



УДК 577.115:579.84:543.429.23

СТРУКТУРА НЕОБЫЧНОГО ЛИПИДА А ИЗ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *Marinomonas communis* ATCC 27118^T

© 2005 г. Е. В. Воробьева^{*,#}, А. С. Дмитренко^{**}, П. С. Дмитренко^{*},
В. В. Исаков^{*}, И. Н. Красикова^{*}, Т. Ф. Соловьева^{*}

^{*}Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159;

^{**}Сантори институт биоорганических исследований, Осака, Япония

Поступила в редакцию 01.11.2004 г. Принята к печати 24.12.2004 г.

Липид А получен с выходом 27% при гидролизе 1%-ной уксусной кислотой липополисахарида из морской гамма-протеобактерии *Marinomonas communis* ATCC 27118^T. С использованием химических методов анализа, одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии с бомбардировкой ускоренными атомами (FAB) показано, что он представляет собой 1-фосфат β-1',6-связанного дисахарида D-глюкозамина, ацилированного остатками (R)-3-додеканойл-оксидедекановой (или (R)-3-деканойл-оксидедекановой), (R)-3-[(R)-3-гидрокси-деканойл]оксидедекановой и (R)-3-гидрокси-декановой кислот в положениях 2, 2' и 3 соответственно. Необычные структурные особенности (низкая степень ацилирования и фосфорилирования) липида А из бактерий *M. communis*, в сравнении с липидом А из наземных бактерий, предполагают, что он может иметь интересные с фармакологической точки зрения биологические свойства. В связи с этим обсуждается потенциальное физиологическое значение липида А из *M. communis* и соединений подобной структуры.

Ключевые слова: морские протеобактерии, *Marinomonas communis*, ЛПС, липид А, ЯМР-спектроскопия, FAB-масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Жизнь в морской среде обитания характеризуется низкой температурой, высокой концентрацией солей и высоким гидростатическим давлением. Одним из главных факторов, позволяющим морским бактериям выживать в экстремальных условиях, является стабильность их клеточных мембран, которая во многом обеспечивается за счет модификации липидного состава клеток при изменении условий существования. Модификации в составе мембранных липидов микроорганизмов под действием температуры или давления наиболее ярко проявляются на уровне жирных кислот [1, 2], однако изменения в составе полярных липидов также наблюдаются [3].

Особое место среди липидных компонентов грамотрицательных бактерий принадлежит липополисахариду (ЛПС) и липиду А (ЛА) как гидрофобному участку его молекулы. ЛПС находится на внешней поверхности наружной мембраны бактериальной клетки [4] и служит барьером для транспорта гидрофобных веществ через мембрану [5]. ЛА осуществляет функцию липидного яко-

ря, удерживая ЛПС в наружной мембране, и играет важную роль в жизни бактерий. С одной стороны, он является составной частью клеточной стенки грамотрицательных бактерий и необходим для поддержания нормальной физиологии и роста микроорганизмов [6]. С другой стороны, ЛА представляет собой эндотоксический центр ЛПС и отвечает за многие патологические свойства, проявляемые этими молекулами, такие, например, как эндотоксический шок, часто сопровождающийся летальным исходом [7, 8]. Поэтому в настоящее время проводится интенсивный поиск потенциальных антагонистов эндотоксина на его основе [9].

В ходе исследования большого количества образцов ЛА из различных источников было обнаружено, что их структурные особенности во многом зависят от видовой принадлежности бактерий [10]. Наиболее распространенным структурным вариантом ЛА является молекула, построенная на основе β-1',6-связанного дисахарида глюкозамина (GlcN). Дисахарид несет α-гликозидную (положение 1) и негликозидную (положение 4') фосфатные группы и остатки (R)-3-гидрокси-тетрадекановой кислоты в положениях 2, 3, 2', 3'. Гидроксигруппы одного, двух или трех остатков (R)-3-гидрокси-кислот этерифицированы нормальными (не содержащими гидроксильной группы) жирными кисло-

Сокращения: ЛА – липид А; ЛПС – липополисахарид; ЖК – жирная кислота; FAB-МС – масс-спектрометрия бомбардировкой ускоренными атомами.

[#]Автор для переписки (тел.: (4232) 31-07-19; факс: (4232) 314050; эл. почта: tikhonovaev@mail.ru).

тами (ЖК). По количеству остатков ЖК в молекуле ЛА различают пента-, гекса- и гептаацильный структурные типы.

Все эндотоксически активные молекулы ЛА имеют гексаацильный тип структуры и два остатка фосфорной кислоты [11]. С другой стороны, согласно данным, доступным к настоящему времени, структурные варианты ЛА, проявляющие высокий антагонизм по отношению к эндотоксинам, имеют дисахаридную основу, одну или две фосфатные группы и низкую степень ацилирования [12]. Известно, что тип ацилирования ЛА, играющий важную роль в связывании бактерий с клетками организма хозяина и последующей активации последних [8], в большой степени зависит от условий роста микроорганизма [13, 14].

До недавнего времени исследования ЛА были практически полностью посвящены препаратам, выделенным из наземных микроорганизмов [10]. В сообщениях о ЛА из морских бактерий их характеристика ограничивалась идентификацией присутствующих в них ЖК [15]. Мы предполагаем, что, в силу особенностей своего существования, морские бактерии могут синтезировать ЛА необычного строения. Действительно, было показано, что ЛА, выделенные из большой группы морских микроорганизмов, имеют ряд особенностей, которые отличают их от ЛА из наземных бактерий. С одной стороны, они более гомогенны, с другой, высоко гетерогенны по составу жирных кислот, имеют низкую степень ацилирования и фосфорилирования, слабо выраженную токсичность [16–19]. Эти обстоятельства делают перспективными более детальные исследования ЛА морских бактерий.

Настоящая работа посвящена структурному изучению ЛА морской γ -протеобактерии *Marinomonas communis* ATCC 27118^T, типового штамма рода *Marinomonas* [20, 21], и является продолжением серии исследований, направленных на поиск потенциальных антагонистов эндотоксинов среды ЛА из морских бактерий. *M. communis* представляет собой аэробную, палочкообразную, полярно-жгутиковую бактерию, обладающую психрофильными и умеренно галофильными свойствами. Это облигатно морской микроорганизм, обитающий в прибрежных водах и открытом океане и нуждающийся в присутствии морской воды в среде роста [22]. Он широко распространен в микробных сообществах с морскими растениями и животными и практически отсутствует в наземной среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракция обезжиренных клеток *M. communis* ATCC 27118^T горячим водным фенолом [23] привела к выделению ЛПС, из которого после ги-

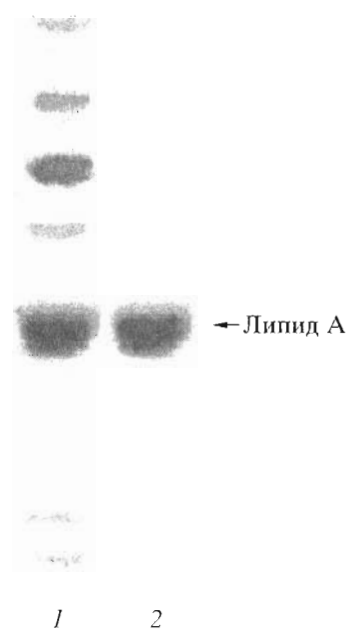


Рис. 1. ТСХ липида А из *M. communis* ATCC 27118^T. 1 – липид А исходный; 2 – липид А после гель-хроматографии на колонке с сефадексом LH-20.

