



УДК 577.1+547.963

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ
СТЕРОИДГИДРОКСИЛИРУЮЩИХ СИСТЕМ
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

II. САМОСБОРКА 20S,22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ
В РАСТВОРЕ И СТЕХИОМЕТРИЯ ЕЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ —
АДРЕНОДОКСИНСРЕДУКТАЗЫ, АДРЕНОДОКСИНА И ЦИТОХРОМА P-450 *

*Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкуматов В. М.,
Чащин В. Л.*

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Исследован процесс самосборки 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы в растворе. Получены константы взаимодействия отдельных белков системы. Изучено влияние температуры на отдельные белки системы, на комплексы адrenoоксинредуктазы с адrenoоксином и адrenoоксином с цитохромом P-450, а также на всю систему в целом. Исследована четвертичная структура цитохрома P-450. Установлено, что цитохром P-450 в виде мономера, в виде комплексов с *M* 115 000 и октамера (*M* 400 000) комплексуется с адrenoоксином и во всех этих формах проявляет функциональную активность. В работе приведены результаты гель-фильтрации смеси адrenoоксинредуктазы, адrenoоксином и цитохрома P-450, полученные при хроматографии смеси в присутствии детергента, в буфере, не содержащем детергент, и в буфере, содержащем адrenoоксин.

Митохондриальные стероидгидроксилирующие системы представляют собой короткие электронтранспортные цепи, состоящие из трех белков — адrenoоксинредуктазы, адrenoоксином и цитохрома P-450. Одна из таких мембраносвязанных систем осуществляет превращение холестерина в pregnenolon [2]. Выделение отдельных компонентов этой системы было описано ранее [3, 4].

Недавно нами была описана самосборка отдельных компонентов 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы на колонке с адrenoоксинсефарозой [1].

Оставался невыясненным важный вопрос: существует ли самосборка 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы в растворе и какова стехиометрия входящих в состав системы адrenoоксинредуктазы, адrenoоксином и цитохрома P-450?

Первый этап настоящей работы заключался в изучении взаимодействий между адrenoоксинредуктазой, адrenoоксином и цитохромом P-450 в растворе.

I. Реконструкция 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы в растворе и изучение взаимодействий между адrenoоксинредуктазой, адrenoоксином и цитохромом P-450. Вначале нами было изучено влияние

* Сообщение I см. [1].

адренодоксина в различных концентрациях на активность реконструированной в растворе 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы.

В опыт был взят цитохром P-450, находящийся в комплексе с холестерином. Этот комплекс имеет спектр поглощения, типичный для высокоспиновой формы белка и отличный от спектра цитохрома P-450, свободного от субстрата (низкоспиновая форма) [5]. Спектральные изменения, наблюдаемые при переходе высокоспиновой формы белка в низкоспиновую, нами были использованы для оценки активности реконструированной 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы в зависимости от концентрации адренодоксина.

В этом опыте адренодоксинредуктаза и цитохром P-450 были взяты в эквимольных количествах (по 4 нмоль каждого). Количество адренодоксина варьировалось в широком диапазоне (от 1 до 300 нмоль), т. е. конечная концентрация адренодоксина в мольном выражении превышала в 75 раз концентрацию адренодоксинредуктазы и цитохрома P-450. Реакция проводилась в присутствии NADPH-генерирующей системы (глюкозо-6-фосфат, NADP и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа). Полученные данные представлены на рис. 1. Видно, что в пределах 1–20 мкМ адренодоксин оказывает стимулирующее действие на реакцию гидроксилирования холестерина (рис. 1а). Однако активность системы заметно снижается при больших избытках адренодоксина (рис. 1б).

Ранее [1] нами была описана самосборка 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы и независимое комплексообразование адренодоксинредуктазы с адренодоксином и цитохрома P-450 с адренодоксином. С учетом этого можно сделать вывод, что адренодоксин в количествах от 1 до 20 нмоль способствует образованию тройных комплексов типа адренодоксинредуктаза · адренодоксин · цитохром P-450. Снижение активности системы при значительных избытках адренодоксина мы объясняем тем, что свободный адренодоксин, конкурируя за участки контакта с адренодоксинредуктазой и цитохромом P-450, разрушает тройные комплексы на функционально неактивные двойные комплексы типа адренодоксинредуктаза · адренодоксин и адренодоксин · цитохром P-450.

Адренодоксинредуктаза в отсутствие адренодоксина не способна восстанавливать цитохром P-450. Поэтому вполне возможным представляется определение констант взаимодействия адренодоксина с адренодоксинредуктазой и цитохромом P-450 путем кинетического анализа скоростей ферментативной реакции в зависимости от концентрации отдельных компонентов системы. Полученные гиперболические зависимости активности системы от концентраций отдельных белков были спрямлены в координатах Лайнуивера — Берка и из них определены соответствующие константы. Так, константа взаимодействия адренодоксинредуктазы с комплексом адренодоксин · цитохром P-450 составила 13 нМ, а константа взаимодействия комплекса адренодоксинредуктаза · адренодоксин с цитохромом P-450 оказалась равной 1,5 мкМ (см. рис. 2).

При изучении 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы, реконструированной на колошке с иммобилизованным адренодоксином, мы обратили внимание на увеличение стабильности белков при их самосборке в мультиферментный комплекс. В связи с этим нами было изучено влияние комплексообразования отдельных белков системы в растворе на их стабильность против тепловой инактивации.

В первой серии опытов исследовали влияние температуры на стабильность отдельных белков. В опытах второй серии изучали влияние температуры на адренодоксинредуктазу и цитохром P-450 в присутствии адренодоксина, а также влияние температуры на всю систему в целом. И наконец, в третьей серии опытов при фиксированной температуре исследовали процесс инактивации адренодоксинредуктазы и цитохрома P-450 как без адренодоксина, так и в его присутствии, а также всей системы в зависимости от времени. Полученные результаты представлены на рис. 3.

