

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики
УНЦ физико-химической биологии СГУ и ИБФРМ РАН

ЛИПОПОЛИСАХАРИД *AZOSPIRILLUM ZEAЕ* N7^T: СТРУКТУРА И
ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА С БЕЛКАМИ НАРУЖНОЙ
МЕМБРАНЫ

АВТОРЕФЕРАТ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Студентки 5 курса 531 группы
Специальности 06.05.01 Биотехнология и биоинформатика
Биологического факультета
Потаповой Оксаны Александровны

Научный руководитель:

д.б.н., профессор



30.05.2019

С. А. Коннова

Научный консультант:

к.б.н., с.н.с. ИБФРМ РАН

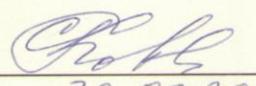


30.05.2019

Е. Н. Сигида

Заведующий кафедрой:

д.б.н., профессор



30.05.2019

С. А. Коннова

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

С развитием науки, в особенности биологических направлений, все больший интерес для сельского хозяйства стал проявляться к разработке и применению биологических удобрений. Однако во многих работах по исследованию стимуляции роста растений бактериями отмечается, что эффективность применения микроорганизмов в качестве удобрений может быть затруднена в условиях реальных сельскохозяйственных полей. Штаммы, которые показывают высокие результаты в стерильных условиях лаборатории, не проявляют рост-стимулирующих свойств при воздействии на них факторов среды и других микроорганизмов почвы.

Несмотря на большое число работ, посвященных изучению механизма взаимодействия растений и микроорганизмов, особенности молекулярных контактов до сих пор не до конца проанализированы. В связи с этим требуется более тщательное и обширное изучение рост-стимулирующих бактерий и их внешних структурных компонентов, которые первыми вступают в контакт с корнями растений. Для успешного прогнозирования образования и развития таких ассоциаций необходимо пополнение объема знаний о структуре компонентов внешних мембран бактерий.

Одним из модельных объектов изучения растительно-микробных ассоциаций выступают бактерии рода *Azospirillum* в связи с их неспецифичностью к растениям-хозяевам. Поскольку среди азоспирилл наиболее изученными в химическом и генетическом плане являются всего несколько видов, в своей работе мы сосредоточились на ранее не исследованном виде *Azospirillum zeae*.

Объект исследования: липополисахариды (ЛПС) бактерий *Azospirillum zeae* N7^T, выделенных из ризосферы кукурузы. Это грамотрицательные свободноживущие подвижные спириллы, N₂-зависимый рост которых происходит при микроаэрофильных условиях. Они способны получать углерод и азот из нескольких источников и вступать в ассоциации

со злаками и другими растительными семействами, не индуцируя образование клубеньков [1]. Липополисахариды являются главными компонентами наружной мембраны и состоят из трех различающихся доменов, ковалентно соединенных друг с другом: гликолипидного домена под названием липид А, гликана – О-специфического полисахарида – и корового олигосахарида между ними [2]. ЛПС выполняют множество функций, например, защита от разрушающих агентов, адгезия к корням растений, а также они являются фактором патогенности. При определенных условиях культивирования на поверхности бактерий образуется капсульный полисахарид (КПС) [3]. В наружной мембране грамотрицательных бактерий помимо ЛПС содержатся также белки порины, отвечающие за поддержание целостности внешней мембраны, за модификацию ЛПС и за транспорт метаболитов. Стабильность и защитные функции внешней мембраны поддерживаются не только ЛПС и поринами по отдельности, но также благодаря образованию ЛПС-Omp комплексов [4, 5].

Цель работы: выявление структурных особенностей липополисахарида (ЛПС) типового штамма бактерий *A. zeae* N7^T и идентификация его взаимодействия с преобладающими белками внешней мембраны в составе бактериальной капсулы.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) получение препаративных количеств липополисахарида и липополисахарид-белкового комплекса из капсульного полисахарида бактерий *A. zeae* N7^T и установление их биополимерного состава;
- 2) анализ молекулярной гетерогенности препарата ЛПС, состава жирных кислот липида А и структуры повторяющихся звеньев О-специфического полисахарида (ОПС) *A. zeae* N7^T;
- 3) моделирование взаимодействия ЛПС и белков внешней мембраны *A. zeae* N7^T.

