

УДК 547.915.5+576.311.347

И. Л. ЮРКОВА¹,
Ю. АРНХОЛЬД²**ИЗУЧЕНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ
ФРАГМЕНТАЦИИ ЛИПИДОВ
В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ *E. COLI* МЕТОДОМ
МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**¹НИИ физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

²Институт медицинской физики и биофизики Лейпцигского университета,
Лейпциг, Германия

Escherichia coli, наиболее изученные прокариоты, служат модельными объектами при исследовании фундаментальных жизненных процессов, в том числе окислительного стресса в биосистемах. Мембраны *E. coli* содержат три основных фосфолипида: фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин (ФГ) и кардиолипин (КЛ). ФГ и КЛ способны подвергаться свободнорадикальной фрагментации в полярной части. Ключевой стадией этого процесса является распад α -гидроксилсодержащих углеродцентрированных радикалов с разрывом двух β -связей. Методом МАЛДИ масс-спектрометрии в комбинации с тонкослойной хроматографией было установлено, что действие систем $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ /аскорбат на модельные мембраны *E. coli* сопровождается накоплением фосфатидной кислоты. Полученные результаты в совокупности с данными по радиолizu сходных соединений указывают на то, что источником фосфатидной кислоты является фрагментация ФГ и КЛ, индуцированная радикалами HO^\bullet в их полярной части.

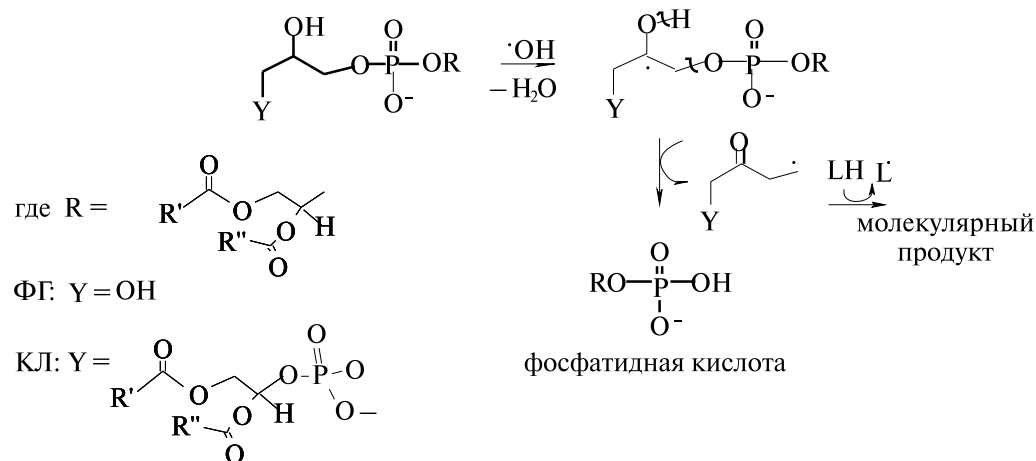
Escherichia coli, one of the best-characterized prokaryotes, has served as a model organism for studies of fundamental life processes including oxidative stress in biosystems. *E. coli* membranes contain three major phospholipids: phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol (PG) and cardiolipin (CL). PG and CL can undergo free-radical fragmentation in the polar part. The key stage of this process is the decomposition of α -hydroxyl-containing carbon-centered radicals involving a rupture of two β -bonds. It has been shown using MALDI-TOF mass-spectrometry and its combination with thin-layer chromatography that the action of the $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ /ascorbate systems on model *E. coli* membranes results in the formation of phosphatidic acid. These data, when combined with the results obtained on radiolysis of similar substances, allowed us to conclude that the formation of phosphatidic acid occurs via an HO^\bullet -induced fragmentation taking place in polar moiety of PG and CL.

Ключевые слова: фосфолипиды, кардиолипин, фосфатидная кислота, активные формы кислорода, свободнорадикальная фрагментация липидов, *E. coli*, МАЛДИ масс-спектрометрия.

Keywords: phospholipids, cardiolipin, phosphatidic acid, reactive oxygen species, free-radical fragmentation of lipids, *E. coli*, MALDI-TOF mass spectrometry.

