



УДК 577.152.199.1.02

ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ СТЕРОИДОВ В ДИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЕ, СОСТОЯЩЕЙ ИЗ ЦИТОХРОМА P-450 И ИММОБИЛИЗОВАННОГО АДРЕНОДОКСИНА

Беспалов И. А., Лис Л. Г., Красовская Л. И.,
Марцев С. П.*

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск;

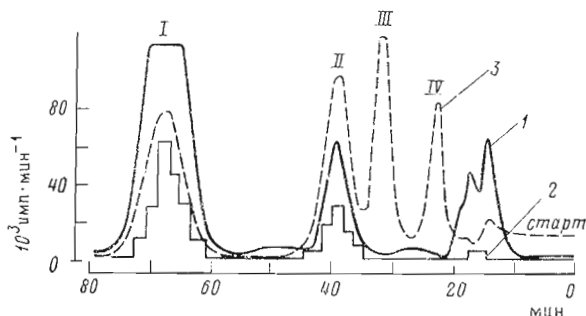
**Институт физики Академии наук БССР, Минск*

Ранее нами экспериментально была показана диссоциация цитохрома P-450 и аденодоксинредуктазы при функционировании мультиферментной системы гидроксилирования стероидов с участием иммобилизованного аденодоксина [1]. Система включала в себя полный набор ферментов митохондриального гидроксилирования стероидов: электронтранспортные белки — NADPH-зависимую редуктазу аденодоксина и иммобилизованный аденодоксин, а также субстратспецифичные цитохромы P-450. В данной модельной системе диссоциация каталитически активных белковых комплексов скоррелирована с процессом гидроксилирования стероидов. Однако вопрос о функциональном значении диссоциации белковых комплексов при электронном транспорте в мультиферментных стероидгидроксилирующих системах остается открытым: одна из гипотез [2, 3] рассматривает диссоциацию как основной процесс, обеспечивающий транспорт электронов и гидроксилирование стероидов, другая (гипотеза прочно связанных триферментных комплексов) [4—6] считает диссоциацию белковых комплексов побочным процессом.

В данной работе исследованы модельные стероидгидроксилирующие системы, гидроксилирование в которых может происходить по единственному механизму — диссоциации и реассоциации диферментных комплексов цитохрома P-450 и иммобилизованного аденодоксина. Каталитическая активность таких систем доказывает функциональную значимость диссоциации и возможность существования механизма гидроксилирования, основанного на диссоциации электронтранспортных белковых комплексов.

В работе использованы гомогенные белки системы гидроксилирования холестерина (цитохром P-450 (C)) и 11 β -гидроксилирования стероидов (цитохром P-450 (11 β)), выделенные из митохондрий надпочечных желез быка с помощью описанных ранее методов [5, 7], а также аденодоксин, иммобилизованный на CNBr-активированной сефарозе 4B [5]. Поскольку аденодоксин является одноэлектронным восстановителем цитохрома P-450, для введения одной оксигруппы в молекулу субстрата требуются два акта восстановления цитохрома разными молекулами аденодоксина и, следовательно, диссоциация диферментного комплекса является функционально необходимым событием.

Общая схема экспериментов включала в себя следующие операции. Аденодоксин-сефарозу промывали для создания анаэробных условий 0,02 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4 (буфер А), через который предварительно пропускали гелий для полного удаления растворенного кислорода [8]. Иммобилизованный аденодоксин восстанавливали в анаэробных условиях дитионитом натрия и продукты деградации дитионита удаляли промывкой аденодоксин-сефарозы бескислородным буфером. Полноту удаления продуктов распада дитионита и восстановления аденодоксина контролировали спектрофотометрически. Данные условия исключают



ВЭЖХ продукта гидроксилирования 11-дезоксикортикостерона в ферментной системе. Контроль по поглощению (λ_{240}) (1, 3) и по радиоактивности (2). Кривая 3 — разделение стандартной смеси 11-дезоксикортикостерона (I), кортикостерона (II) и их 48-гидроксилированных (соответственно III и IV). Условия разделения: хроматограф ХЖ-1305 (СССР), колонка $0,5 \times 230$ мм, сорбент Lichrosorb RP-18₂ (10 мкм). Элюент — ацетонитрил — метанол — вода (22 : 28 : 50), скорость элюции 1,0 мл/ч

