

ф

**АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

На правах рукописи

ЧЕРНОГОЛОВ Алексей Алексеевич

УДК 577.152.1.03:577.112.4:543.42

**ИМУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОХРОМ P-450-ЗАВИСИМЫХ
МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМ МИТОХОНДРИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ**

Специальность 02.00.10. - Биоорганическая химия, химия природных
и физиологически активных веществ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Минск 1993

77,1
Работа выполнена в Институте
наук Беларуси

биологической химии Академии

ЛНБ України ім.В.Стефаника



Научные руководители:

доктор химических наук 00760730 (N)
доктор химических наук С.А. Усолов

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,
профессор

Д.И. Метелица

доктор биологических наук

В.М. Шкуматов

Ведущая организация:

Белорусский государственный университет

Защита диссертации состоится _____ 1993 г.

в _____ ч. на заседании специализированного совета Д 006.22.01.
по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при
Институте биологической химии Академии наук Беларуси по адресу :
220067, Минск, Академгородок, ул. Жодинская 5/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биологической химии АН Беларуси.

Автореферат разослан _____ 1993 г.

Ученый секретарь специализированного
совета, кандидат химических наук

Н.М. Литвинко

©

Институт биологической химии АН Беларуси

Актуальность темы. Цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы являются одной из наиболее интенсивно изучаемых групп ферментов, что обусловлено их распространенностью, широким спектром катализируемых реакций, принципиальной значимостью в обеспечении гомеостаза в организме человека и животных и перспективой практического использования. Во внутренней мембране митохондрий коры надпочечников локализованы, как минимум, две цитохром Р-450-зависимые ферментные системы: холестерингидроксилирующая, реализующая ключевой этап стероидогенеза - образование прегненолона - исходного субстрата для синтеза широкого спектра эндогенных стероидов, и система, гидроксилирующая стероиды в 11 β -положение, а также участвующая в 18- и 19-гидроксилировании стероидов с образованием альдостерона. Обе системы включают в качестве промежуточных компонентов электронтранспортной цепи адренодоксинредуктазу (АР) и адренодоксин (АД), а специфичность реакций обеспечивается изоферментами цитохрома Р-450 - Р-450_{ssc} и Р-450₁₁. Строгая стерео- и региоспецифичность Р-450-зависимых реакций и их согласованность связаны с особенностями мембранной организации электронтранспортных комплексов. Важность этих реакций для биосинтеза кортикостероидов объясняет повышенный интерес к изучению организации и функционирования митохондриальных монооксигеназных систем и их терминальных оксидаз - Р-450_{ssc} и Р-450₁₁. Основные работы в этом направлении выполнены на уровне солюбилизованных и очищенных препаратов белков. В то же время, вопрос о мембранной организации митохондриальных цитохром Р-450-зависимых систем и приемлемость предложенных моделей мембранной организации микросомальных цитохромов Р-450 для исследования митохондриальных гемопротеинов остается открытым.

Цель и задачи исследования. Основная задача работы - исследование молекулярной организации холестерин- и 11 β -гидроксилирующей систем в составе внутренней мембраны митохондрий коры надпочечников быка с помощью иммунохимических подходов. Антитела к отдельным белкам и фрагментам молекулы Р-450_{ssc} использованы в качестве высокоспецифичных аналитических реагентов для количественного определения компонентов монооксигеназ, изучения их ориентации в мембране, а также для исследования структурно-функциональных взаимоотношений в монооксигеназном катализе.

Научная новизна. Впервые получены антитела к структурно оформленным элементам молекулы Р-450_{ssc}. Показано, что антитела к белкам-компонентам митохондриальных монооксигеназных систем могут служить в качестве модуляторов активности этих систем, ингибируя реакции гидроксилирования стероидов. Исследована роль отдельных участков молекулы Р-450_{ssc} в монооксигеназном катализе. Разработаны системы микроопределения АР, АД, Р-450_{ssc} и Р-450₁₁ и исследовано их содержание



в митохондриях коры надпочечников. На основании данных по взаимодействию антител с мембранами предложена модель организации монооксигеназных систем во внутренней мембране митохондрий. Показано, что два крупных домена P-450_{ssc} являются транс-мембранными. Исследована антигенная структура P-450_{ssc} и локализованы четыре антигенные детерминанты в молекуле гемопротейна.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Получение антител к белкам-компонентам монооксигеназных систем митохондрий коры надпочечников и к фрагментам молекулы P-450_{ssc} - F1, F2 и F3.
2. Исследование влияния полученных антител на реакции гидроксирования холестерина и 11-дезоксикортикостерона.
3. Разработка методов микроопределения AP, АД, P-450_{ssc} и P-450₁₁ и определение содержания белков в митохондриях коры надпочечников.
4. Исследование взаимодействия антител с митопластами и субмитохондриальными частицами.
6. Исследование антигенной структуры P-450_{ssc}.

Практическая ценность работы. Практическая ценность диссертационной работы заключается в том, что полученные в ней результаты могут служить основой для создания мембраносвязанных монооксигеназных систем, обладающих повышенной стабильностью и селективностью, а также для разработки методов модулирования активности компонентов монооксигеназ при помощи антител. Разработанные методы определения AP, АД, P-450_{ssc} и P-450₁₁ могут быть использованы для создания методов диагностики, основанных на экспресс-анализе этих белков в коре надпочечников, а также для обнаружения продуктов экспрессии генов монооксигеназ в различных биотехнологических системах.

Апробация работы. Материалы диссертации представлялись на Всесоюзной конференции "Цитохром P-450 и охрана внутренней среды человека" (Москва, 1985), Всесоюзной конференции "Цитохром P-450 и охрана окружающей среды" (Новосибирск, 1987), VII Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов (Таллинн, 1987), V Советско-швейцарском симпозиуме "Биологические мембраны: структура и функции" (Рига, 1988), 6-ой Международной конференции по биохимии и биофизике цитохрома P-450 (Вена, 1988), 14-ом Международном конгрессе по биохимии (Прага, 1988), V Всесоюзной конференции "Цитохром P-450 и модификация макромолекул" (Ялта, 1989), Всесоюзном симпозиуме "Химия белков" (Тбилиси, 1990), 20-ом конгрессе ФЕБО (Будапешт, 1990), VII Международной конференции "Биохимия и биофизика цитохрома P-450; Структура и функция, биотехнологические и экологические аспекты" (Москва, 1991), 9-ом Международном симпозиуме "Микросомы и окисление лекарств" (Иерусалим, 1992).

Публикации. По основным результатам диссертации опубликовано 9 статей и тезисы 12 докладов на конференциях.

Объем работы: ____ страниц текста, ____ рисунков и ____ таблиц. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы.

1. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ-КОМПОНЕНТАМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМ И ФРАГМЕНТАМ МОЛЕКУЛЫ P-450_{сс}

Получение антител (Анти-...) к компонентам монооксигеназных систем митохондрий коры надпочечников быка - AP, AD, P-450_{сс} и P-450₁₁ - явилось основой комплексного использования различных иммунохимических методов для изучения функции этих ферментов и их организации в мембране. На первом этапе работы была проведена иммунохимическая характеристика полученных антител, основная цель которой заключалась в исследовании их специфичности. С помощью иммунодиффузии по методу Ухтерлони и иммуноблоттинга было показано, что полученные антитела не проявляют выраженных перекрестных реакций с гетерологичными антигенами. Сравнение иммунохимических свойств ряда представителей митохондриальных и микросомальных P-450-зависимых монооксигеназ подтверждает значительные их структурные отличия, тогда как иммунохимические свойства P-450_{сс} из митохондрий коры надпочечников быка и плаценты человека очень близки.

