

Université de Montréal

**Fructose-1,6-bisphosphate aldolase de classe II : aspects structural et dynamique  
dans le mécanisme réactionnel**

par  
Benoit Jacques

Département de biochimie et de médecine moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Biochimie

Décembre, 2016

© Benoit Jacques, 2016.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Fructose-1,6-bisphosphate aldolase de classe II : aspects structural et dynamique  
dans le mécanisme réactionnel**

présenté par:

Benoit Jacques

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Pascale Legault,	présidente-rapporteur
Jurgen Sygusch,	directeur de recherche
Laurent Salmon,	membre du jury

Mémoire accepté le: .....

## RÉSUMÉ

La D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) catalyse la réaction réversible d'aldolisation dans la voie métabolique du glucose, c'est-à-dire l'interconversion du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et du D-glyceraldéhyde 3-phosphate (G3P) en D-fructose 1,6-bisphosphate (FBP). Les aldolases sont regroupées en deux classes selon le mécanisme réactionnel : la classe I, dont fait partie l'enzyme humaine, catalyse la réaction en passant par la formation d'un intermédiaire covalent (base de Schiff), alors que les aldolases de classe II sont des métalloenzymes — un cation métallique divalent est requis pour son activité catalytique.

L'aldolase de classe II, absente des mammifères, se retrouve notamment chez des agents pathogènes, par exemples *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), *Giardia lamblia* (giardiase), *Escherichia coli* (infections diverses) et *Helicobacter pylori* (ulcère et cancer gastrique). Cette distribution en fait une cible potentielle dans la découverte de médicaments. La conception d'inhibiteurs spécifiques pour l'aldolase de classe II requiert une fine connaissance de sa catalyse enzymatique et de sa structure tridimensionnelle. Cette connaissance demeure incomplète, alors que l'ensemble des structures de complexes enzyme-inhibiteur ou enzyme-intermédiaire ne supporte pas une partie du mécanisme publié dans la littérature.

Nous étudions le rôle catalytique de deux résidus situés chacun sur une boucle de surface mobile de l'aldolase de classe II de *H. pylori* et impliqués dans des étapes d'échange de proton. Les mutants simples H180Q et E142A ont été caractérisés cinétiquement et cristallisés pour la détermination de structure sur la base de la diffraction aux rayons X. Les structures cristallines des mutants complexés à des intermédiaires réactionnels ont été résolues. La déprotonation du groupe hydroxyle en C4 du FBP initie le clivage de la liaison en C3—C4 du cétohexose, première étape du mécanisme catalytique de rétroaldolisation. Nos résultats identifient His180, sur la boucle  $\beta 6-\alpha 8$ , comme responsable de cet échange de proton. Ce résidu est un ligand de l'ion de zinc dans la structure native ; le changement conformationnel observé suite à l'amarrage du phosphate en C1 de

FBP libère His180 pour permettre le clivage. L'ion de zinc migre par la suite vers le site actif afin de faciliter la liaison du substrat et la stabilisation de l'intermédiaire énediolate. Nos résultats vont à l'encontre de l'hypothèse publiée précédemment sur le rôle catalytique de Asp82 dans cet échange de proton du groupe hydroxyle en C4, le rôle de ce dernier résidu se limitant plutôt au maintien de l'intégrité structurale du site actif. La libération du G3P nouvellement produit est suivie de la protonation stéréospécifique de l'intermédiaire énediolate générant le DHAP. La libération du DHAP complète ainsi le cycle catalytique. La protonation de l'intermédiaire énediolate est effectuée par l'intermédiaire du résidu Glu142, situé sur la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ , ce qui concorde avec des études cinétiques publiées sur d'autres FBPA de classe II. Ces études ont attribué le même rôle à ce résidu conservé entre homologues. Nous avons par la suite établi un protocole de simulation de dynamique moléculaire pour évaluer le repliement de ladite boucle et ainsi comprendre le mode d'action du résidu Glu142. Des détails mécanistiques de l'étape de clivage s'ajoutent à nos connaissances actuelles ; des questions subsistent quant à leur implication au reste de la catalyse. En attribuant un rôle crucial à la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  dans la catalyse et non limité à la liaison de substrats, cette boucle des aldolases de classe II peut devenir une cible dans le développement d'inhibiteurs. De plus, la migration de l'ion de zinc non dépendante de ligand suggère la possibilité de chélater et restreindre l'ion loin du site actif.

**Mots clés : aldolisation, rétro-aldolisation, transfert de proton, métalloenzyme, cristallographie, diffraction aux rayons X, enzymologie, dynamique moléculaire.**

## ABSTRACT

Fructose-1,6-bisphosphate aldolase catalyzes the reversible aldol reaction in glucose metabolism interconverting dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and D-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) into D-fructose 1,6-bisphosphate (FBP). Aldolases are furthermore classified based on their reaction mechanism: class I aldolase (e. g. human aldolase) forms a covalent Schiff base intermediate with substrate, whereas class II aldolase utilizes a divalent metal cation in catalysis.

Class II aldolase is commonly found in pathogenic organisms such as *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Giardia lamblia* (giardiasis), *Escherichia coli* (diverse infections) and *Helicobacter pylori* (ulcer and gastric cancer) but not in mammals. This distribution makes class II aldolase a potential target for drug discovery. Structure driven drug design depends on an explicit knowledge of the reaction mechanism of class II aldolase and its three-dimensional structure. Our current knowledge is lacking; existing aldolase crystal structures with reaction intermediates and with competitive inhibitors are not coherent with proposed mechanisms in literature.

The present study focuses on the catalytic role of two residues, each located on a mobile loop of *H. pylori* class II aldolase and each implicated in a critical proton transfer step. Single mutants H180Q and E142A were characterized enzymatically and crystallized for X-ray structure determination. Crystal structures of reaction intermediates formed with substrate were determined. The catalytic mechanism requires proton abstraction at the FBP C4 hydroxyl group to initiate C3—C4 bond cleavage, first step of the retroaldol reaction. Our data supports His180 situated on the mobile loop  $\beta 6-\alpha 8$ , as the residue responsible for this proton transfer. Notably, His180 chelates the zinc ion in the native structure. The structural change induced due to C1 phosphate binding of FBP releases His180 to promote cleavage. Displacement of the catalytic zinc ion ensues, facilitating substrate binding and subsequent stabilization of the enediolate intermediate. Our results do not support the previous hypothesis of a catalytic role for Asp82 in C4 hydroxyl group proton abstraction; it rather plays an important role in maintaining struc-

tural integrity for active site binding. Displacement of the nascent aldehyde G3P and concomitant stereospecific protonation of the enediolate species generates the obligate triose phosphate, DHAP. Dissociation of DHAP from the active site completes the catalytic cycle. The residue responsible for initiating enediolate protonation was identified as residue Glu142, situated on mobile loop  $\beta 5\text{-}\alpha 7$ , and this is in agreement with previous kinetic studies of enediolate protonation in other class II aldolases, attributing the same role to this conserved residue. We devised a molecular dynamic simulation method to follow the catalytic loop folding event, further investigating details of the role of Glu142 in catalysis. We gained further knowledge of the cleavage event, although work remains to elucidate missing details of the catalysis and integrate our findings. By attributing a role in catalysis to loop  $\beta 6\text{-}\alpha 8$  not limited to substrate binding, this loop of class II aldolases becomes a potential target in drug design. In addition, ligand independent zinc ion migration suggest it is possible to chelate the metal and restrain it far from the active site.

**Keywords:** aldol reaction, retro-aldol reaction, proton transfer, metalloenzyme, crystallography, X-ray diffraction, enzymology, molecular dynamics.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> . . . . .	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> . . . . .	<b>v</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> . . . . .	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> . . . . .	<b>xi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> . . . . .	<b>xii</b>
<b>LISTE DES SIGLES</b> . . . . .	<b>xiv</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> . . . . .	<b>1</b>
1.1 Métabolisme du glucose . . . . .	1
1.2 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase . . . . .	1
1.2.1 Groupes d'aldolases . . . . .	1
1.2.2 Classes . . . . .	3
1.2.3 Distribution . . . . .	3
1.3 FBPA de classe II . . . . .	5
1.3.1 Fonctions . . . . .	5
1.3.2 Structure . . . . .	7
1.3.3 Essentialité . . . . .	7
1.4 Intérêt biomédical . . . . .	10
1.4.1 Vaccins . . . . .	10
1.4.2 Cible thérapeutique et conception d'inhibiteurs . . . . .	11
1.5 Mécanisme catalytique . . . . .	14
1.5.1 Aldolisation . . . . .	15
1.5.2 Reconnaissance de substrat et stéréospécificité . . . . .	16
1.5.3 Métal catalytique . . . . .	18

1.5.4	Premières données structurales . . . . .	20
1.5.5	Changements conformationnels . . . . .	21
1.5.6	Rôle d'un résidu d'acide aspartique . . . . .	23
1.5.7	Proposition d'un résidu histidine . . . . .	27
1.5.8	Deuxième boucle catalytique . . . . .	30
1.6	Objectifs . . . . .	31
1.6.1	Déprotonation de l'hexose . . . . .	32
1.6.2	Déprotonation du triose . . . . .	32
1.6.3	Dynamique des boucles catalytiques . . . . .	32
1.7	Méthodes et justification . . . . .	33
1.7.1	Cinétique enzymatique . . . . .	33
1.7.2	Radiocristallographie . . . . .	34
1.7.3	Dynamique moléculaire . . . . .	37
1.8	Contribution des auteurs . . . . .	39

<b>CHAPTER 2 :</b>	<b>REACTION MECHANISM OF CLASS II FRUCTOSE-1,6-</b>	
	<b>BISPHOSPHATE ALDOLASES : FROM LIGAND RECOG-</b>	
	<b>NITION TO SUBSTRATE CLEAVAGE . . . . .</b>	<b>40</b>
2.1	Abstract . . . . .	41
2.2	Abbreviations . . . . .	41
2.3	Introduction . . . . .	42
2.4	Experimental procedures . . . . .	47
2.4.1	Hexitol-bisphosphate preparation . . . . .	47
2.4.2	Purification and crystallization of aldolases . . . . .	47
2.4.3	Data collection and processing . . . . .	47
2.4.4	Structure solution and refinement . . . . .	48
2.4.5	Comparisons . . . . .	49
2.4.6	Enzyme kinetics . . . . .	50
2.4.7	pH profile assay . . . . .	50

2.5	Results . . . . .	50
2.5.1	Native <i>H. pylori</i> aldolase structure. . . . .	50
2.5.2	DHAP-bound structures . . . . .	51
2.5.3	Substrate turnover in the crystalline state . . . . .	57
2.5.4	Hexitol bisphosphate . . . . .	59
2.5.5	Kinetics of native and mutant aldolases . . . . .	60
2.5.6	DHAP-bound mutant structures . . . . .	62
2.5.7	Hexose binding in class II aldolase . . . . .	64
2.5.8	Open and closed conformation . . . . .	66
2.5.9	Subunit cooperativity . . . . .	66
2.5.10	Zinc relocation . . . . .	68
2.5.11	His180/His226 side chain . . . . .	70
2.6	Discussion . . . . .	71
2.6.1	Substrate/product recognition . . . . .	72
2.6.2	Conformational transitions prior to cleavage . . . . .	75
2.6.3	Reversible substrate cleavage . . . . .	76
2.6.4	Conformational transitions following cleavage . . . . .	77
2.6.5	TBP inhibition . . . . .	79
2.7	Footnotes . . . . .	80
2.8	Acknowledgements . . . . .	80
2.9	Author contributions . . . . .	81
2.10	Conflict of interest . . . . .	81
2.11	References . . . . .	81

<b>CHAPITRE 3:</b>	<b>DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE D'UNE ALDOLASE DE</b>	
	<b>CLASSE II . . . . .</b>	<b>91</b>
3.1	Résumé . . . . .	91
3.2	Introduction . . . . .	91
3.3	Méthodes expérimentales . . . . .	94

3.3.1	Préparation de structures . . . . .	94
3.3.2	Simulations . . . . .	96
3.3.3	Analyse par composantes principales . . . . .	97
3.4	Résultats . . . . .	97
3.4.1	Coordination du zinc . . . . .	97
3.4.2	Analyse par composante principale . . . . .	99
3.5	Discussion . . . . .	103
3.6	Conclusion . . . . .	108
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE . . . . .</b>		<b>110</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE . . . . .</b>		<b>122</b>

## LISTE DES TABLEAUX

2.I	Data collection and refinement statistics . . . . .	53
2.I	Data collection and refinement statistics (continued) . . . . .	54
2.II	Steady state kinetic parameters. . . . .	62
3.I	Géométrie de l'ion de zinc dans les simulations . . . . .	98

## LISTE DES FIGURES

1.1	Métabolisme du glucose . . . . .	2
1.2	Mécanisme catalytique des deux classes d'aldolase . . . . .	4
1.3	Comparaison de structures du type tonneau ( $\beta\alpha$ ) <sub>8</sub> . . . . .	8
1.4	Inhibiteurs de la FBPA de classe II . . . . .	13
1.5	Mécanisme de la réaction aldolique . . . . .	17
1.6	Site actif et changement conformationnel . . . . .	22
1.7	Cavité du site acif et liaison de l'hexose . . . . .	26
1.8	Alignement de séquences primaires . . . . .	28
2.1	Electron density of trapped dihydroxyacetone-P intermediates in the active site of Class II aldolase . . . . .	52
2.2	Electron density of hexose bisphosphate and trioses phosphate trapped in the active sites of Class II aldolases . . . . .	58
2.3	pH activity profiles for native <i>Helicobacter pylori</i> aldolase . . . . .	60
2.4	Electron density of dihydroxyacetone-P trapped in the active site of <i>Helicobacter pylori</i> class II aldolase variants. . . . .	63
2.5	Electron densities of substrate FBP and inhibitor TBP trapped in the active site of <i>Helicobacter pylori</i> aldolase variant H180Q. . . . .	65
2.6	Conformational changes induced upon DHAP binding in class II aldolases. . . . .	67
2.7	Electron density of products trapped in the active site of <i>Helicobacter pylori</i> aldolase variant E149A. . . . .	69
2.8	Reaction mechanism depicting proton abstraction that initiates substrate cleavage. . . . .	78
3.1	Coordination de l'ion de zinc dans les simulations . . . . .	95
3.2	Fluctuation moyenne quadratique . . . . .	100
3.3	Projection sur les vecteurs propres . . . . .	102

3.4	Espace conformationnel des projections . . . . .	104
4.1	Mécanisme catalytique de la réaction aldolique . . . . .	111
4.2	État de transition de la réaction rétro-aldolique . . . . .	116
4.3	Structure du mutant D82N de HpFBPA . . . . .	118

## LISTE DES SIGLES

DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DPA	acide dipicolinique
Ec-	<i>Escherichia coli</i>
ED	Entner-Doudoroff
EDE	modèle de l'enzyme liée au DHAP avec la boucle $\beta 5-\alpha 7$ expérimentale
EDP	modèle de l'enzyme liée au DHAP avec boucle $\beta 5-\alpha 7$ prédite
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ELP	modèle de l'enzyme libre avec la boucle $\beta 5-\alpha 7$ prédite
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
F1P	D-fructose 1-phosphate
FBP	D-fructose 1,6-bisphosphate
FBPA	D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FBPase	D-fructose-1,6-bisphosphatase
FucA	L-fuculose phosphate aldolase
GBP	D-glucitol 1,6-bisphosphate
Gl-	<i>Giardia lamblia</i>
G3P	D-glycéraldéhyde 3-phosphate
GPDH	glycérol-3-phosphate déshydrogénase
HBP	hexitol 1,6-bisphosphate
HCA	acide 8-hydroxyquinoline carboxylique
Hp-	<i>Helicobacter pylori</i>
IRTF	spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier
MBP	D-mannitol 1,6-bisphosphate
Mt-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PGH	acide phosphoglycolohydroxamique
PGHz	phosphoglycolohydrazide
PDB	Protein Data Bank

REMD	<i>replica exchange molecular dynamics</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMSD	<i>root mean squared deviation</i>
RMSF	<i>root mean squared fluctuation</i>
S1P	L-sorbose 1-phosphate
Sa-	<i>Salmonella arizonae</i>
SBP	L-sorbose 1,6-bisphosphate
Sc-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sd-	<i>Shigella dysenteriae</i>
TBP	D-tagatose 1,6-bisphosphate
TBPA	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase
TCI	titration calorimétrique isotherme
TIM	triose phosphate isomérase

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Métabolisme du glucose

Dans la plupart des organismes vivants, le D-glucose est une importante source de carbone et d'énergie. La consommation classique de cet aldohexose est amorcée par une série d'enzymes qui composent la voie métabolique nommée glycolyse. Le pyruvate, produit de la glycolyse, sera acheminé soit vers le cycle de Krebs, pour une décomposition oxydative, soit vers la fermentation. Des métabolites de cette voie peuvent aussi être redirigés vers d'autres voies métaboliques, comme celle des pentoses.

Cette transformation du glucose en pyruvate, présentée en figure 1.1, comporte une étape de clivage d'un lien carbone-carbone. Un cétohexose bisphosphate, le D-fructose 1,6-bisphosphate (FBP), est clivé entre les carbones 3 et 4 pour former deux trioses phosphate, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le D-glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P). Cette réaction de clivage est catalysée par la D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA), une lyase (EC 4.1.2.13). La réaction dans le sens du clivage est une rétro-aldolisation. La réaction inverse, aldolisation, ou addition aldolique, est catalysée par la même enzyme. Cette réaction aldolique est une étape dans la voie de la gluconéogénèse : production de glucose à partir de pyruvate. Il n'existe aucun régulateur connu de l'activité catalytique de la FBPA. La vitesse et la direction de la catalyse sont dictées par la concentration des substrats selon le flux métabolique.

### 1.2 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase

#### 1.2.1 Groupes d'aldolases

La réaction aldolique génère jusqu'à deux centres stéréogènes qui sont les carbones du lien formé. Les énantiomères générés dépendent des substrats et de leur orientation lors de l'addition. Les aldolases sont divisées en 4 groupes selon la spécificité pour leur

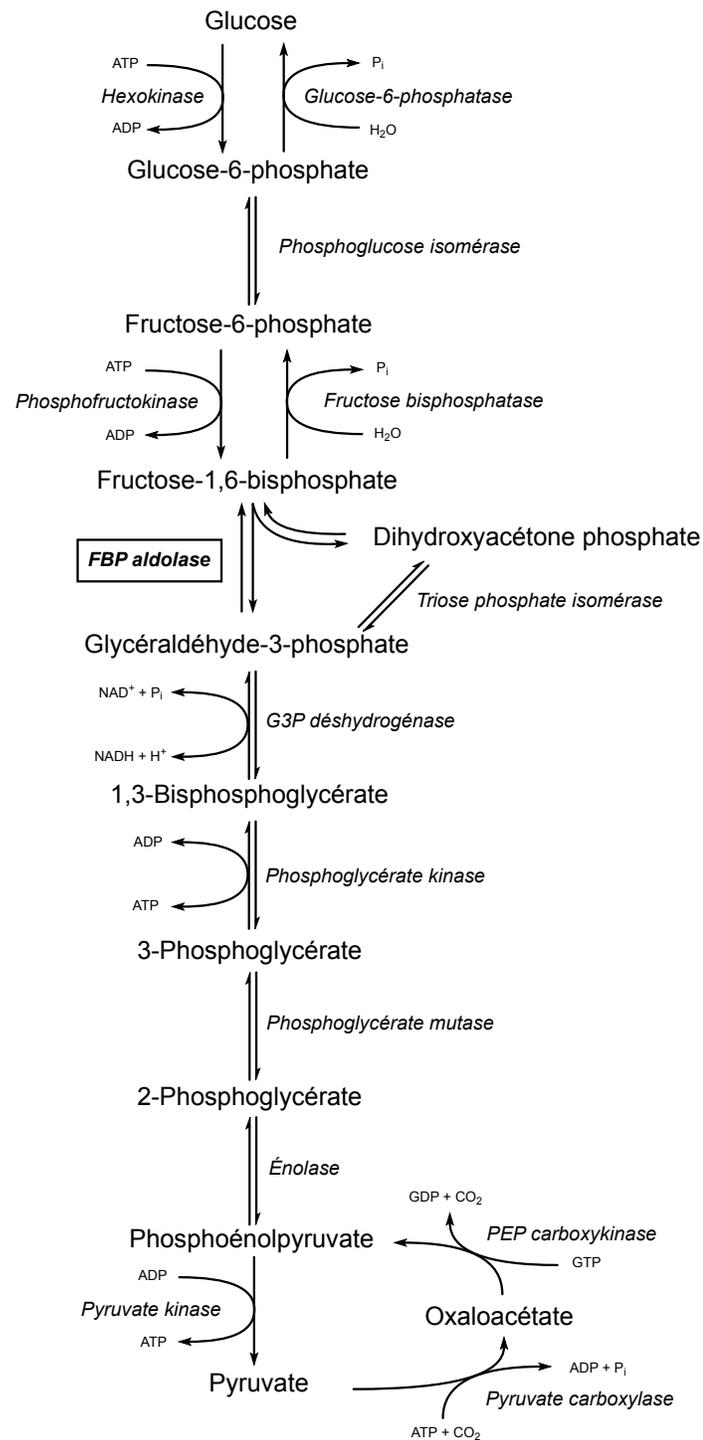


Figure 1.1 – Métabolisme du glucose. Schéma reproduit de Voet et Voet (2004) avec la glycolyse de haut en bas et la gluconéogénèse de bas en haut.

donneur nucléophile (Fessner, 2004; Takayama et al., 1997). Seulement deux enzymes du groupe d'aldolases dépendantes du DHAP sont spécifiques pour le D-G3P comme accepteur électrophile. La FBPA produit le (3S,4R,5R)-D-fructose 1,6-bisphosphate alors que la D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase (TBPA) produit le (3S,4S,5R)-D-tagatose 1,6-bisphosphate (TBP).

### 1.2.2 Classes

Des différences majeures entre des FBPA ont été observées en premier lieu par Warburg et Christian (1943), en comparant l'aldolase du muscle du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) avec celle de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Ils ont observé par exemple l'inhibition de la FBPA de *Saccharomyces cerevisiae* (ScFBPA) par des agents chélateurs et le recouvrement de l'activité par une concentration plus élevée en ions métalliques. L'aldolase du lapin ne réagit pas ainsi, mais il est possible de réduire l'enzyme pendant la catalyse, avec un borohydrure, pour obtenir un complexe inactif DHAP-aldolase (Grazi et al., 1962).

Les FBPA sont catégorisées sous les classes I et II, selon leur modèle mécanistique (Rutter, 1964). L'aldolase de lapin est de classe I, alors que celle de la levure, de classe II. Une FBPA de classe I est reconnue pour former une liaison covalente avec le substrat. Une lysine du site actif forme la liaison covalente dans la première étape de réaction, nommément la production d'intermédiaires iminium et énamine durant la catalyse, voir figure 1.2. La catalyse effectuée par une FBPA de classe II comporte un cation métallique divalent, tel que le zinc, le cobalt ou le fer. Cet ion métallique est directement coordonné par le substrat donneur d'électrons, stabilisant ce dernier ou du moins l'intermédiaire énediolate (Fessner et al., 1996).

### 1.2.3 Distribution

Ces deux classes de FBPA semblent avoir suivi des chemins évolutifs différents, comme deux réponses distinctes à une même question. Leur répartition laisse croire que la classe II précédait la classe I dans le trajet évolutif (Marsh et Lebherz, 1992;

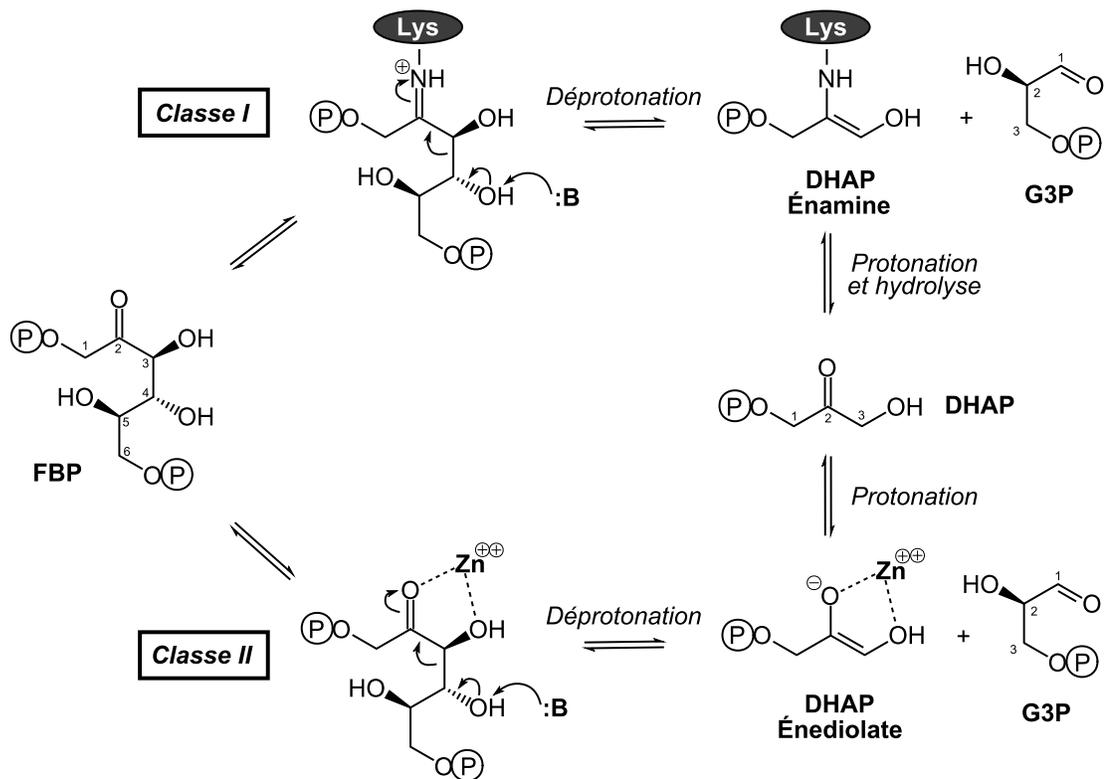


Figure 1.2 – Mécanisme simplifié de la catalyse réversible de la rétro-aldolisation de FBP par les deux classes d'aldolase. La catalyse par l'aldolase de classe I est la voie du haut ; la classe II est celle du bas. Les deux classes partagent les mêmes substrat et produits, en passant par différents intermédiaires réactionnels. Schéma reproduit de St-Jean (2008).

Rutter, 1964). La classe II est retrouvée chez des procaryotes et même des protistes — dont fait partie *Giardia lamblia*. Même si l'aldolase de classe I se retrouve chez des organismes bactériens — *Escherichia coli* par exemple, qui possède les deux classes —, elle se retrouve également chez la plupart des organismes eucaryotes.

Les deux classes de FBPA montrent le même repliement de tonneau ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> (ou *TIM-barrel*), voir 1.3.2, alors qu'elles sont dissimilaires du point de vue de la structure primaire. Les aldolases forment des homomères, en général des tétramères chez la classe I alors que des tétramères et des dimères sont observés chez la classe II. Il existe des exceptions à cette observation générale, notons une classe I décamerique et une classe II tétramérique (Pegan et al., 2009; Thomson et al., 1998). Quant à la classe II, l'interface du

dimère est composé des hélices  $\alpha 4$ ,  $\alpha 11$  et  $\alpha 12$  (aldolase de *Helicobacter pylori*, figure 1.3) qui interagissent avec l'hélice correspondante de l'autre sous-unité dans une apparente symétrie rotationnelle. Ce type de repliement tonneau  $(\beta\alpha)_8$ , qui comporte près d'une vingtaine de familles, est ubiquitaire. Une revue publiée par Nagano et al. (2002) répartit l'ensemble de protéines présentant ce repliement en 21 superfamilles. Ces protéines, qui sont pour la plupart des enzymes, ont des fonctions variées. On retrouve par exemple, des racémases, des émolases et des glycosidases. Toutes ces enzymes pourraient provenir d'un ancêtre commun ; une évolution divergente expliquerait cette diversité de fonctions. Les deux classes d'aldolase forment chacune une superfamille distincte de tonneau  $(\beta\alpha)_8$ . Elles auraient donc chacune suivi son propre chemin évolutif pour en arriver à catalyser la même réaction.

Quoique les deux classes de FBPA soient distinctes, il est possible de répartir les aldolases de classe II en sous-classes. Cela est fait surtout au niveau de la comparaison de séquences, afin de différencier les classes IIa et IIb (Henze et al., 1998; Plaumann et al., 1997; Rogers et Keeling, 2004; Sánchez et al., 2002). Dans la sous-classe IIa, on retrouve la FBPA de *Escherichia coli* (EcFBPA) et la FBPA de *Mycobacterium tuberculosis* (MtFBPA). Alors qu'en IIb, nous avons la FBPA de *Giardia lamblia* (GIFBPA) et la FBPA de *Helicobacter pylori* (HpFBPA).

