

УДК 577.112/115/036/15.042

УЧАСТИЕ БЕЛКОВЫХ И ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ
МЕМБРАН ХРОМАФФИННЫХ ГРАНУЛ В РЕАКЦИЯХ,
КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ДОФАМИН- β -МОНООКСИГЕНАЗОЙ

ПЕТРОСЯН С. Ам., БОЯДЖЯН А. С., КАРАГЕЗЯН К. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Исследованы донорно-акцепторные отношения цитохрома b_{561} , кислого медьсодержащего белка и дофамин- β -монооксигеназы из мембран хромаффинных гранул. Используя методы оптической спектроскопии и полярографии, показано, что кислый медьсодержащий белок может служить донором электронов в реакциях гидроксिलирования, катализируемых дофамин- β -монооксигеназой, и одновременно акцептором электронов цитохрома b_{561} . Установлено также, что реакции переноса электронов между отмеченными белками модулируются некоторыми липидами—аналогами фосфолипидных компонентов мембран хромаффинных гранул. На основании полученных данных сделан вывод о наличии *in vivo* функциональной взаимосвязи между цитохромом b_{561} , кислым медьсодержащим белком и дофамин- β -монооксигеназой и о возможном участии фосфолипидных компонентов мембран хромаффинных гранул в процессах переноса электронов между этими белками.

Хромаффинные гранулы (ХГ), локализованные в основном в мозговом слое надпочечников, осуществляют хранение, накопление и секрецию гормонов катехоламинной природы [1]. В ХГ протекает также один из этапов биосинтеза катехоламинов—гидроксילирование дофамина с образованием норадреналина, катализируемый дофамин- β -монооксигеназой (ДБМ) (КФ 1.14.17.11), для осуществления которого необходимо наличие электронодонорных систем [2, 3]. В гранулах две формы ДБМ—мембранная и растворимая [3]. Если вопрос о природе донора электронов растворимой формы фермента можно считать решенным [3], то физиологический донор электронов мембранной формы фермента до настоящего времени не установлен. В то же время, в мембранах ХГ обнаружен ряд белков, обладающих способностью переносить электроны — NADH: (акцептор) редуктаза, флавопротеид, цитохром b_{561} и кислый медьсодержащий белок (КМБ) [4—7], аналоги которых, как правило, являются компонентами известных цепей переноса электронов митохондриальных и микросомных мембран. Представляется вполне вероятным, что все вышеотмеченные белки могут являться компонентами единой цепи переноса электронов, поставляющей восстановительные эквиваленты конечному акцептору этой цепи ДБМ, осуществляющей реакцию биосинтеза норадреналина. Известно, что сходные системы функционируют на мембранах микросом и мито-

хондрией, осуществляя поставку восстановительных эквивалентов, необходимых в реакциях гидроксирования, катализируемых цитохромом P₄₅₀ [8, 9].

Изучение функциональной взаимосвязи переносчиков электронов мембран ХГ могло бы в значительной степени прояснить вопрос относительно природы физиологического донора электронов ДБМ и возможности существования на мембране ХГ цепи переноса электронов.

В настоящей работе представлены результаты экспериментов по изучению донорно-акцепторных отношений некоторых компонентов предполагаемой цепи (цитохрома b₅₆₁, КМБ и ДБМ) и взаимодействию их с фосфолипидами (ФЛ) и сфингомиелином (СФМ) — аналогами мембранных липидов ХГ. Отдельные этапы данного исследования были описаны в наших предыдущих сообщениях [10—12].

Материалы и методы

ХГ выделяли из мозгового слоя свежих надпочечников быка методом Hoffman и др. [13]. Белковые компоненты мембран ХГ (цитохром b₅₆₁, КМБ и ДБМ) были получены описанными ранее методами [13—16]. Содержание меди в препаратах белков и липосом определяли методом Matsuba, Takahashi [17]. Препараты КМБ, ДБМ и цитохрома b₅₆₁ восстанавливали 10-кратным молярным избытком аскорбата и дитионита соответственно, окисляли 10-кратным молярным избытком феррицианида. Медь из состава КМБ удаляли инкубацией с эквимольным количеством ЭДТА в течение 30 мин, реконструкцию проводили в присутствии 2-кратного молярного избытка CuCl₂ в течение 10 мин. Избыток окислителя, восстановителя, ЭДТА и CuCl₂ удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Все отмеченные процедуры проводили при комнатной температуре. Белок определяли методом Lowry и соавт. [18], в качестве стандарта использовали БСА.

