



УДК 577.115:579.84:543.429.23

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПИДА А ИЗ МОРСКОЙ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ

Pseudoalteromonas haloplanktis ATCC 14393^T

© 2004 г. И. Н. Красикова[#], Н. В. Капустина, В. В. Исаков,
Н. М. Горшкова, Т. Ф. Соловьева

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 21.07.2003 г. Принята к печати 07.10.2003 г.

С помощью химических методов анализа и спектроскопии ЯМР определена химическая структура липида А, полученного гидролизом липополисахарида из морской γ -протеобактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393^T уксусной кислотой. Показано, что изучаемый липид А является β -1,6-связанным дисахаридом глюкозамина, замещенным двумя остатками фосфорной кислоты (в положениях С1 и С4'), двумя остатками (R)-3-гидроксиалкановых (нормальных и разветвленных) кислот со сложноэфирным типом связи (в положениях С3 и С3'), одним остатком (R)-3-гидроксидодекановой и одним остатком (R)-3-додеканойлоксидодекановой кислот (оба с амидным типом связи).

Ключевые слова: морские грамотрицательные бактерии, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, ЛПС, липид А, ЯМР-спектроскопия ¹H, ³¹P, ¹³C.

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные бактерии наряду с классическими мембранными липидами, построенными на основе глицерина, содержат необычный гликофосфолипид, называемый липидом А. Выполняя функцию липидного якоря липополисахарида (ЛПС), О-антигена и эндотоксина протеобактерий [1], он является составной частью клеточной стенки и важен для поддержания нормальной физиологии и роста микроорганизмов [2]. Многие патофизиологические проявления грамотрицательных инфекций, в том числе эндотоксемия и бактериальный шок, ассоциированы с уникальными, так называемыми эндотоксическими свойствами липида А [3]. Поэтому в настоящее время проводится интенсивный поиск потенциальных антагонистов эндотоксина на его основе [4].

Наиболее распространенным структурным вариантом липида А является молекула, построенная на основе β -1,6-D-глюкозаминил-D-глюкозамина [5]. Дисахарид несет α -гликозидную (положение 1) и негликозидную (положение 4) фосфорильные группы и ацилирован сложноэфирно- (положения 3 и 3') и амидносвязанными (положения 2 и 2') (R)-3-гидрокси- и (R)-3-ацилоксиалкановыми кислотами. По количеству остатков жирных кислот в молекуле липида А различают пента-, гекса-

гептаацильные структурные типы. Все эндотоксически активные молекулы липида А имеют гексаацильный тип структуры и два остатка фосфорной кислоты [6]. С другой стороны, согласно данным, доступным к настоящему времени, структурные варианты липида А, проявляющие высокий антагонизм по отношению к эндотоксинам, имеют дисахаридную основу, одну или две фосфатных группы и низкую степень ацилирования [7].

Известно, что тип ацилирования липида А, играющий важную роль в связывании бактерий с клетками организма хозяина и последующей активации последних [3], в большой степени зависит от условий роста [8, 9]. Мы предположили, что морские бактерии, чья среда обитания (преимущественно низкая температура, высокое давление, повышенное содержание неорганических солей [10]) по большей части сильно отличается от таковой для наземных бактерий, могут стать источником интересных с фармакологической точки зрения структурных вариантов липида А. Действительно, анализ общего химического состава липидов А из 13 видов морских бактерий, принадлежащих к шести родам и трем семействам, показал, что они имеют ряд особенностей, таких, как высокая степень гетерогенности по составу жирных кислот, низкая степень ацилирования и фосфорилирования, слабо выраженная токсичность, отличающих их от липидов А наземных бактерий [11]. Это обстоятельство делает пер-

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ТЕА – триэтиламин.
[#]Автор для переписки (тел.: (4232) 31-07-19; факс: (4232) 314050; эл. почта: innakras@piboc.dvo.ru).

Таблица 1. Состав липида А из *P. haloplanktis* ATCC 14393^T

Компонент	% на Σ ЖК*	г-моль**	г-моль/2 ост. GlcN***
	I	II	III
10 : 0	0.6	0.0401	0.21
11 : 0	1.7	0.0137	0.07
12 : 0	10.2	0.1163	0.32
3-ОН-10 : 0	9.7	0.0607	0.62
3-ОН-11 : 0	19.7	0.0889	0.47
3-ОН-12 : 0	27.4	0.2210	1.18
3-ОН-изо-11 : 0	4.8	0.0162	0.09
3-ОН-изо-12 : 0	15.5	0.0612	0.33
<i>E</i> -2-10 : 1	–	0.0406	0.22
<i>E</i> -2-11 : 1	–	0.0701	0.37
<i>E</i> -2-12 : 1	2.2	0.1821	0.97
<i>E</i> -2-изо-12 : 1	–	0.0359	0.19
Σ норм. ЖК	12.5	0.1701	0.90
Σ 3-ОН-ЖК	79.3	0.7767	4.14
P	–	0.3194	1.7
GlcN	–	0.3758	2.0

* Расщепление 4 н. NaOH, 100°C, 4 ч.

