



УДК 577.1+547.963

БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
11 β -ГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА P-450
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ И РЕКОНСТРУКЦИЯ
ДЕЗОКСИКОРТИКОСТЕРОН-
И ДЕЗОКСИКОРТИЗОЛГИДРОКСИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

Ахрем А. А., Марцев С. П., Чащин В. Л.

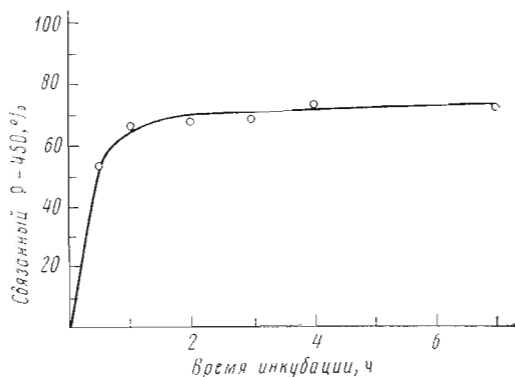
Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Продолжая изучение структурной организации митохондриальных мембраносвязанных стероидгидроксилирующих систем, мы осуществили выделение 11 β -дезоксикортикостеронгидроксилирующего цитохрома P-450. Описанные до сих пор методы выделения этого белка в частично очищенном или высокоочищенном состоянии основаны на неспецифической гидрофобной или на ионообменной хроматографии с использованием сорбентов типа аналино-сефарозы [1], октиламино-сефарозы [2] или DEAE-целлюлозы [3] и не позволяют получать 11 β -гидроксилирующий цитохром P-450, свободный от цитохрома P-420.

Для выделения 20S,22R-холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 ранее нами предложено использовать адренодоксин-сефарозу [4]. Предполагая для всех цитохромов P-450, локализованных в мембране митохондрий клеток коры надпочечников, способность образовывать биоспецифический комплекс с одним и тем же электронтранспортным белком — адренооксином, мы решили применить адренодоксин-сефарозу и для выделения 11 β -гидроксилирующего цитохрома P-450.

Исходным материалом для выделения 11 β -гидроксилирующего цитохрома P-450 служили митохондрии коры надпочечников быка, полученные и далее обработанные ультразвуком в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 (исходный буфер), согласно [5]. 11 β -Гидроксилирующий цитохром P-450 солибилизировали добавлением к субмитохондриальным частицам исходного буфера, содержащего 0,5% холата натрия, 0,5 мМ EDTA и 0,1 мМ дигитреин, при постоянном перемешивании в течение 60 мин при 4°. Во всех буферах, используемых при выделении, для стабилизации цитохрома присутствовал дезоксикортикостерон в концентрации 10⁻⁵ М. После солиubilизации раствор осветляли центрифугированием 60 мин при 105 000g. К полученному супернатанту добавляли твердый сульфат аммония из расчета 180 г на 1 л раствора. Образующийся осадок, содержащий 11 β -гидроксилирующий цитохром P-450, отделяли центрифугированием 30 мин при 30 000g и далее его растворяли в исходном буфере, содержащем 0,4% холата натрия и 0,2% твин 80. Раствор после перемешивания на холоду в течение 60 мин вновь осветляли центрифугированием и с супернатантом еще дважды повторяли процедуру вышеописанного фракциониро-

Кривая связывания 11 β -гидроксилирующего цитохрома Р-450 (45 нмоль) с аденодоксин-сефарозой (1,65 мкмоль иммобилизованного аденодоксина). Связанный цитохром Р-450 выражен в процентах от внесенного в среду инкубации



вания с помощью сульфата аммония. Детергент твин 80 ввели в среду выделения для лучшей растворимости осадков. Осадок после третьего фракционирования (осадок А) растворяли в исходном буфере, содержащем 0,3% холата натрия, для удаления нерастворимой части раствор центрифугировали 20 мин при 48 000g и диализовали в течение 12 ч против 20 объемов исходного буфера. Раствор после диализа разводили в три раза исходным буфером и наносили на колонку с аденодоксин-сефарозой, приготовленной согласно [5]. 11 β -Гидроксилирующий цитохром Р-450 после промывки колонки исходным буфером элюировали тем же буфером, содержащим 0,3% холата натрия, 1 М NaCl и 20% глицерина. Полученный белок имел спектрофотометрический индекс D_{391}/D_{280} , равный 0,80, и был гомогенен, по данным гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. Нами была отмечена значительная часть не сорбировавшегося на колонке с аденодоксин-сефарозой цитохрома Р-450. Для повышения выхода белка мы обратились к биоспецифической хроматографии в объеме аденодоксин-сефарозы — batch-процедуре. К 30 мл уплотненного геля аденодоксин-сефарозы (330 нмоль иммобилизованного аденодоксина/мл сефарозы) добавлен разведенный исходным буфером (после диализа) раствор осадка А. После инкубации (4 ч) при комнатной температуре гель перенесли в колонку и элюцию проводили как описано выше. На рисунке показана кинетика связывания цитохрома Р-450 с аденодоксин-сефарозой при 20°.