Протеолитическая модификация P-450_{сс} в растворе трипсином приводит к образованию ряда крупных фрагментов полипептидной цепи (рис. 1), свидетельствуя о доменной структуре молекулы гемопротенина (Shahshchin et al., 1985). Нативный гемопротенин подвергается, при лимитируемом времени обработки, протеолитической атаке только в области Arg²⁸⁰-Asn²⁸⁷, в результате чего образуются фрагменты F1 и F2. С помощью иммуноэлектрофореза триптического гидролизата P-450_{сс} в присутствии Анти-P-450_{сс} было показано, что антигенные детерминанты содержатся как в F1, так и в F2. Эти результаты явились предпосылкой для получения антител к фрагментам полипептидной цепи P-450_{сс} F1 и F2, а также антител к фрагменту F3, представляющему N-концевую последовательность F2.

Анти-F1 и Анти-F2 не образуют в условиях иммунодиффузии по Ухтерлони преципитатов с F2 и F1, соответственно, а Анти-F2 и Анти-F3 перекрестно реагируют с F3 и F2. Все антитела "узнают" P-450_{сс}, что свидетельствует о совпадении антигенных детерминант фрагментов и P-450_{сс} (это не исключает различий в полном наборе детерминант изолированных фрагментов и формируемых ими участков в молекуле гемопротенина) и позволяет предположить, что большинство детерминант сформировано протяженными участками полипептидной цепи P-450_{сс}.

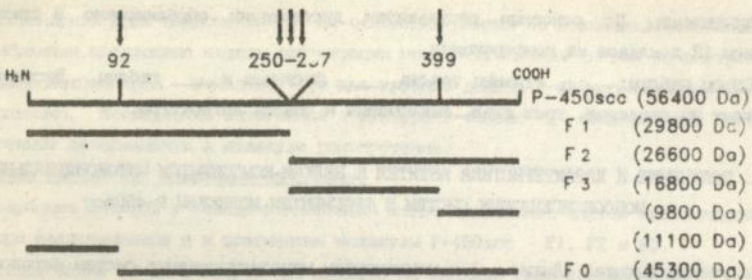
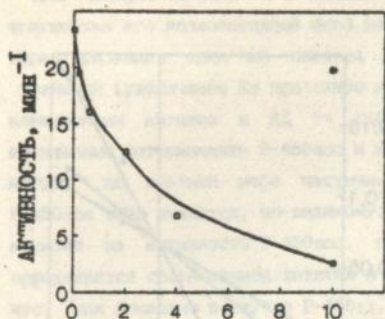


Рис. 1. Схема трипсинолиза P-450sc.

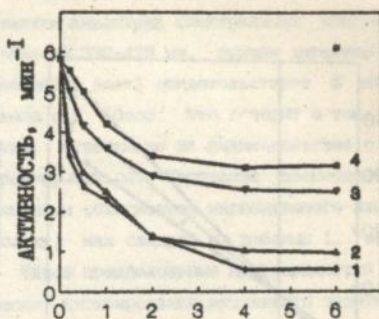
Чтобы определить эффективность и специфичность полученных антител была изучена стероидгидроксимирующая активность P-450sc и P-450₁₁ в реконструированных системах в присутствии антител. В предварительных экспериментах установлено, что Анти-АД и Анти-АР ингибируют реакции гидроксимирирования с участием обоих цитохромов P-450, но эффективность ингибироваия при этом не превышает 40% (уменьшение активности при 10-кратном молярном избытке антител). Наиболее выраженное ингибироваие реакций гидроксимирирования наблюдается в случае использования антител к терминальным компонентам - P-450₁₁ (рис. 2) и P-450sc (рис. 3). Эффект зависит от концентрации добавленных антител. Так, если в отсутствие антител активность P-450₁₁, оцененная по скорости образования кортикостерона, составляет 23 мин⁻¹, то в присутствии 2-кратного избытка Анти-P-450₁₁ она уменьшается на 46%, составляя 12.5 мин⁻¹. Ингибироваие носит специфический характер, поскольку добавление 10-кратного избытка Анти-P-450sc приводит к снижению активности лишь на 18%, что сравнимо с контрольным экспериментом, в котором использовались неиммунные антитела (15%). В присутствии Анти-P-450sc наблюдается ингибироваие холестерингидроксимирующей активности P-450sc. При 2-кратном избытке антител скорость образования прегненолона снижается с 5.8 мин⁻¹ до 1.4 мин⁻¹ (при этом в присутствии неиммунных антител наблюдается даже некоторая активация реакции). В обоих случаях в присутствии больших избытков специфических антител степень ингибироваия достигает 90%.

Для того, чтобы оценить функциональное значение доменов P-450sc, сформированных N- и C-концевыми участками его полипептидной цепи, исследовано влияние антител к F1, F2 и F3 на способность P-450sc осуществлять ферментативную трансформацию холестерина в прегненолон.



[Анти-P-450(11)]/[P-450(11)],

Рис. 2. Активность P-450₁₁ в присутствии Анти-P-450₁₁. Количество белков в пробе: 1 нмоль P-450₁₁, 5 нмоль АД, 0.4 нмоль AP. * - контроль (активность в присутствии неиведенных антител).



[Анти-P-450(вс)]/[P-450(вс)], М/М

Рис. 3. Активность P-450(вс) в присутствии Анти-P-450(вс) (1), Анти-F1 (2), -F2 (3) и -F3 (4). Количество белков в пробе: 1 нмоль P-450(вс), 4 нмоль АД, 1 нмоль AP. * - контроль.

Таблица 1. Влияние Анти-P-450(вс), Анти-F1, Анти-F2 и Анти-F3 на кинетические параметры взаимодействия гемоглобина с АД и активность P-450(вс) при различных концентрациях АД*.

Образец	[Антитела]/ [P-450(вс)], М/М	Взаимодействие с АД		Активность	
		V_{max} , Азвс-420 мМ	K_m , мМ	V_{max} , мин ⁻¹	K_m , мМ
Контроль без антител	0	0.117	9.1 (0.995)	20.0	10.0 (0.998)
В присутствии:					
- неиведенных антител	2	0.120	8.9 (0.993)	26.6	14.2 (0.995)
	4	0.118	9.2 (0.995)	28.4	15.2 (0.994)
- Анти-P-450(вс)	2	0.118	15.6 (0.997)	18.3	26.0 (0.993)
	4	0.115	16.8 (0.995)	24.9	43.6 (0.994)
- Анти-F1	2	0.136	18.6 (0.998)	25.0	32.1 (0.998)
	4	0.125	19.6 (0.999)	28.4	52.2 (0.995)
- Анти-F2	2	0.112	15.5 (0.998)	23.7	33.8 (0.996)
	4	0.112	18.9 (0.995)	26.4	41.0 (0.998)
- Анти-F3	2	0.118	15.8 (0.997)	17.5	31.0 (0.992)
	4	0.114	16.2 (0.997)	23.9	48.1 (0.993)

* - Спектрофотометрическое титрование P-450(вс) АД проводили в кюветках 1 см в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.4, при концентрации P-450(вс) - 2.9 мМ, твина 20 - 0.5%, в диапазоне концентраций АД - 4-40 мМ. Активность P-450(вс) определяли в системе, содержащей (в объеме 1 мл) 1 нмоль P-450(вс), 0.5 нмоль AP в диапазоне [АД]/[P-450(вс)] - 2-20. V_{max} и K_m , K_a и кажущуюся K_m рассчитывали, используя компьютерную программу Enzfick 3 (Biosoft, США). В скобках приведены коэффициенты корреляции для данных в координатах Лайндивера-Берта.

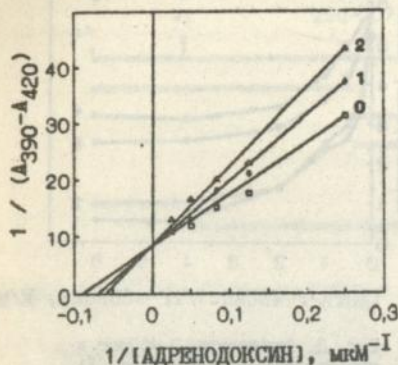


Рис. 4. Зависимость спектральных изменений низкостинновой формы Р-450всс от концентрации АД. Условия см. в подписи к таблице 1. 0 - без антител, 1 - [Анти-^п-450всс] 1 - [Анти-Р-450всс]/[Р-450всс] = 2, 2 - то же = 4.

