



УДК 577.1+547.963

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ  
СТЕРОИДГИДРОКСИЛИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ

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

*Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

Изучен процесс самосборки отдельных белков митохондриальной холестерин-гидроксилирующей системы в единый ферментный ансамбль. На колонке с иммобилизованным адренодоксидом с использованием адренодоксинредуктазы и специфичного к холестерину цитохрома P-450 реконструирована система, способная осуществлять превращение холестерина в прегненолон. Данный подход представляется весьма эффективным для иммобилизации различных стероидсинтезирующих систем.

В биосинтезе кортикостероидных гормонов из холестерина, протекающем в клетках коры надпочечников, центральное место занимают процессы гидроксилирования. При этом ферментные системы, отвечающие за  $20\alpha$ , (22R)-гидроксилирование холестерина,  $11\beta$ -гидроксилирование дезокси-кортикостерона, 18-гидроксилирование кортикостерона, локализованы во внутренней мембране митохондрий, в то время как  $17\alpha$ - и 21-гидроксилазы связаны с гладкими мембранами эндоплазматического ретикулаума [1].

Эти гидроксилирующие системы (стероидные гидроксилазы) представляют собой сложный многокомпонентный функционально-активный белковый ансамбль. Так,  $20\alpha$ , (22R)-холестерингидроксилаза, осуществляющая начальную стадию трансформации холестерина в кортикостероидные гормоны — превращение холестерина в прегненолон (рис. 1), — состоит из трех белковых компонентов: NADPH-зависимой флавопротеидредуктазы (адренодоксинредуктазы), негеминового железосодержащего белка (адренодоксина) и оксидазы холестерина, гемсодержащего белка — цитохрома P-450 [2—4]. Эти три белка формируют необходимую для активации молекулярного кислорода [5] цепь переноса электронов от NADPH к простетической группе цитохрома P-450 — протопему IX. Выделение интактной холестерингидроксилазы, по-видимому, невозможно, так как у всех трех компонентов системы прочность их связывания с митохондриальной мембраной различна. Если для отделения адренодоксина достаточно механического разрушения митохондрий, то для адренодоксинредуктазы необходимо дальнейшее разрушение митохондрий ультразвуком до субмитохондриальных частиц, а для цитохрома P-450 требуется обработка субмитохондриальных частиц соответствующим детергентом. Поэтому, хотя выделение отдельных компонентов холестерингидроксилазы и реконструкция холестерингидроксилирующей активности *in vitro* и были описаны [2—4], кардинальный вопрос механизма действия этой системы — необходимость самосборки отдельных компонентов в единый ферментный ансамбль — оставался неясным.

Ранее рядом авторов [6, 7] было показано, что комплексообразование по крайней мере между двумя белками, адренодоксинредуктазой и адренодоксином, необходимо для проявления системой гидроксилирующей активности. Были предприняты неудачные попытки идентифицировать

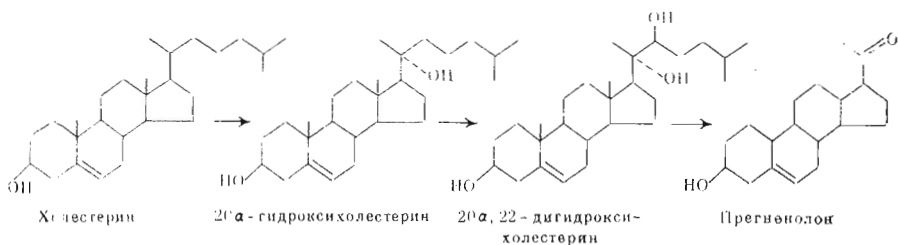


Рис. 1. Превращение холестерина в прегненолон, катализируемое  $20\alpha$ , ( $22R$ )-холестерингидроксилирующей системой

и комплекс адренодоксина с цитохромом P-450 [6]. Недавно нами было показано, что такой комплекс имеет место. Это позволило предложить принципиально новый подход к выделению цитохрома P-450, основанный на биоспецифической хроматографии [8].