** Гидролиз 6 н. HCl, 100°C, 24 ч.

спективным установление детальной структуры липида А из морских бактерий.

В рамках настоящего исследования проведено изучение структуры липида А из бактерий *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393^T, типового штамма вида *P. haloplanktis* [12]. *P. haloplanktis* (бывшая *Alteromonas haloplanktis* [13]) является аэробной, гетеротрофной, граммотрицательной бактерией [14]. Она относится к широко распространенным облигатно морским микроорганизмам, которые легко выделяются как из прибрежных вод, так и из вод открытого океана и требуют присутствия морской воды в среде роста [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Липид А из *P. haloplanktis* ATCC 14393^T (далее липид А *P. h.*), полученный гидролизом ЛПС 1% AcOH, по данным ТСХ, представляет собой довольно сложную смесь гомологов с разной степенью фосфорилирования и ацилирования. Отсутствие цветной реакции при обработке липида А нингидрином свидетельствует о том, что он не содержит свободных аминогрупп. Гель-фильтрацией на колонке с сефадексом LH-20 и последующей колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 36% была получена гомогенная, по

данным ТСХ, фракция, аналитические данные которой представлены в табл. 1.

Согласно данным химического анализа, липид А *P. h.* содержит глюкозамин, фосфор и жирные кислоты, основными из которых являются додекановая (12 : 0), 3-гидроксиундекановая (3-ОН-11:0) и 3-гидроксидодекановая (3-ОН-12:0). Наряду с вышеперечисленными, в его составе обнаружены также 3-гидроксидекановая (3-ОН-10:0) и 3-гидрокситридекановая (3-ОН-13:0), а также 3-гидроксиалкановые кислоты *изо*-серии (3-ОН-*изо*-11:0 и 3-ОН-*изо*-12:0), на долю которых приходится до 20% общего количества жирных кислот (табл. 1). Величина угла вращения суммарной фракции 3-гидроксиалкановых кислот ($[\alpha]_D = -11.99^\circ$ (0.4%, CHCl₃)) свидетельствует о *R*-конфигурации их оптически активных атомов.

Интересно, что щелочной гидролизат липида А *P. h.* не содержит (*E*)-2-ненасыщенных жирных кислот, которые часто обнаруживаются в гидролизатах образцов липида А, имеющих в своем составе 3-ацилоксиалкановые кислоты со сложноэфирным типом связи [16]. Это косвенно указывает на отсутствие подобных производных в изучаемом липиде А.

Определение молярного соотношения основных компонентов, входящих в состав липида А из *P. haloplanktis* ATCC 14393^T, показало, что он представляет собой дисахарид глюкозамина, ацилированный пятью остатками жирных кислот и имеющий две фосфатные группы (табл. 1). Общий вид ¹³C- и ³¹P-ЯМР-спектров изучаемого липида А (рис. 1а, б) хорошо согласуется с подобным заключением.

Как следует из данных, представленных в табл. 2а, аномальный атом невосстанавливающего остатка глюкозамина липида А имеет β -конфигурацию (100.84 м.д.), С1-центр восстанавливающего остатка имеет α -ориентацию (94.87 м.д.) и несет остаток фосфорной кислоты ($J_{C1, P}$ 4.6 Гц). На присутствие фосфатной группы при С1-атоме указывает и величина хим. сдвига одного из сигналов в спектре ³¹P-ЯМР изучаемого липида А (–1.39 м.д., рис. 1б). Величина хим. сдвига второго сигнала в фосфорном спектре свидетельствует о том, что соответствующий ему остаток фосфорной кислоты находится при вторичной гидроксильной группе глюкозаминобиозы.

Анализ области спектра, где резонируют С2-атомы глюкозамина, подтверждает выводы о дисахаридной природе изучаемого соединения (два сигнала с величинами хим. сдвигов 54.04 и 51.90 м.д.), о α - и β -конфигурациях аномальных атомов восстанавливающего и невосстанавливающего остатков глюкозамина соответственно и о присутствии фосфатной группы при С1-атоме ($J_{C2, P}$ 8.4 Гц). Сдвиг в сильное поле сигналов обоих С2-атомов в сравнении с сигналами С2-атомов в 6-дифе-

