



УДК 577.154.02

 γ -(3')-КАНАМИЦИНОВЫЙ ЭФИР АТР — ИНГИБИТОР
АМИНОГЛИКОЗИД-3'-ФОСФОТРАНСФЕРАЗ

Шүжянцева В. В., Ганелин В. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Для исследования механизмов катализируемой ферментами инактивации аминогликозидных антибиотиков синтезирован γ -(3')-канамициновый эфир АТР, структура которого моделирует одно из возможных промежуточных соединений ферментативной реакции. Показано, что синтезированный эфир не является субстратом аминогликозид-3'-фосфотрансфераз, но конкурентно ингибирует реакцию фосфорилирования канамицина с K_i 26 мкМ для аминогликозид-3'-фосфотрансфераз I и II из *E. coli* и с K_i 10 мкМ для фермента из *Act. fradiae*. На основании полученных данных делается выбор в пользу механизма ферментативной инактивации антибиотиков, включающего в себя стадию фосфорилирования фермента.

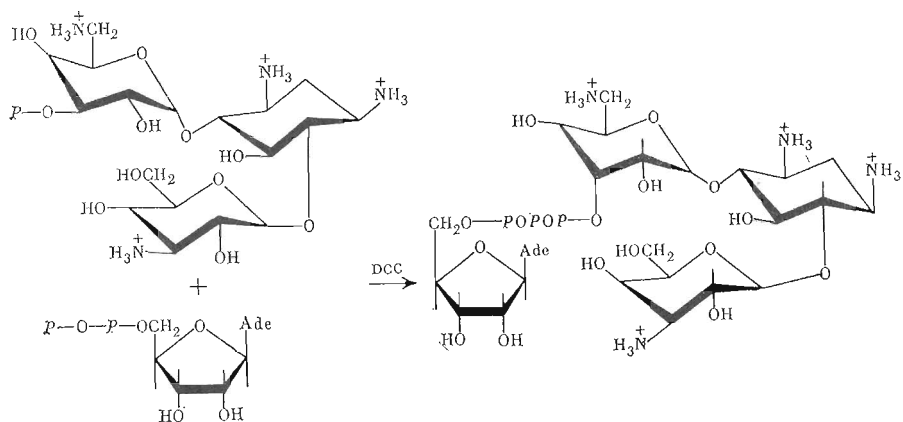
Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам обусловлена способностью микробной клетки синтезировать ферменты, катализирующие инактивацию антибиотиков. В частности, аминогликозид-3'-фосфотрансферазы, обнаруженные у бактерий и актиномицетов, катализируют АТР-зависимую инактивацию ряда аминогликозидных антибиотиков путем фосфорилирования их 3'-гидроксильной группы с образованием ADP [1, 2].

Известно несколько групп аминогликозид-3'-фосфотрансфераз, различающихся между собой по субстратной специфичности. Так, аминогликозид-3'-фосфотрансфераза I фосфорилирует 3'-ОН-группу канамицина, неомицина, паромомицина, рибостамицина, а также 5'-ОН-группу ливидомицина и 3',4'-дидезоксирибостамицина, но не 3'-ОН-группу бутирозицина. Напротив, бутирозин, а также канамицин, неомицин, паромомицин и рибостамицин являются субстратами аминогликозид-3'-фосфотрансферазы II, однако этот фермент в отличие от первого не способен фосфорилировать ливидомицин [1, 2].

В последние годы было обнаружено, что синтез антибиотикинактивирующих ферментов может быть детерминирован особыми генетическими структурами, получившими название «транспозоны» (Tn), которые способны встраиваться в различные участки бактериального генома путем так называемой незаконной рекомбинации [3, 4]. В частности, Tn 601 и Tn 5 детерминируют синтез аминогликозид-3'-фосфотрансфераз I и II соответственно [5, 6]. Эти ферменты кроме субстратной специфичности различаются по относительной скорости фосфорилирования субстратов, значениям молекулярных масс, иммунологическим характеристикам и некоторым другим свойствам [5, 6]. Однако механизмы их действия, последовательность событий при переносе фосфатного остатка от АТР на антибиотик мало изучены. Описана лишь весьма условная схема реакции фосфорилирования канамицина [7]: закрепление 3'-гидроксильной группы антибиотика, которая приближена к γ -фосфатному остатку АТР, атом фосфора в котором должен нести частичный положительный заряд.

