



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 12 * № 2 * 1986

УДК 577.32.23 : 577.112.4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕДУКТАЗНОГО КОМПЛЕКСА МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ. ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РЕАГЕНТОВ

*Усанов С. А., Турко И. В., Чащин В. Л.,
Ахрем А. А.*

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

С помощью 3,3'-дитиобис(сукининимидилпропионата), 1-этил-3-(3-диметиламино-пропил)карбодимида и N-сукининимидил-3-(2-пиридилилдитио)пропионата получены ковалентно связанные комплексы адренодоксиредуктазы и адренодоксина — белков, являющихся компонентами стероидгидроксилирующей системы митохондрий коры надпочечников. Количество ковалентно связного комплекса максимальное в случае использования водорасторвимого карбодимида. Однако полученный комплекс не способен переносить электроны с NADPH на цитохром P-450. Функционально активный комплекс (выход 42%) образуется при использовании гетеробифункционального реагента — N-сукининимидил-3-(2-пиридилилдитио)пропионата. С помощью гель-пропикующий, ионообменной и аффинной хроматографий ковалентно связанный комплекс адренодоксиредуктазы с адренодоксином выделен в гомогенном состоянии. В присутствии цитохрома P-450 такой комплекс способен переносить электроны с NADPH на гемопротеин. Полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение о наличии на молекуле адренодоксина отдельных центров связывания для цитохрома P-450 и адренодоксиредуктазы и не противоречат модели функционирования системы в виде организованного комплекса.

Стероидгидроксилирующая система митохондрий коры надпочечников, состоящая из белков трех типов: флавопротеида (адренодоксиредуктазы), железосеросодержащего белка (адренодоксина) и гемопротеида (цитохрома P-450) — представляет собой электрон-транспортную цепь, выполняющую функцию переноса электронов от NADPH к кислороду. Адренодоксиредуктаза и адренодоксин образуют участок переноса электронов, в котором редуктаза принимает два электрона от NADPH, а адренодоксин по одноэлектронному механизму передает их на цитохром P-450 [1]. Селективная химическая модификация позволила показать функциональную значимость остатков цистеина и гистидина в нуклеотидсвязывающем центре адренодоксиредуктазы [2, 3]. Один из остатков аргинина этого фермента, по-видимому, взаимодействует электростатически с фосфатной группой NADPH [4].

Адренодоксиредуктаза образует высокоспецифичный комплекс ($K_{дис} = 10^{-9}$ M) с адренодоксином [5]. Следовательно, флавопротеид кроме участка, связывающего кофактор, должен содержать центр, взаимодействующий с адренодоксином. Учитывая электростатическую природу сил, участвующих в образовании комплекса «кислого» белка адренодоксина с адренодоксиредуктазой, можно предположить, что остатки лизина молекулы флавопротеида должны вовлекаться во взаимодействие с адренодоксином. В самое последнее время это предположение нашло экспериментальное доказательство [6]. Взаимоотношения между нуклеотид- и адренодоксиревязывающими участками на молекуле адренодоксиредуктазы неясны. Однако имеется указание, что эти участки разнесены на молекуле флавопротеида [2].

Известно, что кроме остатков Glu⁷⁴, Asp⁷⁹ и Asp⁸⁶ молекулы адренодоксина [7–9] во взаимодействие с адренодоксиредуктазой вовлекается единственный остаток тирозина (Tyr⁸²) [10].

Структурные основы взаимодействия адренодоксина с цитохромом P-450 менее исследованы.

Ранее, используя бифункциональные реагенты, мы показали, что ковалентно спищый диметил-3,3'-дитиобиспропионатом комплекс адренодоксина с цитохромом Р-450 сохраняет функциональную активность [11], а взаимодействие адренодоксина с гемопротеидом осуществляется по домену F₁, представляющему N-концевую часть молекулы [12].

Электронный транспорт в митохондриях коры надпочечников может осуществляться в тройном (или более высокого порядка) комплексе или по принципу «челнока». В последнем случае адренодоксин переносит электроны от адренодоксиредуктазы на цитохром Р-450, что предполагает наличие актов ассоциации-диссоциации. Имеются экспериментальные доказательства в пользу как первой [13, 14], так и второй моделей [15–17]. Обе модели накладывают ряд ограничений на структурную организацию компонентов электронтранспортной цепи.