Бактерии культивировались в оптимальных для роста условиях, после чего клетки были отмыты от капсульного материала, высушены ацетоном.

ЛПС изолировали из внешней мембраны экстракцией горячим 45% фенолом. Биополимерный состав ЛПС и КПС установлен общепринятыми колориметрическими методами, гетерогенность препаратов по молекулярной массе охарактеризована электрофорезом. Жирные кислоты в ЛПС идентифицированы методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) метиловых эфиров жирных кислот, а их распределение в липиде А установлено методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии с времяпролетным масс-анализатором. ОПС и липид А выделяли деградацией ЛПС в мягких кислотных условиях. ОПС очищали гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50. Моносахаридный состав липида А идентифицирован ГЖХ ацетилированных метилгликозидов, ОПС – ГЖХ ацетатов полиолов и ацетилированных 2-(S)-октигликозидов. Структура повторяющихся звеньев ОПС установлена на основании анализа 1D и 2D ^1H и ^{13}C спектров ЯМР. Взаимодействие ЛПС и поринов моделировали при помощи молекулярного докинга в программе Nex 8.0.0.

Структура дипломной работы: работа состоит из введения, основной части, включающей результаты и их обсуждение, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 33 источников, он состоит из трех глав: характеристика рост-стимулирующих ризобактерий, характеристика азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum*, строение внешней мембраны грамотрицательных бактерий.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Бактерии рода *Azospirillum* относятся к α -подклассу протеобактерий семейства Rhodospirillaceae. Штамм *A. zeae* N7^T был выделен из ризосферы кукурузы *Zea mays* в Канаде и предоставлен нам для исследования коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Выход ЛПС после водно-фенольной экстракции сухих бескапсульных клеток составил 6,95%. В составе ЛПС было установлено содержание

характерных для данных гликополимеров компонентов: углеводов ($75,6 \pm 5,9\%$), КДО ($1,50 \pm 0,01\%$), а также 3-гидроксилированных жирных кислот. Анализ содержания белков по методу Бредфорда выявил $\sim 10\%$ белков, которые, не детектировались методом электрофореза при окрашивании Кумасси R-250. Электрофорез в ПААГ с окрашиванием нитратом серебра продемонстрировал наличие высокомолекулярных S-форм ЛПС, содержащих ОПС (рисунок 1).

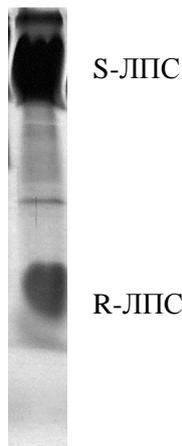


Рисунок 1 – Электрофореграмма ЛПС *A. zeae* N7^T (окраска нитратом серебра)

Мягким кислотным гидролизом ЛПС с последующим осаждением липида А и фракционированием супернатанта гель-фильтрацией был выделен О-специфический полисахарид с выходом 43%. В составе ОПС выявлено присутствие L-Rha и D-Glc в ОПС соотношении $\sim 3:1$.

^{13}C ЯМР спектр содержал сигналы четырех аномеров при δ 99,8–105,3, сигналы метильных групп (С-6 Rha) при δ 17,8–18,0, сигналы О-ацетильной группы при δ 22,2 (CH_3) и δ 175,5 (CO), сигнал CH_2OH группы (С-6 Glc) при δ 62,2 и сигналы остальных углеродов моносахаридных колец при δ 70,3–81,3. Отсутствие в спектре в диапазоне δ 82–88 свидетельствовало о том, что моносахаридные остатки являются пиранозидами [6].

