

УДК 577.151

## СУБСТРАТНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГОМОЛОГОВ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ L-ТРЕОНОВОЙ КИСЛОТЫ\*,\*\*

© 2020 Ч. Чжан<sup>1#</sup>, Юй Лю<sup>1#</sup>, С. У<sup>1</sup>, С. Чжан<sup>2\*\*\*</sup>, Х. Хуан<sup>1\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong, 510631 China; E-mail: hhuang@m.scnu.edu.cn

<sup>2</sup> Institute of Ecological Science, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong, 510631 China; E-mail: xszhang@scnu.edu.cn

Поступила в редакцию 26.11.2019

После доработки 07.01.2020

Принята к публикации 21.01.2020

Несмотря на физиологическое значение альдоновых сахарных кислот для живых организмов, мало известно о метаболических путях этих соединений. В данной работе мы исследовали функциональное разнообразие гомологов дегидрогеназы L-треоновой кислоты (ThrDH, UniProt ID: Q0KBC7) – фермента, имеющего два NAD-связывающих домена (PF14833 и PF03446). Мы изучили десять гомологов ThrDH с различным геномным контекстом и охарактеризовали семь новых ферментативных активностей ((R)-пантоатдегидрогеназа, L-дегидрогеназа альдроновой кислоты, дегидрогеназа 6-дезоксид-L-талионовой кислоты, дегидрогеназа L-идоновой кислоты, дегидрогеназа D-ксилоновой кислоты, дегидрогеназа D-глюконовой кислоты и редуктаза 2-гидрокси-3-оксопантоевой кислоты). Кроме того, нами также были идентифицированы два ассоциированных метаболических пути: было обнаружено, что дегидрогеназа L-идоновой кислоты участвует в деградации L-идоновой кислоты посредством ее окисления/декарбоксилирования у *Agrobacterium radiobacter* K84, в то время как 2-гидрокси-3-оксопантоатредуктаза участвует в катаболизме D-глюкарата посредством дегидрирования/расщепления субстрата у *Ralstonia metallidurans* CH34.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** (R)-пантоатдегидрогеназа, катаболизм L-идоновой кислоты, катаболизм D-глюкарата, дегидрогеназа L-альдроновой кислоты, дегидрогеназа D-ксилоновой кислоты.

**DOI:** 10.31857/S0320972520040065

Сахарные кислоты представляют собой сахараиды с карбоксильной группой. Их подразделяют на альдоновые, улозоновые, уроновые и альдаровые кислоты. Альдоновые кислоты, у которых альдегидная функциональная группа альдозы окислена с образованием карбоксильной группы, выполняют важные физиологические функции. Например, D-глюконовая кислота является регулятором кислотности и хелатором ионов металлов [1], аскорбиновая кислота (ви-

тамин С) – жизненно важное соединение для живых организмов [2], сиаловые кислоты – важные составляющие структур клеточной поверхности [3]. Согласно Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>), альдоновые сахарные кислоты выявляются в биологических жидкостях и экскрементах человека. Так, D-глицериновая, D-глюконовая и L-ксилоновая кислоты обнаруживаются в слюне, а L-треоновая кислота и D-ксилоновая кислота – в крови и моче [4]. Поэтому изучение метаболизма альдоновых кислот может помочь определить их биологические функции на молекулярном уровне. Большинство альдоновых кислот катаболизируются посредством их последовательного дегидрирования и расщепления, в ходе которых альдоновые кислоты или их фосфаты сначала подвергаются дегидрированию с образованием промежуточных кетодезоксипроизводных соединений, которые затем расщепляются альдолазой на два фрагмента [5–9].

В связи с быстрым увеличением количества аминокислотных последовательностей в доступных базах данных белков, разнообразие путей катаболизма альдоновых кислот оказалось в

Принятые сокращения: EryDH – дегидрогеназа D-эритроновой кислоты; PanDH – (R)-пантоатдегидрогеназа; SSN – сеть сходства последовательностей (sequence similarity network); ThrDH – дегидрогеназа L-треоновой кислоты.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimiyi>, в рубрике «Papers in Press», BM19-334, 11.02.2020.

\*\* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 4, 2020.

\*\*\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

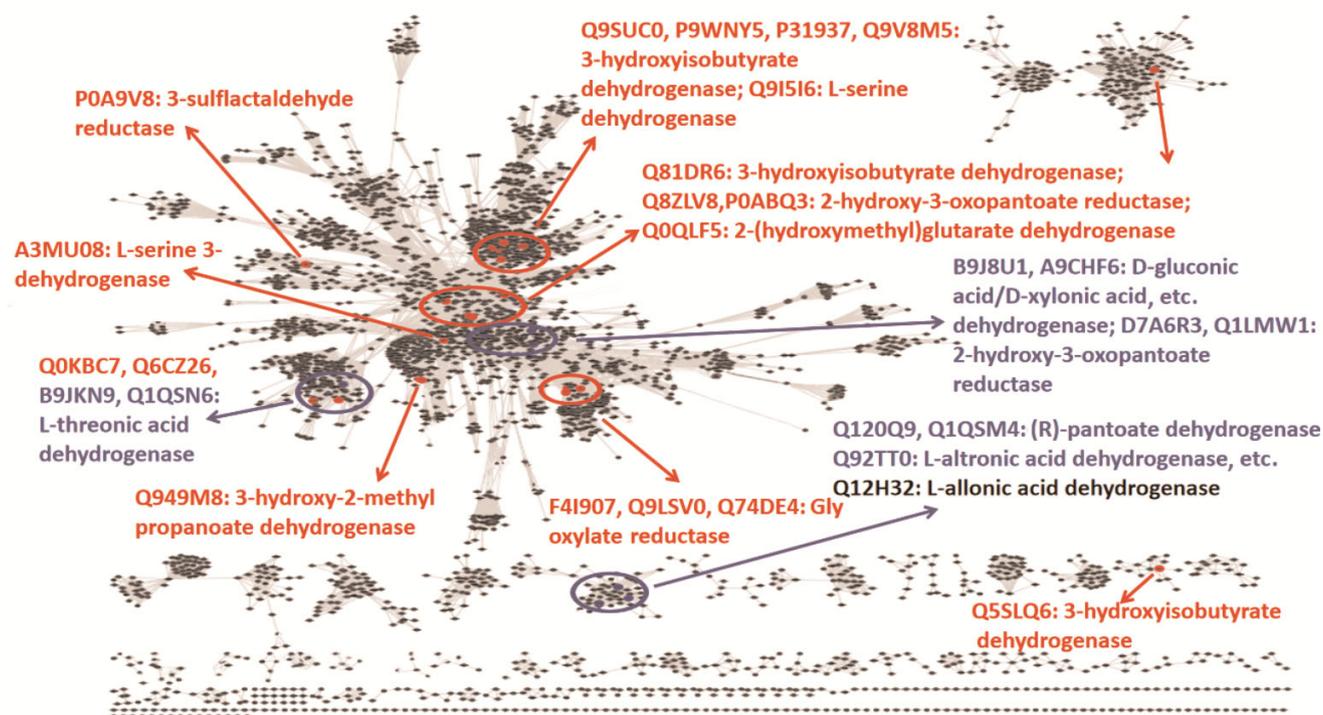
значительной степени недооцененным. Ранее группа Gerlt et al. охарактеризовала дегидрогеназу L-треоновую кислоту (ThrDH) и дегидрогеназу D-эритроновой кислоты (EryDH), которые участвуют в деградации тетрановых кислот в различных катаболических путях [10]. В настоящей работе с целью изучения новых дегидрогеназ альдоновых кислот и связанных с ними метаболических путей нами были отобраны четыре гомолога EryDH (UniProt ID: Q0KBD2) и десять гомологов ThrDH (UniProt ID: Q0KBC7) на основе сходства их аминокислотных последовательностей, разнообразия геномного контекста (рис. S1 Приложения) и доступности данных по геномной ДНК. В результате проведенной работы мы смогли продемонстрировать большое разнообразие субстратов для семи новых дегидрогеназ альдоновых кислот, а также определили два новых катаболических пути.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Все сахара были приобретены в «Carbosynth» (Китай) или синтезированы химическим путем (Хуайхуа, Китай). Другие химические реактивы были приобретены в «Sigma-

