

УДК 577.152.3

Asp141 И ЦЕПОЧКА ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ Asp141–Asn109–Asp33 ОБЕСПЕЧИВАЮТ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗ КЛАССА GT80

© 2015 Ксяюан Чен¹, Юанминг Венг², Женпинг Ма²,
На Ли², Вейкуинг Хан², Куи Женг², Юмей Цей^{1*},
Джянсонг Ченг^{2*}

¹ Shandong Agricultural University, College of Animal Science
and Veterinary Medicine 271018, China; E-mail: caiyum@163.com

² Nankai University, State Key Laboratory of Medicinal
Chemical Biology and College of Pharmacy, Tianjin 300071,
China; E-mail: jiansongcheng@nankai.edu.cn

Поступила в редакцию 18.12.14
После доработки 04.03.15

Сиалилтрансферазы – это главные ферменты, принимающие участие в биосинтезе физиологически и патологически значимых природных молекул, содержащих в своем составе сиаловые кислоты. В данной работе изучен не обладающий сиалилтрансферазной активностью рекомбинантный белок Pm0160, несущий естественную мутацию D141→Y в мотиве DDG, идентифицированном в сиалилтрансферазах семейств GT52 и GT80. Исследование различных мутантных форм этого белка показало, что единственная аминокислотная замена (Y141→D) приводила к восстановлению его способности к переносу сиаловых кислот. На основании анализа известной структуры кристаллов сиалилтрансфераз класса GT80 установлено, что между тремя консервативными аминокислотными остатками (Asp141, Asn109 и Asp33) внутри молекул этих ферментов возникает цепочка следующих друг за другом водородных связей. Проведенные эксперименты по мутагенезу показали, что цепочка последовательных внутримолекулярных связей между главным функциональным остатком (Asp141) и соответствующими аминокислотами в структурных доменах Nβ4, Nβ1 и Nα1, в большей степени важна для поддержания стабильности белка, чем для ориентации Asp141 в необходимой для катализа конформации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сиалилтрансфераза, цепочка водородных связей, главный функциональный остаток, стабильность, активность.

Сиаловые кислоты (Sia) – это семейство отрицательно заряженных α-кетокислот с 9-членной углеродной цепочкой, обычно замыкающих полисахаридные цепи и обнаруженных в клетках всех типов. Эти кислоты принимают участие в разнообразных физиологических и патологических процессах, таких как межклеточные взаимодействия, передача сигналов, бактериальные и вирусные инфекции, метастазирование опухолей [1, 2]. Sia природного происхождения и N-ацетилнейраминавая кислота (Neu5Ac), как их главный представитель, присутствуют в различных линкерных структурах, формируемых особыми ферментами – сиалилтрансферазами.

Сиалилтрансферазы катализируют реакцию переноса сиаловой кислоты от субстрата-донора цитидин 5'-монофосфат-Sia (CMP-Sia) на

субстрат-акцептор терминальный остаток галактозы (Gal), лактозы (Lac), N-ацетилгалактозамин (GalNAc) или же другой остаток Sia. В настоящее время сиалилтрансферазы были идентифицированы в разнообразных организмах: бактериях, вирусах, в различных органах млекопитающих, и распределены по пяти классам гликозилтрансфераз (GT): GT29, GT38, GT42, GT52 и GT80, в соответствии с особенностями их структуры (CAZy-Carbohydrate-Active enZyme database, <http://www.cazy.org/>). Кроме того, сиалилтрансферазы бактериального происхождения широко используются для синтеза различных Sia-содержащих структур, поскольку бактериальные ферменты обладают гибкой субстратной специфичностью и продуктивно экспрессируются в клетках *Escherichia coli* [3, 4].

Установлено, что сиалилтрансферазы млекопитающих содержат в первичной последова-

* Адресат для корреспонденции.

тельности небольшие консервативные мотивы, такие как L, S, VS и III. Эксперименты по сайт-специфическому мутагенезу показали, что эти мотивы вносят вклад в связывание субстрата-донора, -акцептора или их обоих [5, 6]. Недавно в бактериальных (поли)сиалилтрансферазах семейства GT38, GT52 и GT80 были обнаружены два высококонсервативных пептидных мотива: (1) D/E-D/E-G и (2) H-P [7]. Причем, чередование Asp (D)/Glu (E) в мотиве (1) было характерно для ферментов класса GT38 [7], тогда как для

ферментов классов GT52 и GT80 этот консервативный мотив (1) был строго D-D-G (рис. 1, A). Поэтому короткая консервативная последовательность D/E-D/E-G была названа мотивом DDG в отношении сиалилтрансфераз классов GT52 и GT80.

Мотив DDG (Asp164–Asp165–Gly166) сиалилтрансферазы из *Neisseria meningitidis* (NST), относящейся к классу GT52, по-видимому, важен скорее для структуры, чем для катализа, поскольку отделен от активного центра фермен-