Грамм-негативные бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) служат модельными объектами при исследовании фундаментальных жизненных процессов, в том числе и при изучении путей развития окислительного стресса в биосистемах [1]. Известно [2, 3], что нарушение баланса окислители/антиокислители в организме сопровождается чрезмерным образованием активных форм кислорода (АФК), способных повреждать компоненты клетки (белки, ДНК, липиды). Нарушение функций прокариотических клеток, индуцированных АФК, объясняют свободнорадикальными повреждениями белков и ДНК [1]. Что касается липидов, то при их взаимодействии с АФК свободнорадикальные процессы могут протекать как в липофильной (пероксидное окисление), так и в гидрофильной (свободнорадикальная фрагментация) частях бислюя [4]. Пероксидирование бактериальных липидов остается предметом дискуссий, так как полиненасыщенные жирные кислоты, основные субстраты указанного процесса, найдены в очень низких концентрациях в мембранах прокариот дикого типа [1]. Тем не менее за последние несколько лет появились сообщения о том, что процесс пероксидного окисления липидов может быть физиологически важным в бактериях определенных штаммов [5]. Возможное развитие свободнорадикальных реакций в полярной части мембран бактерий без участия ферментов в литературе не обсуждается.

Основными компонентами бактериальных мембран *E. coli* являются следующие фосфолипиды: фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидил-глицерин (ФГ) и кардиолипин (КЛ) [6]. Анионные КЛ и ФГ содержат свободные гидроксильные группы в β -положении к фосфоэфирной связи и могут подвергаться процессу свободнорадикальной фрагментации с образованием фосфатидной кислоты (ФК) согласно ниже приведенной схеме [2]:



Целью данной работы было установить возможность протекания свободнорадикальной фрагментации фосфолипидов в модельных мембранах *E. coli*, подвергнутых воздействию систем $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$. Природные фосфолипиды представляют собой пулы из большого числа молекулярных видов с одинаковой полярной частью и различным жирнокислотным составом. Для исследований свободнорадикальных превращений в сложных липидных системах была использована времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией и ионизацией пробы при содействии матрицы (МАЛДИ МС). МАЛДИ МС позволяет переводить высокомолекулярные нелетучие молекулы в газовую фазу в виде неповрежденных ионов [7]. Это позволяет получить прямую и полную информацию как о составе жирнокислотных остатков в молекуле липида, так и о составе сложной смеси липидов.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали липидные экстракты из *E. coli* от фирмы «Avanti Polar Lipids Inc.» (Alabaster, США), которые содержали 67 % ФЭ, 23,2 % ФГ и 9,8 % КЛ. Фосфатидная кислота, выделенная из фосфатидилхолина яичных желтков, была получена от фирмы «Sigma-Aldrich» (Deisenhofen, Германия).

Мультиламеллярные липосомы готовили из липидных экстрактов *E. coli* методом гидратации тонких липидных пленок [8].

Свободнорадикальные процессы инициировали с помощью редокс-систем $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$. К водным суспензиям липидов добавляли FeCl_2 или CuSO_4 , H_2O_2 и аскорбиновую кислоту в количествах, необходимых для получения нужной концентрации каждого, далее образцы термостатировали при температуре 37 °С в течение необходимого времени. Общепринято [3], что металл-катализируемое разложение гидропероксида в реакциях Фентона или Хабера – Вайсса приводит к образованию активных радикалов HO^\bullet , высоко реакционноспособных частиц.

Липиды, выделенные из исследуемых образцов, разделяли с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Аликвоту хлороформного экстракта из липосом наносили на ВЭТСХ-пластинки, покрытые силикагелем Н 60 с толщиной слоя 0,2 мм (Merck, Darmstadt, Германия), которые элюировали в системе хлороформ : метанол : 25 % водный аммиак (в объемном соотношении 65 : 35 : 8). Для разделения ФГ от других фосфолипидов *E. coli* в качестве элюента использовали смесь растворителей хлороформ : метанол : уксусная кислота (в объемном соотношении 65 : 25 : 10). Липидные пятна на ВЭТСХ-пластинках идентифицировали в УФ ($\lambda = 366 \text{ нм}$) после обрызгивания пластинок раствором примулина (5 мг примулина растворяли в 100 см³ смеси ацетон : вода (в объемном соотношении 4 : 1)). Примулин не разруша-

ет липиды, что позволяет анализировать их с помощью масс-спектрометрии после экстракции из силикагеля пластинок.