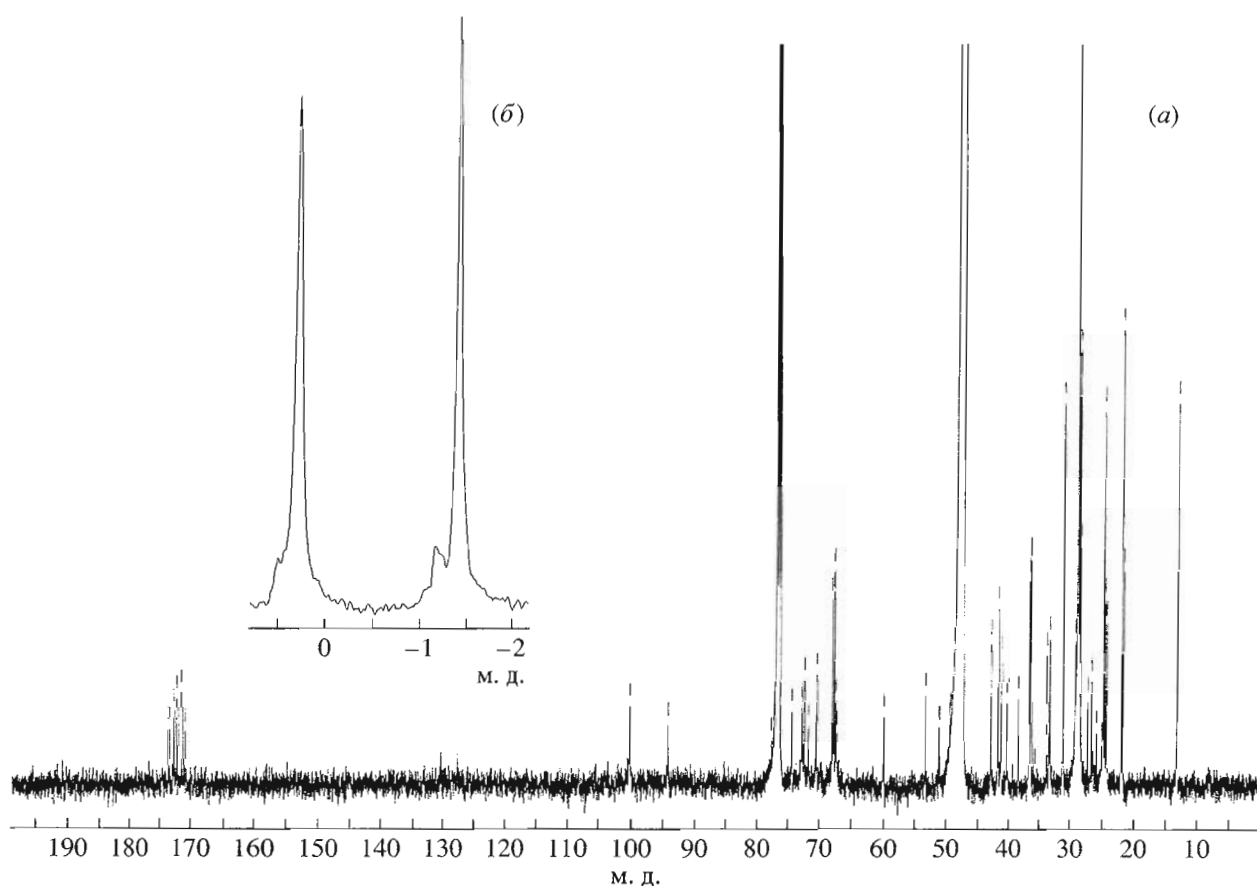


Рис. 1. ^{13}C - (a) и ^{31}P - (б) ЯМР-спектры липида А из *P. haloplanktis* ATCC 14393^T.

нилфосфате метил-(2-дезоксид-2-[(*R*, *S*)-3-гидрокситетрадеcanoиламино]- β -*D*-глюкопиранозил)-(1 \rightarrow 6)-2-(2-дезоксид-2-[(*R*, *S*)-3-гидрокситетрадеcanoиламино]- α -*D*-глюкопиранозид) (56.6 и 53.9 м.д. соответственно) [17] позволяет сделать заключение, что гидроксильные группы при С3-атомах обоих остатков глюкозамина замещены [18].

Резонансная область С6-атомов остатков глюкозамина представлена одним сигналом (60.58 м.д.), что предполагает участие одного из С6-атомов в образовании гликозидной связи. Действительно, как показали DEPT-135-эксперименты (данные не приводятся), сигнал второго С6-атома смещен в область 68.17 м.д., демонстрируя β -1,6-связь в липиде А *P. h.*

Наиболее сложной частью спектра ^{13}C -ЯМР изучаемого липида А оказалась область резонанса атомов С3, С4, С5 глюкозамина (68–75 м.д.), насчитывающая 11 сигналов. Усложнение этой части спектра произошло за счет того, что кроме сигналов вышеперечисленных углеродных атомов в ней присутствуют сигнал одного из С6-атомов глюкозамина, о котором говорилось выше, а также сигналы С3-атомов 3-гидрокси- (~69 м.д.) и 3-ацилоксиалкановых (71–73 м.д.) кислот [19, 20].

Поэтому анализ этой части спектра мы начали с отнесения сигналов, принадлежащих жирным кислотам.

