



УДК 577.152.1.03 : 577.142.4 : 543.42

СЕЛЕКТИВНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ
ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА P-450
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ
ТЕТРАНИТРОМЕТАНОМ

*Усанов С. А., Пикулева И. А., Чащин В. Л.,
Ахрем А. А.*

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Метод химической модификации тетранитрометаном использован для исследования роли тирозиновых остатков холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 из митохондрий коры надпочечников, отвечающего за ключевую стадию биосинтеза стероидных гормонов — превращение холестерина в прегненолон. Введение нитрогруппы в ароматическое кольцо остатков тирозина гемопротенда сопровождается переходом цитохрома P-450 в неактивную P-420-форму и приводит к потере ферментативной активности цитохрома P-450 в процессе окислительного расщепления холестерина. Анализ кинетики нитрования цитохрома P-450 указывает на существование нескольких групп остатков тирозина в молекуле гемопротенда, различающихся по своей доступности модификатору. Инактивация цитохрома P-450 наблюдается при модификации одного-двух остатков тирозина, при этом в процессе модификации не затрагиваются другие аминокислотные остатки. Модификация сопровождается изменением спектральных характеристик цитохрома P-450. Холестерин и адrenoноксин — высокоспироновые эффекторы — обладают защитным эффектом по отношению к модификации, вызываемой тетранитрометаном. Полученные данные обсуждаются с точки зрения функциональной значимости остатков тирозина в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450.

Цитохром P-450-зависимая холестерингидроксилирующая ферментная система митохондрий коры надпочечников, расположенная на внутренней, обращенной в матрикс, стороне митохондриальной мембраны, осуществляет ключевую стадию биосинтеза стероидных гормонов, превращение холестерина в прегненолон, посредством окислительного расщепления боковой цепи молекулы холестерина [1—3]. Реакция превращения холестерина в прегненолон требует присутствия молекулярного кислорода и донора электронов NADPH. В состав гидроксилирующей системы входят флавопротеид (адrenoноксинредуктаза), ферредоксин (адrenoноксин) и цитохром P-450, которые образуют электронтранспортную цепь, необходимую для переноса электронов с NADPH на кислород [4].

Роль цитохрома P-450 в монооксигеназной реакции заключается в связывании субстрата, взаимодействии с промежуточным переносчиком электронов адrenoноксином и активации молекулярного кислорода с последующим внедрением одного из атомов активированного кислорода в молекулу окисляемого соединения. Реакция отщепления боковой цепи холестерина протекает в три стадии и до конца не исследована [5].

Несмотря на то что в настоящее время цитохром P-450 получен в гомогенном виде и достаточно хорошо охарактеризован [6—10], роль его отдельных аминокислотных остатков в механизме катализа монооксигеназной реакции остается невыясненной. Согласно механизму действия стероидгидроксилирующей системы, молекула цитохрома P-450 должна содержать участки, ответственные за взаимодействие с холестерином и адrenoноксином, а также домен, отвечающий за взаимодействие с фосфолипидной мембраной. Участие в этих взаимодействиях неполярных сил позволяет предположить вовлечение гидрофобных ароматических остатков аминокислот белка в формирование как активного центра цитохрома P-450, так и участков, ответственных за взаимодействие с фосфолипидной мембраной.

Возможность участия остатков тирозина в формировании активного центра цитохрома Р-450 показана в работе [11], в которой с помощью фотоаффинных меток идентифицирован гемпептид цитохрома Р-450, содержащий по крайней мере 2 из 15 присутствующих в молекуле гемопротеида остатков тирозина. Целью настоящей работы является исследование функциональной роли остатков тирозина в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 из митохондрий коры надпочечников.

Химическая модификация цитохрома Р-450 тетранитрометаном и оценка эффекта модификации

Для того чтобы оценить функциональную значимость остатков тирозина в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450, в данной работе изучена химическая модификация гемопротеида достаточно специфичным по отношению к остаткам тирозина химическим реагентом — тетранитрометаном.

Нитрование белков тетранитрометаном, как правило, проводят при рН 8,0 [12]. Однако такие условия неприемлемы для цитохрома Р-450, который при данном значении рН изменяет спиновое состояние, переходя из высокоспиновой ($s^{5/2}$) в низкоспиновую ($s^{1/2}$) форму с последующим превращением в неактивный цитохром Р-420 [13]. В этой связи химическую модификацию цитохрома Р-450 проводили при рН 7,4, когда гемопротеид наиболее стабилен. Цитохром Р-450 в среде, не содержащей детергентов, существует в виде агрегатов с молекулярной массой $\sim 400\ 000$. Однако в присутствии 1 М КСl и 0,3% холата натрия наблюдается дезагрегация гемопротеида до мономерной формы с молекулярной массой 49 000 [10]. Во всех случаях, кроме специально оговоренных, для того чтобы избежать влияния агрегатного и спинового состояний гемопротеида на процесс модификации, использовали цитохром Р-450, элюируемый с колонки с аденодоксинсефарозой 0,05 М фосфатным буфером, содержащим 1 М КСl и 0,3% холата натрия. В этих условиях цитохром Р-450 находится в высокоспиновом состоянии в дезагрегированном виде [10]. Обычно степень модификации тетранитрометаном может быть легко оценена из рН-зависимых спектральных изменений *o*-нитрофенильного хромофора нитротирозиновых остатков при 360 и 428 нм. Однако в случае гемопротеидов наблюдается суперпозиция полос поглощения нитрофенильного и гемового хромофоров, затрудняющая количественную оценку степени модификации. Кроме того, остатки тирозина и нитротирозина имеют перекрывающиеся полосы в УФ-части спектра, что также препятствует количественной интерпретации эффекта модификации. В таких случаях единственным доступным методом оценки степени модификации является аминокислотный анализ.

Согласно данным аминокислотного анализа холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450, модифицированного тетранитрометаном (табл. 1), модификация приводит к уменьшению числа остатков тирозина и накоплению остатков нитротирозина, не затрагивая других аминокислотных остатков белка. Однако процедура аминокислотного анализа достаточно трудоемка и продолжительна. Поэтому мы решили разработать быстрый и адекватный метод определения числа образовавшихся остатков нитротирозина в молекуле цитохрома Р-450 после его модификации тетранитрометаном. В основу метода была положена возможность удаления гемового хромофора из цитохрома Р-450 при осаждении белка подкисленным ацетоном [14] или при экстрагировании гема органическими растворителями [15].