### 1.3 FBPA de classe II

#### 1.3.1 Fonctions

Les FBPA de classe II ont un rôle primaire dans le métabolisme du glucose, voir section 1.1. La glycolyse est la dégradation du glucose comme source d'énergie, alors que la gluconéogénèse est la production de glucose à partir d'autres sources de carbone — voie utilisée pour la croissance en milieu à faible concentration de glucose, par exemple. Il est donc facile d'imaginer ces enzymes comme essentielles à la survie cellulaire. Il faut toutefois prendre en considération que des voies alternatives à la glycolyse, dite voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), existent. Ainsi, des procaryotes peuvent dégrader le

glucose par la voie Entner-Doudoroff (ED), identifiée en premier lieu chez *Pseudomonas saccharophila* (Entner et Doudoroff, 1952). Depuis, cette voie qui dégrade le glucose en pyruvate a été retrouvée chez nombre d'organismes (dont certains eucaryotes) : *Escherichia coli* (Eisenberg et Dobrogosz, 1967), *Aspergillus niger* (Elzainy et al., 1973) et *Penicillium notatum* (Pitt et Mosley, 1985).

Les FBPA ont aussi des fonctions secondaires qui ne découlent pas de leur fonction catalytique. Les FBPA de classe I peuvent se lier à des structures fibreuses du cytosquelette, dont l'actine (O'Reilly et Clarke, 1993) et la tubuline (Karkhoff-Schweizer et Knull, 1987; Walsh et al., 1989). Ces FBPA ont d'autres partenaires, tels que des inositols phosphate (Baron et al., 1995), un transporteur de glucose dit GLUT4 (Kao et al., 1999), un promoteur de nucléation de l'actine dit WASP (St-Jean et al., 2007) et un facteur d'activation de GTPase dit ARNO (Merkulova et al., 2011). Ces aldolases auraient ainsi un rôle dans la localisation cellulaire, et peut-être même dans la formation de structures cellulaires.

Ces rôles ne peuvent être simplement transposés sur les FBPA de classe II, alors que l'organisme généralement procaryote ne possède pas de cytosquelette. Étant donné le grand nombre de copies, 47 800 par cellule de *Escherichia coli* (Ishihama et al., 2008), une fonction secondaire à cette classe est probable. Cette FBPA serait exposée à la surface des cellules, selon l'exemple de *Saccharomyces cerevisiae* (Pardo et al., 1999). L'enzyme ainsi exposée est un antigène reconnu lors de certaines infections, dont celle causée par *Candida albicans* (Fernández-Arenas et al., 2004). La FBPA de classe II de *Neisseria meningitidis*, en plus d'être exposée à sa surface, est importante pour la pathogénicité ; ceci est dû à son rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte (Tunio et al., 2010). Cette adhésion est médiée par l'interaction de la FBPA du pathogène avec le récepteur de la cadhérine Flamingo dans le cas de *Streptococcus pneumoniae* (Blau et al., 2007). Un anticorps anti-FBPA en empêche l'adhérence aux cellules épithéliales humaines. Dans une autre mesure, la FBPA lie le plasminogène, précurseur de la plasmine, ce qui facilite l'invasion du pathogène, par exemple chez le genre *Paracoccidioides* (Chaves et al., 2015) et chez *Neisseria meningitidis* (Shams et al., 2016). Contrairement à la classe I,

les FBPA de classe II participent à des interactions intercellulaires, surtout dans le cas d'agents pathogéniques.

### 1.3.2 Structure

Les FBPA de classe II adoptent un repliement de type *TIM-barrel*. Il s'agit d'une alternance de brins  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  dans la séquence primaire. Ceci forme un tonneau bicouche dont la couche intérieure formée d'un feuillet  $\beta$  se trouve dans un environnement hydrophobe, alors que la couche extérieure est composée d'hélices avec une surface exposée au solvant.

Le nom de ce motif provient de sa première observation chez la triose phosphate isomérase (TIM) (Banner et al., 1976). Nous pouvons constater des caractéristiques communes parmi les protéines montrant le même repliement (Nagano et al., 2002; Sterner et Höcker, 2005). Près de la moitié des enzymes de type tonneau  $(\beta\alpha)_8$  peuvent lier un ion métallique divalent. Un site de liaison pour un groupement phosphate est retrouvé sur deux tiers de ces protéines. Il est aussi intéressant de noter que les résidus catalytiques sont surtout retrouvés à l'extrémité C-terminale du feuillet  $\beta$  parallèle, ainsi que sur les boucles de surface de ce côté du tonneau — dites boucles  $\beta\alpha$ , c'est-à-dire situées entre un brin  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ .

### 1.3.3 Essentialité

L'importance des FBPA de classe II pour un organisme est discutable, alors qu'elle varie selon ce dernier et selon la source de carbone présente. L'inactivation du gène, par délétion ou insertion, mène à des organismes non viables, prenons par exemple *Candida albicans* (Rodaki et al., 2006), *Escherichia coli* (Gerdes et al., 2003) et *Pseudomonas aeruginosa* (Jacobs et al., 2003). Cet effet sur la croissance cellulaire dépend du degré de la diminution de l'activité de FBPA. L'étude sur *Candida albicans* montre une inhibition notable lorsque l'activité tombe sous les 15% du type sauvage, et un arrêt apparent lorsqu'elle est de moins de 4%. Un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* dépourvu de FBPA, qui voit sa croissance inhibée en présence de glucose seul, est capable de croître

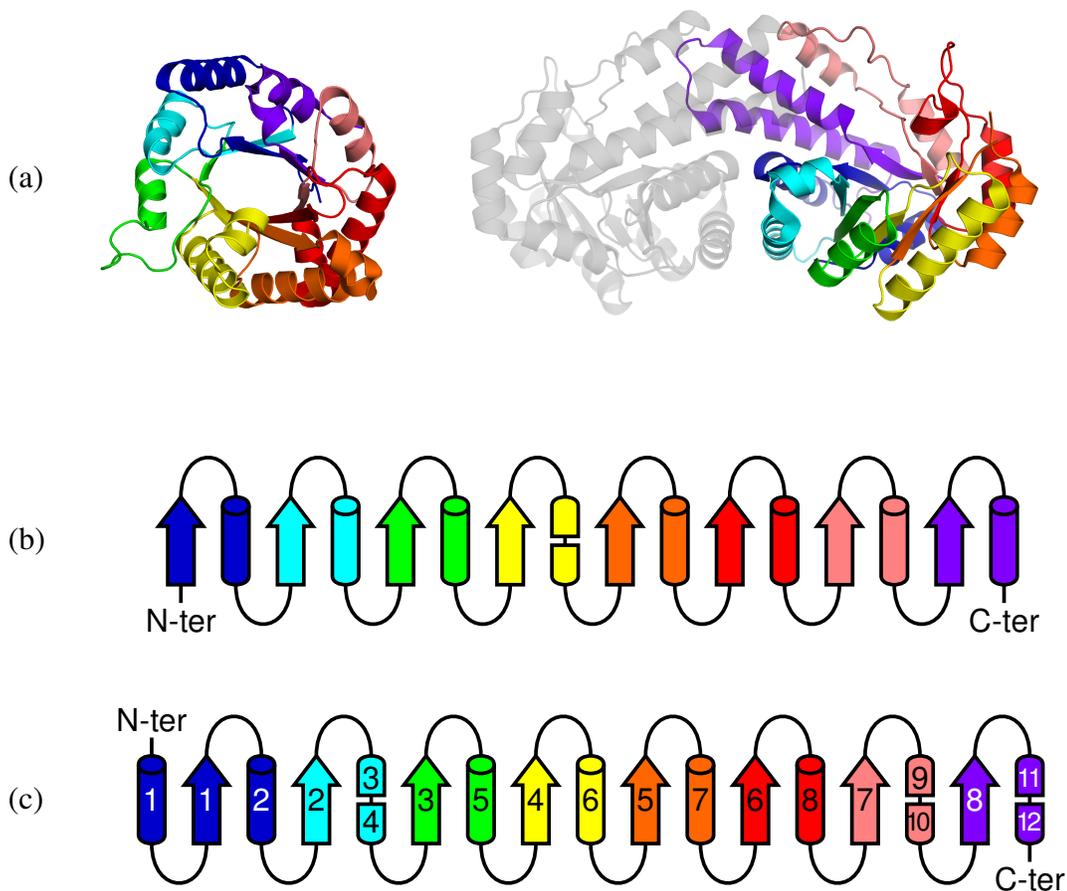


Figure 1.3 – Comparaison de structures du type tonneau  $(\beta\alpha)_8$ . (a) Structures tertiaires de (gauche) Triose phosphate isomérase de *Gallus gallus*, code d'accèsion PDB 1TIM (Banner et al., 1976) et de (droite) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase de classe II de *Helicobacter pylori* (dimère avec la seconde sous-unité en gris), code d'accèsion PDB 3C4U (Fonvielle et al., 2008). Structures secondaires respectives de (b) 1TIM et de (c) 3C4U.

en milieu avec des métabolites en amont et en aval de la voie glycolytique, notamment le galactose et le lactose (Schwelberger et al., 1989). Une étude par Galkin et al. (2007), en utilisant une technique d'interférence par ARN, permet aussi de suggérer que les FBPA de classe II sont essentielles à la survie cellulaire. L'effet de cette inactivation est aussi prononcé quant à *Escherichia coli*, qui possède les deux classes ; l'expression de la classe II est constitutive, alors que la classe I doit être induite (Stribling et Perham, 1973).

Toutefois, il doit être noté que d'autres études n'arrivent pas à la même conclusion. L'équipe de Salama et al. (2004) a utilisé la technique des transposons pour différencier les gènes essentiels de ceux non essentiels chez *Helicobacter pylori*. De ces derniers, se trouve l'aldolase, auquel un transposon a été détecté en une seule occurrence. La position de ce transposon est inconnue, ce qui jette le doute sur l'analyse. En effet, les auteurs émettent la possibilité qu'un transposon soit détecté dans un gène, alors que l'insertion s'est faite dans un gène voisin. En prenant exemple de l'étude de Gerdes et al. (2003), leurs critères de sélection catégoriseraient l'aldolase de *Helicobacter pylori* comme ambiguë, au lieu de non essentielle.

L'effet d'une inhibition de croissance suite à une perte d'activité de la FBPA est reproduite par l'utilisation d'une souche mutante de *Escherichia coli* au niveau de la FBPA de classe II. Cette FBPA de classe II est ainsi sensible à la température, fonctionnant normalement à 30 ° mais inactive à 40 ° (Böck et Neidhardt, 1966). Avec comme seule source de carbone des composés non glucogéniques, la culture croît normalement, en partie dû à l'expression induite de la FBPA de classe I (normalement présente à faible niveau constitutif). Toutefois, la présence ou l'ajout de substrats glucogéniques — glucose, fructose ou gluconate, entre autres — inhibe fortement la croissance bactérienne lorsque la FBPA de classe II présente à haut niveau constitutif est inactivée. Les auteurs identifient particulièrement l'accumulation de FBP comme cause de toxicité, sa concentration augmentant de 7 à 20 fois. Il est rapporté que cette accumulation inhibe la synthèse d'acides nucléiques, de phospholipides et de protéines (Böck et Neidhardt, 1966; Su et al., 1975). Cette réduction de synthèse peut être expliquée par un effet de l'accumulation de FBP sur la concentration de facteurs associés à la synthèse d'acides ribo-

nucléiques ribosomiques : les nucléosides triphosphate d'initiation et le guanosine 3',5'-bis(diphosphate) (Cashel et Kalbacher, 1970; Gaal et al., 1997; Schneider et Gourse, 2003).

## 1.4 Intérêt biomédical

La FBPA de classe II s'avère essentielle à la survie cellulaire — ou du moins utile à la croissance cellulaire — par son rôle dans le maintien de la voie métabolique EMP. Inhiber l'aldolase, et donc bloquer ce flux métabolique, mène à une production accrue de métabolite, jusqu'à atteindre des niveaux toxiques pour la cellule. Puisque l'humain est exempt de FBPA de classe II, il s'agit d'une cible potentielle pour combattre certaines infections.

Nombre d'agents pathogènes ciblés sont donnés en exemple dans les études présentées dans la section 1.3.3 ainsi que dans la présente. De cette liste non exhaustive, retenons *Helicobacter pylori*, qui sera ultérieurement présenté comme principal modèle d'étude pour notre recherche. Cette bactérie est reconnue pour causer des infections gastriques. Ces infections sont une cause de cancers gastriques (Forman et al., 1991; Nomura et al., 1991; Parsonnet et al., 1991). *Helicobacter pylori* fait partie des carcinogènes de classe I (IARC Working Group, 1994). Le risque de développer un cancer relié à la présence de cette bactérie est estimé à 75% ; *Helicobacter pylori* serait la cause de 5,5% de cancers, tous types confondus (Herrera et Parsonnet, 2009).

### 1.4.1 Vaccins

La FBPA de classe II, à la surface de cellules, cause une réponse immunitaire chez l'hôte, comme il a été démontré pour les aldolases de *Giardia lamblia* (Palm et al., 2003), *Streptococcus pneumoniae* (Ling et al., 2004) et *Paracoccidioides brasiliensis* (da Fonseca et al., 2001). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-FBPA de *Candida albicans* permet une protection contre la candidose (Fernández-Arenas et al., 2004). Cette même aldolase est impliquée dans le diagnostic de la candidose invasive (Li et al., 2013b).

La FBPA de classe II recombinante de *Candida albicans* est ainsi utilisée pour détecter l'anticorps anti-FBPA chez le patient, ce qui permet d'identifier ce type d'infection plus rapidement et plus spécifiquement.

La protection par des anticorps ainsi que la production possible par l'hôte fait de l'aldolase une composante possible dans l'élaboration de vaccins. Il s'agirait donc de vaccins à partir de protéines de synthèse, ce qui est plus sécuritaire que l'utilisation d'organismes pathogènes atténués. L'aldolase recombinante de *Clostridium perfringens* a servi pour vacciner des poulets, leur conférant une protection contre l'entérite nécrosante (Kulkarni et al., 2007). L'utilisation d'un peptide de 14 acides aminés, provenant de l'extrémité N-terminale de la FBPA de classe II de *Candida albicans*, suffit à immuniser l'hôte contre une infection du pathogène (Xin et Cutler, 2011). Il y a aussi des exemples de la classe I dans la vaccination, par exemple contre le ver plat *Schistosoma mansoni* (Saber et al., 2013).

#### **1.4.2 Cible thérapeutique et conception d'inhibiteurs**

La découverte d'agents thérapeutiques se fait généralement selon deux méthodes : le criblage à haut débit et la conception rationnelle selon la cible. Le criblage de produits naturels a mené à la découverte de familles de composés. Plus récemment, la conception rationnelle a gagné en popularité par la diversité d'informations et de techniques disponibles, par exemple les détails structuraux des mécanismes d'inhibition ainsi que l'amarrage *in silico* par modélisation moléculaire. Un exemple de cas serait de déterminer les cavités à la surface de la cible et d'évaluer des fragments quant aux interactions possibles, et finalement de les lier entre eux.

Deux approches sont généralement envisagées dans le développement rationnel d'inhibiteurs. En premier lieu, le mécanisme catalytique de l'enzyme est ciblé. Un exemple simple d'inactivateur de la FBPA de classe II est l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA). Toutefois, cette approche n'est que peu spécifique, alors que d'autres cibles seront touchées, d'autres métalloprotéines dans ce cas-ci. Il est préférable de rationaliser un composé spécifique à l'enzyme. La deuxième approche est donc de concevoir un ana-

logue de substrats ou d'intermédiaires réactionnels. Il est ainsi possible d'aller chercher une plus grande affinité pour le composé, mais la spécificité n'est pas garantie si les substrats sont partagés entre plusieurs enzymes. Les études portées sur le développement d'inhibiteurs de FBPA de classe II se sont donc penchées, dans différentes mesures, à la fois sur la conception d'un analogue, ou du moins d'un composé pouvant occuper les cavités du site actif, et sur la propriété de chélation qui permet la spécificité entre les deux classes de FBPA.

Pour les composés nommés subséquemment **en caractères gras**, se référer à la figure 1.4. Le premier inhibiteur spécifique aux FBPA de classe II est l'acide phosphoglycolohydroxamique (**PGH**), un analogue du DHAP (Collins, 1974; Lewis et Lowe, 1973). Le groupement d'acide hydroxamique est un excellent groupe chélateur. L'efficacité du **PGH** serait due à sa forme hydroxamate, qui serait plus près d'un intermédiaire, la forme énediolate, que du DHAP. Par contre, la ressemblance avec le DHAP engendre une trop grande efficacité envers d'autres enzymes ayant le même substrat, comme la FBPA de classe I et la TIM. Après trois décennies, les nouvelles connaissances structurales ont permis l'avancement de la conception d'inhibiteurs de FBPA de classe II. Le groupement hydroxamique est remplacé par un groupe hydrazide, ce qui résulte en du phosphoglycolohydrazide (**PGHz**) (Fonvielle et al., 2004). La sélectivité s'en est retrouvée grandement améliorée et des modifications similaires ont été effectuées sur des analogues d'hexoses, par exemple le composé **1** (Fonvielle et al., 2008). La sélectivité se définissant comme suit  $(K_M/K_i)_{\text{classe II}} / (K_M/K_i)_{\text{classe I}}$ , un nombre plus élevé est relatif à une inhibition plus efficace sur la classe II que sur la classe I. Comparant les FBPA de lapin et de *Saccharomyces cerevisiae*, la sélectivité du **PGH** est de 273, le **PGHz** de 8900 et le composé **1** de 86 500. Ces composés sont des produits phares pour la génération suivante.

Les inhibiteurs présentés sont prometteurs, mais ils ont tous un défaut particulier qui est la présence d'un groupement fortement chargé, le phosphate. Ceci empêche le composé de passer les membranes lipidiques, ce qui concorde avec le manque d'efficacité *in vivo* rapporté par certaines de ces études. Le phosphate terminal (la position P6 quant au

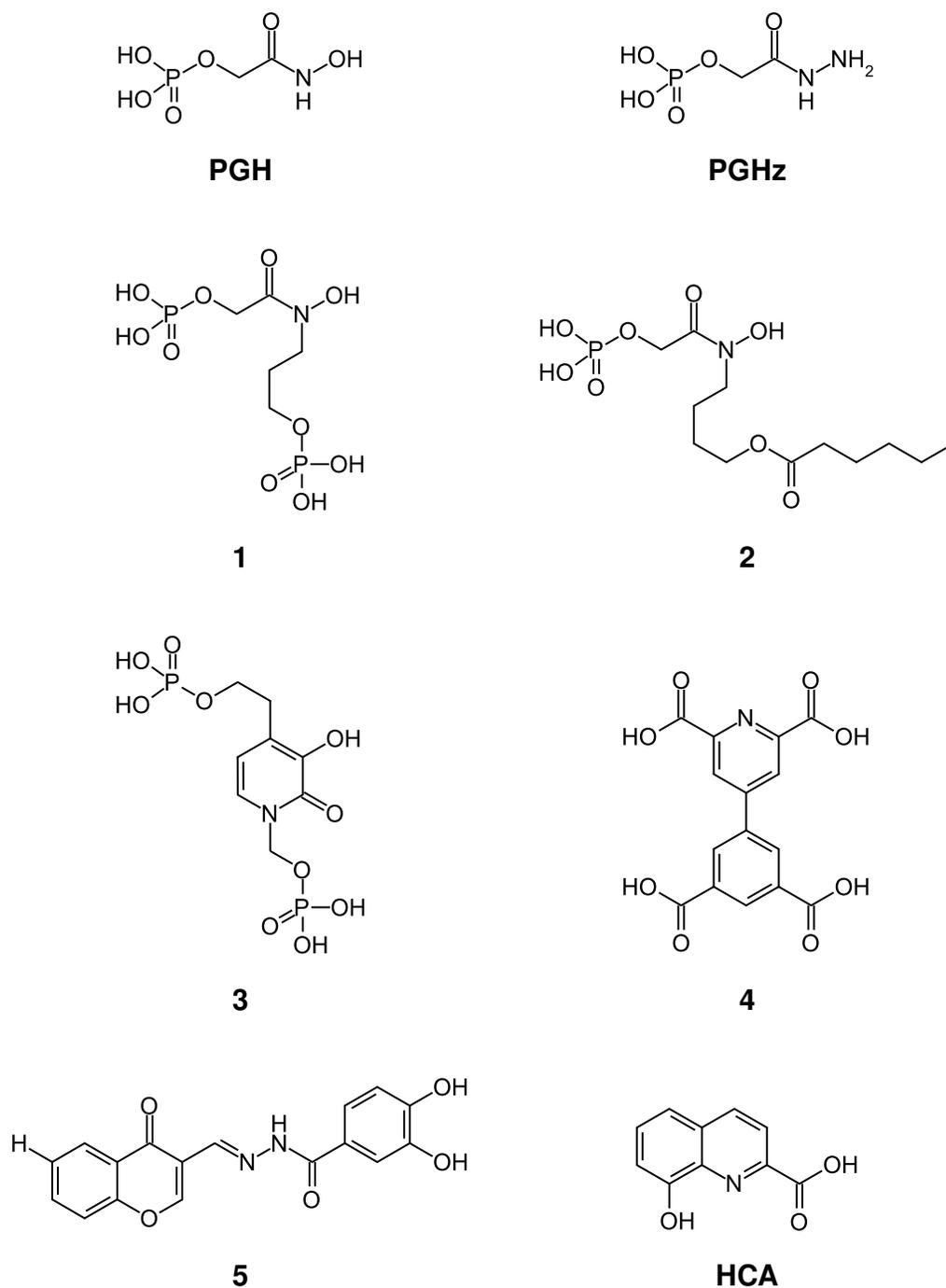


Figure 1.4 – Inhibiteurs de la FBPA de classe II. Composés d'intérêt compilés de plusieurs études exposant les différentes approches de la conception d'inhibiteurs et l'évolution de candidats potentiels.

FBP) ne serait pas nécessaire à la fixation du ligand. Le groupe de Daher et al. (2010) a tenté de remplacer ce phosphate par un groupement lipidique, comme le montre le composé **2**. Les structures obtenues comportent un site de liaison de cette chaîne qui diffère de la prédiction, résumant une limite de la conception rationnelle : de l'hypothétique à la réalité. Le groupe de Li et al. (2011) a poussé plus loin la conception rationnelle en bâtissant des hydroxypyridinones, le composé **3** par exemple. Une autre piste évaluée est celle de l'acide dipicolinique (DPA), qui est un agent chélateur connu (Çolak et al., 2009). L'équipe de Labbé et al. (2012) a synthétisé des fragments, comme le composé **4**, qui pourront servir de point de base afin de construire un inhibiteur plus spécifique à la FBPA de classe II. La conception rationnelle a aussi été appliquée à la fois à la FBPA de classe II et à la D-fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) (Li et al., 2013a). Il a été possible de synthétiser des composés spécifiques aux deux par l'assemblage de fragments, composés tel que le **5**. Ceci en ferait un agent antimicrobien puissant, puisque les deux cibles font partie du cycle de Calvin de cyanobactéries. Ainsi, cette méthode menant à la découverte d'inhibiteurs potentiels nécessite une bonne connaissance structurale et mécanistique de la cible. La méthode de criblage peut aussi mener à des découvertes, surtout lorsqu'il s'agit de mode d'interaction inconnu. Un cas intéressant d'un inhibiteur non compétitif vient d'une étude de criblage par l'équipe de Capodagli et al. (2014b). Il s'agit de l'acide 8-hydroxyquinoline carboxylique (**HCA**), qui vient coordonner l'ion de zinc en remplaçant un résidu histidine ayant normalement ce rôle. Ce mode d'inhibition est aussi défini comme le déplacement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  (Capodagli et al., 2014a).

## 1.5 Mécanisme catalytique

Les détails atomiques d'un mécanisme catalytique sont souvent découverts par l'interprétation de structures tridimensionnelles. Une structure rend possible l'identification spécifique des résidus impliqués, par leur géométrie et leur proximité. D'autres expériences biochimiques sont toutes aussi importantes, car elles complètent ce qui est impossible de capturer dans une structure obtenue par diffraction aux rayons X de cristaux de protéines. Une structure cristalline est foncièrement statique : il faut concevoir le

crystal comme une reproduction répétée à grande échelle d'une même conformation, la plus stable selon les conditions de l'expérience, ou une moyenne de plusieurs conformations. Lors de l'interprétation d'une structure et la proposition d'un mécanisme, il faut considérer un ensemble de structures — représentant, dans le meilleur des cas, chacune un cliché du trajet catalytique.

Avant l'obtention des premières structures des FBPA de classe II, les études sur le sujet utilisaient des avenues variées qui ouvraient la voie à plusieurs hypothèses. Depuis la découverte du site actif chez la première structure cristalline, notre vision du mécanisme s'est amoindrie, se limitant à des idées supportées par des résultats pourtant contradictoires. Nous devons donc porter un regard nouveau sur les travaux effectués lors des dernières décennies.

### 1.5.1 Aldolisation

La catalyse par la FBPA de classe II suit le modèle mécanistique de l'aldolisation. Il s'agit plus précisément de la catalyse basique de cette réaction. Ce modèle avait été suggéré par Rutter (1964). Ici, nous faisons référence à la réaction aldolique, ou addition aldolique, qui produit un aldol — mot-valise d'aldéhyde et alcool qui pourtant décrit un aldéhyde ou une cétone comportant un groupe hydroxyle (voir Solomons et Fryhle, 2008, section 17.4). Le terme de condensation aldolique est couramment utilisé, quoique qu'il ne s'agit pas d'une réaction de condensation, c'est-à-dire la combinaison de deux molécules par la libération d'une troisième. La condensation aldolique proprement dite implique la réaction aldolique suivi d'une déshydratation ce qui résulte en un crotonal-déhyde et une molécule d'eau.

Nous pouvons appliquer ce mécanisme général de catalyse basique au cas de la FBPA en considérant la réaction d'addition d'une cétone (DHAP) sur le groupe carbonyle d'un aldéhyde (G3P) pour produire l'aldol (FBP), voir à la figure 1.5. La première étape de l'aldolisation catalysée par une base est la déprotonation en carbone  $\alpha$  du carbonyle. Cette abstraction est facilitée par la faible acidité de ces hydrogènes. L'intermédiaire généré, un anion énolate, est stabilisé par la délocalisation de la charge négative ; les deux

formes de résonance sont un carbanion (charge sur le carbone  $\alpha$ ) et un oxyanion (charge sur l'oxygène du carbonyle). Dans la deuxième étape, la forme carbanion — l'espèce nucléophile — procède à l'attaque sur le carbone du groupe carbonyle de l'aldéhyde. Suite à la formation d'un nouveau lien carbone-carbone, un intermédiaire alkoxyde est formé : les électrons  $\pi$  du carbonyle de l'aldéhyde migrent vers l'oxygène, lui conférant une charge négative. L'aldol est obtenu suite à un échange de proton entre cet oxygène et un acide. Ce dernier peut être l'acide conjugué de la base qui a initié la réaction, complétant le cycle catalytique (cet intermédiaire alkoxyde du mécanisme classique est souvent ignoré des schémas de catalyse enzymatique ; les étapes 2 et 3 sont abrégées en une seule étape concertée). Le chemin mécanistique serait le même dans le sens inverse, aussi appelé réaction rétro-aldolique.

Établir ce modèle mécanistique nous permet maintenant de cerner les mécanismes d'une catalyse enzymatique de l'aldolisation. L'aldolase est très spécifique quant à ses substrats, comme vu à la section 1.2.1. La position des substrats dans le site actif dictera le composé obtenu quant aux centres stéréogéniques. Étant donné la nécessité d'un ion métallique dans la catalyse, son implication dans le mécanisme est à déterminer. De plus, il faut identifier les résidus responsables des échanges de protons, les inconnus **X** et **Y** dans la figure 1.5.