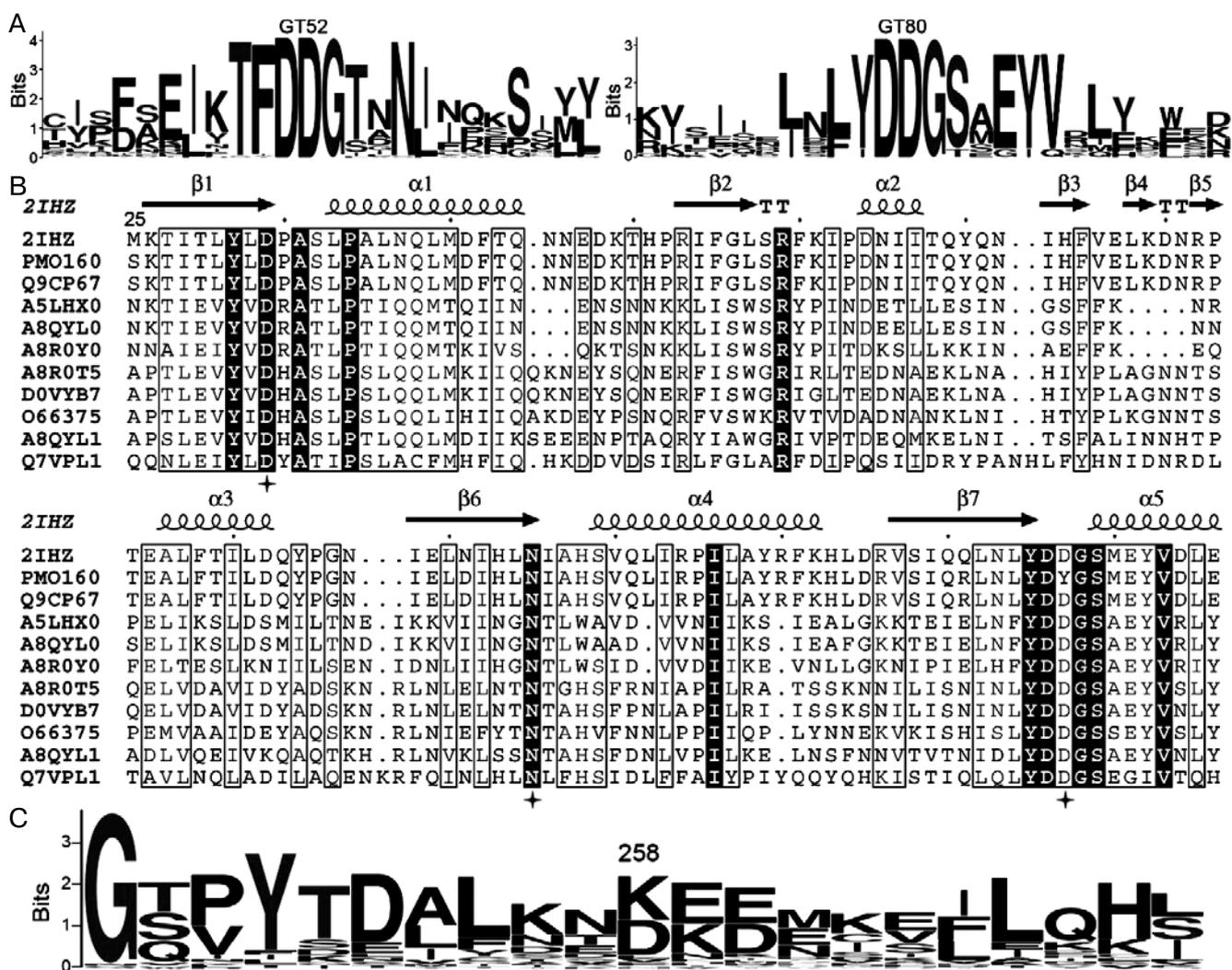


Рис. 1. Логографическое изображение последовательности мотива DDG и окружающих его аминокислотных остатков было выполнено на основе выровненных последовательностей сиалилтрансфераз классов GT52 и GT80. Высота букв соответствует частоте встречаемости соответствующей аминокислоты в различных выровненных последовательностях (A). Выровненные N-концевые последовательности различных сиалилтрансфераз класса GT80. Аминокислотные остатки, формирующие цепочку водородных связей (Asp141–Asn109–Asp33), помечены черными крестиками. В выровненную последовательность фермента PmST1 (2IHZ) не включены первые 24 а.о. (B). Логографическое изображение последовательности аминокислотных остатков, окружающих главную функциональную группу (остаток Asp258 был идентифицирован как главный в ферменте из бактерии *Neisseria meningitidis* серотипа L1), выполнено на основе выровненных последовательностей сиалилтрансфераз класса GT52 (C)

та структурой петля–спираль–петля [8]. И напротив, в ферментах класса GT80 второй остаток аспарагиновой кислоты (Asp141) в этом мотиве является главным функциональным остатком и отнимает протон у 3'-ОН лактозы (Lac), что делает группу 3'-O⁻ более сильным нуклеофилом для атаки на аномерный атом C2 в CMP-Neu5Ac [9]. К настоящему времени известны структуры четырех сиалилтрансфераз класса GT80 в своей апо-форме, либо в комплексе с CMP или в комплексе с CMP-3FNeuAc и Lac [9–12]. Основываясь на информации о структуре (рис. 1, В и 2, В), можно проследить формирование цепочки водородных связей между консервативными аминокислотными остатками (а.о.) Asp141, Asn109 и Asp33 в молекулах этих ферментов. Помимо этого, главный функциональный а.о. Asp141 локализуется на небольшой петле, соединяющей домены Nβ5 и Nα5, а а.о. Asn109 и Asp33 располагались в концевых частях доменов Nβ4 и Nβ1 соответственно. Далее, а.о. Asp33 взаимодей-

ствовал с α-спиралью Nα1 посредством водородной связи, формируемой атомом кислорода бокового радикала а.о. Asp33 и атомом N-пептидной связи, образуемой а.о. Ala39 (либо Thr или Ser в других ферментах класса GT80) (рис. 2, В). Предположений о роли этой цепочки водородных связей не существует и исследований в этом направлении ранее не проводилось.