Обработка немодифицированного цитохрома Р-450 подкисленным ацетоном или бутанолом приводит к практически полному исчезновению поглощения в области полосы Soret (рис. 1а). Образующиеся после удаления гема подкисленным ацетоном осадки апоцитохрома Р-450 растворяли либо в смеси, содержащей 0,5% додецилсульфата натрия и 2% КОН, либо в 6 М хлоргидрате гуанидина (см. «Экспериментальную часть»), что приводило к получению ярко-желтых растворов белка со спектральными параметрами, характерными для нитрофенильного хромофора остатка нитротирозина (рис. 1б). Сопоставление результатов по определению числа модифициро-

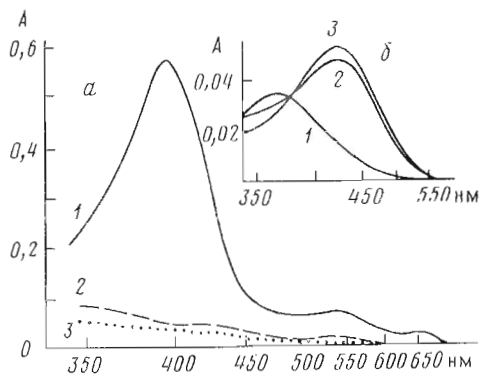


Рис. 1

Рис. 1. Спектры поглощения: *a* — немодифицированного цитохрома Р-450 до (1) и после обработки гемопротейда подкисленным ацетоном (2) и бутаноном (3); *б* — модифицированного 50-кратным молярным избытком тетранитрометана цитохрома Р-450 после удаления гема подкисленным ацетоном с последующим растворением апобелка в 6 М хлоридате гуанидина с рН 5,3 (1), 8,0 (2), 9,5 и 11,8 (3)

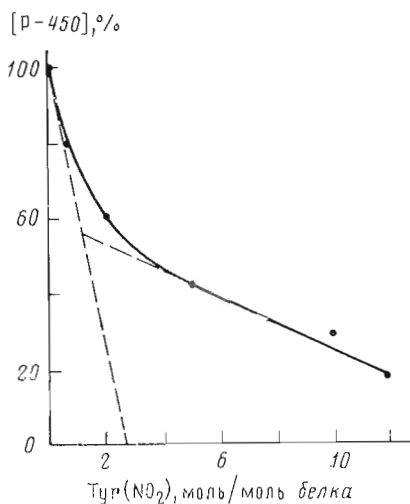


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость степени инактивации гемопротейда от количества введенных в молекулу цитохрома Р-450 нитрогрупп. Нитрование проводили в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,3% холата натрия и 1 М КСl

ванных в цитохроме Р-450 остатков тирозина спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента молярного поглощения для нитротирозина при 428 нм, равного $4100 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [12], с данными аминокислотного анализа (табл. 2) свидетельствует в целом о соответствии данных двух разных методов. Однако спектрофотометрический метод дает несколько завышенные результаты, что, на наш взгляд, связано с тем, что в данных условиях коэффициент молярной экстинкции остатков нитротирозина в белке несколько отличается от принятого значения коэффициента молярной экстинкции для нитротирозина, находящегося в растворе. Использование выведенного нами среднего пересчетного коэффициента, равного 1,4, позволяет получать для двух методов сопоставимые результаты.

Согласно спектрофотометрическому анализу, модификация цитохрома Р-450 сопровождается уменьшением концентрации нативного цитохрома Р-450, что проявляется в уменьшении поглощения карбонильного комплекса цитохрома Р-450 при 450 нм (см. «Экспериментальную часть»), и переходом цитохрома Р-450 в цитохром Р-420 — процесс, называемый далее инактивацией гемопротейда. Из табл. 3 следует, что при различных соотношениях тетранитрометан — цитохром Р-450 инактивация гемопротейда завершается в течение 1 ч. Поэтому в последующих экспериментах реакцию цитохрома Р-450 с тетранитрометаном проводили 1 ч. Процесс инактивации цитохрома Р-450 тетранитрометаном не подчиняется кинетике типичных реакций псевдопервого порядка. Этот факт может быть объяснен тем, что в процесс модификации, сопровождающийся инактивацией гемопротейда, вовлекаются несколько остатков тирозина, различающихся по своей доступности или реакционной способности по отношению к тетранитрометану.

Для доказательства того, что процесс инактивации цитохрома Р-450 связан именно с модификацией остатков тирозина, мы определили количество нитротирозиновых остатков, образующихся в процессе модификации. Сопоставление процессов инактивации цитохрома Р-450 (табл. 3) и его модификации, оцененной по количеству образовавшихся остатков нитротирозина (табл. 2, рис. 2), позволяет заключить, что именно модификация остатков тирозина является причиной инактивации гемопротейда. Как

Аминокислотный состав (моль/моль белка) нативного и модифицированного тетранитрометаном цитохрома P-450 *

Аминокислота	Тетранитрометан, моль/моль белка			Аминокислота	Тетранитрометан, моль/моль белка		
	0	50	100		0	50	100
Pro	24,7	24,5	25,1	Phe	24,2	24,2	23,1
Glu	50,2	49,7	48,7	Lys	27,0	27,2	27,0
Gly	22,3	22,0	22,6	His	9,8	10,3	9,8
Ala	22,7	23,4	24,8	Arg	23,7	24,0	23,5
Met	12,3	11,8	12,1	Tyr	15,0	13,5	10,6
Leu	43,3	40,6	42,6	Tyr(NO ₂)	0,0	3,2	4,4

* Нитрование проводили 1 ч в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3% холата натрия и 1 М KCl. Полученные данные нормированы по содержанию остатков лизина и аргинина (соответствующие цифры подчеркнуты).

Таблица 2

Определение степени нитрования цитохрома P-450 (моль Tyr(NO₂)/моль белка) с помощью аминокислотного и спектрофотометрического анализа *

Тетранитрометан, моль/моль белка	Аминокислотный анализ (А)			Спектральный анализ (С)	С/А по Tyr(NO ₂)
	Tyr(NO ₂)	Tyr	Tyr+Tyr(NO ₂)	Tyr(NO ₂)	
25	1,9	12,2	14,1	2,5	1,3
50	3,2	13,5	16,7	5,2	1,6
100	3,9	10,8	14,7	5,5	1,4
150	7,2	8,6	15,8	10,2	1,4
200	10,0	8,6	18,6	13,2	1,3

* Нитрование проводили 1 ч в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3% холата натрия и 1 М KCl.

Таблица 3

Остаточная концентрация (%) цитохрома P-450 при модификации тетранитрометаном *

Время нитрования, мин	[P-450] при избытке тетранитрометана, моль/моль белка			
	25	50	150	200
30	75,9	60,2	52,1	46,3
60	60,1	52,4	40,5	25,8
120	56,9	46,5	32,3	20,1
210	51,8	45,3	31,9	19,7

* Нитрование проводили в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3% холата натрия и 1 М KCl.