В продолжение работы по изучению структуры и функции гидроксилирующих систем нами исследовалась возможность самосборки отдельных компонентов холестерингидроксилазы в единый белковый ансамбль.

Все работы проводились с гомогенными препаратами белков, выделенными согласно описанным ранее методам [8, 9].

Известно, что в результате связывания холестерина с окисленной формой (ферриформой) цитохрома P-450 с образованием феррисубстратного комплекса гемопротейда происходит переход железа цитохрома из низкоспинового состояния в высокоспиновое [5]. По окончании ферментативного акта продукт (прегненолон) отделяется от окисленного цитохрома P-450, при этом железо цитохрома переходит в первоначальное состояние — низкоспиновое. Такие переходы, регистрируемые также спектрофотометрически, являются надежными критериями процесса гидроксилирования *in vitro* [10]. Следует отметить, что холестерингидроксилирующий цитохром P-450 выделяется в комплексе с эндогенным холестерином, т. е. представляет собой фермент-субстратный комплекс, характеризующийся высокоспиновой окисленной формой железа гема.

Реконструкция холестерингидроксилазы проводилась на колонке с адренодоксином, иммобилизованным на бромциан-сефарозе 4В (рис. 2). Свободный от детергента (холата натрия) цитохром P-450 наносили на колонку с адренодоксин-сефарозой. Затем через колонку пропускали адренодоксинредуктазу. Цитохром P-450 и адренодоксинредуктаза были взяты в количествах, превышающих необходимые для насыщения всей колонки, что исключало возможность их отдельного, т. е. несовместного, комплексообразования с иммобилизованным адренодоксином. В последнюю очередь через колонку пропускали NADP и NADPH-генерирующую систему: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и глюкозо-6-фосфат. Через 1 ч инкубации при комнатной температуре проводили десорбцию белков с колонки. При этом, учитывая разные условия десорбции адренодоксинредуктазы и цитохрома P-450 с иммобилизованного адренодоксина [8], удалось дифференциально элюировать эти белки с колонки (рис. 2).

Выше отмечалось, что цитохром P-450, полученный в процессе его выделения, находится в комплексе с субстратом (холестирином) и его спектр поглощения типичен для высокоспиновой формы белка. Спектр поглощения в видимой области исходного цитохрома P-450 характеризовался максимумами при 394 и 650 нм (рис. 3, 1), а спектр поглощения полученного после опыта цитохрома P-450 имел максимумы при 418, 540 и 570 нм (рис. 3, 2) (низкоспиновая форма белка). Это свидетельствует о том, что эндогенный холестерин был превращен в прегненолон, а следовательно, на иммобилизованном адренодоксине произошла самосборка холестерингидроксилазы. Однако наличие перегиба при 400 нм в спектре поглощения полученного после опыта цитохрома P-450 (рис. 3, 2) было обусловле-

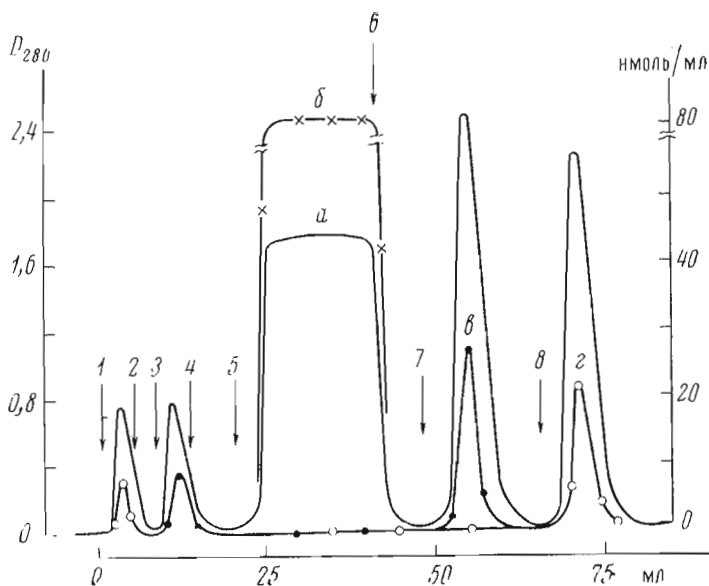


Рис. 2. Реконструкция и дифференциальная десорбция холестерингидроксилазы. *a* — поглощение при 280 нм; *b* — NADPH, нмоль/мл; *δ* — адренодоксинредуктаза, нмоль/мл; *ε* — цитохром P-450, нмоль/мл. Цифры указывают последовательность операций при реконструкции, проведении ферментативной реакции и дифференциальной десорбции холестерингидроксилазы

