



УДК 577.158.8.04

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ  
ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНОВ  
НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P-450  
ИЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

*Кисель М. А., Усанов С. А., Метелица Д. И., Ахрем А. А.*

*Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

Изучено влияние модифицированных фосфатидилэтанолламинов на активность цитохрома P-450 в реакции гидроперекисного окисления анилина. Показано, что активность цитохрома P-450 увеличивается при добавлении липосом, в состав которых входят фосфатидилэтанолламины с кислотными свойствами. Строение полярной части молекулы фосфолипида мало сказывается на ферментативной активности. Обсуждена возможная роль кислых фосфолипидов в проявлении гидроксилирующей активности цитохрома P-450 в гидроперекисном окислении.

Недавно нами показано, что кислые фосфолипиды — фосфатидилсерин и фосфатидилинозит — активируют цитохром P-450, выделенный из микросом печени кролика, в реакциях гидроксилирования анилина и нафталина [1] и окислительного деметилирования диметиланилина гидроперекисью кумила [2]. Фосфатидилсерин и фосфатидилинозит оказывают существенное влияние на равновесие спиновых форм цитохрома P-450, что также отражается на катализируемых им реакциях [3]. В противоположность этому нейтральные фосфолипиды — фосфатидилхолин и сфингомиелин — не оказывают активирующего действия на цитохром P-450. На основании полученных данных нами высказано предположение, что для проявления каталитической активности цитохрома P-450 весьма существен его переход в определенную конформацию, которая реализуется при электростатических взаимодействиях полярных групп фосфолипидов с молекулой гемопротейна [1–3]. В пользу этого свидетельствует тот факт, что взаимодействие фосфолипидов с цитохромом P-450 переводит его в  $\alpha$ -спиральную форму [4].

С целью проверки нашего предположения о важности взаимодействия полярных групп фосфолипидов с цитохромом P-450 в настоящей работе проведено модифицирование природного фосфатидилэтанолламина (PtdEtn) введением в его аминогруппу электрофильных заместителей и изучено влияние полученных производных на активность цитохрома P-450 в реакции окисления анилина с помощью гидроперекиси кумила. Фосфатидилэтанолламин модифицировали посредством реакций с уксусным и янтарным ангидридами и динитрофторароматическими соединениями.

Использованы сокращения соответственно рекомендациям IUPAC, см. Eur. J. Biochem., 79, 1–9 (1977): PtdSer — фосфатидилсерин, PtdIns — фосфатидилинозит, PtdCho — фосфатидилхолин, PtdEtn — фосфатидилэтанолламин.

Таблица 1

## Хроматографические и спектральные характеристики модифицированных фосфатидилэтаноламинов

Соединение	Отношение к нингидрину	Хроматографическая подвижность, $R_{\text{PtdEtn}}$		$\nu_{\text{макс}}$ , $\text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм
		система А	система Б		
PtdEtn	+	1,0	1,0		
(I)	-	1,3	1,2	1560, 1650	-
(II)	-	0,6	1,3	1560, 1660	-
(III)	-	1,7	1,6	-	351
(IV)	+	1,4	1,5	-	330, 415

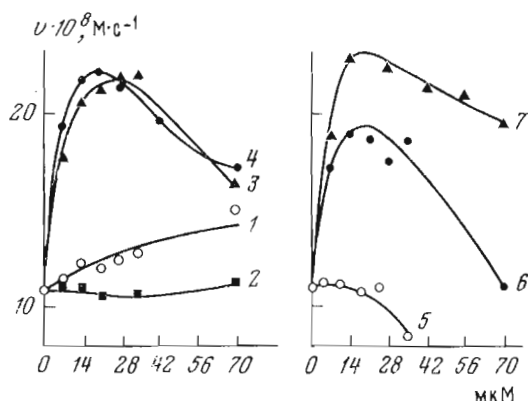
Таблица 2

Влияние модифицированных фосфатидилэтаноламинов на кинетические параметры гидроксирования анилина гидроперекисью кумила при участии цитохрома P-450 ( $3,5 \cdot 10^{-7}$  М)