Для исследования возможных путей ферментативных реакций в последние годы получил развитие подход, основанный на использовании стадийных ингибиторов [8, 9]. «Мостиковые» структуры (мульти-субстратные аналоги по Вольфендену [9]) могут быть полезны, во-первых, для получения экспериментального доказательства вклада в катализ правильной ориентации субстратов ферментом и, во-вторых, для выбора того или иного пути ферментативной реакции.

Целью работы является синтез «мостиковой» структуры — γ (3')-канамицинового эфира АТР, моделирующей промежуточное соединение фер-



ментативной реакции, при которой происходит прямая атака γ -фосфатного остатка АТР по 3'-ОН-группе антибиотика с последующим гидролизом пирофосфатной связи, и изучение взаимодействия полученного аналога с аминогликозид-3'-фосфотрансферазами. Исходными соединениями при синтезе явились АРР и канамицин-3'-фосфат, а в качестве конденсирующего агента применяли N,N' -дихлорогексилкарбодимид (схема). Так как молекула канамицин-3'-фосфата полифункциональна, для однозначного протекания реакции необходима соответствующая защита функциональных групп и надлежащий выбор растворителя. Для защиты аминогрупп использовали протонирование [10]; чтобы избежать фосфорилирования гидроксильных групп антибиотика и АРР, реакцию проводили в смеси пиридина с гидроксилсодержащим растворителем — водой.

Синтезированное соединение при хроматографии в двух системах растворителей и при электрофорезе давало одно пятно, поглощающее в УФ-области и дающее реакцию с нингидрином (таблица). Оно не расщепляется щелочной фосфатазой *E. coli*, но гидролизуется фосфодиэстеразой зменного яда до АМР. При этом соотношение нуклеотид — канамицин-3'-фосфат соответствует теоретическому. Полученный эфир АТР относительно устойчив в нейтральных водных растворах, так $\tau/2$ при рН 7,5 (4 мМ натрий-фосфатный буфер) и 20° С составляет примерно 3 сут.

Изучено действие на γ -(3')-канамициновый эфир АТР аминогликозид-3'-фосфотрансфераз I и II, выделенных в гомогенном состоянии из клеток *E. coli* с плазмидами R6 (Tn 601) и JR67 (Tn 5) с помощью конкурентной аффинной хроматографии на неомицинсефарозе и гель-фильтрации через сефадекс G-100 [6]. Этот метод позволяет получать препараты ферментов без АТР-гидролизной активности, что делает возможным использование спектрофотометрического метода определения активности аминогликозид-3'-фосфотрансфераз по образованию АРР с помощью сопряженных реакций, катализируемых лактатдегидрогеназой и пируваткиназой в присутствии фосфоэнолпирувата и NADH [6]. Кроме того, исследовали действие на синтезированный эфир АТР аминогликозид-3'-фосфотрансферазы, выделенной из мицелия *Actinomyces fradiae*. Отличительной особенностью этого фермента является то, что в качестве субстратов он использует паромомицин, неомицин и рибостамицин. Канамицины в этом случае служат крайне плохими субстратами, так как скорость их фосфорилирования в ~100 раз меньше, чем скорость фосфорилирования паромомицина [11].

В настоящее время для данного фермента предложено наименование «аминогликозид-3'-фосфотрансфераза V» [12].

Хроматографические и электрофоретические характеристики γ -(3')-канамицинового эфира АТР (КрррА)

Соединение	R_f		E_{ADP}
	(А)	(В)	
КрррА	0,06	0,6	0
АРР	0,17	0,67	+1
Канамицин-3'-фосфат	0	0,16	-1,6