Сигналы ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров были отнесены с помощью двумерной спектроскопии $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и HMBC). На основании внутризвеньевых Н,Н и Н,С корреляций и $^3\text{J}_{\text{H,H}}$ констант спин-спинового взаимодействия, были идентифицированы спин-спиновые

системы четырех моносахаридов. Спектр TOCSY продемонстрировал наличие H-1/H-2, H-2/H-3,4,5 и H-6/H-5,4,3 кросс-пиков для трех остатков Rha и H-1/H-2,3,4,5 и H-2/H-3,4,5 кросс-пики для остатка Glc. Сигналы внутри каждой спин-спиновой системы были отнесены с помощью спектров COSY. Альфа-конфигурация остатков рамнозы и бета-конфигурация остатка глюкозы была установлена на основании химических сдвигов сигналов C-5 при сравнении с литературными данными [6].

На основании проведенных исследований была установлена структура повторяющегося звена ОПС *A. zeae*: три остатка рамнозы в основной цепи и терминальный остаток глюкозы (рисунок 2). На основании интегральной интенсивности сигналов в ¹H ЯМР спектре была установлена степень ацетилирования одного из остатков рамнозы, составлявшая 70-75%.

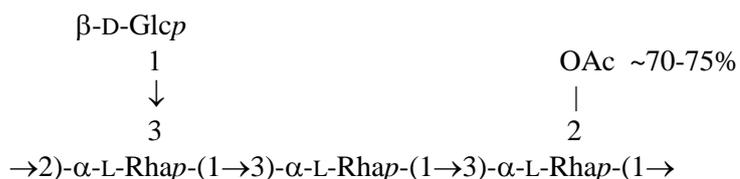


Рисунок 2 – Строение повторяющихся звеньев ОПС *A. zeae*

Данная структура ОПС встречается также у бактерий *A. lipoferum* SpBr17 (степень ацетилирования 90%), SR5, SR16, SR38, SR61, SR66, SR98 (степень ацетилирования 60-65%) [7].

Анализ жирных кислот позволил установить, что в составе липида *A. zeae* преобладали 3-ОН-C14:0 (62,45%) и 3-ОН-C16:0 (28,2%), в меньшем количестве присутствовали C16:1 (3,1%), C18:1 (3,7%) и C19:0 (0,25%). В результате анализ ЛПС, дезацелированного в мягких щелочных условиях, выявлено снижение содержания 3-ОН-C14:0, что свидетельствовало о том, что эта кислота является первичной O-связанной.

В составе липида *A. zeae* были идентифицированы GlcN и GalA в соотношении 2:1. Состав и содержание ЖК *A. zeae*, а также моносахаридный состав липида *A* схожи с таковыми у бактерий *A. lipoferum* SpBr17 [8]. В МАЛДИ масс-спектре липида *A*, записанном в режиме рефлектрона,

присутствовали три обособленных группы $[M-H]^-$ ионов с наиболее интенсивными сигналами в каждой группе при m/z 1249.9, 1476.1 и 1712.4, которые соответствовали три-, тетра- и пентаацильным типам с двумя остатками GlcN, остатком GalA, 3-ОН-С16:0, 3-ОН-С14:0 и С16:1. Гетерогенность сигналов внутри каждой группы подтверждалась характеристичной для липида А разницей масс между пиками 14, 28 и 26 а.е.м., соответствующие разницей в одно или два $-CH_2-$ звена между насыщенными жирными кислотами и одно звено $-CH_2-$ звено между насыщенной и мононенасыщенной жирной кислотой. Разница в 226 а.е.м. между тетра- и пентаацильными типами соответствовала остатку 3-ОН-С14:0, а разница 236 а.е.м. между три- и тетраацильными типами – остатку С16:1. МАЛДИ масс-спектр положительных ионов липида А, записанный в режиме рефлектрона, содержал соответствующие сигналы натриевых аддуктов $[M+Na]^+$ для три-, тетра- и пентаацильных типов липида А.

Таким образом, на основании экспериментальных и литературных данных [7, 8] была установлена структура липида А, пентаацильная форма которой представлена на рисунке 3.