### 1.5.2 Reconnaissance de substrat et stéréospécificité

Le FBP existe sous formes cyclique ou linéaire en solution. La forme cyclique à 5 atomes, ou furanose, est présente sous deux anomères par la formation d'un centre stéréogénique en C2 :  $\alpha$ - et  $\beta$ -furanose. Les concentrations respectives de ces anomères sont d'environ 10 à 25% et 75 à 90% (Gray, 1971; Koerner et al., 1973). En cherchant la préférence d'une aldolase pour un anomère, l'équipe de Schray et al. (1975) a rapporté une activité anomérase — conversion entre les deux anomères, par la catalyse de l'ouverture du cycle — chez la ScFBPA. Une étude subséquente par Midelfort et al. (1976) jette le doute sur ces conclusions en critiquant une possible sous-évaluation du taux d'anomérisation non catalysé ; leur conclusion est que la FBPA de classe II de levure ne lie que

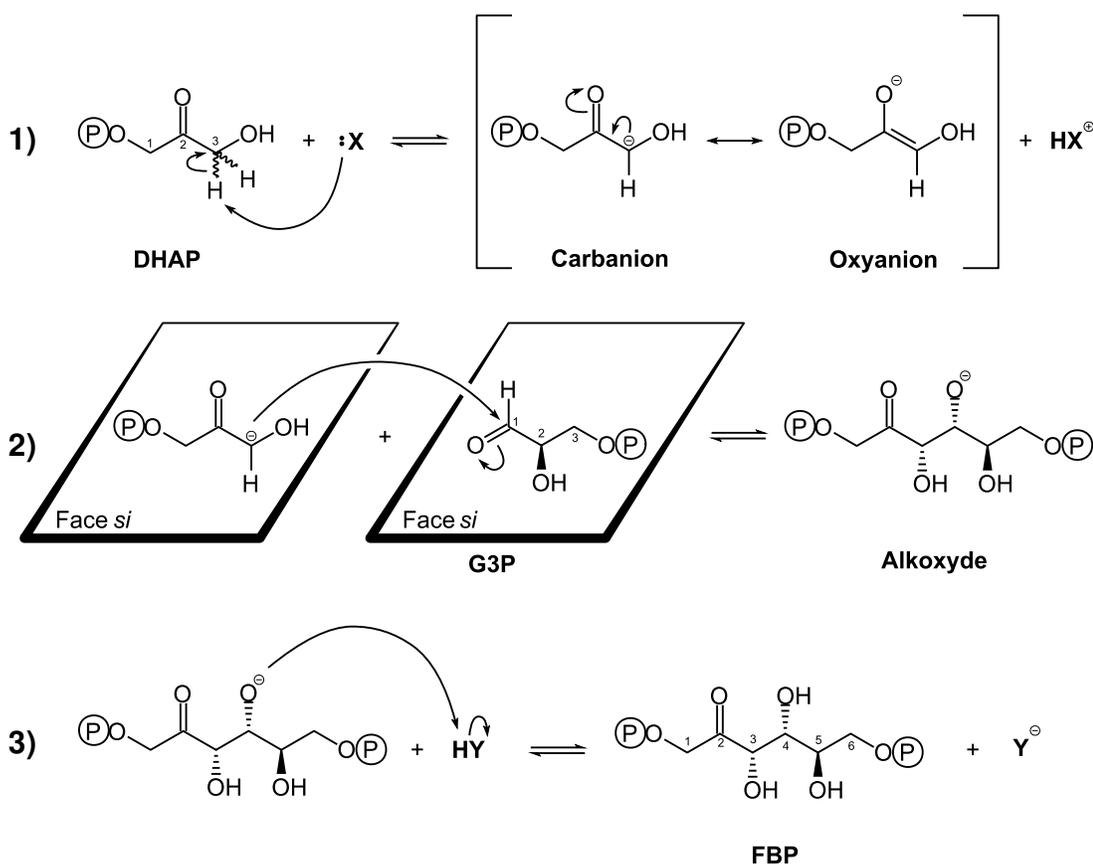


Figure 1.5 – Mécanisme de la réaction aldolique catalysée par une base en trois étapes avec les substrats DHAP et G3P. Schéma inspiré de Solomons et Fryhle (2008).

la forme acyclique du FBP, qui est de moins de 2% de sa concentration totale (Swenson et Barker, 1971). Cette activité d'anomérisation n'est pas non plus retrouvée chez d'autres aldolases, notons la FBPA de classe II de *Escherichia coli* (Szwergold et al., 1995). L'utilisation d'une forme mineure d'un composé rappelle la sélectivité de l'aldolase quant au G3P : la forme reconnue par l'enzyme, l'aldéhyde, n'est d'environ que 3% de la concentration totale, la forme prédominante en solution étant le diol géminale (Trentham et al., 1969).

La réaction catalysée par les FBPA est séquentielle et ordonnée (Rose et al., 1965). Le DHAP sera le premier substrat lié et l'espèce nucléophile. De plus, l'abstraction pour former l'énédiolate se fait sur l'hydrogène *pro-S* en C3 (Rose et Rieder, 1958). Le

DHAP devrait donc avoir un site spécifique de liaison qui ne permet que la géométrie où seul ce proton est accessible à la base catalytique. Notons toutefois que la FBPA de classe II n'est pas autant spécifique quant au G3P. Il a été rapporté que la réaction est possible entre le DHAP et le L-G3P pour former le (3S,4R,5S)-L-sorbose 1,6-bisphosphate (SBP), ainsi que la rétro-aldolisation de ce dernier (Tung et al., 1954). L'utilisation du D- ou L-G3P explique le centre (5R) ou (5S) — (3S,4R,5R)-D-FBP ou (3S,4R,5S)-L-SBP. D'autres diastéréoisomères ne montrent aucune activité, comme le (3S,4S,5R)-D-TBP. La position entre les deux trioses doit donc être finement contrôlée lors de l'attaque nucléophile pour une production stricte des centres stéréogéniques (3S,4R), alors que le centre (5R) ou (5S) est conservé depuis l'utilisation du D- ou L-G3P. L'attaque par la face *si* de l'énolate produit le centre (3S) sur l'hexose. L'attaque sur la face *si* du G3P forme le centre (4R). Le groupe de Tung et al. (1954) montre aussi la nécessité relative des groupements phosphate. Les sucres D-fructose 1-phosphate (F1P) et L-sorbose 1-phosphate (S1P) sont clivés — quoique dans une moindre mesure — alors que leurs comparses monophosphate en position 6 ne le sont pas. Ceci renforce l'idée d'une plus grande spécificité envers le DHAP que pour le G3P (ce dernier fournit le phosphate en position 6).

### 1.5.3 Métal catalytique

Les FBPA de classe II sont des métalloenzymes nécessitant un cation métallique divalent, le zinc dans la plupart des cas (Jagannathan et al., 1956; Kobes et al., 1969). Les ions divalents qui procurent une activité catalytique sont de la première période des métaux de transition : manganèse, fer, cobalt, nickel et zinc ; la sélectivité dépend de l'enzyme en question, par exemple le cobalt est préféré chez l'aldolase de *Clostridium perfringens* (Bard et Gunsalus, 1950). En premier lieu, le métal divalent semblait avoir un rôle de puits d'électron dans le complexe formé avec les substrats (Mildvan et al., 1971; Rutter, 1964). La polarisation du carbonyle du DHAP ou du FBP par le métal, dans la première sphère de coordination, viendrait faciliter l'abstraction d'un proton. Il avait aussi été suggéré que le métal est coordonné par le groupement phosphate en C1

(Mildvan et al., 1971).

Certains précédents points s'en trouvent déjà contredits par des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Smith et Mildvan, 1981; Smith et al., 1980). Dans le cas de ScFBPA, les distances entre le carbonyle et le métal et entre le phosphate et le métal sont trop grandes pour que ces deux groupes fassent partie de la première sphère de coordination du métal. L'interaction entre le substrat et l'ion métallique divalent serait effectuée par l'intermédiaire d'un résidu histidine. L'on peut ainsi décrire un état où les carbonyle du DHAP ou du FBP ne seraient pas polarisés par la présence du métal divalent, ce qui va à l'encontre du rôle proposé de puits d'électron (Belasco et Knowles, 1983). Ces résultats obtenus par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) montrent plutôt une polarisation du carbonyle de G3P, qui pourrait être causée par le résidu responsable de la protonation de l'alkoxyde (composé **Y** de l'étape 3 de la figure 1.5). Il faudra attendre les premières structures cristallines pour comprendre que l'ion de zinc se déplace entre deux sites durant la catalyse : l'un près et l'autre éloigné du substrat.

Des cas existent de mécanismes dépendants de métaux divalents et ils peuvent se montrer similaires à la FBPA de classe II en certains points. La glyoxalase I catalyse l'isomérisation des espèces thiohémiacétals en  $\alpha$ -hydroxythioesters (Creighton et Hamilton, 2001). Cette catalyse inclut un ion de zinc de géométrie octaédrique qui coordonne les groupes hydroxyle et carbonyle du substrat. La réaction catalysée est l'isomérisation de ces deux groupes en passant par un intermédiaire énediolate stabilisé par le métal. La D-xylose isomérase est dépendante de deux ions d'un métal divalent (manganèse ou magnésium) pour catalyser l'isomérisation d'un aldose en cétose (Allen et al., 1994; Kovalevsky et al., 2010). Un premier ion lie le substrat et le maintient, de l'ouverture du cycle (furanose ou pyranose) jusqu'à la fin de la catalyse. Le deuxième métal depuis sa position initiale promeut un échange de proton entre une molécule d'eau le liant et le substrat. Ce métal se déplace par la suite sur environ 2 Å pour lier l'intermédiaire réactionnel au site actif. La phosphomannose isomérase de type I, zinc dépendante, catalyse aussi l'isomérisation d'un aldose en cétose (Roux et al., 2011). L'ion unique de zinc, pentaédrique, lie une molécule d'eau qui est impliquée dans l'ouverture du cycle

du substrat. Ensuite, le métal effectue un déplacement d'environ 1 Å et coordonne l'oxygène du groupe en C1, stabilisant l'intermédiaire énediolate formé subséquemment. Ces exemples de métalloenzymes ont certains points communs avec l'aldolase — nature du métal, son déplacement, son lien avec le substrat ou son implication avec un intermédiaire énediolate. Toutefois, l'aldolase catalyse le bris d'un lien C—C, et non une isomérisation.

#### 1.5.4 Premières données structurales

Les études précédentes ont renforcé le mécanisme suggéré de l'addition aldolique catalysé par une base. Par contre, l'identification de résidus impliqués demeurent une tâche ardue, quoique possible (Berry et Marshall, 1993). La résolution des premières structures d'une FBPA de classe II, la EcFBPA, a grandement facilité cette analyse, codes PDB 1DOS et 1ZEN (Blom et al., 1996; Cooper et al., 1996). Les structures d'aldolases référées sont ainsi disponibles sur la Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000). Une observation étonnante amène déjà son lot de questions : le zinc catalytique adopte deux positions mutuellement exclusives. La transition de la position retranchée (site I) à la position exposée (site II) requiert un déplacement de l'ion de zinc de plus de 3 Å, ainsi qu'un changement conformationnel de résidus le coordonnant. Le zinc retranché est coordonné par His110, His226, His264 et Glu174, qui sont des résidus conservés (Labbe, 2009). Les résidus His110 et His264, situés sur des brins  $\beta$ , effectuent une rotation de leur chaîne latérale pour suivre le zinc. Notons aussi la présence de deux boucles de surface mobiles :  $\beta 5\text{-}\alpha 7$  (généralement trop mobile pour être observée par cristallographie) et  $\beta 6\text{-}\alpha 8$  (contenant His226).

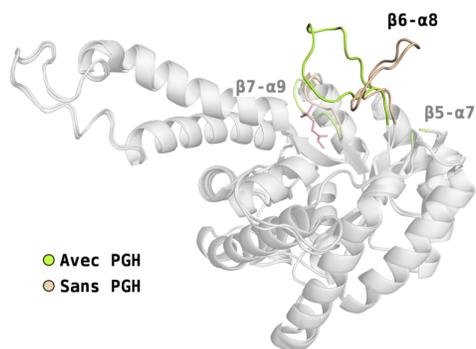
Des sites de coordination de cations monovalents ont aussi été identifiés. L'activation de l'enzyme par ces ions avait déjà été rapportée quoique leur nature ne soit pas conservée, le sodium ou le potassium selon l'enzyme (Baldwin et al., 1978; Rutter, 1964; Szewergold et al., 1995). Un premier site est au coeur de l'enzyme, derrière le zinc, à 5,4 Å de ce dernier chez HpFBPA (Fonvielle et al., 2008). Cet ion pourrait jouer un rôle dans le maintien de la structure tridimensionnelle, permettant la géométrie propice à la ca-

talyse enzymatique. Un second site — retrouvé dans l'enzyme de *Escherichia coli* — semble dépendant de la présence d'un substrat (Hall et al., 1999). Le sodium se trouve coordonné par le groupement phosphate au site P1 — le site de liaison du phosphate en C1 du DHAP ou du FBP, P1 étant le nom de l'atome de phosphore de ce groupe. Ce ne serait encore qu'une fonction structurale alors que dans d'autres FBPA de classe II, cet ion est remplacé par l'amine primaire d'un résidu lysine.

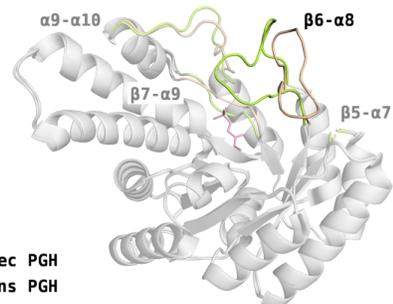
### 1.5.5 Changements conformationnels

Avec les années, de nombreuses structures se sont ajoutées à la liste de FBPA de classe II. L'utilisation d'inhibiteurs analogues de substrat ou d'intermédiaire réactionnel offre l'occasion d'apprécier les différentes conformations adoptées par ces aldolases. Nous avons vu le cas du PGH qui a été largement utilisé à cet effet, comme il est possible de le constater en figure 1.6. La conformation de l'enzyme suite à la liaison de cette molécule est très similaire entre organismes. Les exemples montrés sont des complexes aldolase-PGH de deux enzymes pour chaque sous-classe. Nous retrouvons la EcFBPA et la MtFBPA parmi les aldolases de classe IIa (Blom et al., 1996; Hall et al., 1999; Pegan et al., 2013). La HpFBPA et la GIFBPA font partie des aldolases de classe IIb (Fonvielle et al., 2008; Galkin et al., 2007).

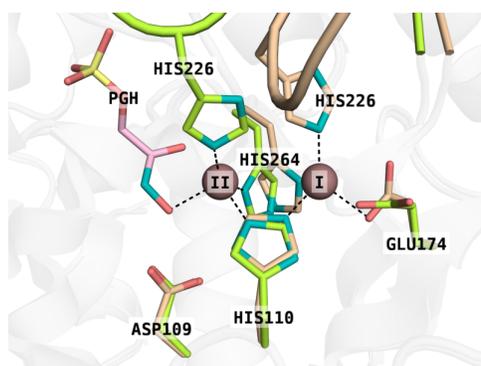
La transition du zinc décrite plus haut semble jouer un rôle alors qu'il s'approche pour être coordonné par le ligand triose. Un aspect important de cette nouvelle conformation (en vert à la figure 1.6) est le mouvement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$ , alors que His226 continue de coordonner le zinc (EcFBPA). Le mouvement de cette boucle dépend du substrat, plus spécifiquement la liaison au site P1. Une amide du squelette de la chaîne peptidique de la boucle ainsi qu'une lysine (classe IIb) lie le groupement phosphate au site P1. Les ions sulfates sont suffisants pour obtenir cette conformation par exemple (Galkin et al., 2009). Ces ions sulfates se lient aux mêmes sites de liaison que les groupements phosphate, induisant notamment le même mouvement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  qu'avec un substrat ou un analogue, sans qu'il n'y ait d'interactions avec l'ion de zinc au site exposé.



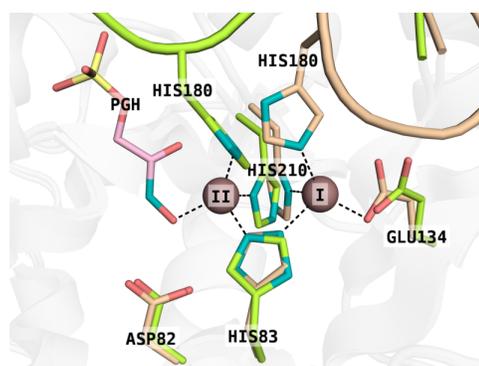
(a) EcFBPA avec PGH (PDB 1B57) et sans (PDB 1DOS)



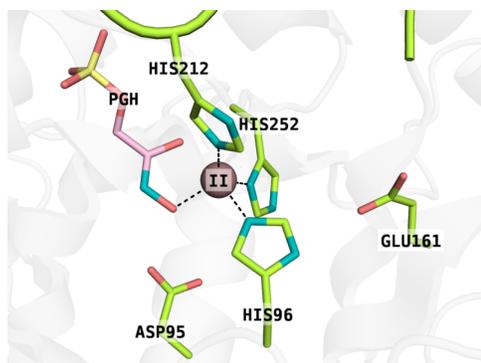
(b) HpFBPA avec PGH (PDB 3C52) et sans (PDB 3C4U)



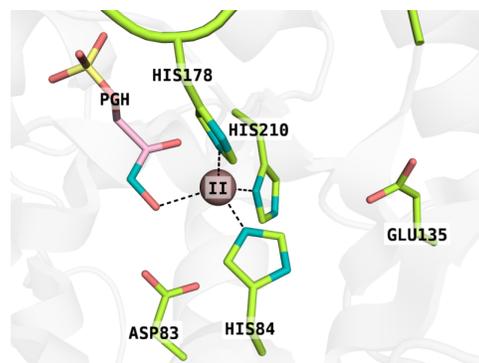
(c) EcFBPA avec PGH



(d) HpFBPA avec PGH



(e) MtFBPA avec PGH (PDB 4DEL)



(f) GIFBPA avec PGH (PDB 2ISW)

Figure 1.6 – Comparaison de structures de FBPA de classe II et changements conformationnels des structures libres (orange) suite à la liaison avec le PGH (ligand rose, structure verte). L'ion de zinc est annoté selon le site occupé (brun). En (a) et (b), la face C-terminale du tonneau est montrée. En (c) à (f), il s'agit du site actif présent sur cette face du tonneau.

Une observation qui a retenue beaucoup d'attention dans ces structures est la proximité du résidu Asp109 (EcFBPA) au substrat (ou inhibiteur dans ce cas-ci). Qu'un résidu carboxylique ait une fonction catalytique d'acide ou de base a été montré dans certains cas, et même chez d'autres métalloenzymes, renforçant ainsi l'idée d'un résidu d'acide aspartique impliqué dans la catalyse de la FBPA de classe II. La L-fucose phosphate aldolase (FucA) qui est une aldolase dépendante du DHAP — aussi dite de classe II, car elle comporte un zinc catalytique — contient un résidu glutamate qui peut agir à la fois en tant qu'acide et base catalytique suite à son déplacement d'un environnement hydrophile à hydrophobe (Fessner et al., 1996; Joerger et al., 2000). Il faut par contre noter que ce mouvement est inexistant chez les FBPA de classe II, l'aspartate en question étant solidement ancré. Le type de repliement de ces deux métalloaldolases et les interactions avec les substrats sont aussi très différents, ce qui met plutôt fin à cette comparaison.

### 1.5.6 Rôle d'un résidu d'acide aspartique

L'implication du résidu d'acide aspartique (Asp109) a été étudié en premier lieu par Plater et al. (1999). La mutation de ce résidu en alanine (D109A) chez EcFBPA et l'analyse cinétique et par spectrométrie IRTF les amènent à conclure que Asp109 ait un rôle catalytique dans l'échange de proton avec le cétohexose. Pour résumer, la mutation en alanine réduit grandement le  $k_{cat}$ , et ceci surtout dans le sens du clivage de l'hexose, la rétro-aldolisation. Il semble aussi que la mutation entraîne la perte de la polarisation du carbonyle de G3P, comme détecté par (Belasco et Knowles, 1983). Cette hypothèse de l'implication de Asp109 dans la catalyse est comparée au mécanisme suggéré — à cette époque — des FBPA de classe I (Morris et Tolan, 1993). Cette étude cinétique avait identifié un résidu d'acide aspartique — aussi par une mutation en alanine — pour ce même rôle d'échange de proton avec le groupe hydroxyle en C4 de l'hexose. Par contre, suite à la publication d'une structure cristalline, ainsi que des études subséquentes sur le mécanisme catalytique de FBPA de classe I, le rôle de Asp33 a été relayé à une simple contribution à l'intégrité structurale en stabilisant les charges de résidus avoisinants (Blom et Sygusch, 1997; St-Jean et Sygusch, 2007; St-Jean et al., 2005). Ce développement reflète

la fine relation structure-fonction d'une enzyme.

Une diminution d'activité enzymatique, donc une perte de fonction, causée par la mutation d'un résidu ne signifie pas forcément qu'un rôle catalytique lui serait attribué. La modification de la structure due à une mutation peut tout aussi bien affecter la fonction de l'enzyme. La mutation de ce long résidu chargé en un court résidu hydrophobe, et à l'intérieur d'une structure secondaire, peut avoir des conséquences inconnues sur la structure tridimensionnelle de la FBPA. Une déformation du site actif chez ce mutant pourrait expliquer la perte de fonction : la géométrie ne permettrait plus la polarisation du carbonyle de G3P — par un autre résidu — ce qui engendre une perte d'activité dans le sens du clivage. Cette étape serait moins limitante dans la réaction de l'aldolisation.

Pour évaluer le rôle de Asp109 (EcFBPA) comme étant structural ou fonctionnel, la combinaison à une étude structurale s'avère nécessaire. Une structure du mutant D83A (GIFBPA) a été obtenue avec le FBP (Galkin et al., 2009). À défaut de contrôle approprié, l'analyse de la structure de GIFBPA-D83A·FBP laisse déjà présager un rôle structural au résidu Asp83, contrairement à ce que les auteurs avancent. La mutation modifie la géométrie adoptée par le squelette peptidique : cette alanine adopte une conformation correspondant à une hélice  $\alpha$ , au lieu de feuillet  $\beta$  chez le type sauvage (le carbonyle pointe à l'opposé pour atténuer la perte de l'interaction Asp $\cdots$ Na). Les auteurs identifient par ailleurs une nouvelle position du cation de zinc comme étant d'intérêt catalytique (figure 1.7). À cette position, l'ion divalent se retrouve coordonné par les groupes hydroxyles en C3 et C4 du FBP. Le zinc ne serait plus fortement coordonné par l'enzyme, les distances étant de 3,05, 4,35 et 3,53 Å avec les histidines 84, 178 et 210, respectivement. La coordination d'un cation de zinc dans la première sphère implique des distances d'environ 2 Å, ou légèrement plus selon le nombre de ligands dans le complexe de coordination (Harding, 2006). Cette structure déformée est ensuite utilisée pour modéliser le résidu manquant et proposer une nouvelle géométrie durant la catalyse, où Asp83 coordonne le zinc et tient office de base et d'acide catalytique. Toutefois, cette structure ne montre pas comment l'enzyme fonctionne, mais plutôt une conformation où elle ne fonctionne pas. En analysant la pochette du site actif avec GIFBPA·TBP, les évi-

dences de perturbations structurelles par la mutation D83A sont plus évidentes (figure 1.7). Une cavité plus profonde est générée, où s'infiltrer une molécule d'eau ainsi que le zinc catalytique.

Une structure plus intéressante du point de vue mécanistique a été publiée par Pegan et al. (2009). L'expérimentation en condition acide a permis d'obtenir la première structure d'un complexe de FBPA de classe II de type sauvage avec FBP (figure 1.7), ainsi qu'une structure avec DHAP et G3P. La protonation des bases catalytiques étant probablement la cause de l'inhibition de l'activité catalytique de l'aldolase permettant le piégeage de substrats, nous pouvons considérer la géométrie observée comme étant plus ou moins propice à la catalyse. Il faut tenir en compte que les hydrogènes ne sont pas visibles par radiocristallographie (sauf à une résolution exceptionnelle) ; les états de protonation sont inconnus et les distances interatomiques peuvent s'en retrouver modifiées. Le cation divalent se retrouve coordonné par les substrats : le carbonyle en C2 et les groupes hydroxyles en C3 et en C4 du FBP, et par le groupe carbonyle et le groupe hydroxyle (C2 et C3) du DHAP dans la seconde structure. La position du résidu Asp95 n'explique toujours pas l'activité catalytique qui lui est attribué. Prenons quelques mesures comme exemple, selon les structures de MtFBPA en complexe avec FBP ou avec DHAP et G3P, codes PDB 3ELF et 3EKZ (Pegan et al., 2009). Un oxygène du carboxylate de Asp95 se trouve à 3,68 Å de l'oxygène en C4 du FBP, et à 4,83 Å de l'oxygène de l'aldéhyde de G3P. En modélisant l'hydrogène du groupe hydroxyle en C4 à un angle tétraédrique,  $109,5^\circ$ , l'angle (FBP)O4—H...O(Asp) est d'environ  $130^\circ$ , et une distance (FBP)O4H...O(Asp) d'environ 3 Å, ce qui est insuffisant pour une abstraction. En supposant un déplacement du résidu, le plus près qu'il est possible de le placer (uniquement par les angles de torsion de la chaîne latérale) positionne un oxygène à une distance de 2,6 Å du proton qu'il devrait supposément abstraire — 3,4 Å entre les deux atomes lourds — et même si ces distances seraient plus faibles à pH physiologique, l'angle n'est toujours pas favorable. Le résidu Asp95 aurait vraisemblablement un rôle structural dû aux interactions avec le groupe hydroxyle en C3 du FBP, ainsi qu'avec Asn27, Gln51 et la molécule de solvant enfouie (un cation monovalent dans d'autres structures). Lorsque

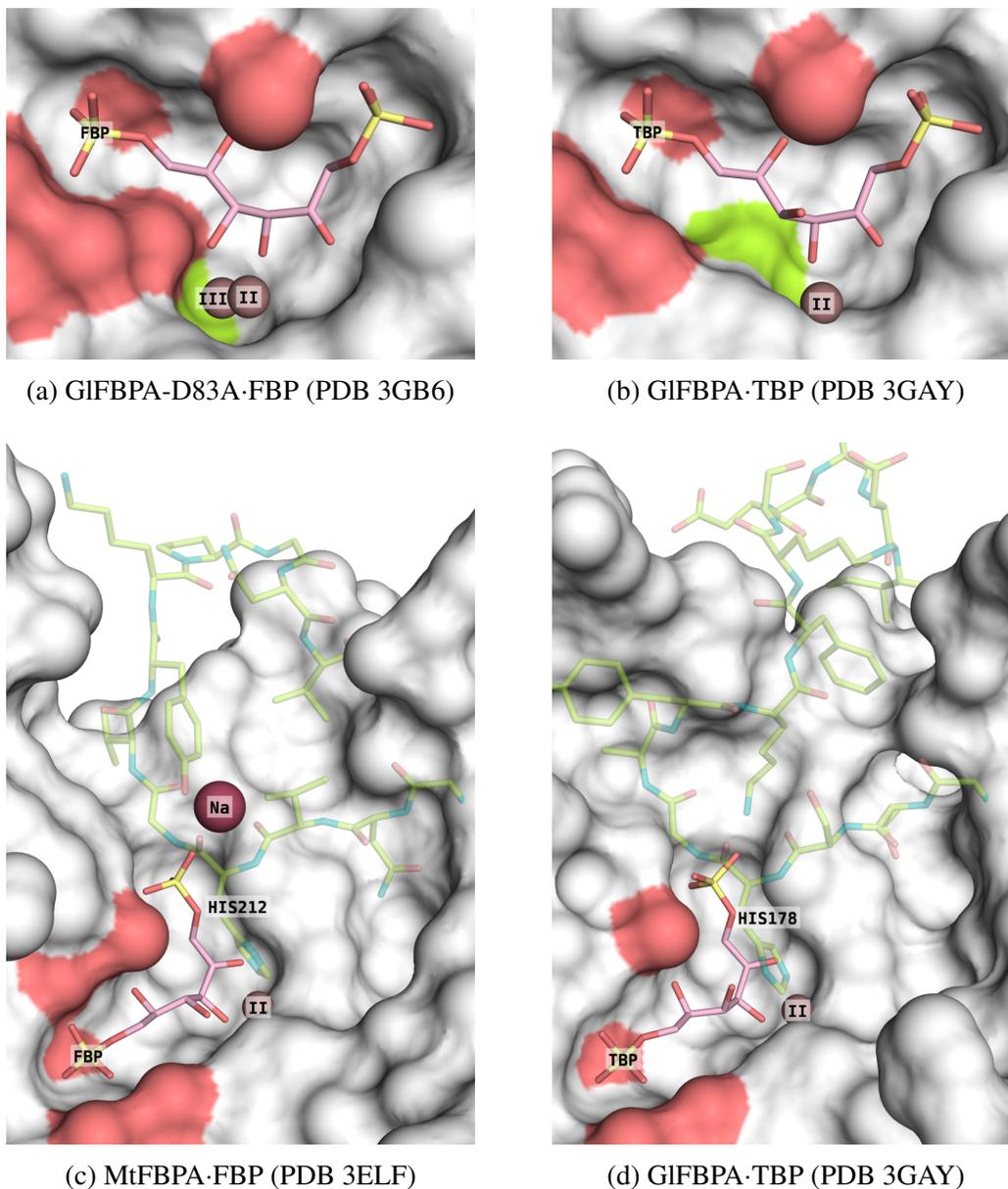


Figure 1.7 – Surface de la cavité du site actif de FBPA de classe II. Le cétohexose est en rose et identifié sur le phosphate en C6 ; les surfaces en rouge sont des molécules d'eau ancrées par la protéine et participant à la fixation du ligand. Le résidu 83 de GIFBPA est en vert dans les sous-figures (a) et (b) qui sont le mutant D83A et le type sauvage, respectivement (Galkin et al., 2009). La boucle  $\beta 6-\alpha 8$  est colorée en vert dans les sous-figures (c) et (d) qui sont MtFBPA-FBP (Pegan et al., 2009) et GIFBPA-TBP, respectivement. Les ions de zinc sont notés selon leur position.

l'ion de zinc se retrouve au site enfoui, ce résidu d'acide aspartique interagit avec le résidu histidine voisin (His96), faisant ainsi partie de la seconde sphère de coordination ; cette conformation n'est pas observée quant à la MtFBPA mais plutôt dans des structures d'homologues obtenues sans ligands (figure 1.6). Dans la recherche d'une conformation permettant l'abstraction de proton de l'hexose, il faut donc prendre en considération l'affaiblissement ou la perte d'interactions avec le résidu d'acide aspartique, en plus d'inclure la pénalité d'un encombrement stérique avec des résidus voisins. L'implication de Asp95 (MtFBPA), Asp109 (EcFBPA), Asp83 (GIFBPA) ou Asp82 (HpFBPA) dans la catalyse est ainsi peu probable car ceci nécessiterait un changement important dans le repliement au niveau d'une structure tertiaire rigide ou dans le positionnement du substrat fermement maintenu en place.

### **1.5.7 Proposition d'un résidu histidine**

Suite à la proposition de reléguer Asp109 (EcFBPA) à un rôle structural, il faut identifier un résidu capable d'effectuer l'échange de proton avec le FBP. Des structures exposées jusqu'à présent, aucun résidu n'est en position d'effectuer cette abstraction. Ceci nous laisse croire que le résidu catalytique se situerait sur une boucle mobile, ce qui est fréquent pour ce type de repliement (Nagano et al., 2002) ; c'est aussi le cas de la FBPA de classe I (St-Jean et Sygusch, 2007). Ce résidu catalytique de la FBPA de classe II doit de toute évidence être conservé chez les FBPA de classe II. Par l'exploration de structures, en particulier MtFBPA·FBP et GIFBPA·TBP (en figure 1.7), nous pouvons sélectionner les candidats potentiels.