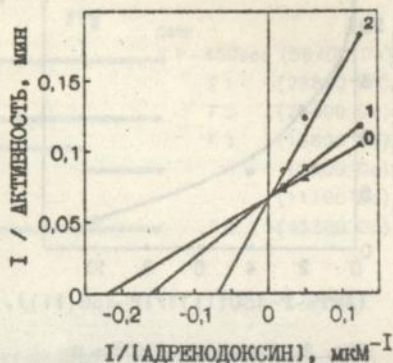


Рис. 5. Зависимость активности Р-450₁₁ от концентрации АД. Реконструированная система: 0,5 нмоль Р-450₁₁, 0,4 нмоль АР, 100 мкМ 11-дезоксикортикостерон. 0 - без антител, 1 - [Анти-Р-450₁₁]/[Р-450₁₁] = 0,2, 2 - то же = 0,6.

Как следует из рис. 3, антитела к фрагментам ингибируют реакцию превращения холестерина в pregnenolon. Эффективность ингибирования Анти-Р-450всс и Анти-F1 совпадает, а Анти-F2 и Анти-F3 оказывают меньший ингибирующий эффект. Во всех случаях ингибирование не является полным. Эти данные позволяют предположить, что в процессе катализа оба домена молекулы гемопротенина принимают участие в ферментативном акте. Это также указывает на динамичное взаимодействие отдельных участков полипептидной цепи Р-450всс и не согласуется с моделью молекулярной организации, согласно которой одна часть молекулы Р-450всс представляет собой каталитический домен, а вторая отвечает за взаимодействие с мембраной.

Механизм ингибирующего действия антител сложен и включает, по-видимому, как непосредственное взаимодействие с функционально важными участками молекулы Р-450всс, так и конформационные перестройки молекулы. Антитела не влияют на восстановление Р-450всс дитионитом натрия и его взаимодействие с холестерином. Эти результаты позволили сделать предположение о том, что антитела нарушают электронный транспорт, препятствуя взаимодействию гемопротенина с АД. Это было проверено титрованием низкостинновой формы Р-450всс, полученной при добавлении к гемопротенину твина-20, АД, являющемуся высокостинновым эффектором Р-450всс.

Как следует из рис. 4 и таблицы 2, в присутствии антител к P-450_{асс} и трем фрагментам его полипептидной цепи уменьшается амплитуда спектральных изменений, характеризующих спинный переход в области 390-420 нм, причем характер этих изменений (увеличение K_{λ} при слабо изменяющейся $\Delta\lambda_{\lambda}$) свидетельствует в пользу конкуренции антител и АД за связывание с P-450_{асс}. Это говорит о том, что антигенные детерминанты P-450_{асс} и участки, отвечающие за взаимодействие с АД, могут, по крайней мере частично, перекрываться. Нарушение взаимодействия P-450_{асс} с АД является, по-видимому, основным объяснением ингибирующего влияния антител на активность P-450_{асс}, поскольку, как следует из таблицы 1, эффект определяется соотношением антител и АД. Такое предположение подтверждается тем, что, как показано в случае P-450₁₁, степень ингибирования активности зависит от соотношения АД:гемопротенин и при больших молярных избытках АД (более 20:1) ингибирующий эффект Анти-P-450₁₁ не проявляется (рис. 5).

Таким образом, антитела к обоим цитохромам P-450 могут служить высокоспецифичными реагентами для изучения белок-белковых взаимодействий, являясь эффективными модуляторами активности этих гемопротенинов.

2. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ-КОМПОНЕНТОВ ЦИТОХРОМ P-450-ЗАВИСИМЫХ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМ ВО ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЕ МИТОХОНДРИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Основные исследования мембранной организации цитохром P-450-зависимых монооксигеназных комплексов выполнены, в основном, на микросомальных системах. В результате анализа данных о первичной структуре, ограниченного протеолиза, химической модификации и иммунохимического определения поверхностных участков белков был предложен ряд моделей мембранной организации микросомальных цитохромов P-450, большинство из которых предусматривает наличие в N-концевой области одного-двух трансмембранных участков, тогда как основная часть молекулы экспонирована на поверхности мембраны.

Топология компонентов монооксигеназных систем в мембране имеет принципиальное значение для осуществления стероидогенеза. До настоящего времени с уверенностью можно было утверждать, что NADPH-связывающий домен AP расположен на поверхности внутренней мембраны, обращенной в матрикс. Что же касается гемопротенинов, то имелось предположение, основанное на результатах ограниченного протеолиза обработанных ультразвуком препаратов митохондрий, о том, что определенные участки цитохрома P-450 могут быть экспонированы в матрикс (Churchill & Kimura, 1979). Получение антител к отдельным компонентам монооксигеназных комплексов, а также к фрагментам молекулы P-450_{асс} открыло возможности для исследования

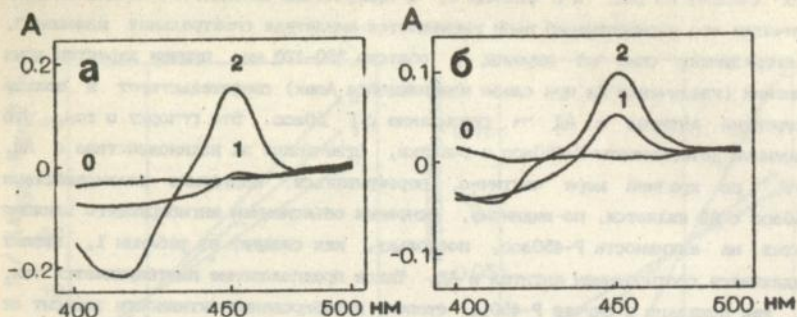


Рис. 6. Ферментативное (1) и химическое (2) восстановление цитохрома Р-450 в митохондриях (А) и СМЧ (Б). 0 - базовая линия. СМЧ были получены ультразвуковой обработкой митопластов на приборе Virsonic (Virtis, США) с последующей промывкой мембран 50 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.4.

особенностей организации этих белков во внутренней мембране митохондрий, включая изучение их стехиометрии и ориентации в мембране.

Чтобы уменьшить влияние компонентов внешней мембраны и сделать доступной цитозольную поверхность внутренней мембраны для антител в работе были использованы митопласты - митохондрии, лишенные внешней мембраны в результате обработки дигитонином. До 85 % полученных митопластов по данным электронной микроскопии сохраняли естественную ориентацию внутренней мембраны. В качестве препаратов с обратной ориентацией мембраны использовались субмитохондриальные частицы (СМЧ), полученные обработкой митопластов ультразвуком. Целостность мембранных препаратов определялась и в условиях ферментативного восстановления мембраносвязанного цитохрома Р-450 (рис. 6). При добавлении к суспензии митопластов NADPH, АД и АР восстанавливается не более 7% Р-450 (Р-450_{вос} и Р-450₁₁). Это свидетельствует о том, что NADPH-связывающий участок и АД-связывающая область в молекуле АР, а также АД-связывающие участки двух цитохромов Р-450, обращенные в матрикс, не доступны антителам. Это подтверждается тем, что в СМЧ, как в присутствии экзогенных АР и АД, так и без них при добавлении NADPH наблюдается характерный спектр карбонильного комплекса восстановленной формы Р-450, причем до 50% белка восстанавливается в данной системе.

