БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 6 * № 6 * 1980

УДК 547.962.02:577.156.1+577.23

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

II.* ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫХ УЧАСТКОВ В МОЛЕКУЛЕ ЦИТОХРОМА Р-450

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

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Изучено комплексообразование модифицированного трипсином цитохрома Р-450 с адренодоксином. Показано, что цитохром Р-450 в виде фрагментов с *M* 27 000 и 22 000 подобно нативному белку образует биоспецифический комплекс с иммобилизованным адренодоксином. Пролонгированный протеолиз цитохрома Р-450, сопровождающийся расщеплением фрагмента с *M* 22 000 до фрагмента с *M* 14 000, также не влияет на комплексообразование цитохрома Р-450 с адренодоксином. Исследована реконструкция в растворе 20*S*, 22*R*-холестеринтидроксилирующей системы с использованием модифицированного трипсином цитохрома Р-450 и показано, что цитохром Р-450 в виде фрагментов сохраняет ферментативную активность по превращению холестерина в прегненолон. Полученные данные позволили предположить, что каталитический центр цитохрома Р-450 и участок, отвечающий за связывание цитохрома Р-450 с электротранспортным белком – адренодоксином, находятся во фрагменте с *M* 27 000. Приводятся результаты протеолиза цитохрома Р-450, находящегося в комплексе с адренодоксином.

В предыдущих сообщениях [1–3] описано действие некоторых протеолитических ферментов на различные формы 20*S*,22*R*-холестеринтидроксилирующего цитохрома Р-450 (далее цитохром Р-450) — белка, выполняющего функцию терминальной оксидазы холестерина в гидроксилирующей системе, локализованной во внутренней мембране митохондрий клеток коры надпочечников. В частности, было установлено, что при действии трипсина (фермент-субстратное соотношение 1 : 50) на цитохром Р-450, находящийся в комплексе с холестерином (высокоспиновая форма [4]), в течение 30 мин происходит образование двух фрагментов: $Ф_1$ (*M* 27 000) и $Ф_2$ (*M* 22 000). Увеличение времени протеолиза (до 24 ч) или количеств взятого в опыт трипсина (до соотношения фермент — субстрат, равного 1:10) приводит к деградации фрагмента $Ф_2$ с образованием фрагмента $Ф_3$ (*M* 14 000).

В настоящей работе продолжено исследование структурной организации цитохрома Р-450 из митохондрий коры надпочечников быка. Целью работы было: 1) локализация в молекуле цитохрома Р-450 каталитическо-

* Сообщение I см. [3].

го центра, отвечающего за трансформацию холестерина в прегненолон, и «площадки» связывания цитохрома Р-450 с адренодоксином, отвечающей за самосборку системы [5]; 2) изучение функциональных и физико-химических характеристик цитохрома Р-450, модифицированного трипсином; 3) исследование организации цитохрома Р-450 в комплексе с адренодоксином.

I. Взаимодействие модифицированного трипсином цитохрома Р-450 с иммобилизованным адренодоксином

Сумма молекулярных весов фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ (27 000 и 22 000 соответственно) составляет молекулярный вес цитохрома Р-450, т. е. фрагменты $Ф_1$ и $Ф_2$ охватывают практически полностью молекулу белка. Можно предположить, что «площадка» связывания цитохрома Р-450 с адренодоксином (наличие биоспецифического комплексообразования этих белков было показано ранее [6]) локализована лишь на одном из этих фрагментов, и попытаться использовать различия в их сродстве с иммобилизованным на сефарозе адренодоксином для выделения искомых фрагментов. Однако триптический гидролизат высокоспиновой формы цитохрома Р-450 [1, 2] прочно сорбировался на адренодоксин-сефарозе, и ни повышение ионной силы исходного буфера (0,05 М натрий-фосфат, pH 7,2) с ростом концентрации NaCl до 0,5 М, ни введение в элюат 0,3% твина 80 [7] не приводило к десорбции и фракционированию фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$. В этих условиях в элюате обнаружен лишь гемовый материал, являющийся, по-видимому, продуктом неизбирательной углубленной деградации незначительной части цитохрома Р-450 до низкомолекулярных фрагментов [1].