В настоящей работе для исследования механизма электронного транспорта и выяснения природы комплексов адренодоксиредуктазы с адренодоксином применен метод бифункциональных реагентов, позволяющий фиксировать комплексы белков.

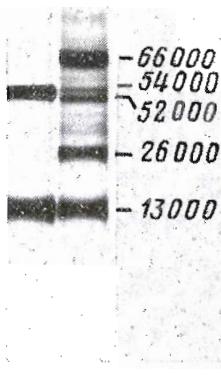
Первоначально для получения ковалентно спищего комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином был использован 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), взаимодействующий со свободными аминогруппами белковых молекул и имеющий расстояние между реакционно-способными группировками 12 Å. Подобного рода аминоспецифичные реагенты использовались нами ранее для получения ковалентно спищего комплекса холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 с адренодоксином [11, 18]. Кроме того, 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат) эффективно применялся для получения ковалентных комплексов других белков, например цитохрома с с цитохром-с-пероксидазой [19].

Молекулярная масса адренодоксиредуктазы в условиях SDS-электрофореза составляет 54 000, а адренодоксина — 13 000 Да. Это позволило интерпретировать полосу с молекулярной массой 66 000 Да, появляющуюся на электрофореграммах после обработки смеси этих белков 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионатом), как комплекс адренодоксиредуктазы с адренодоксином, что было в дальнейшем подтверждено двумерным электрофорезом (данные не приведены). Количественная оценка выхода ковалентно спищего комплекса показала, что при использовании 10–15-кратных мольных избытков реагента образуется до 8% ковалентно спищего комплекса. Увеличение концентрации 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионата) до 400–600-кратных избытков приводит лишь к 2-кратному увеличению количества образующегося комплекса. Относительно невысокий выход ковалентно спищего комплекса в присутствии 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионата) побудил к поиску другого реагента для фиксации комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином, в качестве которого был опробован водорасторимый 1-этап-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимиид. Карбодиимиды неоднократно использовались для получения комплексов электронтранспортных белков [9, 20–24]. Одним из преимуществ этих реагентов является то, что образование ковалентной связи между белками не сопровождается введением дополнительной пространственной группы, хотя не исключается возможность принудительного сближения реагирующих белков на 2–3 Å [21].

Обработка смеси адренодоксиредуктазы и адренодоксина водорасторимым карбодиимиидом приводит к образованию ковалентно спищего комплекса двух белков, о чем свидетельствует появление на электрофореграммах полосы с молекулярной массой 66 000 Да (рис. 1). Кроме основной полосы, соответствующей комплексу, появляются дополнительные полосы с молекулярными массами 26 000 и 52 000 Да, которые, на наш взгляд, соответствуют димеру и тетramerу адренодоксина. Количество ковалентно спищего комплекса зависит от концентрации карбодиимида. При концентрации реагента 10 мМ выход комплекса составляет до 95% в пересчете на адренодоксиредуктазу. Образование ковалентно спищего комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином сопровождается потерей ими способности переносить электроны от NADPH на

а *б*

Рис. 1. SDS-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле смеси адренодоксиреактазы и адренодоксина до (*а*) и после (*б*) обработки 1-этил-3-(3-диметиламинонпропил)карбодиимидом (условия см. «Экспер. часть»). Справа указаны молекулярные массы в дальтонах



цитохромы *c* и Р-450. Факт нарушения электротранспортной функции ряда гемопротеидов после их обработки карбодиимидом хорошо известен [8]. Так как функциональная активность — основное требование, предъявляемое к ковалентно спищому комплексу, водорастворимый карбодиимид в качестве бифункционального реагента, несмотря на высокий выход комплекса, оказался неприемлемым.