Данные о количественном содержании и соотношении отдельных компонентов монооксигеназных систем достаточно противоречивы. Это связано с тем, что существующие спектральные методы позволяют определять только суммарный Р-450. Другие методы основаны на предварительном выделении белков или определении их

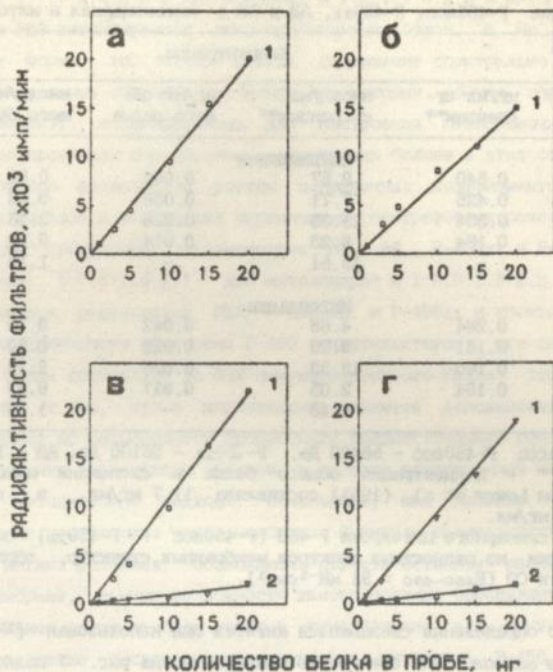


Рис. 7. Калибровочные графики для определения AP (А), АД (Б), P-450_{сс} (В) и P-450₁₁ (Г) (графики 1). После нанесения образцов, нитроцеллюлозные фильтры обрабатывали антителами соответствующей специфичности и [125 I]белком А. Графики 2 на рис. В и Г - связывание для P-450_{сс} и P-450₁₁ в присутствии Анти-P-450₁₁ и Анти-P-450_{сс}, соответственно.

специфических активностей. В ранних исследованиях (Wang et al., 1974) для AP и АД была предложена стехиометрия 1:7.6. Было показано, что соотношение AP:АД:P-450_{сс} может составлять 1:10:10 (Ohashi & Oshira, 1978). Для суммарного P-450, АД и AP было также предложено соотношение 8:3:1 (Hanukoglu & Hanukoglu, 1986).

Для прямого определения белковых компонентов митохондриальных цитохром Р-450-зависимых систем был разработан один из вариантов твердофазного радиоиммунологического анализа (РИА), основанный на физической сорбции антигенов на нитроцеллюлозных фильтрах с последующей обработкой фильтров антителами соответствующей специфичности (рис. 7). В качестве универсального реагента

Таблица 2. Содержание P-450_{всс}, P-450₁₁, АД и АР в митохондриях и митопластах.

Антиген*	Концентрация,			
	мг/мл суспензии**	нмоль/мл суспензии**	мг/мг общего белка	нмоль/мг общего белка
	Митохондрии			
P-450 _{всс}	0.540	9.57	0.046	0.82
P-450 ₁₁	0.425	7.71	0.036	0.66
АД	0.304	25.33	0.026	2.16
АР	0.164	3.23	0.014	0.28
Цитохром P-450***	-	13.51	-	1.15
	Митопласты			
P-450 _{всс}	0.264	4.68	0.042	0.75
P-450 ₁₁	0.181	3.28	0.029	0.53
АД	0.160	13.33	0.026	2.14
АР	0.104	2.05	0.017	0.33
Цитохром P-450***	-	8.48	-	1.36

* - Молекулярная масса P-450_{всс} - 56400 Да, P-450₁₁ - 55100 Да, АД - 12000 Да, АР - 50700 Да. ** - Концентрация общего белка в суспензии митохондрий, определенная методом Lowry et al. (1951) составляла 11.7 мг/мл, в суспензии митопластов - 6.23 мг/мл.

*** - Концентрацию суммарного цитохрома P-450 (P-450_{всс} + P-450₁₁) определяли спектрофотометрически из разностных спектров мембранных структур, обработанных дитионитом натрия и СО ($E_{480-490} = 91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

для количественного определения связанных антител был использован [¹²⁵I]белок А из *Staphylococcus aureus*. Как следует из приведенных на рис. 7 калибровочных графиков, радиоактивность фильтров для всех использованных антигенов прямо пропорциональна количеству антигена в диапазоне 0.5-20 нг, что соответствует 9-350 фмолям P-450_{всс} и P-450₁₁, 40-1700 фмолям АД и 10-400 фмолям АР.

Сравнение с известными методами позволяет сделать вывод о том, что разработанные тест-системы являются наиболее чувствительными при определении АР и АД и одними из наиболее чувствительных при определении P-450_{всс}. В условиях анализа не наблюдалось перекрестной реакции Анти-P-450_{всс} и Анти-P-450₁₁ с гетерологичными гемопroteинами (графики 2 на рис. 7В и 7Г), что позволило количественно охарактеризовать оба цитохрома P-450 в мембранных препаратах.

Результаты определения содержания компонентов цитохром P-450-зависимых монооксигеназ в митохондриях и митопластах, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что суммарно эти белки составляют более 12% митохондриального белка, причем массовая доля гемопroteинов является наибольшей (8.2%), а количество P-450_{всс} превышает количество P-450₁₁ в 1.4 раза. Рассчитанное из данных микроопределения молярное соотношение АР, АД, P-450₁₁ и P-450_{всс}

составляет 1:7.7:2.4:2.9 в митохондриях и 1:6.4:1.6:2.3 в митопластах. Поскольку в условиях РИА детектируется иммунореактивный белок, а не только хромофор-содержащие формы, то, чтобы учесть содержание спектрально необнаруживаемого белка в контрольных образцах (концентрацию которых обычно определяли спектрофотометрически), использованных для построения калибровочных зависимостей, параллельно проводили определение концентрации белков в этих образцах с помощью аминокислотного анализа. С учетом поправочных коэффициентов, полученных в результате анализа и отражающих ограничения спектрофотометрического определения концентрации стандартов, стехиометрия AP, AD, P-450₁₁ и P-450_{сс} может быть представлена: 1:7.9:1.9:2.7 - для митохондрий и 1:6.8:1.3:2.2 - для митопластов. Сравнение результатов РИА P-450_{сс} и P-450₁₁ и спектрофотометрического определения суммарного цитохрома P-450 свидетельствует, что спектрально детектируемые формы составляют до 80% иммунореактивного белка. Эти отличия связаны, по-видимому, с тем, что в митохондриях имеются дополнительно апо-цитохромы P-450, а также не подвергшиеся процессингу предшественники гемопротеинов.

Для изучения ориентации белков в составе естественных мембран применяются различные методические подходы, основанные, как правило, на использовании реагентов, не проникающих через мембраны. Антитела взаимодействуют с мембранными белками в мягких условиях, позволяющих изучать истинное расположение молекулы белка в мембране, причем возможности такого подхода определяются специфичностью антител. Ранее антитела были успешно использованы для иммуногистохимического анализа, а также исследования ориентации цитохрома P-450 в микросомальной мембране (Frey et al., 1985; De Lenos-Chiarandini et al., 1987).