Спектр поглощения элюата в виде карбоксикомплекса показал наличие только компонента с $\lambda_{макс}$ 423 нм. Полная элюция сорбированных на адренодоксин-сефарозе продуктов трипсинолиза цитохрома Р-450 была достигнута при использовании 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия, т. е. в условиях десорбции нативного белка с иммобилизованного адренодоксина [6]. Вместе с тем, если нативный цитохром в этих условиях дезагрегирует до мономера с M 58 000 [7], то цитохром Р-450 после его модификации до фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$, согласно данным гель-хроматографии, сохраняет полимерную структуру (M 400 000). Это может быть вызвано различной природой агрегации нативного цитохрома Р-450 и образующихся фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$. Отсутствие дезагрегирующего действия 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия на модифицированный трипсином цитохром Р-450 — наиболее существенное отличие последнего от нативного цитохрома Р-450. Гель-электрофорез в диссоциирующих условиях [8] показал, что элюированный с адренодоксин-сефарозы в этих условиях материал представляет собой фрагменты $Ф_1$ и $Ф_2$ в эквимольном соотношении.

На рис. 1 представлены спектры поглощения окисленных форм и разностные спектры карбоксикомплексов модифицированного трипсином цитохрома Р-450 до и после хроматографии на адренодоксин-сефарозе. Спектрофотометрический индекс $D_{393}-D_{470}/D_{418}-D_{470}$ в случае исходного гидролизата был равен 1,0, а для элюированных фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ — 1,2 (рис. 1*а*). Кроме того, если исходный гидролизат содержал до 25% компонента $\lambda_{макс}$ 423 нм, то в полученных фрагментах содержание этого компонента составляло 11% (рис. 1*б*). Следовательно, в результате удаления продуктов углубленной деградации спектральные характеристики элюированных с адренодоксин-сефарозы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ были практически идентичными спектральным характеристикам взятого в опыт цитохрома Р-450 [9]. Уменьшение отношения $D_{393}-D_{470}/D_{418}-D_{470}$ от 1,5 до 1,2 при трипсинолизе нативного белка связано либо с частичным удалением холестерина в процессе выделения фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$, либо с повышением содержания компонента с $\lambda_{макс}$ 423 нм (2—3% — для нативного и 11% —

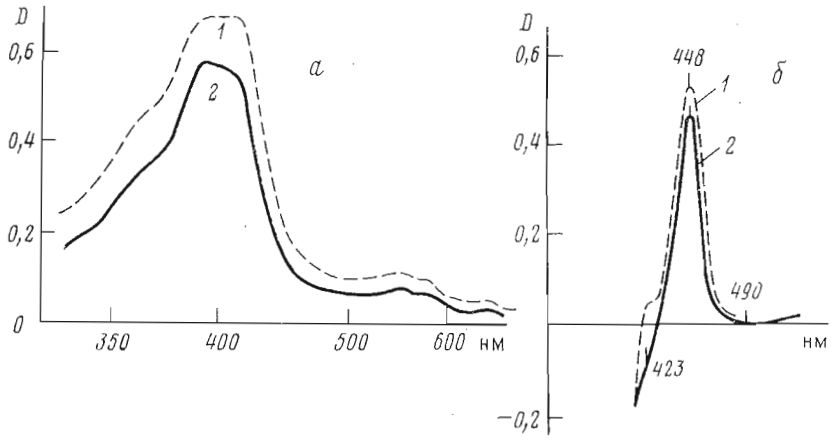

Рис. 1. Спектры поглощения цитохрома Р-450 в виде суммы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$: *а* – окисленные формы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ до (*1*) и после (*2*) хроматографии на адренодоксин-сефарозе; *б* – разностные спектры поглощения (карбоксикомплекс против восстановленной формы) фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ до (*1*) и после (*2*) хроматографии на адренодоксин-сефарозе

для модифицированного цитохрома Р-450). Спектрофотометрический индекс D_{393}/D_{280}, характеризующий удельное содержание гема, составлял в случае выделенных фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ 0,81, что практически соответствовало индексу для нативного белка.