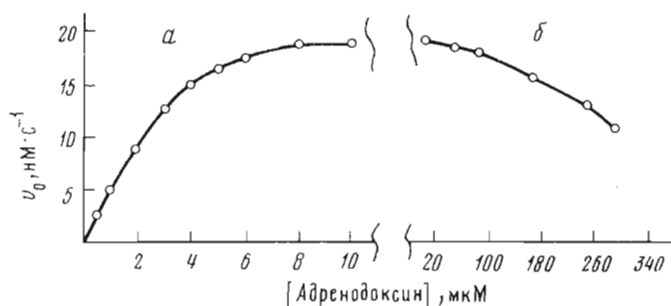


Рис. 1. Влияние концентрации адренодоксина (Ад) на активность 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы при эквимольном соотношении цитохрома Р-450 и адренодоксинредуктазы

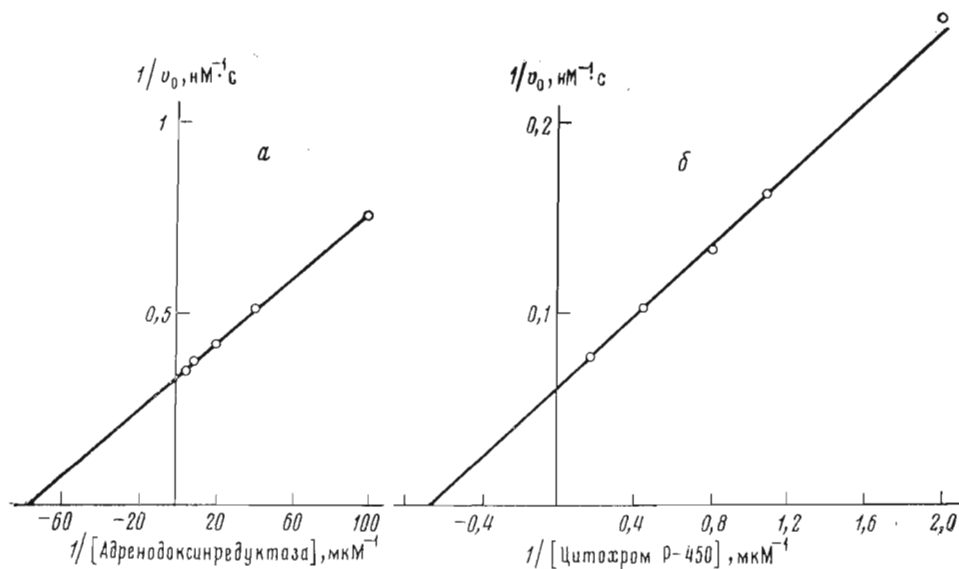
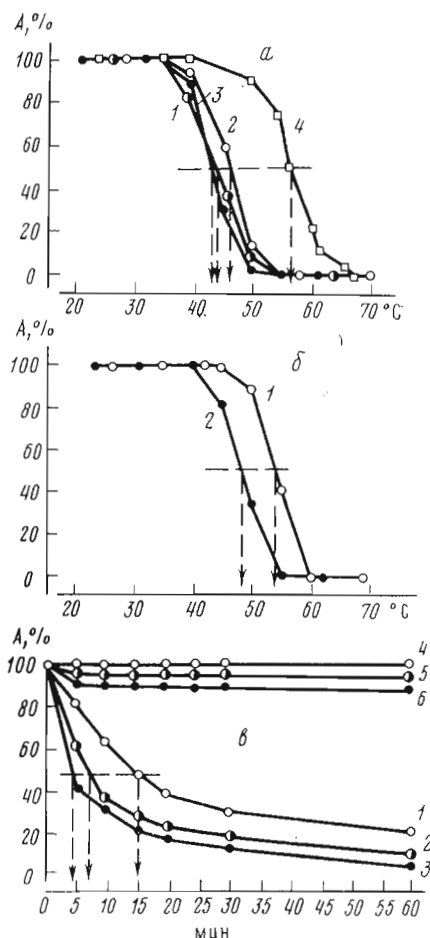


Рис. 2. Определение констант диссоциации адренодоксинредуктазы с комплексом адренодоксин-цитохром Р-450 (а) и цитохрома Р-450 с комплексом адренодоксинредуктазы-адренодоксин (б)

Для сравнительного описания стабильности белков мы использовали температуру, при которой через 10 мин инкубации наблюдаемая инактивация составляла 50% (T_{50}). Из представленных данных видно, что наименее стабильным компонентом системы является адренодоксинредуктаза (T_{50} 43° С). Несмотря на то что адренодоксин увеличивает стабильность адренодоксинредуктазы, влияние адренодоксина в той же концентрации на стабильность цитохрома Р-450 оказывается более существенным (T_{50} для цитохрома Р-450 и адренодоксинредуктазы в присутствии адренодоксина составляет 54 и 48° С соответственно). Поэтому кривая уменьшения ферментативной активности системы в зависимости от температуры в целом совпадает с кривой инактивации адренодоксинредуктазы.

Наиболее выраженная стабилизация отдельных белков системы при их комплексообразовании наблюдалась при фиксированной температуре в зависимости от времени (см. рис. 3в). В этом случае как для отдельных белков системы — адренодоксинредуктазы и цитохрома Р-450 в присутствии адренодоксина, так и для системы в целом практически не наблюдалось инактивации в условиях опыта, в то время как отдельные белки инактивировались в короткий промежуток времени.

Рис. 3. Влияние комплексообразования на температурную инактивацию компонентов 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы: а — инактивация цитохрома Р-450 в свободном от субстрата виде (1) и в комплексе с холестерином (2), аденодоксинредуктазы (3) и аденодоксина (4); б — инактивация цитохрома Р-450 (1) и аденодоксинредуктазы (2) в присутствии 15-кратного мольного избытка аденодоксина; в — инактивация при 45°С цитохрома Р-450 в свободном от субстрата виде (1) и в комплексе с холестерином (2), аденодоксинредуктазы (3) и повышение стабильности этих компонентов в присутствии 15-кратного мольного избытка аденодоксина (4, 5, 6 соответственно)



Следует отметить, что аденодоксин оказывает стабилизирующее влияние как на высокоспиновую, так и на низкоспиновую формы цитохрома Р-450, что свидетельствует о способности аденодоксина образовывать комплекс с обеими указанными формами.

