



УДК 577.1+547.963

**РОЛЬ ЖЕЛЕЗОСЕРОСОДЕРЖАЩЕГО «КЛАСТЕРА»
АДРЕНОДОКСИНА В САМОСБОРКЕ 20S,
22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ**

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

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Адренодоксин, негемовый железосеросодержащий белок, входит в состав стероидгидроксилирующих систем из митохондрий коры надпочечников и совместно с адренодоксинредуктазой образует цитохром P-450-редуктазный комплекс, осуществляющий транспорт электронов к цитохрому P-450 [1–3]. Молекула адренодоксина содержит Fe_2S_2 -«кластер», схематично изображенный на рис. 1. Этот «кластер» связан с молекулой белка посредством четырех остатков цистеина. В настоящее время известна полная аминокислотная последовательность для адренодоксина из митохондрий коры надпочечников быка [4] и адренодоксина из митохондрий коры надпочечников свиньи [5].

Недавно нами при работе с колонкой, заполненной адренодоксин-сефарозой (адренодоксин, иммобилизованный на CNBr-сефарозе), была показана самосборка 20S, 22R-холестерингидроксилирующей системы [6]. Полученные результаты позволили предположить наличие у молекулы адренодоксина индивидуальных участков связывания с адренодоксинредуктазой и цитохромом P-450.

Большой интерес представляло выяснение роли Fe_2S_2 -«кластера» в формировании пространственной структуры молекулы адренодоксина и поддержании ее в нативном виде, способном взаимодействовать с адренодоксинредуктазой и цитохромом P-450. Кроме того, в процессе трансформации холестерина в прегненолон на колонке с реконструированной 20S, 22R-холестерингидроксилирующей системой наблюдалось разрушение Fe_2S_2 -«кластера», что приводило к падению ферментативной активности системы. В этой связи практическую ценность представляло выяснение возможности повторного встраивания «кластера» в молекулу адренодоксина, иммобилизованного на сефарозе.

Контроль за степенью удаления и встраивания «кластера» проводили спектрофотометрически, регистрируя в 2-мм кювете спектр поглощения адренодоксин-сефарозы. Контрольная кювета содержала те же количества сефарозы 4В. В опыт было взято 3,5 мл уплотненной адренодоксин-сефарозы с удельным содержанием иммобилизованного адренодоксина 330 нмоль/мл геля. Для удаления «кластера» адренодоксин-сефарозу про-

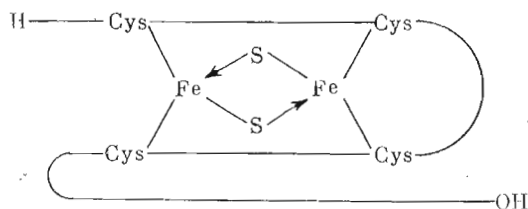


Рис. 1. Схематичное изображение Fe_2S_2 -«кластера» адренодоксина

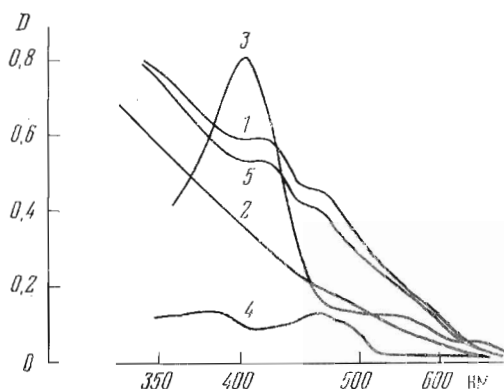


Рис. 2. Спектры поглощения нативной адренодоксин-сефарозы (1), адренодоксин-сефарозы после удаления Fe_2S_2 -«кластера» (2), сорбированного цитохрома Р-450 (3) и адренодоксинредуктазы (4) и адренодоксин-сефарозы после реконструкции Fe_2S_2 -«кластера» (5)

мывали 200 мл 0,1 М трис-НСl-буфера (рН 9,0), содержащего 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Следует отметить, что наибольший эффект удаления наблюдался после предварительного анаэробного восстановления иммобилизованного адренодоксина дитионитом натрия. В этих условиях происходит довольно быстрое исчезновение характерной для адренодоксин-сефарозы темно-красной окраски (рис. 2, 2).

Для проверки связывающей способности обработанной таким образом адренодоксин-сефарозы проводили самосборку 20S, 22R-холестерингидроксилирующей системы по методу [6]. Для этого через колонку (1×0,5 см), наполненную сефарозой с иммобилизованным адренодоксином, лишенным «кластера», наносили 40 нмоль цитохрома Р-450 в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 (исходный буфер). После промывки колонки 20 мл исходного буфера гель помещали в кювету спектрофотометра и записывали спектр сорбированного цитохрома Р-450 против кюветы, наполненной сефарозой с иммобилизованным адренодоксином, лишенным «кластера» (рис. 2, 3). Элюцию сорбированного цитохрома Р-450 проводили исходным буфером, содержащим 1 М NaCl и 0,3% холат натрия.

Для проверки связывания адренодоксинредуктазы через колонку пропускали 40 нмоль адренодоксинредуктазы с последующей регистрацией спектра поглощения (рис. 2, 4). Элюцию адренодоксинредуктазы осуществляли исходным буфером, содержащим 0,5 М NaCl. Определение содержания цитохрома Р-450 и адренодоксинредуктазы после десорбции и спектральный анализ этих белков в сорбированном состоянии показали, что сорбция (с учетом потерь при хроматографическом процессе) проходила практически на 100%.

