



УДК 577.1 + 547.963

ВЫЯСНЕНИЕ ПРИРОДЫ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ,
УЧАСТВУЮЩИХ В КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ АДРЕНОДОКСИНА
И АДРЕНОДОКСИНРЕДУКТАЗЫ. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ
ОСТАТКОВ ЛИЗИНА, ГЛУТАМИНОВОЙ И АСПАРАГИНОВОЙ
КИСЛОТ АДРЕНОДОКСИНА

Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Изучен механизм комплексообразования компонентов стероидгидроксилирующей системы — аденодоксинредуктазы и аденодоксина. Методами химической модификации аденодоксина показано, что остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот принимают непосредственное участие в его комплексообразовании с аденодоксинредуктазой, необходимым для процесса ферментативного гидроксилирования кортикостероидных гормонов.

Известно, что во внутренней мембране митохондрий коры надпочечников присутствует ферментативная система, осуществляющая 20α -($22R$)-гидроксилирование холестерина с последующим превращением его в прегненолон и 11β -гидроксилирование дезоксикортикостерона [1—3]. Данная стероидгидроксилирующая система состоит из трех белковых компонентов: аденодоксинредуктазы, аденодоксина и цитохрома P-450. Выделение из митохондрий коры надпочечников и реконструкция этой ферментативной системы *in vitro* были неоднократно описаны ранее [4, 5]. К сожалению, до настоящего времени нет данных о природе взаимодействия отдельных компонентов в процессе гидроксилирования, не выяснен вопрос о роли комплексообразования этих белков при ферментативном гидроксилировании кортикостероидных гормонов.

В данной работе исследовано участие свободных карбоксильных и аминогрупп АД в процессе его комплексообразования с АД-редуктазой. Контроль за процессом проводился при помощи реакции восстановления цитохрома *c*, протекающей лишь в случае образования комплекса [АД-редуктаза·АД] [6], наличие которого постоянно контролировалось с помощью гель-хроматографии на колонке ($1,5 \times 50$ см) с сефадексом G-100.

Вначале было изучено влияние ионной силы и pH среды на образование комплекса [АД-редуктаза·АД]. При этом optimum pH и ионной силы реакции восстановления цитохрома *c* находились в пределах 7,3—7,5 и 0,09—0,1 соответственно (рис. 1). Даже при экстремальных значениях pH для данных белков — 5,0 и 9,0 (значения *pI* для АД и АД-редуктазы равны 5,0 и 8,9 соответственно) [7, 8] наблюдался процесс восстановления

Сокращения: АД, АД_N, АД_C — соответственно нативный, цитракопированный и модифицированный по карбоксильным группам аденодоксин; АД-редуктаза — NADPH-зависимая аденодоксинредуктаза.

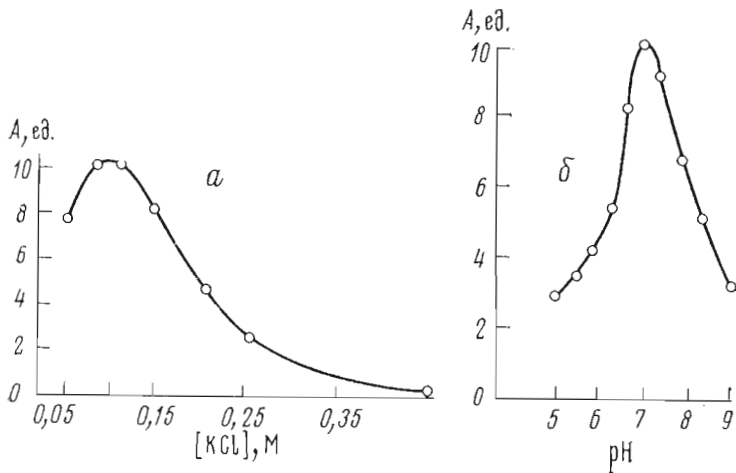


Рис. 1. Зависимость цитохром-с-редуктазной активности комплекса [АД-редуктаза·АД] от ионной силы (а) и рН (б) среды