Недавно при изучении генома вирулентного штамма *Pasteurella multocida* 671/90 [13] было установлено, что предполагаемая сиалилтрансфераза Pm0160, последовательность которой была выведена из структуры гена *pm0160* этой бактерии, несла мутацию Asp141→Tyr в мотиве DDG (рис. 1, В). Учитывая тот факт, что главные функциональные остатки в сиалилтрансферазах класса GT52 или, по крайней мере, места их расположения, не являются консервативными (рис. 1, С), было бы интересным выяснить, может ли а.о. Tyr141 заменить Asp141 и функционировать как главный в ферменте

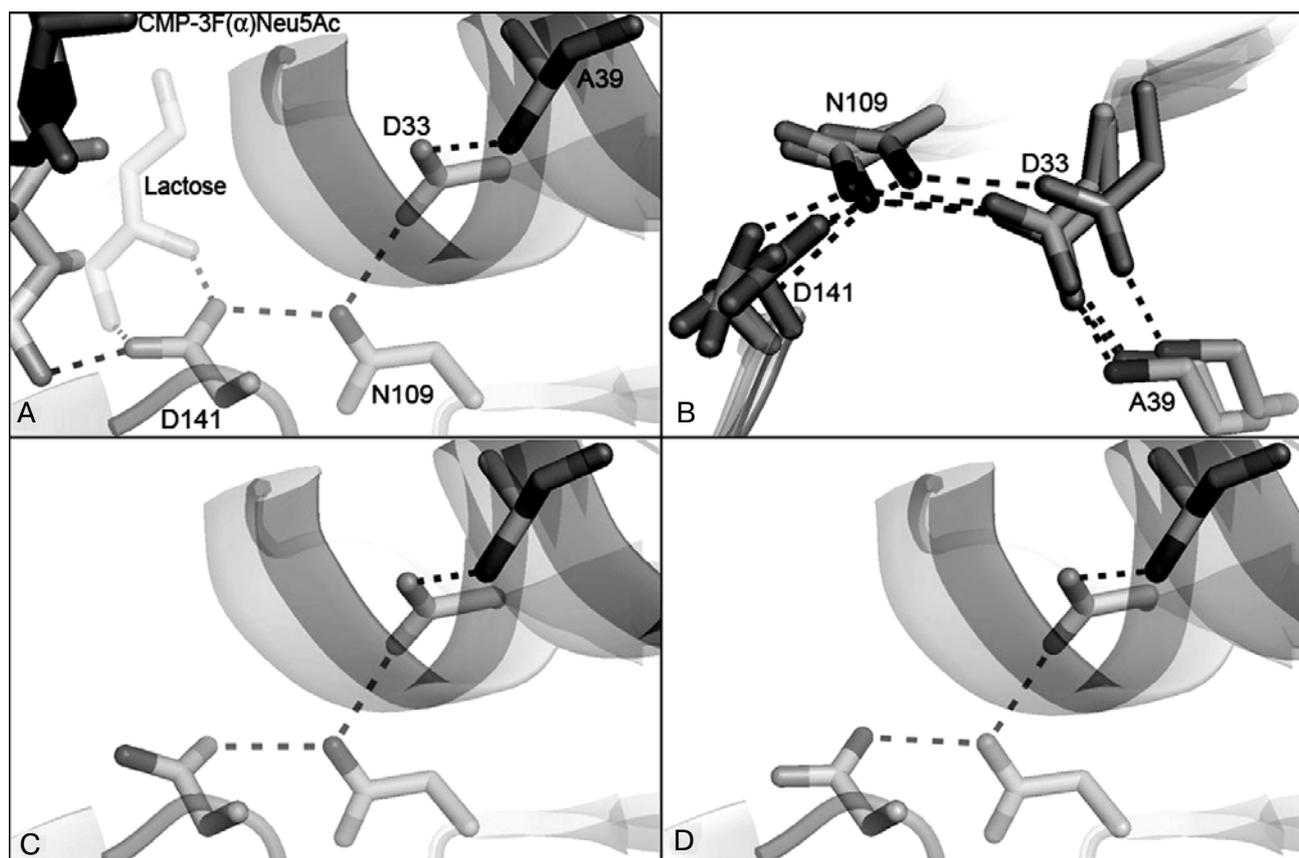


Рис. 2. Схематическое изображение цепочки водородных связей в активном центре фермента PmST1 (2IHZ) (A); изображение представленных в различной ориентации цепочек водородных связей в активных центрах четырех сиалилтрансфераз класса GT80 (2IHZ, 2Z4T, 2ZWI и 2IY8) (совмещены соответствующие остатки и связи между ними) (B); карбоксамиды в боковом радикале остатка Asn141 в мутантной форме D141N–N109D–D33N (D) фермента PM018 (2I1B) был представлен в позиции с противоположной ориентацией по сравнению с тем же остатком в мутантной форме D141N белка PM0188 (C)

Pm0160. При этом в представленной работе была исследована роль цепочки водородных связей (Asp141–Asn109–Asp33) внутри молекулы этого фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование, экспрессия и очистка белков.