Поскольку подход, основанный на селективном выделении фрагмента, содержащего «площадку» связывания цитохрома Р-450 с адренодоксином, с использованием биоспецифической хроматографии на адренодоксин-сефарозе себя не оправдал, для идентификации указанного фрагмента мы обратились к анализу гидролизата цитохрома Р-450, состоящего, по данным гель-электрофореза, из фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$. Для этого на колонку с адренодоксин-сефарозой наносили гидролизат высокоспиновой формы цитохрома Р-450, полученный после трипсинолиза белка в течение 3 ч при соотношении фермент — субстрат 1:10 (в этих условиях происходит практически полное расщепление фрагмента $Ф_2$ до фрагмента $Ф_3$ с M 14 000 [3]). При нанесении на колонку с адренодоксин-сефарозой гидролизата, содержащего фрагменты $Ф_1$ и $Ф_3$, основная часть гемового и пептидного материала сорбировалась на колонке, а гель-электрофорез несорбировавшихся продуктов протеолиза не выявил в них наличия ни фрагмента $Ф_1$, ни фрагмента $Ф_3$. Полная элюция оставшихся в связанном состоянии с адренодоксин-сефарозой продуктов была достигнута, как и для фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$, только в условиях, найденных для нативного цитохрома Р-450 — 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия. Последующий гель-электрофорез показал, что элюированные в присутствии 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия продукты трипсинолиза являются суммой фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$.

В случае указанного протеолиза наблюдаются более выраженные по сравнению с фрагментами $Ф_1$ и $Ф_2$ спектральные изменения как в спектре поглощения, так и в разностном спектре поглощения карбоксикомплекса, что свидетельствует о неизбирательной деградации части цитохрома Р-450 до низкомолекулярных продуктов. Спектральные характеристики совместно элюированных фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$ существенно отличались от характеристик исходного гидролизата перед его нанесением на колонку с адренодоксин-сефарозой и были близки к спектральным характеристикам фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$. Так, в спектре поглощения карбоксикомплекса суммарно элюированных с колонки фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$, но не в спектре поглощения карбоксикомплекса продуктов, не сорбировавшихся на адренодоксин-сефарозе, основной компонент имел $\lambda_{макс}$ 448 нм, т. е. соответствовал

характерному компоненту нативного цитохрома Р-450 (рис. 2).

Таким образом, расщепление фрагмента $Ф_2$ не приводит к потере связывания фрагментов с адренодоксин-сефарозой и фрагмент $Ф_2$, как таковой, не отвечает за взаимодействие цитохрома Р-450 с адренодоксином. Протеолиз фрагмента $Ф_2$ не приводит к удалению протогема IX из активного центра цитохрома Р-450, поскольку молярные количества фрагмента $Ф_1$ находятся в соответствии с содержанием протогема IX после десорбции фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$ с колонки с адренодоксин-сефарозой. Продукты углубленной неспецифической деградации цитохрома Р-450 не сорбируются на адренодоксин-сефарозе, в то время как фрагменты $Ф_1$ и $Ф_3$ образуют прочный комплекс с иммобилизованным адренодоксином. Участок, обеспечивающий прочное связывание фрагмента $Ф_2$ с $Ф_1$, после гидролиза фрагмента $Ф_2$ остался во фрагменте $Ф_3$.

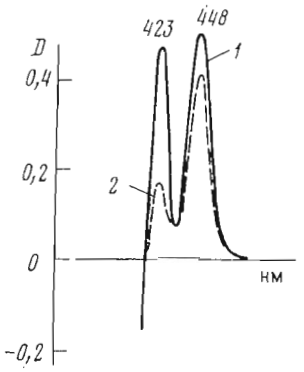

Рис. 2. Спектры поглощения карбоксикомплексов цитохрома Р-450, модифицированного трипсином до фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$, до (*1*) и после выделения (*2*) на колонке с адренодоксин-сефарозой

Цветная гем-специфическая реакция с бензидином в присутствии перекиси водорода [10] показала, что при окрашивании полиакриламидного геля, содержащего разделенные фрагменты $Ф_1$ и $Ф_3$, гемсодержащим фрагментом является только фрагмент $Ф_1$.

