



УДК 547.962+577.156.1+577.23

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ 20S,  
22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА P-450  
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ**

**I. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА  
ГЛОБУЛЯРНОГО СТРОЕНИЯ ЦИТОХРОМА P-450 И ЕГО СПЕКТРАЛЬНО  
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ФОРМ**

**Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г.,  
Шкуматов В. М., Чащин В. Л.**

*Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

Протеолиз цитохрома P-450 трипсином приводит к образованию сравнительно устойчивых к дальнейшему действию фермента двух фрагментов с  $M$  27 000 и 22 000. Увеличение времени трипсинолиза до 24 ч или увеличение количеств трипсина до соотношения фермент-субстрат, равного 1:10, приводит к исчезновению фрагмента с  $M$  22 000 и появлению фрагмента с  $M$  14 000. При действии на цитохром P-450 химотрипсина, термолизина и протеазы из *Staphylococcus aureus* V8, несмотря на исчезновение полосы нативного белка, не наблюдается образования устойчивых к действию этих ферментов определенных фрагментов. Протеолиз цитохрома P-450, находящегося в виде октамера, комплексов с  $M$  115 000 и мономера, не показал изменений в характере и кинетике гидролиза этих форм. В работе сравниваются результаты действия протеолитических ферментов на цитохром P-450, находящийся как в свободном виде, так и в комплексе с субстратом, в карбоксикомплексе и неактивной форме (цитохром P-420). Найдены различия в характере и кинетике протеолиза, полученного различными способами цитохрома P-420.

20S,22R-холестерингидроксилирующий цитохром P-450 (далее цитохром P-450) в митохондриях клеток коры надпочечников совместно с адренодоксинредуктазой и адренодоксином катализирует превращение холестерина в прегненолон [1, 2]. Указанная реакция протекает в каталитическом центре цитохрома P-450, содержащего в качестве простетической группы протогем IX. В этом же центре происходит присоединение и активация молекулярного кислорода [3], в то время как адренодоксинредуктаза и адренодоксин образуют цитохром P-450 — редуктазный комплекс, осуществляющий транспорт электронов от NADPH к цитохрому P-450.

Недавно было показано [4] наличие специфического комплекса между адренодоксином и цитохромом P-450, а также продемонстрирована самосборка 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы из отдельных ее компонентов [5]. Поскольку указанная система локализована во внутренней мембране митохондрий, цитохром P-450 является мембраносвязанным белком и для его извлечения требуются специальные условия [6, 7].

Таким образом, на молекуле цитохрома P-450 предположительно можно выделить следующие функционально важные участки:

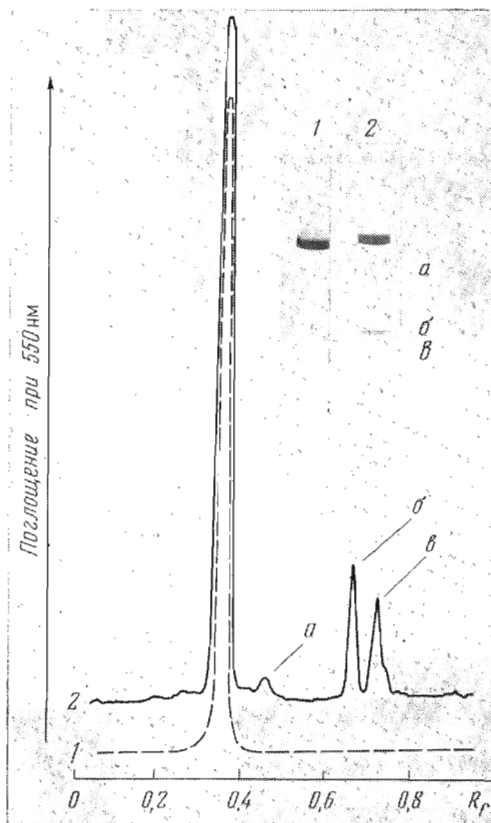


Рис. 1. Электрофореграммы цитохрома Р-450 непосредственно после выделения (1) и через две недели хранения при 4° (2). Стрелками указаны образующиеся фрагменты

а) каталитический центр с входящим в его состав протогемом IX; б) «площадку» связывания цитохрома Р-450 с электронтранспортным белком аденодоксином; в) участок контакта цитохрома Р-450 с митохондриальной мембраной.

Для выяснения механизма действия цитохрома Р-450 необходимо иметь сведения о расположении на его молекуле перечисленных участков.

Ценным методом, позволяющим получить такие сведения, является ограниченный протеолиз. Этот метод дает возможность выяснить и глобулярное строение белка, поскольку компактные глобулярные участки в отличие от развернутых резистентны к протеолизу и могут быть получены после протеолиза в изолированном виде.

В настоящей работе метод ограниченного протеолиза был применен в целях изучения полиглобулярного строения цитохрома Р-450, выяснения его доступности действию протеолитических ферментов и выяснения характера протеолиза спектрально различающихся форм цитохрома Р-450.