Для детального понимания молекулярной организации 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы необходимо знать стехиометрию белков, входящих в ее состав, и важным этапом в этом направлении является выяснение субъединичного строения (четвертичной структуры) аденодоксинредуктазы, аденодоксина и цитохрома Р-450.

II. Гель-хроматография отдельных белков 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы и их смесей. Молекулярные веса для аденодоксинредуктазы, аденодоксина и цитохрома Р-450 по данным гель-электрофореза в додецилсульфате натрия составляют 50 000, 13 000 и 46 000 соответственно (рис. 4), тогда как по данным гель-хроматографии в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 (исходный буфер), — 53 000, 26 000 и 400 000 соответственно (рис. 4б). Реконструкция в растворе 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы осуществляется в исходном буфере. Следовательно, в этих условиях аденодоксинредуктаза существует в мономерном виде, аденодоксин — в виде димера, а цитохром Р-450 — в виде октамера.

В недавнем сообщении [6] нами были приведены условия дезагрегации цитохрома Р-450, не оказывающие на него инактивирующего воздействия. Так, было найдено, что присутствие в исходном буфере 1 М NaCl + 0,3% холата натрия приводит к дезагрегации цитохрома Р-450 до мономера. Изучение дезагрегирующего воздействия на цитохром Р-450 одного холата натрия показало, что он также проявляет значительный дезагре-

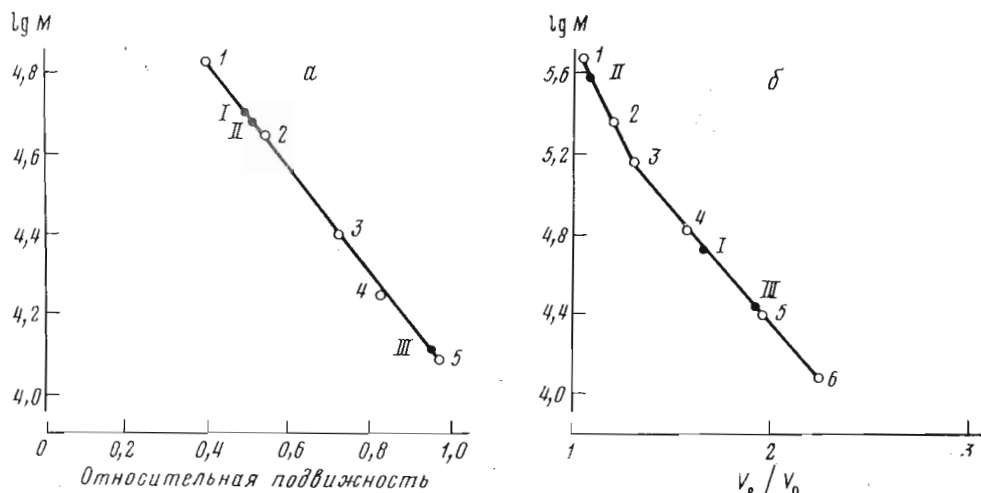


Рис. 4. Определение молекулярного веса компонентов 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы: а — методом гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия; белки-стандарты: 1 — бычий сывороточный альбумин (M 67 000), 2 — яичный альбумин (M 45 000), 3 — химотрипсиноген (M 25 000), 4 — миоглобин (M 17 800), 5 — цитохром с (M 12 400); б — методом гель-хроматографии, белки-стандарты: I — ферритин (M 480 000), 2 — каталаза (M 240 000), 3 — альдолаза (M 147 000), 4 — альбумин (M 67 000), 5 — химотрипсиноген (M 25 000), 6 — цитохром с (M 12 400). I, II, III — адrenoоксидоредуктаза, цитохром Р-450 и адrenoоксин соответственно

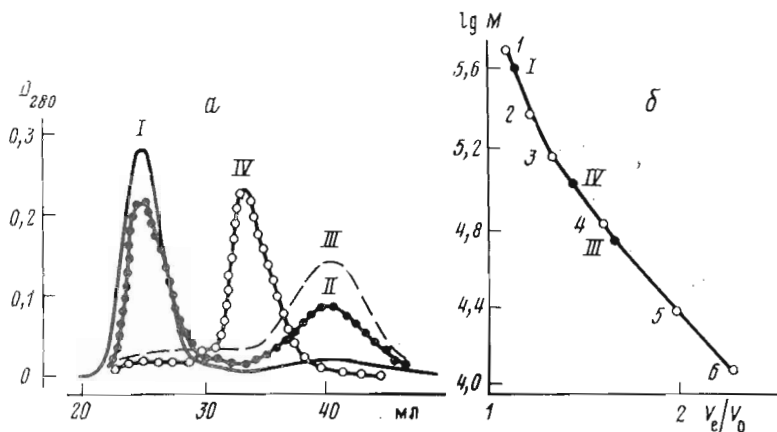


Рис. 5. а — гель-хроматография цитохрома Р-450 на колонке с сефадексом G-200 в 0,05 M натрий-фосфатном буфере, pH 7,2 (I) с добавлением 0,3% холата натрия (II), 1 M NaCl+0,3% холата натрия (III) и 0,3% твина 80 (IV); б — определение молекулярного веса по кривым I–IV в сравнении со стандартными белками: I — ферритин, 2 — каталаза, 3 — альдолаза, 4 — альбумин, 5 — химотрипсиноген, 6 — цитохром с

гирующий эффект. При гель-хроматографии цитохрома Р-450 в исходном буфере, содержащем 0,3% холата натрия, были получены две фракции с молекулярным весом 58 000 и 400 000 в количестве 60 и 40% соответственно от взятого в опыт белка (рис. 5).