Таблица 4

Влияние защиты SH-групп на стабильность цитохрома P-450 при нитровании тетранитрометаном
Приведено остаточное содержание цитохрома P-450, %

Обработка помимо нитрования ^{1*}	Избыток тетранитрометана, моль/моль белка		
	0	50	100
—	100	57,8	45,6
2,2'-Дипиридилдисульфид ^{2*}	93,4	56,5	42,9
Дитиотреит ^{3*}	98,6	56,8	44,0
2,2'-Дипиридилдисульфид ^{2*} и дитиотреит ^{3*}	97,8	55,7	41,3

^{1*} Условия нитрования: 50 мМ фосфатный буфер, pH 7,4 (1 ч, 25° С).

^{2*} До нитрования, условия: 10-кратный мольный избыток 2,2'-дипиридилдисульфида (1 ч, 25° С).

^{3*} После нитрования, условия: 0,1 М дитиотреит (1 ч, 25° С).

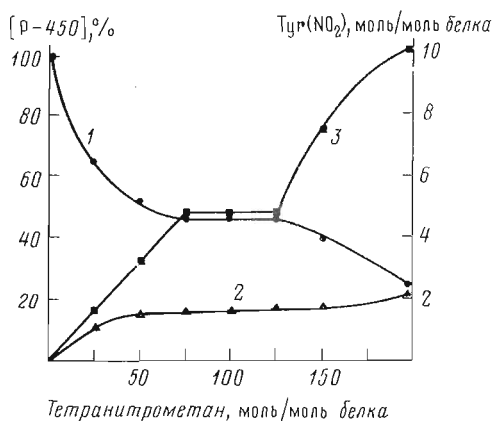


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость степени инактивации цитохрома P-450 (1), образования цитохрома P-420 (2) и модификации цитохрома P-450 (3) от соотношения тетранитрометан — цитохром P-450. Условия нитрования см. рис. 2, время 1 ч

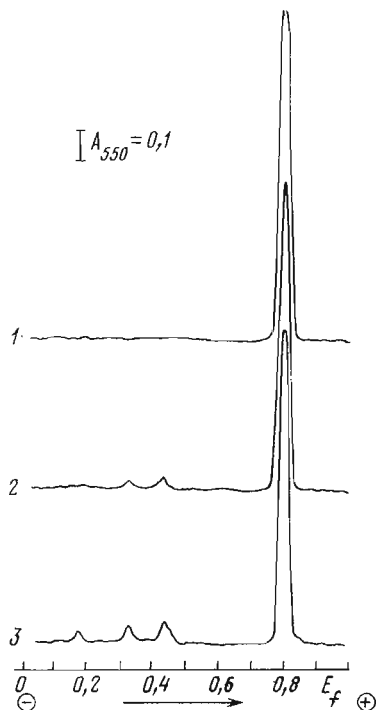


Рис. 4

Рис. 4. Электрофореграммы модифицированного 25- (1), 50- (2) и 200-кратным (3) мольными избытками тетранитрометана цитохрома P-450. Условия нитрования см. рис. 2, время 1 ч

вытекает из рис. 2, модификация 12 (основываясь на результатах спектрофотометрического анализа) из 15 присутствующих в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 остатков тирозина сопровождается практически полной инактивацией гемопротейда. Из зависимости степени инактивации цитохрома P-450 от количества введенных в молекулу гемопротейда нитрогрупп, согласно теоретическому уравнению [16], следует, что в молекуле цитохрома P-450 имеется несколько функционально важных остатков тирозина, доступных тетранитрометану, модификация которых приводит к практически полной инактивации.

Результаты экспериментов по определению зависимости степени инактивации цитохрома P-450 и его модификации от соотношения тетранитрометан — цитохром P-450 (рис. 3) свидетельствуют, что в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 имеется несколько групп остатков тирозина, различающихся по своей доступности тетранитрометану, что подтверждает ранее высказанное предположение. Первоначально в молекуле гемопротейда подвергаются модификации приблизительно два остатка тирозина, имеющих функционально важное значение, что влечет за собой резкую инактивацию белка. Затем, при увеличении концентрации модификатора, не происходит ни модификации, ни инактивации цитохрома P-450, т. е. молекула гемопротейда при таких избытках модификатора противостоит инактивирующему воздействию. Дальнейшее повышение концентрации тетранитрометана резко увеличивает число модифицируемых остатков тирозина. Инактивация при больших избытках модификатора, по-видимому, сопровождается разворачиванием полипептидной цепи белка, приводящим к увеличению числа доступных нитрованию остатков тирозина. При инактивации цитохрома P-450 большими избытками модификатора не наблюдается количественного перехода цитохрома P-450 в цитохром P-420, а имеет место потеря гемового хромофора (рис. 3). Этот факт можно объяс-

нить радикальным механизмом реакции нитрования тетранитрометаном [17]. Образующиеся в ходе процесса модификации радикалы могут атаковать гемовый хромофор, приводя к деструкции цитохрома Р-450. Например, деструкция цитохрома ЛМ₂ микросом печени кроликов, сопровождающаяся потерей гемового хромофора,— хорошо известный факт [18, 19].

Оценка побочных эффектов реакции модификации тетранитрометаном цитохрома Р-450

Известно, что тетранитрометан при значительных концентрациях способен взаимодействовать с остатками гистидина, метионина, триптофана и цистеина [17, 20]. Поскольку содержание первых трех аминокислот в модифицированных тетранитрометаном препаратах цитохрома Р-450, по данным аминокислотного анализа, существенно не изменяется (табл. 1), нами было детально изучено влияние модификации на сульфгидрильные группы гемопротейда. Побочное действие тетранитрометана на сульфгидрильные группы обычно объясняется способностью модификатора окислять их до различных промежуточных продуктов. Существует два основных пути атаки сульфгидрильных групп тетранитрометаном: первый ведет к образованию дисульфидной связи, а второй сопровождается окислением сульфгидрильной группы до сульфоновой кислоты в присутствии кислорода воздуха. Проведение реакции модификации холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 тетранитрометаном в анаэробных условиях не изменяет, однако, картины модификации (данные не приведены), свидетельствуя о том, что второй путь не реализуется. Вместе с тем, используя метод электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, мы не обнаружили полимерных форм модифицированного цитохрома Р-450, расщепляемых меркаптоэтанолом.

