



УДК 577.1 + 547.963

**ВЫДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ
СТЕРОИДГИДРОКСИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКА***Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

Предложена схема выделения отдельных компонентов 20α -($22R$)-холестерингидроксилирующей системы из митохондрий коры надпочечников быка. Описанная схема позволяет получать компоненты стероидгидроксилирующей системы в высокоочищенном виде и с небольшими затратами времени. Проведена реконструкция стероидгидроксилирующей системы с получением прегненолона из холестерина.

В настоящее время большое внимание исследователей привлекают системы, осуществляющие введение гидроксильных групп в низкомолекулярные органические соединения, в частности ферментативная система митохондрий коры надпочечников, ответственная за 20α -($22R$)-гидроксилирование холестерина и 11β -гидроксилирование дезоксикортикостерона, т. е. система, принимающая непосредственное участие в биосинтезе кортикостероидных гормонов [1].

Выделение этой системы было описано ранее [2—5], однако предложенные схемы выделения чрезвычайно трудоемки и требуют больших затрат времени. В настоящей работе нами описана схема выделения всех трех компонентов стероидгидроксилирующей системы из митохондрий коры надпочечников быка: аденодоксинредуктазы, аденодоксина и цитохрома P-450. Нам кажется удобным использование этой схемы при изучении механизма ферментативного гидроксилирования стероидных гормонов, а также при изучении строения и функции отдельных белков данной системы, так как все выделение занимает сравнительно немного времени и позволяет получать белки в высокоочищенном виде.

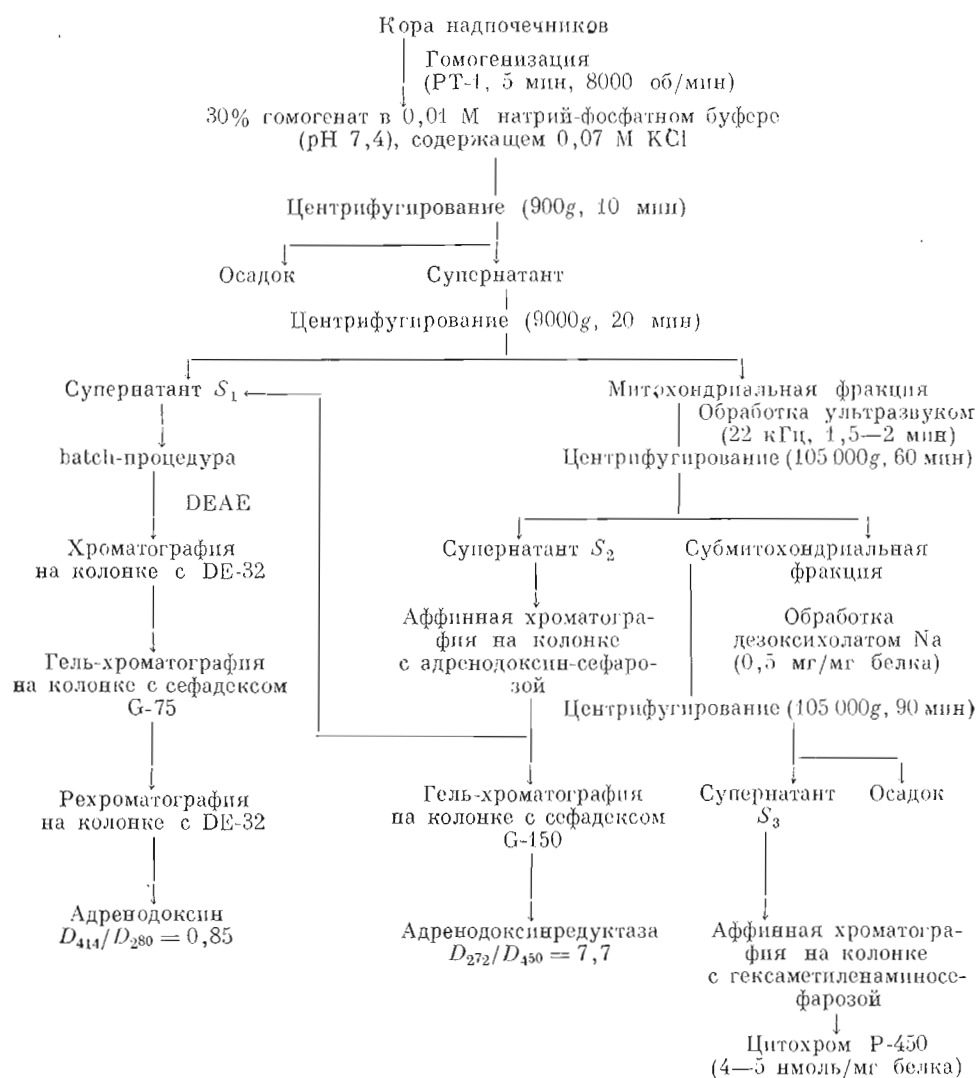
В качестве исходного сырья для выделения белков были взяты надпочечники крупного рогатого скота. Так как данная ферментативная система локализована во внутренней мембране митохондрий [6], нами после жесткой механической гомогенизации надпочечников была предпринята работа митохондриальной фракции. Далее митохондрии разрушали действием ультразвука, при этом в супернатанте S_2 , полученном после центрифугирования обработанной ультразвуком митохондриальной фракции, находились аденодоксин и аденодоксинредуктаза, а в осаждаемой фракции (субмитохондриальная фракция) — цитохром P-450. Для солиubilизации цитохрома P-450 из субмитохондриальной фракции последнюю обрабатывали дезоксихолатом натрия.