дролита 1% водной АсОН с высоким выходом (27.7% от веса сухого ЛПС) был получен ЛА. После гель-фильтрации на колонке с сефадексом LH-20 в очищенной фракции ЛА (рис. 1, образец 2) были идентифицированы *D*-GlcN, фосфор и ЖК. В целом, на два остатка GlcN приходились одна фосфатная группа и пять остатков ЖК (табл. 1).

Данные спектроскопии ЯМР подтверждают дисахаридную структуру ЛА из *M. communis*: в ¹H-ЯМР-спектре присутствуют два сигнала аномерных протонов Н1 и Н1'. Величины их химических

Таблица 1. Химический состав липида А из *M. communis* ATCC 27118^T

Компонент	Содержание	
	мкмоль/мг	мкмоль/2 мкмоль GlcN
Кислота 10 : 0	0.1490	0.40
Кислота 12 : 0	0.2197	0.59
Кислота 3-ОН-10 : 0	1.1290	3.03
Кислота <i>E</i> -10 : 1	0.2910	0.78
ΣЖК 3-ОН-10 : 0*	1.4199	3.81
ΣЖК	1.7886	4.80
P	0.3746	1.01
GlcN	0.7452	2.00

* ΣЖК 3-ОН-10 : 0 = сумма ЖК 3-ОН-10 : 0 + кислота *E*-10 : 1 (продукт дегидратации кислоты 3-ОН-10 : 0 в условиях кислотного гидролиза).

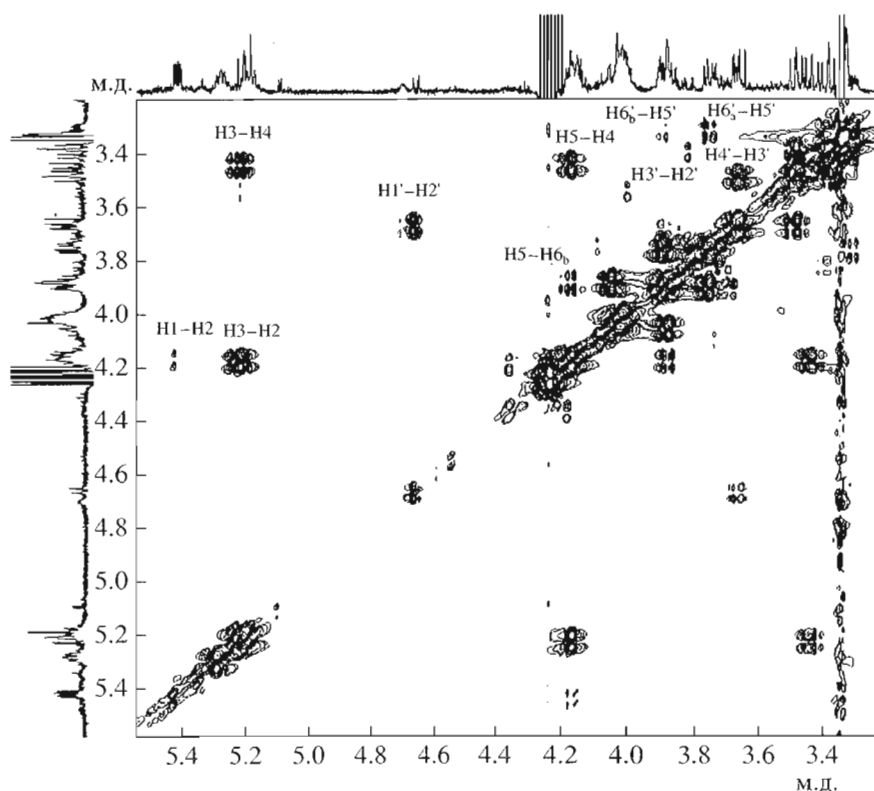


Рис. 2. ^1H - ^1H -COSY-спектр липида А из *M. communis* ATCC 27118 T .

сдвигов (5.42 и 4.65 м.д. соответственно; рис. 2, табл. 2) свидетельствуют о том, что восстанавливающий и невосстанавливающий концы глюкозаминобиозы находятся в α - и β -пиранозидных формах. С использованием ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и 2D-HSQC-методики было определено положение сигналов аномерных атомов C1 и C1' (94.5 и 102.5 м.д. соответственно), которое подтвердило α - и β -ориентацию остатков GlcNI и GlcNII.

Сигналы H2 и H2', которые в COSY-спектре перекрестно реагировали с протонами H1 и H1' (рис. 2), находились в области резонанса (4.16 и 3.66 м.д. соответственно, табл. 2), характерной для остатков GlcN с ацильным замещением аминогруппы. Величины химических сдвигов сигналов атомов C2 и C2', которые в сравнении с атомами незамещенного GlcN резонировали в более сильном (52.6 м.д.) и более слабом (56.6 м.д.) полях (рис. 3, табл. 2), подтверждают наличие связей углерод-азот в ациламиногруппах при этих углеродных атомах. Анализ этой области спектра позволяет также сделать заключение о присутствии ацильных заместителей при C3-атомах глюкозаминобиозы. Хорошо известно, что положение сигнала C2-атома GlcN зависит от присутствия заместителя при C3-атоме: ацилирование гидроксильной группы в этом положении сдвигает сигнал C2-атома в сильное поле [24]. Учитывая эту закономерность, мы пришли к выводу,

что восстанавливающий конец ЛА из *M. communis* имеет заместитель при C3-атоме, в то время как гидроксильная группа при C3'-атоме GlcNII не замещена. Аналогичный вывод был сделан при анализе ^1H - ^1H -COSY-спектра в области резонанса протонов H3 и H3' (рис. 2). Сигнал H3 находится в слабом поле (5.20 м.д.), что указывает на присутствие ацильного заместителя при C3-атоме, в то время как сигнал H3' с δ 3.48 м.д. находится в области резонанса протонов незамещенного углеводного кольца (3.5–4.5 м.д. [25]).