Для изучения ориентации AP, AD, P-450_{сс} и P-450₁₁ митопласты и СМЧ инкубировали с возрастающими количествами антител соответствующей специфичности. Количество связанных антител определяли после инкубации суспензии с избытком [¹²⁵I]белка А и радиометрии мембран. Как следует из рис. 8, Анти-P-450_{сс} и Анти-AP связываются с митопластами, причем количество связанных антител определяется их соотношением с мембранным белком, достигая насыщения при 40-60-кратных избытках антител. В то же время, связывание Анти-AD и Анти-P-450₁₁ с митопластами не превышает 7.5%. В последнем случае наблюдаемое включение радиоактивности в мембраны хорошо коррелирует с содержанием в препаратах митопластов суммарного P-450, способного ферментативно восстанавливаться, и может быть объяснено взаимодействием антител с разрушенными мембранами. В случае же Анти-P-450_{сс} и Анти-AP характер связывания указывает на их специфическое взаимодействие с экспонированными на цитозольной поверхности внутренней мембраны полипептидными фрагментами белков. Полученные на митопластах данные

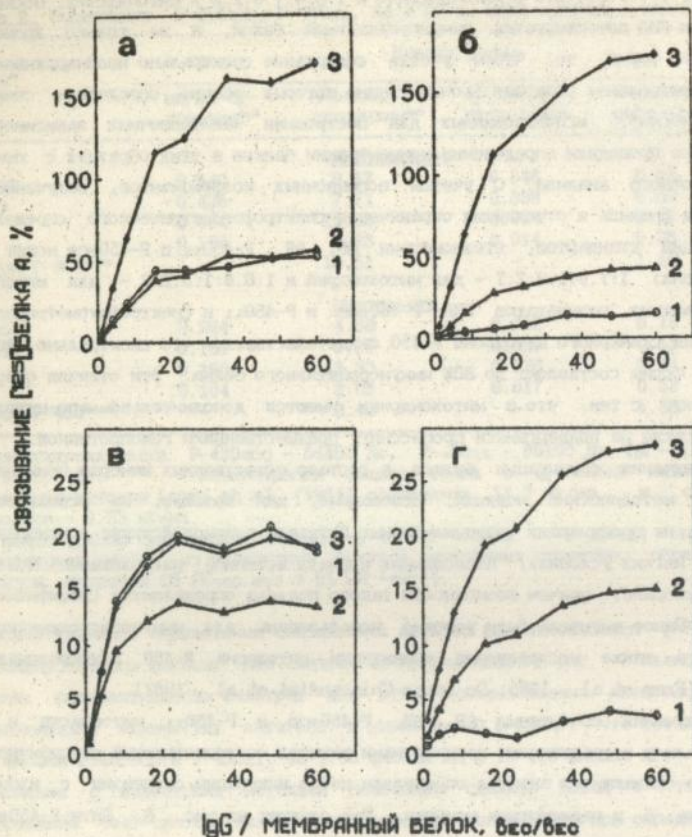


Рис. 8. Связывание Анти-АР (А), Анти-АД (Б), Анти-Р-450сс (В) и Анти-Р-450лл (Г) с митохондриями (графики 1) и СМ (графики 2). Суспензию мембран в 10 мМ трис-НС1 буфере, рН 7.4, содержащем 0.3 М сахарозу и 2% бычьего сывороточного альбумина инкубировали с возрастающими количествами специфических антител в течение 2 ч при 20°C. Затем образцы промывали, инкубировали с $[^{125}\text{I}]$ белком А, центрифугировали и радиометрировали осадки. Графики 3 - связывание антител с СМ, рассчитанное с учетом данных таблицы 3.

позволили сделать предварительный вывод о трансмембранном расположении Р-450сс во внутренней мембране митохондрий. Чтобы проверить это предположение, было

Таблица 3. Распределение компонентов монооксигеназных систем между растворимой и мембранной фракциями митохондрий, обработанных ультразвуком*.

Белок	фракция, мг белка в пробе		Относительное содержание белка в мембранной фракции, %
	растворимая	мембранная	
P-450 _{всс}	4.4	10.8	71.1
P-450 ₁₁	4.5	5.0	52.6
АД	7.6	2.4	24.0
АР	4.2	2.1	33.3

* - После ультразвуковой обработки мембранную фракцию отделяли центрифугированием и определяли количество белков в соответствующих радиоизотопических системах.

исследовано взаимодействие антител с СМЧ, содержащими внутреннюю мембрану с доступной для антител матричной поверхностью.

Ультразвуковая обработка митохондрий приводит к резкому увеличению связывания Анти-P-450₁₁ и Анти-АД. При этом уровень связывания Анти-АР и Анти-P-450_{всс} с СМЧ существенно не меняется по сравнению с митохондриями. Таким образом, антитела ко всем компонентам стероидгидроксилирующих систем специфически взаимодействуют с эпитопами соответствующих белков, экспонированными на матричной поверхности внутренней мембраны, где, по-видимому, и реализуются основные этапы белок-белковых взаимодействий. Различия в характере связывания Анти-P-450_{всс} и Анти-P-450₁₁ с митохондриями свидетельствуют о специфичности использованного иммунохимического подхода и указывают на уникальный характер мембранной организации этих гемопротеинов.

Анализ графиков на рис. 8 свидетельствует, что максимальный уровень связывания антител определяется количеством и доступностью иммунореактивного белка в мембране. Поэтому существенным фактором, влияющим на конечный результат, является удаление части белков из мембраны в процессе ультразвуковой обработки. Определение содержания компонентов монооксигеназ в митохондриях и СМЧ показало, что по сравнению с митохондриями в СМЧ удельное содержание АР на 67%, АД - на 76%, P-450_{всс} - на 29%, а P-450₁₁ - на 47% ниже (таблица 3).

Эти данные, отражающие потери белков при ультразвуковой обработке, позволяют заключить, что при интерпретации результатов связывания антител с СМЧ необходимо учитывать фактор солюбилизации белков из мембраны. Достоверная оценка связывания антител при условии отсутствия удаления белков в процессе получения СМЧ, представляется затруднительной. Однако, если предположить иммунохимическую гомогенность компонентов монооксигеназных систем и однородность их организации в мембране, то результаты по связыванию антител с СМЧ могут быть представлены в

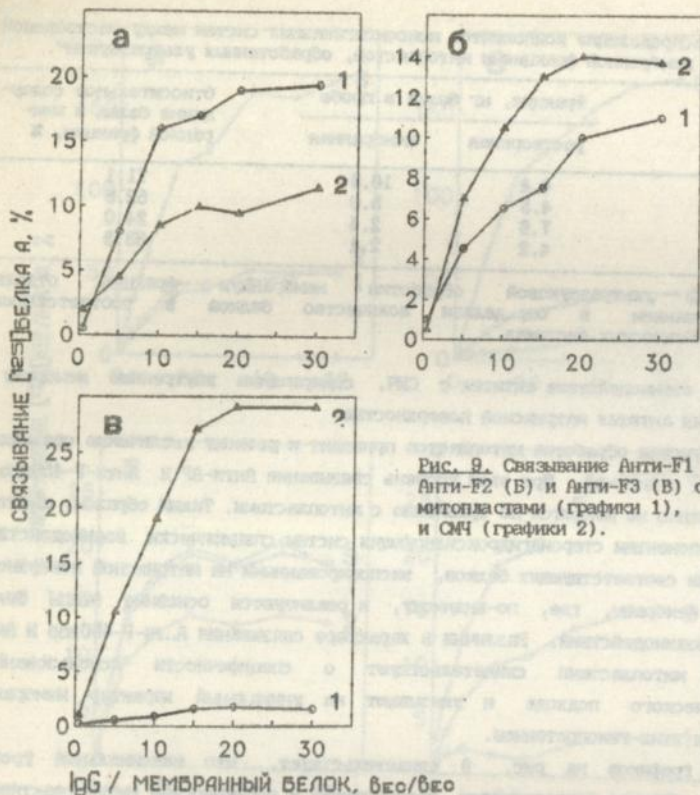


Рис. 9. Связывание Анти-F1 (А), Анти-F2 (Б) и Анти-F3 (В) с митохондриями (графики 1), и СМ (графики 2).

виде графиков, отличающихся от исходных лишь тем, что каждое полученное экспериментально значение связывания (рис. 8, графики 2) пересчитано с учетом соответствующих коэффициентов пропорциональности, отражающих количество белка в растворимой фракции: 3.03 - для AP, 4.16 - для АД, 1.41 - для P-450_{воо} и 1.89 для P-450_н. Приведенные на рис. 8 графики 3 носят условный характер, но позволяют оценить возможное связывание антител с СМ при отсутствии солюбилизации белков из мембраны.