Все эти данные свидетельствуют о том, что как каталитический центр цитохрома Р-450, так и «площадка» его связывания с адренодоксином локализованы во фрагменте $Ф_1$.

Следует отметить характеристические особенности, наблюдаемые при гель-электрофорезе продуктов модификации цитохрома Р-450 трипсином. Согласно данным электрофоретического разделения в присутствии додецилсульфата натрия и меркаптоэтанола, ограниченный гидролиз трипсином цитохрома Р-450 приводит к образованию фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ (рис. 3*а*). Аналогичная электрофореграмма была получена для элюированных с адренодоксин-сефарозы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$. Иная картина для фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$, полученных до и после адренодоксин-сефарозы, наблюдается при гель-электрофорезе в отсутствие меркаптоэтанола (рис. 3*б*). В последнем случае фрагмент $Ф_2$ разделяется на две дополнительные фракции – $Ф_2'$ и $Ф_2''$. На электрофоретическое поведение цитохрома Р-450 меркаптоэтанол влияния не оказывает, и, следовательно, межмолекулярные дисульфидные связи (или дисульфидная связь) в нативном белке отсутствуют. Проведенное сравнение электрофореграмм позволило установить: а) электрофоретическая подвижность и молярные количества фрагмента $Ф_1$ в обоих случаях полностью совпадали; б) подвижности фрагментов $Ф_2$ и $Ф_2'$ равны; в) молярные количества фрагментов $Ф_2'$ и $Ф_2''$ в сумме составляют молярное содержание фрагмента $Ф_2$. Наиболее вероятным, на наш взгляд, объяснением этого факта может являться образование внутренней дисульфидной связи во фрагменте $Ф_2$. Для доказательства данного предположения к фрагментам $Ф_1$ и $Ф_2$ перед их обработкой додецилсульфатом натрия для модификации свободных сульфгидрильных групп добавляли Na-соль *n*-хлормеркурибензойной кислоты. На полученной электрофореграмме обработанных таким образом фрагментов не наблюдалось появления артефактного фрагмента $Ф_2''$.

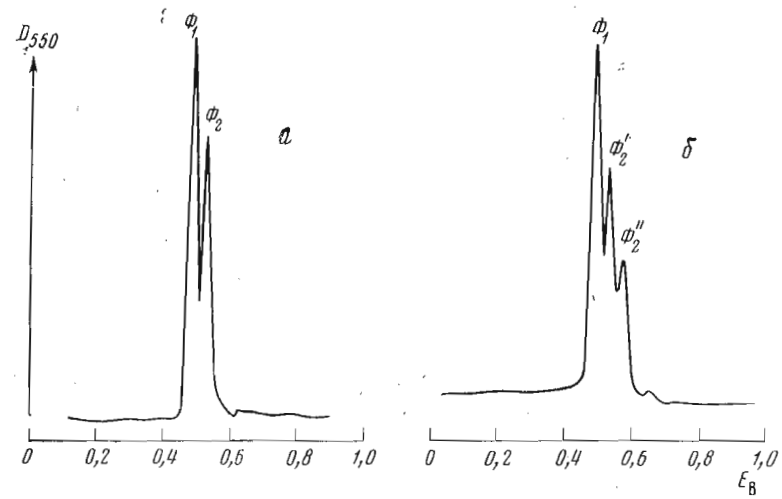

Рис. 3. Электрофореграммы цитохрома Р-450 в виде фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$, полученные после гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола (*а*) и без 2-меркаптоэтанола (*б*). E_B – электрофоретическая подвижность относительно бромфенолового синего