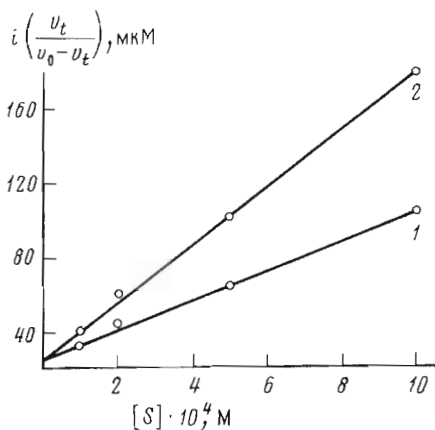


Рис. 1

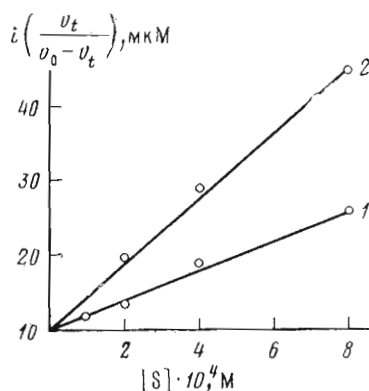


Рис. 2

Рис. 1. Ингибирование реакции фосфорилирования канамицина, катализируемой аминокликозид-3'-фосфотрансферазой II, в присутствии 20 мкМ (1) и 60 мкМ (2) γ -(3')-канамицинового эфира АТР; концентрация АТР 4 мМ

Рис. 2. Ингибирование реакции фосфорилирования паромомина, катализируемой аминокликозид-3'-фосфотрансферазой V из *Act. fradiae*, в присутствии 15 мкМ (1) и 30 мкМ (2) γ -(3')-канамицинового эфира АТР; концентрация АТР 1,5 мМ

Оказалось, что γ -(3')-канамициновый эфир АТР не гидролизруется исследованными ферментами с образованием канамицин-3'-фосфата и АDP, т. е. образование АDP, определявшееся спектрофотометрическим методом по сопряженным реакциям, катализируемым лактатдегидрогеназой и пируваткиназой, не было обнаружено. При используемых концентрациях субстрата (10–100 мкМ) ингибирующего действия этого соединения на сопряженные реакции не наблюдалось.

Как известно, перенос фосфатной группы различными киназами может происходить по одному из двух путей [13]: 1) образование в качестве промежуточного продукта реакции фосфорилированного фермента с последующим переносом фосфатного остатка от белка на субстрат; 2) прямое фосфорилирование соответствующего субстрата, которое, в свою очередь, может осуществляться по следующим механизмам: а) ассоциативный линейный механизм $S_N2(P)_{in\ line}$, заключающийся в атаке нуклеофила по линии, соединяющей уходящую и реагирующую группу; б) диссоциативный линейный механизм $S_N1(P)$, включающий образование метафосфата (PO_3^-) в качестве промежуточного продукта; в) $S_N2(P)$ -механизм, сопровождающийся псевдобрращением, так как нуклеофил атакует атом фосфора со стороны макроэргической пиррофосфатной связи.

В случае аминокликозид-3'-фосфотрансфераз реализация второго пути по любому из трех механизмов должна была бы приводить к гидролизу синтезированного соединения. Устойчивость бисубстратного аналога свидетельствует о том, что, по-видимому, прямой атаки γ -фосфата АТР по 3'-гидроксильной группе антибиотика не происходит.

Однако в реакциях АТР-зависимого фосфорилирования канамицина, катализируемого аминокликозид-3'-фосфотрансферазами I и II, γ -(3')-канамициновый эфир АТР оказался конкурентным по отношению к канамицину ингибитором с K_i 26 мкМ (рис. 1). Ранее было показано [14], что антибиотик, близкий по структуре к субстратному, но не содержащий 3'-гидроксильную группу, являются конкурентными ингибиторами этих ферментов со значениями K_i , близкими по величине к K_m канамицина (K_m 20 мкМ). Очевидно, связывание ингибитора с ферментом происходит за счет сродства фермента к антибиотику, а не к нуклеотидному фрагменту (для АТР K_m 0,4 мМ).

Аналогичное исследование активности было проведено и с ферментом из *Act. fradiae*. И в этом случае полученное соединение оказалось конкурентным по отношению к антибиотику — субстрату (паромомину) — ин-

гибитором с K_i 10 мкМ (рис. 2). Интересно, что ингибирующее действие аналога АТР на аминокликозид-3'-фосфотрансферазу V оказалось на порядок сильнее, чем ингибирующее действие канамицина (K_i 180 мкМ), который является конкурентным ингибитором по отношению к паромомицину [11]. Фермент из *Act. fradiae* обладает более высоким сродством к АТР, чем аминокликозид-3'-фосфотрансферазы I и II (K_m 0,15 мМ), с чем и может быть связана большая эффективность γ -(3')-канамицинового эфира АТР в качестве ингибитора: вклад АТР в связывание с ферментом **несколько больше**, чем в предыдущих случаях.