Сигналы метиновых протонов H4, H3' и H4', а также двух метиленовых протонов H6' находятся в области 3–4 м.д. (рис. 2, 3, табл. 2), что свидетельствует об отсутствии заместителей при атомах C4, C3', C4' и C6'. С другой стороны, протоны H6_a и H6_b коррелируют с C6'-атомом, сигнал которого находится при 68.6 м.д., что указывает на 1' \rightarrow 6-гликозидную связь между остатками глюкозамина. Дополнительные подтверждения 1' \rightarrow 6-связи в ЛА из *M. communis* были получены с помощью экспериментов NOESY и HMBC (данные не приводятся): в NOESY-спектре присутствовали кросс-пики аномерного протона H1 с протонами H6_a и H6_b, в двумерном спектре наблюдалась корреляция между атомами C1' и H6_a и H6_b.

Согласно данным общего химического анализа, ЛА из *M. communis* содержит одну фосфатную группу. В соответствии с этим в спектре ^{31}P -ЯМР

ЛА из *M. communis* наблюдался один сигнал, величина химического сдвига которого (0.36 м.д., табл. 2) предполагает, что фосфатная группа находится при С1-атоме. Расщепление сигнала Н1 ($J_{\text{H1, P}}$ 7.0 Гц), сдвиг сигнала С1 в слабое поле, а также дублетные сигналы атомов С1 и С2 ($J_{\text{C1, P}}$ 3.4 и $J_{\text{C2, P}}$ 7.0 Гц) хорошо согласуются с таким предположением. Таким образом, на основании полученных данных можно говорить, что углеводный скелет ЛА из *M. communis* представляет собой дисахарид D-GlcN с β -1',6-связью, имеющий фосфатную группу при С1-атоме и свободные гидроксильные группы в положениях 4, 3', 4' и 6'.

Анализ жирных кислот ЛА из *M. communis* показал наличие декановой (10 : 0), додекановой (12 : 0) и четырех остатков (R)-3-гидроксидекановой (3-ОН-10 : 0) кислот. В соответствии с этим, в HSQC-спектре присутствовали три (один – двойной интенсивности) α -CH₂-мультиплета при 42.5, 43.1 и 41.7 м.д. (рис. 3, табл. 2) в виде индивидуальных кросс-пиков. Используя двумерную COSY-спектроскопию, мы определили тип замещения 3-гидроксидекановых кислот в изучаемом ЛА. Согласно данным Рибейро [25], сигналы β -СН-протонов незамещенных 3-гидроксиалкановых кислот находятся в области резонанса сахарных протонов (~4 м.д.), тогда как сигналы β -СН-протонов ацилоксиалкановых кислот сдвигаются в слабое поле (~ до 5.20 м.д.). Спектр ЛА из *M. communis* содержит один сигнал двойной интенсивности β -СН-протонов (4.05 м.д.) от двух остатков незамещенной 3-гидроксидекановой кислоты, который образует COSY-кросс-пики с мультиплетами α -СН₂ при 2.46 м.д. и сигналами γ -СН₂ при 1.51 м.д. Сигналы при 5.19 и 5.28 м.д., перекрестно взаимодействующие с мультиплетами α -СН₂ (2.50 и 2.62 м.д.) и сигналами γ -СН₂ (1.60 и 1.57 м.д.), принадлежат протонам β -СН от двух остатков 3-ацилоксидекановой кислоты. Протоны β -2- и β -2'-СН ацилоксиалкановых кислот коррелируют с С-атомами, резонирующими при 71.8 и 72.4 м.д., в то время как протоны β -3'- и β -2'-СН остатков незамещенных 3-гидроксидекановых кислот коррелируют с С-атомом, имеющим величину химического сдвига 69 м.д., что хорошо согласуется с присутствием в ЛА из *M. communis* двух ацилокси- и двух гидроксиалкановых кислот. Отсутствие сигналов при 44 и 39 м.д., характерных для С2-атомов амидносвязанных 3-гидроксиалкановых кислот и ацилоксиалкановых кислот со сложноэфирным типом связи соответственно [26], свидетельствует, во-первых, о том, что изучаемый ЛА не содержит N-связанных 3-гидрокси- и O-связанных ацилоксиалкановых кислот, и, во-вторых, о том, что обе ацилоксиалкановые кислоты имеют амидный тип связи.

Чтобы определить, как остатки ЖК распределяются на молекуле ЛА, была использована двумерная НМВС-спектроскопия (данные не приво-

Таблица 2. Данные спектров ¹H-, ¹³C- и ³¹P-ЯМР липида А из *M. communis* АТСС 27118^T

Положение на	δ C	δ H	J, Гц	δ P
GlcNI				
1	94.5	5.42 дд	3.3; 7.0	-0.36
2	52.6	4.16 м		
3	74.8	5.20 дд	9.2; 10.7	
4	69.8	3.43 т	10.4; 9.2	
5	73.8	4.16 м		
6 _a	69.4	3.88 дд	6.7; 11.9	
6 _b		4.05 м		
GlcNII				
1'	102.5	4.65 д	8.5	
2'	56.6	3.66 дд	8.5; 10.4	
3'	75.4	3.48 дд	8.6; 10.4	
4'	71.5	3.38 дд	8.6; 10.0	
5'	77.0	3.31 ддд	10.0; 4.9; 2.4	
6' _a	69.5	3.75 дд	6.7; 11.9	
6' _b		3.88 дд	2.4; 11.8	
ЖК-2				
CONH	172.2			
2 (α -2)	42.5	2.50 м		
3 (β -2)	71.8	5.19 м		
4 (γ -2)	34.9	1.60 м		
5 (δ -2)	26.1	1.29 м		
ЖК-R				
COO	174.6			
2 (α' -2)	35.0	2.30 м		
3 (β' -2)	25.8	1.62 м		
4 (γ' -2)	30.0	1.38 м		
ЖК-3				
COO	173.1			
2 (α -3)	43.1	2.46 м		
3 (β -3)	69.5	4.05 м		
4 (γ -3)	37.9	1.51 м		
ЖК-2'				
CONH	173.3			
2'-(α -2)	41.7	2.62 м		
3'-(β -2)	72.4	5.28 м		
4'-(γ -2)	34.9	1.57 м		
5'-(δ -2)	27.9	1.29 м		
ЖК-R ₁				
COO	173.1			
2'-(α' -2)	43.1	2.46 м		
3'-(β' -2)	69.5	4.05 м		
4'-(γ' -2)	37.9	1.51 м		
Ω	14.2	0.89 т	6.5	
ω -1	23.4	1.33 м		
ω -2	32.5	1.29 м		
(CH ₂) _n	29.8–29.9	1.30 м		