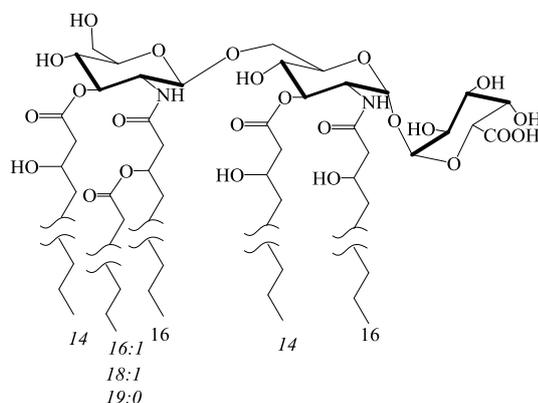
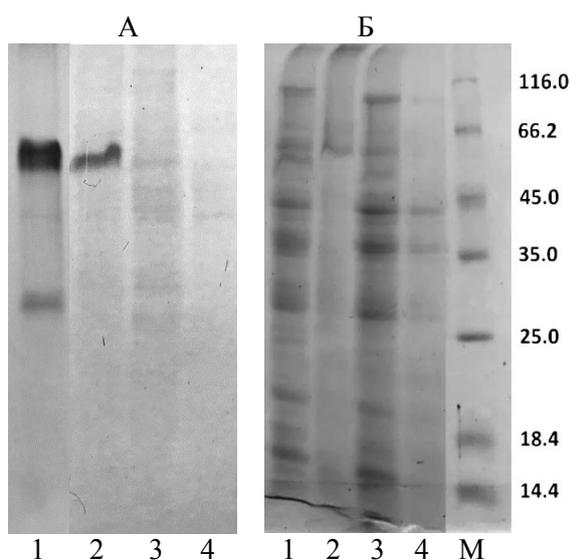


Рисунок 3 – Структура пентаацильного липида А *A. zeae*

Сходная *A. zeae* структура липида А была установлена для бактерий *A. lipoferum* SpBr17 [8], однако в его составе не обнаружена вторичная С19:0 кислота.

Известно, что КПС *A. brasiliense* и *A. lipoferum* представлены липополисахарид-белковыми и полисахарид-липидными комплексами [9].

При исследовании методом гель-фильтрации смывого с поверхности клеток *A. zeae* капсульного материала были выделены три фракции, содержащие углеводы, белки и КДО. Анализ электрофоретической подвижности выделенных фракций КПС *A. zeae* свидетельствовал о том, что в составе первой фракции присутствовали ЛПС и белки в широком диапазоне масс, в том числе характерные для внешней мембраны азоспирилл белки с молекулярной массой 42 кДа (OmaA) и 30 кДа (OmpW), выделенные и охарактеризованные из капсулы бактерий *A. brasilense* Sp245 (Евстигнеева С.С. с соавт, ИБФРМ РАН, неопубликованные данные). В виду консервативности белковых компонентов мембран в пределах бактериального рода дальнейшее моделирование структуры комплексов ЛПБК в составе капсулы было проведено для данных белков.



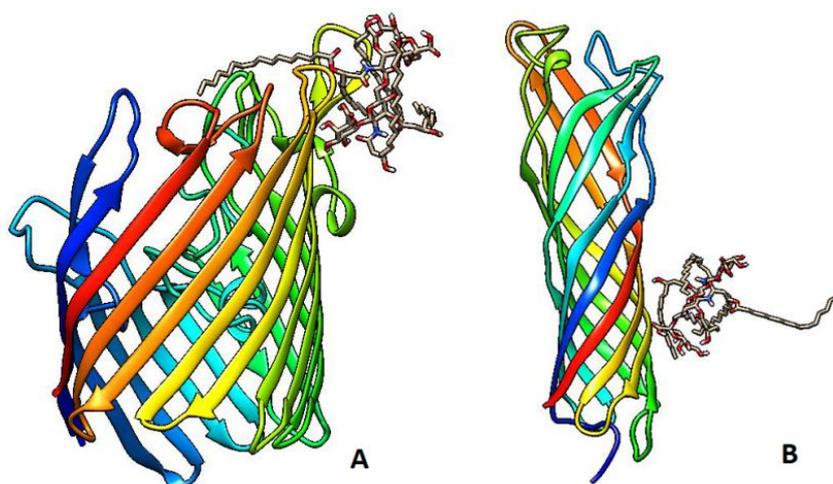
А – окрашивание на углеводы, Б – окрашивание на белки
 1 – КПС *A. zeae*, 2 – фракция I, 3 – фракция II, 4 – фракция III, 5 –
 белковый маркер, кДа

Рисунок 4 – Электрофореграмма с окраской геля Кумасси R-250

Первичные структуры указанных белков были получены из базы данных аминокислотных последовательностей Uniprot для бактерий *A. brasilense* Sp245. На основании трехмерных моделей было установлено, что белки внешней мембраны *A. zeae* OmaA и OmpW являются мономерами.

