



УДК 577.152.1.03:577.112.4:543.42

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ  
ТЕТРАНИТРОМЕТАНОМ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА В ДОМЕНАХ  
ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА P-450***Чащин В. Л., Шкулева И. А., Усанов С. А.,  
Ахрем А. А.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

В продолжение ранее выполненных работ по структурно-функциональному исследованию холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 митохондрией коры надпочечников в настоящей работе изучено распределение модифицированных тетранитрометаном остатков тирозина в отдельных доменах гемопротейда. С помощью хроматографии тиол-дисульфидного обмена и электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия выделены фрагменты F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> модифицированного цитохрома P-450. Установлено, что модификации тетранитрометаном подвергаются остатки тирозина, локализованные во фрагменте F<sub>1</sub> — гемсодержащем каталитическом домене молекулы гемопротейда.

Цитохром P-450-зависимая холестерингидроксилирующая система митохондрией коры надпочечников ответственна за скоростьлимитирующие стадии биосинтеза стероидных гормонов из холестерина [1]. Вместе с другими компонентами электронно-транспортной цепи — аденодоксин-редуктазой и аденодоксином — гидроксилирующая система осуществляет перенос электронов от NADPH на молекулярный кислород. Один атом активированного таким образом кислорода внедряется в молекулу окисляемого соединения, а другой восстанавливается до молекулы воды. Предполагается, что в молекуле холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 помимо каталитического центра имеется аденодоксинсвязывающий участок и участок, ответственный за связывание с фосфолипидной мембраной. Взаимодействия, обеспечивающие образование комплексов с холестерином и аденодоксином, а также связывание цитохрома P-450 с мембраной, носят скорее всего преимущественно гидрофобный характер [2, 3].

Известно, что молекула холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 в результате ограниченного протеолиза трипсином расщепляется на два фрагмента — F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>, молекулярные массы которых равны соответственно 27 000 и 22 000 [4]. Установлено, что фрагмент F<sub>1</sub> является гемсодержащим каталитическим доменом молекулы холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 и представляет собой N-концевую часть полипептидной цепи молекулы гемопротейда. Фрагмент F<sub>2</sub> — C-концевая часть молекулы цитохрома P-450, отвечающая, по-видимому, за взаимодействие с фосфолипидной мембраной [5]. Важно отметить, что ограниченный протеолиз цитохрома P-420, образующегося в результате инактивации цитохрома P-450, имеет иную картину [6].

Недавно нами показано, что нитрование одного-двух остатков тирозина в молекуле цитохрома P-450 приводит к его инактивации [7, 8]. Возможно, это объясняется тем, что модификации подвергаются функционально важные остатки тирозина. В таком случае эти остатки должны находиться во фрагменте F<sub>1</sub>, содержащем каталитический участок молекулы цитохрома P-450. Последнее предположение проверено в настоящей работе.

Для локализации модифицированных остатков тирозина использованы препараты цитохрома P-450, содержащие в среднем 1,6 остатка нит-