В работе использовали коммерческие препараты фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и лизофосфатидилэтаноламина (лФЭ) из сердца быка, фосфатидилхолина (ФХ) и лизофосфатидилхолина (лФХ) из яичного желтка, фосфатидной кислоты (ФК) из яичного ФХ, СФМ из почек свиньи, моно- и дифосфатидинозитов из семян сои и фосфатидилсерина (ФС) из мозга быка. Перед употреблением все липиды очищали от примесей других липидов, лизо-форм, жирных кислот и продуктов перекисного окисления, как описано ранее [19]. Липидные везикулы со Стоксовым радиусом от 80 до 115 Å получали обработкой ультразвуком суспензии липида в 20 мМ К-фосфатном буфере, рН 7,0 (20 мг липида в 1 мл буфера) в течение 20 мин при частоте 22 кГц и 10° на диспергаторе УЗДН-2Т трубчатым концентратором под током азота. В этих условиях лизо-формы ФЛ, моно- и дифосфатидилглицериды образуют мицеллы, а все остальные используемые ФЛ и СФМ — бислойные липосомы [20]. Для удаления высокомолекулярных агрегатов смесь центрифугировали 2 ч при 15000g. Индекс Клей-

на (A_{233}/A_{215}) полученных препаратов составлял 0,3—0,5, что находится в пределах допустимых значений [20].

У. А. ДБМ определяли методом Kuzuya, Nagatsu [23]. Инкубационная смесь содержала 20 мМ тирамин (субстрат), 10 мМ донор электронов (КМБ, аскорбат или ферроцианид), 20 мМ фумарат, 2—10 мкг фермента в 10 мМ Na-ацетатном буфере, pH 6,0. В контрольных пробах субстрат добавляли после остановки реакции. Смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин, реакцию останавливали добавлением 4N NH_4OH . Смесь центрифугировали и к надосадочной жидкости добавляли периодат Na (2%) для окисления образующегося в ходе реакции окситирамина до оксибензальдегида. Через 5 мин добавляли мета-бисульфит Na (10%) для нейтрализации избытка периодита и регистрировали поглощение оксибензальдегида при 330 нм. У. А. выражали в мкмоль продукта, образующегося за 1 мин/1 мг белка. В качестве стандарта использовали раствор оксибензальдегида. При изучении кинетики образования продуктов реакции гидроксилирования, катализируемой ДБМ, использовали инкубационную смесь, содержащую субстрат донор электронов и фермент. При использовании липидов фермент предварительно инкубировали с препаратами липосом или мицелл при комнатной температуре 10 мин. Смесь инкубировали при 37° 15 мин, через каждые 5 мин отбирали пробы и далее повторяли те же процедуры, что и в случае определения У. А. За кинетикой окисления цитохрома b_{561} следили по уменьшению интенсивности полосы поглощения с максимумом при 561 нм, характерной для восстановленной формы цитохрома и отсутствующей у окисленной.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре «СФ—46» и «Спектод М—40» при комнатной температуре, в кюветах с длиной оптического пути 1 и 0,5 см; полярографические — на кислородном анализаторе «Beckman», снабженном электродом Кларка, при 37° в герметичной кювете.

Эксперименты проведены в модельных системах с использованием высокоочищенных препаратов соответствующих белков и везикул, сформированных из отмеченных липидов. Полученные в работе данные являются средними трех независимых экспериментов, каждый из которых включал от трех до пяти измерений.

Результаты и обсуждение:

Эксперименты по изучению донорно-акцепторных отношений цитохрома b_{561} , КМБ и ДБМ показали возможность переноса электронов от цитохрома к КМБ, с одной стороны, и от КМБ к ДБМ—с другой. Так, инкубация восстановленных препаратов цитохрома b_{561} с окисленными препаратами КМБ приводила к восстановлению последнего и окислению цитохрома. На рис. 1, а показана кинетика отмеченного процесса (кривая 3). Окисления цитохрома b_{561} не наблюдалось в присутствии как восстановленных препаратов КМБ, так и его окисленной

апо-формы. Реконструированный белок в окисленном состоянии вновь мог выступать в роли акцептора электронов цитохрома.

