

Lipid A - Pusat Aktif Endotoksin, Struktur Kimia dan Bioaktivitasnya

Hendig Winarno

Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi - BATAN, Jakarta

ABSTRAK

Studi tentang bioaktivitas endotoksin dan lipid A serta penentuan struktur lipid A telah dilakukan oleh para peneliti di berbagai negara, terutama di Jepang, Jerman, dan Amerika Serikat. Pendekatan sintesis dan pengujian bioaktivitas menunjukkan bahwa struktur lipid A sintetik yang diusulkan mempunyai aktivitas yang sama dengan lipid A dan *Escherichia coli* natural. Diketahui pula bahwa lipid A merupakan *active centre* dan bertanggung jawab terhadap endotoxin activities bakteri gram negatif. Selanjutnya, pengujian bioaktivitas terhadap berbagai analog lipid A sintetik, menunjukkan bahwa asam lemak yang terikat pada lipid A mempunyai peranan yang penting terhadap aktivitas endotoksin dan bakteri gram negatif. Studi tentang imunogenisitas dan antigenisitas lipid A atau LPS dapat dilakukan dengan menggunakan lipid A atau LPS sintetik bertanda ^{14}C .

PENDAHULUAN

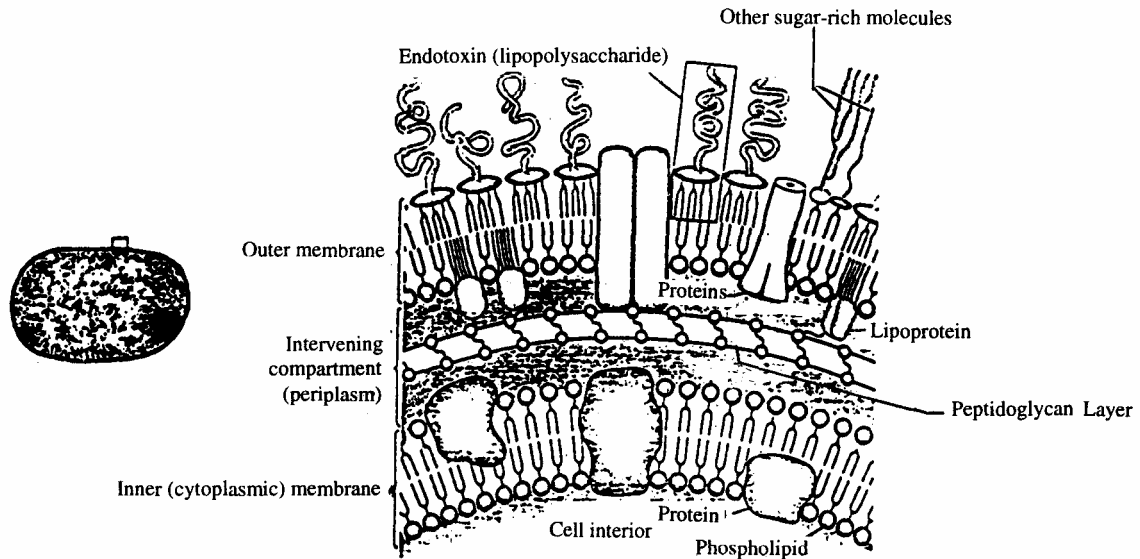
Endotoksin

Lipopolisakanida (LPS) atau lebih dikenal dengan nama endotoksin, adalah suatu senyawa kompleks yang terdapat pada dinding sel bakteri gram negatif. Senyawa tersebut dapat menyebabkan berbagai penyakit, misalnya demam, kolera, tetanus, *lethal shock*, tekanan darah rendah, menurunnya sel darah putih, dan lain sebagainya. Di samping mempunyai efek yang merugikan bagi manusia, endotoksin juga mempunyai efek yang berguna, yaitu untuk meningkatkan daya tahan tubuh terhadap infeksi (menghasilkan antibodi) yang disebabkan oleh bakteri atau virus dan membunuh sel kanker⁽¹⁾.