Il est possible aussi d'éliminer certains résidus uniquement impliqués dans la liaison du substrat. Tous les groupements chargés ou polaires (groupes phosphate ou hydroxyle) du FBP font au moins une interaction ionique ou un pont hydrogène, à l'exception faite du groupe hydroxyle en C4, cible catalytique. Cet ensemble d'interactions serait vraisemblablement effectuée afin de positionner ce groupement. Ce positionnement du substrat concorde aussi avec des structures de complexes FBPA-inhibiteur variés (Daher et al., 2010; de la Paz Santangelo et al., 2011; Fonvielle et al., 2008; Galkin et al., 2009;

Li et al., 2011). L'accès au groupe hydroxyle en C4 de l'hexose permettrait donc au résidu catalytique d'effectuer l'abstraction du proton. Par exemple, la liaison du TBP implique les mêmes interactions, la seule différence étant l'inversion du stéréocentre C4. Un mécanisme de sélectivité dicté par le positionnement de la partie C4 à C6 de l'hexose, provenant de G3P, avait été suggéré par (Hall et al., 2002) pour expliquer la différence de spécificité entre une FBPA de classe II et une TBPA de classe II. En effet, la comparaison de leur structure montre la similitude de la liaison du DHAP et de la coordination d'un ion de zinc. Ces deux aldolases dépendantes du DHAP doivent exposer la face *si* de ce dernier à la face *si* (FBPA) ou *re* (TBPA) du G3P. Ces deux aldolases utiliseraient le même mécanisme catalytique, mais une liaison différente du G3P.

Des TBPA de classe II sont incluses dans un alignement de séquences primaires (figure 1.8), afin d'identifier des résidus à la fois conservés et dans la possibilité d'abstraire un proton. L'on retrouve une identité de séquence des FBPA d'environ 25% entre les deux sous-classes, d'environ 40% dans la même sous-classe. Les identités de séquence des TBPA de classe II avec ces FBPA des classes IIa ou IIb sont respectivement d'environ 25% et 35–40%. Dans le nombre réduit de résidus conservés entre ces deux types d'aldolases se trouvent donc les résidus catalytiques.

Dans la structure MtFBPA·FBP, le résidu His212 serait le plus enclin des résidus à effectuer cette abstraction sur le groupe hydroxyle ; il s'agit du résidu le plus près de ces atomes du substrat, et il n'interagit qu'avec peu de partenaires, ce qui lui confère plusieurs conformations possibles — n'oublions pas qu'il fait partie d'une boucle très flexible, la boucle  $\beta 6$ - $\alpha 8$ . Une deuxième boucle flexible ( $\beta 5$ - $\alpha 7$ ) n'est que rarement observée dans les structures cristallines, elle pourrait aussi être impliquée dans cette pre-

Figure 1.8 – Alignement de séquences d'aldolases de classe II. Comparaison entre sous-classes de FBPA de classe II et avec deux différentes TBPA de classe II, respectivement P56109, O97447, P9WQA3, P0AB71, P0AB74, A9MPP7, P0C8J6 et Q32EA9 sur Uniprot (Consortium, 2015), avec l'alignement effectuée par Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Les couleurs sont les degrés de similarité : bleu - résidus identiques ; mauve - résidus fortement similaires ; rouge - résidus faiblement similaires.

		<i>aaa</i>		<i>bc</i>	
HpFBPA	IIb	48	TSEGAIKYMGIDMAV-----GMVKTCERYPHIPVALHLHDHGTTFE---		88
GlfBPA	IIb	49	CSRGALKYSDMIYLK-----KLCEAALEKHPDIPCTIHLHDHGDITLE---		89
MtFBPA	IIa	52	FSTGGAEFGSGLGVKDMVT-----GAVALAEFTHVIAAKY-PVNVALHTDHCPKDKLDS		104
EcFBPA	IIa	60	FSNGGASFIAGKGVKSDVPQGAAILGAISGAHHVHQMAEHY-GVPVILHTDHCCKKL-LP		117
EcTBPA	kbaY	49	GTPGTFKHIALEEIY-----ALCSAYSTTY-NMPLALHLHDHHESLD---		88
SaTBPA	kbaY	49	GTPGTFKHIALEEIY-----ALCSAYSTSF-DIPLALHLHDHHESLD---		88
EcTBPA	gatY	49	GTPGTFTHAGTENLL-----ALVSAMAKQY-HHPLAHLHDHHTKFD---		88
SdtBPA	gatY	49	GTPGTFTHAGIENLL-----ALVSAMAKQY-HHLLAHLHDHHTKFD---		88
				<i>c</i>	
HpFBPA	IIb	89	-----SCEKAVKAGFTSVMIDASHHAFENLELTSKVVMAHNAGVSVAEELGR		137
GlfBPA	IIb	90	-----SVKMAIDLGFSSVMIDASHHPFDENVRITKEVVAYAHARSVSVAEELGT		138
MtFBPA	IIa	105	YVRPLLAISAQRVSKGGNPLFQSHMWDGSAVPIDENLAI AQELLKAAAAAKIILEIEIGV		164
EcFBPA	IIa	118	WIDGLLDAGEKHFAATGKPLFSSHMIDLSEESLQENIEICSKYLERMSKIGMTLEIELGC		177
EcTBPA	kbaY	89	-----DIRRKVHAGVRSAMIDGSHFPFAENVKLVKSVD FCHSQCDSVAEELGR		137
SaTBPA	kbaY	89	-----DIRHKVNAGVRSAMIDGSHFPFAENVKLVKSVD FCHSRDCSVAEELGR		137
EcTBPA	gatY	89	-----DIAQKVRSGVRSVMIDASHLPFAQNI SRVKEVDFCHRFDVSVAEELGQ		137
SdtBPA	gatY	89	-----DIAQKVRSGVRSVMIDASHLPFAQNI SRVKEVDFCHRFDVSVAEELGQ		137
			<i>d</i>	<i>cb</i>	<i>b</i>
HpFBPA	IIb	138	LMGIEDNISVDEK--DAVLVNPKEAEQFVKES----QVDYLAPAIGTSHGAFKFKGEP-		189
GlfBPA	IIb	139	LGGIEDVQN----TVQLTEPQDAKKFVELT----GVDALAVAIGTSHGAYKFKSES-		187
MtFBPA	IIa	165	VGGEEDGVANEIN--EKLYTSPEDFEKTIEALGAGEHGKYL LAATFGNVHGVYKPGNVKL		222
EcFBPA	IIa	178	TGGEEDGVDNSHMDASALYTQPEDVDYAYTELSK-ISPRTIAASFGNVHGVYKPGNVVL		236
EcTBPA	kbaY	138	LGGVEDDMSVDAE--SAFLTDPQEA KR FVELT----GVDSLAVAIGT AHGLYSKT----		186
SaTBPA	kbaY	138	LGGVEDDMSVDAE--NAFLTDPQEA KR FVELT----GVDSLAVAIGT AHGLYTKK----		186
EcTBPA	gatY	138	LGGQEDDVQVNEA--DALYTNPAQAREFAEAT----GIDSLAVAIGT AHGMYASA----		186
SdtBPA	gatY	138	LGGQEDDVQVNEA--DALYTNPVQAREFAEAT----GIDSLAVAIGT AHGMYASA----		186
			<i>cb</i>	<i>b</i>	
HpFBPA	IIb	190	K--LDFERLQEVK-----RLTNIPLVLHGASAI PDNVRKSYLDAGGDLKGSKGVPF EF		240
GlfBPA	IIb	188	DIRLAIDRVKTIS-----DLTGIPLVMHGSSV PKDKVDMINKYGGKMPDAVGVP IES		240
MtFBPA	IIa	223	RPDILAQQQVAAAKLGLPADAKPFDVVFHGGSGSL-----KSE		261
EcFBPA	IIa	237	TPTILRDSQEVVSKKHNLPHN--SLNFVFHGGSGST-----AQE		273
EcTBPA	kbaY	187	-PKIDFQRLAEIR-----EVVDIPLVLHGASDVP-----DEF		217
SaTBPA	kbaY	187	-PKIDFQRLAEIR-----EVVDIPLVLHGASDVP-----DEY		217
EcTBPA	gatY	187	-PALDFSRLENIR-----QWVNLPLVLHGASGLS-----TKD		217
SdtBPA	gatY	187	-PALDFSRLENIR-----QWVNLPLVLHGASGLS-----TKD		217
			<i>ab</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
HpFBPA	IIb	241	LQESVKGGINKVN TD TDLRIAFIAEVRKVANED-----KSQFDLRKF		282
GlfBPA	IIb	241	IVHAI GEGVCKIN VDS SRMAMTGAI RKFVFEH-----PEKFDPRDY		282
MtFBPA	IIa	262	IEEALRYGVVKMNV DTD TQYAFTRPIAGHMFTNY---DGVL--KVDGEVGVK VYDPRSY		316
EcFBPA	IIa	274	IKDSVSYGVVKMNI DTD TQWATWEGVLNYYKANEAYLQQLGNPKGEDQPNK KYDPRVW		333
EcTBPA	kbaY	218	VRRTIELGVTKVNVATELKI AFAGAVKAWFAEN-----PQGNDRPY		259
SaTBPA	kbaY	218	VRRTIELGVCKVNVATELKI AFAAAVKWF IEN-----PDGNDRPY		259
EcTBPA	gatY	218	IQQTIKLGICKIN VATELKNFSQALKNYLTEH-----PEATDPRDY		259
SdtBPA	gatY	218	IQQTIKLGICKIN VATELKNFSQALKNYLTEH-----PEATDPRDY		259

a: Résidus liant D-G3P

b: Résidus liant DHAP

c: Résidus coordonnant l'ion de zinc

d: Résidu catalytique de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$

mière étape de la rétro-aldolisation. Le mouvement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  pour lier le substrat est commun aux aldolases de classe II. Ce changement conformationnel rapproche le résidu His du substrat ; la transition pourrait permettre une position où le résidu serait enclin à effectuer l'échange de proton. Et même sans prendre en compte la flexibilité de ladite boucle, la rotation autour des liens  $C\alpha-C\beta$  et  $C\beta-C\gamma$  de ce résidu histidine (les angles de torsion  $\chi_1$  et  $\chi_2$ , respectivement) mène à une position où N $\epsilon$  se trouve à environ 2 Å de l'ion divalent ainsi que du groupe hydroxyle en C4.

Une opposition à cette hypothèse est l'implication du résidu His dans la coordination du zinc. Cette liaison serait moins forte qu'il n'y paraît, car une faible densité électronique est observée pour ce résidu (Coinçon, 2011). Il est aussi possible que ce lien soit brisé lors du changement conformationnel de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$ . Les indices quant à un rôle catalytique au résidu His212 (MtFBPA), His226 (EcFBPA), His178 (GIFBPA) ou His180 (HpFBPA) relèvent d'une liberté de mouvement suggérée par les structures obtenues jusqu'à présent (Coinçon, 2011).

### 1.5.8 Deuxième boucle catalytique

Une boucle flexible,  $\beta 5-\alpha 7$ , n'est que rarement observée dans les structures cristallines. Une structure montre une partie de cette boucle chez EcFBPA qui se replie vers le site actif, code PDB 1B57 (Hall et al., 1999). Cette conformation observée a probablement été obtenue par un excès de zinc pendant la purification et la cristallisation, car un résidu de cette boucle est impliquée dans la coordination d'un second cation de zinc normalement absent. Une sous-unité d'un homodimère de HpFBPA présente cette boucle exposée au solvant, alors qu'un inhibiteur analogue d'hexose occupe le site actif, code PDB 3N9S (Daher et al., 2010). Une structure de MtFBPA-PGH, code PDB 4DEL présente cette boucle se repliant vers le site actif, ce qui rapproche un résidu glutamate (Glu169) du ligand (Pegan et al., 2013). Ce résidu avait été préalablement reconnu comme ayant une fonction catalytique par des essais enzymatiques (Zgiby et al., 2002). En plus de remarquer la perte d'activité par la mutation du résidu chez *Escherichia coli* (E182A), ces derniers obtiennent le même résultat en rigidifiant la boucle par la muta-

tion simultanée de quatre résidus glycine en alanine. En caractérisant l'effet isotopique de la production d'énediolate à partir de DHAP (ralentissement relatif de la cinétique enzymatique par l'utilisation de [1(S)-<sup>2</sup>H]DHAP]), ces mêmes auteurs concluent que le résidu Glu182 et la flexibilité de la boucle l'arborant sont nécessaires dans l'étape de l'abstraction du proton en C3 du kétotriose. Ce résidu semble conservé chez les FBPA et les TBPA de classe II (figure 1.8).

La géométrie d'attaque du résidu glutamate de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  n'est pourtant pas bien définie. Les structures présentant cette boucle près du site actif sont obtenues par des conditions modifiant des interactions, soit une concentration élevée en cations de zinc chez EcFBPA (Hall et al., 1999), soit la cristallisation à pH acide chez MtFBPA (Pegan et al., 2013). L'abstraction pourrait autant s'effectuer directement par le glutamate que par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Chez certaines aldolases, comme HpFBPA, il y a plusieurs résidus Glu sur la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  et puisque le repliement est incertain et la boucle diffère entre aldolases, nous devons identifier le résidu expliquant l'activité catalytique.

## 1.6 Objectifs

Cette étude en est une de la relation structure-fonction d'une métalloenzyme. Il s'agit de la FBP aldolase de classe II. Les modèles d'étude sont l'aldolase de classe IIb de *Helicobacter pylori* et celle de la classe IIa de *Escherichia coli*. Sauf indication contraire, la numérotation des résidus se réfère à HpFBPA. L'objectif global du présent ouvrage se résume en l'identification de résidus impliqués dans l'aldolisation catalysée par l'aldolase de classe II, suivi par la description du mode d'action, impliquant les éléments de structures et leur cheminement dynamique lors du trajet catalytique. Les deux étapes principales de la catalyse d'addition aldolique qui nous intéressent sont : la déprotonation en C $\alpha$  (C3) du DHAP (préparant l'espèce nucléophile) et la protonation de la forme alkoxyde en C4 de l'hexose. L'importance de cette dernière étape de l'aldolisation s'en voit plus évidente en considérant la réaction rétro-aldolique ; la déprotonation de ce groupe hydroxyle de l'hexose amorce le clivage du lien carbone-carbone.

### 1.6.1 Déprotonation de l'hexose

Nous allons nous distancer du rôle catalytique attribué à Asp82 (Asp109 de EcFBPA), comme vu en section 1.5.6. Nous cherchons à tester l'hypothèse d'un résidu histidine (His180) à effectuer cette abstraction de proton formant l'alkoxyde (Belasco et Knowles, 1983; Coinçon, 2011; Smith et Mildvan, 1981; Smith et al., 1980). Quoique longtemps considérée uniquement dans la coordination du zinc, la liaison de ce résidu avec le cation divalent serait faible et il est suggéré qu'elle doit être brisée pour permettre la transition du zinc entre les positions exposée et retranchée (Coinçon, 2011). Il s'agirait donc de déterminer le rôle de His180 dans la catalyse enzymatique par la description cinétique d'un mutant en plus de l'interprétation de sa structure avec ou sans substrats, afin d'en piéger les intermédiaires réactionnels

### 1.6.2 Déprotonation du triose

Un résidu de glutamate serait responsable de la déprotonation du DHAP, produisant l'espèce nucléophile apte à attaquer le G3P. À l'instar des études effectuées sur EcFBPA et MtFBPA— par Zgiby et al. (2002) et Pegan et al. (2013), respectivement — nous voulons identifier par la cinétique enzymatique ce résidu conservé chez HpFBPA : Glu142. Un deuxième résidu de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ , Glu149, est utilisé à des fins de contrôle. L'utilisation de mutants en radiocristallographie permettrait le piégeage de l'intermédiaire réactionnel énediolate.

### 1.6.3 Dynamique des boucles catalytiques

Les deux étapes de transfert de proton précédentes, effectuées par His180 et Glu142, impliquent notamment le mouvement de deux boucles catalytiques. La boucle  $\beta 6-\alpha 8$  se déplace pour accueillir le FBP ou le DHAP au niveau du site P1, tout en rapprochant le résidu His180 dudit substrat. Cette nouvelle conformation faciliterait l'approche de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  au site actif. Ce deuxième mouvement reste encore hors de notre compréhension. La radiocristallographie ne fournissant que des images floues à ce sujet, nous

nous tournons vers une méthode *in silico* : la simulation de dynamique moléculaire. Nous cherchons à comprendre le trajet utilisé par la boucle afin d’approcher le résidu catalytique, par exemple identifier les interactions nouvellement formées.

## 1.7 Méthodes et justification

### 1.7.1 Cinétique enzymatique

#### 1.7.1.1 Mesures cinétiques

Lorsqu’il est question d’une enzyme, il est fréquent de caractériser son activité catalytique selon le profil mathématique décrit par Michaelis et Menten (1913). Cette équation asymptotique (1.1) est la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en substrat. Ce profil nous renseigne sur les propriétés catalytiques de l’enzyme, notamment par deux valeurs :  $K_M$  et  $V_{\max}$ .

$$v([S]) = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1.1)$$

La vitesse maximale, ou vitesse limite, est atteinte à saturation théorique de substrats,  $V_{\max} = \lim_{[S] \rightarrow \infty} v([S])$ . La constante catalytique  $k_{\text{cat}}$ , obtenue par la relation  $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E_T]$ , représente un taux catalytique (ou fréquence) par molécule d’enzyme. La constante de Michaelis  $K_M$  équivaut à la concentration de substrat lorsque  $v = \frac{1}{2}V_{\max}$ . De sa plus simple expression, il s’agit d’un rapport de constantes de vitesse autour du complexe  $ES$  :  $K_M = \frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1}$ , selon les vitesses de dissociation du complexe ( $k_{-1}$ ) et d’association ( $k_1$ ). L’on retrouve dans la littérature l’utilisation du rapport  $k_{\text{cat}}/K_M$ , synonyme d’efficacité catalytique, pour comparer l’impact de changements de substrats.

#### 1.7.1.2 Justification

Dans le présent projet, nous faisons appel à deux différents systèmes rapporteurs afin d’obtenir ces valeurs catalytiques pour la réaction globale, ainsi que les réactions directe et inverse menant à un intermédiaire réactionnel. Cette approche permet de mieux

cerner l'impact fonctionnel d'une mutation. En premier lieu, l'essai dit couplé permet la détection du clivage du FBP par l'oxydation de nicotinamide adénine dinucléotide (Richards et Rutter, 1961; Warburg et Christian, 1943). Suite au clivage du FBP par l'aldolase, la TIM convertit le G3P en DHAP qui est par la suite consommé par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) ainsi qu'une molécule de NADH. Le deuxième essai est la détection de la production de l'intermédiaire énediolate (carbanion) par la réduction de ferricyanure (Healy et Christen, 1973; Qamar et al., 1996). Cet essai est effectué en présence de FBP ou de DHAP, l'espèce énediolate étant produite soit suite au clivage du FBP, soit par la déprotonation en C3 du DHAP. L'on peut constater ainsi l'effet d'une mutation sur la catalyse de la rétro-aldolisation de la FBPA de classe II, ainsi que l'effet sur chacune des voies de formation de l'intermédiaire énediolate.

## **1.7.2 Radiocristallographie**

### **1.7.2.1 Cristallographie**

Le cristal est un assemblage ordonné et périodique d'une unité de base répétée. Tout cristal comporte ainsi une symétrie translationnelle de cette maille élémentaire. Les protéines, ou autres macromolécules biologiques, sont cristallisables *a priori* et le type d'analyse fait sur des cristaux de nature métallique, ionique ou de composés simples est transférable à ces immenses molécules.

Il ne faut pas considérer un cristal protéique comme un vulgaire solide immuable. Le pourcentage de solvant avoisine 50% et les protéines sont toutes aussi capables de subir des changements conformationnels, comme le mouvement de boucles ; les enzymes demeurent généralement actives sous cet état. La haute concentration en protéines n'est pas non plus sans rappeler l'environnement cytoplasmique (Ellis, 2001).

Dans ces conditions, il est possible d'effectuer le trempage de cristaux dans une solution contenant un composé d'intérêt qui se diffusera dans les cristaux. Des complexes aldolase-ligand sont ainsi obtenus. L'enzyme étant active, l'on peut s'attendre à une catalyse complète ou partielle du FBP, en fonction de la concentration du substrat,

du temps d'incubation et du type d'enzyme (un mutant par exemple). Il serait possible de piéger un intermédiaire réactionnel, par exemple la forme énediolate suite au trempe avec du DHAP. L'utilisation d'analogues de substrat nous renseigne sur le mode de liaison de l'enzyme. Dans notre cas, nous utilisons la réduction du cétohexose bisphosphate pour obtenir l'hexitol 1,6-bisphosphate (HBP). Cette réaction chimique ne permet pas le contrôle du nouveau centre stéréogénique depuis le groupe C2 carbonyle du FBP, résultant en un mélange de (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-D-mannitol 1,6-bisphosphate (MBP) et de (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-D-glucitol 1,6-bisphosphate (GBP) (Ginsburg et Mehler, 1966).

### 1.7.2.2 Diffraction aux rayons X

La diffraction est un phénomène physique qui peut être simplement ramené à la diffusion d'une onde incidente suite à sa rencontre avec un objet. L'on peut aussi définir la diffraction comme le résultat de ce phénomène, c'est-à-dire la sommation des ondes produites. Cette interférence sera dite destructive ou constructive selon la différence de phase entre ces ondes.

La diffraction de rayons X par un objet cristallin résulte majoritairement en une interférence destructive, due au grand nombre d'éléments diffractants. Par contre la symétrie de cette structure conduit à de l'interférence constructive lorsque des conditions précises sont obtenus, selon la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n\lambda. \quad (1.2)$$

Pour une longueur d'onde  $\lambda$  ainsi que pour chacun de ses multiples ( $n \in \mathbb{N}$ ), l'interférence constructive est obtenue par deux éléments séparés par une distance  $d$  uniquement pour un angle de réflexion  $\theta$  — l'angle de diffraction est de  $2\theta$ .

Autrement dit, le trajet supplémentaire d'une seconde onde diffractée doit évaluer la longueur d'onde, ou son multiple, afin que la différence de phase soit nulle. La résolution de la technique est aussi représentée par cette équation, alors que cette première peut se définir par la distance minimale entre deux éléments contribuant à une tache de

diffraction, le terme  $d$ . La longueur d'onde utilisée, de l'ordre de l'angström, permet une résolution atomique.

Le résultat direct d'une exposition est le patron de diffraction ; les taches — due à l'interférence constructive, voir la loi de Bragg — sont un échantillonnage discret de la maille réciproque, représentation de la maille élémentaire dans l'espace réciproque. Après l'assemblage de nombreux patrons et une transformation de Fourier, nous obtenons au final une densité électronique de la maille élémentaire.

### 1.7.2.3 Justification

La résolution atomique est notre motivation pour appliquer la radiocristallographie à cette étude mécanistique. Une limitation importante à la méthode est l'obtention de cristaux de protéines. Les macromolécules biologiques sont généralement difficiles à cristalliser, car elles comportent un nombre important de degrés de liberté et de minimums d'énergie. La formation d'un cristal requiert la présence d'une conformation unique ou, du moins, d'un seul ensemble de conformations similaires qui permettent l'assemblage cristallin. Une deuxième limite importante est de résoudre la structure, due au problème de phase (Rupp, 2009, Part IV).

Ces deux limites ont été surmontées par des travaux précédents, autant sur les aldolases que sur d'autres protéines présentant un repliement de tonneau  $(\beta\alpha)_8$ . Ce repliement stable explique la facilité de cristallisation, dont les conditions sont reproductibles et disponibles dans les études structurales citées jusqu'à présent. Le problème de phase est solutionné par remplacement moléculaire, alors que les structures de l'aldolase sujet ou d'homologues ont déjà été résolues.

Une alternative fréquente et complémentaire à la radiocristallographie est la RMN. Les résultats obtenus s'apparentent à des interactions et à des distances plutôt qu'à des positions atomiques. Ces contraintes sont utilisées pour calculer une structure tridimensionnelle. Toutefois, résoudre une structure RMN est un tâche difficile, voir impossible dans le cas d'une protéine de plus de 30 kDa formant des complexes multimériques, et chaque structure serait un nouveau défi. Tandis qu'en radiocristallographie, une fois les

problèmes en amont résolus, il est plus aisé d'obtenir de nombreuses structures et ainsi de tester plusieurs conditions et substrats.

### 1.7.3 Dynamique moléculaire

#### 1.7.3.1 Simulations *in silico*

Les simulations mécanistiques sont des modèles mathématiques résolvant des équations du domaine de la physique. La mécanique quantique est largement utilisée pour décrire le comportement d'électrons et d'atomes légers (comme l'hydrogène), en répondant à l'équation de Schrödinger. Heureusement pour nous, les noyaux d'atomes lourds se comportent classiquement. Cette approximation explique la plus simple utilisation d'une loi de Newton :  $F = m\ddot{r}$ . La force  $F$  exercée sur un atome est aussi décrite comme l'opposé du gradient de l'énergie potentielle,  $-\nabla U$ . Cette énergie potentielle est calculée sur un atome et ce calcul est réitéré sur tout le système, à l'aide d'un champ de force empirique, (1.3), qui est l'exemple du champ de force de CHARMM (Brooks et al., 2009; MacKerell et al., 1998). Ce champ de force est choisi car nous pouvons inclure une large gamme de molécules par l'intermédiaire du *CHARMM General Force Field* (CGenFF) (Vanommeslaeghe et al., 2009; Yu et al., 2012). De plus, les effets de polarisation et de transfert de charge peuvent être reproduits par l'ajout de particules de Drude au système (Lamoureux et al., 2003). Ainsi, un champ de force polarisable permettrait une description mieux adaptée aux cas particuliers d'interactions entre une protéine et un métal de transition.

$$\begin{aligned}
 U(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{liens}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{\text{UB}}(S - S_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{diédraux}} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{\text{impropres}} K_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{résidus}} U_{\text{CMAP}}(\phi, \psi) \\
 & + \sum_{\text{non liés}} \left\{ \epsilon_{ij}^{\text{min}} \left[ \left( \frac{R_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}} \right\} \quad (1.3)
 \end{aligned}$$

Ce calcul de force ne dépend que de la position et de la nature des atomes, selon

ces différents termes. La plupart de ceux-ci sont des oscillateurs harmoniques, ou du moins des approximations aux environs du minimum d'énergie. Notons aussi des termes Lennard-Jones et d'interaction électrostatique, pour imiter le profil énergétique interatomique — répulsion à courte distance et attraction à longue distance. Une structure expérimentale est utilisée comme conformation initiale, notre point de départ.

Les masses atomiques étant connues et conservées, ce calcul d'énergie potentielle résulte en l'accélération des particules, dérivée seconde de la position en fonction du temps  $\ddot{\mathbf{r}}(t)$ . La trajectoire — position des atomes en fonction du temps  $\mathbf{r}(t)$  — est l'objectif des calculs. Au lieu de procéder à l'intégration continue de la loi de Newton, la trajectoire est obtenue plus simplement par l'algorithme de Verlet avec vitesses (Allen et Tildesley, 1987; Verlet, 1967). En fournissant une vitesse initiale — dérivée première de la position  $\dot{\mathbf{r}}(t)$  —, l'on peut calculer la position après un pas  $\delta t$  (1.4), ainsi qu'une nouvelle vitesse (1.5).

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \dot{\mathbf{r}}(t)\delta t + \frac{1}{2}\ddot{\mathbf{r}}(t)\delta t^2 \quad (1.4)$$

$$\dot{\mathbf{r}}(t + \delta t) = \dot{\mathbf{r}}(t) + \frac{1}{2}[\ddot{\mathbf{r}}(t) + \ddot{\mathbf{r}}(t + \delta t)]\delta t \quad (1.5)$$

Cette méthode dite d'intégration numérique permet toutefois aux erreurs de calculs de se propager. Un premier facteur à contrôler est le pas de calcul, qui doit être assez court pour fournir un échantillonnage acceptable du phénomène ayant la plus haute fréquence : la vibration de liens interatomiques. La vibration des liens de type X–H est ignorée — ceux-ci sont gardés fixes — afin d'économiser dans le temps de calcul.

Le nombre important de calculs itératifs, ainsi qu'un nombre d'atomes pouvant aller dans les quelques centaines de milliers (majoritairement des molécules d'eau dans le cas de solvant explicite), causent la nécessité de recourir à des approximations, voir quelques exemples ci-haut. La plupart de ces approximations sont validées lors du développement du champ de force, comme c'est le cas de ses paramètres, qui sont déterminés afin de reproduire des mesures expérimentales ou de simulations *ab initio*.

### 1.7.3.2 Justification

Notre compréhension de la dynamique moléculaire par l'approche cristallographique se limite au facteur de température, ou facteur B. Ce facteur est interprété comme une fluctuation moyenne de la position d'un atome ou d'un groupe d'atomes, calculée par la diminution du pouvoir de diffraction. Cette notion de dynamique cristalline n'est donc utile que dans l'interprétation de la structure. Un facteur B élevé, qui est attribué à un atome ou à un groupe d'atomes mobiles, indique une incertitude relative de la position de ces atomes jusqu'au point où il ne soit plus possible de déterminer cette position ; ceci dû à un signal trop faible. Les simulations de dynamique moléculaire combleront cette lacune des structures statiques obtenues par radiocristallographie. Ces structures statiques représentent des étapes de la catalyse et les trajectoires obtenues de simulations permettent de faire des liens entre elles. L'on peut aussi considérer les simulations de dynamiques moléculaires comme des modèles de prédictions qui peuvent ensuite être validés avec des expériences *in vitro*.