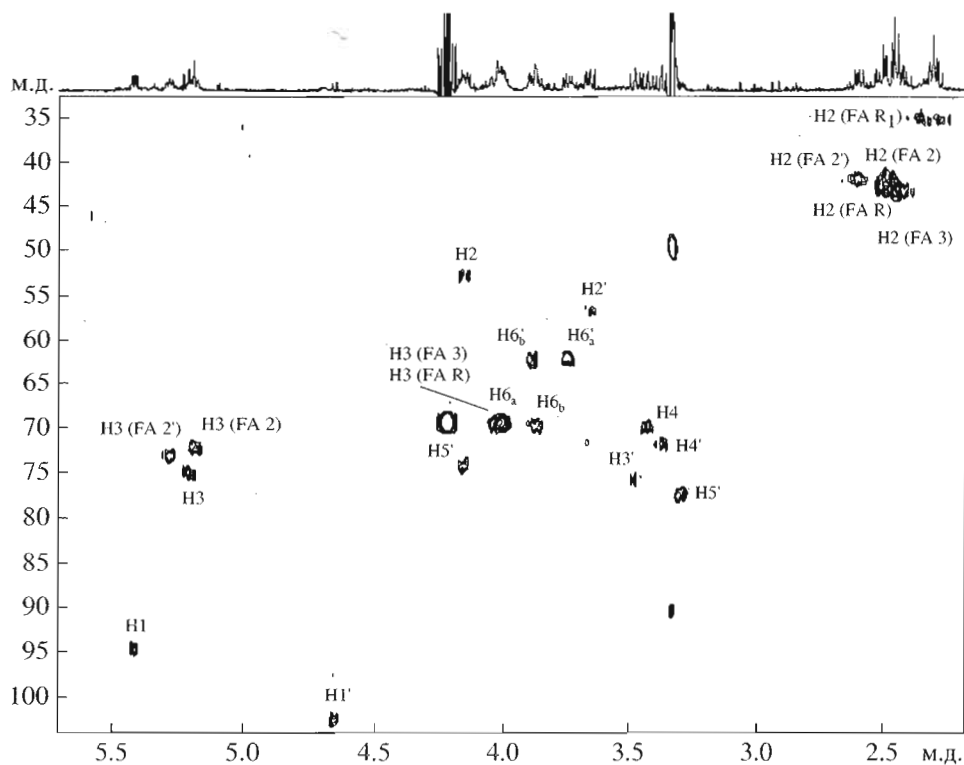


Рис. 3. ^1H - ^{13}C -HSQC-спектр липида А из *M. communis* ATCC 27118^T.

дятся). Кросс-пик между протоном H2 глюкозамина и сигналом C1 (при 172.2 м.д.) одной из кислот 3-ОН-10 : 0 указывает на присутствие гидроксикислоты (ЖК-2, табл. 2) в положении C2 глюкозаминобиозы. Кросс-пики между β -СН-протоном ЖК-2 и C1-атомом ЖК-2, с одной стороны, и β -СН-протоном ЖК-2 и C1-атомом при 174.6 м.д., с другой, подтверждают замещение гидроксильной группы ЖК-2 остатком другой ЖК (ЖК-R). Место присоединения второй ацилоксиалкановой кислоты (ЖК-R₁) этим методом определить не удалось, так как химические сдвиги C1-атомов трех остатков ЖК были очень близки (173.2, 173.1 и 173.1 м.д. для ЖК-3, ЖК-2' и ЖК-R₁ соответственно, табл. 2).

Более точно распределение остатков жирных кислот на молекуле ЛА из *M. communis* было определено с помощью масс-спектрометрии с бомбардировкой ускоренными атомами (ФАВ-МС). В ФАВ-МС-спектре отрицательных ионов (рис. 4а) присутствовали два максимальных по массовому числу пика равной интенсивности с m/z 1281.90 и 1253.90, указывающие на присутствие двух молекулярных форм в изучаемом ЛА. С учетом данных общего химического анализа (табл. 1), пики могут соответствовать двум типам молекулярных ионов $[M - \text{H}]^-$ пентаацилированного ЛА, содержащего два остатка глюкозамина, одну фосфатную группу, четыре остатка 3-гидроксидекановой кислоты и один додекановой или декановой кислоты.

С использованием моноизотопных массовых чисел были подсчитаны молекулярные массы для формул $\text{C}_{64}\text{H}_{119}\text{O}_{21}\text{N}_2\text{P}$ и $\text{C}_{62}\text{H}_{115}\text{O}_{21}\text{N}_2\text{P}$, они равны 1282.8044 и 1254.77 Да.

Наряду с сигналом исходного пентаацилированного ЛА в спектре присутствовали пики, соответствующие его де-О-ацилированным тетра- (m/z 1111.85, 1099.99, 1093.81, 1081.99 и 1065.47) и триацильным (m/z 929.80 и 911.34) производным (табл. 3). Согласно данным ТСХ (рис. 1, дорожка 2), ЛА, использованный для МС, не содержит де-О-ацилированных производных. Следовательно, тетра- и триацильные производные являются результатом частичной деградации ЛА в условиях ФАВ-МС, а их присутствие в спектре указывает на то, что часть остатков ЖК присоединена к углеводному скелету довольно лабильными сложноэфирными связями. Сигналы при m/z 1111.85, 1093.81 и 1065.47 образуются в результате потери остатка кислоты 3-ОН-10 : 0, сигналы при m/z 1099.99 и 1081.99 соответствуют потере ацильных остатков 12 : 0 или 10 : 0. Триацильные производные (m/z 929.80 и 911.34) получаются в результате одновременного отщепления двух остатков жирных кислот: 12 : 0 (или 10 : 0) и 3-ОН-10 : 0. Анализ этой части спектра позволяет говорить, что нормальные ЖК и, по крайней мере, один остаток 3-гидроксидекановой кислоты имеют сложноэфирный тип связи.