Все спектры были получены с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра (Bruker Daltonik GmbH, Германия), в котором используется азотный лазер, излучающий при $\lambda = 337$ нм. Все измерения проводили *DE*-способом (*delayed extraction conditions*) с использованием рефлектора, дающим высокое разрешение по массам и высокую точность определения масс. В качестве матрицы использовали 0,5 М раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, содержащий 0,1 % трифторуксусной кислоты. Анализ выполнен в режиме регистрации положительных ионов: детектировали молекулярные ионы, образующиеся путем присоединения к молекуле субстрата протона ($M + H^+$) или иона натрия ($M + Na^+$). Согласно стехиометрии образования положительно заряженных молекулярных ионов в условиях лазерного облучения в масс-спектрометре отрицательный заряд липидов компенсируется положительно заряженными ионами. Молекула ФГ с одним отрицательным зарядом образует аддукт с двумя катионами, молекула ФК или КЛ с двумя зарядами – аддукт с тремя катионами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В состав модельных бактериальных мембран входят ФЭ, ФГ и КЛ, что подтверждается МАЛДИ МС. Полный спектр липидного экстракта *E. coli* представлен на рис. 1, а. В приведенном спектре пики в интервале масс 1400–1600 Да соответствуют КЛ, увеличенный фрагмент данной области спектра представлен на рис. 1, б. Молекулярные виды КЛ были определены с учетом того, что данный липид в МАЛДИ масс-спектрах характеризуется тремя основными аддуктами: $(КЛ + 2H + Na)^+$, $(КЛ + H + 2Na)^+$ и $(КЛ + 3Na)^+$. Согласно полученным спектральным данным КЛ представляет собой смесь молекулярных видов, различающихся длиной (16 или 18 атомов углерода) и степенью насыщенности ацильных остатков (табл. 1). В отличие от ФГ и ФЭ в составе молекулы КЛ содержится четыре ацильных остатка. Так, пики с $m/z = 1528,0$ и $m/z = 1550,0$ соответствуют молекулярному виду КЛ, у которого четыре ацильных остатка (18 : 1) (здесь и далее указано соотношение числа атомов С и двойных связей в ацильной цепи).

Пики ФЭ и ФГ находятся в интервале масс 700–800 Да и перекрываются, что затрудняет интерпретацию спектра. Для получения информации о жирнокислотном составе ФГ данный липид был отделен от других липидов с помощью ВЭТСХ и после экстракции из силикагеля проанализирован методом МАЛДИ МС (рис. 1, в). Основные пики на приведенном спектре характерны для аддуктов ФГ (16 : 0, 16 : 0), (16 : 0, 16 : 1), (16 : 0, 18 : 1), (18 : 1, 18 : 1) с ионами H^+ и Na^+ (см. табл. 1).