Aldrich» (США), нуклеотиды – в «General Biosystems» (Анху, Китай), ферменты – в «New England Biolabs» (США), плазмиды – в «Novagen» (Германия), геномная ДНК была получена от ATCC (США) и DSMZ (Германия). Эксперименты были проведены с использованием спектрометра Varian 600 MHz NMR, спектрофотометров Nanodrop 2000 и UV-visible (AOE instruments UV-1800).

**Генерирование сетей сходства последовательностей (SSN).** Сеть сходства последовательностей (SSN – sequence similarity network) позволяет анализировать и визуализировать структурно-функциональные взаимосвязи в больших семействах белков. SSN были построены, как описано ранее [11]. Вкратце, аминокислотная последовательность белка, его идентификационный номер (ID) в базе данных UniProt или номер семейства в базе данных Pfam (например, PF14833 на рис. 1) использовали как входные данные для программы EFI-EST (<http://efi.igb.illinois.edu/efi-est/>). В сети репрезентативного узла (representative node network) показатель 50% гер, например, означает, что аминокислотные последовательности с идентичностью более 50% будут представлены в виде одного узла. Как правило, первоначально SSN создается на основе вырав-



**Рис. 1.** Структурно-функциональное пространство гомологов ThrDH в контексте SSN (PF14833, 61 955 членов,  $e^{-67}$ , идентичность 40%, 50%гер). Ферменты с известными функциями выделены красным цветом, охарактеризованные в настоящей работе ферменты – синим цветом. Q12H32 показан темно-серым цветом (фермент с низкой активностью). С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

**Таблица 1.** Активные альдоновые кислоты, использованные в настоящей работе в качестве субстратов для тестирования гомологов ThrDH и EryDH

Ферменты (UniProt ID)	Субстраты
Гомологи EryDH (PF01370)	
Q1QSN8/Q1QSM2/B9J8U2/A9CHF5	<b>D-эритроновая кислота</b>
Гомологи ThrDH (PF14833-PF02446)	
Q1QSN6	<b>L-треоновая кислота</b>
B9JKN9	<b>L-треоновая кислота, L-идоновая кислота, L-рибоновая кислота</b>
Q1QSM4/Q120Q9	<b>(R)-пантоат</b>
Q12H32	L-аллоновая кислота
Q92TT0	<b>6-дезоксид-L-галононовая кислота, L-альтроновая кислота, L-люксоновая кислота, L-рамноновая кислота, L-манноновая кислота</b>
B9J8U1/A9CHF6	<b>L-треоновая кислота, L-идоновая кислота, D-глюконовая кислота, D-ксилоновая кислота, D-галактоновая кислота</b>
D7A6R3/Q1LMW1	<b>D-глицериновая кислота</b>

Примечание. Полужирным шрифтом выделены субстраты, в отношении которых показана наибольшая ферментативная активность.

нивания, соответствующего ~30%-ной идентичности последовательности. Затем критерий оценки выравнивания может быть увеличен, чтобы различить разные функции белка (узлы с одинаковой функцией объединяются в один кластер).

**Очистка ферментов.** Фрагменты генов, кодирующих гомологи ThrDH и EryDH разных видов бактерий, амплифицировали по стандартному протоколу ПЦР с использованием соответствующих геномных ДНК и праймеров (табл. S1 Приложения) и лигировали в вектор PET-28a (рис. S2 Приложения). Полученными плазмидами с подтвержденными нуклеотидными последовательностями трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3) для экспрессии белков. Трансформированные клетки инокулировали в 1 л культуральной среды Лурия–Бертани (LB), содержащей 50 мкМ канамицина, и культивировали при 37 °С и 200 об/мин до достижения  $OD_{600}$  0,5–0,8. Для индукции экспрессии белка добавляли 0,4 мМ IPTG и инкубировали клетки в течение ночи (20 °С, 180 об/мин). Далее клетки собирали и суспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0), лизировали с использованием французского пресса (French press) и центрифугировали. Полученный супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой, колонку промывали тремя объемами буфера А (25 мМ Tris, pH 8,0) и двумя объемами 25 мМ имидазола

в буфере А. Белки элюировали 250 мМ имидазолом в буфере А. Полученные белковые фракции анализировали в SDS-PAGE (рис. S3 Приложения). Фракции, содержавшие очищенные белки, объединяли и трижды диализовали против буфера А. Полученные белковые фракции быстро замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С до их дальнейшего использования.