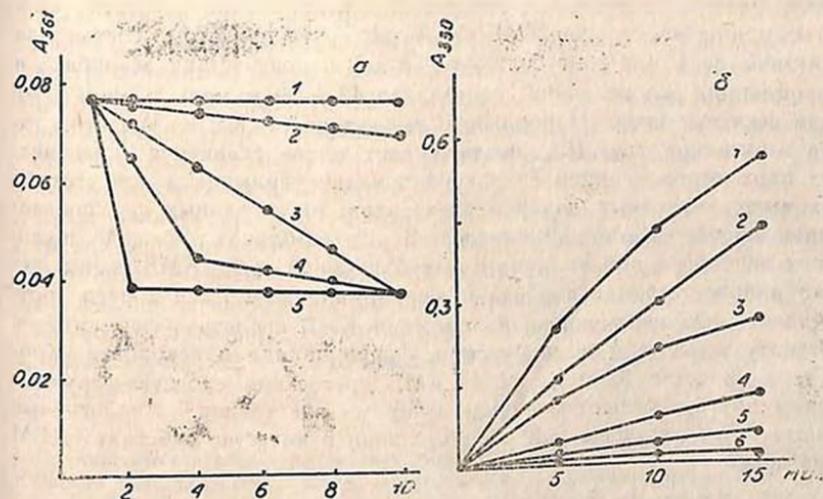


Рис. 1. Окисление восстановленной формы цитохрома b_{561} под действием окисленной формы КМБ в присутствии ФК (1), ФС (2), без липида (3), ФЭ (4) и ЛФЭ (5). Реакционная смесь содержит: $1,5 \times 10^{-6}$ М цитохром, 2×10^{-5} М КМБ и 10^{-3} М соответствующий липид. Регистрировали в 10 мМ К-На-фосфатном буфере, рН 7.0, в 1 см кювете (а); образование окситирамина при гидроксировании тирамина в присутствии ЛФХ (1), ФХ (2), без липида (3), ФЭ (4), ФС (5) и ФК (6). Реакционная смесь содержит: 5×10^{-8} М ДБМ, 10^{-6} М КМБ, 2×10^{-5} М тирамина и 5×10^{-5} М соответствующий липид в 10 мМ Na-ацетатном буфере, рН 6.0. Кинетику регистрировали в 0,5 см кювете (б)

Как было ранее отмечено, реакции, катализируемые ДБМ, протекают лишь в присутствии внешнего донора электронов (фермент представляет собой медьсодержащую гидроксилазу со смешанными функциями). Нами было обнаружено, что в присутствии восстановленных препаратов КМБ фермент оказался способным катализировать реакции гидроксирования соответствующих субстратов — тирамина и дофамина. В присутствии окисленных препаратов КМБ либо его восстановленных апо-форм образования продуктов реакции гидроксирования не наблюдалось. Реконструированные препараты КМБ вновь приобретали способность выступать в роли доноров электрона ДБМ. На рис. 2 представлена кинетика образования продуктов (а) и поглощения кислорода (б) в ходе реакции гидроксирования тирамина под действием ДБМ в присутствии КМБ, а также двух других наиболее эффективных *in vitro* доноров электронов фермента — ферроцианида и аскорбата [24]. Отметим, что хотя последний является общепризнанным физиологическим донором электронов растворимой ДБМ [3], и его концентрация в ХГ достаточно велика [25], установлено, что *in vivo* мембранная форма фермента не способна использовать этот

восстановитель в качестве донора электронов [26]. Как следует из представленных на рис. 2 данных, реакция, катализируемая ДБМ, наиболее интенсивно протекает при наличии в инкубационной среде в качестве донора электронов КМБ. У. А. фермента при этом составляла 56 мкмоль за 1 мин/1 мг белка, тогда как в присутствии аскорбата и феррицианида эта величина составляла 43 и 29 мкмоль /1 мин/ 1 мг белка соответственно. Наибольшую эффективность КМБ в качестве донора электронов для ДБМ подтверждает также сравнение кинетических параметров реакции гидрокселирования тирамина в присутствии трех вышеотмеченных доноров электронов, рассчитанных с использованием преобразований Лайнунвера-Берка (таблица). Так, V поглощения кислорода при наличии в инкубационной среде КМБ, выше, нежели в присутствии аскорбата и феррицианида, в 1,5 и 2 раза соответственно. Одновременно в присутствии КМБ сродство фермента к субстрату выше, чем в присутствии феррицианида и аскорбата. Кроме того, сродство ДБМ к самому КМБ превосходит сродство фермента к двум другим вышеотмеченным донорам электронов. Аналогичные данные были получены при использовании в качестве субстрата ДБМ дофамина.