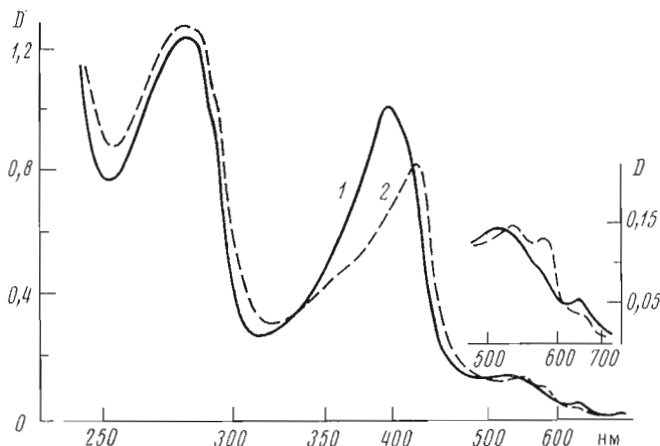


Рис. 3. Спектры поглощения исходного цитохрома P-450 (1) и полученного после проведения ферментативной реакции на колонке с иммобилизованной холестерингидроксилазой (2)

но тем, что не все количество иммобилизованного цитохрома было переведено в низкоспиновое состояние. Дополнительная обработка элюированного с колонки цитохрома P-450 электронтранспортной системой привела практически к полному превращению цитохрома в низкоспиновую форму. Соответствующий расчет показал, что ~ 75% общего количества иммобилизованного на колонке с адренодоксин-сефарозой цитохрома P-450 было включено в функционально-активный тройной белковый комплекс. Неполное превращение цитохрома можно объяснить стерическими затруднениями, возникающими при присоединении адренодоксинредуктазы к иммобилизованному комплексу адренодоксин·цитохром P-450. Добавление к полученной после колонки низкоспиновой форме цитохрома 3—5-кратных

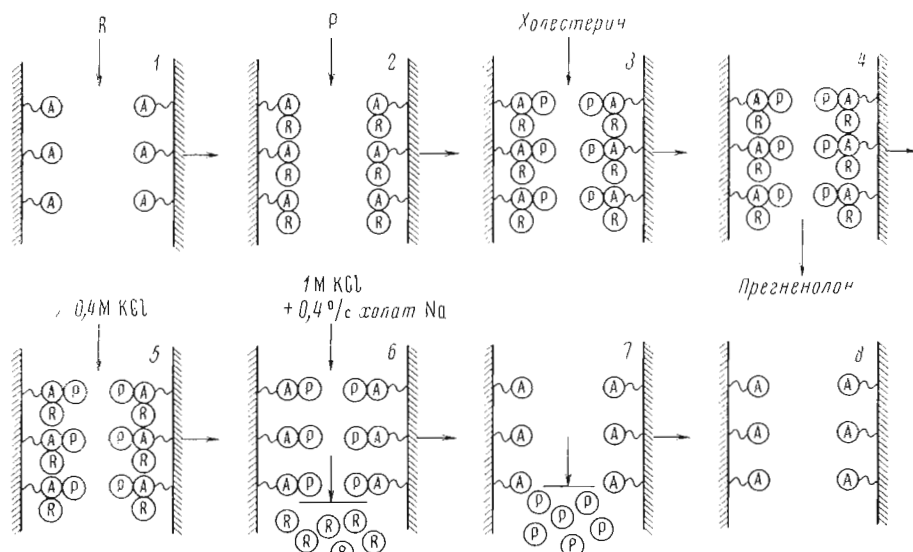


Рис. 4. Схема самосборки холестерингидроксилазы в единый ферментный комплекс (1—3) с последующим проведением ферментативной реакции (3—4) и дифференциальная десорбция отдельных белков (5—7). А — адренодоксин, R — адренодоксинредуктаза, P — цитохром P-450

молярных избытков холестерина приводило к превращению спектра поглощения в спектр, характерный для исходного препарата белка.