Система	Суммарная концентрация фосфолипидов, мкМ*	Температура, °С	$v \cdot 10^3$ , М·с <sup>-1</sup> **	$K_m \cdot 10^3$ , М**
Без фосфолипидов		19	8,0	5,0±
		23	9,7	5,0
		27	15,4	4,5
		31	23,3	5,0
PtdCho	17,5	19	8,9	6,3
		22,5	13,2	6,3
		27	20,8	6,3
		31	27,8	6,3
PtdCho + PtdEtn	35	20	10,8	8,0
		26	15,2	5,0
		32	19,2	3,0
PtdCho + PtdEtn	35	19	26,7	5,9
		23	33,9	5,1
		27	41,7	4,4
		31	51,3	3,1
PtdCho + (I)	35	19	19,1	3,3
		23	23,8	3,3
		27	34,5	3,3
		31	43,5	3,3
PtdCho + (II)	35	19	16,7	2,5
		23	22,2	2,5
		27	28,6	2,5
		31	38,5	2,5
PtdCho + (III)	35	19	14,6	2,6
		23	20,0	2,6
		27	27,8	2,6
		31	37,0	2,6
PtdCho + (IV)	35	22	10,4	4,5
		27	18,9	5,0
		32	35,7	8,3
PtdIns	17,5	19	16,6	4,1
		22,5	22,2	3,2
		27	28,6	2,5
		31	35,7	1,7

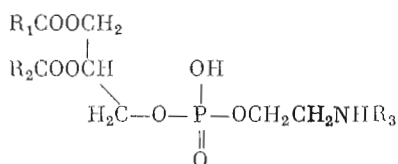
\* Отношение PtdCho — липид, 1 : 1.

\*\* Значения максимальных скоростей реакции определены с точностью  $(\pm 1,0) \cdot 10^{-8}$  М·с<sup>-1</sup>, а значения  $K_m$  — с точностью  $(K_m \pm 1,0) \cdot 10^{-3}$ , М.



Зависимость скорости гидроксилирования анилина гидроперекисью кумила в присутствии цитохрома Р-450 от концентрации фосфолипидов: 1 — PtdCho, 2 — PtdCho+(IV), 3 — PtdCho+(I), 4 — PtdCho+(II), 5 — PtdCho+PtdEtn, 6 — PtdCho+(III), 7 — PtdCho+PtdIns. Липиды в смеси находятся в эквимольном соотношении, температура реакции 32° С.

В результате получено 4 соединения (I) — (IV), различающиеся структурой фосфолипидной полярной группировки.



где R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> — алкилы

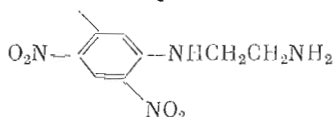
R<sub>3</sub>=H

Ac

OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH

— —NO<sub>2</sub>

NO<sub>2</sub>



PtdEtn

(I)

(II)

(III)

(IV)

Проведенная модификация понижает основность азота и придает фосфолипиду кислотные свойства [5]. Полученные соединения охарактеризованы по их хроматографической подвижности в нейтральной системе растворителей и в системе, содержащей аммиак. Производные (I) — (III) дают отрицательную реакцию с нингидрином, что подтверждает отсутствие в этих соединениях первичной аминогруппы. Производное (IV) окрашивается нингидрином. В ИК-спектрах соединений (I) и (II) наблюдаются характерные для амидов кислот полосы 1560 и 1660 см<sup>-1</sup>, отсутствующие в исходном фосфатидилэтаноламине. Полученные данные (табл. 1) подтверждают строение модифицированных фосфатидилэтаноламинов.

Сам фосфатидилэтаноламин и некоторые его модифицированные производные не образуют липосом. Поэтому в реакции окисления анилина гидроперекисью кумила нами использованы смеси фосфатидилэтанолamina или его производных с фосфатидилхолином (при соотношении 1:1). Из рисунка следует, что сам фосфатидилхолин или его смесь с фосфатидилэтанолamiном мало влияют на каталитическую активность цитохрома Р-450, причем если фосфатидилхолин при высоких концентрациях несколько повышает скорость реакции, то повышение содержания в инкубационной среде смеси фосфатидилхолин — фосфатидилэтанолamin снижает скорость окисления анилина (кривая 5). Мало влияет на скорость реакции добавление в среду смеси фосфатидилхолина с производным (IV) (кривая 2), однако введение других модифицированных фосфатидилэтанолamin

ноламинов активизирует процесс (кривые 3, 4, 6). Оптимальным является соотношение цитохром Р-450 — фосфолипиды 1 : 50.

Влияние производных фосфатидилэтаноламина в смеси с фосфатидилхолином, а также действие индивидуальных фосфатидилхолина и фосфатидилинозита на реакцию окисления анилина дополнительно изучали в интервале температур 19—31° С. Получены зависимости скорости реакции окисления анилина от его начальных концентраций в присутствии или в отсутствие фосфолипидов. Эти зависимости при всех температурах описываются уравнением Михаэлиса — Ментен. С помощью трансформации этого уравнения по методу Лайнуивера — Берка вычислены значения максимальных скоростей реакции и констант Михаэлиса (табл. 2).

