragarat B., Deleage G., Roux B. // *Biochemie*. 1989. V. 71. № 7. P. 917—929.
11. Russel L. K., Kirkley S. A., Kleyman T. R., Chan S. H. P. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 73. № 2. P. 434—443.
12. Crane F. L., Glenn G., Green D. E. // *Biochim. et biophys. acta*. 1956. V. 22. № 3. P. 475—481.
13. Fesseden J. M., Racker E. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. № 10. P. 2483—2487.
14. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5229. P. 680—685.

15. Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Потапенко Н. А., Гринкевич Х. А., Кравченко З. Б., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А.//Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 12. С. 1757—1774.
16. Bradford M. M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 2. P. 248—254.
17. Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S.//J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 10. P. 2413—2420.
18. Atassi M. Z., Habeeb A. F. S. A.//Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 546.

Поступила в редакцию  
21.III.1994

V. A. Grinkevich\*, V. G. Zaitsev, P. F. Pavlov\*,  
I. V. Nazimov, E. F. Iljina

### INVESTIGATION OF THE STRUCTURE OF OSCP OF H<sup>+</sup>-ATPase FROM PIG HEART MITOCHONDRIA

M. M. Schemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow;

\* Department of Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Key words: mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase, oligomycin sensitivity conferring protein, primary structure, epitope sequence, comparative analysis.

Unmodified and citraconilated OSCP of the pig heart mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase were hydrolysed by proteinase from *Staphylococcus aureus* V8 and trypsin, respectively. To purify the individual peptides, various types of HPLC and covalent chromatography on SH-Sepharose were used. By the automatic Edman method complete or partial amino acid sequences of the peptides obtained were determined, thus allowing for the reconstruction of the primary structure of pig OSCP.

A linear antigenic determinate recognizable by A1 monoclonal antibody against bovine OSCP, was localized. Studies showed Gly<sup>43</sup> residue (bovine OSCP) to be replaced by Ala<sup>43</sup> (pig OSCP), which is responsible for a decrease of the affinity of the monoclonal antibody A1 to pig OSCP.

Comparative analysis of primary structures of bovine and pig OSCP was carried out.