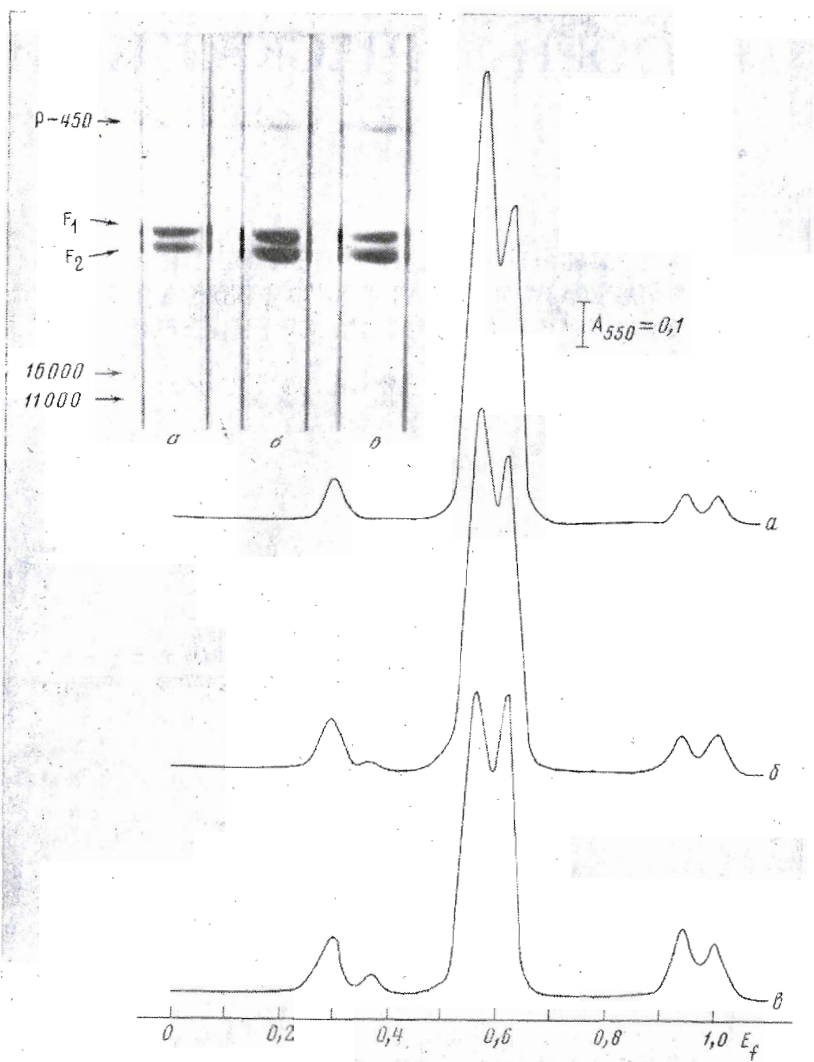


Рис. 1. Электрофорез и денситограммы образцов цитохрома P-450, подвергнутого ограниченному протеолизу трипсином: *a* — немодифицированный гемопроteid, *б* и *в* — препараты цитохрома P-450, нитрованные 25- (*б*) и 50-кратными (*в*) мольными избытками тетранитротетана в течение 1 ч

ротирозина на молекулу белка. С помощью трипсина белок расщепляли на два фрагмента, которые по электрофоретической подвижности идентичны фрагментам  $F_1$  и  $F_2$  нативного гемопротеида (рис. 1). Фрагменты  $F_1$  и  $F_2$  разделяли с помощью хроматографии тиол-дисульфидного обмена, которая ранее была применена для разделения фрагментов ограниченного трипсинолиза немодифицированного цитохрома P-450 [9]. Этим методом был получен электрофоретически гомогенный фрагмент  $F_1$  (рис. 2б) и фракция, содержащая фрагмент  $F_2$  и нерасщепленный цитохром P-450. Для разделения фрагмента  $F_2$  и нерасщепившегося цитохрома P-450 мы применили метод препаративного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. Полученные таким образом препараты фрагмента  $F_2$  и не расщепленного трипсином цитохрома P-450 были электрофоретически гомогенными (рис. 2в, г). Аминокислотный анализ фрагментов модифицированного белка позволил обнаружить остатки нитротирозина только во фрагменте  $F_1$  (см. таблицу).

Следует отметить, что если для исходного модифицированного белка суммарное содержание остатков тирозина и нитротирозина практически совпадает с содержанием тирозина в молекуле нативного цитохрома P-450,