Область резонанса карбонильных атомов углерода представлена пятью сигналами равной интенсивности (рис. 1а, табл. 2б), что хорошо согласуется с данными химического анализа (табл. 1), в соответствии с которыми изучаемый липид А имеет пентаацильный тип структуры. Четыре сигнала в области резонанса атомов С2 (41–44 м.д. [19, 20]) 3-гидроксиалкановых кислот указывают на присутствие в молекуле липида А четырех остатков упомянутых кислот. В то же время области резонанса атомов С3 (~68 м.д.) и С4 (~37 м.д.) 3-гидроксиалкановых кислот представлены только тремя сигналами. Это позволяет предполагать, что гидроксильная группа одного из таких остатков имеет ацильный заместитель. Присутствие в спектре сигналов с величиной хим. сдвига 71 и 34 м.д. (С3- и С4-атомы амидносвязанных 3-ацилоксиалкановых кислот [19, 20]) хорошо согласуется с этим предположением.

Амидный тип связи 3-ацилоксиалкановой кислоты с остатком глюкозамина был также подтвержден при анализе области резонанса С2-атомов 3-гид-

Таблица 2. Данные ^{13}C -ЯМР-спектроскопии липида А из *P. haloplanktis* ATCC 14393^T (δ , м. д.)

а)

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\beta\text{-Glc}pN_p\text{-(1} \rightarrow$	100.84	54.04	73.75	72.00	75.11	60.58
$\alpha\text{-Glc}pN\text{-(1} \rightarrow P$	94.87	51.90	73.33	67.95	73.23	68.12

б)

Жирные кислоты	Неразветвленные кислоты									Кислоты <i>изо</i> -ряда	
	C1	C2	C3	C4	C3, C5*	-CH ₂ -	ω 3	ω 2	ω 1	ω 4	-CH ₃
3-ОН		43.77	68.72	37.59							
	175.22	42.57	68.46	37.40	25.16						
	174.34	42.09	68.34	37.33	24.91	28.97-	32.14	22.88	14.08	39.30	21.77
3-Оас	173.84		71.13		24.86	28.92					
	173.15	41.15	73.06	34.73**	24.69						
Нормальные	172.78	34.26**	-	-	24.41					-	-

* В этой колонке указаны сигналы C3- и C5-атомов нормальных и 3-гидроксиалкановых кислот соответственно.

** Отнесение сигналов для этих C-атомов может быть изменено на противоположное.

рокси(ацилокси)-алкановых кислот. Известно, что C2-атомы амидно связанных 3-гидрокси кислот имеют величину хим. сдвига около 44 м.д., в то время как аналогичные атомы 3-гидроксиалкановых кислот со сложноэфирным типом связи резонируют в более сильном поле (42 м.д.) [19, 20]. Замещение гидроксильной группы при C3-атоме кислоты смещает сигнал атома C2 в сильное поле на 2–3 м.д. (41 и 39 м.д. для C2-атомов амидно- и сложноэфирно связанных 3-ацилоксиалкановых кислот соответственно [19, 20]). В спектре липида А *P. h.* присутствует один сигнал при 44 м.д. (C2-атом 3-гидроксиалкановой кислоты с амидным типом связи), два – при 42 м.д. (C2 атомы 3-гидроксиалкановых кислот со сложноэфирным типом связи), один – при 41 м.д. (C2-атом 3-ацилоксиалкановой кислоты с амидным типом связи) (табл. 2б).

Интересно, что в спектре липида А *P. h.* наблюдается сигнал с величиной хим. сдвига 73.06 м.д. Согласно данным, приведенным в работе [21], такой сигнал является характеристическим для гидроксикислот, которые в α -положении к гидроксильной группе имеют двойную связь в *транс*-конфигурации. В спектре липида А *P. h.* есть сигналы C-атомов при двойной связи (128–132 м.д., рис 1а). Однако ни в щелочном, ни в кислотном гидролизатах изучаемого липида А непредельная жирная кислота не была обнаружена. В настоящее время проводятся эксперименты по ее идентификации.

Чтобы определить, какая кислота ацилирует гидроксильную группу амидно связанной 3-ацилокси кислоты, липид А *P. h.* был подвергнут мягкой щелочной обработке, которая избирательно удаляет жирные кислоты со сложноэфирным типом

связи [22]. Присутствие в гидролизате кислот 3-ОН-11:0 (42.6%), 3-ОН-10:0 (18.6%), 3-ОН-12:0 (16.2%), 3-ОН-*изо*-12:0 (13.5%) и небольшого количества 3-ОН-*изо*-11:0 (6.5%) указывает на то, что они ацилируют гидроксильные группы глюкозамина. При последующей более жесткой обработке (6 М NaOH, 4 ч, 100°C) в гидролизате липида А кроме выше перечисленных жирных кислот была обнаружена кислота 12:0 (20.8% от общего количества сложноэфирно- и амидно связанных жирных кислот). Одновременно наблюдалось значительное увеличение (до 31.1% от суммы кислот с разным типом связи) количества кислоты 3-ОН-12:0. Эти данные свидетельствуют о том, что изучаемый липид А содержит 3-додеканоилсидодекановую кислоту с амидным типом связи.