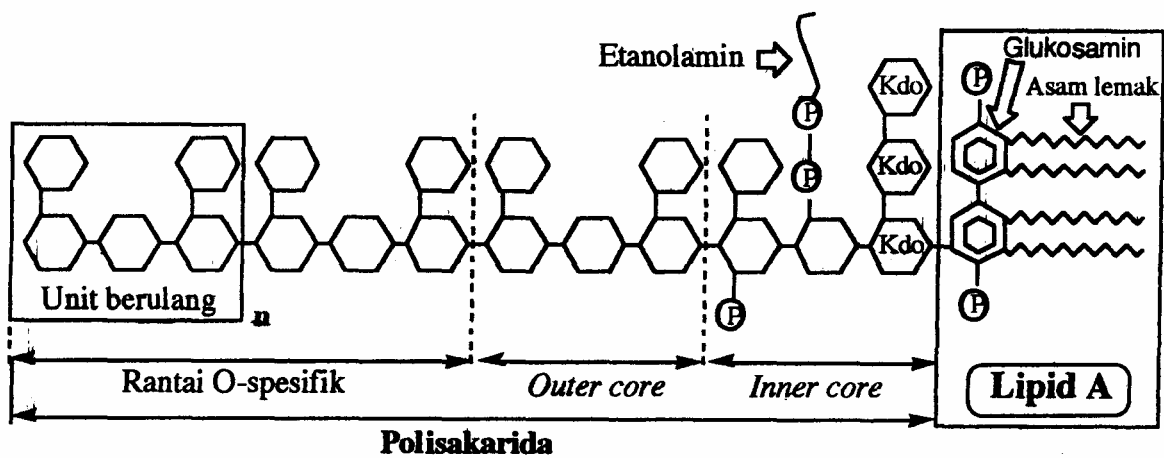
Gambar 1 menunjukkan dinding sel bakteri gram negatif yang terdiri dari lapisan luanda lapisan dalam. Pada lapisan luar terdapat LPS, protein, lipoprotein, dan molekul lain yang banyak mengandung gula, sedangkan lapisan dalam terdiri dari protein dan lipoprotein Untuk mengetahui bagaimana endotoksin mempunyai dua fungsi yang berlawanan, beberapa peneliti terutama di Institut Penelitian Borstel dan Institut Max Planck untuk Imunologi (German), Fak. MIPA Univ. Osaka (Jepang),

dan Universitas Rockefeller (USA) telah melakukan penelitian khususnya dalam hubungannya dengan identifikasi struktur dan komponen yang bertanggung jawab terhadap *endotoxin activities* dan bakteri gram negatif di dalam tubuh. Penelitian dititik beratkan pada isolasi endotoksin dan komponennya dan bakteri *Salmonella (typhimurium, minnesota)* dan *Escherichia (coli)*, sintesis endotoksin secara sebagian maupun total, serta uji bioaktivitasnya.

Pada dasarnya LPS terdiri dari dua bagian utama, yaitu bagian polisakarida dan bagian lipid (**Gambar 2**). Bagian polisakarida merupakan rangkaian dan berbagai macam gula, yang dibagi lagi menjadi 3 segmen, yaitu segmen rantai O-spesifik (dibentuk oleh sedikitnya 3 rangkaian gula yang berulang). Segmen ini merupakan segmen yang sangat bervariasi dan memberikan efek kekebalan yang spesifik. Berikutnya adalah segmen *outer core* dan *inner core* yang merupakan oligosakarida yang relatif tidak bervariasi. Segmen *inner core* ini mempunyai susunan gula dengan 7 atom karbon (heptose) dan 8 atom karbon yang unik yang disebut dengan Kdo (asam 3-deoksi-D-manno-2-oktulosonat). Bagian lipid terdiri dari glukosamin *backbone*, fosfat, dan asam lemak. Bagian lipid ini selanjutnya dikenal dengan nama **lipid A**.