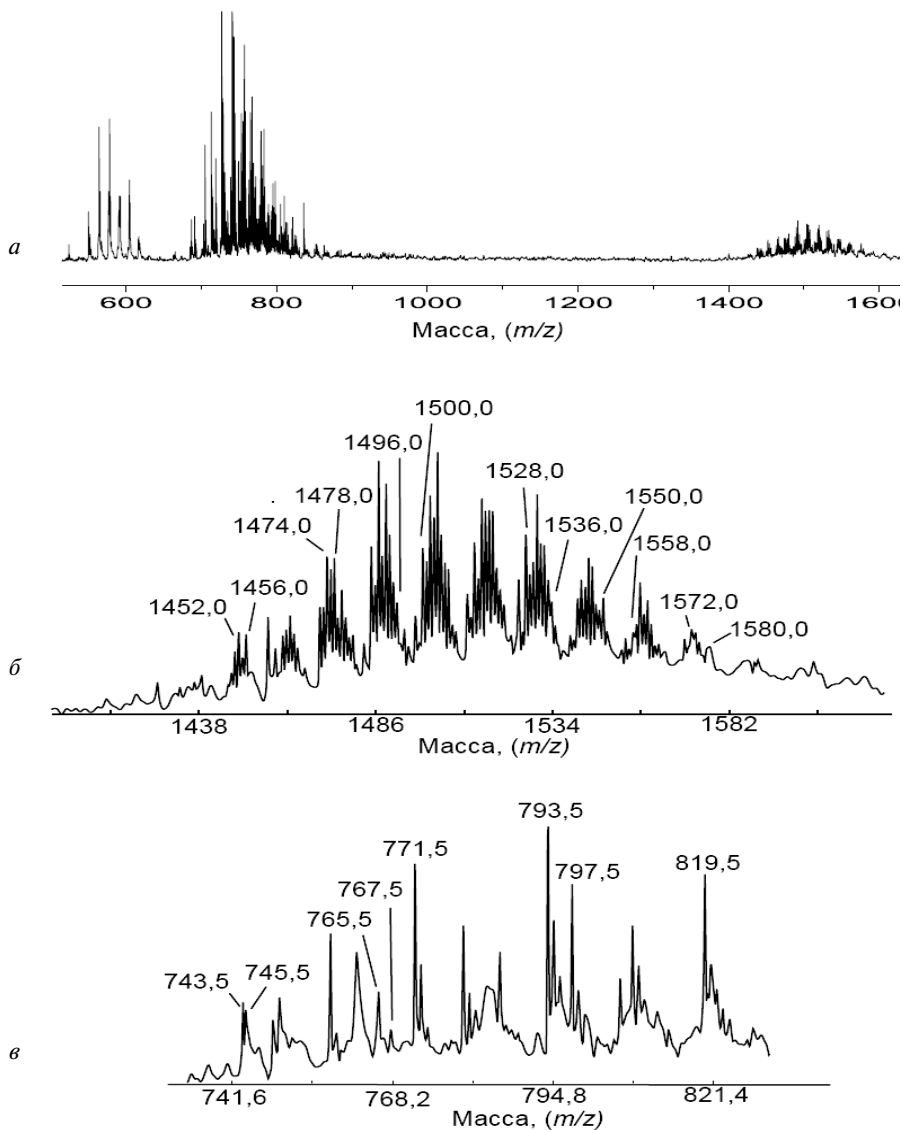


Рис. 1. МАЛДИ масс-спектры:
a, б – липидный экстракт, полученный из бактерий *E. coli*;
в – фосфатидил-глицерин бактерий *E. coli*; *б* – фрагмент спектра *a*
 в диапазоне масс 1400–1600 Да

Методом ВЭТСХ было установлено, что в модельной мембране после действия систем $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ (с соотношением компонентов 1 : 5 : 0,1 мМ) образуется новый липид, показатель R_f которого соответству-

ет стандартной ФК. В качестве стандарта была использована ФК, полученная с помощью ферментативной трансформации яичного фосфатидилхолина и представляющая собой пул из различных молекулярных видов.

Таблица 1

Описание пиков МАЛДИ масс-спектров бактериальных КЛ и ФГ и липида ФК, образующегося при действии системы Fe^{2+}/H_2O_2 /аскорбат (1 : 5 : 0,1 мМ) на модельные мембраны *E. coli*

Липид	Пик, m/z		
	$2H^+$, Na^+	$2Na^+$, H^+	$3Na^+$
КЛ			
4 x (18 : 1)	1528,0	1550,0	1572,0
2 x (16 : 0), 2 x (18 : 1)	1452,0	1474,0	1496,0
2 x (16 : 0), 2 x (18 : 0)	1456,0	1478,0	1500,0
4 x (18 : 0)	1536,0	1558,0	1580,0
ФГ	Na^+ , H^+	$2Na^+$	
16 : 0, 16 : 1	743,5	765,5	—
16 : 0, 16 : 0	745,5	767,5	—
16 : 0, 18 : 1	771,5	793,5	—
18 : 1, 18 : 1	797,5	819,5	—
ФК	$2H^+$, Na^+	$2Na^+$, H^+	$3Na^+$
16 : 0, 18 : 1	697,5	719,5	—
16 : 0, 18 : 0	—	721,5	743,4
18 : 1, 18 : 1	723,5	745,5	—
18 : 0, 18 : 1	725,5	747,5	—
18 : 0, 18 : 0	727,5	749,5	—

Из экспериментальных и литературных данных [4] следует, что в условиях $Fe^{2+}(Cu^{2+})$ -опосредованного генерирования радикалов HO^\bullet в модельных бактериальных мембранах образование ФК возможно в результате свободнорадикальной фрагментации, протекающей в полярной части КЛ и ФГ.