Следует сказать, что в спектре липида А *P. h.* присутствует сигнал при 39.30 м.д., который теоретически может принадлежать C2-атому 3-ацилокси кислоты со сложноэфирным типом связи [19]. В действительности он не может быть сигналом такого C2-атома, так как это предполагает присутствие в изучаемом липиде А двух остатков 3-ацилоксиалкановых кислот. В этом случае область резонанса C3- и C4-атомов 3-гидрокси кислот (69 и 37 м.д. соответственно) должна быть представлена двумя сигналами, чего в реальном спектре липида А *P. h.* не наблюдается. С другой стороны, следует иметь в виду, что изучаемый липид А содержит жирные кислоты *изо*-серии (табл. 1), характерной особенностью ^{13}C -ЯМР-спектров которых являются сигналы с величиной хим. сдвига ~39 (ω 4-атом) и ~22 (C-атомы двух концевых метильных

групп) м.д. [23]. Присутствие в спектре липида А наряду с сигналом 39.30 м.д. сигнала при 21.77 м.д. (рис. 1, табл. 2б) надежно доказывает, с одной стороны, наличие в изучаемом липиде А кислот изо-серии, с другой – отсутствие 3-ацилоксикислоты со сложноэфирным типом связи.

Отнесение сигналов спектра ^{13}C -ЯМР в области резонанса атомов С3, С4 и С5 глюкозамина было сделано на основании литературных данных [24], принимая во внимание, что липид А *P. h.* содержит две фосфатные группы, одна из которых замещает вторичную гидроксильную группу глюкозаминобиозы. Учитывая, что присутствие фосфатной группы изменяет величину химического сдвига С-атома, при котором она находится, и соседних с ним атомов и вызывает уширение соответствующих сигналов [24], мы пришли к заключению, что сигналы с величинами хим. сдвигов 72.44 ($J_{\text{C}_3, \text{P}}$ 4.6 Гц), и 75.11 м.д. ($J_{\text{C}_5, \text{P}}$ 2.3 Гц) принадлежат С3'- и С5'-атомам соответственно, а остаток фосфорной кислоты находится при С4'-атоме (73.17 м.д., табл. 2а). Более узкие сигналы при 73.33, 71.19 и 67.95 м.д. были отнесены к атомам С3, С5 и С4 восстанавливающего остатка дисахарида, который имеет незамещенную гидроксильную группу при С4-атоме.

Подтверждение высказанным выше предположениям о структуре липида А *P. h.* было получено с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. Сигнал ^1H при 5.55 м.д., который проявляется как типичный двойной дублет (дублет дублетов), был отнесен к аномерному протону восстанавливающего остатка, имеющего α -ориентацию ($J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$ 3.04 Гц) и несущего фосфатную группу ($J_{\text{H}_1, \text{P}}$ 6.5 Гц). Дублетный сигнал в области 4.75 м.д. был отнесен к Н1' невосстанавливающего остатка глюкозаминобиозы. Константа расщепления между Н1' и Н2' (7.9 Гц) подтверждает ранее высказанное предположение о β -конфигурации гликозидной связи между остатками глюкозамина. Используя ^1H - ^1H -COSY-спектроскопию и величины хим. сдвигов аномерных протонов при 5.55 и 4.75 м.д. как точку отсчета, были сделаны отнесения сигналов избранных протонов обоих остатков глюкозамина (табл. 3).

Хим. сдвиги атомов Н2, Н2', Н3, Н3' и Н4' доказывают, что обе аминогруппы, а также гидроксильные группы при С3, С3' и С4' имеют замещение. Напротив, хим. сдвиг метинового протона Н4 (3.57 м.д., табл. 3) предполагает, что гидроксильная группа при С4-атоме не замещена.

