

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ДНК-СВЯЗАННЫХ ЛИПИДОВ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* ПО ДАННЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© Р. И. Жданов,^{1,*} Д. Керн,² В. Лоренц,² М. Я. Ибрагимова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,

²Институт аналитической химии и химии окружающей среды
и Университет им. Мартина Лютера, Халле-Виттенберг, Германия;

* электронный адрес: zrenad@gmail.com

В работе впервые реализован подход к определению липидома хроматина прокариотической клетки, основанный на изучении липидного состава ДНК-связанных липидов методом электроспрей-ионизации с использованием масс-спектрометрии (ESI-LC-MS). Этим методом мы обнаружили кислоты 16 : 0 и 18 : 1, содержащиеся в первой липидной фракции (слабо связанные с ДНК), и кислоты 14 : 0, 16 : 1 и 18 : 2, содержащиеся во второй липидной фракции (прочно связанные с ДНК).

Ключевые слова: *Pseudomonas aurantiaca*, ДНК-связанные липиды, жирные кислоты, масс-спектрометрия.

Принятые сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ESI-LC-MS — электроспрей-ионизация с использованием масс-спектрометрии.

Целью нашей работы явилось определение жирнокислотного состава прочно и слабо связанных с ДНК липидов *Pseudomonas aurantiaca* по данным масс-спектрометрии. Липидомика заняла прочное место в постгеномных науках, однако в используемых протоколах исследования липидома не учитывается особая группа липидов, а именно липиды, прочно связанные с ДНК (Carvalho et al., 2012). Тем не менее изучение таких ДНК-связанных липидов может представлять большой интерес в связи с данными о сигнальной роли липидов в клетке (Albi, Viola Magni, 2004) и регуляции активности генов липидами (Jump, 2004; Hannun, Obeid, 2008). Данных о жирнокислотном профиле ДНК-связанных липидов до настоящего времени очень мало. Мы изучили липидный состав фракций ДНК-связанных липидов методом масс-спектрометрии с использованием электроспрей-ионизации (ESI-LC-MS). Обнаружены жирные кислоты 16 : 0 и 18 : 1 (спирторастворимая фракция 1) и 14 : 0, 16 : 1 и 18 : 2 (прочносвязанные липиды — фракция 2).

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали штамм грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aurantiaca* ВКМ В-1558 в стационарной фазе роста (48 ч), выращенной на синтетической питательной среде.

Препараты высокомолекулярной ДНК выделяли фенольным методом (Zhdanov et al., 2006). Две фракции ДНК-связанных липидов из высокомолекулярной ДНК были выделены в соответствии с описанным ранее методом (Стражевская и др., 2009). Масс-спектры пиков фракций ДНК-связанных липидов 1 и 2 регистрировали на

масс-спектрометре API2000 модели LC-ESI-MS (Applied Biosystems, США) (turbo spray) в режиме отрицательной (negative mode, -Q1) или положительной (positive mode, +Q1) ионизации при 350 °С. Растворители из липидных фракций удаляли и высушивали под вакуумом. Осадки фракций 1 и 2 растворяли в 500 мкл смеси хлороформ/метанола (2 : 1) и наносили на колонку ВЭЖХ модуля RPC18 с обращенной фазой. В качестве стандарта использовали наразин (nazarin) с формулой C₄₃H₇₂O₁₁ и мол. массой 765.05 г·моль⁻¹; в режиме положительной ионизации прибор регистрирует пик с m/z 765.

Использованные реактивы: фенол, хлороформ, метанол, этанол, хлорид натрия, гидроксид натрия, магний хлористый (Merck, Германия) и ДНКаз 1 (Koch Light, Англия).

Результаты и обсуждение

Ранее было показано существование определенных базовых жирнокислотных остатков после гидролиза фракций ДНК-связанных липидов (Стручков, Стражевская 1993; Стражевская и др., 2009; Zhdanov et al., 2006). Для разделения суммарных липидов фракций 1 и 2 ДНК-связанных липидов мы использовали ВЭЖХ в сочетании с методом ESI-LC-MS. Методом ВЭЖХ (LC) с элюцией смесью ацетонитрил : вода (9 : 1) липиды разделяли на колонке RPC18 по их полярности, а масс-спектрометрический метод (ESI-MS) позволил измерить масс-спектры компонентов фракций в различных режимах ионизации.

В масс-спектрах после разделения суммарной фракции 1 ДНК-связанных липидов методом ВЭЖХ (время

выхода 8.38—8.83 мин) (ESI-LC-MS, negative mode, pH 7.0, ацетонитрил : вода, 9 : 1) нами обнаружены пики, соответствующие карбоксилат-анионам свободных жирных кислот. Этими кислотами (в диапазоне от C10 до C20) оказались пальмитиновая (C16 : 0) (m/z 255.4; теоретическая масса аниона для $C_{16}H_{31}O_2 = 255.4228$) и олеиновая (C18 : 1) (m/z 281.4; теоретическая масса аниона для $C_{18}H_{33}O_2 = 281.4601$) кислоты, являющиеся базовыми не только для общих, но и для ДНК-связанных липидов *P. aurantiaca*. Причем в пике со временем выхода 8.380 мин элюировалась лишь пальмитиновая кислота, в пике со временем выхода 8.606 мин — обе кислоты, C16 : 0 и C18 : 1, а с пиком 8.832 мин выходила лишь олеиновая кислота 18 : 1. В отличие от фракции 1 во фракции 2 ДНК-связанных липидов были обнаружены 14 : 0 (m/z 227.3; теоретическая масса аниона для $C_{14}H_{27}O_2 = 227.3578$), 16 : 1 (m/z 253.4; теоретическая масса аниона для $C_{16}H_{29}O_2 = 253.4068$) и 18 : 2 (m/z 279.4; теоретическая масса аниона для $C_{18}H_{31}O_2 = 279.4428$) кислоты (негативный режим). При позитивном режиме регистрации масс-спектрометра, как и следовало ожидать, не было зарегистрировано никаких пиков, соответствующих жирным кислотам. В предыдущих работах, посвященных изучению жирнокислотного профиля ДНК-связанных липидов *P. aurantiaca* (Стражевская и др., 2009), мы не привели данных по содержанию линолевой кислоты 18 : 2, хотя она и была обнаружена в следовых количествах, желая получить дополнительные доказательства этого факта с помощью метода масс-спектрометрии.