Иное дезагрегирующее воздействие на цитохром Р-450 оказывает твин 80. Так, молекулярный вес цитохрома Р-450, определенный гель-хроматографией в буфере, содержащем 0,3% твина 80, оказался равным 115 000 (рис. 5). В принципе такой молекулярный вес соответствует молекулярному весу димера цитохрома Р-450. С целью доказательства того, что элюируемые с колонки с сефадексом комплексы с M 115 000 являются димерами цитохрома Р-450, в буфер, содержащий 0,3% твина 80, были добавлены 1 M

NaCl+0,3% холата натрия. В этом случае можно было ожидать дальнейшей дезагрегации предполагаемых димеров до мономера цитохрома Р-450. Однако в указанных условиях цитохром Р-450 элюировался в виде комплексов с M 115 000. Такое поведение цитохрома Р-450 можно было объяснить либо отсутствием дезагрегирующего воздействия 1 М NaCl+0,3% холата натрия при наличии твина 80, либо тем, что комплекс с M 115 000 не отвечает димеру цитохрома Р-450, а является комплексом мономера цитохрома Р-450 с мицеллами твина 80. Нами было установлено, что удаление 1 М NaCl+0,3% холата натрия приводит к обратимому образованию октамера.

Следует отметить, что как холат натрия, так и твин 80 наряду с дезагрегацией не приводят к инактивации цитохрома Р-450, что легко контролируется по переходу цитохрома Р-450 в цитохром Р-420. После удаления детергентов цитохром Р-450 полностью сохранял свою активность по трансформации холестерина в прегненолон.

Оставался невыясненным чрезвычайно важный вопрос: какое соотношение белков имеется в тройных комплексах? В работах [7—9] указывалось, что аденодоксинредуктаза и аденодоксин образуют между собой комплекс в соотношении 1:1. В исходном буфере цитохром Р-450 находится в виде октамера, поэтому можно было бы предположить, что при реконструкции 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы в растворе образуются функционально-активные тройные комплексы со стехиометрией между аденодоксинредуктазой, аденодоксином и цитохромом Р-450, равной 1:1:8. Однако такая стехиометрия вызывает серьезные возражения. Во-первых, в состав октамера в этом случае должна входить субъединица, отвечающая за его взаимодействие с аденодоксином, и тогда вполне допустимой становится химическая неоднородность молекул цитохрома Р-450. Это не согласуется с данными, полученными нами ранее [10]. И во-вторых, такая молекулярная организация 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы трудно объяснима с точки зрения переноса электронов от молекулы аденодоксина к активным центрам мономеров цитохрома Р-450, входящих в состав октамера.

Поскольку найденные нами условия дезагрегации цитохрома Р-450 до мономера и до комплексов с M 115 000 не приводят к инактивации цитохрома Р-450, мы предположили, что образование октамера носит неспецифический характер и вызвано гидрофобной природой белка. В то же время отдельные молекулы цитохрома Р-450, входящие в состав октамера, обладают способностью образовывать комплекс с аденодоксином и могут функционировать самостоятельно. В таком случае стехиометрия белков в функционально-активном тройном комплексе должна быть равной (1:1):8 при условии, что в образование октамера не вовлечены участки полипептидной цепи цитохрома Р-450, отвечающие за его комплексообразование с аденодоксином. Молекулярный вес такого комплекса, вычисленный в соответствии с молекулярными весами отдельных белков, должен составлять примерно $1 \cdot 10^6$. Была сделана попытка показать наличие тройного комплекса между аденодоксинредуктазой, аденодоксином и цитохромом Р-450 с помощью гель-хроматографии и количественно оценить состав входящих в него белков. Однако гель-хроматография эквимольной смеси аденодоксинредуктазы, аденодоксина и цитохрома Р-450 в исходном буфере на сефадексе G-200 не выявила тройных комплексов, и белки элюировались согласно их молекулярным весам.

Так как аденодоксин вступает в комплексообразование и с аденодоксинредуктазой и с цитохромом Р-450, для стабилизации тройных комплексов была проведена гель-хроматография эквимольной смеси белков в исходном буфере, содержащем аденодоксин в концентрации 17 мкМ. Полученная хроматограмма представлена на рис. 6. Анализ выделенных фракций показал, что фракция I содержит цитохром Р-450, а фракция II — аденодоксинредуктазу. Наличие перегибов после первого и второго пиков

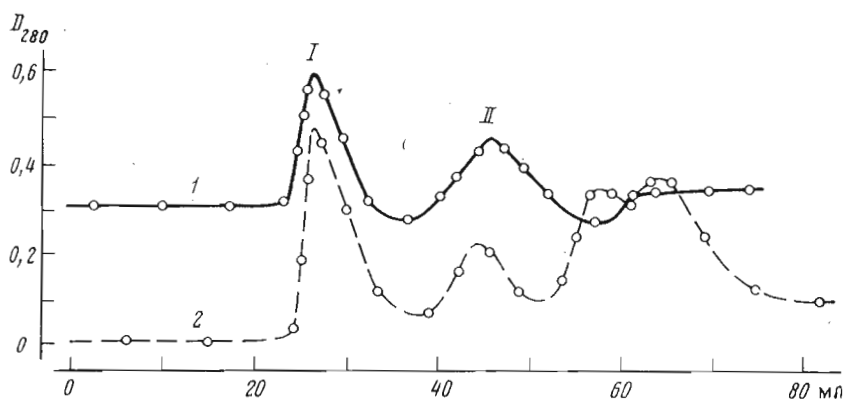


Рис. 6. Гель-хроматография эквимольной смеси цитохрома Р-450 и адrenoдоксинредуктазы в присутствии адrenoдоксина (I) и смеси белков-стандартов (фerrитин, альбумин, химотрипсиноген, цитохром с) (2); I — цитохром Р-450, II — адrenoдоксинредуктаза

