



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.1+547.963

САМОСБОРКА 11 β -СТЕРОИДГИДРОКСИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ*Ахрем А. А., Марцев С. П., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

При биосинтезе кортикостероидных гормонов в клетках коры надпочечников мембраносвязанные митохондриальные гидроксилирующие системы осуществляют: а) последовательную трансформацию холестерина в прегненолон [1]; б) конечные стадии биосинтеза кортикостерона и кортизола [2]; в) биосинтез важнейшего представителя минералокортикоидов альдостерона [3]. Имеются данные о том, что в состав указанных систем входят аденодоксинредуктаза и аденодоксин, в то же время за субстратную специфичность отвечает третий компонент — цитохром P-450.

Недавно нами была показана самосборка функционально-активной 20S, 22R-холестерингидроксилирующей системы на колонке с аденодоксин-сефарозой и сделано предположение, что самосборка характерна для всех митохондриальных стероидгидроксилирующих систем [4].

В продолжение этой работы нами исследована возможность самосборки 11 β -дезоксикортикостеронгидроксилирующей системы. В настоящей работе применяли 11 β -гидроксилирующий цитохром P-450 (спектрофотометрический индекс $D_{393}/D_{280}=0,80$, удельное содержание 11,25 нмоль цитохрома P-450 на 1 мг белка). 11 β -Гидроксилирующий цитохром P-450 был получен по методу, аналогичному описанному ранее для выделения 20S, 22R-холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 [5]. Различие состояло в том, что для хроматографии на аденодоксин-сефарозе использовалась фракция, получаемая при 30% насыщении солибилизата субмитохондриальных частиц сульфатом аммония. Белок гомогенен по данным N-концевого анализа, а также гель-электрофореза, проводимого в присутствии додецилсульфата натрия.

Реконструкцию системы осуществляли на колонке с аденодоксин-сефарозой в условиях, сходных с описанными ранее [4]. На колонку с аденодоксин-сефарозой (1,4 мкмоль иммобилизованного аденодоксина) наносили свободный от холата натрия цитохром P-450 (60 нмоль) в 0,05 M натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 (исходный буфер), затем в том же буфере пропускали аденодоксинредуктазу (25 нмоль). По окончании сорбции обоих компонентов и непродолжительной промывки колонки исходным буфером пропускали 11-дезоксикортикостерон (900 нмоль) или 11-дезоксикортизол (900 нмоль) в присутствии NADP⁺ (1,5 мкмоль) и компонентов NADPH-генерирующей системы: глюкозо-6-фосфата (15 мкмоль) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (20 ед. акт.). Количества NADP⁺ и NADPH-генерирующей системы были достаточными, чтобы скорость реакции в каждом случае не лимитировалась концентрацией NADPH.