Gambar 1. Bakteri gram negatif dan irisan dinding sel yang dilihat secara mikrograf⁽¹⁾



Gambar 2. Struktur kimia Lipopolisakarida dan bakteri *Salmonella typhimurium*

Keterangan :

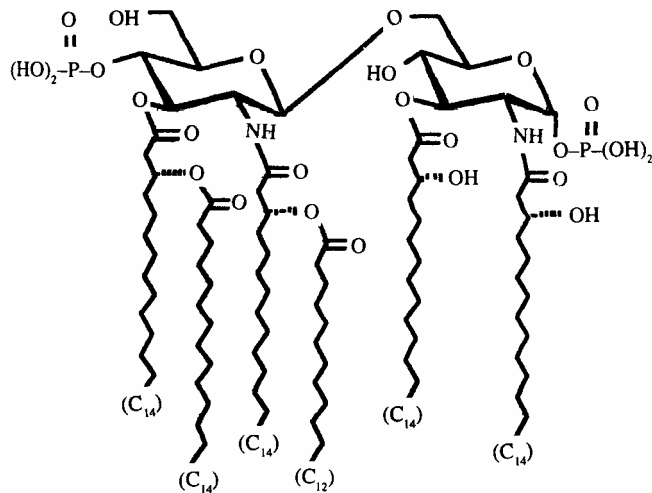
-  = gula
- P* = fosfat
- Kdo* = asam 3-deoksi-D-manno-2-oktulosonat

Lipid A *Escherichia coli*

Pada tahun 1954, Westphal dan Luderitz telah mengisolasi bagian lipofilik dan LPS yang dikenal dengan nama **lipid A** dengan cara menghidrolisis bakteri pada kondisi asam. Sejak saat itu, penelitian mengenai bioaktivitas LPS difokuskan pada **lipid A**⁽²⁾.

Struktur kimia lipid A dan berbagai spesies bakteri pada dasarnya adalah identik, berisi D-glukosamin disakarida *backbone* yang dihubungkan dengan ikatan β -(1 \rightarrow 6), yang mengan-

dung residu fosfat pada posisi 1 dan 4' dan residu asam lemak pada gugus B-amino dan gugus hidroksil-3⁽³⁾. Struktur lipid A dan *Escherichia coli* Re-mutan adalah seperti struktur I, yaitu 2-deoksi-6-O- {2-deoksi-2-[(R)-3-dodekanoiloksitradekanoil-amino] - 3 - O - [(R)-3-tetradekanoiloksitradekanoil]- β -D-glukopiranosil} - 3 - O - [(R)-3-hidroksitetradekanoil]-2-[(R)-3-hidroksitetradekanoilamino] - α - D - glukopiranososa 1,4'-bis(fosfat)^(4,5). Struktur tersebut telah dibuktikan melalui isolasi dan pendekatan sintesis total LPS. Selanjutnya, berbagai uji bioaktivitas terhadap analog lipid A sintetik telah dilakukan.



Gambar 3. Struktur lipid A LPS dari *Escherichia coli*

PEMBAHASAN

Untuk membuktikan kebenaran struktur lipid A LPS dari *Escherichia coli* yang diusulkan maka dilakukan uji bioaktivitas terhadap lipid A sintetik dan lipid A natural dari *Escherichia coli*^(6,7) (Tabel 1). Selain itu, kedua sampel tersebut juga dianalisis menggunakan NMR dua dimensi.

Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut mempunyai aktivitas endotoksin yang sama. Dengan demikian, struktur lipid A *Escherichia coli* yang diusulkan oleh Imoto et al.⁽⁴⁾ menuju pada arah yang benar.

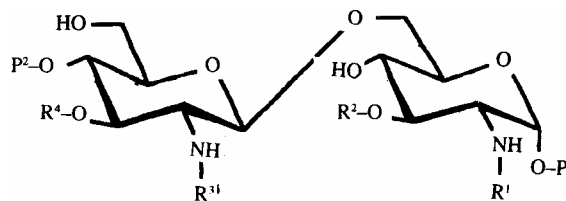
Tabel 1. Aktivitas endotoksin dan lipid A sintetik dan lipid A natural *E. Coli*^(6,7)

Jenis tes endotoksitas yang dilakukan	Jenis hewan percobaan	Lipid A yang diperlukan untuk aktivitas endotoksin (µg)	
		Lipid A <i>E. coli</i> sintetik	Lipid A <i>E. coli</i> natural
Toksitas letal (LD ₅₀) ^a	Tikus	0,01	0,01
Respon terhadap demam	Kelinci	0,04	0,04
Reaksi Shwartzman lokal	Kelinci	12,5	12,5
Kemampuan mendorong toleransi endotoksin terhadap LPS dari <i>Salmonella abortus equi</i>	Tikus	30	30
Mitogenesis B-limfosit	Tikus	2	2
Aktivasi <i>Machropage</i> (10 ng/ml prostaglandin E ₂ terlepas)	Tikus	1	1