*1. Характер и кинетика протеолиза цитохрома Р-450 при действии трипсина, химотрипсина, термолизина и протеазы из Staphylococcus aureus V8.* Предположение о полиглобулярном строении цитохрома Р-450 возникло из наблюдений, сделанных нами при анализе отдельных образцов высокоочищенного цитохрома Р-450 в процессе его хранения. На рис. 1 представлены электрофореграмма, полученная для высокоочищенного препарата цитохрома Р-450 непосредственно после его выделения, и электрофореграмма этого же образца белка после хранения в течение двух недель

при 4°. Различия электрофореграмм могли быть объяснены только наличием следовых количеств клеточных протеиназ в препарате белка.

При выполнении настоящей работы нами использовался цитохром P-450, гомогенный, по данным гель-электрофореза и N-концевого анализа, и выделенный согласно [4], с некоторыми модификациями.

Ранее отмечалось, что цитохром P-450 в буферах без добавлений детергентов находится в полимерном состоянии,  $M$  800 000 [8] и 400 000 [9].

Во избежание влияния процессов агрегации на характер и кинетику протеолиза цитохрома P-450 вначале действию протеолитических ферментов подвергали цитохром P-450, находящийся в 0,05 M натрий-фосфатном буфере (pH 7,2), содержащем 1 M NaCl+0,3% холата натрия. В этих условиях цитохром P-450 практически полностью находится в виде мономера [9].

Для протеолиза был взят цитохром P-450 в виде комплекса с холестерином (высокоспиновая форма цитохрома P-450 [10]).

При инкубировании цитохрома P-450 с трипсином (соотношение фермент — субстрат 1:50) до 30 мин происходит полное исчезновение полосы нативного белка с появлением двух фрагментов:  $\Phi_1$  ( $M$  27000) и  $\Phi_2$  ( $M$  22000) (рис. 2a). Для определения молекулярных весов образующихся фрагментов строили калибровочные графики со стандартными белками.

Используя различную концентрацию полиакриламидного геля, мы нашли молекулярный вес цитохрома P-450 равным 49 000 в отличие от ранее приведенного — 46 000 [11].

При увеличении времени трипсинолиза до 24 ч наблюдается практически полный гидролиз фрагмента  $\Phi_2$  с образованием фрагмента  $\Phi_3$  ( $M$  14 000) (рис. 2a). На рис. 2б показано изменение в ходе трипсинолиза молярных количеств цитохрома P-450 и фрагментов  $\Phi_1$ ,  $\Phi_2$  и  $\Phi_3$ . Видно, что за 24 ч несколько уменьшается и количество фрагмента  $\Phi_1$ . Для устранения побочных явлений время протеолиза цитохрома P-450 было сокращено до 3 ч. Это было достигнуто путем увеличения соотношения фермент — субстрат до 1:10. Рис. 3a показывает характер трипсинолиза цитохрома P-450 за 3 ч при соотношении 1:10, а рис. 3б — изменения в ходе трипсинолиза молярных количеств белка и фрагментов при том же соотношении фермента и субстрата. Видно, что появление фрагмента  $\Phi_3$  происходит в результате дальнейшего гидролиза фрагмента  $\Phi_2$ . Необходимо отметить в этом случае более высокие конечные выходы фрагментов  $\Phi_1$  и  $\Phi_3$  по сравнению с пролонгированным трипсинолизом.

N-Концевой анализ продуктов трипсинолиза цитохрома P-450 при соотношении фермент — субстрат 1:50 показал, что за 5 мин появляются такие аминокислоты, как Ile, Asp, Leu, Ala, за 30 мин — Ile, Leu, Asp, Ala, Tyr, Gly, Thr, Glu и, наконец, за 60 мин практически весь набор аминокислот. Несмотря на высокие молярные количества образующихся фрагментов (до 0,8, см. рис. 2), данные N-концевого анализа указывают на возможность протекания более глубокого расщепления небольшого количества цитохрома P-450 до низкомолекулярных фрагментов, не детектируемых при гель-электрофорезе.

Углубленной деградацией небольшой части цитохрома P-450 при трипсинолизе до низкомолекулярных фрагментов мы объясняем и наблюдаемое уменьшение интенсивности поглощения в процессе гидролиза цитохрома P-450 в максимуме полосы Core ( $\lambda_{\text{макс}}$  393 нм), и связанное с этим уменьшение спектрофотометрического индекса  $D_{393}/D_{280}$ . Одновременно с уменьшением интенсивности поглощения при 393 нм в ходе трипсинолиза наблюдается появление в абсолютном спектре поглощения карбоксикомплекса компонента с  $\lambda_{\text{макс}}$  около 420 нм. Эти изменения не превышали 20–25% за 30 мин трипсинолиза при соотношении фермент — субстрат 1:50.