Третьим бифункциональным реагентом, использованным для получения ковалентно спищего, функционально активного комплекса адренодоксиреактазы с адренодоксином, явился гетеробифункциональный реагент — N-сукциниimidил-3-(2-пиридилдитио)пропионат. В результате экспериментов по спищанию этим реагентом белков была выбрана следующая последовательность операций: адренодоксиреактаза предварительно обрабатывалась N-сукциниimidил-3-(2-пиридилдитио)пропионатом для введения в молекулу активированных сульфгидрильных групп, а затем модифицированная таким образом адренодоксиреактаза взаимодействовала с адренодоксином, предварительно обработанным метил-4-меркаптобутириимидалом с целью введения дополнительных сульфгидрильных групп. Максимальный выход ковалентно спищего комплекса адренодоксиреактазы с адренодоксином достигается при предварительной обработке флавопротеида 7-кратным мольным избытком N-сукциниimidил-3-(2-пиридилдитио)пропионата, а адренодоксина — 20-кратным мольным избытком метил-4-меркаптобутириимида и составляет 42% от количества адренодоксиреактазы, взятой в эксперимент (рис. 2).

На рис. 3 представлены результаты двумерного электрофореза ковалентно спищих адренодоксиреактазы и адренодоксина (перед электрофорезом во втором направлении дисульфидная связь восстанавливается дитиотреитом). Кроме ковалентно спищего комплекса и свободных белков на электрофорограмме присутствуют олигомерные формы сложного состава.

Тот факт, что молекулярная масса ковалентно спищего комплекса составляет 66 000 Да и комплекс распадается в условиях двумерного электрофореза на адренодоксиреактазу и адренодоксин, позволяет сделать вывод, что эти белки входят в состав комплекса в соотношении 1:1.

Прежде чем предпринять исследование функциональной активности

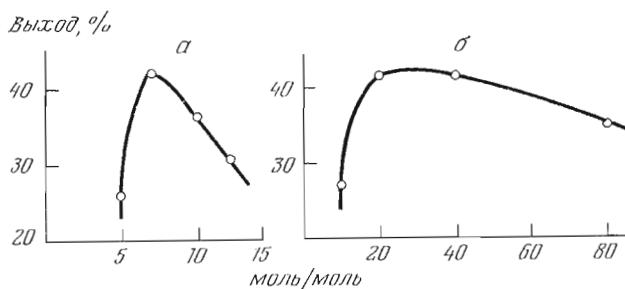


Рис. 2. Зависимость выхода ковалентно сшитого комплекса адренодоксингредуктазы (80 мкМ) с адренодоксином (500 мкМ) от количества взятого для предварительной модификации адренодоксингредуктазы N-сукцинимидил-3-(2-пиридинилдитио)пропионата (приведены мольные избытки) (а) и от количества взятого для предварительной модификации адренодоксина метил-4-меркаптобутириимида (б). а – адренодоксин предварительно обработан 20-кратным мольным избытком метил-4-меркаптобутириимида, б – адренодоксингредуктаза – 7-кратным мольным избытком N-сукцинимидил-3-(2-пиридинилдитио)пропионата

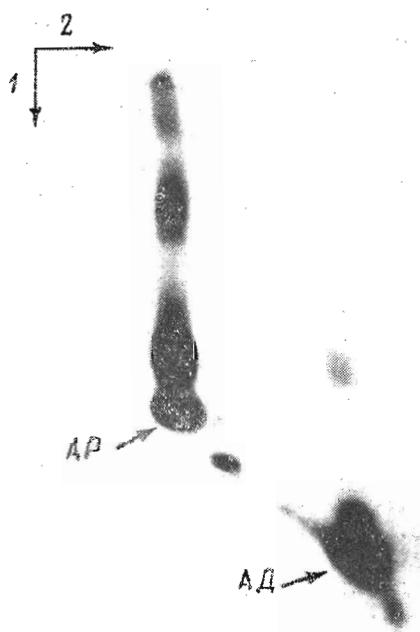


Рис. 3. Двумерный электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле ковалентно сшитого с помощью N-сукцинимидил-3-(2-пиридинилдитио)пропионата комплекса адренодоксингредуктазы (АР) с адренодоксином (Ад) (условия см. «Экспер. часть»)

данного ковалентно сшитого комплекса, необходимо было получить его в гомогенном состоянии.