Молекулярный вес 11 β -гидроксилирующего цитохрома Р-450, установленный по методу [6], составил 45 000. Анализ препарата по методу [7] показал полное отсутствие цитохрома Р-420. Основные стадии выделения 11 β -гидроксилирующего цитохрома Р-450 приведены в таблице. Для проверки функциональной активности 11 β -гидроксилирующего цитохрома Р-450 реконструирована *in vitro* 11 β -дезоксикортикостеронгидроксилирующая система. Для этого к 2 нмоль цитохрома в 0,2 мл элюирующего буфера добавлены 2 нмоль аденодоксинредуктазы, 40 нмоль аденодоксина, 100 нмоль дезоксикортикостерона, смешанного с ^3H -дезоксикортикостероном, а также компоненты NADPH-генерирующей системы — NADP $^+$ (200 нмоль), глюкозо-6-фосфат (2 мкмоль) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (35 ед). Общий объем раствора доводили исходным буфером до 2 мл и инкубировали в течение 30 мин. Анализ на радиоактивность отдельных пятен, выявленных на пластинке с силикагелем после хроматографии продуктов реакции в системе хлороформ — этанол (94:6), показал, что за 30 мин в описанных выше условиях инкубации количество образовавшегося кортикостерона составило 40 нмоль/нмоль добавленного цитохрома (80% трансформации исходного субстрата). Для выяснения субстратной специфичности 11 β -дезоксикортикостеронгидроксилирующего цитохрома Р-450 по отношению к дезоксикортизолу в среду инкубации при тех же условиях введен дезоксикортизол. Анализ продуктов реакции после их хроматогра-

Основные стадии очистки 11 β -гидроксилирующего цитохрома P-450

Этапы выделения 11 β -гидроксилирующего цитохрома P-450	Объем, мл	Белок, мг	Цитохром P-450, нмоль	Удельное содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	D_{394}/D_{280}
Субмитохондриальные частицы	1550	9565	—	—	—
I. Солюбилизация цитохрома холатом натрия	1400	4400	3730	0,848	—
II. Фракционирование сульфатом аммония	520	1508	1500	0,995	—
III. То же	240	1029	906	0,880	—
IV. »	180	860	720	0,837	—
V. Биоспецифическая хроматография на адренодоксин-сефарозе	18	16	180 (370) *	11,25	0,80

* В скобках указано количество цитохрома P-450, полученное в параллельном опыте с использованием хроматографии в объеме адренодоксин-сефарозы.

фии в системе хлороформ — этанол (85:15) показал трансформацию дезоксикортизола в кортизол с выходом 85%.

Таким образом, 11 β -гидроксилирующий цитохром P-450, так же как и описанный нами ранее 20S,22R-холестерингидроксилирующий цитохром P-450, образует комплекс с адренодоксином; полученные данные позволили предложить новый метод выделения 11 β -гидроксилирующего цитохрома P-450, в гомогенном виде полностью свободного от цитохрома P-420; результаты по реконструкции *in vitro* 11 β -гидроксилирующей системы свидетельствуют о том, что в гидроксилировании дезоксикортикостерона и дезоксикортизола принимает участие один и тот же 11 β -гидроксилирующий цитохром P-450.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takemori S., Sato H., Gomi T., Suhara K., Katagiri M. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 63, 588-593.
2. Ingelman-Sundberg M., Montelius J., Rydstrom J., Gustafsson J.-A. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 5042-5047.
3. Watanuki M., Tilley B. E., Hall P. F. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 247, 236-247.
4. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 278-280.
5. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) *Биоорг. химия*, 3, 780-786.
6. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.
7. Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378.

Поступило в редакцию
21.XI.1978

BIOSPECIFIC CHROMATOGRAPHY OF 11 β -HYDROXYLATING CYTOCHROME P-450 FROM ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA AND RECONSTITUTION OF DEOXYCORTICOSTERONE AND DEOXYCORTISOL HYDROXYLATING SYSTEM

AKHREM A. A., MARTSEV S. P., CHASHCHIN V. L.

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

A new method for isolating 11 β -hydroxylating cytochrome P-450 by biospecific chromatography on adrenodoxin-Sepharose is described. The method allows to obtain electrophoretically homogeneous cytochrome P-450 with a spectrophotometric index D_{394}/D_{280} equal to 0.80. Using 11 β -hydroxylating cytochrome P-450 thus obtained, a system is reconstituted which transforms *in vitro* deoxycorticosterone and deoxycortisol to corticosterone and cortisol, respectively.