Отдельные компоненты системы — адренодоксинредуктаза и цитохром P-450, элюированные с колонки после окончания опыта, не отличались по активности от исходных белков и после непродолжительного диализа вновь могли быть использованы для самосборки на адренодоксин-сефарозе в холестерингидроксилирующую систему. При этом было отмечено резкое увеличение устойчивости белков против тепловой инактивации в случае их комплексообразования по сравнению с отдельными компонентами, находящимися в растворе.

Для полного доказательства функциональной активности иммобилизованной таким образом  $20\alpha, (22R)$ -холестерингидроксилазы через колонку пропускали  $[4-^{14}C]$ холестерин в присутствии NADPH-генерирующей системы. При этом в элюате с колонки помимо непрореагировавшего  $[4-^{14}C]$ -холестерина присутствовал  $[4-^{14}C]$ прегненолон. Выходы прегненолона в зависимости от времени инкубации и концентрации холестерина составляли 15—25%. Подбору оптимальных условий гидроксилирования стероидов будут посвящены дальнейшие исследования.

В литературе имеются данные, что в гидроксилировании холестерина, дезоксикортикостерона и кортикостерона участвуют одни и те же белки электронтранспортной цепи митохондриальных стероидгидроксилирующих систем — адренодоксинредуктаза и адренодоксин [3, 11, 12]. Это, очевидно, позволяет получать разнообразные стероидгидроксилирующие комплексы, иммобилизованные на сефарозе, используя одни и те же препараты адренодоксина и адренодоксинредуктазы, но различные по субстратной специфичности цитохромы P-450. На рис. 4 схематично представлен процесс самосборки  $20\alpha, (22R)$ -холестерингидроксилазы, биосинтез прегненолона и дифференциальная десорбция отдельных компонентов указанной системы. Помимо использования данного подхода в биосинтезе *in vitro* ряда важных кортикостероидных гормонов этот метод позволяет получать свободную от высокоспинового формы, а также от адренодоксина и адренодоксинредуктазы низкоспиновую форму цитохрома P-450, представляющую собой большой интерес для исследований в области субстратной специфичности цитохрома P-450.

## Экспериментальная часть

В работе были использованы гомогенные препараты адренодоксинредуктазы (КФ 1.6.7.1), адренодоксина и цитохрома Р-450, выделенные согласно [8, 9], бромциан-сефароза 4В (Pharmacia, Швеция), NADP, глюкозо-6-фосфат (Reanal, ВНР), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (1400 ед/мл) (Fergak, Западный Берлин), [4-<sup>14</sup>C]холестерин (57,2 мКи/ммоль; Изотон, СССР), холат натрия получали из холевой кислоты (Koch-Light, Англия).

Спектры поглощения снимали на приборе Specord UV-VIS (ГДР). Концентрации адренодоксинредуктазы, адренодоксина ( $\epsilon_{414} 10^4$  и  $\epsilon_{450} 1,13 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  соответственно [13] и цитохрома Р-450 ( $\epsilon_{450-490} 9,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [14]) определяли спектрофотометрически в кюветах с длиной оптического пути (в зависимости от концентрации белков) 1—20 мм. Иммунизацию адренодоксина проводили так, как описано ранее [9]. Полученный сорбент содержал 330 нмоль иммобилизованного адренодоксина на 1 мл осажденного геля сефарозы.