Необходимо отметить, что аденодоксин находился не только в супернатанте S_2 , полученном после отделения субмитохондриальных частиц,

но и в супернатанте S_1 после отделения митохондриальной фракции. Это, очевидно, связано с тем, что митохондрии частично разрушаются при механической гомогенизации ткани, однако на выход аденодоксинредуктазы и цитохрома Р-450 процесс частичного разрушения митохондрий существенного влияния не оказывает, так как для солиubilизации как аденодоксинредуктазы, так и цитохрома Р-450 необходимо дополнительное воздействие ультразвуком и дезоксихолатом натрия соответственно. Поэтому для полного выделения аденодоксина супернатант S_1 и супернатант S_2 , предварительно пропущенный через колонку с аденодоксин-сефарозой, объединяли.

Дальнейшее выделение белков проводили, используя методы ионообменной и гель-хроматографии в случае аденодоксина и аффинной хроматографии в случае аденодоксинредуктазы и цитохрома Р-450. При выделении аденодоксинредуктазы нами была использована аффинная хроматография как на колонке с аденодоксин-сефарозой, так и в объеме аденодоксин-сефарозы (batch-процедура). Выделение отдельных компонентов стероидгидроксилирующей системы представлено на схеме. Получение митохондриальной, субмитохондриальной, а также фракций S_1 ,

Схема выделения отдельных компонентов стероидгидроксилирующей системы



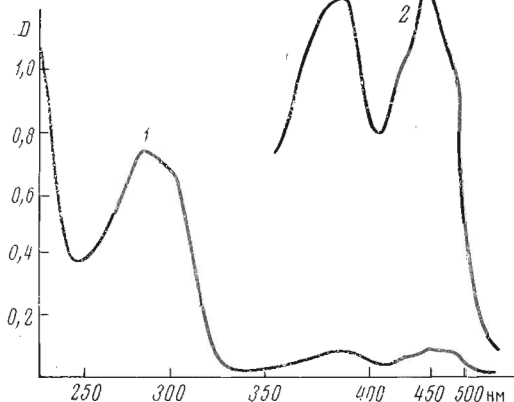


Рис. 1

Рис. 1. Спектр поглощения очищенного препарата адренодоксинредуктазы при концентрации белка 8,8 мкМ (1) и 115 мкМ (2)