Таким образом, синтезированное соединение — γ -(3')-канамициновый эфир АТР является конкурентным по отношению к антибиотику — субстрату ингибитором аминокликозид-3'-фосфотрансфераз. Полученные результаты не противоречат предположению о том, что перенос фосфатного остатка от АТР на антибиотик осуществляется через стадию образования фосфорилированного фермента.

Экспериментальная часть

В работе использовали натриевую соль ADP (Reanal, Венгрия), щелочную фосфатазу из *E. coli* (КФ 3.1.3.1) и фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1; Worthington, Англия), лактатдегидрогеназу, пируваткиназу, NADH и трихлоргексиламмониевую соль фосфоэнолпирувата (Reanal, Венгрия), N,N-дихлоргексилкарбодимид (BDH, Англия).

Синтез γ -(3')-канамицинового эфира ADP. Аденозин-5'-дифосфат (натриевая соль, 180 мг, 0,35 ммоль) пропускали через колонку с даунсом 50×8 (100-200 меш, H^+ -форма), элюировали ледяной водой и упаривали при температуре не выше $30^\circ C$. Канамицин-3'-фосфат (200 мг, 0,35 ммоль) растворяли в воде (10 мл) и прибавляли 2 мл 1 н. HCl. Полученный раствор прибавляли к раствору ADP в смеси вода — пиридин (5 мл: 5 мл), затем добавляли DCC (2,06 г, 10 ммоль), перемешивали 12 ч при $20^\circ C$, добавляли еще DCC (1,03 г, 5 ммоль) и оставляли при перемешивании при $4^\circ C$. Через 2 сут дихлоргексилмочевину отфильтровывали, промывали водой, фильтр экстрагировали эфиром (3×10 мл), водный раствор упаривали. Продукт реакции выделяли электрофорезом в 0,05 М ацетатном буфере, pH 4,1 (градиент потенциала 120 В/см), на бумаге 3 MM (Whatman) и дополнительно очищали препаративной ТСХ на пластинках с силикагелем (ЛСЛ₂₅₄+13% гипса, Chemapol, СССР) в системе *n*-пропанол — конц. аммиак — вода (6:3:1) (А). Полученный γ -(3')-канамициновый эфир АТР элюировали водой и лиофилизовали. Выход составил 10% относительно вводимого в реакцию ADP. Количество синтезированного аналога, вводимого в реакцию пробу, рассчитывали, принимая значение молярного коэффициента поглощения (ϵ_{260}) для АТР равным $13\,200\ M^{-1}\ cm^{-1}$.

ТСХ проводили на пластинках с силикагелем (Silufol, СССР) в системе А, а также в системе *n*-пропанол — 80% CH_3COOH — вода (9:1:10) (Б). Было определено содержание канамицин-3'-фосфата в полученном соединении по реакции с ингибрином. На пластину с DEAE-целлюлозой (DC-Plastikfolien Cellulose F₂₅₄, Merck), разграфленную на квадраты (2×2 см), наносили пробы канамицин-3'-фосфата различной концентрации, продукта реакции и ADP. Затем пластину опрыскивали ингибриновым реактивом (2,5 г ингибрина, 5 мл 80% CH_3COOH , 20 мл воды, 4,75 мл ацетона), высушивали и пробы элюировали смесью вода — *n*-пропанол (1:1) по 3 мл. После центрифугирования растворов спектрофотометрировали при 560 нм и по калибровочному графику определяли количество канамицин-3'-фосфата в пробе. Количество нуклеотидного материала рассчитывали по поглощению при 260 нм, используя значение молярного коэффициента поглощения для АТР. Соотношение нуклеотид — канамицин-3'-фосфат соответствовало теоретическому.

Аминокликозид-3'-фосфотрансферазы I и II выделяли из клеток *E. coli* с плазмидами R6 (Tn 601) и JR67 (Tn 5) соответственно при помощи конкурентной аффинной хроматографии на сорбенте неомипицефароза и гель-фильтрации через сефадекс G-100 аналогично работе [6]. При очист-

ке фермента из экстрактов мицелия *Act. fradiae* использовали фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, хроматографию на неомидинсефарозе, гель-фильтрацию через сефадек G-100 и хроматографию на DEAE-целлюлозе аналогично [11]. О гомогенности ферментов судили по электрофорезу в полиакриламидном геле при различных значениях pH [6, 11].