Цитохром Р-450 содержит четыре титруемые 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) в денатурирующих условиях сульфгидрильные группы. В процессе модификации цитохрома Р-450 тетранитрометаном происходит уменьшение количества титруемых сульфгидрильных групп. Максимальное снижение титруемых групп на молекулу цитохрома Р-450 при его модификации 100-кратными избытками модификатора достигает трех. Исследованные кинетики окисления сульфгидрильных групп в процессе модификации показывает, что уменьшение числа титруемых SH-групп происходит уже в первые минуты реакции, тогда как модификация цитохрома Р-450, сопровождаемая его инактивацией, протекает в течение 1 ч и более. Факт абсолютного несовпадения скоростей этих двух процессов, на наш взгляд, указывает на отсутствие заметного вклада модификации сульфгидрильных групп в процесс инактивации цитохрома Р-450.

Предварительная модификация цитохрома Р-450 по сульфгидрильным группам с помощью 2,2'-дигидрилдисульфида сопровождается незначительной инактивацией (до 10%) цитохрома Р-450, указывая на то, что доступные для данного реагента сульфгидрильные группы не влияют на процесс инактивации гемопротейда. Последующая модификация цитохрома Р-450 тетранитрометаном не изменяет в существенной степени картину модификации, наблюдаемой в отсутствие защиты сульфгидрильных групп (табл. 4). Не изменяет свойств цитохрома Р-450 и последующая обработка дитиотреитом. Таким образом, инактивация цитохрома Р-450 в процессе модификации гемопротейда тетранитрометаном не связана с окислением сульфгидрильных групп.

Известно, что иногда при модификации некоторых белков тетранитрометаном наблюдается образование ковалентных межмолекулярных сшивок [21—23]. Для того чтобы определить, имеет ли место данный процесс в нашем случае, мы подвергли электрофорезу в диссоциирующих условиях образцы цитохрома Р-450, модифицированного до разной глубины.

Как показано на рис. 4, модификация цитохрома тетранитрометаном при незначительном избытке последнего не сопровождается образованием высокомолекулярных форм гемопротейда. Однако при использовании значительных избытков модификатора отмечается появление мипорных полос,

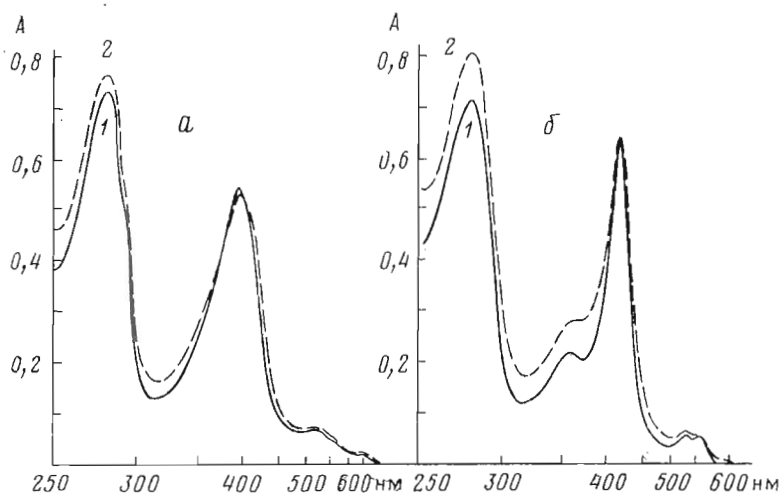


Рис. 5. Спектры поглощения: *a* — высоко- ($[P-450] 4,7 \text{ нМ}$), *б* — низкоспиновой ($[P-450] 5,8 \text{ нМ}$) формы цитохрома P-450 до (1) и после (2) модификации 25- или 50-кратным молярным избытком тетранитрометана

характерных для димерных и тримерных форм гемопротейда с молекулярными массами 100 000 и 140 000 соответственно. Полученные данные свидетельствуют об образовании при больших избытках тетранитрометана межмолекулярных ковалентных сшивок. Следует, однако, отметить, что даже при использовании 200-кратных избытков тетранитрометана, при которых гемопротейд инактивируется практически полностью, количество полимерных форм цитохрома P-450 не превышало 10%. Образование межмолекулярных сшивок, сопутствующее нитрованию, вероятно, следствие взаимодействия феноксильных радикалов, образующихся при модификации и являющихся общим интермедиатом как в процессе нитрования, так и при образовании ковалентных сшивок. Таким образом, хотя образование незначительного количества межмолекулярных сшивок и имеет место, оно не может являться причиной инактивации цитохрома P-450.

Влияние модификации цитохрома P-450 на оптические характеристики гемопротейда

Известно, что цитохром P-450 может существовать как в высокоспиновом, связанном с субстратом, так и в свободном от субстрата низкоспиновом состояниях [24]. Модификация тетранитрометаном гемопротейда в обеих формах приводит к увеличению поглощения в УФ-области при 278 нм (рис. 5), что сопровождается уменьшением спектрофотометрического индекса. Увеличение поглощения наблюдается также в области 380 нм, где находится изобестическая точка нитротирозинового хромофора. Вместе с тем если для низкоспиновой формы цитохрома P-450 при модификации не наблюдается существенных изменений в области полосы Soret, то для высокоспиновой формы изменяется спектрофотометрический индекс $(393-470)/(417-470)$ за счет увеличения поглощения при 417 нм, вызванного переходом цитохрома P-450 при нитровании в цитохром P-420. Для обеих форм характерно уширение спектра при 460 нм, что, однако, существенно отличается от полосы поглощения нитротирозиновых остатков при 428 нм.

Отмеченные изменения спектральных характеристик цитохрома P-450, как результат модификации тетранитрометаном, указывают на непосредственное участие остатков тирозина в гем-белковом взаимодействии. Нарушение этих взаимодействий, вызываемое модификацией, сопровождается инактивацией гемопротейда с превращением в неактивную форму — цитохром P-420. Интересно, что при модификации цитохрома P-450 тетранитрометаном изменяются спектральные параметры гемопротейда в области

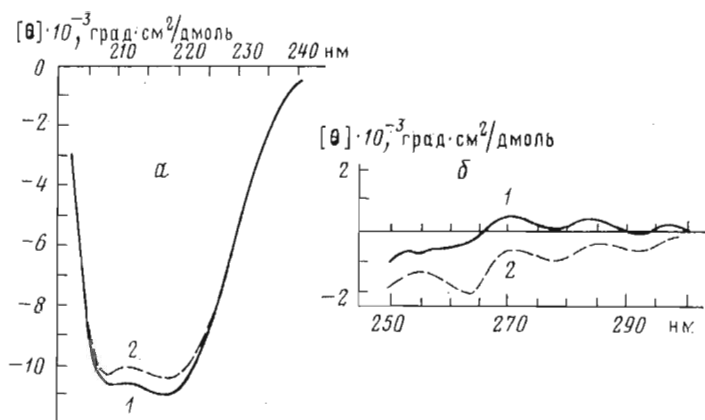


Рис. 6. Спектры КД нативного (1) и модифицированного (2) 50-кратным молярным избытком тетранитрометана цитохрома Р-450 в УФ-области (а) и в области поглощения ароматического хромофора (б). Условия нитрования см. рис. 2, время 1 ч