В качестве первого этапа выделения комплекса была использована гель-проникающая хроматография на сефадексе G-100 (рис. 4а). На данной стадии очистки удаляется часть свободного адренодоксина (фракция IV) и частично высокомолекулярные формы сшитых белков (фракция I), которые элюируются в свободном объеме колонки. Ковалентно сший комплекс адренодоксингредуктазы и адренодоксина (фракция II) элюируется между свободным объемом и свободной адренодоксингредуктазой (фракция III) и в значительной степени загрязнен белками, присутствующими во фракциях I и III (рис. 5б).

Следующий этап очистки ковалентно сшитого комплекса заключается в ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (рис. 4б). При про-

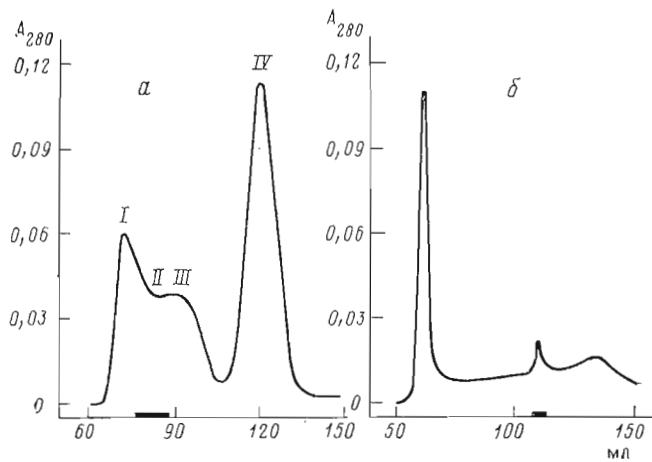


Рис. 4. Выделение ковалентно сшитого с помощью N-сукциниimidил-3-(2-пиридилидитио)пропионата комплекса адренодоксинредуктазы с адренодоксином. Хроматографии на сепадексе G-100 (а) и на DEAE-целлюлозе (б). Черными прямоугольниками на оси абсцисс обозначены фракции, которые отбирались для дальнейшей очистки.

мывке колонки 150 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, остаточные количества свободного адренодоксина оставались сорбированными, о чем свидетельствовало красно-буровое пятно в верхней части колонки, тогда как адренодоксинредуктаза, ее ковалентно сшитый комплекс с адренодоксином и высокомолекулярные формы сшитых белков элюируются с колонки, постепенно перераспределяясь между фракциями. По данным SDS-электрофореза (не приводятся), ковалентно сшитый комплекс присутствует практически во всех фракциях, меняется только степень его загрязненности свободной адренодоксинредуктазой и высокомолекулярными формами сшитых белков. Хотя данная стадия очистки и приводит к значительным потерям ковалентно сшитого комплекса, она оправданна, так как позволяет полностью удалить свободный адренодоксин (рис. 5в).

Для отделения адренодоксинредуктазы на завершающем этапе очистки была использована хроматография на адренодоксин-сепарозе. Так как участок, ответственный за взаимодействие с адренодоксином, в ковалентном комплексе уже блокирован, мы предположили, что в отличие от свободного флавопротеида связанный с адренодоксином белок не будет взаимодействовать с носителем. Действительно, хроматография на адренодоксин-сепарозе позволила получить ковалентно сшитый комплекс адренодоксинредуктазы с адренодоксином в высокоочищенном состоянии (рис. 5г).

Располагая гомогенным ковалентно сшитым комплексом, свободным от примесей адренодоксинредуктазы и адренодоксина, мы исследовали его функциональную активность в реакциях восстановления цитохромов *c* и P-450. В присутствии донора электронов NADPH ковалентно сшитый комплекс способен восстанавливать как цитохром *c* (рис. 6а), так и цитохром P-450 (рис. 6б).

К сожалению, многостадийная процедура очистки комплекса приводит к значительным его потерям. Конечный выход очищенного ковалентно сшитого комплекса составляет ~1% в расчете на взятую в эксперимент адренодоксинредуктазу. Это в существенной степени ограничило более детальное исследование его катализитических свойств и физико-химических параметров.