Для исследования расположения отдельных участков молекулы P-450_{воо} относительно мембраны было изучено, в описанных выше условиях, взаимодействие с митохондриями и СМ антител к фрагментам F1, F2, и F3. Как следует из рис. 9, Анти-F1 и Анти-F2, специфически взаимодействуют как с митохондриями, так и с СМ, что подтверждает трансмембранную ориентацию гемопroteина. Принципиально важным



является тот факт, что, в отличие от Анти-F2, Анти-F3 связываются только с СМЧ. Это означает, что фрагмент F3 экспонирован преимущественно в матрикс и подтверждает правомерность использованного иммунохимического подхода для анализа укладки полипептидной цепи гемопротенина в мембране.

Эксперименты по связыванию антител с мембранами не позволили выяснить расположение области, соединяющей оба домена P-450_{ss}, которая соответствует трипсин-чувствительному участку Arg²⁵⁰-Asn²⁶⁷. Для решения этого вопроса использовали ограниченный протеолиз мембранных структур трипсином с последующим идентификацией образовавшихся пептидных продуктов иммуноблоттингом в присутствии специфических антител к P-450_{ss} и его фрагментам F1 и F2 (рис. 10).

При протеолитической обработке нативных митопластов не образуется иммунохимически детектируемых продуктов с молекулярной массой меньше, чем у P-450_{ss} (рис. 10, образец 2). В то же время, трипсинолиз СМЧ с последующим разделением растворимой и мембраносвязанной белковых фракций центрифугированием, приводил к исчезновению во фракции мембран зоны специфического окрашивания на уровне 50000 Да и появлению зон на уровне 29800 и 26600 Да, соответствующих фрагментам F1 и F2, образующимся при трипсинолизе растворимого гемопротенина. Проведенный иммуноблоттинг в присутствии Анти-F1 и Анти-F2 показал, что образующиеся при обработке СМЧ трипсином пептидные продукты P-450_{ss} иммунохимически идентичны фрагментам полипептидной цепи P-450_{ss} F1 и F2. Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что петля, связывающая домены гемопротенина в области Arg²⁵⁰-Asn²⁶⁷, обращена в матрикс.

Результаты по связыванию антител и ограниченному протеолизу мембран позволяют предложить схему расположения отдельных компонентов монооксигеназ во внутренней мембране митохондрий (рис. 11), согласно которой P-450_{ss} и AP пронизывают мембрану, а АД расположен на матриксной поверхности мембраны, являясь перимембральным белком.

Полученные данные свидетельствуют в пользу участия как N-, так и C-концевой области P-450_{ss} во взаимодействии с мембраной и позволяют говорить, что в случае митохондриальных цитохромов P-450 (по крайней мере, P-450_{ss}) реализуется модель молекулярной организации, предлагаемая для микросомальных гемопротенинов, согласно которой N-концевая последовательность осуществляет взаимодействие с мембраной, а большая часть молекулы формирует обращенный в водную фазу каталитический домен, (Nelson & Strobel, 1988, 1989; Edwards R., 1989). Проведенный по методам Chou & Fasman (1978) и Kyte & Doolittle (1982) расчет элементов вторичной структуры свидетельствует, что, в отличие от микросомальных гемопротенинов, у P-450_{ss} не имеется протяженных α-спиральных



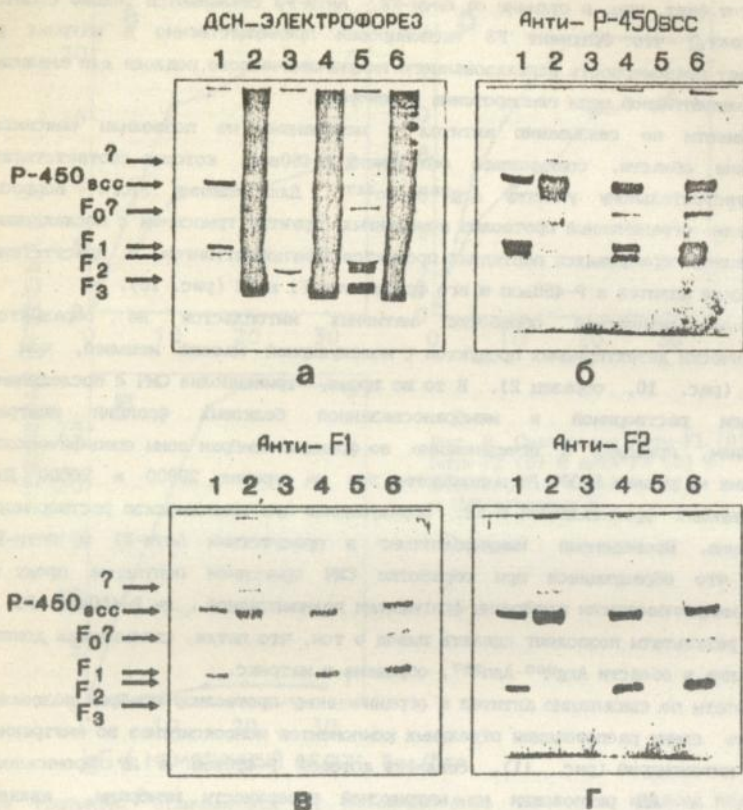


Рис. 10. Ограниченный протеолиз мембраносвязанного P-450_{csc} трипсином. А - электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия. Образцы содержали: 1 - очищенный препарат P-450_{csc} (11 мкг), обработанный трипсином в течение 20 мин при соотношении P-450_{csc}/трипсин 100:1 (контроль, содержащий F1 и F2); 2 - митохондрии (56 мкг мембранного белка) обработанные трипсином при соотношении белок/трипсин 800:1 в течение 80 мин; 3 и 4 - растворимая и мембранная фракции препарата СМН, обработанного трипсином 800:1 в течение 20 мин; 5 и 6 - соответствуют образцам 3 и 4, но время обработки трипсином было увеличено до 80 мин. Б, В и Г - иммуноблоттинг в присутствии Анти-P-450_{csc}, Анти-F1 и Анти-F2, соответственно.

участков в N-концевой последовательности, а наиболее гидрофобные участки расположены преимущественно в центральной и С-концевой областях молекул.

МАТРИКС

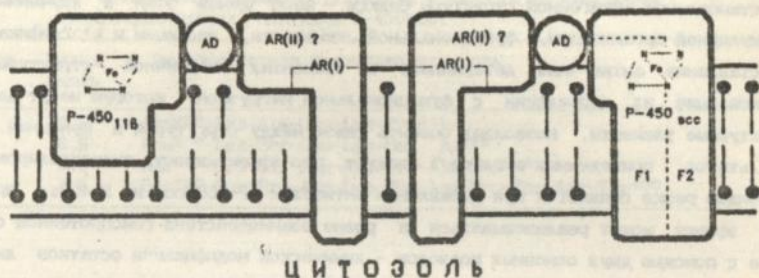


Рис. 11. Схема молекулярной организации цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ во внутренней мембране митохондрий по данным анализа взаимодействия антител с митохондриями и СМЧ.

Что касается Р-450_{11β}, то полученные результаты отражают только существование доступных для антител эпитопов на матриксной поверхности внутренней мембраны. Вопрос об особенностях мембранной организации Р-450_{11β} остается открытым. Расчет гидрофобных участков в молекуле Р-450_{11β} свидетельствует об определенной гомологии в их расположении между этим гемопroteinом и Р-450_{acc}. Однако, как следует из анализа содержания белков в мембранах, обработанных ультразвуком, Р-450_{11β} менее жестко связан с мембраной по сравнению с Р-450_{acc} (таблица 3). Появившиеся данные о генетической и функциональной гетерогенности цитохрома Р-450_{11β} свидетельствуют, что в стероидогенезе на стадиях 11 β - и 18-, 19-гидроксилирования участвуют различные молекулярные формы гемопroteinа (Kiruta et al., 1988; Ogishima et al., 1989).