**Анализ ферментативной активности.** Сначала была проанализирована дегидрогеназная активность полученных ферментов – четырех гомологов EryDH и десяти гомологов ThrDH – в отношении библиотеки альдоновых сахарных кислот (34 монокарбоновых сахарных кислот, табл. S2 Приложения) в 96-ячеечном микропланшете. Дегидрогеназную активность оценивали путем измерения образующегося NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  при 340 нм). Реакционная смесь (150 мкл, 25 °С) содержала 1 мкМ дегидрогеназы, 100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,5 мМ  $\text{NAD}^+$ , 1 мМ субстрата. Значения оптической плотности регистрировали через каждую секунду в течение 5 мин. Субстраты, в отношении которых была выявлена наибольшая ферментативная активность, отбирали для проведения более тщательных кинетических измерений с использованием описанного выше метода (табл. 1). Для запуска ферментативной реакции в 200 мкл реакционной смеси, содержащей 100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ ,

Таблица 2. Репрезентативные данные кинетики для гомологов ThrDH

Ферменты (UniProt ID) и субстраты	$K_M$ , мМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , с <sup>-1</sup> · М <sup>-1</sup>
B9JKN9			
L-треоновая кислота	1,19 ± 0,16	20,00 ± 0,92	1,68 × 10 <sup>5</sup>
L-идоновая кислота	1,98 ± 0,42	16,40 ± 1,66	8,3 × 10 <sup>3</sup>
B9J8U1			
D-глюконовая кислота	0,62 ± 0,06	22,40 ± 0,65	3,6 × 10 <sup>4</sup>
L-идоновая кислота	3,60 ± 0,34	21,10 ± 0,92	5,8 × 10 <sup>3</sup>
L-треоновая кислота	1,00 ± 0,13	4,20 ± 0,17	4,1 × 10 <sup>3</sup>
D-ксилоновая кислота	4,45 ± 0,43	15,20 ± 0,91	3,4 × 10 <sup>3</sup>
Q92TT0			
6-дезоксид-L-талоновая кислота	2,10 ± 0,31	6,30 ± 0,46	3,0 × 10 <sup>3</sup>
L-альтроновая кислота	3,10 ± 0,32	7,90 ± 0,45	2,5 × 10 <sup>3</sup>
D7A6R3			
D-глицериновая кислота	0,030 ± 0,004	9,30 ± 0,28	3,2 × 10 <sup>5</sup>
Q1QSM4			
(R)-пантоат	0,23 ± 0,03	6,10 ± 0,23	2,7 × 10 <sup>4</sup>
B9J8U2			
D-эритроновая кислота	0,82 ± 0,10	1,09 ± 0,04	1,3 × 10 <sup>3</sup>
Q1QSM2			
D-эритроновая кислота	1,24 ± 0,18	15,80 ± 0,75	1,27 × 10 <sup>4</sup>

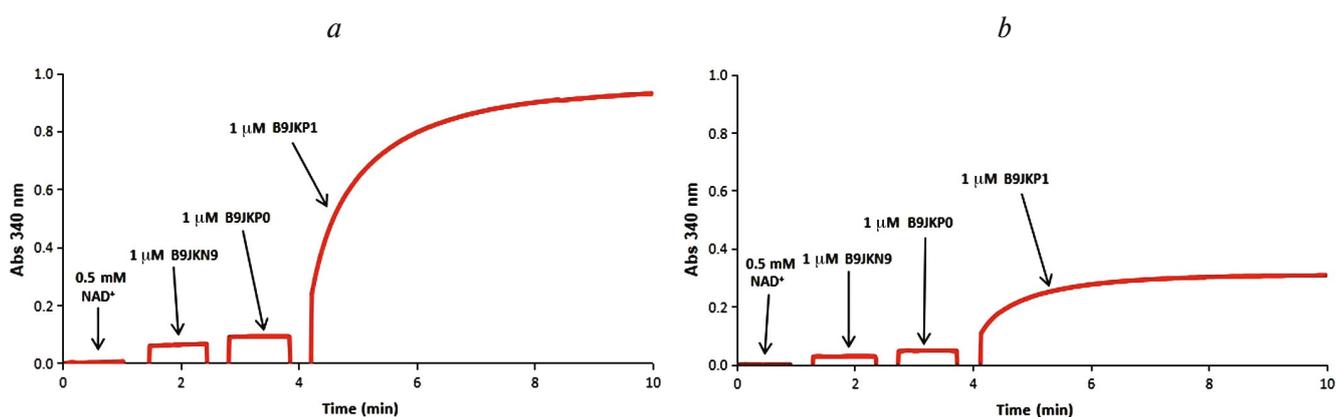


Рис. 2. Спектрофотометрический анализ катаболических путей, ассоциированных с L-треоновой и L-идоновой кислотами. Реакционные смеси содержали 100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1,0 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,5 мМ NAD<sup>+</sup>, 0,5 мМ АТФ и 1 мМ субстратов L-треоновой (a) или L-идоновой кислоты (b). Последовательность добавления в реакционную смесь ферментов ThrDH (B9JKN9), AP\_endo (B9JKP0) и DUF1537 (B9JKP1) показана на каждой панели.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

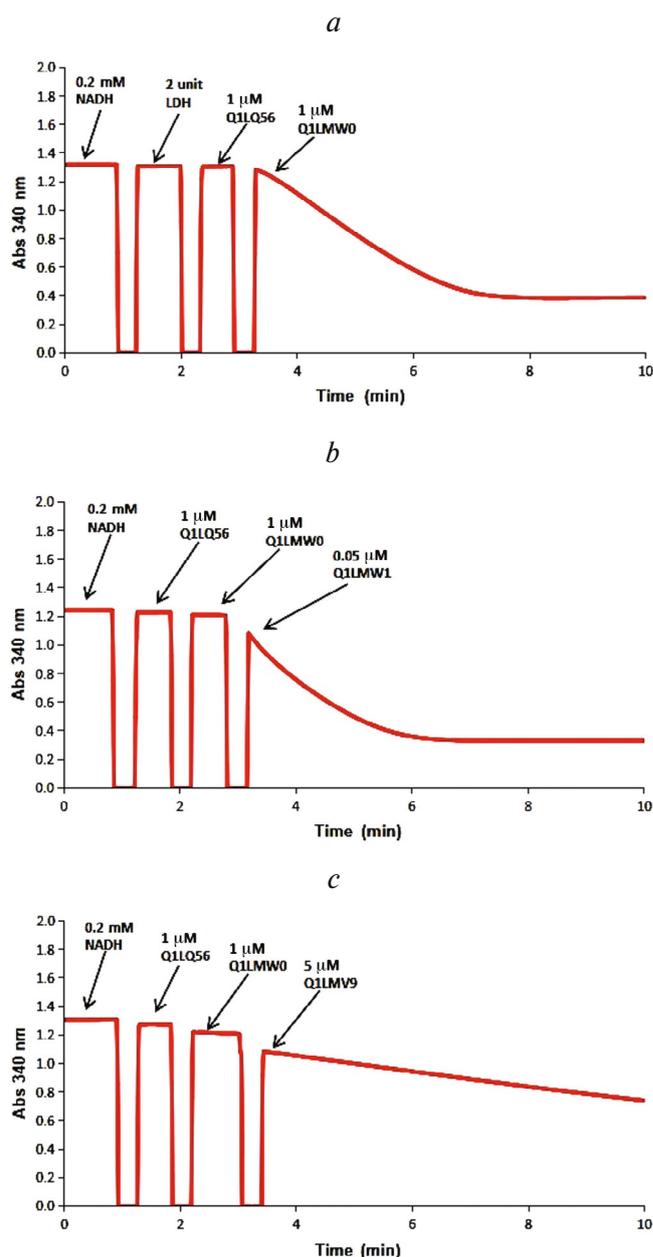
0,5 мМ NAD<sup>+</sup> и различные концентрации субстратов альдоновых кислот, добавляли фермент в соответствующей концентрации. Начальные скорости реакции при различных концентрациях субстрата соответствовали уравнению Михаэлиса–Ментен (табл. 2).