Адренодоксин образует стехиометрические комплексы с адренодоксинредуктазой [5] и цитохромом P-450 [25], причем прочность этих комплексов существенно различается и выше в случае флавопротеида. Согласно работе [9], в молекуле адренодоксина один и тот же участок, включающий Glu⁷⁴, Asp⁸⁹ и Asp⁸⁶, за счет электростатических взаимо-

a b c d

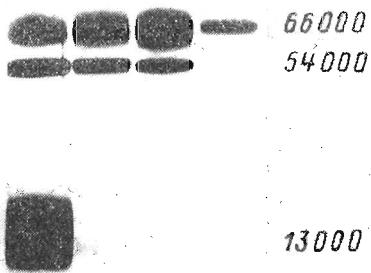


Рис. 5. SDS-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле фракций ковалентно спицкого с помощью N-сукциниимилид-3-(2-пиридилдитио)пропионата комплекса адренодоксинредуктазы с адренодоксином на отдельных этапах очистки: исходный (*a*), после разделения на сефадексе G-100 (*b*), DEAE-целлюлозе (*c*) и адренодокси-сефарозе (*d*). Справа указаны молекулярные массы в дальтонах

действий образует комплексы с адренодоксинредуктазой и цитохромом P-450. Учитывая принцип комплементарности, можно предположить, что участки молекул флавопротеида и гемопротеида, вовлекающиеся во взаимодействие с отрицательно заряженным участком молекулы адренодоксина, должны быть достаточно схожи. В этой связи непонятным кажется существенное различие в сродстве адренодоксина к адренодоксинредуктазе (10^{-9} М) [5] и цитохрому P-450 (10^{-7} М) [25].

Исследование взаимодействия адренодоксинредуктазы и цитохрома P-450 с иммобилизованным на сефарозе 4B, активированной бромцианом, адренодоксином [14] свидетельствует о том, что необходимы различные условия для того, чтобы элюировать белки, связанные с носителем: если комплекс флавопротеида с иммобилизованным адренодоксином может быть разрушен использованием только ионной силы (0,4 М NaCl), то для того, чтобы элюировать цитохром P-450, кроме ионной силы (1 М NaCl) требуется присутствие ионного детергента — холата натрия (0,3%). Этот факт может свидетельствовать о разной природе сил, обусловливающих образование комплексов адренодоксина с адренодоксинредуктазой и цитохромом P-450, а значит, может указывать на существование различных участков, вовлекающихся в процессы комплексообразования.

Схема, описывающая восстановление цитохрома с комплексом адренодоксинредуктазы с адренодоксином, который функционирует между 1- и 3-электронвосстановленными состояниями без диссоциации последнего [26], предусматривает по крайней мере в цитохром-с-редуктазной реакции наличие на молекуле адренодоксина двух участков, ответственных за взаимодействие с адренодоксинредуктазой и цитохромом с.

В пользу существования на молекуле адренодоксина различных участков, вовлекающихся в комплексообразование с флавопротеидом и гемопротеидом, говорят имеющиеся в литературе данные об участии железосеросодержащего кластера адренодоксина в образовании комплексов. Известно, что хромофорная группа адренодоксина не вовлекается во взаимодействие с адренодоксинредуктазой [27]. Вместе с тем исследование комплексообразования цитохрома P-450 с адренодоксином, проведенное с помощью спин-решеточной релаксации парамагнитных центров в присутствии ионов диспрозия [28], указывает на то, что железосеросо-

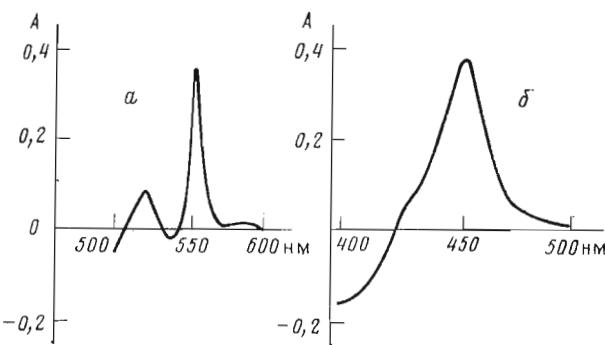


Рис. 6. Спектры восстановленного цитохрома *c* (*a*) и карбонильного комплекса восстановленной формы цитохрома Р-450 (*b*) в присутствии NADPH и очищенного ковалентно спицтого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином

держащий кластер адренодоксина вовлекается в комплексообразование с цитохромами Р-450 и *c* [29].