460 нм. Увеличение поглощения при 460 нм не характерно для спектральных характеристик продукта реакции модификации — нитротирозиновых остатков. Сам нитротирозин не способен проникать в активный центр цитохрома Р-450 и взаимодействовать с гемовым хромофором, поскольку его добавление к цитохрому Р-450 не приводит к заметным изменениям спектральных характеристик гемопротейда. Однако в результате модификации цитохрома Р-450 тетранитрометаном образуются спектры, напоминающие спектры поглощения гиперпорфириновых структур гемопротейдов, свидетельствуя о нарушении гем-белковых контактов в цитохроме Р-450 в результате модификации. Полученные результаты, на наш взгляд, подтверждают высказанное ранее предположение о том, что в процесс модификации вовлекаются остатки тирозина активного центра цитохрома Р-450, а образующиеся в результате модификации нитрогруппы взаимодействуют с железом гема цитохрома Р-450. Образование гиперпорфириновых спектров при модификации цитохрома Р-450 LM_2 тетранитрометаном было показано ранее [25].

Влияние модификации остатков тирозина на конформацию цитохрома Р-450

В области поглощения пептидных хромофоров (200–250 нм) в результате модификации тетранитрометаном (50-кратный избыток) происходит уменьшение эллиптичности при 208 и 218 нм (рис. 6а). Несовпадение спектров КД нативного и модифицированного цитохрома Р-450 в УФ-области указывает на то, что нитрование приводит к изменению степени спирализации белка. Уменьшение эллиптичности, характеризующей степень упорядоченности вторичной структуры белка, вызвано также, по-видимому, частичной инактивацией цитохрома Р-450 в результате модификации. Например, известно, что инактивация цитохрома Р-450 LM_2 микросом печени кроликов с превращением его в цитохром Р-420 сопровождается уменьшением отрицательной эллиптичности гемопротейда [26].

В области поглощения ароматических хромофоров (250–300 нм) в результате модификации цитохрома Р-450 тетранитрометаном происходит значительное увеличение отрицательной эллиптичности гемопротейда (рис. 6б). Так как полосы поглощения в спектрах КД в районе 270 нм обусловлены оптической активностью остатков тирозина и гема, изменение спектра в этой области после модификации тирозиновых остатков подтверждает участие данных аминокислотных остатков в гем-белковом взаимодействии.

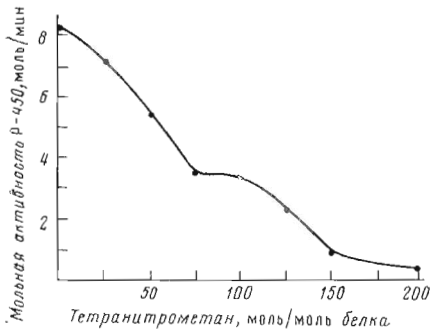


Рис. 7

Рис. 7. Изменение ферментативной активности цитохрома P-450 в реакции превращения холестерина в прегненолол при его модификации тетранитротетаном. Условия нитрования см. рис. 2, время 1 ч

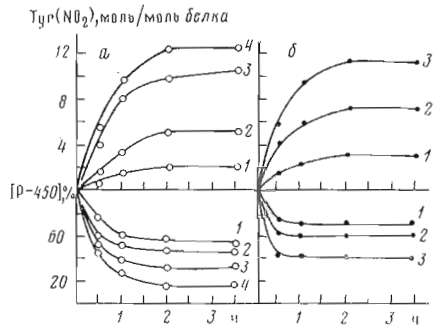


Рис. 8

Рис. 8. Влияние агрегатного состояния цитохрома P-450 на степень его нитрования в зависимости от времени реакции при использовании 25- (1), 50- (2), 150- (3) и 200-кратного (4) молярного избытка тетранитротетана. а — нитрование в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,3% холата натрия и 1 М KCl; б — нитрование в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4

Влияние модификации остатков тирозина цитохрома P-450 на каталитическую активность гемопротеида

Инактивация гемопротеида, как результат модификации, приводит к потере ферментативной активности цитохрома P-450 в холестерингидроксилирующей системе (рис. 7). Этот факт может свидетельствовать в пользу функциональной важности остатков тирозина для проявления цитохромом P-450 каталитических свойств. Следует отметить, что ферментативная активность, как и содержание формы P-450, изменяется ступенчато (ср. рис. 3). Первоначально происходит частичное падение ферментативной активности, затем фермент проявляет некоторую устойчивость по отношению к модификатору, и, наконец, наступает резкое уменьшение способности катализировать реакцию вплоть до полного исчезновения активности.

Влияние агрегатных и синовых состояний цитохрома P-450 на процесс модификации

Для оценки доступности остатков тирозина в молекуле цитохрома P-450 ями была изучена химическая модификация гемопротеида, находящегося в разных агрегатных состояниях.

Цитохром P-450 в октамерной форме характеризуется большей устойчивостью при обработке тетранитротетаном по сравнению с мономером (рис. 8). В то же время в случае октамера при использовании одинаковых молярных избытков тетранитротетана количество модифицированных остатков тирозина существенно выше (рис. 8а). Таким образом, процесс агрегации цитохрома P-450 сопровождается экспонированием дополнительных, функционально менее важных, остатков тирозина. Такое предположение хорошо согласуется с экспериментальными данными по ионизации гидроксильных групп тирозиновых остатков в молекулах мономера и агрегата, также свидетельствующими о том, что в случае агрегатного состояния число доступных титруемых групп остатков тирозина выше (данные не приведены).