**Определение метаболических путей.** Последовательность реакций катаболических путей для L-треоновой и L-идоновой кислот определяли путем последовательного добавления соответствующих ферментов и последующей регистрации изменений значений оптической плотности при 340 нм. К 200 мкл реакционной смеси (100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,5 мМ NAD<sup>+</sup>, 0,5 мМ АТР, 1 мМ L-треоновой кислоты или 1 мМ L-идоновой кислоты) добавляли 1 мкМ дегидрогеназы (B9JKN9) и 1 мкМ изомеразы (B9JKP0). По достижении состояния равновесия в реакционную смесь вносили 1 мкМ киназы DUF1537 (B9JKP1) (рис. 2). В случае D-глюкрат-ассоциированного катаболического пути ферментативную активность дегидратазы D-глюкарной кислоты (Q1LQ56) и альдолазы (Q1LMW0) подтверждали продукцией пирувата, которую регистрировали с помощью сопряженной с лактатдегидрогеназой реакции в присутствии NADH. Реакционная смесь (200 мкл, 25 °С) содержала 100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,2 мМ NADH и 1,0 мМ D-глюкрат. Для инициации реакции в реакционную смесь добавляли 2 единицы LDH, 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56), 1 мкМ альдолазы (Q1LMW0) и регистрировали изменения значений оптической плотности при 340 нм. Дегидрогеназную активность Q1LMW1 определяли по такому же протоколу, но вместо LDH в реакционную смесь добавляли 0,05 мкМ Q1LMW1 (рис. 3).

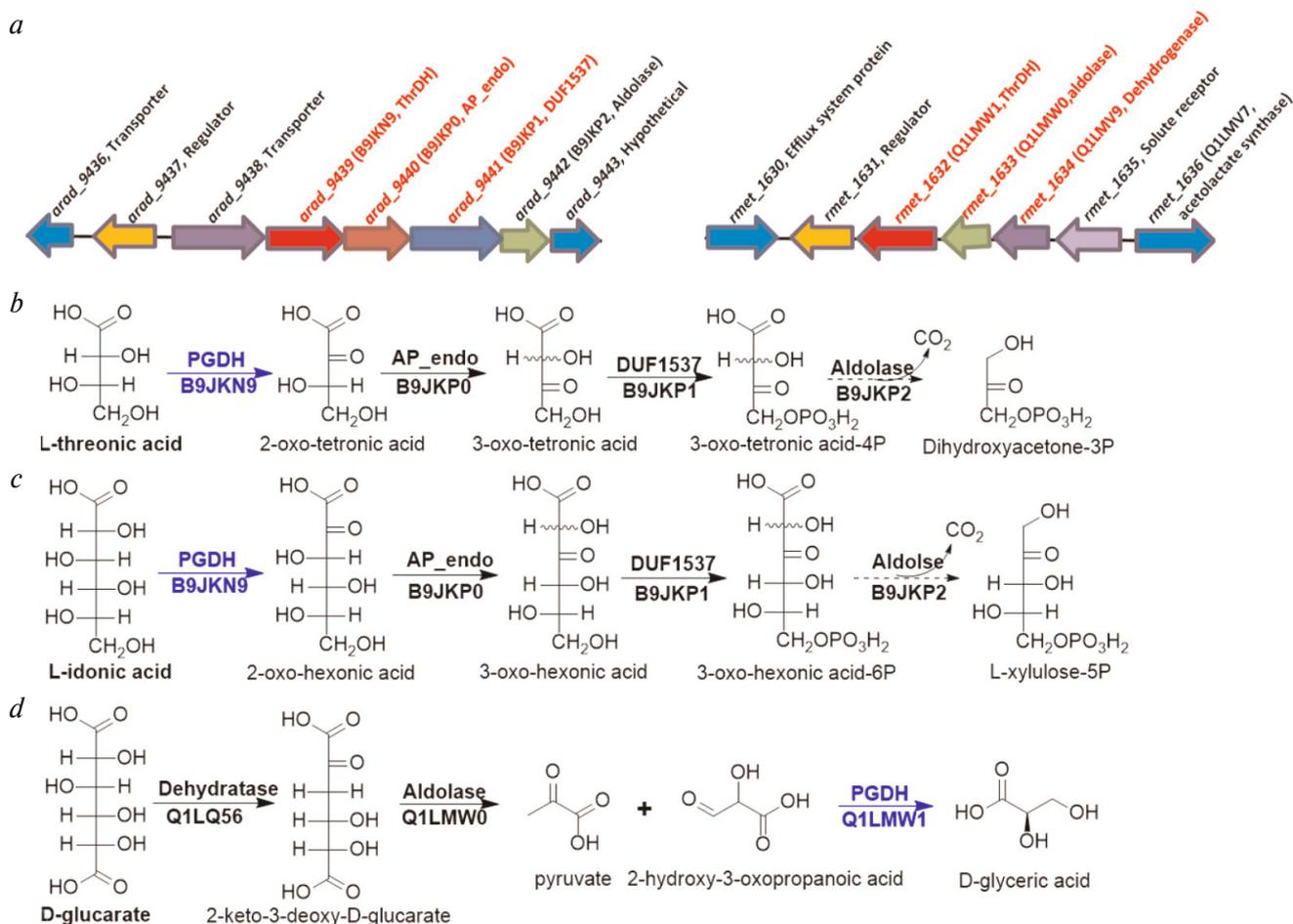
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Субстратная специфичность дегидрогеназ.** Нами была выявлена специфичность четырех гомологов EryDH (UniProt ID: Q1QSN8, Q1QSM2, B9J8U2, A9CHF5; идентичность аминокислотной последовательности ~38–76%) в отношении D-эритроновой кислоты, что согласуется с данными предыдущей работы [10], в то время как гомологи ThrDH были способны катализировать реакции с разнообразными субстратами (табл. 1).