Высокая степень ультразвуковой солюбилизации АР при наличии иммунохимически детектируемых участков на обеих поверхностях мембраны может свидетельствовать в пользу существования двух пулов флавопротеина — жестко и лабильно связанного с мембраной и подтверждает сделанное предположение о гетерогенности организации этого белка в мембране (Suhara et al., 1982; Hiwataishi & Ichikawa, 1982). Однако, природа и функциональное значение возможной гетерогенности АР в составе мембраны остаются неизвестными.

Полученные данные свидетельствуют о том, что цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы митохондриального типа могут иметь отличия от микросомальных монооксигеназ мембранную организацию, что согласуется с различиями механизмами трансляции, характерными для митохондриальных и микросомальных белков.

3. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ИММУНОРЕАКТИВНЫХ УЧАСТКОВ В МОЛЕКУЛЕ Р-450₈₀₀

Установление антигенной структуры белков - необходимый этап в изучении их молекулярной организации, функциональной активности, эволюции и классификации. Представление антигенных детерминант в элементах первичной структуры и установление их корреляции с функциональной нагрузкой, которую несут данные структурные элементы, позволяет оценить связь между структурой и функцией. Из результатов, приведенных в главе 1 следует, что эффективность гидроксирования стероидов резко снижается при добавлении антител к Р-450₈₀₀ и Р-450₁₁, причем этот эффект может реализовываться на уровне взаимодействия гемопroteинов с АД. Ранее с помощью двух основных подходов - химической модификации остатков лизина янтарным ангидридом (Адамович Т.Б. и соавт., 1989) и структурного изучения полученного с помощью бифункциональных реагентов ковалентного комплекса "АД-Р-450₈₀₀" (Турко И.В. и соавт., 1988) - было показано, что ферредоксин-связывающая область формируется рядом участков, расположенных в N- и C-концевых частях молекулы Р-450₈₀₀, а именно последовательностями Leu⁸⁸-Thr²²³ и Leu³⁶⁸-Gly⁴¹⁸. Эти данные стали предпосылкой для поиска корреляции между антигенными областями и функционально активными участками молекулы гемопroteина. Для решения этой задачи был локализован ряд антигенных детерминант в полипептидной цепи Р-450₈₀₀.

Для исследования антигенной структуры Р-450₈₀₀ использовали иммунохимический анализ продуктов химического гидролиза Р-450₈₀₀ (1.4 мкмоль Р-450₈₀₀). Выбор в качестве источника пептидного материала химотриптического гидролизата Р-450₈₀₀ обусловлен тем, что он содержит ряд растворимых в водных буферах пептидов, имеющих достаточную длину для формирования антигенных детерминант и перекрывающих большую часть предполагаемых АД-связывающих участков. Продукты гидролиза разделяли последовательно на биогеле Р-4 в 50% уксусной кислоте, обращеннофазовой ВЭЖХ на колонке Ultraphere-ODS и катионообменной хроматографией на Ultrasil Cx. На каждой стадии для дальнейшего разделения и анализа отбирали только фракции, содержащие пептиды, взаимодействующие с Анти-Р-450₈₀₀ в условиях проводившихся параллельно иммуноферментного анализа и капиллярного электрофореза.

Анализ гомогенности фракций и идентификацию пептидов осуществляли стандартными методами структурной химии - определением N-концевых аминокислот динилным методом, аминокислотным анализом и секвенированием пептидов по методу Эдмана. После ряда хроматографий и рехроматографий были выделены 4 иммунореактивные фракции в количествах, необходимых для анализа их структуры.

Таблица 4. Аminoкислотная последовательность и количественный выход иммунореактивных пептидов Р-450всс.

Пептид	Выход, нмоль	Аминокислотная последовательность
P1	4.1	Asn ²⁸⁶ -Lys-Ala-Glu-Lys-Tyr ²⁴¹
P2	6.9	Leu ²⁷² -Lys-Ser-Glu-Lys-Met ²⁷²
P3	5.0	Ala ³⁶¹ -Met-Gly-Arg-Asp-Pro-Ala-Phe ³⁶⁶
P4	3.5	Ser ³⁹⁰ -Ser-Pro-Asp-Lys-Phe-Asp-Pro-Thr-Arg-Trp ⁴⁰⁰

1 ISTKTPHFYSEIPSPGDNGWLNLYHFWRKGGQRINFRHINFTQKYGPIY
 51 REKLGLESVYIIPEDVAHLKFKFEGSYPERYDIPFWLAYHYRYQKPIGV
 101 LFKKSGTNKKDRVVLNTEVNAPEAIRNFIFLLNPFVQDFVSLHKRIRKQ
 151 GSKFVGDIKEDLFHFAVESITNVMFGERLGMLEETVNEAQKFDIAVIK
 201 MFHTSVPLLVNPFELVRLFKTKNRCNVAAMDITFNKAKKYTEIFYGDLR
 251 RKTEFRNYPGILYCLLKSERMLLEDVKNITEMLAGGVNTTSMTLGMHLY
 301 EMARSLNQEMLREEVLNARFQABGDISKMLGMPLLKASIKETLRHPFI
 351 SVTLGRYPESDLVLDYLIIFAKTLVQVAIYAMGRDPAFFSSEPKDPTFR
 401 LSKKDLIHFTNLGFGWVRQCVGRRIAELEMTLFLIHILENFKVMGHI
 451 GDVDTIFNLILTFDKPIFLVFRFFNGQDFQA

Рис. 12. Антигенные участки в полипептидной цепи Р-450всс (НКА...). Для сравнения показаны остатки лизина, участвующие по данным Адамович Т.Б. и соавт. (1989), в реализации взаимодействия гемопротенина с Ад (К) и пептиды Р-450всс, выделенные из ковалентного комплекса "Ад-Р-450всс" (Турко И.В. и соавт., 1988) (LAY...).

Анализ полученных фракций показал, что они представляют пептиды Р-450всс, соответствующие последовательностям гемопротенина: Asn²⁸⁶-Tyr²⁴¹, Leu²⁸⁶-Leu²⁷², Ala³⁶¹-Phe³⁶⁶, Ser³⁹⁰-Trp⁴⁰⁰ (таблица 4). Количественный выход иммунореактивных пептидов был невысок, что может быть связано с тем, что пептиды P2, P3 и P4, как и, по-видимому, ряд иммунореактивных фракций, полученных в количествах, недостаточных для полного структурного анализа, представляют собой промежуточные продукты гидролиза, дальнейшая деградация которых приводит к появлению коротких пептидов, не обладающих антигенными свойствами. Сравнение локализованных антигенных детерминант с участками, отвечающими, по данным других авторов, в молекуле гемопротенина за взаимодействие с Ад (рис. 12), позволяет предположить, что антигенные детерминанты Р-450всс, по крайней мере частично, совпадают с этими участками или перекрываются с ними, что согласуется с результатами

спектрофотометрического титрования гемопротейна АД в присутствии антител.

Обращает внимание тот факт, что три из четырех иммунореактивных участков расположены во фрагменте F3, который, как показано, экспонирован преимущественно в матрикс. Это свидетельствует в пользу вовлечения указанных участков во взаимодействие с АД. Кроме того, как следует из результатов расчета профиля гидрофильности P-450_{сс}, проведенного по методу Hopp & Woods (1981), пептиды P1 и P2 расположены в предсказанных антигенных областях молекулы гемопротейна. Высокая концентрация положительно заряженных аминокислотных остатков в указанных участках (рI пептидов составляет: для Asp²⁵⁶-Tyr²⁴¹ - 9.4, Leu²⁸⁶-Leu²⁷² - 9.9, Ala³⁶¹-Phe³⁶⁶ - 6.6, Ser³⁹⁰-Trp⁴⁰⁰ - 6.6) подтверждает данные о существенной роли остатков лизина и аргинина в комплексообразовании P-450_{сс} с АД.