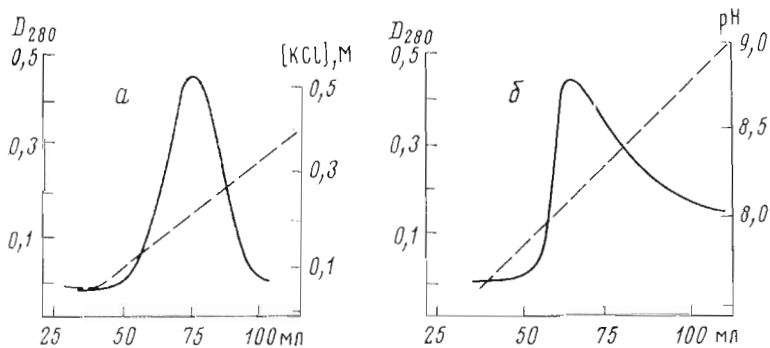


Рис. 2. Элюционные профили десорбции АД-редуктазы с колонки, наполненной АД-сефарозой, при использовании градиента концентрации KCl (а) и рН (б) элюирующего буфера

цитохрома *c*, в то время как при ионной силе 0,45 он практически отсутствовал. Эти результаты согласуются с результатами десорбции АД-редуктазы с колонки, наполненной АД-сефарозой (рис. 2), показывающими, что использование градиента концентрации KCl более эффективно для элюирования АД-редуктазы, чем применение градиента рН. Полученные данные позволили сделать вывод, что существенную роль в образовании комплекса [АД-редуктаза·АД] играют кислотно-основные взаимодействия между отдельными компонентами.

Нами была предпринята попытка выяснения природы аминокислотных остатков АД, взаимодействующих с АД-редуктазой. Для этого была проведена химическая модификация остатков лизина, глутаминовой и аспарагиновой кислот АД.

В качестве модифицирующего агента ϵ -аминогрупп лизина был выбран цитраконовый ангидрид, позволяющий осуществить химическую модификацию в мягких условиях. По завершении модификации избыток реагента был удален на колонке с сефадексом G-25.

Свидетельством химической модификации аминокислотных групп белков цитраконовым ангидридом может служить отношение D_{250}/D_{280} [9]. В случае нативного АД оно равно 1,03, в то время как для АД_N — 2,9 (рис. 3). Добавление АД_N в реакционную среду, содержащую NADPH, АД-редуктазу и цитохром *c*, как и добавление нативного АД, стимулировало цитохром-с-редуктазную активность (рис. 4а). Константа диссоциации ($K_{дис}$),

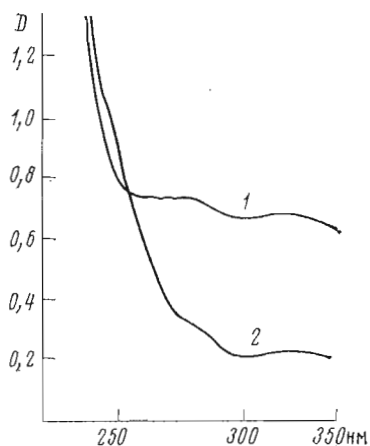


Рис. 3. УФ-спектры АД (1) и АД_N (2). Концентрация белка $0,45 \cdot 10^{-4}$ и $0,15 \cdot 10^{-4}$ М соответственно

нерастворимым. При модификации свободных карбоксильных групп АД нами использовались различные величины pH реакционной среды (таблица). В работе применялся АД, модифицированный при значении pH среды 6,3, так как в этих условиях эффект модификации наиболее выражен (количество модифицированных групп, влияние модификации на кинетические параметры комплексообразования) без существенных денатурационных изменений в молекуле АД (D_{414}/D_{280} , идентичность спектров КД нативного АД и АД_C). АД, модифицированный при pH 5,7, очевидно, подвергался частичной кислотной денатурации в процессе модификации, о чем свидетельствует существенное уменьшение отношения D_{414}/D_{280} .

Система, реконструированная из АД-редуктазы и АД_C, резко отличалась от системы, включающей нативный АД, в частности, по скорости восстановления цитохрома с (рис. 4а). Кроме того, если $K_{дис}$ для комплекса [АД-редуктаза·АД_N] составляла $\sim 1 \cdot 10^{-9}$ М, то для комплекса [АД-редуктаза·АД_C] — $6,6 \cdot 10^{-7}$ М (почти на 3 порядка выше) (рис. 4б).