Как уже указывалось, цитохром может существовать в виде высоко- и низкосиновой форм. Переход из одного состояния в другое сопровождается существенными изменениями в области гемового хромофора. Не исключено, что такие перестройки в области активного центра сопровождаются значительными конформационными изменениями в молекуле белка. Чтобы проверить правильность нашего предположения, мы провели также модификацию остатков тирозина молекулы цитохрома P-450, лишенного

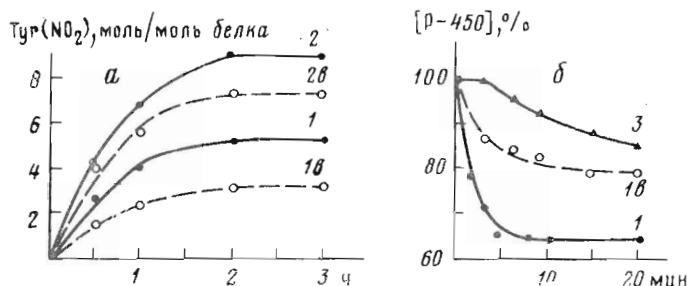


Рис. 9. Нитрование низкоспиновой формы цитохрома Р-450 25- (1) и 50-кратным (2) мольным избытком тетранитрометана в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,3% холата натрия и 1 М КСl (а), и инактивация этой же формы гемопротейда, а также цитохрома Р-450 в присутствии адренодоксина (моль/моль) (3) при нитровании 25-кратным мольным избытком тетранитрометана в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4 (б). Для сравнения приведены соответствующие характеристики для высокоспиновой формы (1в, 2в)

субстрата. Как следует из рис. 9, низкоспиновая форма цитохрома Р-450 содержит больше остатков тирозина, подвергающихся модификации, чем высокоспиновая форма. Разница примерно в два остатка тирозина, полученная при 25-кратном избытке тетранитрометана, свидетельствует о наличии как минимум двух остатков тирозина в центре связывания холестерина цитохромом Р-450. Так как высокоспиновая форма образуется при комплексобразовании цитохрома Р-450 с холестерином и адренодоксином и участок, ответственный за взаимодействие с субстратом находится в непосредственной близости к гемовому хромофору [27], полученные данные указывают на то, что связывание цитохрома с холестерином приводит к экранированию остатков тирозина, локализованных в активном центре.

Для сравнения нами было проведено нитрование цитохрома Р-420, полученного обработкой высокоспиновой формы гемопротейда 0,3% дезоксихолатом натрия. Полученные данные (не приведены) свидетельствуют о том, что процесс превращения цитохрома Р-450 в цитохром Р-420 не влияет на картину нитрования, что не согласуется с результатами работы [28], в которой высказано предположение о том, что процесс превращения цитохрома Р-450 в цитохром Р-420 сопровождается экранированием остатков тирозина.

Влияние холестерина и адренодоксина на процесс инактивации цитохрома Р-450 тетранитрометаном

Высокоспиновая форма цитохрома Р-450, содержащая эндогенно связанный холестерин, содержит меньше остатков тирозина, подвергающихся модификации, чем низкоспиновая форма, что предполагает защиту цитохрома Р-450 субстратом от инактивации. Однако ввиду очень ограниченной растворимости холестерина мы не смогли показать прямо стабилизирующий эффект данного соединения на инактивацию низкоспиновой формы. Вместе с тем мы обнаружили взаимосвязь между спектрофотометрическим индексом $(393-470)/(417-470)$, который характеризует степень насыщенности цитохрома Р-450 субстратом, и повышением устойчивости к тетранитрометану. Чем больше индекс, т. е. чем насыщеннее цитохром Р-450 субстратом, тем он устойчивее по отношению к тетранитрометану. Это позволило заключить, что субстрат реакции — холестерин — защищает цитохром Р-450 от инактивации тетранитрометаном, и подтверждает ранее сделанный вывод о вовлечении в процесс модификации остатков тирозина активного центра цитохрома Р-450.

Известно, что цитохром Р-450 образует бинарные комплексы с адренодоксином [29]. Чтобы определить, затрагивает ли модификация участки, ответственные за взаимодействие с адренодоксином, мы провели модификацию цитохрома Р-450, находящегося в 50 мМ фосфатном буфере, в присутствии стехиометрических количеств адренодоксина. Присутствие адре-

нодоксина приводит к повышению стабильности цитохрома P-450 по отношению к тетранитрометану (рис. 9б). Уменьшение степени инактивации цитохрома P-450 под влиянием тетранитрометана в присутствии аденодоксина не может быть объяснено снижением концентрации модификатора в ходе взаимодействия с аденодоксином, так как последний содержит лишь один остаток тирозина, способный подвергаться нитрованию [30].

Таким образом, высокоспиновые эффекторы, значительно влияющие на активный центр цитохрома P-450, изменяя его спиновое состояние, оказывают защитный эффект на гемопротеид по отношению к реакции модификации тетранитрометаном, свидетельствуя о том, что процесс модификации, сопровождающийся инактивацией гемопротеида, связан с нитрованием остатков тирозина, имеющих принципиальное значение для поддержания нативной конформации.

Представленные в настоящей работе аргументы позволяют предположить, что остатки тирозина в молекуле цитохрома P-450 имеют большое функциональное значение, принимая непосредственное участие в формировании активного центра цитохрома P-450.

Экспериментальная часть

В работе использовали холат натрия, холестерин, прегненолон, тетранитрометан, 2,2'-дипиридилдисульфид (Serva, ФРГ), дитиотреит, глюкозо-6-фосфат (Reanal, ВНР), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту), NADPH (Boehringer, ФРГ), сефадекс G-50 (тонкий), сефарозу 4В, активированную бромцианом, 2',5'-ADP-сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), 3-нитротирозин (Sigma, США). Другие реактивы — отечественного производства.

Выделение аденодоксина. Аденодоксин выделяли по методу [31] с некоторыми модификациями. Конечные препараты гомогенны, по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, и характеризуются спектрофотометрическим индексом A_{414}/A_{280} , равным 0,83. Концентрацию аденодоксина определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции $1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 414 нм [32]. Иммуобилизацию аденодоксина на активированной бромцианом сефарозе 4В проводили согласно [33].

Выделение аденодоксинредуктазы. Аденодоксинредуктазу выделяли биоспецифической хроматографией на аденодоксин-сефарозе 4В, как описано ранее [31]. После элюирования аденодоксин-редуктазы с аффинной колонки 0,5 М КСl в дальнейшем проводили не гель-хроматографию, а аффинную хроматографию на 2',5'-ADP-сефарозе 4В. Редуктазу диализовали против 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, и наносили на колонку (2×5 см) с 2',5'-ADP-сефарозой 4В. Колонку промывали 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,2, затем концентрацию буфера повышали до 50 мМ и элюировали аденодоксинредуктазу последним буфером, содержащим 1 мМ NADP⁺. Белок диализовали для удаления NADP⁺ против 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,2. Аденодоксинредуктаза гомогенна, по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, и характеризуется спектрофотометрическим индексом A_{272}/A_{450} , равным 7,7. Концентрацию аденодоксинредуктазы определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 450 нм [33].