ВЫВОДЫ

1. Получены антитела к белкам-компонентам монооксигеназных систем митохондрий коры надпочечников и антитела к фрагментам молекулы P-450_{сс} - F1, F2 и F3.
2. Показано, что антитела к P-450_{сс}, F1, F2 и P-450₁₁ ингибируют (до 90%) гидроксигирование холестерина и 11-дезоксикортикостерона, соответственно.
3. Разработаны методы микроопределения AP, АД, P-450_{сс} и P-450₁₁ и определено содержание белков в митохондриях коры надпочечников. Показано, что стехиометрия этих белков во внутренней мембране митохондрий составляет 1:6.8:2.2:1.3.
4. Исследовано взаимодействие антител с митопластами и субмитохондриальными частями. На основе полученных данных предложена модель молекулярной организации монооксигеназных систем во внутренней мембране митохондрий.
5. Показано, что два домена P-450_{сс} - F1 и F2 - доступны в мембране для специфических антител, а связывающая эти домены петля в районе Arg²⁵⁰-Asn²⁶⁷ и N-концевая последовательность F2 (фрагмент F3) экспонированы в матрикс.
6. Локализованы антигенные детерминанты P-450_{сс}, сформированные последовательностями Asp²⁵⁶-Tyr²⁴¹, Leu²⁸⁶-Leu²⁷², Ala³⁶¹-Phe³⁶⁶ и Ser³⁹⁰-Trp⁴⁰⁰.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Усанов С.А., Черногоров А.А. Иммунохимический анализ холестерин-гидроксиглирующего цитохрома P-450 из митохондрий коры надпочечников. Получение антител к доменам F1 и F2. // В сб.: Цитохром P-450 и охрана внутренней среды человека. Тезисы докладов. Пушино. 1985. С. 55.

2. Усанов С.А., Черноголов А.А., Ахрем А.А., Чашин В.Л. Иммунохимическая характеристика холестерингидроксилирующего цитохрома P-450. Моноспецифические антитела к доменам F1 и F2. // Биохимия. 1987. Т. 52. N 1. С. 110-122.
3. Усанов С.А., Черноголов А.А., Петрашин А.И., Ахрем А.А., Чашин В.Л. Иммунохимическое исследование холестерингидроксилирующей системы. Топология и стехиометрия компонентов электронтранспортной цепи в полипептидной мембране. // Биологические мембраны. 1987. Т. 4. N 10. С. 1102-1116.
4. Чашин В.Л., Черноголов А.А., Усанов С.А., Ахрем А.А. Структурные исследования и модель молекулярной организации стероидгидроксилирующих систем. // В сб.: Цитохром P-450 и оксана окружающей среды. Тезисы докладов. Новосибирск. 1987. С. 37.
5. Чашин В.Л., Черноголов А.А. Исследование антигенной структуры и топографии холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 митохондрий коры надпочечников. // В сб.: VII Всесоюзный симпозиум по жизни белков и пептидов. Тезисы докладов. Таллин. 1987. С. 130-131.
6. Усанов С.А., Черноголов А.А., Чашин В.Л., Ахрем А.А. Стехиометрия и топология белков-компонентов монооксигеназных систем митохондрий коры надпочечников. // В сб.: V Советско-швейцарский симпозиум "Биологические мембраны: структура и функции". Тезисы докладов. Рига. 1988. С. 114.
7. Chernogolov A.A., Chashchin V.L., Usanov S.A. Immunoclinical studies of cytochrome P-450_{sc}. The role of polypeptide chain fragments in monooxygenase catalysis. // In: 14th International Congress of Biochemistry. Abstracts. Prague, Czechoslovakia. 1988. P. 99.
8. Usanov S.A., Chernogolov A.A., Adamovich T.B., Turko I.V., Pikuleva I.A., Chashchin V.L. Molecular aspects of structure-function interrelations in cytochrome P-450_{sc} system. // In: Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics (Ed. I. Schuster). London: Taylor & Francis. 1989. P. 121-124.
9. Усанов С.А., Черноголов А.А., Чашин В.Л. Иммунохимическое исследование холестерингидроксилирующего цитохрома P-450. Топология полипептидной цепи гемопротеида в фосфолипидной мембране. // Биохимия. 1989. Т. 54. N 6. С. 916-925.
10. Usanov S.A., Chernogolov A.A., Chashchin V.L. Inhibitory domain-specific antibodies to cytochrome P-450_{sc}// FEBS Letters. 1989. V. 255, N 1. P. 125-128.
11. Черноголов А.А., Ометтан Г., Лалко А.Г., Лунев В.Е., Усанов С.А. Цитохром P-450_{11p}: структурная и иммунохимическая характеристика. // В сб.: Цитохром P-450 и модификация макромолекул. Тезисы докладов. Ялта. 1989. С. 265-266.
12. Усанов С.А., Черноголов А.А., Хонкакоски П., Ланг М., Пассанен М., Раунио К., Пелконен О. Холестерингидроксилирующий цитохром P-450 митохондрий коры

надпочечников быка и плаценты человека: иммунохимические свойства и структурная характеристика. // Биохимия. 1990. Т. 55. N 5. С. 865-877.

13. Усанов С.А., Черноголов А.А., Чапин В.Л. Молекулярная организация митохондриальных монооксигеназных систем коры надпочечников. // В сб.: Всесоюзный симпозиум "Химия белков". Тезисы докладов. Тбилиси. 1990. С. 31.

14. Chernogolov A.A., Usanov S.A. Immunochemical mapping of ferredoxin-binding sites in cytochrome P-450sc. // In: 20th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS). Abstracts. Budapest, Hungary. 1990. P. 209.

15. Usanov S.A., Chernogolov A.A., Chashchin V.L. Is cytochrome P-450sc a transmembrane protein? // FEBS Letters. 1990. V. 275. N 1,2. P. 33-35.

16. Chernogolov A.A., Adamovich T.B., Usanov S.A. Immunochemical mapping of ferredoxin-binding sites in cytochrome P-450sc. // In: VIIth International Conference "Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450". Abstracts. Moscow, 1991, P. 37.

17. Chernogolov A.A., Lapko A.G., Usanov S.A. Structural and immunochemical analysis of cytochrome P-45011p from bovine adrenal cortex mitochondria. // In: VIIth International Conference "Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450". Abstracts. Moscow, 1991, P. 37.

18. Chernogolov A.A., Hudecek J., Anzenbacher P., Usanov S.A. Computer prediction of the secondary structure of cytochromes P-450sc and P-45011p. // In: VIIth International Conference "Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450". Abstracts. Moscow, 1991, P. 144.

19. Chernogolov A.A., Adamovich T.B., Usanov S.A. Immunochemical mapping of ferredoxin-binding sites in cytochrome P-450sc. // In: Proceedings of the VIIth International Conference "Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450", Moscow, 1991, P. 57-59.

20. Chernogolov A.A., Lapko A.G., Usanov S.A. Structural and immunochemical analysis of cytochrome P-45011p from bovine adrenal cortex mitochondria. // In: Proceedings of the VIIth International Conference "Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450", Moscow, 1991, P. 60-62.

21. Chernogolov A.A., Usanov S.A. Interaction of cytochrome b₅ with mitochondrial cytochromes P-450. // J. Basic & Clinical Physiol. & Pharmacol. 1992, v. 3, P. 199.

Подписано в печать 26.05.93.

Бумага типографская № 1.

Усл.печ.л. 1,5

Тираж 100

Зак.105

Формат 60x84,1/16.

Печать офсетная.

Учет.изд.л. 1,39

Бесплатно.

Отпечатано на ротапринтере ЦНБ АН РБ. 220601, Минск,
ул. Сурганова, 15.

AB 36.496

1966-1967