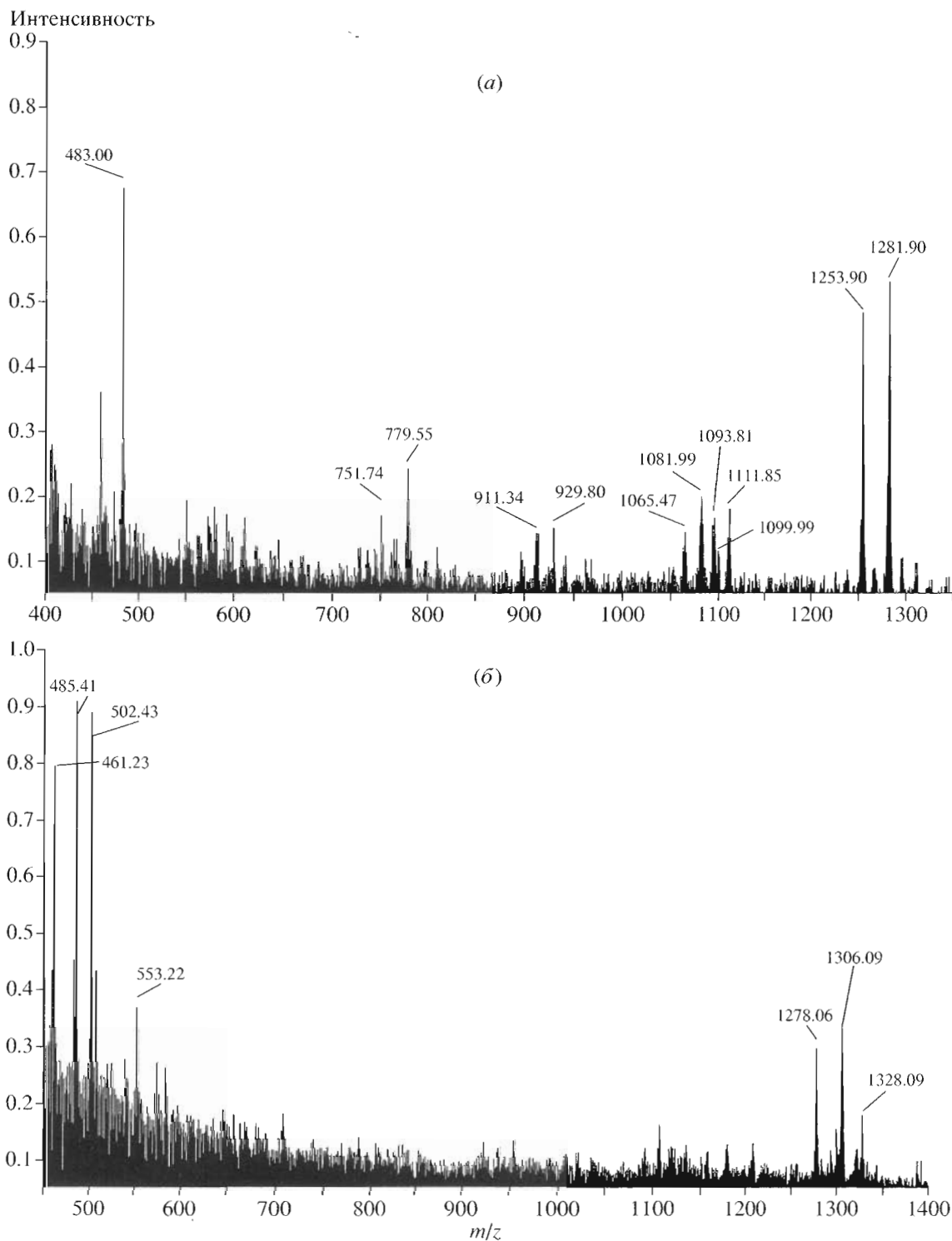


Рис. 4. Масс-спектры (а) отрицательных и (б) положительных ионов, полученных при бомбардировке липида А из *M. communitis* ATCC 27118^T ускоренными атомами, показывающие распределение остатков ЖК на молекуле глюкозамнобиозы.

Наряду с сигналами де-*O*-ацелированных производных в спектре присутствовали пики двух фрагмент-ионов, которые соответствуют монофосфорилированному остатку GlcN, замещенному двумя остатками кислот 3-ОН-10 : 0 и одним

остатком нормальной ЖК (10 : 0 или 12 : 0, m/z 751.74 и 779.55 соответственно). Согласно данным спектроскопии ЯМР, представленным выше, в ЛА из *M. communitis* фосфатная группа находится в положении C1 GlcN1. Следовательно,

Таблица 3. Отнесение сигналов (m/z) в FAB-масс-спектрах липида А из *M. communis* ATCC 27118^T. Спектры регистрировали в смеси хлороформ–метанол (2 : 1, по объему)

FAB-МС отрицательных ионов	
1281.90 (I)	$[M_1 (2 \times \text{GlcN} + 4 \times 3\text{-OH-10 : 0} + 1 \times 12 : 0 + \text{H}_3\text{PO}_4) - \text{H}]^-$
1253.90 (II)	$[M_{II} (2 \times \text{GlcN} + 4 \times 3\text{-OH-10 : 0} + 1 \times 10 : 0 + \text{H}_3\text{PO}_4) - \text{H}]^-$
1111.85	$\{[M_1 - \text{H}]^- - 3\text{-OH-10 : 0}\}$
1093.81	$\{[M_1 - \text{H}]^- - 3\text{-OH-10 : 0} - \text{H}_2\text{O}\}$
1065.47	$\{[M_{II} - \text{H}]^- - 3\text{-OH-10 : 0} - \text{H}_2\text{O}\}$
1099.99	$\{[M_1 - \text{H}]^- - 12 : 0\}$
1081.99	$\{[M_1 - \text{H}]^- - 10 : 0\}$
928.8	$\{[M_1 - \text{H}]^- - 12 : 0 - 3\text{-OH-10 : 0}\}$
911.34	$\{[M_{II} - \text{H}]^- - 10 : 0 - 3\text{-OH-10 : 0}\}$
779.94	$\{[M_1 - \text{H}]^- - \text{GlcN} - 2 \times 3\text{-OH-10 : 0}\}$
751.74	$\{[M_{II} - \text{H}]^- - \text{GlcN} - 2 \times 3\text{-OH-10 : 0}\}$
FAB-МС положительных ионов	
1328.00	$[M_1 + 2 \text{Na}]^+$
1306.09	$[M_1 + \text{Na}]^+$
1278.06	$[M_{II} + \text{Na}]^+$
502.43	$[M_1 - \text{GlcN} - 2 \times 3\text{-OH-10 : 0} - 12 : 0 - \text{H}_2\text{O}]^+$ $[M_{II} - \text{GlcN} - 2 \times 3\text{-OH-10 : 0} - 10 : 0 - \text{H}_2\text{O}]^+$
485.41	$[M_1 - \text{GlcN} - 2 \times 3\text{-OH-10 : 0} - 12 : 0 - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ $[M_{II} - \text{GlcN} - 2 \times 3\text{-OH-10 : 0} - 10 : 0 - 2\text{H}_2\text{O}]^+$

пики с m/z 751.7 и 779.9 принадлежат восстанавливающему концу глюкозаминобиозы, несущему три остатка ЖК. Два из них представляют собой кислоты 3-ОН-10 : 0 и присоединены к атомам С2 и С3 глюкозамина. Остатки нормальных ЖК (10 : 0 и 12 : 0) присоединены к гидроксильной группе амидносвязанной кислоты 3-ОН-10 : 0, поскольку, как уже отмечалось, сложноэфирносвязанные ацил-оксидановые кислоты в ЛА из *M. communis* не обнаружены.

Дополнительное доказательство присутствия амидносвязанной ацилоксикислоты было получено при обработке ЛА слабой щелочью (12% NH_4OH , 20°C, 18 ч) [27]. Единственной кислотой, обнаруженной после такой обработки, была 3-ОН-10 : 0. Из этого следует, что кислоты 10 : 0 и 12 : 0 являются вторичными и присоединены к *N*-связанной кислоте 3-ОН-10 : 0.