Полноразмерный ген *pm0160* синтезирован фирмой «GENEWIZ» (Китай) и встроен в вектор pET15b. Мутагенез выполнен с использованием набора для сайт-специфического мутагенеза fast site-directed mutagenesis kit («TransGen», Франция). Контроль результатов мутагенеза проводили путем секвенирования ДНК на фирме «GENEWIZ» (Китай). Рекombинантные плазмиды вводили в компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3). Трансформированные клетки культивировали в среде Лурия–Бертани (LB), содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессию рекombинантных белков инициировали добавлением к культуре 0,1 мМ ИПТГ (изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид) и инкубировали клетки 24 ч при 16° (180 об/мин). Затем культуру выращивали при 37° при взбалтывании (250 об/мин) до поглощения в суспензии 0,8 при 600 нм. Клетки осаждали 10 мин при 8000 об/мин, ресуспендировали в буфере для лизиса (100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,1%-ный Triton X-100) и разрушали ультразвуком. Полученную смесь центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин, а супернатант подвергали аффинной хроматографии на колонке с Ni²⁺-НТА (нитрилотриацетат), уравновешенной 5 объемами буфера для сорбции белков (5 мМ имидазол, 0,5 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Колонку промывали 8-ю объемами буфера для промывки (40 мМ имидазол, 0,5 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0) и элюировали целевые белки буфером для элюции (200 мМ имидазол, 0,5 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Концентрацию очищенного фермента определяли с использованием набора Bicinchoninic acid Protein Assay Kit («Pierce», США) и БСА в качестве белкового стандарта. Чистота очищенных препаратов ферментов была >96%, что было установлено методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза (гели окрашивали кумасси).

Анализ реакционной смеси методом тонкослойной хроматографии (TLC). Ферментативную реакцию проводили в течение 40 мин при 37° в 40 мкл среды, содержащей 100 мМ Tris-HCl-буфер, pH 8,0 и 0,35 мкг белка PmST1 (положительный контроль) или различные мутантные формы Pm0160. В качестве субстратов использовали СТР и Neu5Ac (по 15 мМ) и α- или β-лактозу (10 мМ). CMP-Neu5Ac генерировался не-

посредственно в реакционной среде под действием CMP-сиалилсинтетазы из *N. meningitidis* (Nmcss). Продукты реакции анализировали методом TLC (MERCK TLC Silica gel 60 F254) в смеси этилацетат/метанол/H₂O/уксусная кислота = 4/2/1/0.2. Для визуализации сахаров пластинки окрашивали *p*-анисальдегидом. При определении термической устойчивости фермент сначала преинкубировали при 45 или 50° 30 мин, а затем определяли его активность.

Определение сиалилтрансферазной активности при различных pH методом ЖХВД. Ферментативную реакцию проводили 30 мин при 37° в 20 мкл среды инкубации, содержащей 100 мМ буфер с pH от 5,0 до 10,0 (MES, pH 5,0–6,5; MOPS, pH 7,0; Tris-HCl, pH 7,5–9,0; CAPSO, pH 9,5; CAPS, pH 10,0), 4,4 нг Pm0160^{141D}, 1 мМ CMP-Neu5Ac («Sigma-Aldrich», США) и 1 мМ LacMU, и останавливали добавлением 10 мкл ТХУ. LacMU (остаток лактозы, несущий флуоресцирующий тег на редуцирующем конце) синтезировали как описано ранее [14]. Реакционную смесь центрифугировали, наносили на колонку Synergi 4μ Polar-RP18 (250 × 4,6 мм) и разделяли в градиенте ацетонитрила от 15 до 70% со скоростью 1 мл/мин 30 мин на хроматографической системе Shimadzu LC-2010A, укомплектованной УФ-детектором SPD-20A UV («Shimadzu», Япония).

Определение термической устойчивости фермента методом ЖХВД. Ферментативную реакцию проводили в течение 30 мин при 37° в 20 мкл смеси, содержащей буфер 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 4,4 нг фермента и по 1 мМ CMP-Neu5Ac и LacMU. Реакцию останавливали 10 мкл ТХУ и анализировали реакционную смесь методом ЖХВД как было описано выше. Для определения термической устойчивости фермент сначала преинкубировали при 45° в течение 0, 10, 30 и 60 мин, затем определяли его активность. Сиалированную LacMU идентифицировали методом масс-спектрометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и экспрессия гена *pm0160*. Ген *pm0160* «дикого» типа был синтезирован по нашему заказу и клонирован в плазмиду pET15b. Гибридный белок N-(His)₆-Pm0160 был экспрессирован в клетках *E. coli* и очищен аффинной хроматографией на Ni²⁺-НТА.

Реактивация белка Pm0160 путем замены Tyr141 на Asp. Как показано на рис. 3, А и В, белок Pm0160 «дикого» типа был неактивен в реакционной системе, описанной в работе [15], где субстрат сиалилтрансферазы, CMP-Neu5Ac, об-

разуется *in situ* из СТР и Neu5Ac под действием Nmcs (раздел «Методы исследования»). Поскольку в сиалилтрансферазах класса GT80 главным функциональным а.о. считается Asp141 в мотиве DDG [9], то нами была выполнена обратная мутация Y141→D. Из рис. 3, А и В следует, что эта единственная мутационная замена приводила к восстановлению сиалилтрансфе-

разной активности белка Pm0160. Замена Met144→Asp в этой реактивированной форме белка, называемой в дальнейшем Pm0160^{141D}, не оказывала заметного влияния на ее ферментативную активность. Это отличало Pm0160^{141D} от другой сиалилтрансферазы (PmST1), где аналогичная мутация приводила к снижению ферментативной активности [16].