## 1.8 Contribution des auteurs

Le corps du présent ouvrage, chapitre 2, a été réalisé par deux coauteurs ainsi que le directeur de recherche. Les trois auteurs ont contribué à la rédaction du manuscrit. Mathieu Coinçon a effectué des essais enzymatiques préliminaires, notamment sur l'enzyme de type sauvage et sur le mutant D82N. Il a produit le profil pH de l'enzyme sauvage et il a résolu une douzaine de structures, dont trois en voie de dépôt à la PDB. Benoit Jacques a effectué les essais enzymatiques, détection par oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide ou par réduction du ferricyanure. Il a résolu une quinzaine de structures, dont dix déposées à la PDB (5UCK, 5UCN, 5UCP, 5UCS, 5UCZ, 5UD0, 5UD1, 5UD2, 5UD3 et 5UD4).

## CHAPTER 2

### REACTION MECHANISM OF CLASS II FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE ALDOLASES: FROM LIGAND RECOGNITION TO SUBSTRATE CLEAVAGE

Benoit Jacques<sup>†</sup>, Mathieu Coinçon<sup>†</sup> and Jurgen Sygusch<sup>‡</sup>

From the Department of Biochemistry and Molecular Medecine,  
Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>‡</sup> To whom correspondence should be addressed.

(Not published)

## 2.1 Abstract

Crystal structures of two bacterial metal (Zn) dependent fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolases in complex with substrate, analogue and triose-P reaction products have been determined to 1.5–2.0 Å resolution. The complexes cryotrapped in *Helicobacter pylori* aldolase crystals showed substrate turnover in the crystalline state enabling a mechanistic description of C3–C4 bond cleavage. Substrate binding initiates active site conformational changes, triggered by P1-phosphate binding, which liberates the Zn chelating His180 of loop  $\beta 6$ – $\alpha 8$ , allowing it to act as a general base to initiate proton abstraction at the FBP C4-hydroxyl group. A second zinc chelating residue, His83, hydrogen bonds the substrate C4-hydroxyl group and assists substrate cleavage by stabilizing the developing negative charge during proton abstraction. Interaction of the ketone substrate with the amide of a conserved glycine polarizes the ketone enabling proton transfer. Substrate recognition does not require metal cofactor interaction with bound FBP. Selectivity for FBP is mechanistic as stabilization of the developing negative charge on the C4-hydroxyl group by the His83 side chain cannot be achieved for the tagatose-1,6-bisphosphate stereoisomer. Cleavage is concerted with metal cofactor relocation from an interior to a surface exposed site, stabilizing the nascent enediolate form and inhibiting aldol addition. Protonation of enediolate form is conducted by conserved Glu142 of loop  $\beta 5$ – $\alpha 7$ . Exchange between energetically equivalent sites by the metal cofactor modifies its coordination geometry, essential for product/substrate release. Recognition and discrimination of the triose-Ps, glyceraldehyde-3-P and dihydroxyacetone-P, implicate charged hydrogen bonds made between C2- and C3-hydroxyl groups of the triose-Ps and conserved Asp255 and Asp82 respectively in the *Helicobacter pylori* aldolase active site.

## 2.2 Abbreviations

DHAP, dihydroxyacetone-phosphate; FBP, D-fructose 1,6-bisphosphate; GBP, D-glucitol 1,6-bisphosphate; G3P, D-glyceraldehyde 3-phosphate; HBP, hexitol-1,6- bis-

phosphate; MBP, D-mannitol 1,6-bisphosphate; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; PGH, phosphoglycolohydroxamate; PGHPP, N-(3-hydroxypropyl)-glycolohydroxamic acid bisphosphate; TBP, D-tagatose 1,6-bisphosphate; TIM, triose-phosphate isomerase; RMSD, root mean square deviation.

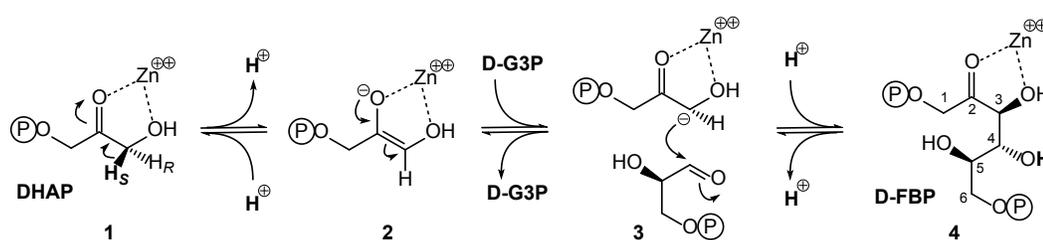
### 2.3 Introduction

Fructose-1,6-bisphosphate aldolases (Fba; E.C.4.1.2.13) are ubiquitous enzymes that catalyze the reversible transformation of D-fructose-1,6-bisphosphate (FBP) into dihydroxyacetone-P (DHAP) and D-glyceraldehyde-3-P (G3P), thus playing a major role during glycolysis, gluconeogenesis and Calvin cycle. A common feature of class II aldolases is that they use a transition metal ion to facilitate aldol/retroaldol reactions (1). These metalloenzymes are evolutionarily and mechanistically unrelated to class I aldolases which employ an active site lysine in Schiff base formation (2). Metalloaldolases are found predominantly in microorganisms including human pathogens such as, but not limited to, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pestis*, *Clostridium difficile*, *Candida albicans* and *Giardia lamblia*, as well as in plant pathogens, e.g. *Magnaporthe grisea*. The enzyme is essential for survival of *Escherichia coli* and *Streptomyces* species (3–6) as well as protozoa such as *Giardia lamblia* (7) making it a promising target for the development of novel antimicrobial drugs.

*Helicobacter pylori* is a human pathogen that colonizes the gastric mucosa, resulting in an acute inflammatory response and damage to epithelial cells and progressing to a number of disease states, including gastritis, peptic ulceration, and gastric cancer (8–13). In *Helicobacter pylori*, enzymes coding for either glycolytic pathway or pentose phosphate shunt are incomplete (14, 15), the Entner-Doudoroff pathway being the only major route of sugar catabolism (16). Glucose catabolism, resulting in intracellular acid production, would be a potential burden on pH maintenance in *Helicobacter pylori*, which has to survive an external pH of 2–3 (17). By contrast, gluconeogenesis, which converts lactate and pyruvate into sugars required for nucleic acid and peptidoglycan

biosynthesis, removes  $H^+$  from the cytoplasm, and is active in *Helicobacter pylori* (18) as enzymes of this pathway are fully present (14). The primary function of *Helicobacter pylori* aldolase is thus aldol reaction during gluconeogenesis.

The main steps of the reversible aldol reaction catalyzed by class II aldolases are depicted in Schema 2.1. Class II enzymes catalyze aldol reaction by use of  $Zn^{2+}$  or  $Co^{2+}$  to somehow polarize the DHAP carbonyl, shown in **1**, thereby facilitating stereospecific proton exchange at the  $\alpha$ -carbon, which produces the enediolate intermediate. The oxyanion form undergoes electronic redistribution, in **2**, followed by nucleophilic addition of *si* face carbanion form unto the *si* face of D-G3P, in **3**, ultimately producing D-FBP, in **4**. Step **3**→**4** could be disputed as passing by an alkoxide intermediate instead of a concerted electronic rearrangement and proton exchange.



Schema 2.1. Catalytic mechanism and reaction intermediates.

Aldolase from both classes adopt similar folding motif referred to as a  $(\beta\alpha)_8$ -barrel; even though the enzymes share no sequence similarity and residues composing the active sites are completely dissimilar (19). The active site is surface exposed in class II aldolases and is situated on the carboxylate end of the parallel  $\beta$  barrel (20). In class II aldolases,  $Zn^{2+}$  coordinates the imidazole groups of three histidine residues and undergoes a conformational transition upon ligand binding in the active site (21). The rotational isomerisation of histidine side chains allows the Zn ion to migrate  $\sim 4 \text{ \AA}$  from a buried binding site, where it interacts with an additional glutamate residue, to a surface exposed site bringing it within coordination distance of C2-carbonyl and C3-hydroxyl group of C1-phosphorylated ligands (7, 21, 22). The migration by the Zn ion is concomitant with conformational changes in two to three loop regions that decreases their

mobility and serves to stabilize attachment at the P1-phosphate binding locus (7, 21–23). One of which, loop  $\beta 6$ - $\alpha 8$ , contains histidine metal ligand His180, in *Helicobacter pylori* aldolase. The latter residue is displaced in the active site cavity to coordinate the divalent metal cation at the exposed site (21).

The conformational changes induced by ligand binding have stabilized aldolase complexes formed with substrate (22, 23), triose-P products and various competitive inhibitors (7, 21, 24). In the majority of crystal structures of the enzymatic complexes,  $Zn^{2+}$  was coordinated with reactants in the active site as indicated in Schema 2.1; however,  $Zn^{2+}$  coordinated invariably most strongly with the DHAP C3-hydroxyl group and to a lesser degree with the C2-carbonyl. In a catalytically incompetent complex,  $Zn^{2+}$  was unexpectedly tightly coordinated with C3- and C4-hydroxyl groups of FBP and not the C2-carbonyl and suggested a possible role by  $Zn^{2+}$  in substrate cleavage (23).

The  $Zn^{2+}$  metal ion readily accommodates different coordination geometries with ligands in enzyme active sites and makes mechanistic interpretation of the catalytic events based upon the structures of enzymatic complexes especially challenging. Zn ion is frequently tetrahedrally coordinated in catalytic sites, although it may readily adopt penta- or hexa-coordinate geometry (25). The coordination geometry depends on the type of ligand that is bound to  $Zn^{2+}$  and the solvent accessibility of the metal binding site (26). In the higher coordination geometry, oxygen dominates as the predominant ligand (27); however energy differences between corresponding four- to six-oxygen coordinated Zn ion complexes appear to differ by less than 0.4 kcal/mol (28). Such relatively low energy barriers to interconversion among Zn ion coordinated complexes could give rise to artefactual mechanistic plasticity in Zn coordination due to crystallization conditions used to trap enzymatic complexes.

Evidence for an essential catalytic role by  $Zn^{2+}$  in the aldolase reaction mechanism comes from  $^{13}C$  NMR study of *Escherichia coli* FBP aldolase showing Zn ion coordination promoted formation of the enediolate-2 intermediate from FBP (29). The intermediate formation was 50 % of maximum at pH 8.0, with maximum at pH 9.0, and represents an extraordinarily large shift in  $pK_a$  of the DHAP C3  $\alpha$ -carbon. Model com-

pounds indeed corroborated that  $\text{Zn}^{2+}$  stabilizes the enolate by shifting the  $\text{p}K_a$  of the C3  $\alpha$ -carbon by 10 units to  $\text{p}K_a \sim 8.4$  (30).

Site-directed mutagenesis of conserved residues has identified one of particular interest, Asp109 in *Escherichia coli* aldolase (31), and the equivalent Asp83 in *Giardia lamblia* (7), whose mutation reduced catalysis by several orders of magnitude. Biophysical characterization implicated interaction by the conserved active site aspartate residue (Asp82 in *Helicobacter pylori*) with the G3P carbonyl and suggested a catalytic role in aldol reaction step **3**→**4** (31). Support from structural studies however were inconclusive. In acid conditions, enzymatic complexes formed with FBP or with the triose-Ps in *Mycobacterium tuberculosis* class II aldolase did not indicate interaction by the FBP C4-hydroxyl group or the G3P C1 carbonyl with the conserved aspartate residue, Asp102 (22). An alanine mutant of the same conserved residue in *Giardia lamblia* in complex with FBP showed the importance of the residue to structural integrity (23). The non-isosteric mutation leads to a deeper pocket below the FBP C3-hydroxyl group that becomes filled with water and a Zn ion, the latter of which is arguably no longer in inner sphere coordination range of the three histidine residues ( $>3 \text{ \AA}$ ).

Biochemical characterization of an alanine mutant of conserved residue Glu182, situated on highly mobile loop  $\beta 5$ - $\alpha 7$  in *Escherichia coli* aldolase indicated a role by the residue in stereospecific proton exchange at the DHAP C3  $\alpha$ -carbon (32), reaction step **1**→**2** as depicted in Schema 2.1. However, such a role by Glu182 could not be immediately reconciled with structural data of an enzymatic complex formed with *Escherichia coli* aldolase by the potent DHAP analogue, phosphoglycolohydroxamate (PGH) (33, 34), where a salt bridge between Glu182 and dimeric partner Arg331 would position Glu182  $\sim 7 \text{ \AA}$  from the exchangeable proton. In a latter study with *Mycobacterium tuberculosis* aldolase using the same inhibitor PGH, the equivalent Glu169 was found to interact with the exchangeable proton via an intervening water molecule hydrogen bonding (35). As it is generally the case, loop  $\beta 5$ - $\alpha 7$  is not modelled in most aldolase structures due to weak density, further complicating the case of its conserved catalytic residue (Glu142 in *Helicobacter pylori* aldolase). Although the structural stud-

ies have revealed molecular detail of trapped enzymatic inhibition complexes they do not distinguish which structure, if any, of the enzymatic complexes represent an authentic intermediate in the reaction trajectory.

In this study, we focus on FBP and triose-Ps recognition and the elementary rate step in retroaldol/aldol reaction, namely C—C bond cleavage/formation catalyzed by class II aldolases. To elucidate the molecular details of the proton abstraction of the C4-hydroxyl group of FBP, we conducted a crystallographic study using *Helicobacter pylori* aldolase and flash cooled native and mutant aldolase crystals soaked in presence of saturating concentrations of FBP. The slow turnover of FBP in the crystallized enzyme enabled trapping of both triose-Ps and FBP in the active site as reaction intermediates. The structures revealed electron density corresponding to a conformationally driven relocation of  $\text{Zn}^{2+}$  ion between mutually exclusive states, whereby the Zn metal cofactor coordinated with DHAP or was sequestered in the active site interior. Recognition of competitive inhibitor, an alditol analog of FBP, did not require Zn coordination. Crystal structures obtained by flash cooling of *Escherichia coli* aldolase crystals soaked with obligate product DHAP or Zn depleted *Escherichia coli* aldolase with hexitol-1,6-bisphosphate (HBP), corroborated Zn independent ligand recognition. The structural analysis indicates a canonical reaction mechanism by which class II aldolases reversibly cleave a C—C bond to form an enediolate intermediate. On basis of structural and site mutagenesis studies, His180, which is a Zn chelating histidine residue, is proposed as the base responsible for proton abstraction at C4-hydroxyl group, thereby initiating C—C bond cleavage. This cleavage mechanism explains the inhibitory role of the (4S)-D-tagatose-1,6-bisphosphate (TBP) stereoisomer. We corroborate the catalytic role of conserved residue Glu142 (*Helicobacter pylori*) of loop  $\beta 5$ - $\alpha 7$  in enediolate protonation following cleavage. Throughout structural analysis of E142A along with E149A control mutant, we observe an apparent subunit cooperativity in class II aldolase.

## 2.4 Experimental procedures

### 2.4.1 Hexitol-bisphosphate preparation

HBP was prepared by  $\text{NaBH}_4$  reduction of FBP and assayed by organic phosphate analysis as previously described, with FBP depletion confirmed by enzymatic assays (36). This reaction produces a mixture of two diastereoisomers: (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-mannitol-1,6-bisphosphate (MBP) and (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-glucitol-1,6-bisphosphate (GBP).

### 2.4.2 Purification and crystallization of aldolases

Native *Helicobacter pylori* class II aldolase as well as variants Glu142Ala, Glu149Ala or His180Gln were purified and crystallized as previously reported (21), as was also the case for purification and crystallization of *Escherichia coli* class II aldolase (19).

### 2.4.3 Data collection and processing

Aldolase crystals were soaked in mother liquor buffer (12 % PEG 1000, 12 % PEG 8000, 0.1 M calcium acetate, and 50 mM Tris/AcOH pH 8) containing 10 mM of ligand. At this concentration, FBP and other bisphosphates begin to precipitate in mother liquor buffer. Hence, the actual concentration of soluble FBP in the mother liquor will be lower in the crystal soaks. Native aldolases were soaked for 10 min to 4 h with DHAP, while mutants were soaked for 4 h as shorter time did not yield high ligand occupancy. Wild-type and H180Q mutant *Helicobacter pylori* aldolases were soaked for 24 h in FBP, the solution remained saturated and crystals were stable. Both E142A and E149A variants of *Helicobacter pylori* aldolase were soaked for 1 h with FBP. In case of *Escherichia coli* aldolase crystals were soaked for 10 min with HBP and 10 mM EDTA was added to the mother liquor to chelate the  $\text{Zn}^{2+}$  metal ion. Prior to data collection, crystals were cryoprotected by transfer through a cryobuffer solution (soaking solution plus 10% glycerol) and immediately flash cooled in liquid nitrogen, or gaseous stream on site, at 100 K. Diffraction datasets were collected at beamlines X8C, X12B, X25 and X29A of the National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, USA), and

at beamlines 08B1-1 and 08ID-1 of the Canadian Light Source (Saskatoon, Canada). A fluorescence energy scan about the Zn  $K\alpha$  edge (1.2818 Å), collected at beamline X8C (NSLS), corroborated that the *Helicobacter pylori* aldolase crystals contained Zn, although no exogenous zinc was added during purification or crystallization of the protein. All data sets were processed with HKL2000 (37) and the results are summarized in Table 2.I. At least one dataset per aldolase variant was treated independently with anomalous scattering to further corroborate Zn presence through anomalous difference maps.

#### 2.4.4 Structure solution and refinement

Crystal structures of complexes formed by soaking DHAP, FBP or TBP into *Helicobacter pylori* aldolase crystals were solved with the PHENIX molecular replacement program (AutoMR) (38) using as reference the structures of either native aldolase, PGH bound to native aldolase or N-(3-hydroxypropyl)-glycolohydroxamic acid bis-phosphate (PGHPP) structure bound to native aldolase, PDB entry codes 3C4U, 3C52, and 3C56, respectively (21). The best solution was used as starting point for refinement. Each structure was completed by iterative rounds of refinement using the `phenix.refine` module (39, 40) and model building in Coot (41). All structures reported belong either to triclinic space group P1 or the monoclinic space group P2<sub>1</sub> and contain one aldolase homodimer in the asymmetric unit, consistent with the biologically active form of the enzyme. Molprobtity server (42) and the Coot validating tools were used to optimize the structures during the refinement. D82N mutant structures were solved using one subunit of DHAP bound model as they crystallized in C2 space group and contain only one subunit per asymmetric unit. The orientation of Asn82 carboxamide was chosen in the electron density map to allow the carboxamide oxygen to hydrogen bond with its backbone amide as was observed in all native structures. The alternate orientation would result in an unfavourable close contact with the both its backbone amide and a Na ion bound in the  $\beta$ -barrel interior. Crystal structures of *Escherichia coli* aldolase were determined and refined by same strategies using the *Escherichia coli* aldolase structure in

complex with PGH, PDB 1B57 (24), as molecular replacement template. Loops  $\beta 5-\alpha 7$ ,  $\beta 6-\alpha 8$  and  $\alpha 9-\alpha 10$  of aldolase structures were often associated with regions of weak electron density, leading to some parts left unmodelled.

Ligand modelling was based on interpretation of electron density shapes from  $2F_o-F_c$  and  $F_o-F_c$  simulated annealing omit maps. Binding by phosphorylated ligands were readily discernable initially by density at phosphate binding loci. Additional controls included B-factor concordance of equivalent atoms in different subunits, real space fit (RSR) or phenix ligandFit (43, 44) and were used to discriminate between different ligands and their conformations. Occupancy of active site ligands was assessed on basis of B-factor agreement with adjacent active site residues.

Final model statistics, calculated with PHENIX, Molprobity and SFCHECK (45), are shown in Table 2.I. The coordinates and structure factors of *Helicobacter pylori* aldolases and *Escherichia coli* aldolases have yet to be deposited within the Protein Data Bank (46). Ramachandran plot analysis with Molprobity placed at least 97 % of non glycine and non proline residues of the 14 structures in the most favourable region and with the remainder found in allowed regions, attesting to good model geometry. Few residues identified as outliers per said analysis were visually inspected and confirmed with respect to electron density.

#### 2.4.5 Comparisons

Structure alignment was performed with the program PyMOL (47). Root mean square deviations (RMSD) are reported based on superposition of equivalent C $\alpha$  atoms between appropriate subunits. Complete chain structure alignment was done between identical enzymes, while alignment between homologues implicated refinement cycles to ignore pairs with high variability due to sequence alignment mismatch. The enediolate plane was calculated by singular value decomposition of DHAP C2, O2, C3 and O3 atom positions (minimization of atom-plane distances) and Zn ion distance from the resulting plane was measured (48).

### 2.4.6 Enzyme kinetics

Enzymatic activity of FBP cleavage was monitored by spectrophotometry using a coupled assay which follows NADH oxidation at 340 nm (49, 50). Enediolate production was assessed by measuring hexacyanoferrate (III) reduction monitored by the decrease in absorbance at 420 nm (51, 52). Kinetic assays were done at 25 ° in buffer (pH 7.4) of TrisH (50 mM) and potassium acetate (100 mM). The initial rate of reaction was concentration dependent and followed saturation kinetics for both cleavage assay and enediolate oxidation. The kinetic constants were determined from initial rate velocity measurements using GraFit 5.0 Data Analysing Software (53).

### 2.4.7 pH profile assay

The following buffers (50 mM) were used to assay maximal velocities at the indicated pH values: PIPES (pH 6.0–7.5), TrisH (pH 7.75–8.75) and CHES (pH 9.0–9.75). The pH data obtained at 25 ° was fitted to the following equation by non-linear regression in GraFit 5.0 to extract  $pK_a$  of titratable groups.

## 2.5 Results

### 2.5.1 Native *H. pylori* aldolase structure.

Briefly, *Helicobacter pylori* FBP aldolase exhibited an  $(\beta\alpha)_8$ -TIM barrel fold similar to the polypeptide fold described previously (21), and an average RMSD among subunits of 0.61 Å. The secondary structure elements were assigned using DSSP (54, 55) and consisted of twelve  $\alpha$ -helices and eight  $\beta$ -strands. The native enzyme has an homodimer in the asymmetric unit cell, where each subunit displays identical tertiary structure (RMSD 0.19 Å). Size exclusion chromatography corroborated the dimeric quaternary structure of *Helicobacter pylori* aldolase, which elutes at relative molecular weight of 70 kDa. The dimer appears symmetric, possible rotation axis at the interface in higher space groups, with helices  $\alpha_{11}$  and  $\alpha_{12}$  contacting center of the  $\beta$ -barrel of the neighbouring subunit, and helices  $\alpha_4$ ,  $\alpha_{11}$  and  $\alpha_{12}$  of one subunit contacting their respective counterpart. The

catalytic zinc ion is located in a shallow pocket at the center of  $\beta$ -barrel C-terminal end, hereby called site I or buried site, and is coordinated by residues His83 (N $\epsilon$ ), His180 (N $\epsilon$ ), His210 (N $\delta$ ), Glu134 (bidentate) and a water molecule. This coordination is reinforced by the interaction of His83 (N $\delta$ ) with Asp 82 and His210 (N $\epsilon$ ) with Glu132. Additionally, His210 and Glu134 interact with a monovalent cation (Na<sup>+</sup>) as do Gln47, Met102, Lys251 and Asn253. Weak electron density was associated with parts of loops  $\beta$ 6- $\alpha$ 8 and  $\alpha$ 9- $\alpha$ 10 (residues 178–192 and 227–237 respectively), indicating conformational flexibility. No electron density was visible for most of loop  $\beta$ 5- $\alpha$ 7 (residues 136–156).

### 2.5.2 DHAP-bound structures

The P1-phosphate binding locus in *Helicobacter pylori* aldolase, portrayed in figure 2.1A, comprises backbone interactions with amides of Gly181, Ser213, Asp255, Thr256 and side chain interactions with Lys184, Ser213 and Thr256 in which each phosphate oxygen participates in at least two hydrogen bonds. The DHAP molecule is further positioned by hydrogen bonds between Gly211 and its C2-carbonyl oxygen and a bidentate hydrogen bond between its C3-hydroxyl group and Asp82 carboxylate. A spine of three water molecules outlines the solvent exposed side of DHAP where they interact with one another through hydrogen bonding. The line of water molecules is anchored by hydrogen bonds to the phosphate oxyanion and Asp82, while the central water molecule interacts with Asp255.

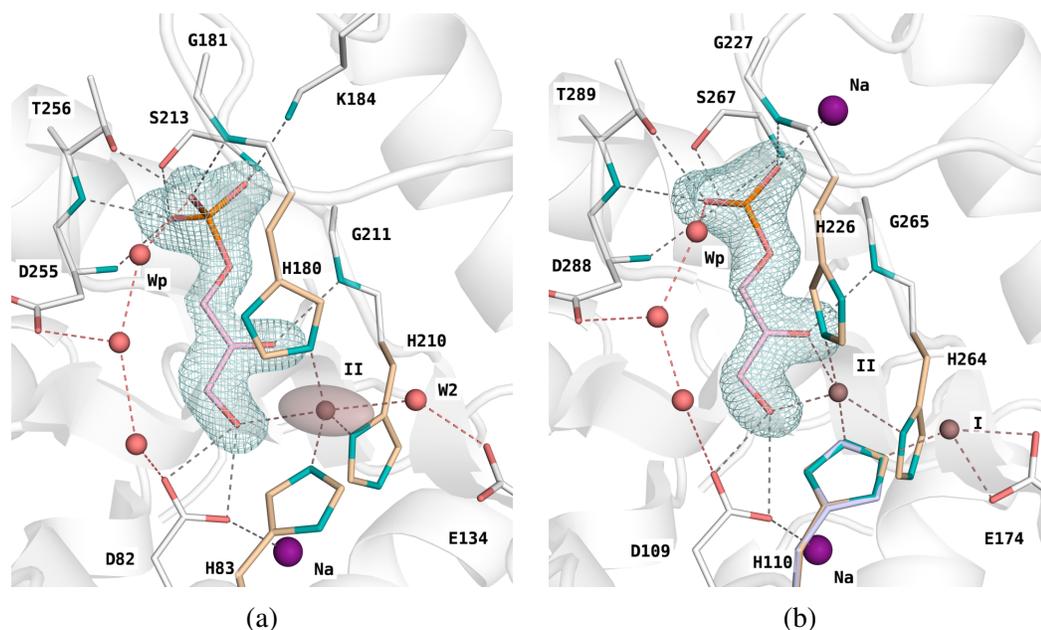


Figure 2.1 – Electron density of trapped dihydroxyacetone-P intermediates in the active site of Class II aldolases. Panels show A- dihydroxyacetone-P bound in the active site of *Helicobacter pylori* aldolase and B- dihydroxyacetone-P bound in active site of *Escherichia coli* aldolase. Electron density encompassing dihydroxyacetone-P was calculated from a kicked  $F_o - F_c$  omit map and contoured at  $3.0 \sigma$ . In panel A, the divalent zinc ion is depicted as a transparent ellipsoid and represents the probability displacement calculated from the anisotropic B-factor of the zinc metal ion in *Helicobacter pylori* aldolase. In panel B, the Zn ion is shown as two brown spheres for two mutually exclusive sites I and II in *Escherichia coli* aldolase with respective occupancies of 0.35 and 0.65 (equal occupancies in other subunit and two corresponding conformations of His264 observed); Zn ion at either site is coordinated by rotating His110. Water molecules are shown as red spheres and sodium cation in purple. Water molecule denoted by Wp interacts with phosphate group at site P1, while W2 denotes a water molecule liganded by zinc ion in site II. View is looking into the  $\beta$ -barrel from the carboxyl side of the  $\beta$ -strands.

Table 2.I – Data collection and refinement statistics.