В масс-спектре ESI-MS (positive mode) пиков, соответствующих карбоксилат-ионам 3-гидрокси жирных кислот, 3-OH 10 : 0 и 3-OH 12 : 0, обнаружено не было. Это свидетельствует в пользу того, что в этих липидных фракциях отсутствуют 3-гидрокси жирные кислоты, маркерные для этого таксона *Pseudomonas*, и, следовательно, ДНК-связанные липиды являются отдельной фракцией липидов, отличной от общих липидов *P. aurantiaca*.

Таким образом, в данной работе реализован подход к исследованию липидома хроматина прокариотической клетки, основанный на изучении липидного профиля ДНК-связанных липидов методом электроспрей-ионизации с использованием масс-спектрометрии (ESI-LC-MS). Этим методом мы обнаружили кислоты 16 : 0, 18 : 1 (фракция 1) и 14 : 0, 16 : 1, 18 : 2 (фракция 2).

Авторы выражают благодарность д. б. н. А. Л. Мулюкину (ИМ РАН, Москва), к. б. н. А. С. Шмыриной и

к. б. н. Н. Б. Стражевской (НИИОПП РАМН, Москва) за помощь в экспериментах, а также проф. Ю. Шиллеру (Институт медицинской физики и биофизики медицинского факультета Университета г. Лейпцига, Германия) за обсуждение отнесения пиков липидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-03-97089-р_поволжье), гранта Фонда им. А. фон Гумбольдта № V-8121/RUS/1032332 (Бонн, Германия) (Р. Ж.), гранта Земли «Верхняя Саксония» и Университета им. Мартина Лютера (Martin-Luther University Halle-Wittenberg) для инициативных проектов, а также гранта Минобрнауки РФ-КФУ 2012—2014 гг. № 12-26 НД02.

Список литературы

- Стражевская Н. Б., Мулюкин А. Л., Шмырина А. С., Краус А., Лоренц В., Жданов Р. И., Эль-Регистан Г. И. 2009. Различия жирнокислотного профиля ДНК-связанных липидов *Pseudomonas aurantiaca* в зависимости от физиологического возраста бактерий. Микробиология. 78 (1) : 48—55. (Strazhevskaya N. B., Mulyukin A. L., Shmyrina A. S., Kraus A., Lorentz V., Zhdanov R. I., El'-Registan G. I. 2009. Characteristics of *Pseudomonas aurantiaca* DNA supramolecular complexes at various developmental stages. Microbiology. 78 (1) : 48—55.)
- Стручков В. А., Стражевская Н. Б. 1993. ДНК-связанные липиды: состав и возможные функции. Биохимия. 58 (8) : 1154—1175. (Struchkov V. A., Strazhevskaya N. B. 1993. DNA-binding lipids: composition and possible functions. Biochemistry. 58 (8) : 1154—1175.)
- Albi E., Viola Magni M. P. 2004. The role of intranuclear lipids. Biol. Cell. 96 : 657—667.
- Carvalho M., Sampaio J. L., Palm W., Brankatschk M., Eaton S., Shevchenko A. 2012. Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome. J. Mol. Syst. Biol. 8 : 600.
- Hannun Y. A., Obeid L. M. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 : 139—150.
- Jump D. B. 2004. Fatty acid regulation of gene transcription. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 41 : 41—78.
- Zhdanov R. I., Shmyrina A. S., Zarubina T. V., Mulyukin A. L., El-Registan G. I., Haupt N., Kraus A., Lorenz W. 2006. The nature of DNA-bound fatty acids in *Pseudomonas aurantiaca*. FEMS Microbiol. Lett. 265 : 151—158.

Поступила 4 II 2014

FATTY ACID PROFILE OF *PSEUDOMONAS AURANTIACA* DNA-BOUND LIPIDS ACCORDING TO ESI-LC-MS MASS-SPECTROMETRY

R. I. Zhdanov¹, * D. Kern,² W. Lorenz,² M. Ya. Ibragimova¹

¹ Chair of Biochemistry, Kazan (Volga Region) Federal University, and ² Institute of Analytical and Environmental Chemistry, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; * e-mail: zrenad@gmail.com

Approach to the study of prokaryotic chromatin lipidome has been realized based on analysis of fatty acid profile of DNA-bound lipids using electrospray ionization mass spectrometry ESI-LC-MS. By this method, we found 16 : 0 and 18 : 1 fatty acids, which are contained in the first fraction (weakly bound to DNA), and 14 : 0, 16 : 1 and 18 : 2 fatty acids, which are contained in the second fraction (strongly bound to DNA).

Key words: *Pseudomonas aurantiaca*, DNA-bound lipids, fatty acids, mass spectrometry.