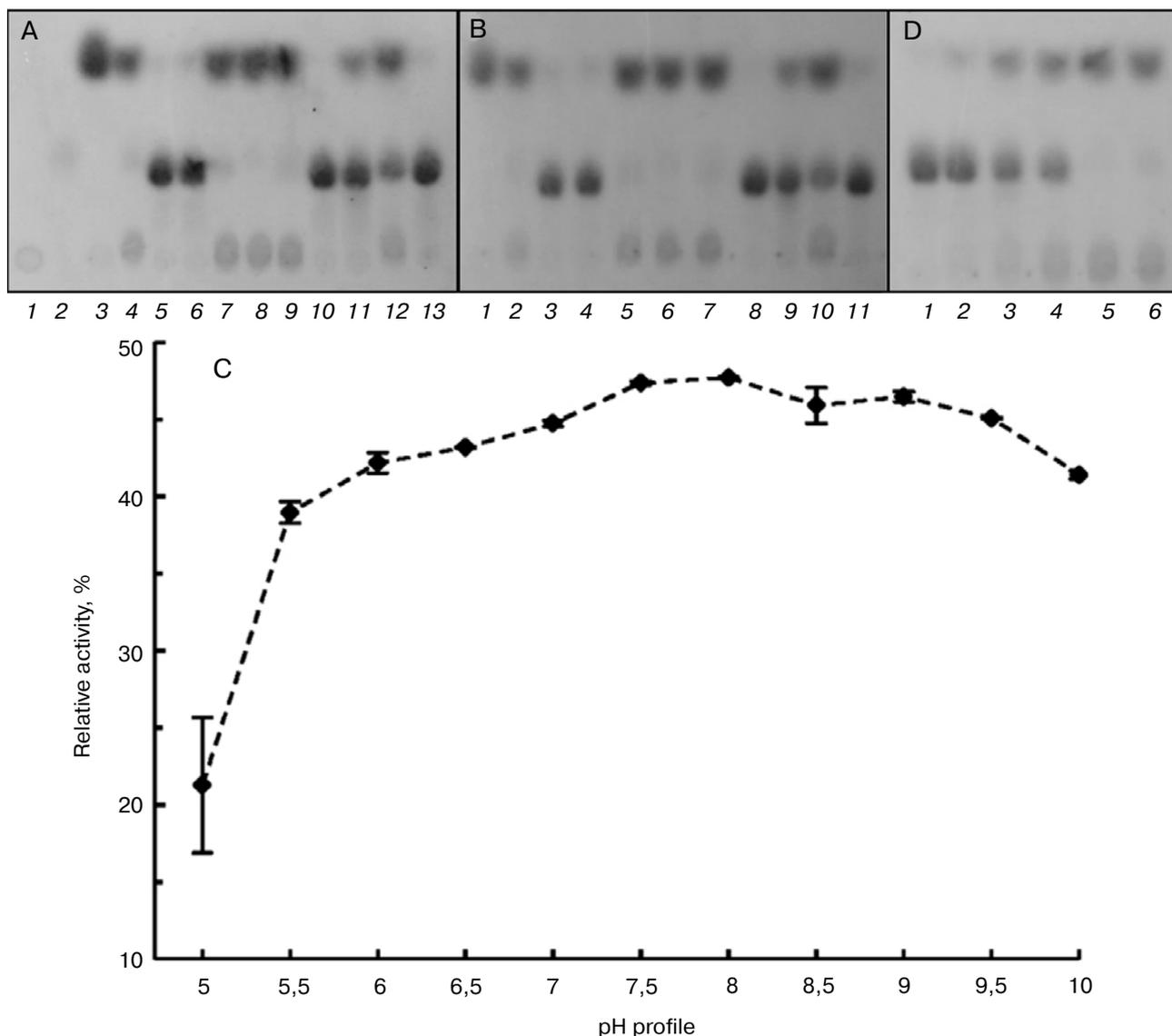


Рис. 3. Анализ методом TLC сиалилтрансферазной активности «дикой» (Pm0160) и реактивированной (Pm0160^{141D}) форм фермента, а также различных мутантных форм в присутствии α -Lac (A) или β -Lac (B) в качестве акцептирующего субстрата. Зависимость сиалилтрансферазной активности Pm0160^{141D} от pH определяли методом ЖХВД (C), а от температуры среды преинкубации в присутствии β -Lac в качестве акцептирующего субстрата – методом TLC (D); A: полосы 1–3: СТР, Neu5Ac, α -Lac; (полосы 4–13) продукты реакции, катализируемой Pm0160, Pm0160^{141D}, мутантными формами: M144D^{141D}, D141N, D141N–N109D, D141N–N109D–D33N, N109A^{141D}, D33A^{141D}, D33L^{141D}, а также белком PmST1 (положительный контроль) соответственно; B – 1: β -Lac; полосы 2–11 – соответствуют 4–13 (A); D – белки Pm0160^{141D}, N109A^{141D} и D33A^{141D} преинкубировали при 45° (полосы 1–3) или при 50° (полосы 4–6), а затем проводили определение активности как описано в разделе «Методы исследования»

Зависимость сиалилтрансферазной активности белка Pm0160^{141D} от pH. Как показано на рис. 3, С, белок Pm0160^{141D} эффективно осуществлял реакцию переноса остатка Neu5Ac от CMP-Neu5Ac на LacMU в широком диапазоне pH с оптимумом при pH ~8,0. Свыше 80% от своей наибольшей активности фермент проявлял в диапазоне pH 5,5–10,0.

Функция цепочки водородных связей. На основе анализа кристаллической структуры четырех сиалилтрансфераз класса GT80 [9–12] было установлено существование цепочки из следующих друг за другом внутримолекулярных водородных связей между тремя консервативными а.о. (Asp141, Asn109 и Asp33). Эта уникальная цепочка связывает главный функциональный а.о. Asp141 с соответствующими остатками структурных доменов Nβ4, Nβ1 и Nα1 основной белковой цепи (рис. 2, В). Казалось вероятным, что такое взаимодействие ориентирует остаток Asp141 в позицию, необходимую для осуществления депротонирования ОН-группы акцептирующего субстрата, а также воздействует на сиалиловый компонент ферментативной реакции посредством образования водородной связи с его атомом О4 (рис. 2, А). Поэтому мы предположили, что эта цепочка водородных связей играет исключительную роль в поддержании сиалилтрансфераз класса GT80 в активном состоянии. Пока неизвестно, вносит ли эта цепочка внутримолекулярных связей свой вклад в конформационную стабильность фермента.