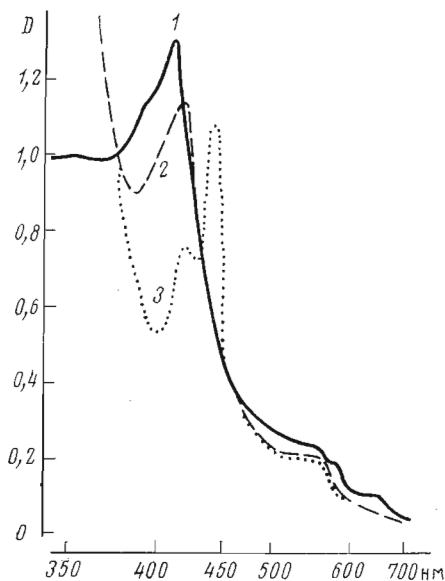


Рис. 2

Рис. 2. Спектры поглощения частично очищенного цитохрома Р-450: окисленная форма (1), дитионитвосстановленная форма (2), восстановленная форма, обработанная моноокисью углерода (3)

S_2 , S_3 описано в «Экспериментальной части» данной работы. Степень чистоты полученных препаратов оценивали спектрофотометрически: для адренодоксина D_{414}/D_{280} [2], для адренодоксинредуктазы D_{272}/D_{450} [7].

При выделении этих белков мы отказались от сульфат-аммонийного фракционирования, широко применяемого ранее [7], поскольку был отмечен факт частичной денатурации адренодоксинредуктазы при проведении данной обработки. Использование градиентной элюции при выделении адренодоксина позволило существенно уменьшить количество стадий по сравнению с ранее применяемыми методиками [3]. Выход адренодоксинредуктазы и адренодоксина при использовании предложенной схемы выделения составлял 10—12 и 40—50 мг на 1 кг надпочечников соответственно.

Очищенный препарат адренодоксинредуктазы имел типичный для флавопротеинов спектр поглощения (рис. 1) с $\lambda_{\text{макс}}$ 272, 378 и 450 нм и перегибами при 420 и 475 нм. Отношение D_{272}/D_{450} составляло 7,7, что соответствует высокоочищенной адренодоксинредуктазе [4, 7].

Элюционный профиль очистки цитохрома Р-450 на колонке с гексаметиленаминосефарозой аналогичен профилю, полученному Имаи и Сато при выделении цитохрома Р-450 из микросом печени кролика [8]. Полученный нами препарат белка являлся смесью высокоспиновой и низкоспиновой форм цитохрома Р-450, о чем свидетельствовал абсолютный спектр поглощения (рис. 2). Спектр поглощения высокоспиновой формы окисленного цитохрома Р-450 (комплекс белка с эндогенным холестерином) характеризовался перегибом при 396 нм и $\lambda_{\text{макс}}$ 645 нм [5], максимумы поглощения при 418, 540 и 575 нм относились к низкоспиновой форме (свободный от субстрата белок) [9]. Спектр поглощения восстановленной формы, обработанной моноокисью углерода, имел $\lambda_{\text{макс}}$ 423, 450 и 550 нм.

Спектральные характеристики полученного препарата цитохрома Р-450 были аналогичны приведенным в работе [10]. Удельное содержание цитохрома Р-450 составляло 4—5 нмоль на 1 мг белка.

Из полученных препаратов аденодоксинредуктазы, аденодоксина и цитохрома P-450 была реконструирована 20α -(22R)-гидроксилирующая система холестерина [11].



В качестве субстрата был взят $[4-^{14}\text{C}]$ холестерин, ожидаемый продукт реакции — $[4-^{14}\text{C}]$ прегненолон. Реакция начиналась добавлением NADPH-генерирующей системы, включающей глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, глюкозо-6-фосфат и NADP. Анализ на радиоактивность пятен с R_f , соответствующим прегненолону, показал, что в результате ферментативной реакции превращение холестерина в прегненолон составляло $\sim 7\%$. Данная величина несколько ниже, чем приводимая в работе [12], что, очевидно, связано с присутствием в инкубационной среде Тритона X-100 (до 0,05%).

Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие реактивы: дитиотреит (Bio-Rad, США), этилендиаминтетрауксусная кислота, дезоксихолат Na (Sigma, США); DEAE-целлюлоза, глицин, NADP (Reanal, Венгрия); DEAE-целлюлоза DE-32 (Whatman, Англия); сефадексы G-75, G-150, бромцан-сефароза 4B, гексаметиленаминосефароза (Pharmacia, Швеция); $[4-^{14}\text{C}]$ холестерин («Изотоп», СССР), холестерин, прегненолон (Germed, ГДР); глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, глюкозо-6-фосфат (Ferak, ФРГ). Остальные реактивы квалификации не ниже ч. д. а.