Для полной самосборки системы через колонку пропускали 40 нмоль цитохрома P-450, промывали колонку исходным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, и далее наносили 25 нмоль аденодоксинредуктазы. Активность оценивали после пропускания через колонку в течение 30 мин при 20°С 5 мл исходного буфера, содержащего 0,5 мкмоль NADPH (использовалась NADPH-генерирующая система) и 50 нмоль [4-¹⁴C]холестерина (разбавляли до удельной радиоактивности 105 000 имп/мин).

Разделение холестерина и прегненолона осуществляли методом ТСХ в системе *n*-пентан — диэтиловый эфир — уксусная кислота, 60:40:2, и определяли процентное содержание образующегося прегненолона (за 100% принимали сумму радиоактивностей холестерина и прегненолона). Установлено, что при самосборке системы на иммобилизованном аденодоксине, лишенном «кластера», превращение холестерина в прегненолон не превышало 5%. В аналогичных условиях при использовании нативной аденодоксин-сефарозы эта величина составляла 55–60%.

Обработка иммобилизованного аденодоксина, лишенного Fe₂S₂-«кластера», 2 и 4 М мочевиной также не привела к потере связывающей способности аденодоксина по отношению к аденодоксинредуктазе и цитохрому P-450. Даже после выдерживания в 8 М мочевины в течение 56 ч аденодоксин полностью сохранял свою связывающую способность. При последующем нанесении аденодоксинредуктазы и цитохрома P-450 на колонку с отмойтой от мочевины аденодоксин-сефарозой происходила самосборка тройных комплексов типа аденодоксинредуктаза — свободный от «кластера» аденодоксин — цитохром P-450.

Нами выявлены условия повторного встраивания Fe₂S₂-«кластера» в молекулу аденодоксина, иммобилизованного на сефарозе. Для этого аденодоксин-сефарозу (иммобилизованный аденодоксин был свободен от «кластера») в 0,1 М трис-HCl-буфере (рН 9,0), содержащем 0,1 М 2-меркаптоэтанол и 8 М мочевины, помещали в ультрафильтрационную ячейку (роль фильтра выполнял диск бумаги Ватман 3 ММ), выдерживали в анаэробных условиях 30 мин и далее при постоянном перемешивании добавляли по 0,2 мл 0,1 М Na₂S и 0,1 М FeSO₄. После 10 мин инкубации при постоянном перемешивании для удаления мочевины, 2-меркаптоэтанол и избытка Na₂S и FeSO₄ через инкубационную смесь током азота продавливали 0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4. Для окисления встроенного «кластера» через гель аденодоксин-сефарозы барботировали воздух. Последующий спектральный анализ показал 85% реконструкцию Fe₂S₂-«кластера» (рис. 2, 5).

Использование аденодоксин-сефарозы с реконструированным «кластером» позволило провести самосборку системы. Последующий анализ активности в условиях, описанных выше, показал, что в этом случае трансформация холестерина в прегненолон составляла 45%.

На основании полученных данных сделан ряд выводов: а) удаление Fe₂S₂-«кластера» не оказывает влияния на структуру участков связывания аденодоксина с аденодоксинредуктазой и цитохромом P-450, б) обработка мочевиной иммобилизованного аденодоксина, свободного от Fe₂S₂-«кластера», не приводит к утрате способности аденодоксина образовывать комплексы с аденодоксинредуктазой и цитохромом P-450, в) при нарушении *in vitro* процесса гидроксирования можно провести «разборку» реконструированной системы, «исправить» или заменить «неработающий» компонент и вновь провести самосборку гидроксильной системы на колонке с аденодоксин-сефарозой для ее дальнейшего использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chu J., Kimura T. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5183–5187.
2. Hiwatashi A., Ishikawa Y., Maruya N., Yamano T., Aki K. (1976) Biochemistry, 15, 3082–3090.
3. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чашин В. Л. (1977) Биоорг. химия, 3, 1064–1069.

4. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. T., Kimura T. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 1141—1157.
5. Ахрем А. А., Лапко А. Г., Лапко В. Н., Морозова Л. А., Репин В. А., Тищенко И. В., Чащин В. Л. (1978) *Биоорган. химия*, 4, 462—475.
6. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) *Биоорган. химия*, 4, 688—693.
Поступило в редакцию
11.VI.1979

**IMPLICATION OF ADRENODOXIN IRON-SULFUR CLUSTER IN
SELF-ASSOCIATION OF THE 20S, 22R-CHOLESTEROL HYDROXYLATING
SYSTEM FROM ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA**

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

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

The removal of iron-sulfur cluster from adrenodoxin abolishes its capability for electron transport, but does not prevent adrenodoxin complexation with adrenodoxin reductase and cytochrome P-450. The conditions are found for the cluster reconstruction into immobilized adrenodoxin.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 19.10.79 Подписано к печати 5.12.79 Т-21710 Формат бумаги 70×108/16
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0 Уч.-изд. л. 14,4 Бум. л. 5,0 Тираж 865 экз. Зак. 2380

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 121089. Москва, Шубинский пер., 10