С целью ответа на все эти вопросы нами были выполнены точечные мутационные замены в белке Pm0160^{141D}: N109→А (белок N109A^{141D}), D33→А (белок D33A^{141D}), D33→L (белок D33L^{141D}), D141N, D141N–N109D, D141N–N109D–D33N. Поскольку белок Pm0160^{141D} отличается от PmST1 и Pm0188 только по пяти и трем аминокислотным остаткам соответственно, то можно было предположить, что активные центры всех этих ферментов имеют много общего в своем строении и функционировании. Первичные структуры белков PmST1 и Pm0188, имеющих 99% идентичности, были установлены ранее и независимо друг от друга двумя группами исследователей [9, 10].

К нашему удивлению, мутантная форма N109A^{141D} обладала практически такой же ферментативной активностью, как и Pm0160^{141D} при использовании α- или β-Lac в качестве субстрата-акцептора (рис. 3, А и В), и лишь немного более низкой активностью при использовании LacMU (таблица). Это могло бы означать, что сиалилтрансферазная активность Pm0160^{141D} может не зависеть или очень слабо зависеть от пространственной ориентации остатка Asp141,

готового к акцептированию субстрата. Действительно, ведь цепочка водородных связей между Asp141–Asn109–Asp33, существующая в белке Pm0160^{141D}, была разрушена в белке N109A^{141D} в результате мутации Asn109→Ala и не могла принимать участие в ориентации главного функционального остатка. В то же время, если водородная связь между Asp109 и Asp33 была нарушена в результате мутаций D33→А или D33→L, то ферментативная активность значительно падала (рис. 3, А, В и таблица). Поскольку остаток Asp33 располагается вдали от активного центра, то это снижение ферментативной активности могло бы являться следствием конформационных изменений, вызванных заменой COOH-группы остатка Asp33 на водород остатка аланина или изопропильный боковой радикал лейцина. Взаимосвязь между существованием цепочки водородных связей и конформационной устойчивостью фермента была прослежена нами путем изучения термической устойчивости различных мутантных форм Pm0160^{141D}. Как следует из рис. 4 (А, В), через 1 ч преинкубации при 45° белки Pm0160^{141D} и D33A^{141D} сохраняли ~64 и 60% своей исходной активности соответственно при использовании LacMU в качестве субстрата-акцептора. Аналогичный результат был получен и методом TLC с β-Lac в качестве субстрата (рис. 3, D). Несмотря на то, что все три исследованных фермента (Pm0160^{141D}, N109A^{141D} и D33A^{141D}) были все еще активны после 30 мин преинкубации при 45°, только Pm0160^{141D} оставался достаточно активным (~50%) после преинкубации в течение 30 мин при 50°. В отличие от неактивного N109A^{141D}, белок D33A^{141D} все еще сохранял некоторую активность, о чем свидетельствовало наличие пятна сиалированного продукта реакции на хроматограмме (рис. 3, D). Можно заключить, что водородная связь, формируемая между Asp141 и остатком Asn109, рас-

Специфическая сиалилтрансферазная активность «дикой» и различных мутантных форм белка Pm0160

Фермент	Активность, ед/мг
Pm0160	ND
Pm0160 ^{141D}	88,4
M144D ^{141D}	99,8
N109A ^{141D}	62,5
D141N–N109D–D33N	ND
D33L ^{141D}	2,1
D33A ^{141D}	5,0

Примечание. ND – активность не детектируется.

положенным в концевой части домена N β 4, по-видимому, более важна для поддержания структурной стабильности фермента, чем для ориентации главного функционального остатка Asp141

в позиции, необходимой для обеспечения переноса Sia.

Необходимо отметить, что замена Asp141→Asn в белках Pm0160^{141D}, PmST1 и Pm0188 очень ма-