Углубленный протеолиз цитохрома P-450 и наблюдаемые при этом спектральные изменения более детально будут рассмотрены в следующем сообщении.

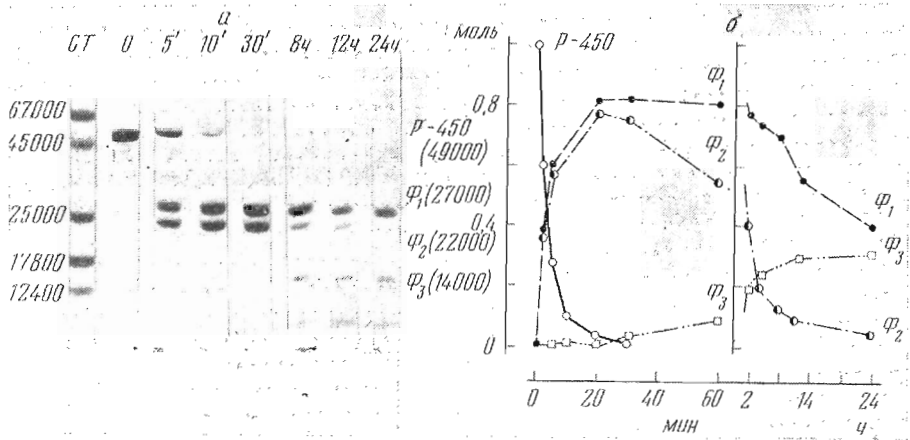


Рис. 2. Характер и кинетика протеолиза цитохрома Р-450 трипсином (соотношение фермент – субстрат 1 : 50; 12% полиакриламидный гель): а – электрофоретический анализ продуктов трипсинолиза во времени, б – изменение в процессе трипсинолиза Р-450 и образующихся фрагментов. СТ – стандартные белки

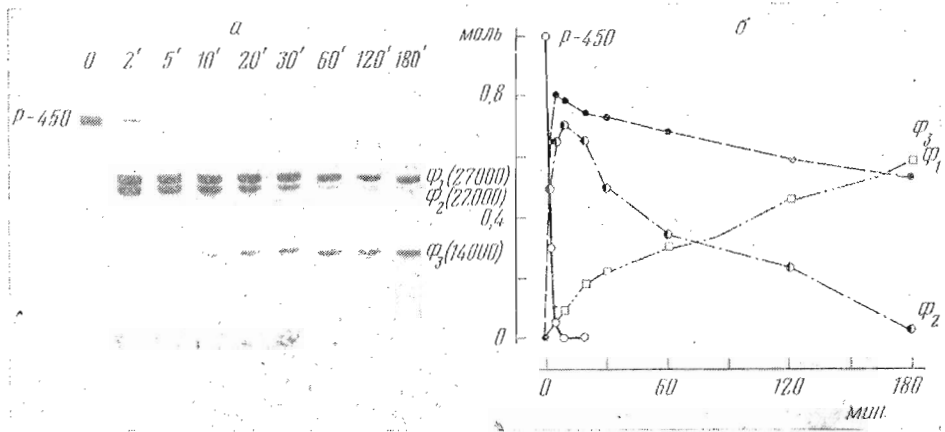


Рис. 3. Протеолиз цитохрома Р-450 трипсином (соотношение фермент – субстрат 1 : 10; 15% полиакриламидный гель): а – электрофоретический анализ продуктов трипсинолиза во времени, б – изменение в процессе трипсинолиза содержания цитохрома Р-450 и образующихся фрагментов

Сумма молекулярных весов фрагментов  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ , равная в пределах точности измерений молекулярному весу цитохрома Р-450, и значительная устойчивость фрагментов к действию трипсина позволяют сделать вывод, что эти фрагменты представляют собой глобулярные участки молекулы цитохрома Р-450, связанные небольшой петлей полипептидной цепи, содержащей остатки основных аминокислот. Для обнаружения в этой петле других аминокислот, а также для определения иных, легко доступных действию протеолитических ферментов участков полипептидной цепи нативного цитохрома Р-450 был осуществлен его гидролиз химотрипсином, термוליзином и протеазой из *S. aureus* V8.

При действии на цитохром Р-450 химотрипсина (соотношение фермент – субстрат 1:50) происходит медленное исчезновение полосы нативного белка без образования существенных количеств промежуточных фрагментов. Слабоинтенсивные фрагменты, соответствующие по молекулярному весу фрагментам  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ , были зафиксированы только после 4 ч

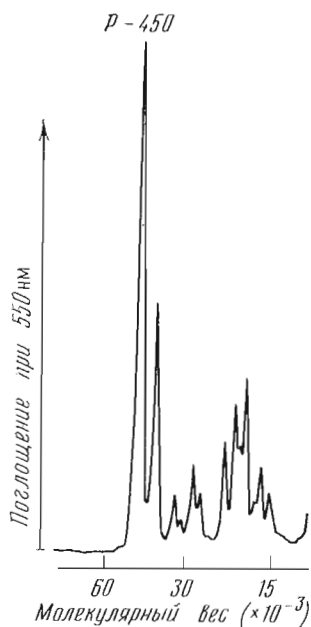


Рис. 4

Рис. 4. Электрофореграмма продуктов протеолиза цитохрома P-450 протеазой из *S. aureus* V8 после 19 ч инкубации