Из представленной на рис. 1 SSN для гомологов ThrDH (рис. 1) видно, что Q1QSN6 обладает специфической активностью в отношении L-треоновой кислоты (расположена в верхнем левом синем круге). Однако B9JKN9 (~49%-ная идентичность аминокислотной последовательности с Q1QSN6) может окислять как L-треоновую



**Рис. 3.** Спектрофотометрический анализ метаболического пути, ассоциированного с D-глюкратом. Исходная реакционная смесь содержала 100 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0), 1,0 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,2 мМ NADH, 1 мМ D-глюкрат. *a* – для определения ферментативной активности Q1LQ56 и Q1LMW0 в реакционную смесь добавляли 2 единицы LDH, 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56) и 1 мкМ альдолазы (Q1LMW0); *b* – для определения редуктазной активности Q1LMW1 в отношении 2-гидрокси-3-оксопентановой кислоты в реакционную смесь добавляли 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56), 1 мкМ альдолазы (Q1LMW0) и 0,05 мкМ ThrDH (Q1LMW1); *c* – для определения ферментативной активности Q1LMV9 в отношении пирувата и 2-гидрокси-3-оксопентановой кислоты в реакционную смесь добавляли 1 мкМ дегидратазы (Q1LQ56), 1 мкМ альдолазы (Q1LMW0) и 5 мкМ Q1LMV9. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>



**Рис. 4.** Генные контексты для дегидрогеназы L-идоновой кислоты (B9JKN9), редуктазы 2-гидрокси-3-оксопентановой кислоты (Q1LMW1) (a) и их соответствующие катаболические пути (b–d). a – Генный контекст для B9JKN9 (*arad\_9439*) и Q1LMW1 (*rmet\_1632*), выделено красным цветом. Субстрат Q1LMV9 (*rmet\_1634*) неизвестен, однако эта дегидрогеназа проявляет редуктазную активность в отношении фенилпировиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот; b, c – катаболические пути, ассоциированные с L-треоновой и L-идоновой кислотами у *Agrobacterium radiobacter* K84. Разные ферменты, участвующие в этих путях, вызывают деградацию обеих альдоновых сахарных кислот с образованием соответствующих фосфатов кетопроизводных сахаров; d – катаболический путь D-глюкарата у *Ralstonia metallidurans* CH34; гомологи ThrDH выделены синим цветом.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohksm/>

кислоту, так и L-идоновую кислоты (табл. 1 и 2). D7A6R3 и Q1LMW1 (63%-ная идентичность аминокислотной последовательности, располагаются в верхнем правом синем круге) специфически окисляют D-глицериновую кислоту с образованием 2-гидрокси-3-оксопентановой кислоты, в то время как для B9J8U1 и A9CHF6 (67%-ная идентичность аминокислотной последовательности) была показана активность в отношении четырех субстратов (D-глюконовая, L-идоновая, L-треоновая и D-ксилоновая кислоты, табл. 1). Кроме того, выявлены новые ферменты: (R)-пантоатдегидрогеназа (PanDH, Q120Q9 и Q1QSM4, 61%-ная идентичность аминокислотной последовательности) и дегидрогеназа L-альтронной кислоты (расположены в

нижнем синем круге). Кинетические величины ( $k_{cat}/K_M$ ) вышеперечисленных ферментов с субстратами альдоновых сахарных кислот колеблются в диапазоне от  $10^3$  до  $10^5$  с $^{-1}$  М $^{-1}$  (табл. 2).

**Определение катаболического пути.** Геномные контексты для B9JKN9 и Q1LMW1 показаны на рис. 4, a. Проведенные эксперименты *in vitro* подтвердили, что L-идоновая кислота может подвергаться деградации путем, сходным с известным путем катаболизма L-треоновой кислоты (рис. 4, b) [10]. В этом метаболическом пути L-идоновая кислота окисляется с помощью B9JKN9 с образованием 2-оксогексоновой кислоты, которая затем изомеризуется и фосфорилируется с участием изомеразы AP\_endo

(B9JKP0) и киназы DUF1537 (B9JKP1). На заключительном этапе нестабильная 3-оксо-гексоновая кислота-6P может распадаться с образованием L-ксилоулозо-5P — самопроизвольно либо под действием альдолазы (B9JKP2) [10, 12] (рис. 2; рис. 4, c).

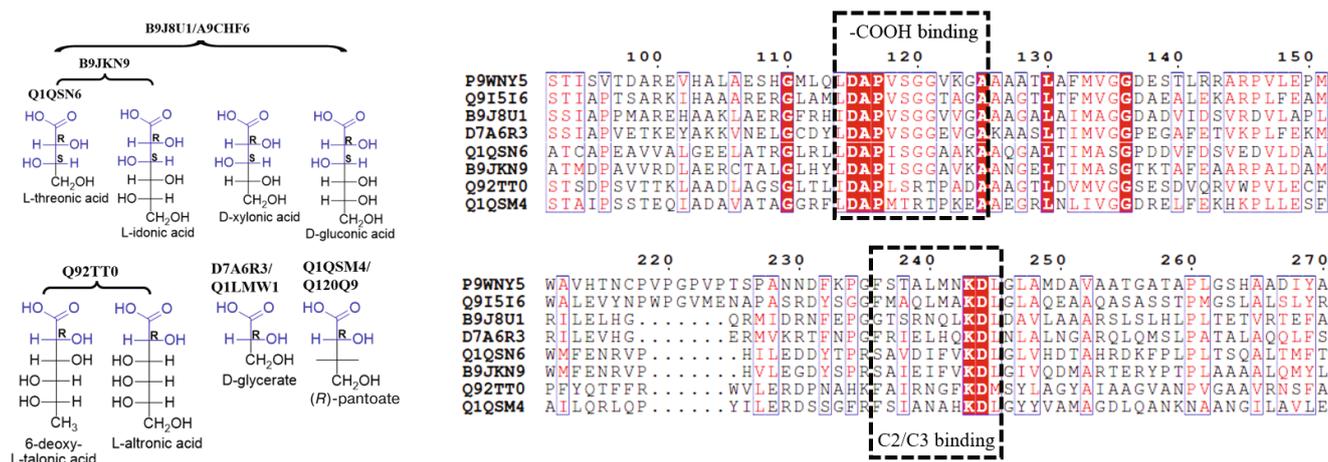
У *Ralstonia metallidurans* CH34 Q1LMW1 принимает участие в типичном пути катаболизма D-глюкарата [13]. Сначала D-глюкарат дегидрируется D-глюкаратдегидратазой (Q1LQ56) с образованием 2-кето-3-дезоксид-глюкарата. Далее этот промежуточный продукт может расщепляться альдолазой (Q1LMW0) с образованием пирувата и 2-гидрокси-3-оксопропановой кислоты (полуальдегид тартроновой кислоты). В завершение Q1LMW1 превращает 2-гидрокси-3-оксопропановую кислоту в D-глицериновую кислоту (рис. 3; рис. 4, d).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