Доказательством того, что модификация амидом глицина не затронула крайне лабильный железосеросодержащий центр в молекуле АД, могут служить данные, полученные при химическом восстановлении АД и АД_C

определенная для комплекса [АД-редуктаза·АД_N], составляла $1 \cdot 10^{-9}$ М, что соответствует $K_{дис}$ для нативных белков [6]. Эти данные свидетельствуют о том, что ε-аминогруппы лизина в молекуле АД не участвуют в процессе комплексообразования АД с АД-редуктазой.

В качестве модифицирующего агента по карбоксильным группам остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот АД использовали амид глицина. Активацию карбоксильных групп проводили водорастворимым карбодимидом. Избыток реагентов удаляли гель-хроматографией на сефадексе G-25.

Хотя оптимум pH среды для модификации свободных карбоксильных групп составляет 4,75 [10], в случае АД реакцию проводили при более высоких значениях pH, поскольку изоэлектрическая точка АД находится в пределах pH 5,0 [7] и при данном значении среды белок становился

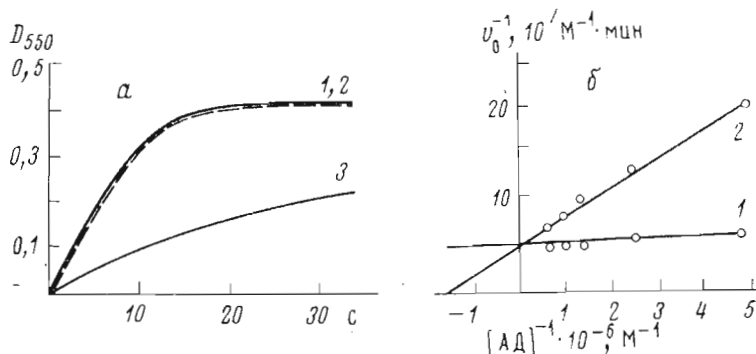


Рис. 4. Влияние модификации АД на кинетические характеристики комплексообразования: а — кинетика восстановления цитохрома с при использовании АД (1), АД_N (2) и АД_C (3); б — определение $K_{дис}$ для комплексов [АД-редуктаза·АД_N] (1) и [АД-редуктаза·АД_C] (2)

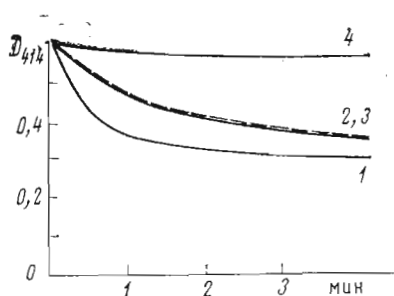


Рис. 5

Рис. 5. Кинетика ферментативного восстановления АД (1) и АД_с (4) и химического восстановления АД и АД_с (2, 3)

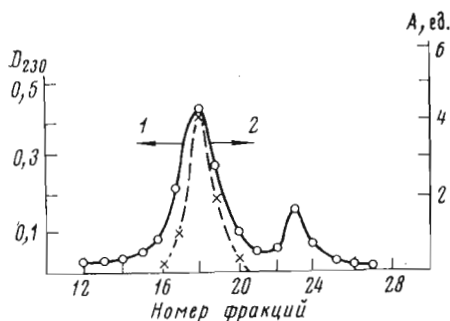


Рис. 6

Рис. 6. Гель-хроматография смеси АД_с и АД-редуктазы на колонке с сефадексом G-100. Элюция 0,01 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,04 М КСl. Объем фракции 2 мл, скорость элюции 6 мл/ч. 1 — поглощение при D_{230} нм, 2 — цитохром-с-редуктазная активность

дитионитом. Спектр поглощения восстановленной формы АД в сравнении с окисленной формой характеризуется исчезновением максимумов поглощения при 414 и 450 нм [11]. Наиболее выражено уменьшение оптической плотности при 414 нм, что и позволяло контролировать химическое и ферментативное восстановление по уменьшению поглощения при данной длине волны. Из рис. 5 можно видеть, что скорости химического восстановления АД и АД_с абсолютно одинаковы, в то время как ферментативное восстановление АД_с АД-редуктазой практически отсутствует.