Enzyme	EcA	EcA	HpA	HpA	HpA	HpA-E142A	HpA-E142A
Ligand	DHAP	GBP	—	DHAP	DHAP+G3P	DHAP	FBP/DHAP+G3P
Wavelength (Å)	1.0809	0.99	1.1	1.0809	1.075	0.97949	0.97949
Resolution range (Å)	39.87–1.70 (1.77–1.70) <sup>†</sup>	29.01–1.65 (1.72–1.65)	45.16–1.66 (1.72–1.66)	39.48–1.85 (1.96–1.85)	45.19–1.78 (1.85–1.78)	45.0–1.67 (1.73–1.67)	29.21–1.44 (1.50–1.44)
Space group	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P1	P2 <sub>1</sub>	P1	P1	P1
Unit cell	57.1 71.4 88.2 108.9	57.2 71.9 89.0 108.4	39.2 62.8 63.73 81.2 75.5 74.7	39.5 88 90.8 100.4	39.4 62.8 64.8 82.2 76.0 74.4	39.3 62.6 64.5 82.2 75.9 74.2	39.5 64.6 62.8 82.1 74.4 75.8
Unique reflections / Multiplicity	72711 / 3.5 (6944 / 3.0)	81553 / 5.7 (9156 / 2.4)	54195 / 1.7 (1377 / 1.3)	49870 / 2.6 (6572 / 2.4)	51940 / 1.9 (4523 / 1.6)	58107 / 2.4 (2620 / 1.3)	95440 / 2.1 (6864 / 1.7)
Completeness (%)	99.0 (95.0)	98.3 (89.1)	76.03 (20.56)	91.9 (89.4)	85.29 (60.81)	86.8 (39.1)	82.23 (48.32)
Mean I/σ(I)	19 (1.7)	28.2 (2.3)	6.36 (1.06)	16.5 (3.3)	9.02 (1.26)	6.9 (0.69)	7.41 (0.98)
R-sym <sup>‡</sup>	0.08 (0.60)	0.09 (0.40)	0.065 (0.43)	0.06 (0.21)	0.057 (0.45)	0.099 (0.91)	0.067 (0.85)
Reflections used in refinement / free	68483 / 5130 (4931 / 398)	78274 / 7507 (4839 / 419)	50927 / 2005 (1372 / 44)	47842 / 4983 (3512 / 391)	47109 / 2285 (3360 / 168)	52189 / 2678 (1923 / 97)	85327 / 4030 (5014 / 225)
R-cryst <sup>§</sup> (%)	14.7	15.4	19.9	15.0	19.1	17.3	16.1
R-free <sup>¶</sup> (%)	17.2	18.3	24.3	19.7	23.3	21.1	19.6
# Atoms							
Protein	5307	5279	4377	4520	4558	4552	4629
Ligand	28	42	6	26	66	66	58
Solvent	1744	1083	393	1043	381	351	532
Bonds RMS							
Length (Å)	0.007	0.007	0.006	0.007	0.004	0.006	0.009
Angle (°)	1.23	1.05	0.72	1.08	0.71	0.734	1.01
Ramachandran							
Favored (%)	98.1	97.8	98.73	98.4	98.08	97.74	98.61
Allowed (%)	100	99.7	100	100	100	100	99.82
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	14.4	15.8	28.21	14.5	31.48	28.31	25.47

<sup>†</sup> Values for high resolution shell

<sup>‡</sup> R-sym =  $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \bar{I}_i(hkl)| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$

<sup>§</sup> R-cryst =  $\sum_{hkl} (|I_o(hkl)| - |I_c(hkl)|) / \sum_{hkl} |I_o(hkl)|$

<sup>¶</sup> R-free: as in R-cryst but with test data set (not used in refinement).

Table 2.I – Data collection and refinement statistics (continued).

Enzyme	HpA-E149A	HpA-E149A	HpA-E149A	HpA-H180Q	HpA-H180Q	HpA-H180Q	HpA-H180Q
Ligand	—	DHAP	DHAP+G3P	—	DHAP	FBP	TBP
Wavelength (Å)	0.97949	0.97949	1.03322	1.03322	0.97949	1.1	1.1
Resolution range (Å)	29.94–1.41 (1.46–1.41) <sup>†</sup>	28.84–1.78 (1.84–1.78)	29.88–1.65 (1.71–1.65)	28.61–1.80 (1.86–1.80)	35.78–1.78 (1.84–1.78)	35.79–1.44 (1.49–1.44)	41.75–1.50 (1.55–1.50)
Space group	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P 1	P 1	P 1	P 1
Unit cell	39.1 82.8 91.1 99.6	39.5 86.1 91.2 100.3	39.3 85.4 91.1 100.2	39.3 64.2 62.5 81.4 74.1 75.9	39.4 63.1 64.8 82.5 76.0 74.4	39.5 64.9 62.7 82.1 74.2 75.8	39.4 62.6 64.8 82.0 75.7 74.2
Unique reflections /Multiplicity	108617 / 3.8 (9765 / 3.1)	54638 / 3.3 (4069 / 2.2)	68950 / 3.1 (6064 / 2.6)	49683 / 1.8 (4199 / 1.6)	50414 / 2.1 (3307 / 1.8)	97445 / 1.8 (8152 / 1.5)	83963 / 1.8 (5772 / 1.4)
Completeness (%)	89.42 (65.90)	87.33 (54.74)	90.22 (67.39)	84.30 (59.70)	83.39 (47.91)	88.71 (66.67)	86.23 (53.16)
Mean I/σ(I)	8.98 (0.90)	10.86 (1.16)	8.44 (1.12)	7.70 (0.92)	7.83 (1.44)	8.93 (1.89)	7.07 (1.46)
R-sym <sup>‡</sup>	0.078 (1.02)	0.085 (0.99)	0.085 (0.68)	0.069 (0.62)	0.079 (0.40)	0.052 (0.23)	0.076 (0.32)
Reflections used in refinement / free	98670 / 4976 (7232 / 370)	50202 / 2301 (3120 / 150)	64399 / 3274 (4810 / 241)	44717 / 2253 (3145 / 148)	46848 / 2313 (2669 / 141)	93002 / 3820 (6979 / 292)	79525 / 3834 (4889 / 260)
R-cryst <sup>§</sup> (%)	16.3	18.4	17.8	21.0	19.3	13.4	13.3
R-free <sup>¶</sup> (%)	18.7	22.8	22.3	25.5	21.6	16.4	17.7
# Atoms							
Protein	4558	4510	4429	4298	4598	4678	4654
Ligand	5	46	36	4	26	46	46
Solvent	579	320	459	270	396	727	787
Bonds RMS							
Length (Å)	0.007	0.003	0.008	0.01	0.004	0.007	0.009
Angle (°)	0.88	0.62	0.92	1.06	0.6	0.96	0.99
Ramachandran							
Favored (%)	98.08	98.25	97.87	98.16	97.74	98.44	98.62
Allowed (%)	99.82	100	99.47	99.63	100	100	100
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	26.29	39.27	28.84	25.91	22.98	22.14	17.18

<sup>†</sup> Values for high resolution shell<sup>‡</sup> R-sym =  $\frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \bar{I}_i(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ <sup>§</sup> R-cryst =  $\frac{\sum_{hkl} (|I_o(hkl)| - |I_c(hkl)|)}{\sum_{hkl} |I_o(hkl)|}$ <sup>¶</sup> R-free: as in R-cryst but with test data set (not used in refinement).

The notable difference when comparing ligand binding in both DHAP-bound structures is the interaction of the P1-phosphate which, in *Helicobacter pylori* aldolase, implicates Lys184 and is replaced by monovalent Na ion in *Escherichia coli* aldolase, triggering the closure of the loop  $\beta 6$ - $\alpha 8$  and/or stabilizing it once closed upon phosphate oxyanion binding (figure 2.1B). This variation in ligand binding mechanism is not unheard of. P1-phosphate binding locus in *Giardia lamblia* class II aldolase implicates Lys182 (23), whereas an ion, Na<sup>+</sup>, is involved in the structures of *Thermus aquaticus* class II aldolase (56) and *Mycobacterium tuberculosis* class II aldolase (22).

A continuous anisotropic electron density in DHAP-bound *Helicobacter pylori* aldolase was interpreted as the Zn<sup>2+</sup> metal ion binding site, represented by an ellipsoid in figure 2.1A. The interpretation of the elongated electron density corresponding to Zn<sup>2+</sup> binding site was corroborated by a difference electron density map calculated based on the anomalous Zn signal and whose electron density showed the same elongated form thereby corroborating our interpretation and justified anisotropic refinement of the Zn ion position at site II, or exposed site. Residual continuous density not coincident with but extending beyond the Zn binding site was interpreted as a tightly bound water molecule, W2, on the basis of the associated B-factor at full occupancy. The associated water molecule is well positioned to coordinate the Zn metal ion at site II. No evidence for Zn binding at the site I was found in electron density difference maps. The Zn ion chelating histidine residues His83 and His210 could be satisfactorily positioned with respect to the Zn ion independently of whether the site II Zn ion position refinement was conducted as a single anisotropic position or in terms of two overlapping isotropic positions. As opposed to other Zn ligands, electron density for the side chain of the chelating histidine residue 180 was weak at best, independently of the mode of Zn ion refinement, and could not be reconciled with an optimal Zn bonding geometry. Superposition of the DHAP-bound *Helicobacter pylori* aldolase structure with structures of DHAP-bound *Escherichia coli* aldolase structure therein, DHAP-bound *Mycobacterium tuberculosis* aldolase and TBP-bound *Giardia lamblia* aldolase (RMSD 0.98 Å, 0.94 Å and 0.58 Å, respectively) coincides with Zn ion located at site II (22, 23).

Different from *Helicobacter pylori* aldolase, the Zn ion cofactor in *Escherichia coli* aldolase was refined using an isotropic B-factor occupying two distinct yet partially populated sites (even though DHAP binding site is fully occupied) and corresponding to site II in *Helicobacter pylori* aldolase and site I which is the buried site of the native enzyme. Zn ion occupancies at site I and II are respectively of 0.35 and 0.65 in one subunit, and 0.50 for both in the other subunit. The absence of direct interaction by DHAP with the Zn ion at site I suggests that it is not required for DHAP binding.

At site II, the  $\text{Zn}^{2+}$  metal cofactor in both *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* aldolase interacted with DHAP contacting the C2-carbonyl group ( $2.68 \pm 0.23 \text{ \AA}^a$ ) and coordinating the C3-hydroxyl group ( $2.35 \pm 0.11 \text{ \AA}^a$ ), similar to that reported for *Mycobacterium tuberculosis* aldolase in complex with DHAP (22). This finding is consistent with FT infrared spectroscopy on class II aldolase from yeast and *Escherichia coli* that indicated no polarization of the C2-carbonyl group by the intrinsic zinc ion from the enzyme (31, 57). Proton exchange at DHAP C3 would not be aided by polarization of carbonyl, but rather stabilizing interactions. Coplanarity of DHAP C1, C2, O2, C3 and O3 atoms, a requisite structural feature in the enediolate form, lends support to identification of the intermediate as the enediolate and would suggest binding by DHAP as the enediolate intermediate when the Zn metal ion occupies site II. The metal cofactor at site II is however significantly out of plane of the putative enediolate and in apparent contradiction to the expected coplanarity by the Zn ion in the enediolate, as observed for a more obvious enediolate plane (58). Hydrogen bonding interaction by the DHAP carbonyl with the conserved Gly211 amide in *Helicobacter pylori* aldolase (Gly265 in *Escherichia coli* aldolase) of  $2.83 \pm 0.09 \text{ \AA}^b$  (figure 2.1) afford stabilization of the enediolate and preclude the necessity of inner shell coordination with the Zn ion to polarize the DHAP carbonyl and hence obviate coplanarity by the Zn ion with the enediolate plane. Both structures corroborate the identification of DHAP binding mode by *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* aldolase as consistent with but not limited to a *cis*-enediolate high-energy intermediate, as bond lengths and angles measurements of DHAP does not give a definitive answer on its nature. The position of Zn ion at site II

could correlate with enediolate identification by stabilizing the intermediate, as the ion at site I indicates it is unneeded for ligand binding (DHAP substrate identification at the active site) and perhaps critical proton exchange.

### 2.5.3 Substrate turnover in the crystalline state

Soaking of FBP into *Helicobacter pylori* aldolase crystals generated electron density maps supporting the notion of an active enzyme conformer in the crystal lattice. The interpretation of the electron density corresponding to substrate cleavage was based on a reduction in the electron density joining FBP C3 and C4 atoms. In figure 2.2A is shown the resultant electron density difference omit map, in native *Helicobacter pylori* aldolase, interpreted as trapped triose-Ps following a day long incubation using saturated concentrations of FBP. Occupancies of DHAP and G3P were refined and validated, in terms of B-factor similarity with contacting residues, to respective values of 0.7 and 0.6. Trapping solely triose-Ps following cleavage in sufficient population for structural analysis proved to be a challenging task as the thermodynamic equilibrium strongly favors FBP as the dominant form (59, 60). The relatively slow diffusion of FBP into the crystal lattice however generated transient pre-equilibrium conditions where the initial low FBP concentrations in the crystal lattice favored triose-P products generation over FBP formation that enabled the trapping of triose-Ps as dominant forms in the crystal lattice. Additionally, any precipitation of FBP in mother liquor during crystal soaks would further ensure conditions for trapping triose-Ps.

G3P was bound as free aldehyde in the active site although G3P exists preponderantly in solution as the hydrated gem-diol form (61). Interpretation as the gem-diol form was not consistent with the electron density shown in figure 2.2A. A notable feature is the aldehyde C2-hydroxyl group which makes a critical hydrogen bond with Asp255. An equivalent binding mode by DHAP would result in charged repulsion between the DHAP ketone carbonyl and Asp255 and indicates a role by Asp255, a conserved active site residue, in discriminating triose-P binding.

The relative disposition in the active site of the refined triose-P positions was consis-

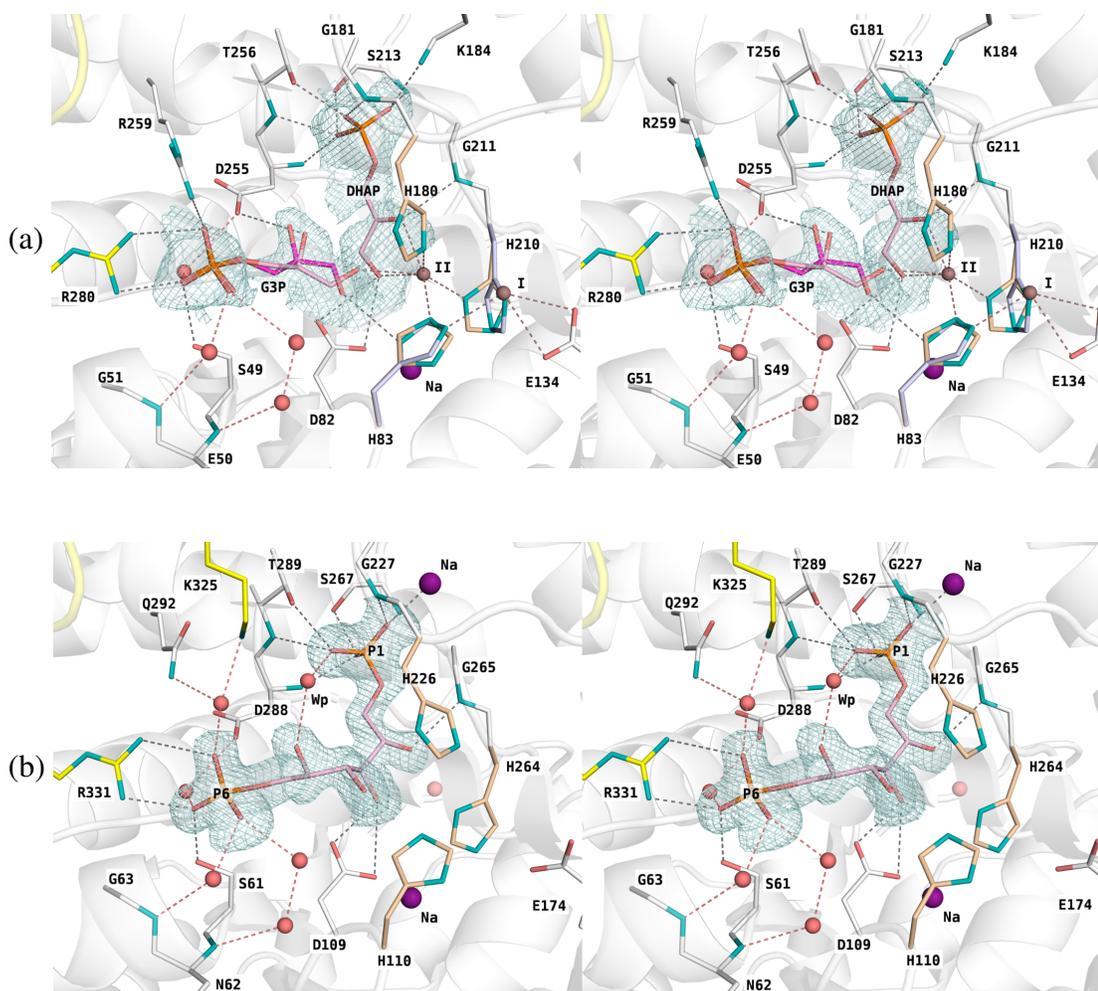


Figure 2.2 – Electron density of hexose-bisphosphate and trioses-Ps trapped in the active sites of Class II aldolases. Panels show stereo-images of A- dihydroxyacetone-P and glyceraldehyde-3-P trapped in active site of *Helicobacter pylori* aldolase (with mutually exclusive *cis* and *trans* G3P in light and dark pink, respectively) and B- glucitol-1,6-bisphosphate trapped in active site of *Escherichia coli* aldolase. Electron density enclosing ligands was calculated from simulated annealing  $F_o - F_c$  omit map and contoured at  $2.5 \sigma$  for glucitol-1,6-bisphosphate and at  $1.5 \sigma$  for triose-Ps. Water molecules are shown as red spheres and sodium cation in purple. Zinc anion is labelled both at site I or II. Electron densities were drawn to take into account the partial occupancies. View is looking into the  $\beta$ -barrel from the carboxyl side of the  $\beta$ -strands.

tent with the *si* face of the D-G3P aldehyde being subjected to a nucleophilic attack by the *si* face of enediolate yielding the expected (3*S*,4*R*) FBP diastereoisomer. Formation of this diastereoisomer requires that the G3P C1-carbonyl be in a *trans* configuration with respect to its C2-hydroxyl group which can be stabilized through the C1-carbonyl interacting with His83 N $\delta$ , as shown in figure 2.2A. This interaction is consistent with the position of the Zn ion at buried site I in order to maintain its coordination with the His83 via its N $\epsilon$  atom. As seen in figure 2.2A, the additional density around G3P C1-carbonyl loci affords interpretation of a second conformation consistent with the D-G3P aldehyde aligned *re* face with respect to DHAP, in a *cis* configuration. In this configuration, G3P carbonyl interacts weakly with the Zn ion at site II (ranging from 2.7 to 3.4 Å). This latter population could have inhibitory purposes by forestalling the reverse reaction, thereby ensuring release of the triose-P. By FTIR method, a significant frequency shift at 1706 cm<sup>-1</sup> was observed for the G3P carbonyl in the yeast and *Escherichia coli* holoenzymes, implying significant polarization of the G3P carbonyl by the intrinsic metal cofactor (31, 57). This frequency shift however was observed with G3P bound to the free holoenzyme which could allow unrestricted approach by the Zn ion to tightly coordinate the G3P carbonyl. Displacement by the metal cofactor to such a site was observed in a catalytically incompetent enzymatic complex of *Giardia lamblia* aldolase (23).

#### 2.5.4 Hexitol bisphosphate

To test whether Zn ion is requisite for ligand binding, crystals of *Escherichia coli* apoaldolase were soaked with HBP, namely a mix of non-cleavable analogs GBP and MBP. Structure determination corroborated the absence of Zn ion in the active site and showed preferential binding by GBP with the displacement of the Zn<sup>2+</sup> chelating residue His226 equivalent to His180 in *Helicobacter pylori* aldolase, and is shown in figure 2.2B. *Escherichia coli* aldolase is a class IIa aldolase as is yeast aldolase (62) which has a 6.5-fold preference for GBP over MBP (K<sub>i</sub> 60 μM and 400 μM, respectively) (63). Superposition of the HBP-soaked structure from *Escherichia coli* apoenzyme either with structures of the *Escherichia coli* holoenzyme-DHAP complex therein (RMSD 0.27 Å),

the *Giardia lamblia* holoenzyme-TBP complex (RMSD 1.3 Å) or the *Mycobacterium tuberculosis* holoenzyme complexes with triose-Ps (DHAP/G3P) and FBP (0.82 Å and 0.81 Å, respectively), shows same binding loci for phosphate oxyanions and hydroxyl groups in the active site, whereas these previous holoenzymes structures present an interaction between ligand and metal cofactor (22, 23). Competent active site binding therefore does not depend on the presence of the metal cofactor.

### 2.5.5 Kinetics of native and mutant aldolases

The Michaelis-Menten steady state parameters,  $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{M}}$ , were determined at various pH for native *Helicobacter pylori* aldolase. The pH activity profile was best described by a bell-shaped curve, shown in figure 2.3, with calculated  $\text{p}K_{\text{a}1}$  and  $\text{p}K_{\text{a}2}$  of 6.91 and 9.60, respectively. The  $\text{p}K_{\text{a}}$  for the acidic limb could relate to a histidine residue implicated in general acid-base catalysis.

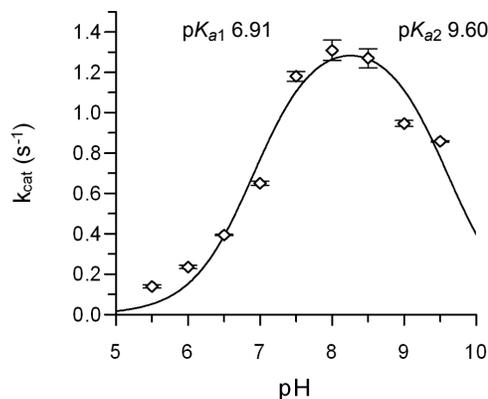


Figure 2.3 – pH activity profiles for native *Helicobacter pylori* aldolase. Panel shows the pH profile for native enzyme.

To assess the contribution by His180 to catalytic activity, the residue was mutated to a glutamine residue in order to retain steric proportions while being unable to participate in proton transfer at physiological pH. In addition, Glu142 and Glu149 in *Helicobacter pylori* aldolase were independently mutated to alanine, as was previously done for Glu181 and Glu182 in *Escherichia coli* aldolase, to better portray a catalytic role attributed to conserved residue (Glu142/Glu182) as opposed to non conserved residue (Glu149/Glu181) of the same loop (32). Michaelis-Menten steady state kinetics were

used to analyze initial rate velocities of the variants and their  $k_{\text{cat}}$  and  $K_M$  values are shown in Table 2.II. We observed a significant loss in activity for the H180Q variant and the E142A variant. The largest reduction observed is the formation of enediolate intermediate from DHAP by the E142A variant.

To verify the presence of enediolate as a reaction intermediate in both native *Helicobacter pylori* aldolase and variants, enediolate oxidation was analyzed in terms of hexacyanoferrate (III) reduction using Michaelis-Menten kinetics and  $k_{\text{cat}}$  are shown in Table 2.II. The enediolate oxidation from FBP cleavage was lowest for the H180Q mutant, indicating the H180Q mutation exerts an inhibitory effect at the cleavage step with the rate limiting step being the proton exchange at the FBP C4 hydroxyl group. The concomitant reduction in enediolate formation from DHAP compared to the native enzyme suggests that the variant also perturbs enediolate formation. In the E142A variant, the rate step for enediolate formation is greatly affected compared to native enzyme as is the cleavage rate step compared to native enzyme. The hundredfold reduction in enediolate formation from DHAP is consistent with this variant impacting enediolate turnover in the active site, as noted previously (32). The twofold reduction in enediolate oxidation at the cleavage step compared to native enzyme is consistent with efficient G3P dissociation (necessary step prior to enediolate oxidation) however it might indicate that the variant impacts the cleavage step albeit to a lesser extent.

The D82N variant of *Helicobacter pylori* aldolase, used to support our hypothesis of a catalytic His180 instead of Asp82, was subjected to kinetic assay of FBP cleavage and to structure determination following soaking with substrates. This residue had been previously implicated for its role in proton abstraction of the C4-hydroxyl group (31). No activity was detected for the isosteric D82N variant even though an hundredfold greater quantity of enzyme was used compared to the native enzyme as well as saturating levels of FBP to assess catalytic activity for this mutant. Thus, the D82N could not be characterized kinetically, although we can estimate at least 300 000-fold reduction in activity. Structure determination of this variant revealed it be isostructural with the native enzyme (RMSD 0.51 Å) and with no loss of either Zn metal cofactor or Na<sup>+</sup>

Table 2.II – Steady state kinetic parameters for native and mutant *Helicobacter pylori* aldolases derived from initial rate velocities of substrate cleavage and enediolate oxidation.

<i>Reaction</i>	<i>Cleavage</i>		<i>Enediolate oxidation</i>			
	FBP→DHAP+G3P		FBP→ENE		DHAP→ENE	
<i>Enzyme</i>	$k_{\text{cat}}^{\dagger}$	$K_{\text{M}}^{\ddagger}$	$k_{\text{cat}}^{\dagger}$	$K_{\text{M}}^{\ddagger}$	$k_{\text{cat}}^{\dagger}$	$K_{\text{M}}^{\ddagger}$
<i>Native</i>	710±20	64±5	384±3	20±1	750±40	300±50
<i>H180Q</i>	10.8±0.3	120±20	16.0±0.6	100±20	22.9±0.8	30±5
<i>E142A</i>	72.4±0.7	19.6±0.9	167±3	13±2	6.2±0.6	280±70
<i>E149A</i>	660±10	134±8	nd	nd	nd	nd
<i>D82N</i>	< 0.02	nd	nd	nd	nd	nd

ENE refers to enediolate species.

$\dagger$   $k_{\text{cat}}$  in  $(10^3 \text{ s})^{-1}$

$\ddagger$   $K_{\text{M}}$  in  $\mu\text{M}$

nd: not determined.

ion (data not shown). We were not able to capture any ligand in the active site, with all structures obtained showing that same conformation as the free enzyme. The only significant difference of this variant being an apparent loss of hydrogen bond between mutated residue and Asn23. That distance between Asp82 and Asn23, formerly around 3 Å, would be around 4 Å for Asn82. The resultant Asn82 rotamer conformation is then thought to induce steric clash involving its carboxamide moiety with DHAP and FBP C3-hydroxyl groups, thereby precluding competent active site binding. The lack of activity would relate to the structural impact of the mutation, rather than its involvement in catalysis.

### 2.5.6 DHAP-bound mutant structures

Structures of variants H180Q, E142A and E149A bound with DHAP showed an identical polypeptide fold as the DHAP-bound native aldolase (RMSD of 0.32 Å, 0.34 Å and 0.22 Å, respectively). DHAP bound in respective active sites is shown in figure 2.4. In those structures, the Zn ion occupies mutually exclusive positions at sites I and II.

We observed a reduced occupancy by DHAP in the active site of the E142A and E149A variants compared to the native enzyme under identical soaking conditions (0.6 for both variants). The populations of the Zn ion at site II matched that of the DHAP occupancies of E142A and E149A aldolase structures. The Zn ion at site I in structures of variants E142A, E149A and H180Q was part of a larger coordination sphere, including water molecules in addition to residues His83, Glu134 and His210. Increase in coordination bond length can be attributed to the loss of the metal chelating residue His180, unavailable as part of a closed loop and simply absent from variant H180Q. A similar coordination was observed in our free native *Helicobacter pylori* aldolase structure with a fully occupied Zn ion at site I. In that case, residue His180 could not be modelled, due to a weak density associated with residues 178–192 of loop  $\beta 6$ - $\alpha 8$  (data not shown). This loosened coordination could be necessary for the transition to site II.

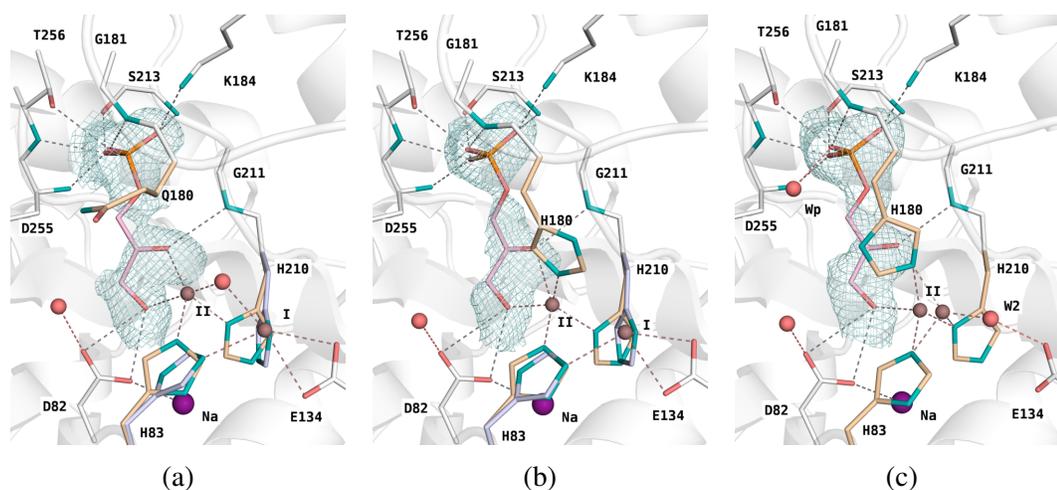


Figure 2.4 – Electron density of dihydroxyacetone-P trapped in the active site of *Helicobacter pylori* class II aldolase variants. Panels show dihydroxyacetone-P bound in active site of mutants A- H180Q, B- E142A and C- E149A. Electron density encompassing dihydroxyacetone-P was calculated from simulated annealing  $F_o - F_c$  omit maps and contoured respectively at 1.5, 1.8 and 2.0  $\sigma$ . Electron density levels were chosen to take into account the refined or estimated populations of the active site species. View is looking into the  $\beta$ -barrel from the carboxyl side of the  $\beta$ -strands.

### 2.5.7 Hexose binding in class II aldolase

H180Q aldolase crystals were soaked in FBP or TBP solutions under identical conditions which resulted in cleavage in native aldolase. A simulated annealing difference omit map shows unambiguous density corresponding to fully bound ligands in both subunits, as shown in figure 2.5. In case of the FBP-bound variant in figure 2.5A, substrate interactions made with the enzyme are identical, as was the polypeptide fold, when compared to HBP-soaked native *Escherichia coli* aldolase structures mentioned previously (RMSD 1.00 Å). Importantly, bound FBP afforded a clear delineation of the numerous active site interactions important in recognizing the cognate substrate.