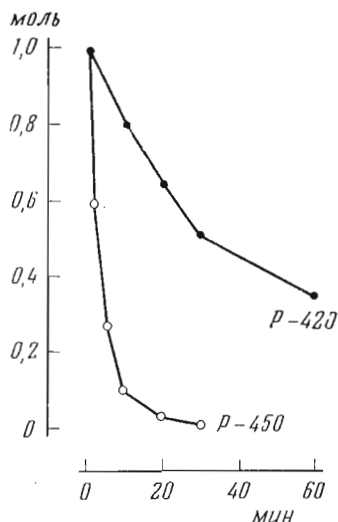


Рис. 5

Рис. 5. Кинетика трипсинолиза цитохрома P-450 и цитохрома P-420, полученного температурной инактивацией

гидролиза. Их образование, по-видимому, связано с неспецифическим действием химотрипсина.

При действии на цитохром P-450 термолизина также не наблюдается образования крупных фрагментов, а полоса нативного белка сохраняется еще более длительное время (до 20 ч).

Интересным является характер протеолиза цитохрома P-450 протеазой из *S. aureus* V8 (рис. 4). Видно, что за 19 ч протеолиза не происходит полного исчезновения полосы нативного белка, а также не наблюдается образования фрагментов  $\Phi_1$ ,  $\Phi_2$  и  $\Phi_3$ . Согласно электрофореграммам, наблюдается появление значительного числа фрагментов с довольно большим молекулярным весом. На наш взгляд, образование этих фрагментов происходит в результате углубленной деградации цитохрома P-450, и это не позволяет сделать заключение о существовании наиболее доступных действию протеазы из *S. aureus* V8 пептидных связей с вовлечением остатков глутаминовой кислоты.

На основании полученных результатов по действию на цитохром P-450 трипсина, химотрипсина, термолизина и протеазы из *S. aureus* V8 можно сделать вывод, что, кроме трипсина, ни один из примененных ферментов не гидролизует молекулу цитохрома P-450 на фрагменты  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ . Этот факт указывает на то, что в петле полипептидной цепи, связывающей две глобулы, наиболее доступными являются остатки основных аминокислот.

Однако такая модель структурной организации цитохрома P-450 в некоторой степени противоречит данным, полученным из пролонгированного трипсинолиза цитохрома P-450 (или протеолиза при увеличенном количестве трипсина в инкубационной среде), поскольку при этом наблюдается дальнейшее расщепление фрагмента  $\Phi_2$  до фрагмента  $\Phi_3$ . Возможны два альтернативных варианта образования фрагмента  $\Phi_3$ . Первый состоит в том, что фрагмент  $\Phi_2$  содержит два глобулярных участка с  $M$  14 000 и 8000, соединенных между собой трудно доступным действию трипсина

участком полипептидной цепи. Второй — в том, что фрагмент  $\Phi_2$  включает глобулярный участок с  $M$  14 000, тогда как остальная его часть, являясь развернутой, гидролизуете при пролонгированном трипсинолизе с образованием в конечном итоге фрагмента  $\Phi_3$ .

При наличии развернутого участка в полипептидной цепи фрагмента  $\Phi_2$ , вероятно, был бы возможен протеолиз по этому месту при действии других протеолитических ферментов. В этом случае в результате появления небольших пептидных фрагментов должна была бы образовываться диффузная полоса белка. Однако этого не происходит. С другой стороны, при пролонгированном трипсинолизе не наблюдается образования фрагмента с  $M$  8000. Этот результат можно было объяснить быстрой углубленной деградацией фрагмента  $M$  8000 до низкомолекулярных продуктов.

Эти соображения заставили нас более детально рассмотреть пути образования фрагмента  $\Phi_3$  при кратковременном трипсинолизе цитохрома P-450. Было обнаружено, что на начальных стадиях трипсинолиза фрагмент  $\Phi_3$  представлен слабоинтенсивной полосой при гель-электрофорезе. При этом между полосой фрагмента  $\Phi_3$  и фрагмента  $\Phi_2$  присутствует ряд слабоинтенсивных фрагментов, при дальнейшем трипсинолизе которых образуется интенсивная полоса фрагмента  $\Phi_3$ .

В этой связи нам кажется наиболее вероятным, что молекула цитохрома P-450 состоит из истинно глобулярного участка, обозначенного как фрагмент  $\Phi_1$ , и фрагмента  $\Phi_2$ , представляющего собой сочетание глобулярного участка  $\Phi_3$  ( $M$  14 000) и труднодоступной действию протеолитических ферментов (химотрипсина, термоллизина и указанной выше протеазы) развернутой части полипептидной цепи.