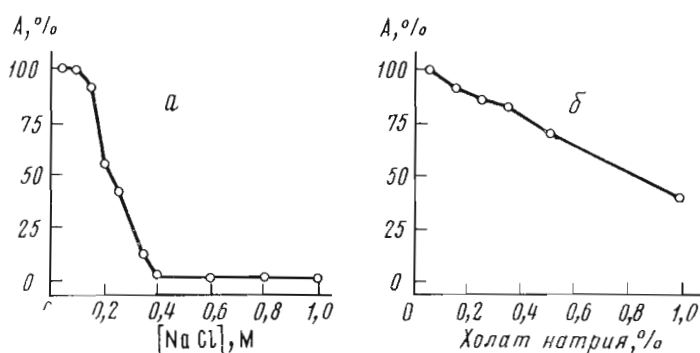


Рис. 7. Влияние концентрации NaCl (а) и холата натрия (б) на активность 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы

свидетельствует о комплексообразовании цитохрома Р-450 и адrenoдоксинредуктазы с адrenoдоксином. Мы полагаем, что в условиях хроматографии из-за высоких количеств адrenoдоксина происходит диссоциация тройных комплексов на отдельные двойные комплексы.

Следует отметить, что адrenoдоксинредуктаза, связанная с адrenoдоксином, элюировалась в мономерном виде, в то время как цитохром Р-450, несмотря на его комплексообразование с адrenoдоксином, элюировался в агрегированной форме. Следовательно, адrenoдоксин способен образовывать комплекс с октамером цитохрома Р-450.

Корректную оценку уменьшения количества адrenoдоксина после пика, отвечающего цитохрому Р-450, мы не смогли выполнить из-за того, что при гель-хроматографии одного цитохрома Р-450 после выхода основных количеств белка поглощение при 280 нм не возвращается полностью к исходному уровню. Это могло явиться причиной значительной ошибки в оценке по спектрам поглощения количества связанного с цитохромом Р-450 адrenoдоксина.

Поскольку вышеописанные подходы не позволили получить тройных комплексов и сделать однозначного заключения относительно стехиометрии адrenoдоксина и цитохрома Р-450 при их комплексообразовании, мы обратились к анализу взаимодействия цитохрома Р-450 с иммобилизованным адrenoдоксином.

III. *Выяснение стехиометрии комплекса цитохрома Р-450 с иммобилизованным адrenoдоксином.* Ранее мы отмечали [4], что холат натрия в

отсутствие других солей вызывает только частичную десорбцию цитохрома Р-450 с иммобилизованного аденодоксина. Исходный буфер, содержащий только 1 М NaCl, также не вызывает полной десорбции цитохрома. Полную элюцию связанного с аденодоксин-сефарозой цитохрома Р-450 достигали исходным буфером, содержащим 0,3% холат натрия и 1 М NaCl.

При исследовании влияния твина 80 на комплекс цитохрома Р-450 с аденодоксином нами было обнаружено, что, как и холат натрия, 0,3% твин 80 в исходном буфере вызывает лишь частичную элюцию цитохрома Р-450, сорбированного на иммобилизованном аденодоксине.

В связи с этим мы предположили, что оба детергента вызывают дезагрегацию сорбированного на аденодоксин-сефарозе цитохрома Р-450, не нарушая при этом комплекса аденодоксина с цитохромом Р-450.

С учетом описанного выше дезагрегирующего воздействия на цитохром Р-450 холата натрия и твина 80 мы сделали предположение, что сорбированный цитохром Р-450 дезагрегируется до комплексов с M 115 000 в случае 0,3% твина 80 и мономера — 0,3% холата натрия.

С целью доказательства этого была проведена оценка количества цитохрома Р-450, элюированного с колонки с аденодоксин-сефарозой твином 80 и холатом натрия, и количеств, оставшихся связанными с иммобилизованным аденодоксином. Для получения комплексов аденодоксина с димером цитохрома Р-450 через колонку с аденодоксин-сефарозой (200 нмоль иммобилизованного аденодоксина на 1 мл геля) в исходном буфере пропускали цитохром Р-450 до полного ее насыщения. Количественная оценка показала, что в условиях насыщения цитохром Р-450 сорбируется в эквимольном соотношении с иммобилизованным аденодоксином. После отмывки несорбированного белка через колонку в исходном буфере был пропущен 0,3% твин 80. Для полной элюции оставшегося на колонке белка через нее пропускали 1 М NaCl+0,3% холата натрия. Расчет показал, что из 100 нмоль первоначально сорбированного цитохрома Р-450 75 нмоль элюировались 0,3% твином 80, а 25 нмоль — 1 М NaCl+0,3% холата натрия.

Аналогичный опыт в присутствии холата натрия показал, что из 100 нмоль первоначально сорбированного белка 90 нмоль элюировались 0,3% холатом натрия и 10 нмоль — 1 М NaCl+0,3% холата натрия. Сорбированный на колонке цитохром элюировали и последовательным пропусканием через колонку 0,3% твина 80, 0,3% холата натрия и 1 М NaCl+0,3% холата натрия. В этом опыте после элюирования твином 80 3% сорбированного цитохрома последующая промывка колонки 0,3% холатом натрия привела к дополнительной элюции $1/2$ части оставшегося на колонке белка.

Так как на колонку с иммобилизованным аденодоксином сорбируется, по-видимому, октамер цитохрома Р-450, полученные данные по количественной десорбции белка в твин 80 свидетельствуют о дезагрегации сорбированного белка до димера. Однако необходимо принять во внимание различную доступность молекул иммобилизованного аденодоксина для различной степени агрегированных молекул цитохрома Р-450, т. е. дезагрегированный под влиянием твина 80 цитохром Р-450 может вступать далее в комплексообразование с молекулами иммобилизованного аденодоксина, ранее пространственно не доступными для комплексообразования с октамером цитохрома Р-450.

Для проверки функциональной активности комплексов с M 115 000 и мономера на колонке со всеми этими формами мы, согласно [1], реконструировали на колонке 20S,22R-холестерингидроксилирующую систему с помощью аденодоксинредуктазы. Во всех вариантах наблюдалась трансформация холестерина в прегненолон.