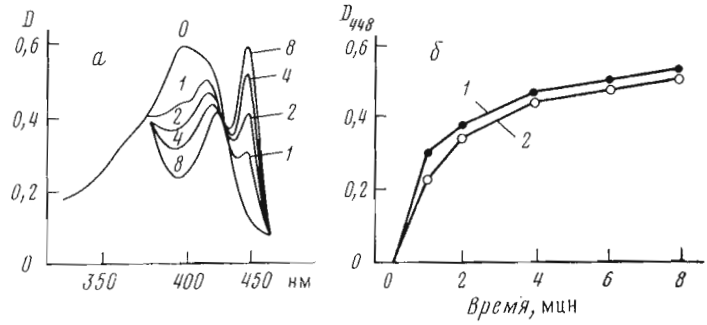

Рис. 4. Образование карбоксикомплекса при ферментативном восстановлении: *а* – изменение спектров поглощения при восстановлении цитохрома Р-450 в виде фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$. 0, 1, 2, 4, 8 – время реакции (мин); *б* – сравнение кинетики образования карбоксикомплекса для нативного цитохрома Р-450 (*1*) и в виде фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ (*2*)

II. Реконструкция 20 S, 22 R-холестерингидроксилирующей системы в растворе с использованием цитохрома Р-450, модифицированного трипсином до фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ и фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$

Сохранение цитохромом Р-450 при его модификации трипсином способности взаимодействовать с адренодоксином и спектральных характеристик, присущих нативному цитохрому Р-450, не позволяло сделать однозначного вывода о сохранении расщепленным цитохромом Р-450 функциональной активности, поскольку необходимым условием процесса трансформации холестерина в прегненолон является электронный транспорт от адренодоксина к протогему IX.

В связи с этим необходимо было выяснить, восстанавливается ли в присутствии NADPH модифицированный трипсином цитохром Р-450 его редуктазным комплексом (адренодоксинредуктаза·адренодоксин), и оценить способность модифицированного трипсином цитохрома Р-450 трансформировать холестерин в прегненолон.

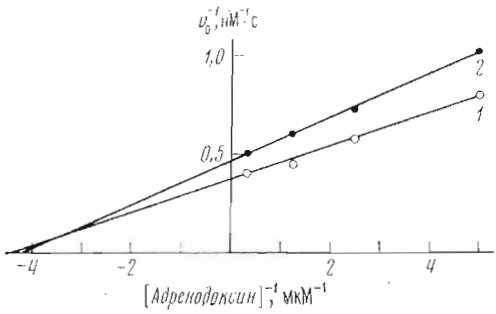

Рис. 5

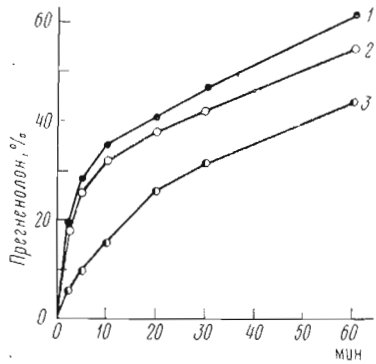

Рис. 6

Рис. 5. Определение $K_{m(каж)}$ по адренодоксину для нативного цитохрома Р-450 (*1*) и для фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ (*2*)

Рис. 6. Превращение холестерина в прегненолон, катализируемое нативным цитохромом Р-450 (*1*), фрагментами $Ф_1$ и $Ф_2$ (*2*) и $Ф_1$ и $Ф_3$ (*3*)

Проведенные опыты показали, что цитохром Р-450 в виде фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ эффективно восстанавливается в присутствии NADPH, адренодоксинредуктазы и адренодоксина. В опыт брали равные по поглощению на 450 нм количества цитохрома Р-450 и фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$, а инкубационную смесь предварительно насыщали окисью углерода. Скорость образования карбоксикомплекса для фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ в реконструированной системе практически совпадала со скоростью для нативного цитохрома Р-450 (рис. 4).