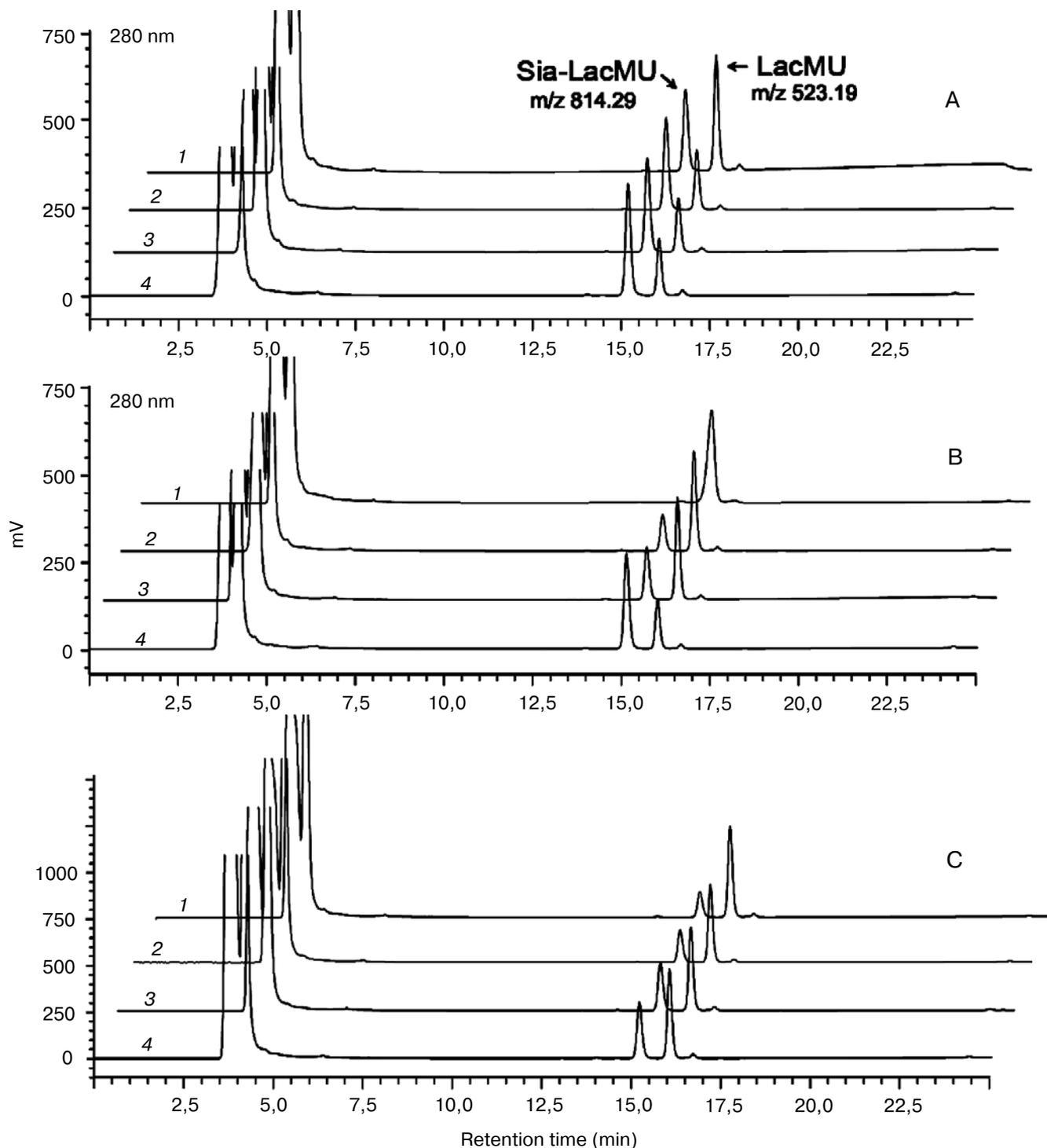


Рис. 4. Термическая устойчивость сиалилтрансфераз. Сначала белки Pm0160^{141D} (A), N109A^{141D} (B) и D33A^{141D} (C) преинкубировали при 45° в течение 10, 30 и 60 мин, а затем определяли их способность к переносу Sia от CMP-Neu5Ac на LacMU методом ЖХВД

ло либо вовсе не сказывалась на их сиалилтрансферазной активности (рис. 3, А и В) [9, 10]. Анализ структуры (2ПВ) мутантной формы D141N белка PM0188 показал, что карбонильный кислород бокового радикала остатка Asn141 образует водородную связь с амидным атомом водорода остатка Asn109, что приводит к переориентации амидной группы остатка Asn141 в сторону от направления на остаток Asn109 (рис. 2, С) [9, 10]. Однако анализ структуры белков PmST1 и PM0188 (2IHZ и 2IY8 соответственно), находящихся в комплексе с Lac и CMP-3FNeuAc, показал, что карбонильный кислород бокового радикала а.о. Asp141, ориентированный далеко в сторону от направления на остаток Asn109, все же способен выполнять депротонирование субстрата-акцептора (Lac). Напротив, несмотря на то, что в белке D141N–N109D–D33N карбоксамидная группа бокового радикала а.о. Asn141, по-видимому, переориентирована и стабилизирована благодаря водородным связям, возникающим между боковыми группами а.о. Asn141, Asp109, Asn33 и атомом N (от Ala39), расположенным в основной цепи белка (рис. 2, С), эта мутантная форма фермента была не способна осуществлять перенос Sia от CMP-Neu5Ac ни на LacMU, ни на α - или β -Lac (таблица, рис. 3, А и В).

Следовательно, можно заключить, что наличие остатка Asp141, выступающего как главный функциональный остаток в ферментах класса GT80, было необходимо для осуществления ферментативной реакции.