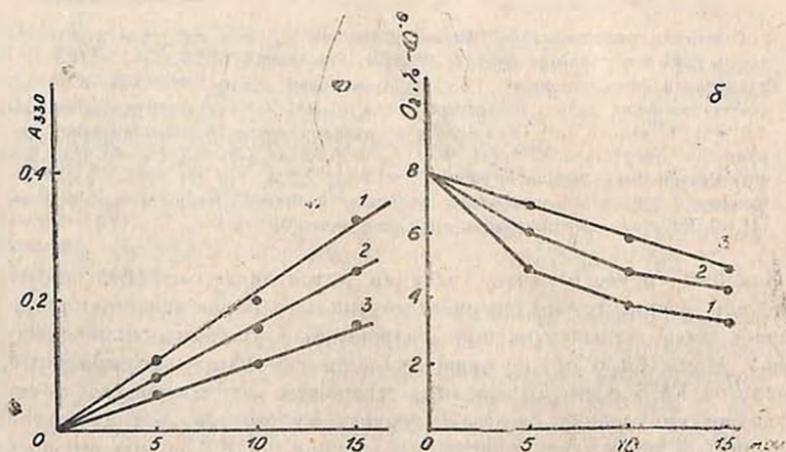


Рис. 2. Окисление восстановленной формы цитохрома b_{561} под действием окисленной формы КМБ (а) и спектры оптического поглощения восстановленной и окисленной форм цитохрома (б). Реакционная смесь содержит: 4×10^{-6} М цитохром и $2,4 \times 10^{-4}$ М КМБ. Кинетику регистрировали в 10 мМ К-Na-фосфатном буфере, рН 7,0, при комнатной температуре в 1 см кювете.

Таким образом, результаты по изучению донорно-акцепторных отношений цитохрома b_{561} , КМБ и ДБМ позволяют с достаточной степенью вероятности предполагать, что один из участков цепи переноса электронов мембран ХГ включает в себя отмеченную функциональную последовательность из этих трех компонентов. Ранее со стороны ряда авторов в экспериментах на фрагментах мембран и телях ХГ было

показано, что восстановление цитохрома b_{561} приводит в конечном итоге к стимуляции реакции гидроксирования, катализируемой ДБМ [27]. Однако ни в системах *in vivo*, ни *in vitro* не удалось показать наличие прямого переноса электронов от цитохрома b_{561} к ДБМ. Разность окислительно-восстановительных потенциалов цитохрома b_{561} и ДБМ (140 и 350 мВ) [6, 24] позволяет предполагать наличие между ними промежуточного звена. Как показали проведенные нами исследования, роль промежуточного звена, функционирующего на участке переноса электронов от цитохрома b_{561} к ДБМ, способен выполнять КМБ, являясь при этом фактически непосредственным донором электронов фермента. Поскольку, как было ранее отмечено, апо-форма фермента не оказалась способной ни принимать электроны от цитохрома b_{561} , ни передавать их ДБМ, мы пришли к выводу, что окислительно-восстановительные свойства КМБ обусловлены наличием в его молекуле атома меди (1 атом меди на молекулярную массу 10 кДа) [7].

Таблица

Кинетические параметры реакции гидроксирования тирамина в присутствии кислого медьсодержащего белка, аскорбата и ферроцианида, определенные при изучении зависимости начальной скорости поглощения O_2 от концентрации донора электронов (А) и субстрата (В).