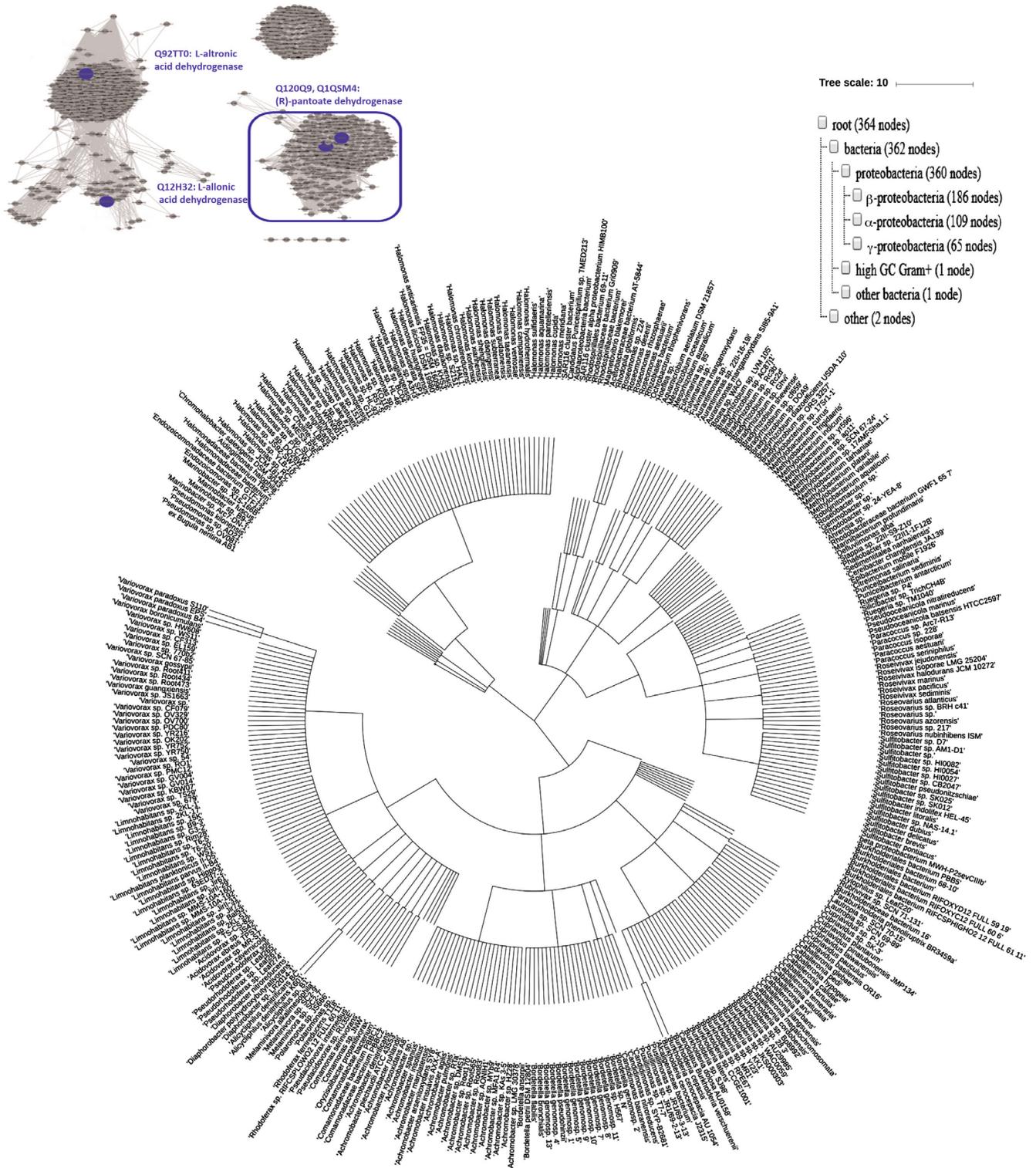
Альдоновые сахарные кислоты широко распространены в окружающей среде и в биологических жидкостях человека и выполняют множество важных физиологических функций [14, 15]. Однако до настоящего времени проводились лишь единичные исследования метаболизма альдоновых сахарных кислот [16, 17]. В данной работе нами была предпринята попытка определить метаболические пути посредством тщательного анализа разнообразия субстратов двух известных семейств дегидрогеназ сахарных

кислот (EryDH: PF01370; ThrDH: PF14833 и PF03446). Во-первых, с использованием комбинированного биоинформатического анализа (анализ гомологии с помощью SSN и анализ индивидуальных геномных контекстов) мы отобрали ферменты, которые могли бы обладать различными функциями. Во-вторых, основываясь на структуре субстратов (-COOH/-SO<sub>3</sub>H) ранее охарактеризованной ThrDH, отображенные нами гомологи ThrDH были подвергнуты скринингу против библиотеки 34 сахарных кислот. Затем гомологи ThrDH были протестированы индивидуально с соответствующими субстратами на предмет детального сравнения кинетических параметров. В завершение на основании выявленных активностей ThrDH по отношению к тестируемым субстратам были изучены ассоциированные с этими ферментами метаболические пути.