Таким образом, а.о. Asp141, расположенный в мотиве DDG, необходим для функционирования Pm0160^{141D}. По-видимому, уникальная цепочка внутримолекулярных водородных связей, формирующаяся между остатками Asp141–Asn109–Asp33 и связывающая главный функциональный а.о. Asp141 последовательно с доменами N β 4, N β 1 и N α 1, нужна именно для стабилизации молекулы фермента, а не для ориентирования Asp141 в продуктивной конформации. Поскольку а.о. Asp141, Asn109 и Asp33 являются высококонсервативными для сиалилтрансфераз класса GT80, то наши выводы могли быть отнесены ко всем ферментам этого класса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального фонда по естественным наукам (гранты 81102361, 81202682 и 31170768) и Тяньджинского фонда по естественным наукам (гранты 12JCQNJC02900 и 13JCYBJC41000).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen, X., and Varki, A. (2010) Advances in the biology and chemistry of sialic acids, *ACS Chem. Biol.*, **5**, 163–176.
- Varki, A. (2008) Sialic acids in human health and disease, *Trends Mol. Med.*, **14**, 351–360.
- Yu, H., Chokhawala, H.A., Huang, S., and Chen, X. (2006) One-pot three-enzyme chemoenzymatic approach to the synthesis of sialosides containing natural and non-natural functionalities, *Nature Protoc.*, **1**, 2485–2492.
- Yamamoto, T. (2010) Marine bacterial sialyltransferases, *Mar. Drugs*, **8**, 2781–2794.
- Jeanneau, C., Chazalet, V., Auge, C., Soumpasis, D.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Imbert, A., and Breton, C. (2004) Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif, *J. Biol. Chem.*, **279**, 13461–13468.
- Datta, A.K. (2009) Comparative sequence analysis in the sialyltransferase protein family: analysis of motifs, *Curr. Drug Targets*, **10**, 483–498.
- Freiberger, F., Claus, H., Gunzel, A., Oltmann-Norden, I., Vionnet, J., Muhlenhoff, M., Vogel, U., Vann, W.F., Gerardy-Schahn, R., and Stummeyer, K. (2007) Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases, *Mol. Microbiol.*, **65**, 1258–1275.
- Lin, L.Y., Rakic, B., Chiu, C.P., Lameignere, E., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., and Strynadka, N.C. (2011) Structure and mechanism of the lipooligosaccharide sialyltransferase from *Neisseria meningitidis*, *J. Biol. Chem.*, **286**, 37237–37248.
- Ni, L., Chokhawala, H.A., Cao, H., Henning, R., Ng, L., Huang, S., Yu, H., Chen, X., and Fisher, A.J. (2007) Crystal structures of *Pasteurella multocida* sialyltransferase complexes with acceptor and donor analogues reveal substrate binding sites and catalytic mechanism, *Biochemistry*, **46**, 6288–6298.
- Kim, D.U., Yoo, J.H., Lee, Y.J., Kim, K.S., and Cho, H.S. (2008) Structural analysis of sialyltransferase PM0188 from *Pasteurella multocida* complexed with donor analogue and acceptor sugar, *BMB Rep.*, **41**, 48–54.
- Iwatani, T., Okino, N., Sakakura, M., Kajiwarra, H., Takakura, Y., Kimura, M., Ito, M., Yamamoto, T., and Kakuta, Y. (2009) Crystal structure of alpha/beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase from a luminous marine bacterium, *Photobacterium phosphoreum*, *FEBS Lett.*, **583**, 2083–2087.
- Kakuta, Y., Okino, N., Kajiwarra, H., Ichikawa, M., Takakura, Y., Ito, M., and Yamamoto, T. (2008) Crystal structure of *Vibrionaceae Photobacterium* sp. JT-ISH-224 alpha2,6-sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: catalytic mechanism and substrate recognition, *Glycobiology*, **18**, 66–73.
- Lainson, F.A., Dagleish, M.P., Fontaine, M.C., Bayne, C., and Hodgson, J.C. (2013) Draft Genome Sequence of *Pasteurella multocida* A:3 Strain 671/90, *Genome Announc.*, **1**, DOI: 10.1128/genomeA.00803-13.
- Yu, H., Chokhawala, H., Karpel, R., Yu, H., Wu, B., Zhang, J., Zhang, Y., Jia, Q., and Chen, X. (2005) A mul-

- tifunctional *Pasteurella multocida* sialyltransferase: a powerful tool for the synthesis of sialoside libraries, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 17618–17619.
15. Yu, H., Cheng, J., Ding, L., Khedri, Z., Chen, Y., Chin, S., Lau, K., Tiwari, V.K., and Chen, X. (2009) Chemoenzymatic synthesis of GD3 oligosaccharides and other disialyl glycans containing natural and non-natural sialic acids, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 18467–18477.
16. Sugiarto, G., Lau, K., Li, Y., Khedri, Z., Yu, H., Le, D.T., and Chen, X. (2011) Decreasing the sialidase activity of multifunctional *Pasteurella multocida* alpha2-3-sialyltransferase 1 (PmST1) by site-directed mutagenesis, *Mol. Biosyst.*, **7**, 3021–3027.

**Asp141 AND THE HYDROGEN-BOND
CHAIN Asp141–Asn109–Asp33 ARE RESPECTIVELY
ESSENTIAL FOR GT80 SIALYLTRANSFERASE
ACTIVITY AND STRUCTURAL STABILITY**

**Xiaoyan Chen¹, Yuanming Wang², Zhenping Ma²,
Na Li², Weiqing Han², Qi Zhang², Yumei Cai^{1*},
Jiansong Cheng^{2*}**

¹ Shandong Agricultural University, College of Animal
Science and Veterinary Medicine 271018, China;
E-mail: caiyum@163.com

² Nankai University, State Key Laboratory of Medicinal Chemical
Biology and College of Pharmacy, Tianjin 300071, China;
E-mail: jiansongcheng@nankai.edu.cn

Received December 18, 2014
Revision received March 04, 2015

Sialyltransferases are key enzymes involved in the biosynthesis of biologically and pathologically important sialic acid-containing molecules in Nature. In this study, the activity of a putative sialyltransferase (Pm0160) harboring an inherent mutation of D141Y in the conserved DDG motif, which has been identified in GT52 and GT80 families, was restored by a reverse mutation. More interestingly, a hydrogen-bond chain was found to form between three conserved residues (Asp141, Asn109, and Asp33) of GT80 sialyltransferases based on recently determined crystal structures. Our mutagenesis experiments demonstrated that the hydrogen-bond chain connecting the general base Asp141 with Nβ4, Nβ1, and Nα1 play an essential role in maintaining protein structural stability other than keeping the general base Asp141 in a productive orientation for sialic acid transfer.

Key words: sialyltransferase, hydrogen-bond chain, general base, stability, activity