ют инактивацию цитохрома P-450 продуктами распада дитионита. Ферментативную реакцию запускали внесением в суспензию с восстановленным иммобилизованным адrenoоксином цитохрома P-450, субстрата (11-дезоксикортикостерона либо холестерина) и поддерживали аэрацией, достигаемой пробулькиванием воздуха через реакционную смесь в течение 15 мин. В этих условиях происходило постепенное реокисление адrenoоксина в результате двух процессов: восстановления цитохрома P-450 и автоокисления ферредоксина кислородом (последний процесс является доминирующим и обуславливает не менее чем на 90% реокисление адrenoоксина). Стероиды, экстрагированные из реакционной среды этилацетатом, идентифицировали и количественно определяли по методу [7] для кортикостерона либо по методу [9] для прегненолона.

Реакцию 11 β -гидроксилирования 11-дезоксикортикостерона проводили в среде, содержащей 370 нмоль иммобилизованного адrenoоксина (1 мл адrenoоксин-сефарозы), 0,9 мкМ цитохром P-450(11 β), 50 мкМ 11-дезоксид-11 α , 2 α (n)³H кортикостерон (24 мкКи/мкмоль), 0,01% твина 20 в конечном объеме 3 мл буфера А. В ходе реакции происходила стереоспецифическая трансформация 11-дезоксикортикостерона в кортикостерон с выходом основного продукта 9,4% (определен после вычета процента трансформации стероида в «нулевой» пробе, не содержавшей цитохрома P-450). Структура образованного радиоактивного продукта реакции доказана тремя способами: 1) методом двумерной ТСХ по стандарту кортикостерона [7]; 2) методом ВЭЖХ (рисунок); 3) с помощью масс-спектрометрии.

Анализ масс-спектров продукта реакции и заведомого образца кортикостерона (Varian MAT-311, 70 эВ, 145°С) показывает, что характер фрагментации и соотношения интенсивности пиков в обоих случаях полностью совпадают. Кроме того, нами изучен характер фрагментации продукта реакции, модифицированного метилгидроксиламином согласно методике [10], и кортикостерона, модифицированного тем же способом, в режиме высокого разрешения. Существенное увеличение стабильности стероида и возросшая вследствие этого интенсивность пика молекулярного иона позволяют с высокой точностью определить значение m/z молекулярного иона, составляющее 404,2651 (расчетное значение на основании элементарного состава $C_{23}H_{33}N_2O_4$ — 404,2675). Эти результаты позволяют однозначно идентифицировать продукт ферментативной реакции как кортикостерон.

Аналогичная схема эксперимента использована для реконструкции системы гидроксилирования холестерина с отщеплением его боковой цепи. Инкубация в течение 15 мин цитохрома P-450 (С) (1,2 мкМ) в присутствии восстановленного иммобилизованного адrenoоксина (1,26 мкмоль), [1 α , 2 α (n)³H]холестерина (18,8 мкМ, 312 мкКи/мкмоль) и твина 80 (0,08%) в 8,5 мл буфера А приводит к появлению специфического продукта реакции — прегненолона. Выход прегненолона после вычета радиоактивно-

сти в «нулевой» пробе составил 4,3%. Продукт реакции идентифицирован как прегненолон методами двумерной ТСХ и ВЭЖХ.

Стереоспецифическое гидроксирование природных субстратов — 11-дезоксикортикостерона и холестерина в предлагаемой диферментной системе позволяет утверждать, что эта модельная система, действующая по механизму диссоциации и реассоциации комплекса цитохром—аденодоксин, воспроизводит продукты ферментативного акта нативной системы. Гидроксирование стероидов в данной модельной системе не связано с участием побочных продуктов каталитического акта, содержащих активированные формы кислорода — супероксида O_2^- и H_2O_2 . Это показано в экспериментах с использованием ферментативных гасителей радикалов — супероксиддисмутазы (Sigma, США) и каталазы (Serva, ФРГ), которые не ингибировали реакции 11 β -гидроксирования 11-дезоксикортикостерона. Единственным объяснением каталитической активности диферментной системы остается гидроксирование стероидов в активном центре цитохрома P-450 при последовательном восстановлении гемопротейна разными молекулами аденодоксина.