В спектре FAB-МС положительных ионов (рис. 4б, табл. 3) пики, имеющие значение для уточнения структуры, были зарегистрированы при m/z 1328.00, 1306.09, 1278.06, 502.43 и 485.41. Первые три сигнала соответствуют двум молекулярным ионам $[M_1 + \text{Na}]^+$ и $[M_1 + 2\text{Na}]^+$ и $[M_{II} + \text{Na}]^+$. Два последних являются фрагмент-ионами невосстанавливающего остатка GlcN, образующимися

в результате расщепления гликозидной связи. Анализ этой части спектра позволяет говорить, что GlcNII несет два остатка кислоты 3-ОН-10 : 0. Оба остатка, один из которых имеет амидный тип связи, а другой – сложноэфирный, находятся в положении С2 (согласно данным ЯМР (табл. 2), гидроксильные группы при атомах С3', С4' и С6' этого остатка GlcN не замещены).

Основываясь на совокупности полученных данных, предлагается следующий вариант структуры ЛА из *M. communis* ATCC 27118^T (рис. 5).

Как следует из полученных нами данных, ЛА из морской бактерии *M. communis* ATCC 27118^T имеет ряд особенностей, которые отличают его от ЛА большинства наземных бактерий. Он содержит только пять остатков короткоцепочечных (включая 3-гидроксиалкановую) ЖК и не имеет ацильного заместителя при С3'-атоме и фосфатной группы при С4'-положении.

Подобные недоацилированные и недофосфорилированные структурные типы ЛА были обнаружены в ЛПС некоторых патогенных бактерий, таких, как *Pseudomonas aeruginosa* [28], *Pseudomonas cichorii* [29], *Helicobacter pylori* [30], мутантная *Rhizobium leguminosarium* AspXL [31], *Pseudomonas corrugata* (в этом ЛА недоацилирование выражается в частичном отсутствии остатка ЖК при положении С3 восстанавливающего конца GlcN) [32]. Считается, что эти химические особенности ЛА играют важную роль, помогая патогенным бактериям избегать иммунной реакции организма хозяина.

Низкая степень ацилирования и фосфорилирования ЛА морских непатогенных бактерий (похожий тип структуры был также обнаружен в ЛА из морской бактерии *M. vaga* [18, 33]) ставит вопросы, которые пока остаются нерешенными. Согласно данным электронной микроскопии, морские грамотрицательные бактерии имеют устройство клеточной стенки, подобное таковому у наземных бактерий. Как и у последних, наружная мембрана морских микроорганизмов содержит молекулы ЛПС [34]. Однако ЛПС морских бактерий имеют некоторые специфические особенности. В отличие от ЛПС наземных видов, которые, как правило, являются ЛПС S-типа, ЛПС многих морских бактерий оказались сходными с ЛПС R-мутантных энтеробактерий, для которых характерно отсутствие O-специфического полисахарида и части олигосахарида кора [35, 36]. Возможно, это обусловлено специфическими условиями обитания морских бактерий. Присутствие на поверхности ЛПС R-формы делает более липофильной клеточную стенку морских микроорганизмов, что может способствовать агрегации клеток в морской воде и дать лишние шансы найти подходящего хозяина (например, возможность жить в поверхностном слое слизи рыб). Высокий выход ЛА (27%) из ЛПС бактерий *M. communis* предполагает, что ЛПС содержит короткие

O-полисахаридные фрагменты или не содержит их вообще. Возможно, в отсутствие ЛПС с полноценной структурой недоацелированный ЛА обеспечивает наружную мембрану гидрофильно-гидрофобным балансом, подходящим для существования бактерии *M. communis* в морской воде.

Следует сказать, что благодаря современным методам молекулярной биологии обнаружено чрезвычайно высокое разнообразие микроорганизмов. Морская среда, микробный мир которой стал интенсивно изучаться относительно недавно, не является исключением. Перед биологами стоит задача определить, каков функциональный вклад такого разнообразия в окружающую среду. Это требует оценки физиологической и потенциальной экологической роли вновь открываемых микроорганизмов, а также структурных работ, направленных на изучение их клеточных компонентов. Дальнейшее изучение ЛА морских бактерий, которые, как показали исследования последних лет [16–19], имеют специфические особенности, может оказаться весьма полезным в решении подобных задач. Следует отметить также, что молекулы ЛА, структурно подобные ЛА из *M. communis*, по своей природе являются антагонистами эндотоксинов [37]. В настоящее время нами проводятся эксперименты, позволяющие оценить потенциальную антиэндотоксическую активность молекул ЛА из морских бактерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Условия культивирования бактерий и выделение ЛПС. Клетки *M. communis* 27118^T выращивали при комнатной температуре с интенсивным перемешиванием на жидкой питательной среде (20 л), содержащей (в г/л 50%-ной морской воды, рН 7.5–7.8): бактопептон (Difco, США) – 5, гидролизат казеина (Merck, Германия) – 2, экстракт дрожжей (Merck) – 2, глюкозу – 1, K_2HPO_4 – 0.2, MgSO_4 – 0.05. Бактерии собирали на поздней логарифмической фазе (18 ч) центрифугированием (4000 g, 30 мин), последовательно промывали ацетоном (2 × 200 мл), смесью хлороформ–метанол (2 : 1, по объему; 2 × 200 мл) и гексаном (1 × 200 мл). Выход сухих обезжиренных клеток составил 0.56 г/л. ЛПС получали экстракцией горячим водным фенолом согласно процедуре [23]. Выход ЛПС после удаления нуклеиновых кислот осаждением 40%-ной трихлоруксусной кислотой составил 27.4 мг/г сухих клеток.

Выделение ЛА. ЛПС (150 мг) обрабатывали 1% AsOH при 100°C в течение 2 ч 40 мин. Полученный в виде осадка ЛА отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в хлороформе, промывали дистиллированной водой (3 раза), сушили над безводным сульфатом натрия и осаждали ацетоном (0.21 мг/мг ЛПС). Далее ЛА очищали с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом LH-20.