Полученные результаты не согласуются с работой [11], авторы которой полагают, что цитохром Р-450 в нативном виде представляет собой мультимер с M 800 000, состоящий из 16 субъединиц; из них только

8 субъединиц содержат гемовую группу (протогем IX), и функциональную активность цитохром проявляет в виде мультимера с M 800 000 [12]. Диссоциация последнего приводит к инактивации цитохрома P-450. Следует отметить, что для целей дезагрегации авторами указанной работы [11] применялись мочевины и додецилсульфат натрия, которые способны переводить цитохром P-450 в цитохром P-420.

Оставался невыясненным принципиально важный вопрос, касающийся организации мономеров в октамере: у всех ли молекул октамера цитохрома P-450 доступны «площадки» связывания с адrenoоксином, или часть из них вовлечена в образование октамера? На первый взгляд совпадение условий полной дезагрегации октамера до мономера с условиями, ранее определенными для диссоциации комплекса цитохрома P-450 с иммобилизованным адrenoоксином [4], указывает на возможность вовлечения в образование октамера «площадок» связывания молекул цитохрома P-450 с адrenoоксином.

Достоверные данные, позволяющие ответить на поставленный вопрос, могли быть получены путем количественной оценки изменения активности реконструированной в растворе 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы в условиях дезагрегации цитохрома P-450.

Однако реконструкцию 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы нельзя было проводить в 1 M NaCl, содержащем 0,3% холата натрия, так как даже при раздельном повышении в инкубационной среде концентраций NaCl или холата натрия (рис. 7) активность системы уменьшается из-за диссоциации комплекса адренодоксина с адренодоксинредуктазой.

Для дезагрегации цитохрома P-450 в реконструированной в растворе системе была сделана попытка использовать твин 80. Во-первых, необходимо было оценить влияние твина 80 на активность системы, во-вторых, показать, что твин 80 не мешает комплексообразованию отдельных белков системы, и, наконец, провести хроматографию смеси отдельных белков в присутствии твина 80.

Вышеописанное исследование по действию твина 80 на комплекс цитохрома P-450 с иммобилизованным адренооксином показало, что комплекс этих белков не диссоциирует в 0,3% твине 80. Однако эти данные были получены после предварительной сорбции цитохрома P-450 на адренодоксин-сефарозе в исходном буфере и могут в принципе не отражать влияния детергента непосредственно на процесс комплексообразования. Поэтому было решено, используя различные концентрации твина 80, изучить его влияние на взаимодействие цитохрома P-450 с иммобилизованным адренооксином. Контроль за взаимодействием осуществляли по анализу сорбированного на адренодоксин-сефарозе цитохрома P-450, а также цитохрома P-450, оставшегося в несвязанном виде после инкубации с адренодоксин-сефарозой. Установлено, что при повышении концентрации твина 80 до 0,3% в условиях полного насыщения сорбента происходит сорбция примерно $1/4$ части количеств цитохрома P-450, сорбировавшихся на адренодоксин-сефарозе в исходном буфере. Этот результат находится в хорошем соответствии с данными, полученными по дезагрегации в 0,3% твине 80 цитохрома P-450 на колонке с адренодоксин-сефарозой.

В специальных опытах было показано, что твин 80 не препятствует образованию комплекса адренодоксинредуктазы с иммобилизованным адренооксином.

При изучении действия твина 80 на цитохром P-450 было установлено, что этот детергент вызывает спектральные изменения, характерные для перехода высокоспиральной формы цитохрома P-450 в низкоспиральную. Поэтому используемый нами критерий активности реконструированной системы в растворе оказался непригодным. Было решено оценивать активность системы по скорости восстановления цитохрома P-450 в зависимости от повышающейся концентрации твина 80. Однако выяснилось, что в присутствии твина 80 происходит уменьшение скорости этой реакции, т. е.

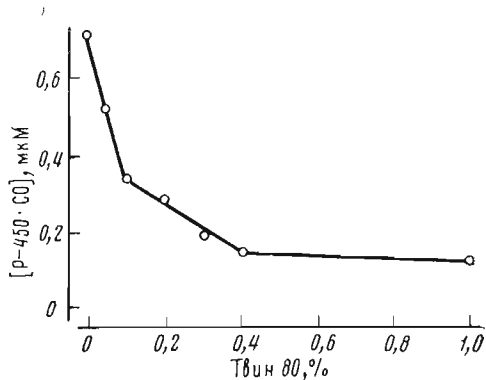


Рис. 8

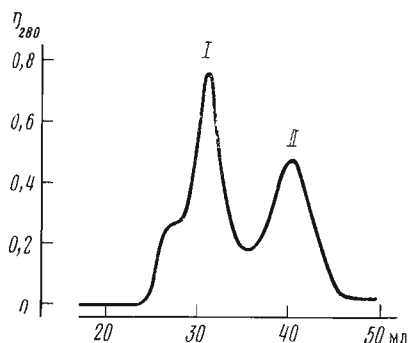


Рис. 9

Рис. 8. Влияние твина 80 на ферментативное восстановление цитохрома P-450

Рис. 9. Гель-хроматография эквимольной смеси цитохрома P-450, адrenoдоксина и адrenoдоксинредуктазы в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,3% твина 80. I — цитохром P-450 (M 115 000), II — комплекс адrenoдоксинредуктазы с адrenoдоксином

имеет место ингибирование транспорта электронов к протогему IX (активному центру цитохрома P-450) (рис. 8). Такое действие твина 80 сделало невозможной оценку влияния агрегации цитохрома P-450 на активность реконструированной в растворе 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы.

Твин 80, с одной стороны, вызывает дезагрегацию цитохрома P-450, а с другой — не разрушает комплекса цитохрома P-450 с адrenoдоксином и не препятствует его образованию. Поэтому была проведена гель-хроматография эквимольной смеси адrenoдоксинредуктазы, адrenoдоксина и цитохрома P-450. Мы надеялись при этом получить тройные комплексы и выяснить в них стехиометрию отдельных белков. Полученная хроматограмма представлена на рис. 9. Анализ отдельных фракций показал, что фракция I содержит цитохром P-450 в виде комплексов с M 115 000, а фракция II — комплекс адrenoдоксинредуктазы с адrenoдоксином. Аналогичный результат был получен при хроматографии смеси адrenoдоксинредуктазы, адrenoдоксина и цитохрома P-450 с соотношением белков 1 : 2 : 1.