* Tes toksitas letal dalam tikus yang disensitifkan dengan galaktosamin

Sejalan dengan penentuan struktur lipid A, uji bioaktivitas lipid A dan LPS juga dilakukan. Dari pengujian tersebut diketahui bahwa lipid A merupakan *active centre* dan *endotoxin activities* dari bakteri gram negatif. Kemudian berbagai analog lipid A dengan berbagai variasi asam lemak dan fosfat-pun telah disintesis^(2,4,8). Di antara hasil sintesis lipid A tersebut disajikan pada

Gambar 1 dan Tabel 2.



Gambar 4. Struktur kimia analog lipid A (lihat Tabel 2)

Tabel 2. Lipid A sintetik

No.	Senyawa	R ⁴	R ³	R ²	R ¹	P ¹	P ²
1	505	C ₁₄ -O-C ₁₄	C ₇ -O-C ₇	C ₁₄ -OH	C ₁₄ -OH	PO(OH) ₂	H
2	504	C ₁₄ -O-C ₁₄	C ₇ -O-C ₇	C ₁₄ -OH	C ₁₄ -OH	H	PO(OH) ₂
3	503	C ₁₄ -O-C ₁₄	C ₁₄ -O-C ₁₂	C ₄ OH	C ₁₄ -OH	H	H
4	LA-24-PP	C ₁₀	C ₁₄ -OH	C ₁₄ -OH	C ₁₀	PO(OH) ₂	PO(OH) ₂
5	LA-23-PP	C ₁₀	C ₁₀	C ₁₀	C ₁₀	PO(OH) ₂	PO(OH) ₂
6	403	C ₁₄ -OH	C ₁₄ OH	C ₁₄ -OH	C ₇ -OH	H	H
7	404	C ₁₄ -OH	C ₁₄ -OH	C ₁₀ -OH	C ₁₄ -OH	H	PO(OH) ₂
8	405	C ₁₄ -OH	C ₁₄ -OH	C ₁₄ -OH	C ₁₂ OH	PO(OH) ₂	H
9	406	C ₁₄ -OH	C ₁₄ -OH	C ₁₄ OH	C ₁₄ -OH	PO(OH) ₂	PO(OH) ₂
10	400	C ₁ OH	C ₁₄ -OH	C ₁₀ -OH	C ₁₄ OH	PO(OH) ₂	PO(OH) ₂

Keterangan:

Lihat struktur pada Gambar 4

C₁₀ : dekanoil

C₁₀-OH : (R)-3-hidroksidekanoil

C₁₄-OH : (R)-3-hidroksitetradekanoil

C₁₄-O-C₁₄ : (R)-3-tetradekanoil-tetradekanoil

Dari perkembangan terakhir mengenai uji bioaktivitas berbagai analog lipid A sintetik yang mengandung asam lemak dengan jenis dan jumlah atom karbon yang bervariasi, diketahui bahwa residu asam lemak yang terkandung pada lipid A mempunyai peranan yang penting terhadap bioaktivitas LPS di dalam tubuh⁽⁹⁻¹¹⁾.

Kenyataan tersebut memberikan dorongan untuk mendesain analog lipid A jenis lain. Diharapkan, pengujian bioaktivitas senyawa analog baru tersebut dapat memberikan tambahan pengetahuan tentang peranan residu asam lemak yang terikat pada lipid A terhadap *endotoxic activities* LPS dan bakteri gram negatif.

Meskipun berbagai analog lipid A telah disintesis dan diuji bioaktivitasnya, namun para peneliti masih belum dapat mengungkapkan peranan lipid A dan komponen penyusunnya terhadap imunogenisitas dan antigenisitasnya yang berhubungan dengan *structure activity & structure function relationships* dari lipid A pada tingkat molekuler. Wright et al. yang dikutip oleh Rietschel et al.⁽¹⁾ mengemukakan bahwa di dalam darah, LPS akan berikatan dengan molekul bersirkulasi yang disebut dengan LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*) dan membentuk kompleks LPS-LBP. Selanjutnya kompleks LPS-LBP tersebut bergandengan dengan reseptor yang dikenal dengan nama CD 14 pada permukaan makrofag.