В соответствии со схемой свободнорадикальной фрагментации жирнокислотный состав продуктов реакции должен определяться ацильным составом субстрата. С целью подтверждения того, что источником ФК в исследуемых модельных мембранах при действии на них систем $Fe^{2+}(Cu^{2+})/H_2O_2$ /аскорбат являются ФГ и КЛ, был проведен анализ молекулярных видов этих фосфолипидов с помощью масс-спектрометрии.

В масс-спектре вновь образующегося липида (рис. 2, а) пики в области масс 690–760 Да по положению совпадали с таковыми в спектре стандартной ФК и соответствовали аддуктам ФК (16 : 0, 18 : 0), (16 : 0, 18 : 1), (18 : 0, 18 : 0), (18 : 0, 18 : 1), (18 : 1, 18 : 1) с ионами Na^+ и H^+ .

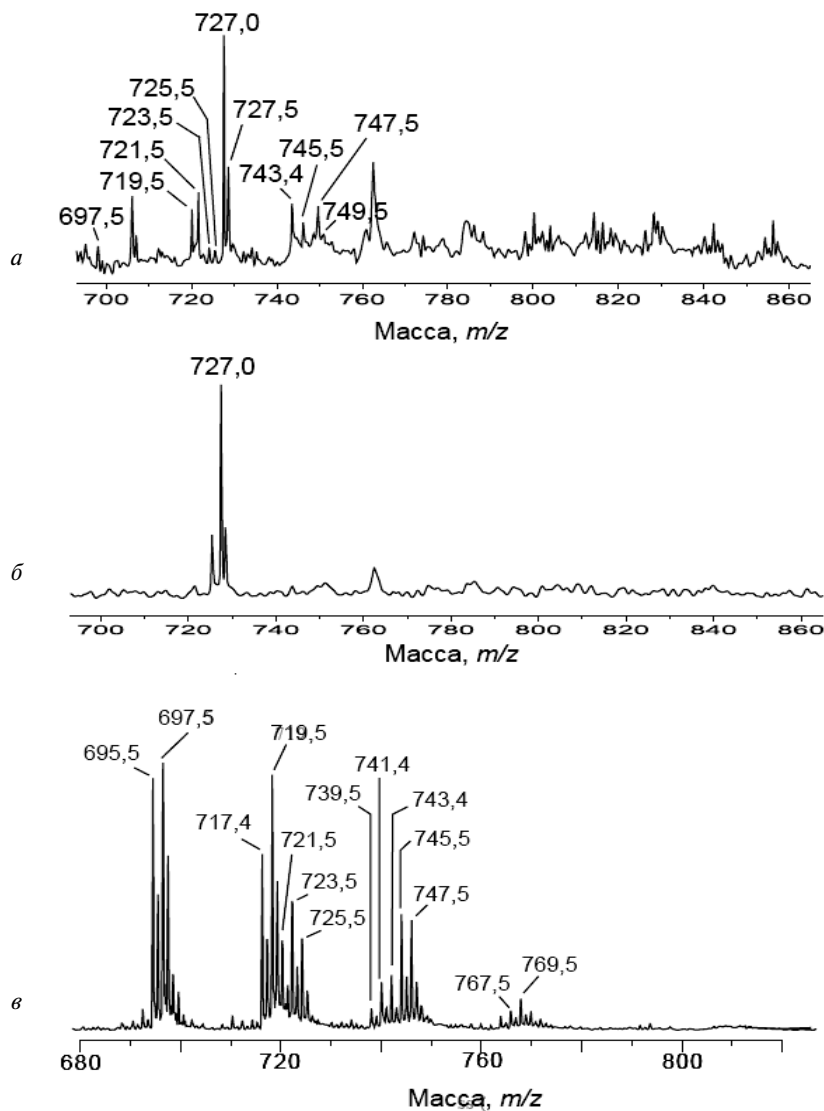


Рис. 2. МАЛДИ масс-спектр органического экстракта из силикагеля ВЭТСХ-пластинки, полученной для образцов модельной бактериальной мембраны после их термостатирования при 37 °С в течение 2 ч: а – с системой $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$; б – без добавок; в – стандартная ФК; б, в – силикагель из ВЭТСХ-пластинки высребался из зоны с R_f , характерным для стандартной ФК; интенсивность пиков матрицы (727,0) в спектрах одинакова