Контроль за модификацией АД амидом глицина проводили при помощи аминокислотного анализа, так как число модифицированных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот можно оценить по возрастанию содержания глицина в АД_с. Сравнение данных аминокислотного анализа для АД и АД_с показало увеличение содержания глицина в последнем на 12—13 остатков, что соответствует 12—13 остаткам глутаминовой и аспарагиновой кислот, затронутых химической модификацией.

Полученные результаты позволили нам сделать предположение о непосредственном участии остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот АД в образовании комплекса [АД-редуктаза·АД].

Необходимо отметить, что, несмотря на изменения $K_{дис}$ и скорости восстановления цитохрома с при использовании вместо АД модифицированного АД_с, способность последнего образовывать комплекс с АД-редуктазой частично сохраняется. Так, согласно работе [6], комплекс считается свободно диссоциирующим при значении $K_{дис} > 1 \cdot 10^{-6}$ М, в то время как использование АД_с дает величину $K_{дис}$ $6,6 \cdot 10^{-7}$ М. На рис. 6 приведен профиль элюции смеси АД-редуктазы и АД_с на колонке с сефадексом G-100, свидетельствующий о том, что гель-хроматография не позволи-

Подбор оптимального значения рН для модификации карбоксильных групп АД

Образец	рН	Количество модифицированных карбоксильных групп	Активность, %	$K_{дис}$, М	D_{414}/D_{230}
АД	—	—	100	$1 \cdot 10^{-9}$	0,83
	5,7	22	15	—	0,5
АД _с	6,3	12—13	30	$6,6 \cdot 10^{-7}$	0,78
	6,5	9—10	40	$2,0 \cdot 10^{-7}$	0,79

ла полностью разделить АД-редуктазу и АДс. Об этом говорит наличие цитохром-с-редуктазной активности в первом пике, соответствующем комплексу [АД-редуктаза·АДс]. Следовательно, в механизме комплексообразования АД-редуктазы с АД помимо электростатических имеют, по видимому, место и взаимодействия другого рода.

Экспериментальная часть

В работе использовали высокоочищенные препараты аденодоксин-редуктазы ($D_{272/450}$ 7,9) (КФ 1.6.99.4) и аденодоксина ($D_{414/280}$ 0,83), полученные по ранее описанной методике [12]; цитохром с (Biomed, Польша), непосредственно перед работой дополнительно очищенный на СМ-целлюлозе SM-52 (Whatman, Англия); бромциан-сефарозу 4В, сефадексы G-25 и G-100 (Pharmacia, Швеция), NADPH (Boehringer, ФРГ), 2,6-дихлорфенолиндифенолят натрия (Chemapol, ЧССР), цитраконовый ангидрид (Merck, ФРГ), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимид (Sigma, США).

Спектры поглощения и кинетику снимали на спектрофотометре Specord UV-VIS (Zeiss, ГДР). Спектры КД получены на приборе JASCO-20 (JASCO, Япония). Аминокислотный анализ проводили на приборе AAA881 (Microtechna, ЧССР). Образцы для анализа гидролизovali в 5,7 н. HCl при 110° в течение 24 ч.

Концентрации растворов препаратов белков определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции: ϵ_{450} $1,13 \cdot 10^4$, ϵ_{413} $1,0 \cdot 10^4$ для АД-редуктазы и АД соответственно [4]. Имобилизацию АД проводили по методу [13] с некоторыми изменениями.

$K_{дис}$ комплекса [АД-редуктаза·АД] определяли по методу, описанному Чу и Кимура [6]. К 1,8 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) добавляли 80 нмоль NADPH, 80 нмоль дихлорфенолиндифенола, 0,42—2,8 нмоль АД до конечного объема 2 мл. Реакцию начинали добавлением 0,1 нмоль АД-редуктазы и регистрировали уменьшение поглощения при 590 нм в течение 8 мин. Количество восстановленного дихлорфенолиндифенола устанавливали, исходя из коэффициента молярной экстинкции ϵ_{590} $1,9 \cdot 10^4$. Активность выражали в нмоль восстановленного дихлорфенолиндифенола в 1 мин.