*2. Действие протеолитических ферментов на октамер, комплекс с  $M$  115 000 и мономер цитохрома P-450.* Ранее нами было сообщено [9], что в среде без детергентов (0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2) цитохром P-450 находится в виде октамера с  $M$  400 000. Добавление к указанному буферу твина 80 до концентрации 0,3% приводит к деагрегации октамера до комплексов с  $M$  115 000. И наконец, в среде 1 М NaCl + 0,3% холата натрия + 0,05 М натрий-фосфатный буфер цитохром P-450 находится в виде мономера.

Возникает вопрос: каким образом молекулы цитохрома P-450 ориентированы в октамере? На наш взгляд, ценная информация о такой ориентации могла быть получена при сравнении результатов протеолиза цитохрома P-450 в условиях его существования в виде мономера, комплексов с  $M$  115 000 и октамера.

Проведенный кинетический анализ изменений молярных количеств цитохрома P-450 и фрагментов  $\Phi_1$ ,  $\Phi_2$  и  $\Phi_3$  при трипсинолизе белка в присутствии 0,3% твина 80 в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, с использованием различных соотношений фермент — субстрат показал полное совпадение полученных данных с результатами трипсинолиза цитохрома P-450 в 1 М NaCl + 0,3% холата натрия.

Эти данные позволили нам сделать вывод, что степень агрегации мономера цитохрома P-450 не оказывает влияния на доступность действию трипсина петли полипептидной цепи, связывающей отдельные глобулярные участки цитохрома P-450. Таким образом, указанные участки при агрегации цитохрома P-450 оказываются экспонированными в раствор.

Химотрипсинолиз цитохрома P-450 в рассмотренных выше условиях в целом остается тем же, что и химотрипсинолиз его в деагрегирующих условиях, однако при агрегации цитохрома P-450 его устойчивость к действию химотрипсина несколько возрастает. Вероятно, это связано с тем, что в деагрегированном белке гидролиз протекает по остаткам гидрофобных аминокислот, которые при отсутствии детергента вовлечены в образование агрегатов.

*3. Действие протеолитических ферментов на спектрально различающиеся формы цитохрома P-450.* В работе [4] указано, что в отличие от

цитохрома Р-450 цитохром Р-420, образующийся из-за частичной денатурации при выделении цитохрома Р-450, не вступает в комплексообразование с электронтранспортным белком аденодоксином. Поэтому можно высказать предположение о невозможности его восстановления цитохром Р-450 — редуктазным комплексом. Показанная в работах [5, 9] самосборка 20S, 22R-холестерингидроксилирующей системы подтвердила предположение о необходимости комплексообразования между ее отдельными компонентами для проявления функциональной активности.

С другой стороны, в работе [9] мы сообщили, что, несмотря на комплексообразование цитохрома Р-450 с аденодоксином, его восстановление в отсутствие субстрата цитохром Р-450 — редуктазным комплексом не происходит. Необходимый транспорт электронов в системе можно инициировать только при добавлении к ней холестерина. При этом восстановление цитохрома Р-450 коррелирует с превращением низкоспиновой формы в высокоспиновую.

Образование указанных спектрально различающихся форм цитохрома Р-450 в большей мере обусловлено конформационными изменениями, происходящими в районе каталитического центра цитохрома Р-450. Однако не исключена возможность и более глубоких структурных перестроек молекулы белка в целом. С целью выяснения таких возможных изменений в структурной организации молекулы цитохрома Р-450 было решено сравнить кинетику и характер протеолиза высокоспиновой и низкоспиновой форм цитохрома Р-450, карбоксикомплекса высокоспиновой формы, цитохрома Р-420, полученного температурной инактивацией, и цитохрома Р-420, полученного при рН 10.

Поскольку степень полимеризации не оказывает влияния на характер протеолиза цитохрома Р-450, данная часть работы проводилась в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2, без добавлений детергентов.

Электрофоретические картины продуктов трипсинолиза, полученные после 30 мин гидролиза фермент-субстратного комплекса цитохрома Р-450, свободного от субстрата цитохрома Р-450 и карбоксикомплекса высокоспиновой формы, практически совпадают. Кинетический анализ трипсинолиза показывает меньшие молярные количества образующихся фрагментов  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$  для низкоспиновой формы цитохрома Р-450 и карбоксикомплекса. Поскольку скорость убывания полосы нативного белка во всех случаях сравнима, можно сделать вывод о более выраженной углубленной деградации для низкоспиновой формы и карбоксикомплекса.