Спектр стандартной ФК представлен на рис. 2, в, описание пиков – в табл. 2. Спектр соответствующей зоны на ВЭТСХ-пластинке контрольного образца характеризуется наличием только пика матрицы (рис. 2, б). В спектре вновь образовавшегося продукта наблюдается также серия сигналов в более дальней области масс (790–860 Да), которые могут относиться к продуктам окисления. Согласно результатам МАЛДИ МС ацильный состав ФК находится в хорошем соответствии с таковым для КЛ и ФГ. Представляется маловероятным, что ФЭ может вносить вклад в образование ФК, так как данный липид не является субстратом свободнорадикальной фрагментации [4].

Таблица 2

Описание пиков МАЛДИ масс-спектра стандартной ФК, полученной из яичного фосфатидилхолина

Пик, m/z	Описание пика
695,5	ФК (16 : 0, 18 : 2) + 2H ⁺ + Na ⁺
697,5	ФК (16 : 0, 18 : 1) + 2H ⁺ + Na ⁺
717,4	ФК (16 : 0, 18 : 2) + H ⁺ + 2Na ⁺
719,5	ФК (16 : 0, 18 : 1) + H ⁺ + 2Na ⁺
721,5	ФК (16 : 0, 18 : 0) + H ⁺ + 2Na ⁺
723,5	ФК (18 : 1, 18 : 1) + 2H ⁺ + Na ⁺
725,5	ФК (18 : 0, 18 : 1) + 2H ⁺ + Na ⁺
739,5	ФК (16 : 0, 18 : 2) + 3Na ⁺ , ФК (16 : 1, 20 : 4) + H ⁺ + 2Na ⁺
741,4	ФК (16 : 0, 20 : 4) + H ⁺ + 2Na ⁺
743,4	ФК (16 : 0, 18 : 0) + 3Na ⁺
745,5	ФК (18 : 1, 18 : 1) + H ⁺ + 2Na ⁺
747,5	ФК (18 : 0, 20 : 4) + 2H ⁺ + Na ⁺ ; ФК (18 : 0, 18 : 1) + H ⁺ + 2Na ⁺
767,5	ФК (18 : 0, 18 : 2) + 3Na ⁺
769,5	ФК (18 : 0, 18 : 1) + 3Na ⁺ ; ФК (18 : 0, 20 : 4) + H ⁺ + 2Na ⁺

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Действие Fe²⁺(Cu²⁺)-содержащих редокс-систем на модельные мембраны *Escherichia coli*, состоящие на 33 % из гидроксилсодержащих фосфолипидов, сопровождается изменением исходного состава, а именно, появлением фосфатидной кислоты, обычно отсутствующей в мембранах бактерий дикого типа. Образование ФК указывает на реализацию свободнорадикальной фрагментации бактериальных кардиолипина и фосфатидилглицерина. Полученные результаты могут иметь значение при выборе *E. coli* в качестве биотехнологических объектов, в генно-инженерных экспериментах, когда изменения в составе мембраны бактерий могут иметь решающее значение при проведении исследований. Также полученные результаты способствуют более глубокому пониманию механизмов развития окислительного стресса в биосистемах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. *Cabrisol E., Tamarit J., Ros J.* // *Internat. J. Microbiol.* 2000. Vol. 3. P. 3–8.
2. *Adly A. M.* // *Res. J. Immunol.* 2010. Vol. 3, № 2. P. 129–145.
3. *Halliwell B., Gutteridge J. M. C.* *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: University press, 2012. 851p.
4. *Юркова И. Л.* // *Успехи химии.* 2012. Т. 81, № 2. С. 175–190.
5. *Hong R., Kang T. Y., Michels C. A., Gadura N.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78, № 6. P. 1776–1784.
6. *Morein S. Andersson A.-S., Rilfors L., Lindblom G.* // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 6801–6809.
7. *Schiller J., Arnhold J., Benard S.* [et al.] // *Anal. Biochem.* 1999. Vol. 267, № 1. P. 46–56.
8. *Bangham A. D., Standish M. M., Watkins M. M.* // *J. Molec. Biol.* 1965. Vol. 13, № 1. P. 238–252.

Поступила в редакцию 27.02.2013.