Таким образом, изучение полученного высокоочищенного, ковалентно спицтого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином, обладающего функциональной активностью, позволяет сделать некоторые выводы относительно расположения функционально важных участков на молекулах белков-партнеров.

1. Сохранение функциональной активности ковалентно спицтого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином свидетельствует о том, что комплексообразование не препятствует последующему взаимодействию флавопротеида с NADPH.

2. Способность комплекса восстанавливать цитохромы *c* и Р-450 указывает на то, что участки на молекуле адренодоксина, взаимодействующие с этими гемопротеидами, могут либо совпадать, либо перекрываться.

3. На основании полученных данных можно сделать вывод об образовании организованных комплексов компонентов холестерингидроксилазной системы, что находится в соответствии с ранее полученными данными [11, 18] и предполагает наличие двух участков на молекуле адренодоксина, ответственных за взаимодействие с адренодоксиредуктазой и цитохромом Р-450.

Полученные данные, однако, не позволяют ответить на вопрос: функционирует ли система, состоящая из ковалентно спицтого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином и цитохромом Р-450, в организованном кластере во время трансформации холестерина в pregnенолон, либо в результате транспорта электронов на конечный акцептор отдельные компоненты системы диссоциируют. Способность каталитических количеств комплекса восстанавливать цитохром Р-450 указывает на диссоциацию вышеназванной системы на гемопротеид и комплекс адренодоксиредуктазы с адренодоксином, по крайней мере в условиях реакции восстановления. Вместе с тем надо помнить, что в условиях реально функционирующих в митохондриальной мембране систем не исключена кластерная организация холестерингидроксилирующей системы.

Экспериментальная часть

В работе использовали холат натрия, дитиотрейт, NADPH, цитохром *c*, 1-этан-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (Serva, ФРГ); сепадексы G-25 и G-100, сепарозу 4B, активированную бромцианом (Pharmacia, Швеция); 3,3'-дитиобис(сукинимидилпропионат), N-сукинимидил-3-(2-пиридилилдитио)пропионат, метил-4-меркаптобутирилат (Pierce, США).

Адренодоксиредуктазу выделяли из митохондрий коры надпочечников как описано ранее [30]. Белок гомогенен, по данным SDS-электрофореза

и иммунодиффузии, и характеризуется спектрофотометрическим индексом $A_{270}/A_{450}=7,7$. Концентрацию адренодоксиредуктазы определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярного поглощения ϵ_{450} 11 $\text{мM}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

Адренодоксин выделяли по методу [31]. Белок гомогенен, по данным SDS-электрофореза и иммунодиффузии, и характеризуется спектрофотометрическим индексом $A_{414}/A_{280}=0,83$. Концентрацию адренодоксина определяли, используя коэффициент молярного поглощения ϵ_{414} 10 $\text{мM}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

Адренодоксин иммобилизовали на сефарозе 4B, активированной бромцианом, согласно прописи фирмы «Pharmacia».

Цитохром P-450 из митохондрий коры надпочечников выделяли согласно [32]. Белок гомогенен, по данным SDS-электрофореза и иммунодиффузии. Концентрацию цитохрома P-450 определяли из разностных спектров поглощения карбонильного комплекса восстановленной формы гемопротеина, используя коэффициент молярного поглощения ϵ_{450} 91 $\text{мM}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [33]. Все спектрофотометрические измерения были выполнены на спектрофотометре Specord M-40 (Karl Zeiss, ГДР).

Получение ковалентно сшитого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином с помощью гомобифункционального реагента. К смеси адренодоксиредуктазы (25 мкМ) с адренодоксином (100 мкМ) в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, добавляли 10–600-кратные мольные избытки 3,3'-дитиобис(сукининимидилпропионата) в диметилформамиде (60 мг/мл). Реакцию проводили 60 мин и останавливали добавлением уксуснокислого аммония до конечной концентрации 50 мМ. Продукты реакции анализировали SDS-электрофорезом.