При трипсинолизе цитохрома Р-420, полученного температурной инактивацией, не было выявлено заметных количеств каких-либо фрагментов, устойчивых к дальнейшему протеолизу. В этом случае на электрофореграммах наблюдали только исчезновение полосы белка. Следует отметить, что для цитохрома Р-420 наряду с общим увеличением его доступности действию трипсина происходит экранирование ранее легко гидролизуемого в цитохроме Р-450 участка полипептидной цепи, связывающего фрагменты  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ . Этот вывод сделан из сравнения скоростей исчезновения на электрофореграммах полос цитохрома Р-450 до и после температурной инактивации (рис. 5).

Полностью отличающаяся от вышерассмотренной картина наблюдалась при трипсинолизе рН-индуцированного цитохрома Р-420 (рис. 6). Так, уже на первых минутах протеолиза помимо фрагментов  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$  происходило образование фрагмента  $\Phi_0$  (обозначенного так во избежание изменения ранее установленной нумерации). На приведенных электрофореграммах видны две диффузные полосы в районе молекулярных весов 16 000 и 11 000. Молекулярный вес фрагмента  $\Phi_0$  равен 38 000. Кинетический анализ молярных количеств цитохрома Р-420 и образующихся в ходе трипсинолиза фрагментов позволил сделать ряд предварительных выводов: на начальных стадиях протеолиза не наблюдается предпочтительного образования одного фрагмента или группы фрагментов и, по-видимому, фрагмент  $\Phi_0$  и

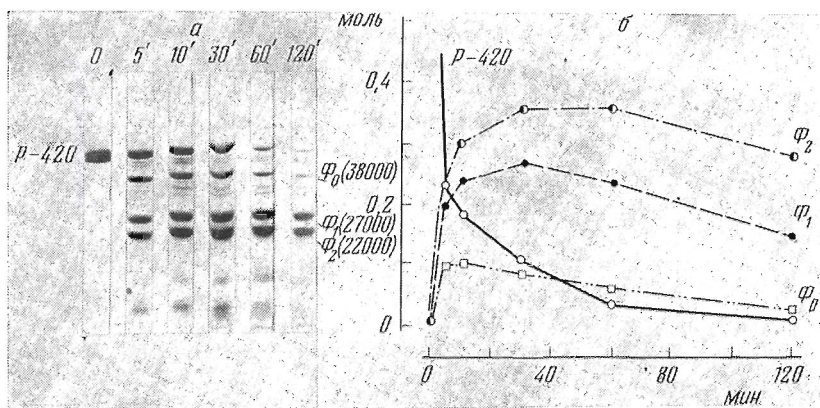


Рис. 6. Трипсинолиз цитохрома P-420, полученного рН-инактивацией: а — электрофотограммы продуктов трипсинолиза во времени, б — изменение в процессе трипсинолиза цитохрома P-420 и образующихся фрагментов

фрагменты  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$  образуются параллельными путями; в отличие от трипсинолиза нативного цитохрома P-450 происходит более значительное накопление фрагмента  $\Phi_2$  по сравнению с фрагментом  $\Phi_1$ ; уменьшение полосы белка происходит быстрее, чем для цитохрома P-420, полученного температурной инактивацией, однако не в такой степени, как для трипсинолиза нативного цитохрома P-450. Следовательно, в рН-индуцированном цитохроме P-420 участок полипептидной цепи между фрагментами  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$  оказывается менее доступным действию трипсина. Образование при трипсинолизе фрагмента  $\Phi_0$  можно объяснить появлением в рН-индуцированном цитохроме P-420 дополнительной петли полипептидной цепи, доступной действию трипсина.

Поскольку  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$  являются фрагментами, в сумме охватывающими, по-видимому, всю молекулу цитохрома P-450, вновь образованная петля, доступная действию трипсина, должна быть локализована в одном из этих фрагментов. В этом случае можно предположить, что в состав фрагмента  $\Phi_0$  входит один из фрагментов ( $\Phi_1$  или  $\Phi_2$ ) в негидролизованном виде, а также один из этих фрагментов, расщепленный по дополнительной петле полипептидной цепи и, таким образом, имеющий меньший молекулярный вес. Тогда гидролиз фрагмента  $\Phi_0$  должен проходить с образованием либо фрагмента  $\Phi_1$ , либо фрагмента  $\Phi_2$  и с освобождением части одного из этих фрагментов. Однако наличие на электрофотограммах фрагментов  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$  свидетельствует о параллельном расщеплении цитохрома P-420 до указанных фрагментов по схеме, рассмотренной для трипсинолиза нативного белка.

При реализации рассмотренных выше двух путей расщепления рН-индуцированного цитохрома P-420 следует ожидать, что один из фрагментов должен накапливаться как по первому, так и по второму пути. В то же время молярное количество оставшегося фрагмента будет занижено из-за образования фрагмента  $\Phi_0$  и его последующего гидролиза.