В предыдущем разделе было описано взаимодействие фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ с иммобилизованным адренодоксином. Количественной характеристикой взаимодействия цитохрома Р-450 с адренодоксином в растворе может служить зависимость скорости перехода высокоспиновой формы цитохрома Р-450 в низкоспиновую форму от концентрации адренодоксина. Поскольку спектр поглощения фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ был практически идентичен спектру поглощения высокоспиновой формы нативного цитохрома Р-450, т. е. в процессе трипсинолиза комплекс с субстратом не нарушался, изменение активности реконструированной системы регистрировали по переходу высокоспиновой формы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ в низкоспиновую, варьируя концентрацию адренодоксина (рис. 5). Найденное значение $K_{m(каж)}$ по адренодоксину ($0{,}2 \cdot 10^{-6}$ М) находилось в хорошем соответствии со значением, определенным для нативного цитохрома Р-450 [11]. Эта величина в какой-то мере соответствует константе диссоциации ($K_{дис}$) комплекса фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ с адренодоксином, хотя для точного определения $K_{дис}$ необходимо учитывать взаимодействие адренодоксина с адренодоксинредуктазой.

Для проверки функциональной активности цитохрома Р-450, модифицированного трипсином соответственно до фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ или $Ф_1$ и $Ф_3$, мы изучили реконструкцию системы по превращению холестерина в прегненолон. Анализ осуществляли по радиоактивности после разделения холестерина и прегненолона в тонком слое силикагеля. Полученные результаты (рис. 6) свидетельствуют о способности цитохрома Р-450, модифицированного трипсином, осуществлять реакцию трансформации холестерина в прегненолон. При взятых в опыт равных количествах цитохрома Р-450, фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ и фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$ (по поглощению карбоксикомплекса на 450 нм) удельная активность реконструированной в растворе 20*S*,22*R*-холестеингидроксилирующей системы была сравнимой.

III. Изучение организации цитохрома Р-450, находящегося в комплексе с адренодоксином

Ранее было установлено [7], что при нанесении цитохрома Р-450 на колонку с адренодоксин-сефарозой в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,2) цитохром сорбируется на иммобилизованном адренодоксине в виде октамера. Такой комплекс был непригоден для выяснения влияния адренодоксина на характер протеолиза цитохрома Р-450, так как происходит, по-видимому, взаимодействие одной из молекул октамера с адренодоксином, в то время как протеолиз оставшейся части октамера будет типичным для свободного цитохрома Р-450.

Исследование гель-хроматографического поведения цитохрома Р-450 показало, что хроматография в присутствии 0,3% твина 80 приводит к его дезагрегации до комплексов с M 115 000 [7]. Эти комплексы являются, по-видимому, комплексами мономера цитохрома Р-450 с мицеллами твина 80, так как добавление к этим комплексам 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия не приводит к образованию мономера цитохрома Р-450.

Вместе с тем указанная концентрация твина 80 не оказывает диссоциирующего влияния как на комплекс цитохрома Р-450 с иммобилизованным адренодоксином, так и на аналогичный комплекс с участием продуктов триптической модификации цитохрома Р-450. В связи с этим сорбированный на адренодоксин-сефарозе октамер цитохрома Р-450 дезагрегировали до комплексов с M 115 000 пропусканием через колонку 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,2, содержащего 0,3% твина 80. После дезагрегации через колонку пропускали трипсин в том же буфере (но без твина 80) (фермент-субстратное соотношение к цитохрому Р-450 составляло 1:50) в течение 30 мин. Трипсин удаляли промывкой колонки указанным буфером, а продукты трипсинолиза элюировали 0,05 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,2, содержащим 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия, и анализировали гель-электрофорезом в диссоциирующих условиях. Полученные электрофореграммы показали, что элюированные 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия продукты представляют собой фрагменты $Ф_1$ и $Ф_2$. Некоторое количество фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ элюировалось при пропускании через колонку трипсина. Это связано, по-видимому, с частичным разрушением иммобилизованного адренодоксина.

Таким образом, взаимодействие адренодоксина с цитохромом Р-450 не приводит к экранированию участка полипептидной цепи, связывающего фрагменты $Ф_1$ и $Ф_2$.