Из табл. 2 следует, что при всех температурах фосфатидилинозит или смесь фосфатидилхолина с модифицированными фосфатидилэтаноламинами (I) — (III) вызывают увеличение скорости окисления анилина. Полученные результаты подтверждают высказанное нами предположение [1, 2] о том, что для эффективного проявления каталитических свойств цитохрома Р-450 необходимо присутствие липидов с отрицательно заряженными группировками. Такие липиды, взаимодействуя с положительно заряженными группами, находящимися вблизи активного центра фермента, стабилизируют оптимальную конформацию цитохрома Р-450. Напротив, фосфатидилхолин или его смесь с производным (IV) не оказывают существенных воздействий на реакцию окисления анилина. Отсутствие заметного активирующего действия в случае смеси фосфатидилхолина с производным (IV) (см. рисунок) свидетельствует о том, что химическая структура, а также размер полярной части липидной молекулы не оказывают влияния на каталитическую активность цитохрома Р-450 в условиях наших опытов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: силикагель для ТСХ (Woelm, ФРГ), цетилтриметиламмонийбромид, 2,4-динитрофторбензол и 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (Serva, ФРГ). Уксусный ангидрид и растворители перед применением перегоняли, янтарный ангидрид перекристаллизовывали.

Цитохром Р-450 выделяли из микросом печени кролика, индуцированных фенобарбиталом по методу [6]. Содержание цитохрома (форма LM<sub>2</sub>) — 18,9 нмоль/мг белка. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин выделяли из липидного экстракта печени свиньи, используя хроматографию на окиси алюминия и силикагеле [7]. Фосфатидилинозит выделяли из пекарских дрожжей [8]. Фосфолипиды были индивидуальными согласно ТСХ на силикагеле в системах: хлороформ — метанол — 28%-ный аммиак, 13 : 5 : 1 (система А) и хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (система Б). Липосомы получали следующим образом. Из аликвоты раствора фосфолипида в хлороформе упаривали растворитель, к сухому остатку приливали 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7,5) и встряхивали. Полученную таким образом дисперсию обрабатывали ультразвуком на приборе УЗДН-1. Содержание цитохрома Р-450 определяли по методу Омуре и Саго [9], концентрацию белка — по методу Лоури [10], содержание липидного фосфора — по методу [11].

*N*-Ацетилфосфатидилэтаноламин получали по модифицированному методу [12]. К 0,07 ммоль фосфатидилэтаноламина в 10 мл 0,12 М карбонатного буфера, содержащего 1% цетилтриметиламмонийбромида, рН 8,5, добавляли 50-кратный избыток уксусного ангидрида и инкубировали при перемешивании 15 мин при 20° С, затем снова добавили 50-кратный избыток ангидрида и смесь инкубировали 30 мин. В ходе реакции добавляли 1 М раствор карбоната натрия. Липиды экстрагировали смесью хлороформ — метанол в соотношении 2 : 1 по объему, экстракт дважды промы-

вали водой. Затем растворитель упаривали, липиды растворяли в 0,2 мл хлороформа и наносили на пластинку с закрепленным слоем силикагеля. Хроматограмму проявляли в системе А. Край проявленной пластинки обрызгивали реагентом на фосфолипиды [13]. Зону, соответствующую наиболее окрашенной полосе, вырезали и элюировали 20 мл смеси хлороформ — метанол — вода, 1 : 2 : 0,8. От силикагеля избавлялись центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин) и к супернатанту приливали 6 мл хлороформа. Верхний водно-метанольный слой отбрасывали, нижний упаривали и производное (I) растворяли в хлороформе, содержащем 10% метанола. Чистоту продукта проверяли ТСХ на силикагеле.

*N*-(3-Карбоксипропионил)фосфатидилэтанолламин (II) получали по реакции фосфатидилэтанолламина с янтарным ангидридом аналогично методу, описанному выше, за исключением того, что янтарный ангидрид добавляли в виде раствора в диметилсульфоксиде и элюцию производного (II) с силикагеля проводили системой растворителей хлороформ — метанол — 0,2 н. HCl, 1 : 2 : 0,8 (по объему). После центрифугирования к супернатанту добавляли 6 мл хлороформа. Верхний слой отбрасывали, а нижний дважды промывали водой.