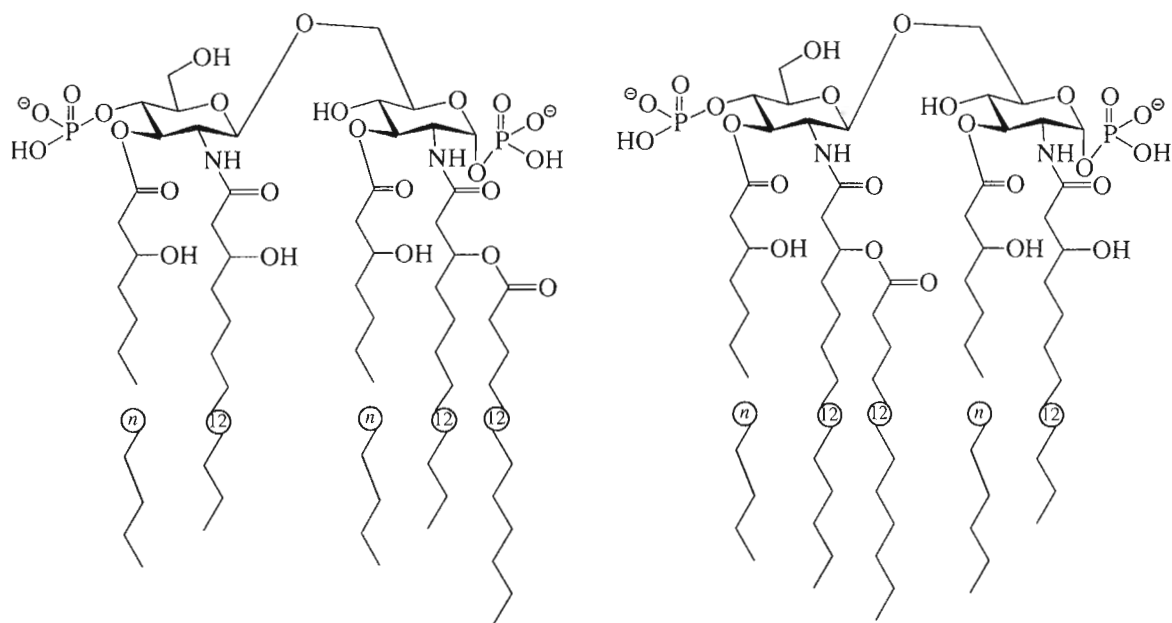
На основании полученных данных был сделан вывод, что липид А *P. h.* является β -1,6-связанным дисахаридом *D*-глюкозамина, замещенным двумя остатками фосфорной кислоты (в положениях С1 и С4'), двумя остатками (*R*)-3-гидроксиалкановых (нормальных и разветвленных) кислот со сложноэфирным типом связи (при С3- и

Таблица 3. Отнесение сигналов избранных протонов в ^1H - ^1H -COSY-ЯМР-спектре остатков глюкозамина липида А из *P. haloplanktis* ATCC 14393^T

Протон	δ , м. д.	Протон	δ , м. д.
Н1	5.55	Н1'	4.75
Н2	4.18	Н2'	3.85
Н3	5.17	Н3'	5.23
Н4	3.57	Н4'	4.05

С3'-положениях), одним остатком (*R*)-3-гидрокси-додекановой и одним остатком (*R*)-3-додеканойлоксидодекановой кислот (оба с амидным типом связи). Принимая во внимание эту информацию, мы предложили два возможных варианта структуры изучаемого липида А (рис. 2), окончательный выбор между которыми будет сделан после дополнительных исследований.

Недавно была опубликована структура липоолигосахарида из дикого штамма бактерий *P. haloplanktis* TAC 125, концевой фрагмент которого представляет собой липид А [25, 26]. Согласно данным, приведенным в этих работах, липид А этого штамма также представляет собой β -1,6-связанный дисахарид *D*-глюкозамина, замещенный двумя остатками фосфорной кислоты (в положениях С1 и С4') и пятью остатками жирных кислот, т.е. аналогичен выделенному нами веществу. Однако присутствующая в нем 3-додеканойлоксидодекановая кислота соединена с дисахаридным остовом не амидной, а сложноэфирной (при С3') связью. Интересно также, что липид А из *P. haloplanktis* TAC 125, в отличие от липида А изучаемого штамма ATCC 14393^T, характеризующегося высокой степенью гетерогенности по составу 3-гидроксиалкановых кислот (табл. 1, колонка 1), содержит только одну 3-гидроксиалкановую кислоту, 3-ОН-12:0. Еще одна особенность бактерий штамма *P. haloplanktis* TAC 125, отличающая их от бактерий типового штамма *P. haloplanktis* ATCC 14393^T, то, что липид А является составной частью липоолигосахарида, а не ЛПС, который в клетках дикого штамма не синтезируется [26]. Столь существенные различия в составе и структуре липида А и ЛПС бактерий одного вида могут объясняться как штаммовыми различиями, так и различиями в условиях их культивирования. В нашем эксперименте рост *P. haloplanktis* ATCC 14393^T проходил при комнатной температуре, тогда как культивирование *P. haloplanktis* TAC 125 осуществляли при температуре 15°C [26]. В настоящее время нами проводятся эксперименты, с помощью которых можно будет определить влияние температурного фактора на состав и структуру липида А из бактерий *P. haloplanktis* ATCC 14393^T.



$n = 3\text{-OH-}10:0, 3\text{-OH-}11:0, 3\text{-OH-}12:0, 3\text{-OH-изо-}11:0, 3\text{-OH-изо-}12:0$

Рис. 2. Предлагаемые варианты структуры липида А из *P. haloplanktis* ATCC 14393^T.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование бактерий и выделение ЛПС.

Бактерии *P. haloplanktis* ATCC 14393^T выращивали при комнатной температуре и интенсивном встряхивании на жидкой питательной среде, содержащей (в г/л 50%-ной морской воды, рН 7.5–7.8): бактопептон (Difco) – 5; гидролизат казеина (Merck) – 2; экстракт дрожжей (Merck) – 2; глюкозу – 1; K_2HPO_4 – 0.2; MgSO_4 – 0.05. Клетки собирали на поздней логарифмической фазе роста (18 ч), центрифугировали, последовательно промывали дистиллированной водой, ацетоном, этанолом, гексаном и дважды смесью хлороформ–метанол (2 : 1 по объему). Выход сухих обезжиренных клеток составил 1.25 г/л. ЛПС получали по методу Вестфала обработкой горячим водным фенолом [27]. Выход ЛПС после удаления нуклеиновых кислот осаждением холодной 40%-ной трихлоруксусной кислотой [28] составил 6.5 мг/г сухих клеток.