Данные кинетического анализа указывают, что дополнительный, доступный действию трипсина участок полипептидной цепи появляется во фрагменте  $\Phi_1$ . Этим и объясняется наличие его меньших молярных количеств по сравнению с фрагментом  $\Phi_2$ . Кроме того, становится понятным тот факт, что фрагмент с  $M$  16 000 является частью фрагмента  $\Phi_1$ , образующейся при гидролизе фрагмента  $\Phi_0$  с освобождением фрагмента  $\Phi_2$ , а фрагмент с  $M$  11 000 появляется при гидролизе рН-индуцированного цитохрома P-420 до фрагмента  $\Phi_0$ .

Так как при химотрипсинолизе цитохрома P-450 не наблюдается образования фрагментов  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ , то с целью локализации во вновь образован-



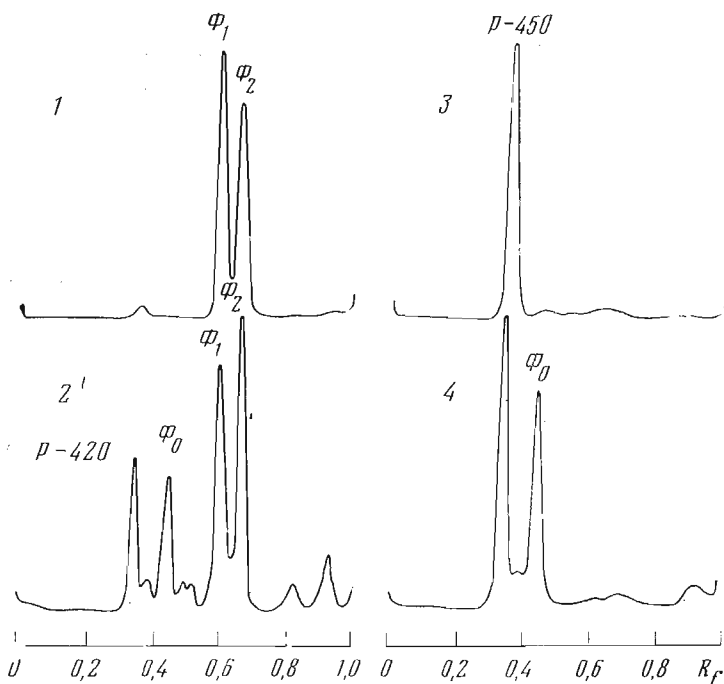


Рис. 7. Сравнение характера протеолиза нативного цитохрома P-450 и цитохрома P-420, полученного рН-инактивацией: трипсинолиз цитохрома P-450 (1), трипсинолиз цитохрома P-420 (2), химотрипсинолиз цитохрома P-450 (3), химотрипсинолиз цитохрома P-420 (4)

ном участке полипептидной цепи аминокислот, образующих пептидные связи, гидролизуемые химотрипсином, было решено провести химотрипсинолиз рН-индуцированного цитохрома P-420. На рис. 7 представлены электрофореграммы, полученные через 30 мин протеолиза в идентичных условиях цитохрома P-450 и цитохрома P-420 трипсином и химотрипсином при соотношении фермент — субстрат 1:50. Эти электрофореграммы наиболее наглядно показывают изменения в строении молекулы цитохрома P-450 при его рН-индуцированном переходе в цитохром P-420. Видно, что химотрипсинолиз рН-индуцированного цитохрома P-420 практически полностью приводит к образованию фрагмента с молекулярным весом, соответствующим фрагменту  $\Phi_0$ .

Таким образом, превращение цитохрома P-450 в цитохром P-420 может осуществляться либо с разрыхлением отдельных глобулярных участков молекулы белка, сопровождающимся повышением общей доступности цитохрома P-450 действию протеолитических ферментов (температурная инактивация), либо с появлением дополнительной петли полипептидной цепи во фрагменте  $\Phi_1$ , гидролизуемой трипсином и химотрипсином (рН-индуцированный цитохром P-420).

В заключение данной работы можно отметить, что появление фрагментов, соответствующих фрагментам  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ , при хранении высокоочищенных препаратов цитохрома P-450, по-видимому, вызвано действием клеточной протеиназы, обладающей сходной с трипсином субстратной специфичностью. Фрагмент с молекулярным весом, соответствующим фрагменту  $\Phi_0$ , образуется, очевидно, в результате частичной денатурации цитохрома P-450 при его хранении.

## Экспериментальная часть

В работе были использованы трипсин, химотрипсин, термолизин, набор белков-стандартов для определения молекулярного веса MS-11 (Serva, ФРГ), протеаза из *S. aureus* V8 (Miles, Англия). Цитохром P-450 выделяли как описано ранее [4]. Низкоспиновую форму цитохрома P-450 получали согласно [9], а карбоксикомплекс — по методу [12].