*N*-(2,4-Динитрофенил)фосфатидилэтанолламин (III). Смесь 50 мг (0,07 ммоль) фосфатидилэтанолламина с фосфатидилхолином в соотношении 1 : 1 диспергировали в 5 мл 0,12 М карбонатного буфера (рН 8,5) и полученную дисперсию обрабатывали ультразвуком. К озвученной дисперсии добавили 37 мг (0,2 ммоль) 2,4-динитрофторбензола в 0,2 мл ацетона. Смесь инкубировали при 20° С в течение 30 мин. Затем вносили в колонку (1,5×20 см), наполненную сефадексом G-50, и элюировали водой. Элюат экстрагировали смесью хлороформа с метанолом в соотношении 2 : 1. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 0,2 мл хлороформа, наносили на препаративную пластинку с закрепленным слоем силикагеля и проявляли в системе А. Желтую зону элюировали 20 мл системы хлороформ — метанол — вода, 1 : 2 : 0,8. Дальнейшие процедуры проводили так, как описано выше.

*N*-[2,4-динитро - 5 - (2 - аминоэтил)аминофенил]фосфатидилэтанолламин (IV). 65 мг (0,08 ммоль) фосфатидилэтанолламина диспергировали в 10 мл 0,12 М карбонатного буфера (рН 8,5), содержащего 1% цетилтриметиламмонийбромида. К этой смеси добавляли 20 мг (0,2 ммоль) 1,5-дифтор-2,4-динитробензола в 0,2 мл ацетона. Смесь инкубировали 30 мин при 20° С, затем приливали 0,5 мл 50% этилендиамина в воде. Через 1 ч реакцию смесь обрабатывали смесью хлороформ — метанол, 2 : 1, и хлороформный слой дважды промывали водой. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 0,2 мл хлороформа, наносили на пластинку с закрепленным слоем силикагеля и проявляли в системе Б.

Реакцию гидроксимирования анилина осуществляли при 32° С в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 7,5. Инкубационная смесь общим объемом 2 мл содержала  $3,5 \cdot 10^{-7}$  М цитохром P-450,  $7,5 \cdot 10^{-3}$  М анилин,  $8,0 \cdot 10^{-4}$  М гидроперекись кумила и различные концентрации фосфолипидов. Реакцию начинали добавлением гидроперекиси кумила, вели ее 3 мин и останавливали добавлением 0,5 мл 30% трихлоруксусной кислоты. Белок отделяли центрифугированием и в супернатанте определяли содержание *n*-аминофенола по методу [14]. Реакцию окисления анилина характеризовали начальными скоростями образования *n*-аминофенола.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Metelitz D. I., Akhrem A. A., Erjomin A. N., Kissel M. A., Usanov S. A. (1979) Acta biol. med. Germ., 38, 511–518.
2. Ахрем А. А., Кисель М. А., Усанов С. А., Метелица Д. И. (1979) Докл. АН БССР, 23, 282–285.
3. Ахрем А. А., Киселев П. А., Кисель М. А., Усанов С. А., Метелица Д. И. (1979) Докл. АН СССР, 245, 234–238.

4. Coon M. J., Chiang Y. L., Vatsis K. P., White R. E. (1978) 12th FEBS Meeting, Dresden, July 2-8, Abstracts, p. 2552.
5. Papahadjopoulos D., Weiss L. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **183**, 417-426.
6. Ахрем А. А., Усанов С. А., Еремин А. Н., Метелица Д. И. (1978) Докл. АН БССР, **22**, 839-842.
7. Dawson R. M. C. (1963) *Biochem. J.*, **88**, 414-423.
8. Treveljan W. E. (1966) *J. Lipid Res.*, **7**, 445-450.
9. Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
11. Gerlach E., Deuticke B. (1963) *Biochem. Z.*, **337**, 477-481.
12. Carraway K. L., Huggins J. W. (1972) *Chem. Phys. Lipids*, **8**, 56-64.
13. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. (1968) *J. Lipid Res.*, **9**, 396.
14. Fujita T., Mannering G. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 8150-8156.

Поступила в редакцию  
20.III.1979

### EFFECT OF MODIFIED PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES ON CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P-450 FROM RABBIT LIVER MICROSOMES

KISSEL M. A., USANOV S. A., METELITZA D. I., AKHREM A. A.

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

The effect of modified phosphatidylethanolamines on the cytochrome P-450 activity in the reaction of hydroperoxide oxidation of aniline has been examined. It was shown that the activity of cytochrome P-450 increases when the liposomes containing acidic phosphatidylethanolamines are added. The structure of the polar moiety of a phospholipid molecule shows no marked effect on the enzymatic activity. Possible implication of acidic phospholipids in hydroxylating activity of cytochrome P-450 in hydroperoxide oxidation was discussed.

---