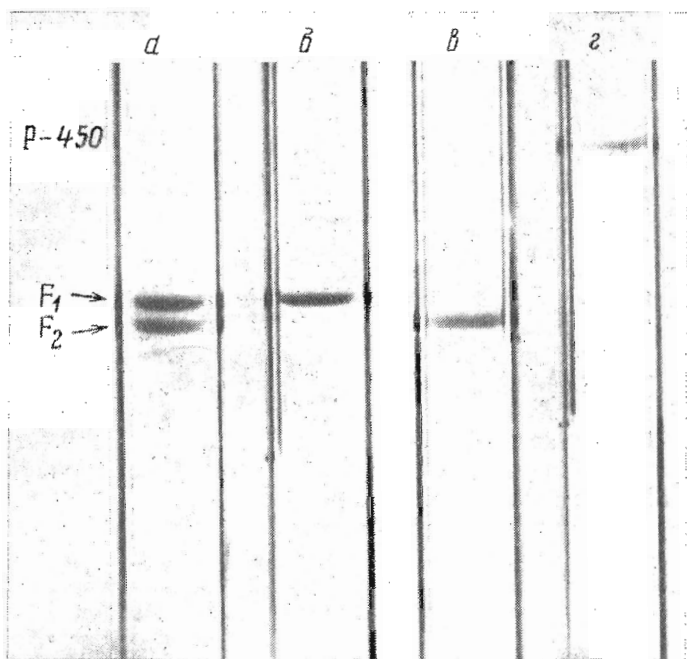


Рис. 2. Электрофорез цитохрома Р-450, модифицированного 25-кратным мольным избытком тетранитрометана и подвергнутого ограниченному протеолизу трипсином (а), а также выделенных фрагментов F<sub>1</sub> (б), F<sub>2</sub> (в) и не расщепленного трипсином гемопротейда (г)

то после обработки гемопротейда трипсином и отделения фрагментов друг от друга во фрагменте F<sub>1</sub> было обнаружено на остаток нитротирозина меньше, чем в исходном белке. Вместе с тем аминокислотный анализ фрагмента F<sub>2</sub>, не содержащего остатков нитротирозина, позволяет обнаружить все пять остатков тирозина, присутствующих в этом фрагменте до модификации. Причины уменьшения количества остатков нитротирозина в процессе расщепления белка и разделения фрагментов в настоящее время неясны. Однако известно, что в случае белков, модифицированных тетранитрометаном, результаты определения содержания остатков нитротирозина с помощью аминокислотного анализа часто оказываются заниженными. Так, например, исчерпывающая модификация тетранитрометаном аденодоксина, содержащего только один остаток тирозина, приводит к продукту, в котором удается обнаружить только 0,63 остатка нитротирозина [11].

В таблице для сравнения приведены данные аминокислотного анализа модифицированного цитохрома Р-450, не подвергнутого ограниченному трипсинолизу. Этот белок содержит остаток нитротирозина и 15 остатков тирозина. Здесь также наблюдается некоторое несоответствие между

Содержание остатков тирозина и нитротирозина в модифицированном тетранитрометаном холестерингидроксилирующем цитохроме Р-450 и в его фрагментах (моль/моль белка)

Модифицированный белок	Tyr (NO <sub>2</sub> )	Tyr *	Tyr (NO <sub>2</sub> ) + Tyr
Цитохром Р-450 до трипсинолиза	1,6	15,3(17,0)	16,9
Фрагмент F <sub>1</sub>	0,55	10,0(12,0)	10,55
Фрагмент F <sub>2</sub>	—	5,0(5,0)	5,0
Не расщепленный трипсином цитохром Р-450	1,05	15,1(17,0)	16,15

\* В скобках данные, полученные для соответствующих препаратов нативного цитохрома Р-450. Результаты аминокислотного анализа цитохрома Р-450, приведенные в работе [10], исправлены здесь в связи с установлением истинной молекулярной массы гемопротейда.

суммарным количеством остатков тирозина и нитротирозина и содержанием данной аминокислоты в молекуле цитохрома P-450. Одной из причин этого несоответствия могло бы быть частичное разрушение остатков нитротирозина в процессе кислотного гидролиза, несмотря на использованные нами во всех случаях добавки фенола, препятствующего этому процессу, однако против такого предположения свидетельствуют данные аминокислотного анализа исходного модифицированного цитохрома P-450 (см. первую строку таблицы). Наличие нерасщепившегося белка можно объяснить тем, что мы использовали минимальное соотношение трипсина — цитохром P-450, чтобы избежать дальнейшего гидролиза фрагмента F<sub>2</sub> [6], который затруднил бы процедуру локализации модифицированных остатков тирозина.