По литературным данным [4, 5], важная роль в построении комплексов ЛПС с белками внешней мембраны принадлежит липиду А. Для биоинформатического анализа нами был проведен анализ моделей пента-, тетра- и триацильных типов липида А с различными остатками вторичных жирных кислот (С16:1, С18:1 и С19:0). Данные модели были дополнены молекулами КДО в положении С6'. Также была построена модель моносахаридного остова с метильными группами вместо жирных кислот. При предварительной подготовке молекул в программе Nex 8.0.0 ЛПС и белки были расположены таким образом, что моносахаридный остов липида А и атомы кислорода в цепях жирных кислот были в наибольшем сближении с Lys и Arg исследуемых белков, участвующих во образовании комплекса. У каждого белка был выявлен один участок связывания.

По результатам молекулярного докинга было установлено, что количество атомов углерода в цепях вторичных ЖК не оказывает влияния на взаимодействие липида А и белков, однако общее количество остатков жирных кислот имеет критичное значение для образования комплекса, поскольку наличие дополнительного атома кислорода существенно влияет на энергию комплекса, в связи с образованием водородной связи с аминокислотными остатками белков. Таким образом, наиболее выгодные комплексы наблюдались для пентаацильных липидов А. Результаты молекулярного докинга белков внешней мембраны с три- и тетраацильными молекулами ЛПС показали, что энергия комплекса была значительно больше для обоих белков, что является менее выгодным. Самые большие значения энергии наблюдались при построении комплексов с молекулой, несущей метильные группы, вместо остатков жирных кислот. Присоединения КДО к липиду А не вызывало уменьшение внутренней энергии в комплексах. Результаты молекулярного докинга комплексов липида А и белков внешней мембраны представлены на рисунке 5 на примере пентаацильной формы липида А с гексадеценовой вторичной ЖК.



А – Комплекс липида А и OmpA, В – Комплекс липида А и OmpW

Рисунок 5 – Комплексы белков OmpA и OmpW с пентаацильными формами липида А (вторичная ЖК – С16:1), красным обозначены атомы кислорода

В сайтах взаимодействия, помимо лизина и аргинина, были также обнаружены тирозин и гистидин. Полученные данные коррелируют с результатами исследований [10, 11] взаимодействия ЛПС и белков внешней мембраны методами молекулярного докинга и рентгеноструктурного анализа бактерий *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas aeruginosa*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы было проведено культивирование бактерий *Azospirillum zeae* N7^T, выделены препараты ЛПС и капсульного полисахарида.

Установлен биополимерный состав ЛПС. Содержание углеводов составляло 75,6±5,9%, КДО 1,5±0,01%. Электрофорез показал преобладание S-форм молекул ЛПС.

Установлен профиль жирных кислот липида А. Преобладающими были 3-гидрокситетрадекановая (62,45%) и 3-гидроксигексадекановая (28,2%), минорными гексадеценная (3,1%), октадеценная (3,7%) и нонадекановая (0,25%) кислоты. Методом О-деацилирования установлено, что первичной

О-связанной кислотой является 3-гидрокситетрадекановая. Показано, что сахарный остов липида А представлен трисахаридом, содержащим два остатка глюкозамина и один остаток галактуроновой кислоты. Методом МАЛДИ масс-спектрометрии установлено наличие в составе ЛПС три-, тетра- и пентаацильных типов липида А.

Выделен препарат О-специфического полисахарида, для которого с помощью химических методов анализа, 1D и 2D ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии была установлена структура повторяющихся звеньев $\rightarrow 2[\beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow 3)]\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}2\text{OAc-(1}\rightarrow$.