Получение ковалентно сшитого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином с помощью водорастворимого карбодиимида. Смесь адренодоксиредуктазы (70 мкМ) с адренодоксином (280 мкМ) диализовали в течение ночи против 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,0. К диализу добавляли сухой 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид до конечной концентрации 10 мМ и реакцию проводили в течение 60 мин. Продукты реакции анализировали SDS-электрофорезом.

Получение ковалентно сшитого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином с помощью гетеробифункционального реагента. Адренодоксиредуктазу (80 мкМ) в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, обрабатывали 30 мин 7-кратным мольным избытком N-сукининимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата (исходный раствор 10 мг/мл в этаноле). Затем белок обессоливали на колонке (1×15 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,4. Адренодоксин (500 мкМ) в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, обрабатывали 30 мин 20-кратным мольным избытком метил-4-меркаптобутириимида. Реагент добавляли сухим. Затем белок обессоливали на колонке (1×15 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,4.

Полученные после предварительной модификации адренодоксиредуктазу и адренодоксин смешивали в соотношении 1:4 и инкубировали 30 мин. Продукты реакции анализировали SDS-электрофорезом.

Очистка ковалентно сшитого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином. Полученные ковалентно сшитые комплексы адренодоксиредуктазы с адренодоксином подвергали гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-100 (1,6×90 см), уравновешенном 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,4 М NaCl. Фракции, которые, по данным SDS-электрофореза, содержали комплекс, разводили в 4 раза 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,4, и наносили на колонку (1×90 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером. Колонку промывали уравновешивающим буфером и элюировали 150 мМ фосфатным буфером, pH 7,4. Фракции, содержащие максимальное количество ковалентно сшитого комплекса адренодоксиредуктазы с адренодоксином, диализовали против 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, в течение ночи, и наносили на колонку (1×10 см) с адренодоксином, иммобилизованным на сефарозе 4B, активированной бромцианом. Белок, элюируемый в свободном объеме колонки, представлял собой чистый комплекс двух белков.

При всех хроматографических операциях поглощение элюата при 280 нм контролировали с помощью хроматографического комплекса Uvicord S (LKB, Швеция).

SDS-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле осуществляли согласно [34] на приборе GE 2/4 (Pharmacia, Швеция). После электрофореза гели помещали в раствор изопропанол — вода — уксусная кислота (5 : 5 : 1), фиксировали в течение 60 мин при 60° С и окрашивали 0,04% раствором кумасси G-250 в 3,5% хлорной кислоте в течение 60 мин при 60° С. Гели отмывали 7,5% уксусной кислотой и сканировали на приставке для сканирования гелей к спектрофотометру Specord M-40 (Karl Zeiss, ГДР). Из денситограмм рассчитывали выход ковалентно сшитого комплекса в процентах как отношение площади пика ковалентно сшитого комплекса к сумме площадей ников высокомолекулярных форм, ковалентно сшитого комплекса и свободной адренодоксипредуктазы.

Двумерный электрофорез проводили в пластинках 7,5% полиакриламидного геля (8×8 см). После разделения в первом направлении гель вымачивали 60 мин в электродионом буфере, содержащем 0,1 М дитиотреит, а затем проводили электрофорез во втором, перпендикулярном направлении.