Содержание белка определяли по методу Лоури и др. [13]. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили согласно Дэвису [14]. Концентрации очищенных препаратов аденодоксина, аденодоксинредуктазы и цитохрома P-450 определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции $\epsilon_{414} 1 \cdot 10^4$ [3], $\epsilon_{450} 1,13 \cdot 10^4$ [4], $\epsilon_{450-490} 9,1 \cdot 10^4$ [15] соответственно. Спектры поглощения получали на спектрофотометре Specord UV-Vis (Zeiss, ГДР). Радиоактивность измеряли на приборе Ultroteta-1210 (ЛКВ, Швеция). Для создания градиентов использовали градиентный смеситель Ultrograd (ЛКВ, Швеция).

Получение митохондриальной фракции. 2 кг свежемороженых (-18°) надпочечников пропускали через мясорубку и полученный фарш подвергали жесткой механической обработке на размельчителе тканей РТ-1 (5 мин, 8000 об/мин) в 5 л 0,01 М натрий-фосфатного буфера, содержащего 0,07 М KCl. Ядерную фракцию и неразрушенные клетки разделяли после центрифугирования при 900 g в течение 10 мин и повторно гомогенизировали с последующим центрифугированием, как описано выше. Супернатант, полученный после отделения ядерной фракции, центрифугировали 20 мин при 9000 g (Beckman J-21B, ротор JA-10). Полученный осадок митохондриальной фракции суспендировали в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,07 М KCl, до концентрации митохондриального белка 60 мг/мл и хранили при -18° , а супернатант S_1 использовали для выделения аденодоксина.

Получение субмитохондриальной фракции. Аликвоты суспензии митохондрий (по 30 мл, всего 300—400 мл) обрабатывали 1,5—2 мин ультразвуком на приборе типа УЗДН-1 при 22 кГц и центрифугировали при 105 000 g в течение 1 ч. При этом был получен супернатант S_2 , использованный далее для выделения аденодоксинредуктазы и аденодоксина, а также субмитохондриальной фракция, содержащая связанный цитохром P-450.

Выделение аденодоксина. В качестве первой стадии выделения белка была выбрана ионообменная хроматография в объеме DEAE-целлюлозы.

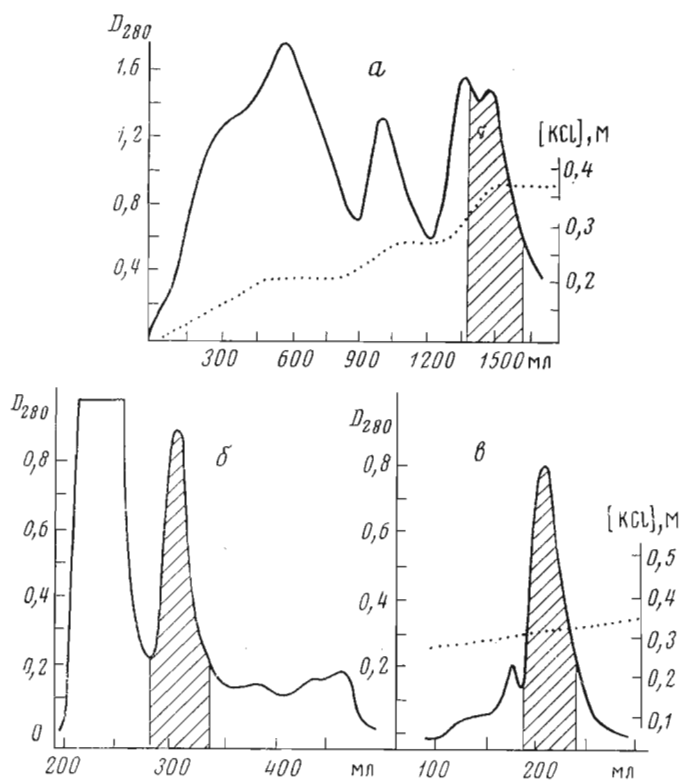


Рис. 3. Выделение адренодоксина: *a* — хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой DE-32; *б* — гель-хроматография на колонке с сефадексом G-75; *в* — рехроматография на колонке с DEAE-целлюлозой DE-32