Выделение цитохрома P-450 из митохондрий коры надпочечников быка. Цитохром P-450 выделяли по методу [10] с некоторыми модификациями. Экстрагированный холатом натрия (0,5 мг детергента на 1 мг митохондриального белка) цитохром P-450 подвергали фракционированию сульфатом аммония от 33 до 45% насыщения. Осадки, содержащие цитохром P-450, диализовали против 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4. Цитохром P-450 центрифугировали при 58 000g в течение 30 мин на центрифуге Beckman L8-70 (ротор Ti-19) и наносили на колонку (2,2×12 см) с аденодоксин-сефарозой 4В. Колонку промывали 50 мМ фосфатным буфером, pH 7,4, затем 2–3 объемами того же буфера, но содержащего 0,4 М КСl, и элюировали цитохром P-450 исходным буфером, содержащим 0,3% холата натрия

и 1 М КСl. Фракции, содержащие цитохром Р-450, с индексом A_{393}/A_{280} , не меньшим 0,55, разводили в 10 раз исходным буфером и подвергали хроматографии на аденодокси-сефарозе 4В. Цитохром Р-450 после промывки колонки 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, с 0,4 М КСl, элюировали исходным буфером, содержащим 0,3% холата натрия и 1 М КСl, и использовали для экспериментов. Очищенный цитохром Р-450 гомогенен, по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, и характеризуется спектрофотометрическим индексом A_{393}/A_{280} , равным 0,8—0,83. Удельное содержание цитохрома Р-450 составляет 15—16 нмоль на 1 мг белка. Спектральные параметры свидетельствуют, что железо гема выделяемого белка находится в высокоспиновом состоянии. Концентрацию цитохрома Р-450 оценивали из разностных спектров карбонильного комплекса гемопротеида, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 450 нм [34].

Получение апоцитохрома Р-450. В случае удаления гема подкисленным ацетоном [14] к аликвоте белка (1 мл) добавляли 1 мл подкисленного раствора ацетона и выдерживали на холоде 15—20 мин. Затем добавляли 9 мл холодного ацетона и центрифугировали при 6000g 15 мин. Осадок белка растворяли в 50 мМ фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 6 М хлоридрат гуанидина, или в 0,5% растворе додецилсульфата натрия, содержащем 2% раствор КОН (для создания щелочной среды). В случае экстракции гема бутанолом [15] к аликвоте белка (1 мл), предварительно подтитрованной до рН 2,0, добавляли 1 мл холодного бутанола. Смесь встряхивали и верхний слой, содержащий гем, отбрасывали. Полученный таким образом апофермент подщелачивали до рН 8,0 и для улучшения растворимости добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 0,5%.

Получение свободного от субстрата (низкоспинового) цитохрома Р-450. Для удаления холестерина из активного центра цитохрома Р-450 к 100 нмоль гемопротеида добавляли 2 нмоль аденодоксиинредуктазы и 4 нмоль аденодоксина и 1 мМ NADPH. За превращением высокоспиновой формы цитохрома Р-450 в низкоспиновую в процессе метаболизма эндогенного холестерина следили спектрофотометрически по уменьшению поглощения при 417 нм. По истечении 20 мин, когда процесс заканчивается полностью, цитохром Р-450 наносили на колонку (1×5 см) с аденодокси-сефарозой. В свободном объеме колонки элюировался аденодоксин, тогда как аденодоксиинредуктаза элюировалась при промывке колонки 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,4 М КСl. Цитохром Р-450 элюировали исходным буфером, содержащим 0,3% холата натрия и 1 М КСl. По своим оптическим характеристикам полученный цитохром Р-450 является типичным низкоспиновым гемопротеидом и не содержит эндогенного холестерина. Соотношение спектрофотометрического индекса $(393-470)/(418-470)$ изменяется после превращения высокоспиновой формы в низкоспиновую с 1,6 до 0,35, характерного для белка, свободного от субстрата.

Модификация цитохрома Р-450 тетранитрометаном. Модификацию остатков тирозина холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 проводили в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 20% глицерина, либо в таком же буфере, но содержащем 0,3% холата натрия и 1 М КСl для дезагрегации гемопротеида до мономерной формы. Реакцию модификации начинали добавлением свежеприготовленных спиртовых растворов тетранитрометана. Контрольные пробы содержали равные аликвоты растворителя. В определенные моменты времени из реакционной смеси отбирали аликвоты и добавляли к 10-кратным избыткам дитиотрейта, для того чтобы остановить реакцию, и затем тетранитрометан и другие побочные продукты реакции удаляли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 (тонкий). Содержание растворителя в инкубационной среде не превышало 1%.

Определение ферментативной активности. Ферментативную активность нативных и модифицированных препаратов цитохрома Р-450 определяли в реконструированной системе, содержащей 1,25 нмоль аденодоксиинредуктазы, 6,25 нмоль аденодоксина и 1,25 нмоль цитохрома Р-450. После предварительной инкубации в течение 10 мин добавляли 200 мкМ Твин-20, 50 мкМ холестерин и $[^3\text{H}]$ холестерин (100 000 имп/мин). После инкубации

в течение 20 мин реакцию начинали добавлением NADPH-генерирующей системы (0,1 мМ NADP⁺, 1мМ глюкозо-6-фосфат и 1 МЕ глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы). Реакцию останавливали добавлением 0,25 мл 0,5 М HCl, после чего холестерин и продукты реакции гидроксилирования экстрагировали 2 раза этилацетатом, порциями по 2 мл. Экстракты объединяли и упаривали на ротаторном испарителе при 40° С. Осадок растворяли в 10 мкл этилацетата и хроматографировали на пластинках силуфола в системе гексан — эфир — уксусная кислота (15 : 15 : 1) с добавлением стандартных растворов холестерина и прегненолона. После разделения стероидов хроматограммы обрабатывали парами иода. Пятна, соответствующие холестерину и прегненолону, вырезали и помещали в флаконы, содержащие по 4мл сцинтилляционной жидкости MC-7. Радиоактивность определяли на приборе Mark III. Удельную активность цитохрома P-450 выражали в молях образующегося прегненолона на 1 моль цитохрома P-450 за 1 мин.

Аминокислотный анализ. Нативный и модифицированный цитохром P-450 подвергали обработке подкисленным ацетоном для удаления гема, промывали осадок водой и высушивали. Кислотный гидролиз проводили в 6 М HCl при 110° С в течение 24 ч в запаянных стеклянных ампулах. Для предотвращения потери тирозина и нитротирозина при гидролизе в образцы цитохрома P-450 добавляли 0,1% фенола. Аминокислотный анализ проводили согласно [35] на аминокислотном анализаторе LKB-2301, используя в качестве стандарта цитротирозин.