Активность ферментов определяли микробиологическим и спектрофотометрическим методами. В первом случае активность определяли по убыли исходного антибиотика с использованием в качестве тест-культуры *Bacillus subtilis*. Во втором случае активность определяли по образованию ADP с использованием сопряженных реакций, катализируемых лактатдегидрогеназой и пируваткиназой [14]. Реакционная смесь (1,2 мл) содержала 20 мМ трис-HCl (pH 7,8), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ дитиотреит, пируваткиназу и лактатдегидрогеназу (по 25 мкг), 0,4 мМ фосфоенолпируват, 0,2 мМ NADH, антибиотик и АТФ. Реакцию начинали добавлением аминокликозид-3'-фосфотрансферазы, за скоростью реакции следили по уменьшению поглощения при 340 нм в термостатируемой микрокювете спектрофотометра «Gilford» при 37° С. Активность фермента выражали в мкмоль образовавшейся ADP (фосфорилированного антибиотика) на 1 мг белка в 1 мин. Белок определяли по методу Лоури [15], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. В работе применяли препараты аминокликозид-3'-фосфотрансфераз I, II и V с удельной активностью 1,5 (канамицин), 4,0 (канамицин) и 2 (паромомидин) ед. акт./мг соответственно. Для определения каждой константы ингибирования проведено по крайней мере три измерения. Для построения графиков в координатах Хантера — Дауса использовали средние величины.

Авторы выражают благодарность Р. М. Хомутову за полезные обсуждения полученных результатов и Р. М. Петюшенко за предоставление канамицин-3'-фосфата.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mitsuhashi S.* Drag Action and Drag Resistance in Bacteria. V. 2. Aminoglycoside Antibiotics. University of Tokyo Press, 1975.
2. *Davies J., Smith D. I.* Ann. Rev. Microbiol., 1978, v. 32, p. 469—518.
3. *Cohen S. N.* Nature, 1976, v. 263, p. 731—738.
4. *Ильина Т. С., Смирнов Г. В.* Итоги науки и техники. ВИНТИ, сер. Микробиол., 1979, т. 10, с. 99—153.
5. *Courvalin P., Flandt M., Davies J.* Microbiology, 1978, p. 262—266.
6. *Ганелин В. Л., Денисов А. А., Шапошников Г. Л., Мазыкин Ю. О., Навашин С. М.* Биохимия, 1980, т. 45, с. 483—491.
7. *Навашин С. М., Фомина Н. П., Сазыкин Ю. О.* Антибиотики группы аминокликозидов. М.: Медицина, 1977, с. 166.
8. *Хомутов Р. М., Северин Е. С.* В кн.: Современные проблемы химии пептидов и белков. М.: Наука, 1969.
9. *Wolfenden R.* Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1976, v. 5, p. 271—305.
10. *Хомутов Р. М., Осипова Т. П., Бирюков А. П., Ишмуратов Б. Х.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 56—63.
11. *Ганелин В. Л., Демина А. С., Петюшенко Р. М., Сазыкин Ю. О., Навашин С. М.* Антибиотики, 1979, т. 6, с. 424—430.
12. *Dowling J. E.* FEMS in Microbiol. Letters, 1979, v. 6, p. 95—98.
13. *Lowe G., Sproat B. S. J. C. S. Perkin I.* 1978, p. 1622—1630.
14. *Ганелин В. Л., Разлогова И. О., Петюшенко Р. М., Чернышев А. И., Есипов С. Е., Сазыкин Ю. О., Навашин С. Н.* Биохимия, 1978, т. 43, с. 2154—2162.
15. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.

Поступила в редакцию
8.VII.1981

γ -(3')-ESTER OF KANAMYCIN AND ATP — AN INHIBITOR OF AMINOGLYCOSIDE-3'-PHOSPHOTRANSFERASES

SHUMYANTZEVA V. V., GANELIN V. L.
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

γ -(3')-Ester of kanamycin and ATP (KpppA) was synthesized for investigation on mechanism of aminoglycoside-3'-phosphotransferases (ATP-3') action. This compound was obtained by the reaction of ADP and kanamycin-3'-phosphate in aqueous pyridine in the presence of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. The amino groups of kanamycin were protected by protonation. KpppA displayed no substrate properties towards several enzymes, but proved to be an inhibitor of aminoglycoside-3'-phosphotransferases I and II (K_i 26 μM) and of the enzyme from *Act. fradiae* (K_i 10 μM).