Экспериментальная часть

В работе были использованы трипсин из поджелудочной железы быка (КФ 3.4.21.4, уд. акт. 40 ед/мг), набор белков-стандартов для определения молекулярного веса MS-11, додецилсульфат натрия, метилфенилсульфонилфторид, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа из дрожжей (КФ 1.1.1.49, уд. акт. 140 ед/мг), глюкозо-6-фосфат, прегненолон (Serva, ФРГ), набор реактивов для электрофореза в полиакриламидном геле (Reanal, ВНР), [4-^{14}C]-холестерин (54,4 мКи/ммоль, Amercham, Англия), холестерин (Germed, ГДР), Na-соль *n*-хлормеркурибензойной кислоты, холат натрия (Sigma, США), сефадекс G-200 (Pharmacia, Швеция). Цитохром Р-450, адренодоксин и адренодоксинредуктазу выделяли согласно работам [6, 12]. Адренодоксин-сефарозу получали по методу [12].

Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР). Содержание цитохрома Р-450 и цитохрома Р-420 определяли по методу [13], содержание белка — по [14]. Гель-электрофорез в денатурирующих условиях проводили согласно [8], сканирование гелей осуществляли на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР), снабженном специальной приставкой. Контроль за хроматографическими процессами вели при помощи комплекта Uvicord-II (LKB, Швеция).

Получение цитохрома Р-450 в виде фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$. К 210 нмоль цитохрома Р-450 в 3 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,2 (исходный буфер), содержащего 1 М NaCl с 0,3% холатом натрия, добавляли 0,1 мг трипсина (весовое соотношение трипсин — цитохром Р-450 1 : 50). После 30 мин инкубации при 20° С гидролизат разводили в 10 раз исходным буфером, содержащим метилфенилсульфонилфторид в концентрации 10^{-4} М, и выдерживали дополнительно 30 мин. Гидролизат наносили на колонку (1,5×10 см) с адренодоксин-сефарозой, уравновешенной исходным буфером. Колонку промывали 100 мл исходного буфера и 100 мл этого же буфера, содержащего 0,5 М NaCl. Элюцию фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ осуществляли исходным буфером с 1 М NaCl и 0,3% холатом натрия. Полученные фрагменты хранили в элюирующем буфере не более 2 сут при 4° С.

Получение цитохрома Р-450 в виде фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$. 200 нмоль цитохрома Р-450 инкубировали с трипсином (фермент-субстратное соотношение 1 : 10) в течение 3 ч. Условия проведения трипсинолиза и последующего выделения фрагментов $Ф_1$ и $Ф_3$ аналогичны описанным выше.

Ферментативное восстановление цитохрома Р-450 в виде фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$. Процесс восстановления регистрировали спектрофотометрически по образованию карбоксикомплекса ($\lambda_{макс}$ 448 нм). Инкубационная смесь (2 мл), насыщенная окисью углерода, содержала фрагменты $Ф_1$ и $Ф_2$ (10 нмоль), адренодоксинредуктазу (1 нмоль) и адренодоксин (5 нмоль). Реакцию инициировали добавлением NADPH-генерирующей системы [7] и регистрировали изменения спектров поглощения в течение 10 мин.

Реакцию превращения холестерина в прегненолон проводили в 10 мл исходного буфера при 25° С. Инкубационная смесь содержала 50 нм [4-^{14}C]холестерина (разбавлен до уд. акт. 105000 имп/нмоль), 5 нмоль фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ или $Ф_1$ и $Ф_3$, 5 нмоль адренодоксинредуктазы и 20 нмоль адренодоксина. Смесь выдерживали 20 мин при 25° С и начинали реакцию добавлением NADPH-генерирующей системы (концентрация NADPH в инкубационной смеси 10^{-4} М). Через определенные интервалы времени из инкубационной смеси отбирали по 2 мл раствора, из которого проводили экстракцию стероидов хлористым метиленом. Экстракты упаривали и хроматографировали на пластинках с закрепленным слоем силикагеля в системе *н*-пентан — диэтиловый эфир — уксусная кислота, 60 : 40 : 2 [15]. Проявление хроматограмм осуществляли парами иода (для визуального контроля в экстракты добавляли нерадиоактивные холестерин и прегненолон). Зоны веществ счищали с пластинок, определяли радиоактивность на приборе Ultrabeta — Vallak 1210 (LKB, Швеция) и рассчитывали процентное содержание образующегося прегненолона (за 100% в каждом экстракте принимали сумму радиоактивности холестерина и прегненолона). Для трех опытов процентное соотношение стероидов в каждом экстракте отличалось не более чем на 5%.