Функциональную активность ковалентно сшитого комплекса адренодоксипредуктазы с адренодоксином определяли по восстановлению цитохрома Р-450. К комплексу добавляли цитохром Р-450 (конечная концентрация 4 мкМ), помещали в две кюветы спектрофотометра, пропускали окись углерода и добавляли в одну кювету NADPH. За процессом следили по увеличению поглощения при 448 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lambeth J. D., Seybert D. W., Lancaster J. R., Salerno J. C., Kamin H. Mol. and Cell. Biochem., 1982, v. 45, № 1, p. 13–31.
2. Hiwatashi A., Ichikawa Y., Yamano T., Maruya N. Biochemistry, 1976, v. 15, № 14, p. 3091–3097.
3. Hiwatashi A., Ichikawa Y. J. Biochem., 1978, v. 84, № 5, p. 1071–1086.
4. Nonaka Y., Sugiyama T., Yamano T. J. Biochem., 1982, v. 92, № 6, p. 1693–1701.
5. Chu J.-W., Kimura T. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 14, p. 5183–5187.
6. Hamamoto I., Ichikawa Y. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 786, № 1, p. 32–41.
7. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 8, с. 1064–1069.
8. Geren L. M., O'Brien P., Stonehuerner J., Millett F. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 4, p. 2155–2160.
9. Lambeth J. D., Geren L. M., Millett F. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 16, p. 10025–10029.
10. Taniguchi T., Kimura T. Biochemistry, 1975, v. 14, № 26, p. 5573–5577.
11. Усанов С. А., Турко И. В., Чащин В. Л., Ахрем А. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 280, № 6, с. 1487–1491.
12. Чащин В. Л., Турко И. В., Ахрем А. А., Усанов С. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 1, с. 135–137.
13. Kido T., Kimura T. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 23, p. 11806–11815.
14. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 688–693.
15. Lambeth J. D., Seybert D. W., Kamin H. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 15, p. 7255–7264.
16. Lambeth J. D., Lancaster J. R., Kamin H. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 8, p. 3674–3678.
17. Hanukoglu I., Jefcoate C. R. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 7, p. 3057–3061.
18. Chashchin V. L., Turko I. V., Akhrem A. A., Usanov S. A. Biochim. et biophys. acta, 1985, v. 826, № 3, p. 313–324.
19. Pettigrew G. W., Seilman S. Biochem. J., 1982, v. 201, № 1, p. 9–18.
20. Zanetti G., Aliverti A., Curti B. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 10, p. 6153–6157.
21. Hackett C. S., Strittmatter P. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 5, p. 3275–3282.
22. Waldmeyer B., Bechtold R., Bosshard H. R., Poulos T. L. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 11, p. 6073–6076.
23. Davis D. J., Hough K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 116, № 3, p. 1000–1006.
24. Geren J. M., Stonehuerner J., Davis D. J., Millett F. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 724, № 1, p. 62–68.
25. Katagiri M., Takikawa O., Sato H., Suhara K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, № 2, p. 804–809.
26. Lambeth J. D., Kamin H. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 9, p. 2908–2917.

27. Hiwatashi A., Ichikawa Y., Maruya N., Yamano T., Aki K. Biochemistry, 1976, v. 15, № 14, p. 3082–3090.
28. Salerno J. C., Lancaster J. R., Lambeth J. D. Fed. Proc., 1980, v. 39, № 3, p. 1140.
29. Geren L. M., Millett F. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 20, p. 10485–10489.
30. Усанов С. А., Пикулева И. А., Чашин В. Л., Ахрем А. А. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 32–45.
31. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чашин В. Л. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 6, с. 780–786.
32. Akhrem A. A., Lapko A. G., Lapko V. N., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. Acta biol. med. Germ., 1979, B, 38, № 2–3, S. 257–273.
33. Omura T., Sato R. J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 7, p. 2370–2378.
34. Davis G. E., Stark G. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 66, № 3, p. 651–656.

Поступила в редакцию
26.III.1985
После доработки
17.VII.1985

**MOLECULAR ORGANIZATION OF ADRENOCORTICAL MITOCHONDRIA
REDUCTASE COMPLEX. CROSS-LINKING STUDIES WITH
BIFUNCTIONAL REAGENTS**

УСАНОВ С. А., ТУРКО И. В., ЧАШЧИН В. Л., АХРЕМ А. А.

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

The water-soluble carbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, homobifunctional reagent 3,3'-dithiobis(succinimidyl propionate), and heterobifunctional reagent N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate have been used to cross-link adrenodoxin reductase and adrenodoxin, components of steroidogenic electron transfer system. Though maximal yield of the cross-linked complex was achieved with the water-soluble carbodiimide, this complex was inactive in the electron transfer from NADPH to cytochrome P-450. The functionaly active complex was formed with N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate. The complex was purified to the apparent homogeneity and shown to be able to mediate the electron transfer. The data obtained indicate existence of different binding sites on adrenodoxin responsible for the adrenodoxin reductase and cytochrome P-450_{sec} binding and do not contradict to the model of the steroidogenic electron transfer in an organized complex.