Выделение липида А. ЛПС (173 мг) гидролизovali 1% уксусной кислотой при 100°C в течение 3 ч. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, растворяли в хлороформе, промывали дистиллированной водой (3 раза), сушили над безводным сульфатом натрия и осаждали 5-кратным объемом ацетона. Липид А (выход 0.18 мг/мг ЛПС) далее очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 с последующей колоночной хроматографией на силикагеле.

Аналитические методы. Моносахаридный состав липида А определяли методом ГЖХ-МС ацетатов полиолов, а также анализом недериватизированных аминсахаров на аминокислотном анализаторе LKB 4251 Alpha+ (Швеция) [29]. Липид А гидролизovali 6 н. HCl при 100°C в течение 24 ч, моносахариды восстанавливали боргидридом натрия и ацетиловали уксусным ангидридом в пиридине. Содержание фосфора, после сжигания липида А действием HClO_4 , определяли молибдатным методом [30].

Жирные кислоты получали щелочным гидролизом (6 н. NaOH, 100°C, 4 ч) липида А, после чего их обрабатывали эфирным раствором диазометана и идентифицировали полученные метиловые эфиры с помощью ГЖХ и ГЖХ-МС. В качестве внутреннего стандарта использовали пентадекановую кислоту, которую добавляли к липиду А до гидролиза. Чтобы определить, какие жирные кислоты имеют сложноэфирный тип связи, липид А подвергали мягкой щелочной обработке [21].

Хроматография. Гель-хроматографию проводили на колонке с сефадексом LH-20 (560 × 15 мм) в системе хлороформ–этанол (3 : 1); в качестве элюента для колоночной хроматографии на силикагеле использовали смеси хлороформ–метанол. ТСХ проводили на пластинах Сорбфил (Сорбполимер, Россия) на алюминиевой подложке в системе хлороформ–метанол–вода–конц. NH_4OH (100 : 62.5 : 10 : 5), с обнаружением пятен нагрева-

нием при 130°C в течение 10 мин после опрыскивания 20%-ной H₂SO₄ в метаноле; свободные аминогруппы обнаруживали нингидрином. ГЖХ и ГЖХ-МС метиловых эфиров жирных кислот осуществляли на газовом хроматографе Agilent 6850 с капиллярной колонкой HP 1 (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм) и на приборе Hewlett-Packard 6890 с капиллярной колонкой HP 5 MS с 5%-ным фенилметилсилоксаном (30 м × 250 мкм × 0.25 мкм), соединенном с масс-спектрометром Hewlett-Packard 5973. Образцы вводили в режиме разделения потоков с коэффициентом 1 : 15 при температуре инжектора 250°C. Анализ проводили при температуре 125–210°C (5°C/мин); газ-носитель гелий. Спектры регистрировали в диапазоне 50–550 атомных единиц массы с частотой 2.94 скана в секунду.

Определение R,S-конфигурации 3-гидроксиалкановых кислот. Смесь жирных кислот (24 мг), полученных щелочным гидролизом (6 н. NaOH, 4 ч, 100°C) обезжиренных клеток *P. haloplanktis* ATCC 14393^T, разделяли на колонке с силикагелем (гексан; гексан-эфир, 2 : 1; гексан-эфир-уксусная кислота, 1 : 1 : 0.1; гексан-эфир-уксусная кислота, 1 : 1 : 0.2; по объему. Угол вращения суммарной фракции 3-гидроксиалкановых кислот (4 мг) измеряли на спектрофотополариметре Perkin-Elmer-141.