На основе полученных результатов можно утверждать, что гомологи EryDH специфичны в отношении D-эритроновой кислоты, в то время как функции гомологов ThrDH довольно разнообразны. Некоторые гомологи ThrDH являются разнородными и проявляют высокую активность в отношении различных структурно сходных сахарных кислот. Например, субстраты фермента Q92TT0 (6-дезоксид-L-талоновая кислота, L-альтронная кислота) имеют (2R)-конфигурацию, в то время как субстраты B9JKN9/B9J8U1/A9CHF6 (L-треоновая, L-идоновая, D-ксилоновая и D-глюконовая кислоты) — консервативную (2R,3S)-конфигурацию (рис. 5).



**Рис. 5.** Структура субстратов и сравнение аминокислотных последовательностей гомологов ThrDH. Консервативные структуры субстратов показаны синим цветом (левая панель), последовательности субстратсвязывающих мотивов выделены пунктирными рамками (правая панель). Для проведения выравнивания аминокислотных последовательностей были использованы структуры дегидрогеназы 3-гидроксиизомаасляной кислоты (P9WNY5, PDB: 5Y8N) из *Mycobacterium tuberculosis* и L-сериндегидрогеназы (Q9I5I6, PDB: 3OBB) из *Pseudomonas aeruginosa*, идентичность их аминокислотных последовательностей с анализируемыми в данной работе ThrDHs составляет 22,4–29,5%. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>



**Рис. 6.** Верхняя часть: SSN для 3000 гомологов Q1QSM4 ( $e^{-72}$ , сходство 50%, 90% гер). Четыре охарактеризованных в настоящей работе гомолога ThrDH выделены синим цветом. Для проведения филогенетического анализа был отобран кластер с (R)-пантоатдегидрогеназой. Нижняя часть: присутствие (R)-пантоатдегидрогеназы (выделена синей рамкой в верхней части рисунка) в различных организмах. Идентификационные номера из SSN были использованы для построения филогенетического дерева с помощью NCBI Taxonomy common tree: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>. Затем скачанный файл с филогенетическим деревом открывали в программе iTOL (<https://itol.embl.de/upload.cgi>).

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Некоторые гомологи ThrDH (Q1QSN6, Q1QSM4, Q120Q9, D7A6R3 и Q1LMW1) катализируют реакцию с субстратами, типичными для дегидрогеназы L-треоновой кислоты, дегидрогеназы D-глицериновой кислоты и новой (R)-пантоатдегидрогеназы (PanDH). Выравнивание аминокислотных последовательностей этих ThrDHs и дегидрогеназ β-гидроксикислот позволило выявить присутствие консервативных последовательностей, необходимых для связывания карбоксильных групп (мотив DAPVSGG) и соседних атомов углерода (мотив FXXXXXXKDL) [18, 19]. Однако из-за ограниченности данных по структурам с близкой гомологией трудно выявить корреляцию между субстратной специфичностью и аминокислотной последовательностью фермента.

В отличие от широко распространенной PanDH (PF02558-PF08546), которая является важным ферментом биосинтеза кофермента A [20], (R)-пантоатдегидрогеназа (Q1QSM4, PF14833-PF03446) обнаружена исключительно в протеобактериях (рис. 6). Несмотря на то что Q12H32 (идентичность ее аминокислотной последовательности с Q1QSM4 составляет 35,7%), Q92TT0 и Q1QSM4 демонстрируют различную субстратную специфичность, они локализируются в одном кластере в сети гомологов ThrDH (рис. 1). Увеличение строгости критериев оценки выравнивания ( $e^{-72}$ ) позволило разделить эти ферменты на разные кластеры в соответствии с их функциями (рис. 6).

Приведенные выше данные о субстратной специфичности гомологов ThrDH согласуются с данными о разнообразии их геномного контекста (рис. S1 Приложения). Аналогично дегидрогеназе L-треоновой кислоты (Q1QSN6) и дегидрогеназе L-идоновой кислоты (B9JKN9) было доказано, что DUF1537 и соседняя альдолаза участвуют в деградации сахаров, представленных на рис. 4 [10]. Однако B9J8U1 и A9CHF6, которые демонстрируют сходную активность в

отношении L-треоновой и L-идоновой кислот, имеют геномный контекст дегидратаз (треониндегидратаза, дегидратаза дигидроксикислот), что может указывать на их участие в различных метаболических путях. В отличие от PanDH, которая кластеризуется с другими ферментами биосинтеза пантотената [21], охарактеризованная в настоящей работе (R)-пантоатдегидрогеназа (Q120Q9, Q1QSM4) имеет тенденцию образовывать пару с альдегиддегидрогеназой. Кроме того, две дегидрогеназы D-глицериновой кислоты (Q1LMW1, D7A6R3) имеют разные геномные контексты. Так, Q1LMW1 кластеризуется с альдолазой (Q1LMW0) и катализирует следующую за этим ферментом стадию в катаболизме D-глюкарата у *Ralstonia metallidurans* CH34 (рис. 4). В то же время D7A6R3, возможно, вовлечена в метаболизм гликолевой кислоты благодаря близко расположенной карболигазе глиоксильной кислоты [22]. Дегидрогеназа L-альтронной кислоты (Q92TT0) и находящиеся поблизости метилтрансфераза и гликозилат указывают на существование совершенно незнакомого пути, который необходимо будет определить.

Проведенная в настоящей работе идентификация субстратов для гомологов ThrDH не только проясняет метаболические пути этих соединений, но также способствует дальнейшему выявлению физиологических функций гомологов ThrDH.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке National Natural Science Foundation, China (grant No. 31970087) и South China Normal University (start-up grant).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., and Larroche, C. (2006) Gluconic acid: properties, applications and microbial production, *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, 185-195.
2. Smirnoff, N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**, 229-235.
3. Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L., and Steenbergen, S. M. (2004) Diversity of microbial sialic acid metabolism, *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **68**, 132-153, doi: 10.1128/mmbr.68.1.132-153.2004.
4. Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S. et al. (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D603-D610, doi: 10.1093/nar/gkn810.
5. Holzer, H., and Holldorf, A. (1957) Isolation of D-glycerate dehydrogenase, some properties of the enzyme and its application to the enzymic-optic determination of hydroxypyruvate in presence of pyruvate, *Biochem. Z.*, **329**, 292-312.
6. Dreyer, J. L. (1987) The role of iron in the activation of mannonic and altronic acid hydratases, two Fe-requiring hydro-lyases, *Eur. J. Biochem.*, **166**, 623-630, doi: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb13559.x.
7. Dahms, A. S., and Donald, A. (1982) D-xylo-aldonate dehydratase, *Methods Enzymol.*, **90**, E302-E305, doi: 10.1016/s0076-6879(82)90145-8.