Мы не можем объяснить, почему при гель-хроматографии не обнаруживаются тройные комплексы типа адrenoдоксинредуктаза · адrenoдоксин · цитохром P-450, поскольку ранее нами описанное взаимодействие цитохрома P-450 с адrenoдоксином [4] и самосборка на колонке с иммобилизованным адrenoдоксином 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы [1] свидетельствуют о прочном взаимодействии этих белков друг с другом.

Совокупность данных, полученных нами с использованием адrenoдоксин-сефарозы, позволяет высказать мнение, что впервые показанная нами самосборка системы из отдельных ее белков может свидетельствовать в пользу существования 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы во внутренней мембране митохондрий в виде мультиферментного комплекса. Этот комплекс, по-видимому, не диссоциирует в процессе трансформации холестерина в прегненолон. Найденные нами условия дезагрегации цитохрома P-450 до мономера, не оказывающие инактивирующего воздействия на цитохром P-450, а также реконструкция на колонке с иммобилизованным адrenoдоксином активной системы с использованием цитохрома P-450 в виде комплекса с M 115 000 и мономера подтверждают высказанное нами ранее предположение [1] об эквимольном соотношении белков системы в мультиферментном комплексе. Тем не менее нами допускается

возможность существования тройных комплексов со стехиометрией, отличной от эквимольной, и, в частности, существование тройных комплексов со стехиометрией адrenoоксинредуктазы, адrenoоксина и цитохрома Р-450, равной 1 : 2 : 1.

Экспериментальная часть

В работе применяли гомогенные препараты адrenoоксинредуктазы, адrenoоксина и цитохрома Р-450 (в комплексе с холестерином и в свободном от субстрата виде), полученные согласно [3, 4], твин 80, глюкозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.49; 140 ед. акт./мг), набор белков-стандартов для определения молекулярного веса MS-11 (Serva, ФРГ), NADP (Reanal, ВНР), холат натрия (Sigma, США), сефадекс G-200, BrCN-сефарозу (Pharmacia, Швеция). Адrenoоксин-сефарозу (200 нмоль иммобилизованного адrenoоксина на 1 мл геля) готовили как описано ранее [3].

Определение активности реконструированной 20S,22R-холестерингидроксигенирующей системы проводили при помощи разностной спектрофотометрии, регистрируя скорость превращения высокоспиновой формы цитохрома Р-450 ($\lambda_{\text{макс}}$ 393 нм) в низкоспиновую форму ($\lambda_{\text{макс}}$ 418 нм). Инкубационная смесь в 2 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,2) содержала 4 нмоль цитохрома Р-450, 4 нмоль адrenoоксинредуктазы и соответствующие количества адrenoоксина. Смесь выдерживали 10 мин при 20° С и реакцию инициировали добавлением 0,1 мл NADPH-генерирующей системы (100 нмоль NADP, 1 мкмоль глюкозо-6-фосфата и 0,5 ед. акт. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) с последующей регистрацией спектральных изменений в течение 3—10 мин в 1-см термостатируемой кювете при t 20±0,1° С.

Концентрации компонентов NADPH-генерирующей системы были достаточными для обеспечения в течение эксперимента постоянной концентрации NADPH, равной 0,1 мМ. В контрольной кювете содержались те же компоненты, исключая NADPH-генерирующую систему. В результате ферментативной реакции превращения холестерина в прегненолон в разностном спектре появлялся максимум при 418 нм и минимум при 393 нм, а также была выявлена изобестическая точка при 402 нм. Такой характер спектральных изменений свидетельствует о превращении фермент-субстратного комплекса в цитохром Р-450, свободный от холестерина. При оценке активности системы использовали прямо пропорциональные участки кинетических кривых. Активность системы (A) выражали в нМ образующейся за 1 с низкоспиновой формы цитохрома Р-450. За 100% принимали максимальное значение активности.

Определение констант диссоциации. Константу диссоциации адrenoоксинредуктазы с комплексом адrenoоксин·цитохром Р-450 определяли по увеличению активности системы при возрастании концентрации адrenoоксинредуктазы. При этом соотношение концентрации адrenoоксина к цитохрому Р-450 было постоянным и равнялось 5 (2,5 мкМ адrenoоксин, 0,5 мкМ цитохром Р-450), а концентрация адrenoоксинредуктазы варьировалась от 0,012 до 0,5 мкМ. Константу диссоциации цитохрома Р-450 с комплексом адrenoоксинредуктаза·адrenoоксин определяли, исходя из увеличения активности системы при повышении концентрации цитохрома Р-450. Соотношение концентрации адrenoоксина к концентрации адrenoоксинредуктазы составляло 10 (5 мкМ адrenoоксин, 0,5 мкМ адrenoоксинредуктаза) при концентрации цитохрома Р-450 от 0,5 до 5,5 мкМ. Значения констант диссоциации, выражаемые в виде значений концентраций адrenoоксинредуктазы и цитохрома Р-450, необходимых для достижения полумаксимальной активности системы, определяли методом двойных обратных величин.

Для оценки кинетических данных использовали средние значения на-

чальных скоростей, полученные из трех опытов. Ошибка определения составляла не более 5—7%.

Температурную инактивацию проводили путем инкубирования аденодоксина, аденодоксинредуктазы, низкоспиновой или высокоспиновой формы цитохрома Р-450 в исходном буфере в интервале температур от 25 до 60° С в течение 10 мин. По окончании инкубации пробы белков немедленно охлаждали до 4° С и контролировали степень инактивации. Для этого в случае аденодоксинредуктазы и аденодоксина использовали реакции восстановления дихлорфенолиндифенола и цитохрома с соответственно [9], в случае цитохрома Р-450 контролировали переход в его неактивную форму — цитохром Р-420 [13]. Степень инактивации 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы оценивали по реакции превращения холестерина в прегненолон [14]. Во всех случаях найденная величина инактивации являлась средней из трех опытов. Величина ошибки при этих определениях составляла 5—10%. Изучение стабильности отдельных белков системы и реконструированной системы в зависимости от времени проводили при температуре 45° С. Для оценки стабильности как отдельных белков, так и системы в целом использовали температуру, при которой степень инактивации составляла 50% (T_{50}). За 100% активности принимали активность, наблюдаемую при температуре 25° С.