$K_{m(каж)}$ *по адренодоксину* определяли на основании увеличения скорости перехода высокоспиновой формы фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ в низкоспиновую при повышении концентрации адренодоксина. Контроль за процессом осуществляли при помощи разностной спектрофотометрии [7]. Опытная кювета содержала 0,88 нмоль фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$, 0,1 нмоль адренодоксинредуктазы и соответствующее количество адренодоксина. Реакцию инициировали добавлением 0,1 мл NADPH-генерирующей системы и регистрировали в течение 3—10 мин при 20° С. Активность выражали в нмоль образующейся низкоспиновой формы, используя линейные участки кинетических кривых. Величины начальной скорости — среднее из трех опытов. Определение $K_{m(каж)}$ проводили в координатах двойных обратных величин. Аналогично определяли $K_{m(каж)}$ по адренодоксину для нативного цитохрома Р-450.

Гель-хроматографию фрагментов $Ф_1$ и $Ф_2$ проводили таким же образом, как и при изучении дезагрегации нативного цитохрома Р-450 [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1979) Биоорган. химия, 5, 789–791.
2. Akhrem A. A., Vasilewsky V. I., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. (1979) 4th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Abstracts, p. 4, Ann Arbor, U.S.A.
3. Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1980) Биоорган. химия, 6, 285–295.
4. Takemori S., Suhara K., Hashimoto S., Hashimoto M., Sato H., Gomi T., Katagiri M. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Communs, 63, 588–593.
5. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 688–693.
6. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 278–280.
7. Akhrem A. A., Lapko V. N., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. (1979) Acta biol. med. Germ., 38, 257–273.
8. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406–4412.
9. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) Докл. АН СССР, 237, 1509–1511.
10. Welton A. F., Aust S. D. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Communs, 56, 898–906.
11. Katagiri M., Takikava O., Sato H., Suhara K. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Communs, 77, 804–808.
12. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 780–786.
13. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., 239, 2370–2378.
14. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. (1949) J. Biol. Chem., 177, 751–766.
15. Morisaki M., Bannai K., Ikekawa M., Shikita M. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Communs, 69, 481–488.

Поступила в редакцию
5.XI.1979

STRUCTURAL ORGANIZATION OF 20*S*,22*R*-CHOLESTEROL HYDROXYLATING CYTOCHROME P-450 FROM BOVINE ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA. II. LOCATION OF FUNCTIONALLY IMPORTANT SITES IN THE CYTOCHROME P-450 MOLECULE

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

Complexing of trypsin-modified cytochrome P-450 with adrenodoxin has been studied. Similarly to native protein, cytochrome P-450 in the form of fragments with MW 27 000 and 22 000 forms a biospecific complex with immobilized adrenodoxin. Prolonged proteolysis of cytochrome P-450 leading to cleavage of the fragment with MW 22 000 to the fragment of MW 14 000 does nor affect complexing with adrenodoxin. The reconstitution of the 20*S*,22*R*-cholesterol hydroxylating system using trypsin-modified cytochrome P-450 shows that the enzymatic activity in conversion of cholesterol to pregnenolone is preserved. The data obtained allowed a conclusion to be made that both catalytic center of cytochrome P-450 and the site responsible for its binding with adrenodoxin, are located in the fragment of MW 27 000. The results of proteolysis of cytochrome P-450 complexed with adrenodoxin are also reported.