Донор электронов	А		Б	
	K_m донора 10^{-4}	V поглощения O_2 10^{-5} М/мин	K_m тирамина 10^{-4} М	V поглощения O_2 10^{-5} М/мин
Кислый медьсодержащий белок	4,0	5,0	1,3	2,9
Аскорбат	5,0	3,3	2,1	2,0
Ферроцианид	6,3	2,2	3,7	1,5

В следующей серии наших экспериментов было изучено воздействие ряда фосфолипидов (лФХ, ФХ, лФЭ, ФЭ, моно- и дифосфатидилнозитов, ФК, ФС и СФМ) — аналогов мембранных липидов ХГ — на реакции переноса электронов между цитохромом b_{561} , КМБ и ДБМ. Эти исследования представляют, на наш взгляд, определенный интерес, поскольку все три вышеотмеченных белка входят в состав мембран ХГ и, соответственно, находятся в определенном липидном микроокружении.

Как показали проведенные эксперименты, нейтральные ФЛ активировали процесс переноса электронов, в то время как кислые ФЛ ингибировали его. Так, перенос электронов от цитохрома b_{561} к КМБ активировался в присутствии ФЭ и лФЭ, а от КМБ к ДБМ — в присутствии ФХ и лФХ. С другой стороны, ФК и ФС ингибировали процесс переноса электронов на обоих этапах. Остальные из используемых липидов не оказывали существенного воздействия на отмеченные реакции переноса электронов. На рис. 1, а показано воздействие ФЭ.

лФЭ, ФК и ФС на реакцию переноса электронов от цитохрома b_{561} к КМБ, а на рис. 1, б — воздействие ФХ, лФХ, ФЭ, ФС и ФК на реакцию гидроксидирования тирамина, катализируемую ДБМ, в присутствии КМБ в качестве донора электронов. Следует отметить, что аналогичные данные были ранее получены нами при использовании в качестве доноров электронов аскорбата и ферроцианида для двух субстратов ДБМ — тирамина и дофаминна [19]. Более высокая степень активации реакций переноса электронов в присутствии лизоформ ФЛ — лФЭ и лФХ, по сравнению с ФЭ и ФХ соответственно, (рис. 1) является, на наш взгляд, следствием того, что при одной и той же исходной концентрации липида в смеси, в случае мицеллярных везикул, образуемых лизо-формами липидов, количество молекул, способных к взаимодействию, больше, чем в случае бислойных липосом, образуемых ФЭ и ФХ. Нам удалось в определенной степени прояснить механизм ингибирующего действия кислых ФЛ на обоих этапах переноса электронов. При гель-фильтрации на колонке с сефарозой 6В смеси, содержащей ДБМ или КМБ и липосомы, сформированные из ФС и ФК, медь, входящая в состав активных центров этих белков, обнаруживалась во фракции липосом. С другой стороны, при наличии в инкубационной смеси экзогенной меди, ингибирующего воздействия ФК и ФС не обнаруживалось. Мы предполагаем, что медь связывается с отрицательно заряженными головками соответствующих кислых ФЛ. В этой связи становится понятной более высокая степень ингибирования реакций переноса электронов со стороны ФК по сравнению с ФС (рис. 1), так как суммарный отрицательный заряд первой больше, чем у последнего.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что некоторые ФЛ, входящие в состав мембран ХГ, способны модулировать реакции переноса электронов между цитохромом b_{561} , КМБ и ДБМ. Интересно отметить, что некоторые из отмеченных ФЛ-модуляторов тесно связаны с изучаемыми нами белками, составляя *in vivo* их непосредственное липидное микроокружение. Так, ФЭ является составным компонентом липидного микроокружения цитохрома b_{561} [14], а ФХ и ФС — ДБМ [28]. К сожалению, пока еще ничего не известно о липидном микроокружении КМБ.

Таким образом, сопоставляя приведенные факты с полученными нами данными, можно допустить возможность участия липидного микроокружения цитохрома b_{561} и ДБМ в реакциях переноса электронов, осуществляемых этими белками при наличии КМБ в качестве промежуточного звена. Выполняют ли фосфолипиды регуляторную роль, осуществление которой возможно как в случае их взаимопревращения (ФС ↔ ФЭ ↔ ФХ), так и взаимозамещения (латеральная диффузия или флип-флоп), или же липидное окружение отмеченных белков всегда постоянно и создает в комплексе ту среду, которая обеспечивает им наиболее эффективное функционирование — эти вопросы требуют своего дальнейшего решения.

THE PARTICIPATION OF THE PROTEIN AND LIPID COMPONENTS OF THE CHROMAFFIN GRANULE MEMBRANE IN THE REACTIONS CATALYZED BY DOPAMINE- β -MONOOXYGENASE

PETROSYAN S. H., BOYAJIAN A. S., KARAGEUZYAN K. G.