Для этого к объединенным супернатантам S_1 и S_2 , предварительно пропущенным через колонку с адренодоксин-сефарозой, добавляли DEAE-целлюлозу, уравновешенную 0,01 М натрий-фосфатным буфером с 0,1 М KCl, и перемешивали 4 ч. После промывания на стеклянном фильтре фракцию белков, содержащую адренодоксин, элюировали 0,01 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,4) с 0,4 М KCl. После диализа данную фракцию наносили на колонку (5,0 × 15 см) с DEAE-целлюлозой DE-32. Для удаления несорбирующихся белков колонку промывали 2 л 0,01 М натрий-фосфатного буфера с 0,1 М KCl, а затем элюировали адренодоксин в градиенте концентрации KCl со скоростью элюции 90 мл/ч (рис. 3а). После обессоливания и лиофильной сушки препарат белка растворяли в минимальном объеме и подвергали очистке на колонке (2,5 × 100 см) с сефадексом G-75, используя для элюирования 0,01 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,4) с 0,1 М KCl при скорости элюции 40 мл/ч. При этом был получен препарат белка, имеющий спектрофотометрический индекс чистоты D_{414}/D_{280} 0,7. Очищенный белок, гомогенный, по данным электрофореза в полиакриламидном геле и N-концевому анализу, был получен на колонке (2,5 × 30 см) с DEAE-целлюлозой DE-32 с применением линейного градиента KCl в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) при скорости элюции 60 мл/ч (рис. 3б, в). Спектрофотометрический индекс чистоты препарата белка D_{414}/D_{280} был равен 0,85.

Приготовление адренодоксин-сефарозы. 7 мкмоль лиофильно высушенного препарата адренодоксина растворяли в 15 мл 0,1 М NaHCO_3 , содержащего 0,5 М KCl, и добавляли к 10 г бромциан-сефарозы, предварительно отмытым 2 л 0,001 М HCl. Гель перемешивали в течение ночи, добавляли 30 мл 1 М раствора глицина и инкубировали дополнительно 2 ч.

Количество иммобилизованного адренодоксина составляло $\sim 95\%$.

Выделение адренодоксинредуктазы. Супернатант S_2 в количестве 200 мл наносили на колонку, наполненную адренодоксин-сефарозой. Белки, не связавшиеся с адренодоксин-сефарозой, отмывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,4) с 0,07 М KCl (контроль — поглощение при 280 нм), а адренодоксинредуктазу, сорбированную на носителе, элюировали этим же буфером, содержащим 0,4 М KCl. При этом фракцию белков, не связавшихся с адренодоксин-сефарозой, объединяли с супернатантом S_1 . Спектрофотометрический индекс чистоты D_{272}/D_{450} полученного после аффинной хроматографии препарата адренодоксинредуктазы составлял 8,0—8,5. Последующей гель-хроматографией на колонке (2,5 × 100 см) с сефадексом G-150 (рис. 4) удалось получить препарат

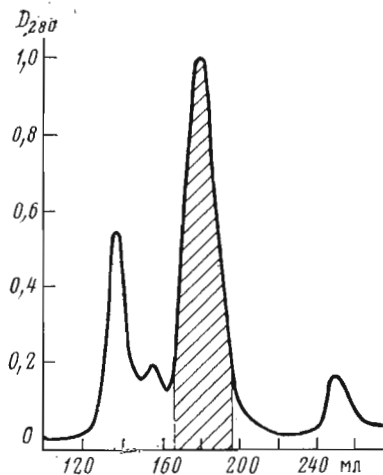


Рис. 4. Гель-хроматография на колонке с сефадексом G-150 препарата адренодоксинредуктазы, полученного после аффинной хроматографии

белка, имеющий спектрофотометрический индекс $D_{272}/D_{450} = 7,7$ (рис. 1) и гомогенный по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Препарат адренодоксинредуктазы хранили без видимой потери активности в 30% растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержащем 10% глицерина.