Из рис. 1 следует, что относительная интегральная интенсивность полосы, соответствующей фрагменту F<sub>1</sub>, уменьшается с увеличением степени модификации цитохрома P-450. Ранее [6] было показано, что при ограниченном трипсинолизе рН-индуцированного цитохрома P-420 происходит более значительное накопление фрагмента F<sub>2</sub> по сравнению с фрагментом F<sub>1</sub>, так как в результате рН-инактивации во фрагменте F<sub>1</sub> появляется участок полипептидной цепи, доступный действию трипсина. Этим и объясняется наличие меньших количеств фрагмента F<sub>1</sub> по сравнению с фрагментом F<sub>2</sub>. Кроме того, становится понятным образование фрагментов с молекулярными массами 11 000 и 16 000, образующихся из фрагмента F<sub>1</sub> (рис. 1).

Уменьшение количества фрагмента F<sub>1</sub> в нашем случае связано с увеличением содержания цитохрома P-420 при модификации большим избытком тетранитрометана. Образующийся в результате модификации цитохром P-420 по своей способности подвергаться ограниченному трипсинолизу, по-видимому, аналогичен рН-индуцированному цитохрому P-420 [6]. Это в свою очередь свидетельствует о том, что в результате модификации тетранитрометаном разрыхляются отдельные глобулярные участки во фрагменте F<sub>1</sub>, что приводит к увеличению их доступности для трипсина.

Таким образом, в результате проделанной работы установлено, что обработка цитохрома P-450 тетранитрометаном приводит к нитрованию остатков тирозина, локализованных во фрагменте F<sub>1</sub>. Вместе с тем для окончательного ответа на вопрос о функциональной роли остатков тирозина необходимо локализовать эти остатки в полипептидной цепи цитохрома P-450. Такая работа в настоящее время проводится в нашей лаборатории.

### Экспериментальная часть

В работе использовали холат натрия, тетранитрометан, дитиотреит (Serva, ФРГ), сефарозу 4В, активированную бромцианом, тиопропил-сефарозу 6В, сефадекс G-50, тонкий (Pharmacia, Швеция), хлоргидрат гуанидина (Merck, ФРГ), нитротирозин, кумасси G-250 (Sigma, США),

Цитохром P-450 выделяли из митохондрий коры надпочечников, как описано ранее [8]. Белок был гомогенен по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, содержал 15–16 нмоль гема на 1 мг белка и характеризовался спектрофотометрическим индексом  $A_{393}/A_{280}$ , равным 0,8–0,83 (ср. [12]). Чистота препарата подтверждена иммунохимически с помощью моноспецифической антисыворотки к цитохрому P-450.

Химическую модификацию цитохрома P-450 тетранитрометаном проводили при 25°С в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7, 4, содержащем 20% глицерин, 1 М NaCl и 0,3% холат натрия. Реакцию начинали добавлением спиртового раствора тетранитрометана (25 моль на 1 моль белка). Реакцию останавливали через 1 ч добавлением 50-кратного по отношению к тетранитрометану избытка дитиотреита.

Протеолиз цитохрома P-450 трипсином (1 моль фермента на 50 моль белка) проводили при 25°С в буфере вышеуказанного состава в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением двукратного по отношению к трипсину избытка соевого ингибитора трипсина. От трипсина, ингибитора

трипсина и низкомолекулярных продуктов трипсинолиза избавлялись хроматографией на колонке (1×1 см) с аденодоксин-сефарозой. При промывке колонки большими объемами 50 мМ фосфатного буфера все вышеуказанные примеси элюировались в свободном объеме колонки. Последующая промывка колонки 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 1 М NaCl и 0,3% хлорид натрия, приводила к элюции фрагментов F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>, а также нерасщепившегося цитохрома P-450.

Хроматографию на тиопропил-сефарозе 6В осуществляли на колонке размером 0,8×5,8 см, как описано ранее [9]. Полученный после хроматографии на аденодоксин-сефарозе препарат белка наносили на колонку с тиопропил-сефарозой 6В, уравновешенной 50 мМ фосфатным буфером, содержащим 1 М NaCl, 0,3% хлорид натрия и 1 мМ EDTA, и промывали двумя объемами того же буфера. Фрагмент F<sub>1</sub> элюировали 50 мМ фосфатным буфером, содержащим 6 М хлоридрат гуанидина и 1 мМ EDTA. Для удаления хлоридрата гуанидина смесь диализовали против воды. Выпавший осадок собирали центрифугированием, лиофилизировали и подвергали кислотному гидролизу.