Цитохром-с-редуктазную активность (А) комплекса [АД-редуктаза·АД] определяли по методу Омуре и др. [1]. Реакционная смесь (2 мл, рН 7,4) содержала по 0,5 нмоль АД-редуктазы и АД, 80 нмоль цитохрома с. Реакцию начинали добавлением 100 нмоль NADPH и регистрировали увеличенные оптической плотности при 550 нм в течение 1—2 мин против контрольной кюветы, содержащей те же компоненты, кроме NADPH. За единицу активности принимали 1 мкмоль восстановленного цитохрома с в 1 мин, используя коэффициент молярной экстинкции ϵ_{550} $1,81 \cdot 10^4$. Определение активности проводили во всех случаях при комнатной температуре.

Получение цитраконилированного АД. 0,2—0,3 мкмоль АД в объеме 2,5 мл обрабатывали при перемешивании в течение 60 мин цитраконовым ангидридом, взятым в 15-кратном молярном избытке в пересчете на одну ϵ -аминогруппу лизина. Величину рН 8,3 реакционной среды поддерживали постоянным добавлением 0,1 н. NaOH при непрерывной регистрации рН на самопишущем рН-метре ОР-207 (Венгрия) с комбинированным электродом (ГК 2024С, Radiometer, Дания). Обессоливание осуществляли на колонке (1,5 × 40 см) с сефадексом G-25 (средний), используя для элюирования 0,01 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4.

Модификация АД амидом глицина. 0,5 мкмоль АД в объеме 2,5 мл выдерживали 60 мин при 10—12° в 0,1 М растворе водорастворимого карбодимида, содержащего 1 М амид глицина. Величины рН растворов 5,7; 6,3; 6,5 поддерживали добавлением 5 н. HCl. Регистрацию изменений рН и удаление избытка реагентов проводили так же, как и в случае мо-

дификации цитраконовым ангидридом. Количество модифицированных карбоксильных групп остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот оценивали по результатам аминокислотного анализа АД_С.

Восстановление АД и АД_С осуществляли дитионитом натрия и ферментативно, используя в последнем случае NADPH и АД-редуктазу. К 120 нмоль АД или АД_С в 1,8 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) добавляли 1 нмоль АД-редуктазы и 200 нмоль NADPH (ферментативное восстановление) или 0,05 мл дитионита натрия (40 мг/мл) (химическое восстановление) и регистрировали уменьшение оптической плотности при 414 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Omura T., Sanders E., Estabrook R. W., Cooper D., Rosental O. (1966) Arch. Biochem. and Biophys., **117**, 660—673.
2. Shikita M., Hall P. F. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 1441—1445.
3. Ramseyer J., Harding B. W. (1973) Biochim. et biophys. acta, **315**, 306—316.
4. Schleyer H., Cooper D., Rosental O. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 6103—6115.
5. Horie S., Watanabe T. (1975) J. Steroid Biochem., **6**, 401—409.
6. Chu J. W., Kimura T. (1973) J. Biol. Chem., **248**, 5183—5187.
7. Wickramasinghe R. H. (1973) Steroids Lipids Res., **4**, 204—212.
8. Wickramasinghe R. H. (1974) Int. J. Peptide Protein Res., **6**, 187—191.
9. Шадури М. И., Поляновский О. Л. (1975) Молекулярн. биология, **9**, 468—477.
10. Hoare D. G., Koshland D. E. (1967) J. Biol. Chem., **242**, 2447—2453.
11. Suzuki K., Kimura T. (1965) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **19**, 340—343.
12. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) Биоорган. химия, **3**, 780—786.
13. Sugijama T., Iamano T. (1975) FEBS Lett., **52**, 145—148.

Поступила в редакцию
6.X.1976
После доработки
23.XII.1976

ELUCIDATION OF THE NATURE OF AMINO ACID RESIDUES INVOLVED IN ADRENODOXIN — ADRENODOXIN REDUCTASE COMPLEX FORMATION. CHEMICAL MODIFICATION OF LYSINE, ASPARTIC AND GLUTAMIC ACID RESIDUES IN ADRENODOXIN

AKHREM A. A., SHKUMATOV V. M., CHASHCHIN V. L.

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

The mechanism has been studied of complex formation for steroid-hydroxylating system components, viz. adrenodoxin and adrenodoxin reductase. By chemical modification of adrenodoxin, it has been shown that the aspartic and glutamic acid residues directly participate in its complexation with adrenodoxin reductase, which is essential for enzymatic hydroxylation of corticosteroid hormones.