Binding of mono- or bisphosphate ligands is dictated through interaction with the phosphate groups, while interactions with hydroxyl groups and carbonyl groups serve to discriminate ligands. Conserved interactions independent of triose-Ps or FBP binding are: Gly211 backbone amide hydrogen bonding with DHAP/FBP C2-carbonyl, Asp82 hydrogen bonding with DHAP/FBP C3-hydroxyl group and Asp255 with G3P/FBP C2/5-hydroxyl groups. The remaining interaction involving the G3P C1-carbonyl differs from that of the FBP C4-hydroxyl group. The latter hydroxyl group interacts with His83 (coordinating  $Zn^{2+}$  at site I). The metal cofactor is not observed at site II in presence of FBP. On the other hand, G3P adopting *cis* or *trans* configurations can interact either with His83 (*trans*) in the same manner as FBP or with the  $Zn^{2+}$  at site II (*cis*) (figure 2.2A).

No Zn ion was present in the FBP H180Q variant at site II, even though in case of DHAP, site II was occupied. Rather, the Zn ion in addition to binding at the buried site I also occupied an intermediate third site (site III), whilst globally remaining at full occupancy. At site III, the Zn ion no longer has His210 in the first coordination sphere and is coordinated by His83, Glu134 and putative water molecules, adopting an octahedral geometry about the Zn ion. The ensemble of structures clearly illustrates the plasticity of the active site in readily accommodating different spheres of coordination by the same Zn ion at different overlapping loci.

Binding by TBP ligand in the H180Q structure is shown in figure 2.5B. The intrinsic

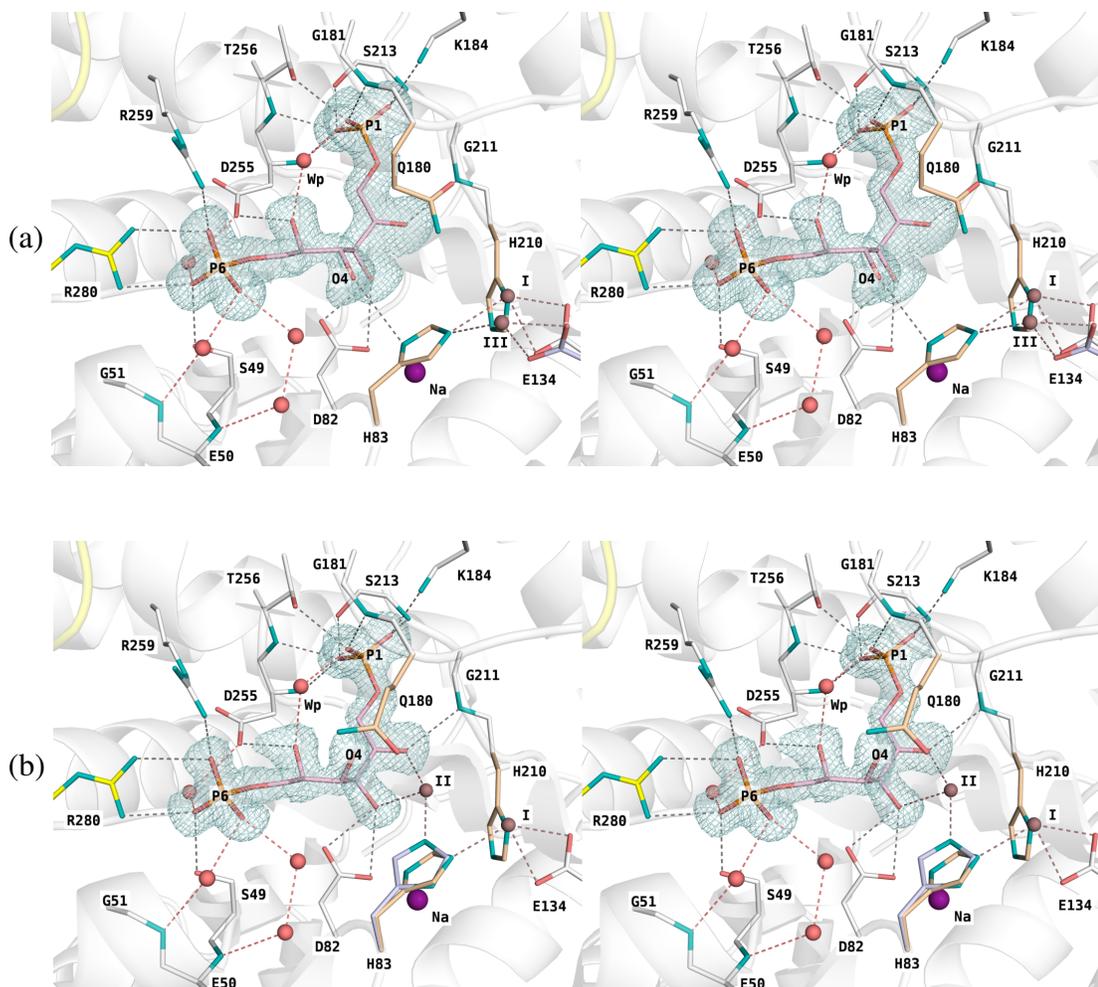


Figure 2.5 – Electron densities of substrate FBP and inhibitor TBP trapped in the active site of *Helicobacter pylori* aldolase variant H180Q. Panels show stereo-images of A- fructose-1,6-bisphosphate and B- tagatose-1,6-bisphosphate trapped in active site of H180Q mutant of *Helicobacter pylori* aldolase. Electron density enclosing ligands was calculated from simulated annealing  $F_o - F_c$  omit map and contoured at  $3.0\sigma$ . Water molecules are shown as red spheres and sodium cation in purple. Zinc anion is labelled both at site I or III. Site III shows the zinc anion octahedrally coordinated by H83, D104, E134 and 3 water molecules. View is looking into the  $\beta$ -barrel from the carboxyl side of the  $\beta$ -strands.

Zn ion occupied sites I and II, with respective refined occupancies of 0.7 and 0.2. Ligand interactions and enzyme fold remain identical with FBP-soaked H180Q variant structure (RMSD 0.13 Å). This TBP-bound structure is also identical to the TBP-bound *Giardia lamblia* native aldolase structure (RMSD 0.66 Å) (23). Both FBP and TBP diastereoisomers show the same active site binding interactions, to a single exception. In case of bound TBP, the (*S*)-C4-hydroxyl group is not implicated directly in any enzyme-ligand interactions, whereas the (*R*)-C4-hydroxyl group of FBP makes an hydrogen bond with His83, not possible in the TBP diastereoisomer.

### 2.5.8 Open and closed conformation

Upon active site ligand binding, loop  $\beta 6\text{-}\alpha 8$  (178-192) in *Helicobacter pylori* aldolase undergoes significant conformational rearrangement, shown in figure 2.6. The loop closure would afford active site access by loop  $\beta 5\text{-}\alpha 7$  (residues 136-156), containing the mutations E142A and E149A, as loop  $\beta 6\text{-}\alpha 8$  open conformation is thought to prevent access. The loop  $\beta 6\text{-}\alpha 8$  closure correlates with P1-oxyanion binding in the active site. In the complexes formed between *Helicobacter pylori* aldolase and active site ligands, Lys184 in loop  $\beta 6\text{-}\alpha 8$  assists Ser213 and Thr256 and backbone amides of Gly181, Ser213 and Thr256 to grasp the P1-phosphate and stabilize the loop in a closed conformation (figure 2.5). For other aldolases such as *Thermus aquaticus* aldolase (56), *Mycobacterium tuberculosis* aldolase (22) and *Escherichia coli* aldolase (24), a monocation replaces Lys184 for its role in loop stabilization upon P1-oxyanion binding. These movements are correlated with the relocation of the catalytic  $\text{Zn}^{2+}$  ion from its buried site I to the surface exposed site II. Although not visible in the electron density map, the loop  $\beta 5\text{-}\alpha 7$  contains Glu182 responsible for the proton exchange with the enediolate in *Escherichia coli* aldolase (32).

### 2.5.9 Subunit cooperativity

Triose-P products were bound as the dominant population in only one subunit of the aldolase homodimer for E149A crystals soaked with FBP. RMSD of the individual

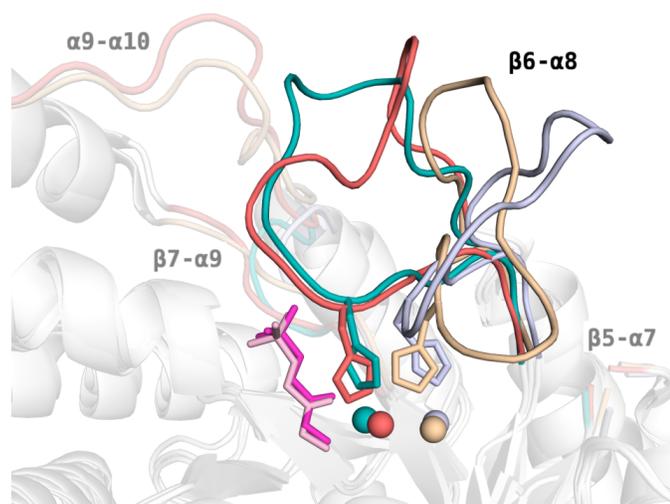


Figure 2.6 – Conformational changes induced upon DHAP binding in class II aldolases. Superpositions of *Helicobacter pylori* aldolase (HpA) and *Escherichia coli* aldolase (EcA). Coloring is as follows: HpA free (beige) or bound (orange) to DHAP (light pink); EcA free (blue) or bound (green) to DHAP (dark pink). Zinc atoms are represented as spheres, with free structures showing site I Zn ion and bound structures showing site II Zn ion. HpA and EcA share loops  $\beta 5-\alpha 7$  (residues 136-156 and 176-198, respectively),  $\beta 6-\alpha 8$  (residues 178-192 and 224-238) and  $\beta 7-\alpha 9$  (residues 211-216 and 265-270). Class IIb HpA has another loop displaced concomitantly by loop  $\beta 6-\alpha 8$ , namely loop  $\alpha 9-\alpha 10$  (residues 227- 237). Suggested catalytic residue, His180 for HpA and His226 for EcA, is part of loop  $\beta 6-\alpha 8$ , while reported catalytic residue, Glu142 for HpA and Glu182 for EcA, is part of unobserved loop  $\beta 5-\alpha 7$ .

bound and unbound subunits with the free variant yielded values of 1.75 Å and 0.25 Å, respectively. These differences were amplified when comparing only loop  $\beta 6-\alpha 8$  (178-192) and corresponding to values of 3.39 Å and 0.17 Å, respectively for bound and unbound subunits, indicating conformation change upon product binding and apparent negative cooperativity in the *Helicobacter pylori* homodimer. Furthermore, the conformational changes in the bound subunit mimicked those found in subunits of the bound native structure (RMSD 0.29 Å), while subunit of the unbound variant resembled that of the native free enzyme (RMSD 0.37 Å). The variant exhibited normal Michaelis-Menten kinetics similar to the native enzyme over the entire concentration range of substrate except for a twofold greater  $K_M$  value (Table 2.II).

These results are in apparent contradiction to those obtained when soaking substrate

in the native *Helicobacter pylori* aldolase crystals, which resulted in a similar predominant triose-P population but in both subunits. Even though both native and E149A variant crystallize with essentially identical space groups and unit cell dimensions in Table 2.I, slight differences in crystal packing cannot be ruled out in the variant, especially given that the position of the variant mutation corresponds to loop  $\beta 5-\alpha 7$  which is not discernible in the crystal structure. Crystallization may have imposed dissimilar conformational fluctuations on mobile loop  $\beta 5-\alpha 7$  in the variant, given that the dimeric subunits do not sample the same conformational space in the crystal lattice and thus leading to binding in a single subunit. The extreme apparent negative binding cooperativity would suggest that the conformational changes by loop  $\beta 6-\alpha 8$  (178-192), promoted by active site binding, entail conformational fluctuations in loop  $\beta 5-\alpha 7$  that are not accessible in both subunits of the variant thereby abrogating active site binding in one subunit.

Ligands and metal cofactor occupancy refinement of E149A variant structure indicates full occupancy in the single subunit while the other subunit being devoid of reaction intermediates. Ligands bound were readily interpreted as triose-P products and formed the predominant population with occupancy  $> 0.6$ , shown in figure 2.7, while FBP and/or water molecules may form the minor populations. The interactions by the triose-P products with the active site recapitulated those observed in the native enzyme, shown in figure 2.2A. The Zn ion is only observed at site II, consistent with substrate cleavage. Density encompassing DHAP is well defined (occupancy 0.87), although somewhat weaker density surrounds the G3P aldehyde, it was nevertheless interpreted as the aldehyde bound in both *cis* and *trans* configuration in figure 2.7 (respective occupancies of 0.25 and 0.36). Both DHAP and G3P are stabilized in the active site through interactions with active site residues identical to the native structure binding DHAP and G3P, including the two aldehyde configurations.

### 2.5.10 Zinc relocation

In structures of *Helicobacter pylori* aldolase in complex with DHAP and both triose-P cleavage products, the  $\text{Zn}^{2+}$  cofactor adopted two distinct binding sites, I and II.

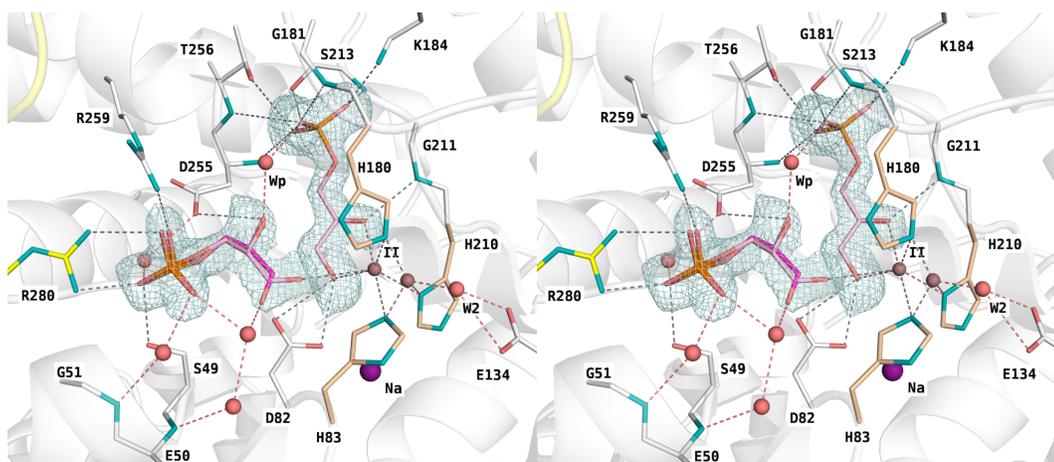


Figure 2.7 – Electron density of products trapped in the active site of *Helicobacter pylori* aldolase variant E149A. Panels show stereoisomers of dihydroxyacetone-P and glyceraldehyde-3-P trapped in active site of E149A *Helicobacter pylori* mutant aldolase. Electron density enclosing ligands was calculated from simulated annealing  $F_o - F_c$  omit map and contoured at  $2.0 \sigma$ . Water molecules are shown as red spheres and sodium cation in purple. Zinc anion is labelled at site I or II. View is looking into the  $\beta$ -barrel from the carboxyl side of the  $\beta$ -strands.

Metal cofactor coordination at these two sites engages the same three chelating histidine residues but necessitates rotations of His83 and His210 imidazole moiety and a translational displacement of His180.

At the buried site I, the Zn ion is further coordinated by Glu134 completing a tetrahedral coordination geometry that can become penta-coordinated with a water molecule as the fifth ligand, as observed previously (21). At the surface exposed site II, the coordination is completed by atoms from the ligands thereby stabilizing this conformation. Invariably, the metal cofactor interacts strongest with C3-hydroxyl group and to a lesser degree with C2-carbonyl of the ketose-phosphate ligand.

As the natural substrates react with the enzyme to produce intermediate species, such as an enediolate form, Zn ion at site II adopts a range of conformations delimited by an elongated electron density. At the center location of the elongated site II, the penta-coordinated metal cofactor is additionally coordinated by a well-defined water molecule (W2) hydrogen bonded to Glu134, as seen for DHAP-bound *Helicobacter pylori* al-

dolase (figure 2.1A). This position reflects a single site anisotropic refinement of Zn ion. The center of site II can also be described as an average of two extremities of this elongated density: at the exterior site II, the Zn ion approaches the ligand and readily adopts tetrahedral geometry; alternatively, position at interior site II denotes a shift away from the ligand as the tetrahedral geometry is instead completed by W2, as the ligand is too far to be considered in the first sphere of coordination. Exterior site II position is observed on multiple accounts, mostly in the case of inhibitory compounds which efficiently chelate the divalent ion, but also with natural substrates as in the aldolase-DHAP complex of *Escherichia coli* (figure 2.1B). Site II depicted in terms of two positions is shown in the FBP-soaked E149A aldolase structure (figure 2.7).

### 2.5.11 His180/His226 side chain

His180 of *Helicobacter pylori*, or His226 of *Escherichia coli*, is situated at the juncture of the mobile  $\beta 6$ - $\alpha 8$  loop and undergoes the largest displacement of all the metal chelating residues upon ligand binding, see figure 2.6. Simulated-annealing omit map encompassing all three chelating histidine residues and metal cofactor showed no or weak density for the His180 side chain in ligand-bound structures, even though the electron density map allowed unambiguous tracing of its peptide backbone. We can relate these cases of weak His180 density (weak interaction with Zn ion) with ongoing Zn ion transition (observed at both sites), as in DHAP-bound *Escherichia coli* aldolase (figure 2.1B) and FBP-soaked *Helicobacter pylori* aldolase (figure 2.2A). Clear electron density delineating the His180 side chain was only observed in the crystal structures for tight binding competitive inhibitors, PGHPP and PGH, in *Helicobacter pylori* aldolase (21), where the metal cofactor interacted only with coordinating residues at site II. The structural data indicates that the Zn ion cofactor undergoes exchange between two metal cofactor coordination sites and requires His180 to weaken its interaction with the metal cofactor during the exchange process.

## 2.6 Discussion

The ability to cryotrap reaction intermediates in the crystalline state provided a unique opportunity to delineate the essential mechanistic features associated with proton transfers during substrate turnover and concomitant triose-P discrimination. Kinetics analysis of *Helicobacter pylori* aldolase variants identified residues His180 and Glu142 as possible involved in two crucial proton exchange steps. Residue His180 is responsible for FBP C4 hydroxyl proton abstraction, requisite step prior to cleavage as shown by the mutant H180Q reduced enediolate formation rate from FBP and greatly reduced retroaldol reaction rate. Residue Glu142 mutation (E142A) had a lesser effect on retroaldol reaction (not as limiting as the first proton exchange) but a very prominent one on enediolate formation from DHAP, thus implicated in enediolate proton exchange step. Residue Asp82 role would arguably be of a structural nature, making kinetics analysis not as clear. Mutant D82N range of effect on retroaldol reaction is unknown, but qualitatively important, as a rate of catalysis was too low to be calculated in the extent of our experiment. Preliminary structural data of D82N variant lead us to suggest a possible effect on substrate binding. These results reflected *Escherichia coli* aldolase mutant D109A 3000-fold decrease in retroaldol reaction rate and a reportedly unmeasurable rate of enediolate formation from FBP (31). Structure of mutant D83A (*Giardia lamblia*) showed the impact of the mutation on FBP binding (23).

The reduced turnover in variants enabled cryotrapping of enzymatic complexes on the aldol/retroaldol reaction coordinate. Substrate/triose-Ps recognition and cleavage could be associated with structures of enzymatic intermediates that afforded detailed insight into the catalytic cycle of class II aldolases at the molecular level. The concurrent conformational changes associated with substrate turnover revealed how dynamics may be harnessed to perform enzyme catalysis in class II aldolases.

Our structural analysis examined catalysis in two bacterial aldolases each belonging to a distinct subfamily of class II FBP aldolase in eubacteria (62). Members of each subfamily are observed to exhibit 40 % sequence similarity, with 25 %–30 % se-

quence similarity among all class II FBP aldolases. However, active site residues interacting with active site ligands are conserved and suggest that the same catalytic mechanism of reversible aldol addition is exploited by all class II FBP aldolases. Aside from backbone interaction and those made through water molecules, we have at binding locus P1 Ser213/267 and Thr256/289, and at locus P6 the phosphate group interacts with Arg280/331 and Ser49/61. Notable are the residues interacting with carbonyl and hydroxyl groups for substrate fine positioning, as FBP for example: C2 carbonyl interacts with backbone Gly211/265, C3 hydroxyl group with Asp82/109, C5 hydroxyl group with Asp255/288. Catalytic target C4 hydroxyl group is shown to interact with His83/110 when the Zn ion is present at site I (figure 2.5A). For *Helicobacter pylori* aldolase, residues His180 and Glu142 are respectively responsible for FBP cleavage (**4**→**3**) and for protonation of DHAP enediolate form (**2**→**1**). The possibility however of Glu142 activating His180 thereby increasing its  $pK_a$  and rendering proton transfer more efficient at the C4-hydroxyl group and in the enediolate cannot be excluded. These proton transfers steps are thoroughly regulated through conformational changes and  $Zn^{2+}$  cofactor displacement.

### 2.6.1 Substrate/product recognition

Recognition and discrimination of the triose-P substrates is critical in *Helicobacter pylori* aldolase whose primary function is D-FBP synthesis by aldolization of D-G3P and DHAP during gluconeogenesis. Each triose-P, although chemically different, are structurally similar. As opposed to triose-phosphate isomerase activity, aldol reaction in aldolase requires each triose-P to interact with a different binding locus. Indiscriminate attachment by DHAP and G3P at either triose-P binding locus is precluded in the active site of *Helicobacter pylori* aldolase. The enzymatic mechanism capable of explicitly recognizing and discriminating G3P and DHAP makes use of differences at the level of donor/acceptor hydrogen bonds by respective carbonyl and hydroxyl group oxygen of the triose-P molecules. The carboxylate moiety of conserved active site residue Asp82 makes a charged hydrogen bond with the DHAP C3-hydroxyl group, shown in

figure 2.1, discriminating against aldehyde triose-P binding as the equivalent G3P C1-carbonyl interaction would be repulsive at physiological pH. Furthermore, keto moieties are considered stronger hydrogen bond acceptors than hydroxyl groups, thus binding by DHAP C2-carbonyl with backbone amide Gly211 would provide an additional level of discrimination. The binding locus corresponding to the cognate aldehyde, G3P, specifically discriminates against DHAP through the charged hydrogen bond made by Asp255 with the G3P C2-hydroxyl group, shown in figure 2.2A and figure 2.7, as the equivalent DHAP C2-carbonyl interaction would be repulsive.

Substrate recognition does not appear to be mediated by interaction with the Zn metal cofactor. The DHAP-bound *Escherichia coli* aldolase structure showed that even though the ligand is present at full occupancy in the active site, the Zn ion can reach half occupancy at site I, undermining its role in ligand binding (figure 2.1B). An FBP analog, GBP, was found to bind in the active site of the apoenzyme (depleted of Zn ion), implicating the same interactions with active site residues as made with a natural substrate (figure 2.2B). Nuclear relaxation studies using paramagnetic metal cofactors with acetol-P in class II yeast aldolase yielded a binding geometry where the metal cofactor did not interact with ligand (64). The [2-<sup>13</sup>C] enriched acetol-P exhibited only a <sup>13</sup>C resonance corresponding to carbonyl interaction that would exclude direct ligand binding with Zn ion at site II. The location of the metal cofactor at site I in presence of the ligand would be consistent with this interpretation.

FBP soaking into *Helicobacter pylori* aldolase crystals resulted in trapping of triose-Ps, DHAP and G3P, indicating the crystallization of a catalytically active conformer. The aldol/retroaldol reaction catalyzed by the class II FBP aldolase is stereospecific, preferentially forming FBP over the TBP diastereoisomer (65, 66). Although stabilizing the enediolate form, metal cofactor interacts weakly at best with the G3P aldehyde in the *cis* configuration, as seen in figure 2.2A and figure 2.7, making it unlikely to polarize the G3P carbonyl sufficiently for efficient protonation of the carbonyl oxygen, and thereby disfavoring TBP formation. G3P release from the active site does not entail enzyme conformational changes (such as movement of loops), as structures following DHAP

binding and FBP/triose-P binding are essentially identical (RMSD 0.3 Å), enabling G3P release to precede DHAP dissociation in agreement with the obligate binding sequence in catalytically competent class II aldolases (67). The presence of the metal cofactor at site II would also enable G3P release in the *cis* configuration as the coordinating His83 N $\delta$  cannot interact with the G3P carbonyl for this His rotamer. Only when the Zn ion is relocated to site I with conserved Zn coordinating His83 ring rotated 180° does His83 N $\delta$  face the carbonyl enabling interaction with G3P and trapping it in the *trans* configuration. Nucleophilic attack of DHAP carbanion would happen on G3P in the *trans* configuration in order to produce FBP. Based on our structural data, *Helicobacter pylori* aldolase is expected to bind exclusively the ketone form of FBP. Anomerase activity was probed in class II aldolases, however the experimental outcomes yielded conflicting interpretations (29, 68–70) as to whether class II aldolases possess such activity.

The trapping of DHAP delineated the active site residues that are responsible for stabilization of the triose-P in the active site. Binding involves recognition of DHAP in carbonyl form as binding by the gem-diol form of DHAP was not observed and is consistent with NMR analysis of DHAP binding in *Escherichia coli* aldolase showing primarily or exclusive binding by the carbonyl form (29). Upon attachment the P1-oxyanion triggers a cascade of conformational changes, including loop  $\beta$ 6- $\alpha$ 8, to grasp the active ligand. The structural characterization identified Asp82 (*Helicobacter pylori*) as the residue that guides the DHAP molecules by its interaction with the C3-hydroxyl group into the active site. The C3-hydroxyl group is coordinated by the Zn metal ion while its C2-carbonyl engages in a close contact. These two groups could be engaged in a bidentate coordination, as observed with a tight binding inhibitor (24). The closest the natural substrate DHAP can be seen from the Zn ion is in DHAP-bound *Mycobacterium tuberculosis* aldolase structure obtained in acidic condition where the distances are 2.12 Å (C3) and 2.20 Å (C2) — the author actually identifies the ligand as the enediolate intermediate (22). Interaction with C2-carbonyl is generally weaker than Zn interaction with C3-hydroxyl; when the Zn ion becomes penta-coordinated, as in DHAP-bound *Helicobacter pylori* aldolase (figure 2.1A), we can see that interaction

with C2-carbonyl further weakens. Although the  $^{13}\text{C}$  NMR data clearly showed a significant shift by  $[2-^{13}\text{C}]$  DHAP carbonyl upon Zn ion coordination, it could not distinguish whether interaction by the metal cofactor with the DHAP carbonyl was direct or indirect. Our structural data clarifies this interpretation and indicates a direct interaction by Zn ion coordination with the C3-hydroxyl group that is transmitted via intervening bonds to the C2-carbonyl. The supplementary interaction of the DHAP C2-carbonyl with the backbone amide of Gly211 would further polarize the keto moiety in leading to electronic rearrangement and enediolate formation. Support for the enediolate intermediate as an active site species also comes from the enediolate oxidation by hexacyanoferrate (III) reduction of DHAP, shown in Table 2.II. Furthermore, the crystallized enzyme is catalytically competent supporting enediolate formation by virtue of the direct interaction of DHAP with the Zn ion.

Additionally, the low pKa  $\sim 8.0$  determined for the enediolate intermediate formation in *Escherichia coli* aldolase by NMR analysis (29) and in model compounds (30) should enable trapping of DHAP in enediolate form under crystallization conditions. As planarity of O2-C2-C3-O3 is not an exclusive feature of the enediolate (71), distinction between DHAP and its enediolate form must be done based on ligand interaction with its surrounding. For the structures reported therein, the enediolate form could be present whenever the intrinsic Zn ion occupies exterior site II, where it interacts closely with the DHAP C3-hydroxyl group. As the Zn ion at site II shows elongated density in the *Helicobacter pylori* aldolase structure, seen in figure 2.1A, both DHAP and enediolate species are suspected; the extent of enediolate form cannot however be unequivocally determined within the limit of crystallographic data at hand.

## 2.6.2 Conformational transitions prior to cleavage

In *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* aldolase, ligand attachment at the P1-phosphate binding site remodels the active site (figure 2.6). The conformational process is the ordering of loop  $\beta 6-\alpha 8$  (residues 178–192 of *Helicobacter pylori* aldolase and residues 224–238 in *Escherichia coli* aldolase) that stabilizes the P1-phosphate oxyan-

ion. His180 in *Helicobacter pylori* aldolase and equivalent His226 in *Escherichia coli* aldolase, located at the inception of this loop, also undergo a conformational displacement. This movement corresponds to a translation by respective C $\alpha$  atoms of  $\sim 5 \text{ \AA}$  and  $4 \text{ \AA}$ , disrupting their ability to chelate the metal cofactor at site I.

Furthermore, upon FBP binding, Zn ion displacement does not coincide with loop  $\beta 6\text{-}\alpha 8$  (and His180) movement. Prior to cleavage, FBP C4-hydroxyl group interaction with His83 N $\delta$  prevents rotation of the Zn ion coordinating residue, keeping the metal cofactor at buried site I. This is corroborated by the variant H180Q, where active site binding by FBP does not entail Zn ion relocation to site II, rather the Zn ion remains buried, as can be seen in figure 2.5A.

### 2.6.3 Reversible substrate cleavage

A reaction mechanism by which to promote cleavage of the C–C bond in class II FBP aldolases that integrates enzymology and structure data is shown in figure 2.8. Our data point to an unconventional role by a Zn ion chelating histidine as the catalytic residue responsible for FBP C3–C4 bond cleavage.