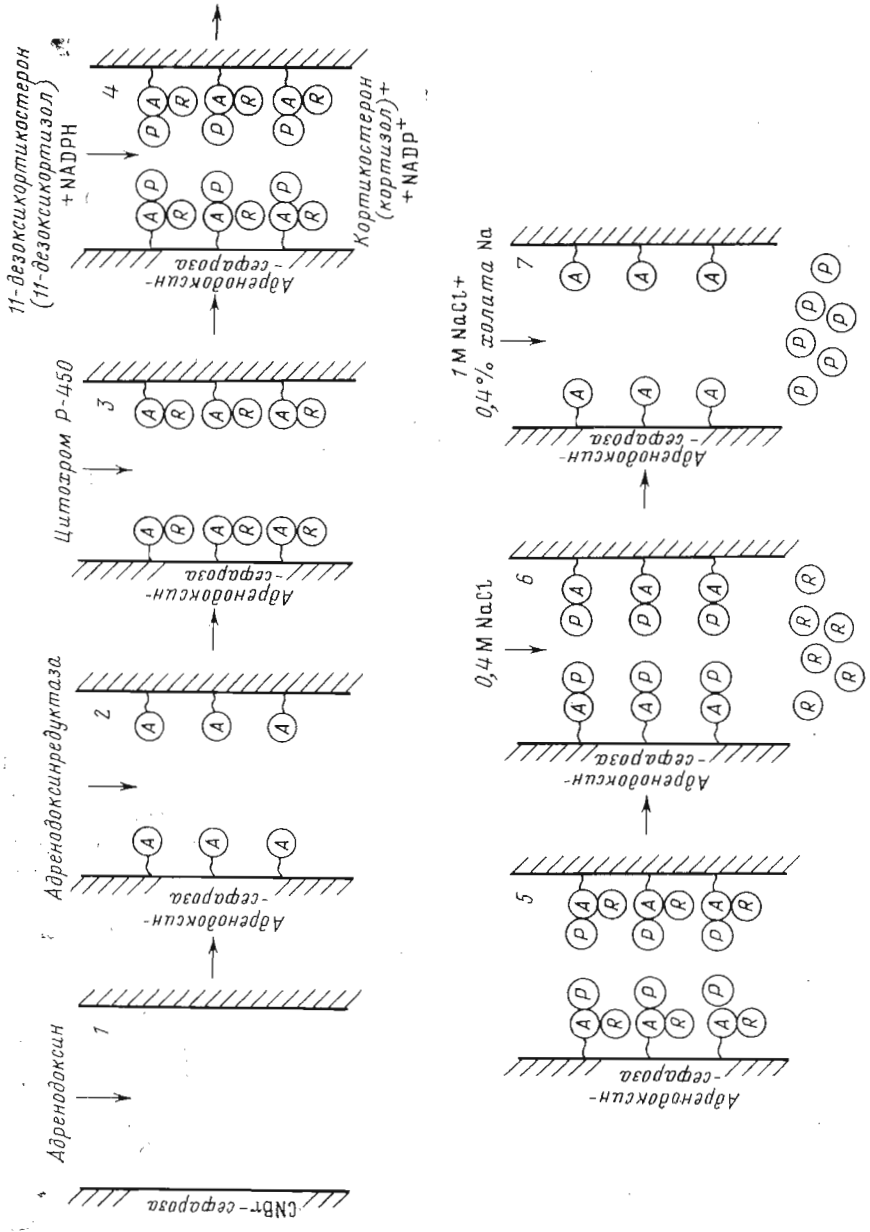


Схема самосборки 11β-гидроксилирующей системы из митохондрией коры надпочечников: 1 – иммобилизация адренодоксина на СNBr-сферозе, 2–4 – самосборка 11β-гидроксилирующей системы, 4 – проведение трансформации 11-дезоксикортикостерона и/или 11-дезоксикортизола, 5–7 – дифференциальная десорбция отдельных белков 11β-гидроксилирующей системы. А – адренодоксин, R – адренодоксинредуктаза, P – 11β-гидроксилирующий цитохром P-450

Для идентификации продуктов реакции элюат экстрагировали этилацетатом. Экстракт хроматографировали в тонком слое силикагеля в системах: хлороформ — этанол (94 : 6) в случае 11-дезоксикортикостерона и хлороформ — этанол (85 : 15) для 11-дезоксикортизола. Количественное определение продуктов реакции проводили с помощью 11-деокси[1,2-³H₂]кортикостерона и 11-деокси[1,2-³H₂]кортизола. В этих условиях наблюдаемая трансформация стероидов составила 40—50% в отличие от 85% при реконструкции 11 β -гидроксилирующей системы в растворе (установлено в специальных опытах). После гидроксилирования 11-дезоксикортикостерона на хроматограмме наблюдалось слабое дополнительное пятно, расположенное между пятнами 11-дезоксикортикостерона и кортикостерона. В подобных условиях возможно образование 18-окси-11-дезоксикортикостерона или 18-оксикортикостерона. Однако из-за незначительных количеств образующегося продукта реакции мы не смогли его идентифицировать. Учитывая разные условия десорбции адренодоксинредуктазы и цитохрома P-450 с адренодоксин-сефарозы (0,4 и 1 М NaCl в присутствии 0,3% холата натрия соответственно), эти белки удалось дифференциально элюировать с колонки. Они не отличались по активности от исходных белков и после непродолжительного диализа (или 10-кратного разбавления в исходном буфере) вновь могли быть использованы для самосборки функционально-активной 11 β -гидроксилирующей системы на колонке с адренодоксин-сефарозой. На рисунке схематично представлен процесс самосборки 11 β -гидроксилирующей системы, биосинтез кортикостерона и кортизола и последующая дифференциальная десорбция отдельных компонентов указанной системы.

Таким образом, предыдущее сообщение [4] по самосборке 20S, 22R-холестерингидроксилирующей системы и настоящее исследование по самосборке 11 β -гидроксилирующей системы демонстрируют общность описанного нами явления самосборки для митохондриальных стероидгидроксилирующих систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jefcoate C. R., Hume R., Boyd G. S. (1970) FEBS Lett., **9**, 41—44.
2. Takemori S., Sato H., Gomi T., Suhara K., Katagiri M. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **67**, 1151—1157.
3. Greengard P., Psychoyos S., Tallan H. H., Cooper D. Y., Rosental O., Estabrook R. W. (1967) Arch. Biochem. and Biophys., **121**, 298—303.
4. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащип В. Л. (1978) Биооргани. химия, **4**, 688—693.
5. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащип В. Л. (1978) Биооргани. химия, **4**, 278—280.

Поступило в редакцию
9.X.1978

SELF-ASSOCIATION OF 11 β -STEROID HYDROXYLATING SYSTEM FROM ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA

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

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

The process of self-association of individual proteins of the 11 β -hydroxylating system into a unique enzyme ensemble was examined. As with 20S, 22R-cholesterol hydroxylating system from adrenal cortex mitochondria, a capability of forming the complex was established for individual components of the 11 β -hydroxylating system. It was shown that 11 β -hydroxylating system reconstituted on a column with adrenodoxin-Sepharose transformed 11-deoxycorticosterone and 11-deoxycortisol in 40—50% yield into corticosterone and cortisol, respectively. On the basis of the results obtained, the authors came to the conclusion that their earlier observation on self-association pertains to all mitochondrial membrane-bound steroid hydroxylating systems.