В составе КПС *A. zeaе* был обнаружен комплекс молекул белковой и углеводной природы, среди которых с использованием колориметрических анализов и электрофореза были идентифицированы ЛПС и белки внешней мембраны OmaA и OmpW.

На основании данных о природе белковых компонентов в составе КПС были смоделированы третичные структуры белков внешней мембраны OmaA и OmpW, а также определен характер их взаимодействия с различными формами липида А *A. zeaе*. Показано, что внутренняя энергия комплексов зависит от количества остатков ЖК, а различия между количествами атомов углерода вторичных жирных кислот не оказывает влияния на взаимодействие молекул.

ВЫВОДЫ

В ходе работы были культивированы бактерии *Azospirillum zeaе* N7^T, получены препараты липополисахарида и капсульного полисахарида.

Проведена характеристика биополимерного состава, углеводного и белкового электрофоретического профилей выделенных препаратов. Электрофорез препаратов ЛПС показал преобладание S-форм молекул, в составе КПС выявлено присутствие ЛПС и белков в широком диапазоне масс, в том числе характерных для внешней мембраны азоспирилл – OmaA и OmpW. Охарактеризован состав жирных кислот ЛПС: преобладающими

были первичные О-связанная 3-гидрокситетрадекановая и N-связанная 3-гидроксигексадекановая жирные кислоты, вторичными О-связанными – гексадеценовая (3,1%), октадеценовая (3,7%) и нонадекановая кислоты. Липид А *A. zeaе* N7^T представляет смесь три-, тетра- и пентаацильных типов, отличающихся содержанием 3-гидрокситетрадекановой кислоты. О-специфический полисахарид состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих три остатка α -L-рамнозы в основной цепи, и один остаток β -D-глюкозы в боковой цепи. Один из остатков рамнозы ацетилирован на 70-75%.

Проанализировано взаимодействие липида А и белков внешней мембраны OmpA и OmpW: наименьшей энергией обладали комплексы с пентаацильными молекулами липида А, вне зависимости от природы вторичных жирных цепей.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kefalogianni, I. Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. / I. Kefalogianni, G. Aggelis // *Appl Microbiol Biotechnol.* -2002. - V. 58. - P. 352–357.
2. Chemistry of Lipid A: At the Heart of Innate Immunity / A. Molinaro [et al.] // *Chem. Eur. J.* - 2015. - V. 21. - P. 500–519.
3. Капсульный полисахарид бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b: структура, антигенная специфичность / О. Н. Смолькина [и др.] // *Биохимия.* - 2010. - Т. 75, №5. - С. 707–716.
4. Chaturvedi, D. Transmembrane β -barrels: Evolution, folding and energetics / D. Chaturvedi, R. Mahalakshmi // *BBA – Biomembranes.* - 2017. - V. 1859. - P. 2467–2482.
5. Gram-negative trimeric porins have specific LPS binding sites that are essential for porin biogenesis / W. Arunmanee [et al.] // *Proc Natl Acad U.S.A.* - 2016. - V. 113, N. 34. - P. 5034–5043.

6. Bock, K. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. / K. Bock, C. Pedersen // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* - 1983. - V. 41. - P. 27–66.
7. Структура и серология O-антигенов азотфиксирующих ризобактерий рода *Azospirillum* / Ю.П. Федоненко [и др.] // *Изв. АН. Сер. хим.* - 2015. - Т. 5. - С. 1024-1031.
8. Choma, A. Characterization of a novel lipid A structure isolated from *Azospirillum lipoferum* lipopolysaccharide / A. Choma, I. Komaniecka // *Carbohydrate Research.* - 2008. - V. 343. - P. 799–804.
9. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum* – wheat root interactions / S. A. Konnova [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1994. - V. 118. - P. 93–99.
10. Gram-negative trimeric porins have specific LPS binding sites that are essential for porin biogenesis / W. Arunmanee [et al.] // *Proc Natl Acad U.S.A.* - 2016. - V. 113, no. 34. - P. 5034–5043.
11. Refinement of OprH-LPS Interactions by Molecular Simulations / J. Lee [et al.] // *Biophysical Journal.* - 2017. - V. 112. - P. 346–355.