Institute of Molecular Biology, Natl. Acad. Sci., of Rep. Armenia, Yerevan

Donor-acceptor relationships between cytochrome b_{561} , dopamine- β -monooxygenase and acidic copper containing protein have been investigated. By the use of optical spectroscopy and polarography it was shown that acidic copper containing protein appears to be the electron donor in the hydroxylation reactions catalyzed by dopamine- β -monooxygenase as well as the electron acceptor for cytochrome b_{561} . It was also determined that the electron transfer reactions between the above mentioned proteins are modulated by some lipids—the analogs of the chromaffin granule membrane phospholipids. On the base of data obtained the possible participation of the chromaffin granule membrane phospholipids in the electron transfer between these proteins has been concluded.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Winkler H., Westhead H. *Neuroscience*, v. 51, p. 1803—1817, 1980.
2. Stewart L. C., Klinman J. P. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 57, p. 551—592, 1988.
3. Winkler H., Apps D. K., Fischer-Colbrie R. *Neuroscience*, v. 18, p. 261—290, 1986.
4. Zaremba S., Hoque-Angeletti R. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 219, p. 297—305, 1982.
5. Петросян С. А., Бояджян А. С., Карагеузян К. Г., Аликян С. А., Абрамов Р. Е. *Нейрохимия*, т. 11, № 1, с. 29—40, 1992.
6. Flatmark T., Terland O. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 253, p. 487—491, 1971.
7. Mikaelyan M. V., Grigoryan N. A., Na'bandyan R. M. *Abstracts 12th Int. Congr. Biochem.*, Australia, p. 326, 1982.
8. Ohashi M., and Omura T. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 4653—4658, 1978.
9. Georgiou M., Perkins L. M., Payne A. N. *Endocrinology*, v. 121, p. 1390—1399, 1987.
10. Бояджян А. С. *Биохимия*, т. 50, с. 84—89, 1985.
11. Осанесян Л. Л., Бояджян А. С., Петросян С. А., Карагеузян К. Г. *Докл. АН СССР*, т. 317, стр. 742—745, 1991.
12. Petrosyan S. A., Novanesyan L. L., Boyajian A. S., Karageuzyan K. G. *Abstracts of 8th General Meeting of European society for Neurochemistry*, GDR, Leipzig, p. 98, 1990.
13. Hoffman P. G., Zinder O., Eonner W. M., Pollard H. B. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 176, p. 375—383, 1976.
14. Петросян С. А., Бояджян А. С., Карагеузян К. Г. *Укр. биохим. журн.*, т. 63, с. 39—45, 1991.
15. Григорян Н. А. Новые металлсодержащие белки хромоаффинных гранул. Очистка и физико-химические свойства. Дис. канд. биол. наук.—134 с., Ереван, Институт биохимии, 1983.
16. Бояджян А. С., Налбандян Р. М., Бунятыан Г. Х. *Биохимия*, т. 46, с. 635—641, 1981.
17. Matsuba Y., Takahashi Y. *Anal. Biochem.*, v. 36, p. 182—191, 1970.

18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
19. Boyadzhyan A. S., Karageuzyan K. G. *Biomed. Science*, v. 1, p. 379—383, 1990
20. Левчук Ю. Н., Воловик Э. Н. *Биофизика*, т. 28, с. 266—269, 1983.
21. Мирволис Л. Б., Бергельсон Л. Д. *Липосомы и их взаимодействие с клетками*. М., Наука, 1986.
22. Klein R. A. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 210, p. 486—489, 1970.
23. Kuzuya H., Nagatsu T. *Enzymologia*, v. 38, p. 31—38, 1969.
24. Ljones T., Skotland T. *Inorg. Persp. Biol. Medic.*, v. 2, p. 151—180, 1979.
25. Terland O., Falmark T. *FEBS Lett.* v. 59, p. 52—56, 1975.
26. Grousselle M., Phillips J. H. *Biochem. J.*, v. 202, p. 759—770, 1982.
27. Wakefield L. M., Cass A. E. G., Radda G. K. *J. Biol. Chem.*, v. 261, № 21, p. 9739—9745, 1986.
28. Saxena A., Fleming P. J. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 4147—4152, 1983.

Поступила 28. IX, 1992