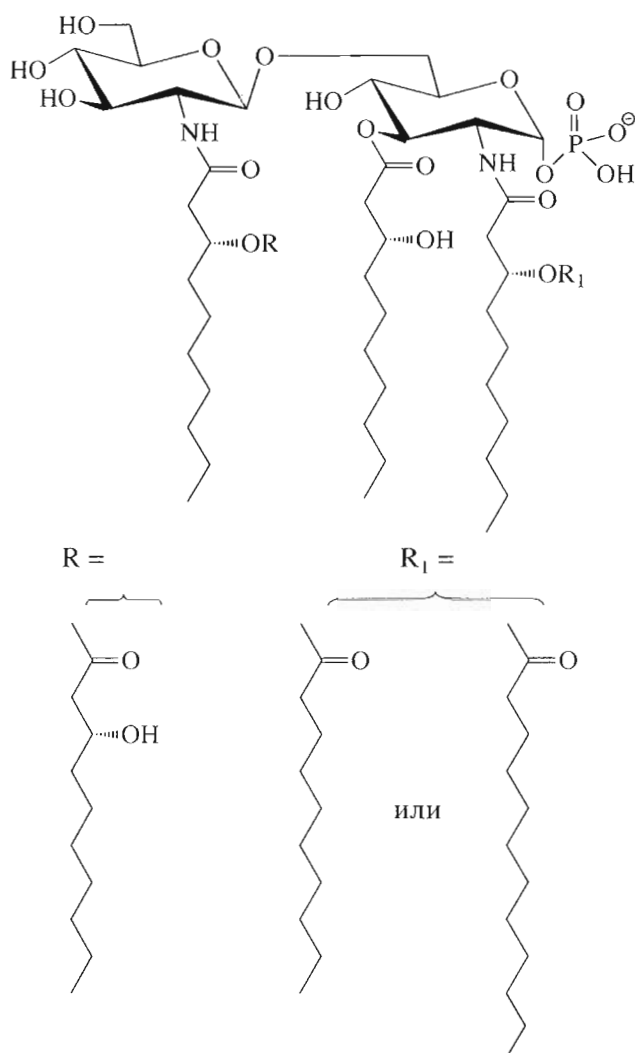


Рис. 5. Структура липида А из *M. communis* ATCC 27118^T.

Аналитические методы. Качественный и количественный анализ свободных аминосоединений, полученных гидролизом ЛА 6 н. HCl при 100°C в течение 24 ч, проводили с помощью аминокислотного анализатора ЛКВ 4251 Альфа Плюс (Швеция). Абсолютную конфигурацию GlcN определяли с использованием ГЖХ его ацелированного 2-октилглюкозида по методу Леонтейна и соавт. [38]. Общее содержание фосфора, полученного после сжигания ЛА в парах HClO_4 , определяли молибдатным методом [39]. Свободные ЖК, полученные гидролизом ЛА 6 н. HCl при 100°C в течение 24 ч, метилировали эфирным раствором диазометана и идентифицировали с помощью ГЖХ и ГЖХ-МС. В качестве внутреннего стандарта использовали пентадекановую кислоту, расчетное количество которой добавляли к ЛА до гидролиза.

Определение R,S-конфигурации 3-гидроксикислот. Для получения 3-гидроксисилановой кисло-

ты смесь ЖК (20 мг), полученную щелочным гидролизом (6 н. NaOH при 100°C, 4 ч) обезжиренных клеток *M. communis*, фракционировали на колонке с силикагелем, используя системы растворителей: гексан; гексан–эфир, 1 : 1; гексан–эфир–уксусная кислота, 1 : 1 : 0.1, по объему. Угол вращения фракции, содержащей 3-гидроксикислоту, измеряли на спектрофотополариметре Perkin-Elmer-141 (Швеция) ($[\alpha]_D = -14.5^\circ$ (0.5, CHCl₃)).

Хроматография. Гель-хроматографию ЛА выполняли на колонке с сефадексом LH-20 (500 × 18 мм) в системе хлороформ–этанол (3 : 1, по объему). Аналитическую ТСХ проводили на пластине с алюминиевой подложкой Сорбфил (“Сорб-полимер”, Россия) с использованием систем хлороформ–метанол–вода–конц. NH₄OH (5 : 3.125 : : 0.5 : 0.25, по объему) для идентификации ЛА и гексан–эфир–уксусная кислота (7 : 3 : 0.1, по объему) для идентификации ЖК и их метиловых эфиров; вещества обнаруживали нагреванием до 130°C в течение 10 мин после опрыскивания 10% H₂SO₄ в метаноле. ГЖХ-анализ ЖК осуществляли на хроматографе Shimadzu GC-9A (Япония; капиллярные колонки Supelcowax 10 и SPB-5, 30 м × 0.25 мм каждая) при температуре 200 и 210°C соответственно. Абсолютную конфигурацию моносахаридов определяли на хроматографе Agilent 6850 (Германия) с колонкой HP 1 MS с 5%-ным фенилметилсилоксаном (30 м × 250 мкм × 0.25 мкм) при температурном режиме от 160 до 250°C (5 град/мин).

Масс-спектрометрия (МС). ГЖХ-МС-анализ метиловых эфиров ЖК проводили на хроматографе Hewlett-Packard, модель 6890, оборудованном капиллярной колонкой HP 5 MS с 5%-ным фенилметилсилоксаном (30 м × 250 мкм × 0.25 мкм) и соединенном с масс-спектрометром Hewlett-Packard, модель 5973. Анализируемые образцы вводили в режиме разделения потоков с коэффициентом 1 : 15 при температуре инжектора 250°C. Анализ осуществляли при температуре 125–210°C (5 град/мин) с гелием в качестве газа-носителя. Спектры регистрировали в диапазоне от 50 до 550 атомных единиц массы с частотой 2.94 скан/с.

ФАВ-МС выполняли на масс-спектрометре высокого разрешения AMD 604S (Германия) с энергией Cs⁺ 8 кВ. ЛА растворяли в смеси хлороформ–метанол (2 : 1, по объему) в концентрации 10 мг/мл, и 0.5 мкл раствора образца смешивали с 0.5 мкл раствора глицерина. 0.5 мкл полученного раствора помещали на металлический держатель образцов и анализировали сразу после высушивания в потоке воздуха.

ЯМР-спектроскопия. Спектры ¹H-, ¹³C-, и ³¹P-ЯМР ЛА записывали при 317 К в системах CDCl₃–CD₃OD (4 : 1, по объему) или CD₃OD–CDCl₃–D₂O (3 : 2 : 1, по объему) при 500, 125 и 202.5 МГц соответственно на спектрометре Bruker DRX-500. В качестве стандартов при регистрации химических

сдвигов использовали тетраметилсилан (для ¹³C и ¹H) (δ_H 0.00, δ_C 0.00) и 85%-ную ортофосфорную кислоту (δ_P 0.00) (для ³¹P). Одномерные (¹H и NOESY) и двумерные (COSY, HSQC, HMBC и TOCSY) спектры регистрировали, используя стандартные импульсные программы.