Определение сульфгидрильных групп. Определение общего количества сульфгидрильных групп до и после модификации проводили с помощью 5,5-дитиобис-нитробензойной кислоты после удаления избытка модификатора и продуктов реакции гель-фильтрацией в присутствии денатурирующих агентов. Количество сульфгидрильных групп определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции 13,6 мМ⁻¹ см⁻¹ при 412 нм для тионитробензойной кислоты. В экспериментах по защите сульфгидрильных групп цитохрома P-450 гемопротеид предварительно модифицировали 2,2'-дипиридилдисульфидом, затем удаляли избыток модификатора гель-фильтрацией и подвергали (предварительно модифицированный по сульфгидрильным группам белок) модификации тетранитрометаном. После модификации тетранитрометаном к цитохрому P-450 добавляли избыток дитиотреита для удаления избытка модификатора и снятия защиты сульфгидрильных групп и подвергали белок гель-фильтрации для удаления побочных продуктов реакции.

Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия проводили в 7,5% полиакриламидном геле согласно [36]. Гели окрашивали кумасси голубым R-250.

Оптические измерения были выполнены на спектрофотометре Specord M-40 (Karl Zeiss, ГДР). Спектры кругового дихроизма в УФ-области регистрировали на автоматическом спектрополяриметре Jasco J-20 (Япония), используя в диапазоне 200—250 нм кюветы с длиной оптического пути 0,1 см, а в диапазоне 250—300 нм — кюветы с длиной оптического пути 0,5 см.

Авторы выражают признательность Л. Г. Мартинович за проведение экспериментов по аминокислотному анализу модифицированных образцов цитохрома P-450 и Г. С. Янковской за помощь в снятии спектров кругового дихроизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Simpson E. R., Boyd G. S. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, v. 24, № 1, p. 10—17.
2. Simpson E. R., Boyd G. S. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1967, v. 28, № 4, p. 945—950.
3. Simpson E. R. Mol. and Cell. Endocrinol., 1981, v. 13, № 3, p. 213—227.
4. Omura T., Sanders E., Estabrook R. W., Cooper D. Y., Rosental O. Arch. Biochem. and Biophys., 1966, v. 190, № 3, p. 660—666.
5. Shikita M., Hall P. F. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1974, v. 71, № 5, p. 1441—1445.
6. Wang H.-P., Kimura T. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 19, p. 6068—6074.
7. Takemori S., Sahara K., Hashimoto M., Sato H., Gomi T., Katagiri M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, v. 63, № 3, p. 588—593.

8. Seybert D. W., Lankaster J. R., Lambeth J. D., Kamin H. J. *Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 23, p. 12088-12098.
9. Suhara K., Gomi T., Sato H., Itagaki E., Takemori S., Katagiri M. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1978, v. 190, № 1, p. 290-299.
10. Akhrem A. A., Lapko V. N., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. *Acta biol. et med. Germ.*, 1979, v. 38, № 2-3, p. 257-273.
11. Dus K. In: *Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450* / Ed. J.-A. Gustafsson. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomed. Press, 1980, p. 129-132.
12. Sokolovski M., Riordan J. F., Vallee B. L. *Biochemistry*, 1966, v. 5, № 11, p. 3582-3589.
13. Kido T., Arakawa M., Kimura T. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 17, p. 8377-8385.
14. Yu C.-A., Gunsalus I. C. *J. Biol. Chem.*, 1974, v. 249, № 1, p. 107-110.
15. Teale F. W. J. *Biochim. et biophys. acta*, 1959, v. 35, № 2, p. 543.
16. Tsou Chen-Lu. *Sci. Sin.*, 1962, v. 11, p. 1535-1558.
17. Riordan J. F., Vallee B. L. *Methods Enzymol.*, 1972, v. 25, p. 515-522.
18. Metelitzka D. I., Akhrem A. A., Eriomin A. N., Kissel M. A., Usanov S. A. *Acta biol. et med. Germ.*, 1979, v. 38, № 2-3, p. 511-518.
19. Ахрем А. А., Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. *Биофизика*, 1980, т. 25, № 1, с. 75-81.
20. Cautrecasas P., Fuchs S., Anfinsen C. B. *J. Biol. Chem.*, 1968, v. 244, № 2, p. 406-412.
21. Brislow A. F., Virden R. *Biochem. J.*, 1978, v. 169, № 12, p. 381-388.
22. Bruce T. C., Gregory J. J., Walters S. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1968, v. 90, № 7, p. 1612-1619.
23. Williams J., Lowe J. M. *Biochem. J.*, 1971, v. 121, № 1, p. 203-209.
24. Schenkman J. B., Sligar S. G., Cinti D. L. *Pharmacol. Ther.*, 1980, v. 12, p. 178-184.
25. Епинг Г.-Р., Сметтан Г., Усанов С. А., Фридрих Е., Бернхардт Р., Рукпауль К., Ахрем А. А. Симпозиум «Цитохром Р-450. Структура и функция». Тезисы докладов. Минск, 1982, с. 8.
26. Chiang Y.-L., Coon M. J. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1979, v. 195, № 1, p. 178-187.
27. Sheets J. J., Vickery L. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 19, p. 5773-5777.
28. Kido T., Kimura T. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 23, p. 11806-11815.
29. Katagiri M., Takikawa O., Sato H., Suhara K. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 77, № 2, p. 804-809.
30. Tanaka M., Hanui M., Yasunobu K., Kimura T. *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 4, p. 1141-1157.
31. Ахрем А. А., Шкумаров В. М., Чащин В. Л. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 6, с. 780-786.
32. Schleyer H., Cooper D., Rosental O. *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 16, p. 6103-6115.
33. Sugiyama T., Yamano T. *FEBS Lett.*, 1975, v. 52, № 1, p. 145-148.
34. Omura T., Sato R. *J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, № 7, p. 2370-2378.
35. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. *Anal. Chem.*, 1958, v. 30, p. 1190-1206.
36. Laemmli U. K. *Nature*, 1970, v. 227, № 3, p. 680-685.

Поступила в редакцию

3.V.1983

После доработки

26.VII.1983

SELECTIVE CHEMICAL MODIFICATION BY TETRANITROMETHANE OF CYTOCHROME P-450 FROM THE ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA

USANOV S. A., PIKULEVA I. A., CHASHCHIN V. L., AKHREM A. A.

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

Selective chemical modification of adrenocortical cytochrome P-450 responsible for the key stages in steroid biogenesis has been carried out. Nitration is followed by the heme-protein inactivation and loss of enzymatic activity. Analysis of the cytochrome P-450 nitration kinetics revealed several types of tyrosine residues differing in their accessibility for the reagent. Modification of only one or two tyrosine residues brought about the enzyme inactivation. Modification was accompanied by changes in the cytochrome P-450 spectral properties. Cholesterol and adrenodoxin protected cytochrome P-450 against inactivation by tetranitromethane. The data obtained are discussed in terms of functional role of tyrosine residues in the cytochrome P-450 molecule.