8. Shimizu, T., Takaya, N., and Nakamura, A. (2012) An L-glucose catabolic pathway in *Paracoccus* species 43P, *J. Biol. Chem.*, **287**, 40448-40456, doi: 10.1074/jbc.M112.403055.
9. Wichelecki, D. J., Balthazor, B. M., Chau, A. C., Vetting, M. W., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Luk, T., Patskovsky, T. Y., Stead, M. B., Hillerich, B. S., Seidel, R. D., Almo, S. C., and Gerlt, J. A. (2014) Discovery of function in the enolase superfamily: D-mannonate and D-gluconate dehydratases in the D-mannonate dehydratase subgroup, *Biochemistry*, **53**, 2722-2731, doi: 10.1021/bi500264p.
10. Zhang, X., Carter, M. S., Vetting, M. W., Francisco, B. S., Zhao, S., Al-Obaidi, N. F., Solbiatia, J. O., Thiavilled, J. J., Crecy-Lagard, V., Jacobson, M. P., Almo, S. C., and Gerlt, J. A. (2016) Assignment of function to a domain of unknown function: DUF1537 is a new kinase family in catabolic pathways for acid sugars, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4161-E4169, doi: 10.1073/pnas.1605546113.
11. Gerlt, J. A., Bouvier, J. T., Davidson, D. B., Imker, H. J., Sadkhin, B., Slater, D. R., and Whalen, K. L. (2015) Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): a web tool for generating protein sequence similarity networks, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1019-1037, doi: 10.1016/j.bbapap.2015.04.015.
12. Luo, S., and Huang, H. (2018) Discovering a new catabolic pathway of D-ribonate in *Mycobacterium smegmatis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **505**, 1107-1111, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.033.
13. Aghaie, A., Lechaplais, C., Sirven, P., Tricot, S., Besnard-Gonnet, M., Muselet, D., Berardinis, V., Kreimeyer, A., Gyapay, G., Salanoubat, M., and Perret, A. (2008) New insights into the alternative D-glucarate degradation pathway, *J. Biol. Chem.*, **283**, 15638-15646, doi: 10.1074/jbc.M800487200.
14. Severi, E., Hood, D. W., and Thomas, G. H. (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens, *Microbiology*, **153**, 2817-2822, doi: 10.1099/mic.0.2007/009480-0.
15. Adachi, O., Hours, R. A., Shinagawa, E., Akakabe, Y., Ykushi, T., and Matsushita, K. (2011) Enzymatic synthesis of 4-pentulosonate (4-keto-D-pentionate) from D-aldopentose and D-pentionate by two different pathways using membrane enzymes of acetic acid bacteria, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2418-2420, doi: 10.1271/bbb.110575.
16. Arrigoni, O., and De Tulio, M. C. (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, *Biochim. Biophys. Acta*, **1569**, 1-9, doi: 10.1016/s0304-4165(01)00235-5.
17. Yew, W. S., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Rakus, J. F., Pierce, R. W., Almo, S. C., and Gerlt, J. A. (2006) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: L-fuconate dehydratase from *Xanthomonas campestris*, *Biochemistry*, **45**, 14582-14597, doi: 10.1021/bi061687o.
18. Tchigvintsev, A., Singer, A., Brown, G., Flick, R., Evdokimova, E., Tan, K., Gonzalez, C. F., Savchenko, A., and Yakunin, A. F. (2012) Biochemical and structural studies of uncharacterized protein PA0743 from *Pseudomonas aeruginosa* revealed NAD-dependent L-serine dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **287**, 1874-1883, doi: 10.1074/jbc.M111.294561.
19. Srikalaivani, R., Singh, A., Vijayan, M., and Surolia, A. (2018) Structure, interactions and action of *Mycobacterium tuberculosis* 3-hydroxyisobutyric acid dehydrogenase, *Biochem. J.*, **475**, 2457-2471, doi: 10.1042/BCJ20180271.
20. Zheng, R., and Blanchard, J. S. (2000) Kinetic and mechanistic analysis of the *E. coli* panE-encoded ketopantoate reductase, *Biochemistry*, **39**, 3708-3717, doi: 10.1021/bi992676g.
21. Webb, M. E., Smith, A. G., and Abell, C. (2004) Biosynthesis of pantothenate, *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 695-721, doi: 10.1039/b316419p.
22. Grostern, A., Sales, C.M., Zhuang, W.Q., Erbilgin, O., and Alvarez-Cohen, L. (2012) Glyoxylate metabolism is a key feature of the metabolic degradation of 1,4-dioxane by *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3298-3308, doi: 10.1128/AEM.00067-12.

## SUBSTRATE DIVERSITY OF L-THREONIC ACID DEHYDROGENASE HOMOLOGS<sup>\*,\*\*</sup>

C. F. Zhang<sup>1#</sup>, Y. P. Liu<sup>1#</sup>, X. X. Wu<sup>1</sup>, X. S. Zhang<sup>2\*\*\*</sup>, and H. Huang<sup>1\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, 510631 Guangdong, China; E-mail: hhuang@m.scnu.edu.cn

<sup>2</sup> Institute of Ecological Science, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong, 510631 China; E-mail: xszhang@scnu.edu.cn

Received November 26, 2019

Revised January 7, 2020

Accepted January 21, 2020

Despite physiological importance of aldonic sugar acids for living organisms, little is known about metabolic pathways of these compounds. Here, we investigated the functional diversity of L-threonic acid dehydrogenase (ThrDH; UniProt ID: Q0KBC7), an enzyme composed of two NAD-binding domains (PF14833 and PF03446). Ten ThrDH homologs with different genomic context were studied; seven new enzymatic activities were identified, such as (R)-pantoate dehydrogenase, L-altronic acid dehydrogenase, 6-deoxy-L-talonate dehydrogenase, L-ionic acid dehydrogenase, D-xylonic acid dehydrogenase, D-gluconic acid dehydrogenase, and 2-hydroxy-3-oxopantoate reductase activities. Two associated metabolic pathways were identified: L-ionic acid dehydrogenase was found to be involved in the degradation of L-ionic acid through oxidation/decarboxylation in *Agrobacterium radiobacter* K84, while 2-hydroxy-3-oxopantoate reductase was found to participate in D-glucarate catabolism through dehydration/cleavage in *Ralstonia metallidurans* CH34.

**Keywords:** (R)-pantoate dehydrogenase, L-ionic acid catabolism, D-glucarate catabolism, L-altronic acid dehydrogenase, D-xylonic acid dehydrogenase