Образцы ЛА для ЯМР-анализа были подготовлены как описано в работе [40]. ЛА (1 мг) растворяли в деионизованной дистиллированной воде с добавлением 0.36 М триэтиламина (25 мкл) на холоде. Нерастворимый остаток отделяли центрифугированием. Водный супернатант подкисляли 1 н. HCl до pH ~ 1. Осадок ЛА отделяли центрифугированием, растворяли в хлороформе (чтобы раствор был прозрачным, добавляли несколько капель метанола), промывали 3 раза деионизованной водой, после чего хлороформный раствор упаривали.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность О.П. Моисеенко за проведение ГЖХ-МС-экспериментов, а также Н.М. Горшковой за культивирование бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ гранта 02-04-49517), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, ДВО РАН (гранты № 03-3-A-05-081 и 03-3-Г-05-040).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O'Leary W.M., Wilkinson S.G. // *Microbial Lipids: Gram-positive Bacteria, Gram-negative Bacteria* / Eds C. Ratledge, S.G. Wilkinson. London: Acad. Press, 1978. V. 1. P. 117–201.
2. Allen E.E., Facciotti D., Bartlett D.H. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 1710–1720.
3. Batrakov S.G., Nikitin D.I., Petryuk I.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1303. P. 39–46.
4. Lugtenberg B., van Alphen L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1983. V. 737. P. 71–115.
5. Nikaido H. // *Microbiol. Mol. Rev.* 2003. V. 67. P. 593–656.
6. Galloway S.W., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 6394–6402.
7. Rietschel R.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahring U., Seydel U., Di Padova F., Schreier M., Brade H. // *FASEB J.* 1994. V. 8. P. 217–225.
8. Moran A. // *J. Toxicol.-Toxin Reviews.* 1995. V. 14. P. 47–83.
9. Opal S.I., Yu Jr., R.L. // *Drugs.* 1998. V. 55. P. 497–508.
10. Wilkinson S.G. // *Prog. Lipid Res.* 1996. V. 35. P. 283–343.
11. Rietschel E.Th., Brade H., Holst O., Brade L., Müller-Loennies S., Mamat U., Zahring U., et al. // *Curr. Topics in Microbiol. Immunol.* 1998. V. 216. P. 39–81.
12. Kawata T., Bristol J.R., Rossignol D.P. // *Br. J. Pharmacol.* 1999. V. 27. P. 853–862.

13. Carty S.M., Sreekumar K.R., Raetz C.R.H. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 9677–9685.
14. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Хотимченко С.В., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 404–411.
15. Di Rienzo J.M., MacLeod R.A. // J. Bacteriol. 1978. V. 136. P. 158–167.
16. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Светашев В.И., Горшкова Р.П., Толмич С.В., Назаренко Е.Л., Командрова Н.А., Иванова Е.П., Горшкова Н.М., Романенко Л.А., Михайлов В.А., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 1286–1294.
17. Corsaro M.M., Piaz F.D., Lanzetta R., Parrilli M. // J. Mass Spectrom. 2002. V. 37. P. 481–488.
18. Капустина Н.В., Красикова И.Н., Исаков В.В., Горшкова Н.М., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 2004. Т. 69. С. 504–510.
19. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Исаков В.В., Горшкова Н.М., Соловьева Т.Ф. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 409–416.
20. Baumann L., Baumann P., Mandell M., Allen R.D. // J. Bacteriol. 1972. V. 3. P. 402–429.
21. van Landschoot A., De Ley J. // J. Gen. Microbiol. 1983. V. 129. P. 3057–3974.
22. Gauthier M.J., Breittmayer V.A. // The Prokaryotes: The Genera Alteromonas and Marinomonas / Eds Balows A., Truper H.G., Swerkin M., Harber H., Schleifer K.-H. New York: Springer-Verlag, 1992. P. 3046–3070.
23. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
24. Jennings H., Smith I.C. // Methods Enzymol. 1978. V. 50. P. 39–50.
25. Ribeiro A.A., Zhou Z., Raetz C.R.H. // Magn. Reson. Chem. 1999. V. 37. P. 620–630.
26. Baltzer L.H., Mattsby-Baltzer I. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 3570–3573.
27. Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A. // J. Lipid Res. 2002. V. 43. P. 2188–2195.
28. Kulshin V.A., Zahringer U., Lindner B., Jager K., Dmitriev B.A., Rietschel E.H. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 198. P. 697–704.
29. Molinaro A., Silipo A., Lanzetta R., Parrilli M., Malvagna P., Evidente A., Surico G. // Eur. J. Org. Chem. 2002. V. 18. P. 3119–3125.
30. Suda Y., Ogawa T., Kashiwara W., Oikawa M., Shimoyama T., Tayashi T., Tamura T., Kusumoto S. // J. Biochem. 1997. V. 121. P. 1129–1133.
31. Vedam V., Kannenberg E.L., Haynes J.G., Sherrier D.J., Datta A., Carlson R.W. // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 1841–1850.
32. Corsaro M.M., Dal Piaz F., Lanzetta R., Naldi T., Parrilli M. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004. V. 18. P. 853–858.
33. Krasikova I.N., Kapustina N.V., Isakov V.V., Dmitrenok A.S., Dmitrenok P.S., Gorshkova N.M., Solov'eva T.F. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. P. 2895–2904.
34. Forsberg C.W., Casterton J.W., MacLeod R.A. // J. Bacteriol. 1970. V. 104. P. 1338–1353.
35. Moule A.L., Wilkinson S.G. // J. Gen. Microbiol. 1989. V. 135. P. 163–173.
36. Sledjeski D.D., Weiner R.M. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. V. 57. P. 2094–2096.
37. Wy C.A., Goto M., Young R.I., Myers T.F. // Biol. Neonate. 2000. V. 77. P. 191–195.
38. Leontcin K., Lindberg B., Lonngreen J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359–362.
39. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.A., Vasendin T.I. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129–133.
40. Zahringer U., Salvetzky R., Lindner B., Ulmer A. // J. Endotoxin Res. 2001. V. 7. P. 133–146.

The Structure of Uncommon Lipid A from the Marine Bacterium *Marinomonas communis* ATCC 27118^T

E. V. Vorob'eva^{*#}, A. S. Dmitrenok^{}, P. S. Dmitrenok^{*},
V. V. Isakov^{*}, I. N. Krasikova^{*}, and T. F. Solov'eva^{*}**

[#]Phone: (4232) 31-0719; fax: (4232) 31-4050; e-mail tikhonovaev@mail.ru

^{*}Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

^{**}Suntory Institute for Bioorganic Research,

1-1-1, Wakayamada, Shimamoto, Mishima, Osaka, 618-8503 Japan

Lipid A was obtained in a high yield (27%) by the hydrolysis of lipopolysaccharide from the marine gamma proteobacterium *Marinomonas communis* ATCC 27118^T with 1% AcOH. Using chemical analysis and 1D and 2D NMR spectroscopic and fast atom bombardment mass spectrometric methods, it was shown to be β -(1',6)-linked *D*-glucosaminobiose 1-phosphate acylated with (*R*)-3-dodecanoyl- or (*R*)-3-decanoyloxydecanoic acid, (*R*)-3-[(*R*)-3-hydroxydecanoyloxy]decanoic acid, and (*R*)-3-hydroxydecanoic acid at the C2, C2' and C3 positions, respectively. Uncommon structural peculiarities (a low acylation and phosphorylation degree) of the *M. communis* lipid A in comparison with those of terrestrial bacteria may be of pharmacological interest. The potential physiological meaning of this lipid A and compounds of similar structure are discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: lipid A, LPS, marine proteobacteria, *Marinomonas communis*, NMR spectroscopy, FAB mass spectrometry