Определение молекулярного веса методом гель-фильтрации [15] проводили на колонке (1×83 см) с сефадексом G-200, уравновешенной 0,05 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,2 (исходный буфер).

Для дезагрегации цитохрома Р-450 образцы белка (0,3 мл, 15 нмоль) подвергали хроматографии на колонке с сефадексом G-200 при 8—10° С в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,3% холата натрия, 0,3% твин 80 или 1 М NaCl+0,3% холата натрия. Молекулярные веса цитохрома Р-450 в различных дезагрегирующих условиях оценивали по калибровочному графику, полученному при калибровке колонки в исходном буфере.

Определение молекулярного веса методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях проводили согласно [16].

Изучение комплексобразования белков методом гель-фильтрации. Смесь белков (по 30 нмоль каждого) анализировали против соответствующего буфера и далее в 0,5 мл наносили на колонку. Идентификацию аденодоксинредуктазы и цитохрома Р-450 осуществляли по реакции восстановления дихлорфенолиндифенола [9] и СО-дифференциальным спектром [13] соответственно. Для идентификации возможных тройных комплексов к отдельным фракциям добавляли NADPH-генерирующую систему и затем анализировали возможность образования карбоксикомплекса [13]. Для анализа двойных комплексов к отдельным фракциям перед добавлением NADPH-генерирующей системы добавляли либо аденодоксинредуктазу, либо цитохром Р-450. Параллельно с указанными анализами в отдельных случаях после гель-фильтрации белки во фракциях идентифицировали по спектрам поглощения.

Изучение дезагрегации цитохрома Р-450, сорбированного на иммобилизованном аденодоксине, проводили при комнатной температуре на колонке, заполненной аденодоксин-сефарозой. Для этого через колонку, содержащую 0,5 мл сорбента (100 нмоль иммобилизованного аденодоксина), пропускали цитохром Р-450, диализованный против исходного буфера, до полного насыщения аденодоксин-сефарозы. Контроль проводили по выходу на постоянное значение поглощения колоночного элюата при 400 нм. Полнота элюции цитохрома Р-450 в различных условиях оценивалась по выходу поглощения элюирующего буфера, содержащего цитохром Р-450, при 400 нм на нулевой уровень. Содержание цитохрома Р-450 определяли по методу [13].

Влияние твина 80 на восстановление цитохрома Р-450 в реконструированной в растворе 20S,22R-холестерингидроксилирующей системе изучали

по скорости образования карбоксикомплекса. Для этого смесь цитохрома P-450 (0,8 мкМ), адренодоксинредуктазы (0,7 мкМ) и адренодоксина (2,5 мкМ) в 4 мл инкубировали 10 мин при 20° С в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,2), содержащем различные концентрации твина 80 (0—1%). Содержимое отдельных проб распределяли в две кюветы, через одну (опытную) барботировали СО. Далее в каждую кювету вносили по 0,1 мл NADPH-генерирующей системы и регистрировали изменения в разностном спектре в течение 10 мин. Концентрацию карбоксикомплекса цитохрома P-450 определяли исходя из коэффициента молярной экстинкции ϵ $91 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 688—693.
2. Yago N., Ichii S. (1969) J. Biochem., 65, 215—224.
3. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 780—786.
4. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биорган. химия, 4, 278—280.
5. Takemori S., Sato H., Gomi T., Suhara K., Katagiri M. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 67, 1151—1157.
6. Akhrem A. A., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. (1978) Abstracts, Cytochrome P-450. Structural and Functional Aspects, Eberswalde, pp. 1—3.
7. Chu J., Kimura T. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5183—5187.
8. Hiwatashi A., Ichikawa Y., Maruya N., Yamano T., Aki K. (1976) Biochemistry, 15, 3082—3090.
9. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 1064—1069.
10. Ахрем А. А., Лапко В. Н., Лапко А. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Докл. АН СССР, 243, 505—507.
11. Tilley B. E., Watanuki M., Hall P. F. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 70, 1303—1307.
12. Shikita M., Hall P. F. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5598—5604.
13. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., 239, 2370—2378.
14. Morisaki M., Bannai K., Ikekawa N., Shikita M. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 69, 481—488.
15. Andrews P. (1964) Biochem. J., 91, 222—233.
16. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.

Поступила в редакцию
1.VI.1979

STRUCTURAL ORGANIZATION OF MEMBRANE-BOUND STEROID HYDROXYLATING SYSTEMS FROM ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA. II. SELF-ASSOCIATION OF THE 20S, 22R-CHOLESTEROL HYDROXYLATING SYSTEM IN SOLUTION AND THE STOICHIOMETRY OF ITS INDIVIDUAL COMPONENTS—ADRENODOXIN REDUCTASE, ADRENODOXIN AND CYTOCHROME P-450

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

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

The self-association of the 20S, 22R-cholesterol hydroxylating system in solution has been studied. The constants of interaction of individual proteins of this system have been obtained. The influence of temperature upon individual proteins of the system, on the complexes of adrenodoxin reductase with adrenodoxin and adrenodoxin with cytochrome P-450, as well as on the whole system has been studied. The quaternary structure of cytochrome P-450 has been investigated. Cytochrome P-450 as a monomer and either as a complex of MW 115 000 or octamer (MW 400 000) has formed adrenodoxin complexes and manifested functional activity. Gel-chromatography of a mixture of adrenodoxin reductase, adrenodoxin and cytochrome P-450 with or without detergent or adrenodoxin has been performed.