Untuk mempelajari lebih lanjut mengenai peranan kompo-

nen lipid A dan strukturnya terhadap aktivitas endotoksin, telah dicoba sintesis lipid A bertanda ^{14}C ⁽¹²⁾. Diharapkan, dengan adanya lipid A bertanda ^{14}C tersebut, misteri tentang aktivitas lipid A dapat diungkapkan. Oleh karena itu usaha-usaha untuk mempelajari strategi sintesis, khususnya radiosintesis perlu dikembangkan untuk mendapatkan metode yang praktis dan efisien.

KESIMPULAN

Melalui isolasi, pendekatan sintesis, dan perbandingan bioaktivitas lipid A sintetis dan lipid A natural dari *Escherichia coli*, serta analisis menggunakan NMR 2 dimensi, maka struktur lipid A *Escherichia coli* secara pasti dapat ditentukan.

Hasil pengujian bioaktivitas lipid A menunjukkan bahwa lipid A merupakan *active centre* dan bertanggungjawab terhadap *endotoxin activities* dan bakteri gram negatif.

Asam lemak yang terikat pada lipid A mempunyai peranan yang penting terhadap aktivitas endotoksin dan bakteri gram negatif.

Untuk mengetahui lebihjauh mengenai imunogenisitas dan antigenisitas suatu lipid A atau LPS perlu disintesis lipid A atau LPS bertanda ^{14}C .

KEPUSTAKAAN

1. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins, *Scient Amer* 1992; 267: 26.
2. Imoto M, Yoshimura H, Yamamoto M, Shimamoto T, Kusumoto S, Shiba T. Chemical synthesis of a biosynthetic precursor of lipid A with a

- phosphorylated tetraacyl disaccharide structure. *Bull. Chem. Soc. Jpa* 1987; 60: 2197.
3. Webb DR. Immunopharmacology and the regulation of leukocyte function, Marcel Dekker, New York, 1982, hal. 183.
4. Imoto M, Kusumoto S, Shiba T, Rietschel ET, Galanos C, Ludentz O. Chemical structure of *Escherichia coli* lipid A, *Tetrahedron Lett.* 1985; 26: 907.
5. Imoto M, YoshimuraH, ShimainotoT, Sakaguchi S, Kusumoto S, ShibaT. Total synthesis of *Escherichia coli* lipid A, the endotoxically active principle of cell-surface lipopolysaccharide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1987; 60: 2205.
6. Galanos C, Luderitz O, Rietschel TH et al. Biological activities of natural and synthetic lipid A's with different fatty acid compositions. *Eur. J. Biochem.* 1985; 148: 1.
7. Kanegasaki S, Tanamoto KI, YasudaT et al. Structure-activity relationship of lipid A: Comparison of biological activities of natural and synthetic lipid A's with different fatty acid compositions. *J. Biochem.* 1986; 99: 1203.
8. Winarno H. Synthesis of lipid A analogs containing various fatty acids, BATAN. Disampaikan padaPresentasi Ilmia1 Hasil Studi Program Magister dalam Rangka Peringatan Ulang Tahun BATAN XXXVI, Jakarta, 20-22 Desember 1994. (Risalah dalam proses penerbitan).
9. Wang MH, Flad HD, Feist W et al. Inhibition of endotoxin-induced interleukin-6 production by synthetic lipid A partial structures in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 1991; 59: 4655.
10. Ulmer AJ, Feist W, Heine H et al. Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid A partial structures that inhibit binding of ° *Infect. Iminun.* 1992; 60: 5145.
11. Perera PY, Manthey CL, Stutz PL, Hildebrandt J, Vogel SN. Induction of early gene expression in murine macrophages by synthetic lipid A analogs with differing endotoxic potentials. *Infect. Immun.* 1993; 61: 2015.
12. Aoki Y. Synthetic studies in the activities of complex lipid A analogs using radiolabelled compound, MasterThesis, Osaka University, Graduate School of Science Ed., Osaka 1994 (In Japanese).