Фрагмент F<sub>2</sub> и не расщепленный трипсином цитохром P-450 элюировали с тиопропил-сефарозы 6В таким же буфером, что и фрагмент F<sub>1</sub>, но содержащим 0,1 М меркаптоэтанол. Меркаптоэтанол и хлоридрат гуанидина удаляли диализом против воды. Выпавший осадок растворяли в 25% меркаптоэтанолем, содержащем 10% додецилсульфата натрия.

Разделение фрагмента F<sub>2</sub> и нерасщепившегося белка осуществляли с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия согласно работе [13]. Зоны геля, соответствующие фрагменту F<sub>2</sub> и цитохрому P-450, вырезали, измельчали, белки экстрагировали при 40°С 1% раствором додецилсульфата натрия.

Кислотный гидролиз цитохрома P-450 и его фрагментов проводили в 6 М HCl при 110°С в течение 24 ч. Для предотвращения разрушения остатков тирозина и нитротирозина в смесь добавляли фенол до концентрации 0,1%. Аминокислотный анализ выполнен на приборе LKB-3201 (Швеция).

Авторы выражают признательность Мартинович Л. Г. за помощь в проведении аминокислотного анализа модифицированного цитохрома P-450.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lambeth J. D., Seybert D. H., Lancaster J. R., Salerno J. C., Kamin H. *Molec. Cell Biochem.*, 1982, v. 75, № 1, p. 13–33.
2. Радюк В. Г., Шкумагов В. М., Чащин В. Л., Ахрем А. А. *Биохимия*, 1982, т. 47, № 10, с. 1700–1709.
3. Seybert D. H., Lancaster J. R., Lambeth J. D., Kamin H. J. *Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 23, p. 12088–12098.
4. Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкумагов В. М., Чащин В. Л. *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 5, с. 789–791.
5. Akhrem A. A., Vasilevsky V. I., Adamovich T. B., Lapko A. G., Schkumatov V. M., Chashchin V. L. In: *Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450* / Eds Gustafsson J.-A. et al. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomed. Press, 1980, p. 57–65.
6. Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г., Шкумагов В. М., Чащин В. Л. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 2, с. 285–295.
7. Usanov S. A., Pikulova I. A., Chashchin V. L., Akhrem A. A. *Abstr. of Symp. «Cytochrome P-450 and xenobiotics»*. Raifenstein, GDR, 1982, p. 19.
8. Усанов С. А., Пикужева И. А., Чащин В. Л., Ахрем А. А. *Биоорг. химия*, 1984, т. 10, № 1, с. 32–45.
9. Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкумагов В. М., Чащин В. Л. *Биоорг. химия*, 1983, т. 9, № 12, с. 1690–1692.
10. Ахрем А. А., Лапко В. Н., Лапко А. Г., Шкумагов В. М., Чащин В. Л. *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 8, с. 1201–1209.
11. Taniguchi T., Kimura T. *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 26, p. 5573–5577.
12. Akhrem A. A., Lapko A. G., Lapko V. N., Schkumatov V. M., Chashchin V. L. *Acta Biol. med. Germ.*, 1979, v. 38, № 2–3, p. 257–273.
13. Laemmli U. K. *Nature*, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–685.

Поступила в редакцию  
12.XII.1983  
После доработки  
9.II.1984

LOCALIZATION OF TETRANITROMETHANE — MODIFIED TYROSINE RESIDUES  
TO DOMAINS OF CHOLESTEROL-HYDROXYLATING CYTOCHROME P-450

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

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

As a continuation of earlier structure-function studies on cholesterol-hydroxylating cytochrome P-450 from the adrenal cortex mitochondria, the present study is concerned with the distribution of tetranitromethane-modified tyrosine residues in the hemo-protein domains. With the aid of thiol-disulfide exchange chromatography and SDS polyacrylamide gel electrophoresis the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> fragments of the modified cytochrome P-450 were isolated. Nitrated tyrosine residues were found in the F<sub>1</sub> fragment, a heme-containing catalytic domain of the molecule.