*Протеолиз цитохрома P-450* проводили при 20° в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, в этом же буфере, содержащем 1 М NaCl + 0,3% хлорида натрия или 0,3% твин 80. Во всех случаях, кроме специально оговоренных, использовали соотношение фермент — субстрат, равное 1:50. Аликвоты для анализа отбирали по 50 мкл и добавляли к 10 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия, содержащего 25% меркаптоэтанола, и далее кипятили 5—10 мин. Электрофорез проводили по методу [13]. Для точной оценки молекулярных весов использовали 7,5; 12 и 15% концентрации полиакриламидного геля. Использовали следующие белки-стандарты: бычий сывороточный альбумин ( $M$  67 000), яичный альбумин ( $M$  45 000), химотрипсиноген ( $M$  25 000), миоглобин ( $M$  17 800), цитохром *c* ( $M$  12 400). Сканирование столбиков полиакриламидного геля проводили на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР), снабженном специальной приставкой. Молярные количества каждого из фрагментов рассчитывали из площади соответствующего пика и молекулярного веса.

*Анализ N-концевых аминокислот*, образующихся в процессе гидролиза, проводили по методу [14]. В таких опытах действие трипсина останавливали подкислением среды до pH 2—3.

*Спектральные характеристики*. Анализ спектральных данных проводили на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР). Анализ содержания в гидролизате компонентов с  $\lambda_{\text{макс}}$  450 и 423 нм проводили согласно [12, 15].

*pH-Индукцированный цитохром P-420* получали добавлением 1 н. NaOH к цитохрому P-450 в 0,01 М натрий-фосфатном буфере до pH 10 с последующим выдерживанием белка в течение 1 ч при 20°. По окончании инактивации, контролируемой по спектрам поглощения карбоксикомплекса, pH среды доводили добавлением  $\text{H}_3\text{PO}_4$  до значений 7,2 и препарат белка подвергали протеолизу трипсином или химотрипсином.

*Температурную инактивацию* цитохрома P-450 проводили при 45° в течение 1 ч. Далее раствор белка охлаждали до 20° и в стандартных условиях проводили трипсинолиз. Степень инактивации, как и в случае pH-индуцированного цитохрома P-420, оценивали по содержанию карбоксикомплекса при  $\lambda_{\text{макс}}$  423 нм [12].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Simpson E. R., Boyd G. S. (1967) Eur. J. Biochem., **2**, 275—285.
2. Ramseyer J., Harding B. W. (1973) Biochim. et biophys. acta, **315**, 306—316.
3. Estabrook R. W., Martinez-Zedillo C., Young S., Peterson J. A., McCarthy J. (1975) J. Steroid Biochem., **6**, 419—425.
4. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биоорган. химия, **4**, 278—281.
5. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биоорган. химия, **4**, 688—693.
6. Yago N., Ichii S. (1969) J. Biochem., **65**, 215—224.
7. Satre M., Vignais P. V., Idelman S. (1969) FEBS Lett., **5**, 135—140.
8. Shikita M., Hall P. F. (1973) J. Biol. Chem., **248**, 5598—5603.
9. Akhrem A. A., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. (1978) Cytochrome P-450, Structural and Functional Aspects, Abstracts, Eberswalde, pp. 1—3.
10. Jefcoate C. R., Orme-Johnson W. H., Beinert H. (1976) J. Biol. Chem., **251**, 3706—3715.
11. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) Докл. АН СССР, **237**, 1509—1512.
12. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2370—2378.
13. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., **244**, 4406—4412.
14. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) Biochem. J., **89**, 59—63.
15. Nishibayashi H., Sato R. (1968) J. Biochem., **63**, 766—779.

Поступила в редакцию  
11.VI.1979

**STRUCTURAL ORGANIZATION OF 20S, 22R-CHOLESTEROL HYDROXYLATING  
CYTOCHROME P-450 FROM ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA. I. LIMITED  
PROTEOLYSIS STUDY OF THE GLOBULAR STRUCTURE OF CYTOCHROME P-450  
AND ITS DIFFERENT SPECTRAL FORMS**

**AKHREM A. A., VASILEVSKY V. I., RADYUK V. G., SHKUMATOV V. M.,  
CHASHCHIN V. L.**

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

Limited trypsinolysis of cytochrome P-450 results in the formation of two fragments with molecular weight of 27 000 and 22 000 that are relatively stable to further trypsin action. Lengthening of incubation time up to 24 h or increase in the trypsin amount up to the enzyme-substrate ratio 1 : 10 leads to disappearance of the 22 000 fragment and gives rise to the 14 000 fragment. Upon cytochrome P-450 treatment with chymotrypsin, thermolysin and *Staphylococcus aureus* V8 protease, the band corresponding to native protein disappears without concomitant formation of fragments resistant towards these enzymes. The proteolysis of cytochrome P-450 as an octamer, complex of MW 115 000 or monomer revealed no differences in the hydrolysis pattern or kinetics between these forms. The action of proteolytic enzymes on free cytochrome P-450, its substrate complex, as well as on its carboxy complex and inactive form (cytochrome P-420) was compared. The differences in the proteolysis pattern and kinetics were observed for cytochrome P-420 prepared by various methods.

---