Аффинная хроматография адренодоксинредуктазы в объеме адренодоксин-сефарозы. 200 мл аликвоты фракции S_2 перемешивали 60 мин с адренодоксин-сефарозой, приготовленной так, как описано выше. После промывания на стеклянном фильтре геля адренодоксин-сефарозы 300 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера с 0,07 М KCl адренодоксинредуктазу элюировали тем же буфером с 0,8 М KCl.

Выделение цитохрома P-450. Для солюбилизации цитохрома P-450 субмитохондриальную фракцию суспендировали в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 10^{-4} М этилендиаминтетрауксусную кислоту, 10^{-4} М дитиотреит и 10% глицерина (буфер А), до конечной концентрации 60 мг белка/мл. К суспензии добавляли дезоксихолат натрия (0,5 мг/мг белка) и перемешивали 1 ч. Несольюбилизованные частицы отделяли центрифугированием при 105 000 g в течение 90 мин. Полученный супернатант в количестве 100 мл наносили на колонку (1,5 × 15 см) с гексаметиленаминосефарозой. Колонку промывали 150 мл буфера А и цитохром P-450 в частично очищенном виде элюировали с колонки буфером А, содержащим 1 М KCl и 0,5% Тритона X-100.

Реконструкцию холестерингидроксилирующей системы проводили согласно работе [12]. Инкубационная среда содержала: 92 нмоль адренодоксина; по 3,5 нмоль адренодоксинредуктазы и цитохрома P-450; 0,01 мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (700 ед./мл); 0,5 мл глюкозо-6-фосфата (25 мг/мл); 0,05 мл NADP (8 мг/мл); 0,02 мл $[4-^{14}\text{C}]$ холестерина (57,2 мКи/ммоль); 0,1 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,4) до конечного объема 5 мл. Реакцию проводили при 37° в течение 20 мин, продукты реакции экстрагировали хлористым метиленом, наносили на пластинку с закрепленным слоем силикагеля и хроматографировали в системе хлороформ — петролейный эфир (40—60°) — этилацетат — метанол (6 : 6 : 3 : 1). Хроматограмму проявляли парами йода. Непосредственно перед хроматографией в экстракт продуктов реакции добавляли нерадиоактивные холестерин и прегненолон. После проявления хроматограмм пятна с R_f , соответствующими прегненололу и холестерину, изолировали и анализировали на радиоактивность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tamaoki B.-I. (1973) *J. Steroid Biochem.*, **4**, 89—116.
2. Suzuki K., Kimura T. (1965) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **19**, 340—343.
3. Suhara K., Takemori S., Katagiri M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **263**, 272—278.
4. Sugijama T., Iamano T. (1975) *FEBS Lett.*, **52**, 145—148.
5. Horie S., Watanabe T. (1975) *J. Steroid Biochem.*, **6**, 401—409.
6. Nagasumu S. (1969) *J. Biochem.*, **65**, 215—224.
7. Suhara K., Ikeda Y., Takemori S., Katagiri M. (1972) *FEBS Lett.*, **28**, 45—47.
8. Imai Y., Sato R. (1974) *J. Biochem.*, **75**, 689—697.
9. Takemori S., Suhara K., Hashimoto S., Hashimoto M., Sato H., Gomi T., Katagiri M. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **63**, 588—593.
10. Ramseyer J., Harding B. W. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **315**, 306—316.
11. Omura T., Sanders E., Estabrook R. W., Cooper D., Rosental O. (1966) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **117**, 660—673.
12. Wickramasinghe R. H. (1974) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **6**, 195—201.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
14. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
15. Schleyer H., Cooper D., Rosental O. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6103—6115.

Поступила в редакцию
6.X.1976

После доработки:
23.XII.1976

ISOLATION OF INDIVIDUAL COMPONENTS OF STEROID-HYDROXYLATING SYSTEM FROM BOVINE ADRENOCORTICAL MITOCHONDRIA

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

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

A scheme for isolation of individual components of 20 α -(22R)-cholesterol-hydroxylating system from bovine adrenocortical mitochondria has been proposed. It yields the high purity components and requires small time expenses. The steroid-hydroxylating system has been reconstituted to prepare pregnenolone from cholesterol.