ЯМР-спектры записывали на приборе Bruker Avance DRX-500. Липид А (7 мг) растворяли в 0.6 мл смеси CDCl₃-CD₃OD (4 : 1). Образцы для ЯМР-анализа были подготовлены как описано в работе [31]: липид А (10 мг) растворяли в деионизованной дистиллированной воде (1.5 мл), добавляли 45 мкл 0.36 М триэтиламина на холоду, следя за тем, чтобы рН раствора был не больше 9. Нерастворимый остаток отделяли центрифугированием. Водный супернатант подкисляли 1 н. HCl, доводя концентрацию кислоты до 0.1 н. Получившийся осадок липида А отделяли центрифугированием, растворяли в хлороформе (чтобы раствор был прозрачным, добавляли несколько капель метанола). Хлороформный раствор три раза промывали деионизованной водой, после чего упаривали.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ грантов 042-04-49466 и 03-04-06969 [МАС]), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Физико-химическая биология", ДВО РАН (№ грантов 03-3-А-05-081 и 03-3-Г-05-040).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lugtenberg B., van Alphen L. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 737. P. 51–115.
2. Galloway S.W., Raetz C.R.H. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 6394–6402.
3. Moran A.J. // Toxicol. Toxin Reviews. 1995. V. 14. P. 47–83.
4. Opal S.I., Yu Jr., R.L. // Drugs. 1998. V. 55. P. 497–508.
5. Wilkinson S.G. // Prog. Lipid Res. 1996. V. 35. P. 283–343.
6. Rietschel E.Th., Brade H., Holst O., Brade L., Müller-Loennies S., Mamat U., Zahringer U., Beckmann F., Seydel U., Brandenburg K., Ulmer A.J., Mattern T., Heine H., Schletter J., Loppnow H., Schönbeck U., Flad H.-D., Hauschildt S., Schade F.U., Di Padova F., Kusumoto S., Schuman R.R. // Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 1998. V. 216. P. 39–81.
7. Kawata T., Bristol J.R., Rossignol D.P. // Br. J. Pharmacol. 1999. V. 27. P. 853–862.
8. Carty S.M., Sreekumar K.R., Raetz C.R.H. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 9677–9685.
9. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Хотимченко С.В., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 404–411.
10. Bartlett D.H., Welch T.J. // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 1008–1016.
11. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Светашев В.И., Горикова П.П., Томшич 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.
12. Baumann L., Baumann P., Mandel M., Allen R.D. // J. Bacteriol. 1972. V. 3. P. 402–429.
13. Gauthier G., Gauthier M., Christen R. // Int. J. System. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 755–764.
14. Baumann P., Gauthier M.J., Baumann L. // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds Krieg N.B., Holt J.G. N.Y.: Williams & Wilkins Co., 1984. P. 343–352.
15. Mullins T.D., Britschgi R.L., Krest R.L., Giovannoni S.J. // Limnol. Oceanogr. 1995. V. 40. P. 148–158.
16. Wollenweber H.-W., Rietschel E.Th. // J. Microbiol. Meth. 1990. V. 11. P. 195–211.
17. Горбач В.И., Иванчина Е.В., Исаков В.В., Лукьянов П.А., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорг. химия. 1982. Т. 13. С. 1409–1415.
18. Jennings H., Smith I.C. // Methods Enzymol. 1978. V. 50. P. 39–50.
19. Tulloch A.P., Mazurek M. // Lipids. 1976. V. 11. P. 228–234.
20. Baltzer L.H., Mattsby-Baltzer I. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 3570–3573.
21. Frankel E.N., Garwood R.F., Khambay B.P.S., Moss G.P., Weedon B.C.L. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1984. P. 2233–2244.
22. Silipo A., Lanzetta R., Garozzo D., Lo Cantore P., Iacobellis N.S., Molinaro A., Parrilli M., Evidente A. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 2498–2505.
23. Reyes E.D., Carballeira N.M. // Synthesis. 1997. V. 10. P. 1195–1198.
24. Горбач В.И., Исаков В.В., Кулеш Ю.Г., Лукьянов П.А., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. С. 81–86.
25. Corsaro M.M., Piaz F.D., Lanzetta R., Parrilli M. // J. Mass Spectrom. 2002. V. 37. P. 481–488.

26. Corsaro M.M., Lanzetta R., Parrilli E., Parrilli M., Tutino M.L. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 5092–5097.
27. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов / Ред. Кочетков Н.К. М.: Мир, 1967. С. 325–332.
28. Кульшин В.А., Яковлев А.П., Аваева С.Н., Дмитриев Б.А. // Мол. генет. микробиол. вирусология. 1987. Т. 5. С. 44–46.
29. Sawardeker J.S., Stoneker J.H., Jeanes A. // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1604.
30. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. // J. Chromatog. 1975. V. 114. P. 129–141.
31. Zaehring U., Salvetzky R., Lindner B., Ulmer A. // J. Endotoxin Res. 2001. V. 7. P. 133–146.

Elucidation of Structure of Lipid A from the Marine Gram-Negative Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393^T

I. N. Krasikova[#], N. V. Kapustina, V. V. Isakov,
N. M. Gorshkova, and T. F. Solov'eva

[#]Phone: +7 (4232) 31-0719; fax: +7 (4232) 31-4050; e-mail: innakras@piboc.dvo.ru
Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

The chemical structure of lipid A from the marine γ -proteobacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393^T, a main product of lipopolysaccharide hydrolysis (1% AcOH), was determined using chemical methods and NMR spectroscopy. The lipid A was shown to be β -1,6-glucosaminobiose 1,4'-diphosphate acylated with two (*R*)-3-hydroxyalkanoic acid residues at C3 and C3' and amidated with one (*R*)-3-hydroxydodecanoyl and one (*R*)-3-dodecanoyloxylododecanoyl residue at N2 and N2', respectively. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: ¹H, ³¹P, ¹³C NMR spectroscopy, lipid A, lipopolysaccharide, marine Gram-negative bacterium, *Pseudoalteromonas haloplanktis*