Реконструкцию холестерингидроксилазы (рис. 2) осуществляли следующим образом: на колонку (1,5 × 2 см), содержащую 1080 нмоль иммобилизованного адренодоксина и уравновешенную 0,01 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,4), наносили 130 нмоль цитохрома Р-450 (1) и 150 нмоль адренодоксинредуктазы (3). Цифры 2, 4, 6 на рис. 2 означают промывку колонки 0,01 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,4). Затем при комнатной температуре в течение 1 ч пропускали 15 мл NADPH-генерирующей смеси, содержащей 1,2 мкмоль NADP, 8 мкмоль глюкозо-6-фосфата и 70 ед. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (5). При прямой идентификации получаемого продукта — прегненолона — обработку колонки NADPH-генерирующей системой проводили в присутствии холестерина. Холестерин (3,87 мг) растворяли в 10 мл этанола и аликвоты по 0,1—0,5 мл добавляли к 15 мл NADPH-генерирующей смеси. В каждую аликвоту нерадиоактивного стероида добавляли 0,01 мл [4-<sup>14</sup>C]холестерина в бензоле. По окончании ферментативной реакции элюат с колонки упаривали до 3 мл и экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2 : 1). Экстракцию проводили до исчезновения радиоактивности в элюате. Экстракты объединяли, упаривали досуха и растворяли в 0,1—0,2 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1). Разделение радиоактивных холестерина и прегненолона осуществляли методом тонкослойной хроматографии [9] с анализом пятен на радиоактивность в сцинтилляторе Брея [15] на приборе Ultrobeta-1210 (ЛКВ, Швеция). После ферментации колонку промывали 10 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) (6) и элюировали адренодоксинредуктазу тем же буфером, содержащим 0,4 М KCl (7). Десорбцию цитохрома Р-450 осуществляли 0,05 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 1 М KCl и 0,4% (вес/объем) холат натрия (8). Реконструкция и дифференциальная десорбция холестерингидроксилазы непрерывно контролировалась по поглощению элюата при 280 нм. Элюат с колонки собирали по фракциям (2,5 мл) со скоростью 15 мл/ч и для каждой фракции записывали спектр поглощения с целью идентификации в элюате NADPH, цитохрома Р-450 и адренодоксинредуктазы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tamaoki B. I. (1973) *J. Steroid Biochem.*, 4, 89—116.
2. Omura T., Sanders E., Estabrook R. W., Cooper D. Y., Rosental O. (1966) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 117, 660—673.
3. Simpson E. R., Boid G. S. (1966) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 24, 10—17.
4. Ramseyer J., Harding B. W. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 315, 306—316.
5. Estabrook R. W., Martinez-Zedillo G., Young S., Peterson J. A., McCarthy J. (1975) *J. Steroid Biochem.*, 6, 419—425.
6. Chu J., Kimura T. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 5183—5187.

7. Hiwatashi A., Ichikawa Y., Maruya N., Yamano T., Aki K. (1976) *Biochemistry*, **15**, 3082—3090.
8. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чашин В. Л. (1977) Тезисы докл. IV Всес. сим-поз. по химии белков и пептидов, с. 118, Минск.
9. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чашин В. Л. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 780—786.
10. Jefcoate C. R., Orme-Johnson W. H., Beinert H. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 3706—3715.
11. Takemori S., Sato H., Gomi T., Suhara K., Katagiri M. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1151—1157.
12. Bjorkhem I., Karlmar K. E. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **51**, 145—154.
13. Schleyer H., Cooper D. Y., Rosental O. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6103—6115.
14. Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370—2378.
15. Bray G. (1960) *Anal. Biochem.*, **1**, 279—285.

Поступила в редакцию  
22.IX.1977

## STRUCTURAL ORGANIZATION OF MITOCHONDRIAL STEROID-HYDROXYLATING COMPLEXES

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

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

The self-assembly of individual proteins from the mitochondrial cholesterol-hydroxylating system into entire enzymatic complex has been studied. A system capable of converting cholesterol to pregnenolon has been reconstituted on a column with immobilized adrenodoxin using adrenodoxin reductase and a cholesterol specific cytochrome P-450. This approach seems to be promising for immobilization of various steroid-synthesizing systems.

---