Предложенная нами диферментная система гидроксирования стероидов представляет собой модель, экспериментально доказывающую функциональную значимость диссоциации белковых электронтранспортных комплексов с участием аденодоксина и цитохрома P-450 для гидроксирования стероидных субстратов. В исследованной экспериментальной системе такой механизм белок-белковых взаимодействий является единственно возможным. В других модельных системах, а также в митохондриальной системе *in vivo* механизм взаимодействия белков в процессе стероидогенного транспорта электронов может быть более сложным и включать кроме диссоциирующего диферментного комплекса цитохром—аденодоксин другие каталитически активные ассоциаты, в том числе триферментные комплексы, каталитическое проявление которых показано в работе [11].

Кроме того, следует отметить, что в исследованной диферментной системе выход гидроксированного стероида достигает 5 моль на 1 моль цитохрома P-450. Таким образом, в данной работе впервые показана возможность функционирования стероидгидроксимирующей диферментной системы с многократным циклическим превращением цитохрома P-450 по схеме, совпадающей со схемой его реакционного цикла в полной по ферментному составу системе [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалов И. А., Марцев С. П., Чащин В. Л., Ахрем А. А. Тез. докл. III Советско-швейцарского симпозиума «Биологические мембраны. Структура и функции». Ташкент, 1983, с. 122.
2. Seybert D. W., Lambeth D. J., Kamin H. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 23, p. 8355—8358.
3. Hanukoglu J., Jefcoate C. R. J. Biol. Chem., 1980, v. 285, № 7, p. 3057—3061.
4. Kido T., Kimura T. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 23, p. 11806—11815.
5. Akhrem A. A., Lapko V. N., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. Acta biol. et med. Germ., 1979, v. 38, № 2—3, p. 257—273.
6. Радюк В. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л., Ахрем А. А. Биохимия, 1983, т. 48, № 3, с. 454—463.
7. Марцев С. П., Чащин В. Л., Ахрем А. А. Биохимия, 1982, т. 47, № 7, с. 1070—1083.
8. Snyder L. R. J. Chromatogr. Science, 1983, v. 21, № 2, p. 65—69.
9. Takikawa O., Gomi T., Suhara K., Itagaki E., Takemori S., Katagiri M. Arch. Biochem. and Biophys., 1978, v. 190, № 1, p. 300—306.
10. Chu M., Vlick S. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 5, p. 2218—2224.
11. Усанов С. А., Турко И. В., Чащин В. Л., Ахрем А. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 280, № 6, с. 1487—1491.
12. Метелца Д. И. Активация кислорода ферментными системами. М.: Наука, 1980. 256 с.

Поступило в редакцию
5.VII.1985

STEROID HYDROXYLATION IN A DIENZYME SYSTEM CONSISTING
OF CYTOCHROME P-450 AND IMMOBILIZED ADRENODOXIN

BESPALOV I. A., LISS L. G., KRASOVSKAYA L. I.*, MARTSEV S. P.

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

Experimental systems for the hydroxylation of steroids (11-deoxycorticosterone and cholesterol) with reduced electron transfer chain, in which flavoprotein was omitted, were investigated. Incubation of chemically reduced immobilized adrenodoxin either with cytochrome P-450_{11β} or cytochrome P-450_{sc} in the presence of substrate of hydroxylation and oxygen yields the specific reaction products, corticosterone or pregnenolone. The catalytic activity of the experimental dienzyme systems proves the possibility of the steroid hydroxylation mechanism based exclusively on dissociation and reassociation of the electron transporting protein complexes.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.01.86 Подписано к печати 05.03.86 Т-00254 Формат бумаги 70×108^{1/16}
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,6 тыс. Уч.-изд. л. 13,4 Бум. л. 4,5
Тираж 908 экз. Зак. 2191

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6