A catalytic role has not been attributed to date to His180. In absence of His180, Zn ion relocation at sites I and II still takes place with a water molecule replacing His180 in the first coordination sphere, as seen in DHAP-bound H180Q aldolase structure (figure 2.4A). His180 is thus neither required for Zn ion relocation nor for ligand binding. The refinement data indicates that His180 has high side chain flexibility, of which the conserved glycine containing motif H<sub>180</sub>G<sub>181</sub> in class II aldolases may help to promote. Importantly, mutation of this otherwise unimportant histidine residue considerably diminishes the enzyme activity, specifically towards the FBP cleavage step. The FBP-bound structure of the H180Q variant clearly showed the trapped uncleaved substrate (figure 2.5A), despite the presence of alleged catalytic residue Asp82. This structure also indicates how proton abstraction at C4-hydroxyl would occur with the Zn ion sequestered to site I and His83 helping in C4-hydroxyl group positioning. Given the native residue be present in this variant structure, His180 would be free to explore its side chain

conformational space (no known interacting residues) and eventually be in place to abstract the FBP C4-hydroxyl proton. The role of residue His180 is thus likely catalytic in nature. This is in contradistinction to the primarily structural role of residue Asp82 (Asp109 in *Escherichia coli*) to which such a catalytic role had been attributed.

*In silico* modelling of His180 based on the H180Q variant changing only  $\chi_1$  and  $\chi_2$  torsion angles of the modelled His180 together with a slight rotation of His83 resulted in the proposed geometry for FBP cleavage catalyzed by class II aldolase, that is illustrated in figure 2.8. Proton abstraction of the FBP C4-hydroxyl group by His180 initiates a rearrangement resulting in cleavage of the substrate C3–C4 bond. The mechanism is consistent with a trajectory of least atomic motion requiring only slight torsion librations involving primarily rotational motions of the histidine side chain.

In both bacterial aldolases, rupture of Zn ion metal bond with His180/His226 (*Helicobacter pylori* or *Escherichia coli*) is critical in order for this residue to act as general base at physiological pH. Histidine residues coordinated to  $\text{Zn}^{2+}$  ion have a  $\text{p}K_a \sim 13$  (72) making proton transfers inefficient, in respect to calculated  $\text{p}K_a$  from figure 2.3. In contrast, the second chelating histidine His83/His110, by virtue of this high  $\text{p}K_a$  and at physiological pH, would stabilize the resultant negative charge created in the intermediate state, C4-alkoxide, by electrostatic interaction or alternatively the transient negative charge on C4-hydroxyl group in case of a concerted proton transfer mechanism alluded to in Schema 2.1.

#### 2.6.4 Conformational transitions following cleavage

Nascent G3P exhibits conformational freedom at C1 aldehyde group with both *cis* and *trans* configurations of the aldehyde fitting into the electron density. Isomerisation between the two configurations following cleavage would create sterically unfavourable interaction in the *cis* configuration between the aldehyde species C1 atom and His83 N $\delta$ , promoting rotation of the His83 imidazole as well as G3P release. His83 rotation in turn promotes displacement of the Zn ion towards site II enabling metal cofactor stabilization of the developing charge on the enediolate intermediate. As the Zn ion leaves site I, a

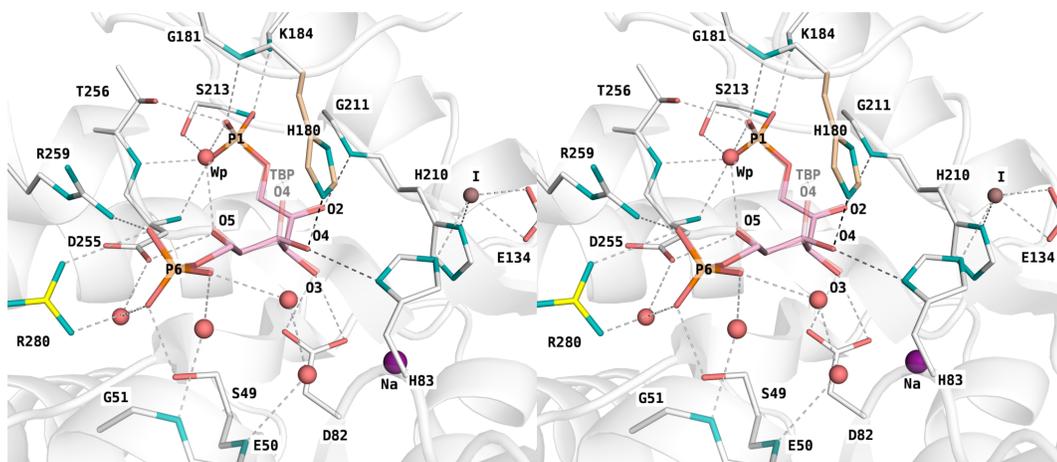


Figure 2.8 – Stereo images of reaction mechanism depicting proton abstraction that initiates substrate cleavage in *Helicobacter pylori* aldolase. Incipient proton abstraction in *Helicobacter pylori* aldolase of the C4-hydroxyl group by His180 (orange) is facilitated by the charged hydrogen bond made by His83 (orange) with the substrate C4-hydroxyl group. In this configuration, His180 is no longer bonded to the Zn metal ion enabling its imidazole N $\epsilon$  to act as a proton acceptor catalyzing proton abstraction at the C4-hydroxyl group. The conformational change requisite for proton abstraction requires small movements by His180 side chain conformation in the structure of *Helicobacter pylori* aldolase H180Q variant in complex with FBP and the retention of the zinc metal ion (brown sphere) at buried site I that sets up histidine side chain geometries suitable for activation by His83 and abstraction by His180. The displacement by His180 is underpinned by its electron density which upon ligand binding becomes disordered with respect to the other chelating histidine residues. Yellow residues and white background structure were extracted from the FBP aldolase complex structures. His180 was modeled in order to orient its N $\epsilon$  atom towards FBP O4 atom forming an angle N $\epsilon$ –O4–C4 of approximately  $109^\circ$  with a distance N $\epsilon$ –O4 of 2.3 Å. TBP ligand (half transparency) from TBP-bound H180Q aldolase structure was superposed to FBP, the TBP O4 hydroxyl being the only difference in this otherwise identical hexose bisphosphate conformation.

water molecule (W2) may occupy this site, while partaking in site II Zn ion coordination.

For the structures therein, loop  $\beta 5-\alpha 7$  was not resolved due to weak density and thus ambiguous interpretation, but a common feature in this loop folding appears when comparing other structures. Structures of ligand bound *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Giardia lamblia* show a residue from loop  $\beta 5-\alpha 7$  (respectively Leu138, Thr178, Val165 and Leu139) protruding in pocket close to site I, created by loop  $\beta 6-\alpha 8$  displacement (21–24). In the structure of *Helicobacter pylori* aldolase crystals soaked with very potent hydroxamate nanomolar inhibitors (73), Leu138 reorganizes and points into said pocket displacing W2. The previously disordered loop  $\beta 5-\alpha 7$  becomes almost fully traceable in the electron density. Sequestration of the metal cofactor at site II thus rigidifies the tertiary structure. Loop  $\beta 5-\alpha 7$  would then be able to fold appropriately over the active site, bringing catalytic residue (Glu142) in proximity of the enediolate intermediate (32, 35). Our attempt to capture the state following cleavage with E142A variant crystals soaked in FBP gave rise to a mix of several reactions coordinates, due to competition between cleavage and bond formation in the active site.

Following completion of the retroaldol reaction by Glu142 and products formation, loop  $\beta 5-\alpha 7$  is thought to unfold, followed by coincident conformational change of loop  $\beta 6-\alpha 8$  to its previous open state and Zn ion migration to buried site I. The latter loop movement is required for DHAP to leave active site pocket, as otherwise G3P could exit prior to this. Release of both product thus marks the end of the catalytic cycle.

### 2.6.5 TBP inhibition

The TBP inhibitor in the H180Q variant binds identically in the active site as was FBP bound in same variant, shown in figure 2.5B and the superposition in figure 2.8. The mechanism proposed for C3–C4 bond cleavage predicts that TBP is not a substrate for the enzyme. The C4-hydroxyl group in the TBP diastereoisomer precludes stabilization of the negative charge developing during proton abstraction by His83/His110. Proton abstraction is furthermore abrogated due to the unfavourable geometry made by the C4-hydroxyl group with His180/226.

This suggested mechanism depends on the position of ketohexose C4-hydroxyl group, that is dictated by substrate binding. Interestingly, class II TBP aldolases harbors a striking similarity with class II FBP aldolases. Apart from a similar fold (RMSD 0.75 Å between *Helicobacter pylori* FBP aldolase-PGH complex and *Escherichia coli* TBP aldolase-PGH complex), those two DHAP-dependent aldolases both share conserved residues participating in DHAP binding and Zn coordination (21, 74). A mutagenic approach lacking structural data was attempted to explain G3P binding differences in TBP and FBP aldolases (66). However, identifying residues dictating substrate specificity proved to be complex as residues thought to interact with active site ligands could not invert specificity at the C4 epimer. Mutations in residues distant from the active site using a directed evolution approach were successful in inverting substrate specificity (75). Structural data of ketohexose-bisphosphate binding would thus be required before our proposed mechanism could be tested against class II TBP aldolases. A catalytic role by a Zn ion chelating histidine residue in class II aldolases represents a novel enzymatic cleavage mechanism of C–C bonds and should offer new insights into understanding substrate specificity — critical knowledge in drug design, protein engineering and synthesis of new synthetic compounds.

## 2.7 Footnotes

<sup>a</sup> Average taken over all subunits binding DHAP.

<sup>b</sup> Average taken over all subunits binding DHAP or FBP.

## 2.8 Acknowledgements

This work was supported by Discovery Grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada to JS. Diffraction data for this study were collected in part on beamlines X12B, X25 and X29 of the National Synchrotron Light Source. Financial support comes principally from the Offices of Biological and Environmental Research and of Basic Energy Sciences of the US Department of Energy

(Contract No. DE-AC02-98CH10886), and from the National Center for Research Resources (P41RR012408) and the National Institutes of Health (P41GM103473). Kind assistance by beamline personnel, Drs L. Flaks, D.K. Schneider, A. Soares, A. Héroux and H. Robinson, is gratefully acknowledged.

Diffraction data was also collected using beamline 08ID-1 and 08B1-1 at the Canadian Light Source, which is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the National Research Council Canada, the Canadian Institutes of Health Research, the Province of Saskatchewan, Western Economic Diversification Canada, and the University of Saskatchewan. Data was collected with the assistance of Shaun Labiuk. We thank Oktavian Toka for his assistance in the kinetic characterisation of native and mutant *Helicobacter pylori* aldolases.

## **2.9 Author contributions**

B. J. and M. C. helped design, collected and analyzed the crystallographic data, performed the biochemical experiments, and wrote the manuscript. J.S. conceived, helped design, analyzed the crystallographic data and biochemical experiments, and wrote and edited the manuscript. All authors approved the final version.

## **2.10 Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## **2.11 References**

1. Kobes, R. D., Simpson, R. T., Vallee, B. L., and Rutter, W. J. Functional role of metal ions in a class II aldolase. *Biochemistry* 8, 585–588, 1969
2. Rutter, W. J. Evolution of aldolase. *Fed. Proc.* 23, 1248–1257, 1964

3. Gerdes, S. Y., Scholle, M. D., Campbell, J. W., Balazsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M. D., Somera, A. L., Kyrpides, N. C., Anderson, I., Gelfand, M. S., Bhattacharya, A., Kapatral, V., D'Souza, M., Baev, M. V., Grechkin, Y., Mseeh, F., Fonstein, M. Y., Overbeek, R., Barabasi, A.-L., Oltvai, Z. N., and Osterman, A. L. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J. Bacteriol.* 185, 5673–5684, 2003
4. Wehmeier, U. F. Molecular cloning, nucleotide sequence and structural analysis of the *Streptomyces galbus* DSM40480 *fda* gene: the *S. galbus* fructose-1,6-bisphosphate aldolase is a member of the class II aldolases. *FEMS Microbiol. Lett.* 197, 53–58, 2001
5. Singer, M., Rossmiessl, P., Cali, B. M., Liebke, H., and Gross, C. A. The *Escherichia coli* *ts8* mutation is an allele of *fda*, the gene encoding fructose-1,6-diphosphate aldolase. *J. Bacteriol.* 173, 6242–6248, 1991
6. Singer, M., Walter, W. A., Cali, B. M., Rouviere, P., Liebke, H. H., Gourse, R. L., and Gross, C. A. Physiological effects of the fructose-1,6-diphosphate aldolase *ts8* mutation on stable RNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 6249–6257, 1991
7. Galkin, A., Kulakova, L., Melamud, E., Li, L., Wu, C., Mariano, P., Dunaway-Mariano, D., Nash, T. E., and Herzberg, O. Characterization, kinetics, and crystal structures of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human parasite, *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 282, 4859–4867, 2007
8. Marshall, B. J. One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. in *Helicobacter pylori: Physiology and genetics* (Mobley, H. L., Mendz, G. L., and Hazell, S. L. eds), *ASM Press, Washington (DC)*, 2001
9. Mitchell, H. M. Epidemiology of infection. in *Helicobacter pylori: Physiology and genetics* (Mobley, H. L., Mendz, G. L., and Hazell, S. L. eds), *ASM Press, Washington (DC)*, 2001

10. Motta, C. R. A., Cunha, M. P. S. S., Queiroz, D. M. M., Cruz, F. W. S., Guerra, E. J. C., Mota, R. M. S., and Braga, L. L. B. C. Gastric precancerous lesions and *Helicobacter pylori* infection in relatives of gastric cancer patients from Northeastern Brazil. *Digestion*. 78, 3–8, 2008
11. Lee, Y.-C., Lin, J.-T., Chen, T. H.-H., and Wu, M.-S. Is eradication of *Helicobacter pylori* the feasible way to prevent gastric cancer? New evidence and progress, but still a long way to go *J. Formos. Med. Assoc.* 107, 591–599, 2008
12. Fukase, K., Kato, M., Kikuchi, S., Inoue, K., Uemura, N., Okamoto, S., Terao, S., Amagai, K., Hayashi, S., and Asaka, M. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*. 372, 392–397, 2008
13. Talley, N. J. Is it time to screen and treat *H pylori* to prevent gastric cancer? *Lancet Lond. Engl.* 372, 350–352, 2008
14. Doig, P., Jonge, B. L. de, Alm, R. A., Brown, E. D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S. D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B. C., Moir, D. T., Vovis, G. F., and Trust, T. J. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 675–707, 1999
15. Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L., and Mégraud, F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 642–674, 1999
16. Chalk, P. A., Roberts, A. D., and Blows, W. M. Metabolism of pyruvate and glucose by intact cells of *Helicobacter pylori* studied by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Microbiology*. 140, 2085–2092, 1994
17. Stingl, K., Uhlemann, E.-M., Deckers-Hebestreit, G., Schmid, R., Bakker, E. P., and Altendorf, K. Prolonged survival and cytoplasmic pH homeostasis of *Helicobacter pylori* at pH 1. *Infect. Immun.* 69, 1178–1180, 2001

18. Hoffman, P. S., Goodwin, A., Johnsen, J., Magee, K., and Zanten, S. J. V. van Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J. Bacteriol.* 178, 4822–4829, 1996
19. Blom, N. S., Tétreault, S., Coulombe, R., and Sygusch, J. Novel active site in *Escherichia coli* fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Nat Struct Biol.* 3, 856–862, 1996
20. Nagano, N., Orengo, C. A., and Thornton, J. M. One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* 321, 741–765, 2002
21. Fonvielle, M., Coinçon, M., Daher, R., Nicolas Desbenoit, Kosieradzka, K., Barilone, N., Brigitte Gicquel, Sygusch, J., Jackson, M., and Therisod, M. Synthesis and biochemical evaluation of selective inhibitors of class II fructose bisphosphate aldolases: towards new synthetic antibiotics. *Chemistry.* 14, 8521–8529, 2008
22. Pegan, S. D., Rukserree, K., Franzblau, S. G., and Mesecar, A. D. Structural basis for catalysis of a tetrameric class IIa fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* 386, 1038–1053, 2009
23. Galkin, A., Li, Z., Li, L., Kulakova, L., Pal, L. R., Dunaway-Mariano, D., and Herzberg, O. Structural insights into the substrate binding and stereoselectivity of *giardia* fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* 48, 3186–3196, 2009
24. Hall, D. R., Leonard, G. A., Reed, C. D., Watt, C. I., A. Berry, and Hunter, W. N. The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *J. Mol. Biol.* 287, 383–394, 1999
25. Dudev, T., Lin, Dudev, M., and Lim, C. First-second shell interactions in metal binding sites in proteins: a PDB survey and DFT/CDM calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3168–3180, 2003
26. Dudev, T., and Lim, C. Factors governing the protonation state of cysteines in pro-

- teins: an ab initio/CDM study. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6759–6766, 2002
27. Glusker, J., Katz, A., and Bock, C. Metal ions in biological systems. *Rigaku J.* 16, 8–16, 1999
  28. Bock, C. W., Katz, A. K., and Glusker, J. P. Hydration of zinc ions: a comparison with magnesium and beryllium ions. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 3754–3765, 1995
  29. Szwegold, B. S., Ugurbil, K., and Brown, T. R. Properties of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli*: an NMR analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 244–252, 1995
  30. Kimura, E., Gotoh, T., Koike, T., and Shiro, M. Dynamic enolate recognition in aqueous solution by zinc(II) in a phenacyl-pendant cyclen complex: implications for the role of zinc(II) in class II aldolases. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1267–1274, 1999
  31. Plater, A. R., Zgiby, S. M., Thomson, G. J., Qamar, S., Wharton, C. W., and Berry, A. Conserved residues in the mechanism of the *E. coli* class II FBP-aldolase1. *J. Mol. Biol.* 285, 843–855, 1999
  32. Zgiby, S., Plater, A. ., Bates, M. ., Thomson, G. ., and Berry, A. A functional role for a flexible loop containing Glu182 in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 315, 131–140, 2002
  33. Collins, K. D. An activated intermediate analogue. The use of phosphoglycolohydroxamate as a stable analogue of a transiently occurring dihydroxyacetone phosphate-derived enolate in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* 249, 136–142, 1974
  34. Lewis, D. J., and Lowe, G. Phosphoglycolohydroxamic acid: an inhibitor of class I and II aldolases and triosephosphate isomerase. A potential antibacterial and antifungal agent. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 10.1039/C39730000713, 1973
  35. Pegan, S. D., Rukseree, K., Capodagli, G. C., Baker, E. A., Krasnykh, O., Franzblau, S. G., and Mesecar, A. D. Active site loop dynamics of a class IIa fructose 1,6-

- bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 52, 912–925, 2013
36. Ginsburg, A., and Mehler, A. H. Specific anion binding to fructose diphosphate aldolase from rabbit muscle. *Biochemistry* 5, 2623–2634, 1966
  37. Otwinowski, Z., and Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode (Enzymology, B.-M. in ed), pp. 307–326, *Macromolecular Crystallography Part A, Academic Press*, 1997
  38. Zwart, P., Afonine, P., Grosse-Kunstleve, R., Hung, L.-W., Ioerger, T., McCoy, A., McKee, E., Moriarty, N., Read, R., Sacchettini, J., Sauter, N., Storoni, L., Terwilliger, T., and Adams, P. Automated structure solution with the PHENIX suite. in *Structural proteomics* (Kobe, B., Guss, M., and Huber, T. eds), pp. 419–435, *Methods in Molecular Biology TM, Humana Press*, 2008
  39. Afonine, P., Grosse-Kunstleve, R., and Adams, P. The Phenix refinement framework. *CCP4 Newsl.*, 2005
  40. Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L.-W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., and Terwilliger, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1948–1954, 2002
  41. Emsley, P., and Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132, 2004
  42. Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. Structure validation by Ca geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and  $C\beta$  deviation. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 50, 437–450, 2003
  43. Terwilliger, T. C., Adams, P. D., Moriarty, N. W., and Cohn, J. D. Ligand identification using electron-density map correlations. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 63, 101–107, 2007

44. Terwilliger, T. C., Klei, H., Adams, P. D., Moriarty, N. W., and Cohn, J. D. Automated ligand fitting by core-fragment fitting and extension into density. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 915–922, 2006
45. Vaguine, A. A., Richelle, J., and Wodak, S. J. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55, 191–205, 1999
46. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242, 2000
47. Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7
48. Mura, C., McCrimmon, C. M., Vertrees, J., and Sawaya, M. R. An introduction to biomolecular graphics. *PLOS Comput Biol.* 6, e1000918, 2010
49. Warburg, O., and Christian, W. [Isolation and crystallisation of the enzyme zymohexose]. *Biochem Z.* 314, 149, 1943
50. Richards, O. C., and Rutter, W. J. Preparation and properties of yeast aldolase. *J. Biol. Chem.* 236, 3177–3184, 1961
51. Healy, M. J., and Christen, P. Mechanistic probes for enzymic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase). *Biochemistry* 12, 35–41, 1973
52. Qamar, S., Marsh, K., and Berry, A. Identification of arginine 331 as an important active site residue in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 5, 154–161, 1996
53. Leatherbarrow, R. J. GraFit Version 5, *Erithacus Software Ltd.*, Horley, U.K., 2001
54. Kabsch, W., and Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 22, 2577–2637,

1983

55. Touw, W. G., Baakman, C., Black, J., te Beek, T. A. H., Krieger, E., Joosten, R. P., and Vriend, G. A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Res.* 43, D364–D368, 2015
56. Izard, T., and Sygusch, J. Induced fit movements and metal cofactor selectivity of class II aldolases: structure of *Thermus aquaticus* fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem.* 279, 11825–11833, 2004
57. Belasco, J. G., and Knowles, J. R. Polarization of substrate carbonyl groups by yeast aldolase: investigation by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 22, 122–129, 1983
58. Islam, Z., Kumar, A., Singh, S., Salmon, L., and Karthikeyan, S. Structural basis for competitive inhibition of 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 290, 11293–11308, 2015
59. Connett, R. J. In vivo glycolytic equilibria in dog gracilis muscle. *J. Biol. Chem.* 260, 3314–3320, 1985
60. Veech, R. L., Raijman, L., Dalziel, K., and Krebs, H. A. Disequilibrium in the triose phosphate isomerase system in rat liver. *Biochem. J.* 115, 837–842, 1969
61. Trentham, D. R., McMurray, C. H., and Pogson, C. I. The active chemical state of D-glyceraldehyde 3-phosphate in its reactions with D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* 114, 19–24, 1969
62. Plaumann, M., Pelzer-Reith, B., Martin, W. F., and Schnarrenberger, C. Multiple recruitment of class-I aldolase to chloroplasts and eubacterial origin of eukaryotic class-II aldolases revealed by cDNAs from *Euglena gracilis*. *Curr. Genet.* 31, 430–438, 1997
63. Mabilia-Bassiloua, C.-G., Zwolinska, M., Therisod, H., Sygusch, J., and Therisod, M. Separate synthesis and evaluation of glucitol bis-phosphate and mannitol bis-

- phosphate, as competitive inhibitors of fructose bis-phosphate aldolases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1735–1737, 2008
64. Smith, G. M., Mildvan, A. S., and Harper, E. T. Nuclear relaxation studies of the interaction of substrates with a metalloaldolase from yeast. *Biochemistry* 19, 1248–1255, 1980
  65. Tung, T. C., Ling, K. H., Byrne, W. L., and Lardy, H. A. Substrate specificity of muscle aldolase. *Biochim. Biophys. Acta.* 14, 488–494, 1954
  66. Zgiby, S. M., Thomson, G. J., Qamar, S., and Berry, A. Exploring substrate binding and discrimination in fructose 1, 6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases. *Eur. J. Biochem. FEBS.* 267, 1858–1868, 2000
  67. Rose, I. A., O’Connell, E. L., and Mehler, A. H. Mechanism of the aldolase reaction. *J. Biol. Chem.* 240, 1758–1765, 1965
  68. Schray, K. J., Fishbein, R., Bullard, W. P., and Benkovic, S. J. The anomeric form of D-fructose 1, 6-bisphosphate used as substrate in the muscle and yeast aldolase reactions. *J. Biol. Chem.* 250, 4883–4887, 1975
  69. Midelfort, C. F., Gupta, R. K., and Rose, I. A. Fructose 1,6-bisphosphate: isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases. *Biochemistry* 15, 2178–2185, 1976
  70. Schray, K. J., and Benkovic, S. J. Anomerization rates and enzyme specificity for biologically important sugars and sugar phosphates. *Acc. Chem. Res.* 11, 136–141, 1978
  71. Sharma, A., Reva, I., Fausto, R., Hesse, S., Xue, Z., Suhm, M. A., Nayak, S. K., Sathishkumar, R., Pal, R., and Guru Row, T. N. Conformation-changing aggregation in hydroxyacetone: a combined low-temperature FTIR, jet, and crystallographic study. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 20194–20207, 2011
  72. Martin, R. B. Pyrrole hydrogen ionization of imidazole derivatives in metal ion complexes and carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 4346–4347, 1974

73. Daher, R., Coinçon, M., Fonvielle, M., Gest, P. M., Guerin, M. E., Jackson, M., Sygusch, J., and Therisod, M. Rational design, synthesis, and evaluation of new selective inhibitors of microbial class II (zinc dependent) fructose bis-phosphate aldolases. *J. Med. Chem.* 53, 7836–7842, 2010
74. Hall, D. R., Bond, C. S., Leonard, G. A., Watt, C. I., Berry, A., and Hunter, W. N. Structure of tagatose-1,6-bisphosphate aldolase: Insight into chiral discrimination, mechanism, and specificity of class II aldolases. *J. Biol. Chem.* 277, 22018–22024, 2002
75. Williams, G. J., Domann, S., Nelson, A., and Berry, A. Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3143–3148, 2003

## CHAPITRE 3

### DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE D'UNE ALDOLASE DE CLASSE II

#### 3.1 Résumé

Les FBPA catalysent la réaction réversible d'aldolisation ; ces lyase forment un nouveau lien carbone-carbone entre deux trioses phosphate pour former un hexose bisphosphate. Cette catalyse comporte deux boucles mobiles. Une première boucle ( $\beta 6-\alpha 8$ ) se replie au site actif en présence de substrat et elle demeurerait dans cette conformation tout au long de la catalyse. La deuxième boucle ( $\beta 5-\alpha 7$ ) comporte un résidu conservé de glutamate qui est impliqué dans l'abstraction d'un proton du substrat DHAP ; il s'agit de la première étape de l'aldolisation. La conformation de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  résultant en l'abstraction demeure inconnue, élément important dans l'élaboration d'un mécanisme réactionnel.

Nous avons eu recours à des simulations de dynamique moléculaire afin d'évaluer le comportement de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  d'un complexe aldolase-DHAP. Comparativement à l'enzyme libre, la présence du substrat a rigidifié la structure tertiaire du complexe aldolase-DHAP alors que la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  a gardé son caractère mobile. Le mouvement de la boucle est décrit en termes de vecteurs propres par l'analyse de composante principale ; les premières composantes sont limitées à la boucle. L'espace conformationnel visité sous cette représentation s'avère restreint suite à la simulation de dynamique classique. Le système mis en place peut toutefois être utilisé avec d'autres types de simulation mieux adaptés pour contrevenir aux limites rencontrées.

#### 3.2 Introduction

Les FBPA de classe II comportent deux boucles de surface impliquées dans la catalyse enzymatique. La boucle  $\beta 6-\alpha 8$  adopte notamment deux conformations définies selon la présence du substrat — *id est* un groupement phosphate au site P1. Nous n'avons

pas pu résoudre la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  dans son entièreté chez la HpFBPA, résidus 136–156 situés entre le brin  $\beta 5$  et l'hélice  $\alpha 7$ . La densité électronique est, dans la plupart des cas, trop faible pour être interprétée. Dans sa conformation ouverte, la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  serait accessible au solvant. Une conformation ouverte a été obtenue par l'utilisation d'un inhibiteur analogue du cétohexose 1,6-bisphosphate (Daher et al., 2010).

Pour permettre la catalyse, la boucle se refermerait sur le site actif, guidée par des interactions encore inconnues. Le résidu catalytique qui y est porté, un acide glutamique, serait ainsi à proximité du substrat. Cette conformation fermée a été observée, du moins en partie, chez deux organismes. Dans le cas de EcFBPA, l'équipe de Hall et al. (1999) utilise une haute concentration en zinc, ce qui stabilise la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  dans une position où l'acide glutamique catalytique interagit avec une arginine de l'autre sous-unité de l'homodimère. Une structure est obtenue par la cristallisation en condition acide de MtFBPA ; la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  a été modélisée selon l'interprétation de la densité électronique par Pegan et al. (2013). Le résidu catalytique sur la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  est trop loin pour interagir directement avec le ligand, mais une interaction indirecte serait possible par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Ces dernières structures représentent une limite de la radiocristallographie : la conformation observée est la plus stable mais pas forcément celle d'intérêt biologique. La conformation recherchée — qui supporte le rôle catalytique de E142 (HpFBPA), de E169 (MtFBPA) ou de E181 (EcFBPA) — serait un évènement rare figurant dans un large espace conformationnel.

Nous nous tournons vers les simulations de dynamique moléculaire afin d'évaluer les conformations possibles de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ . Le calcul empirique sera appliqué sur HpFBPA, dont nous pouvons utiliser la conformation ouverte connue de la boucle ainsi que des modélisations *de novo*. L'utilisation d'un champ de force empirique dit additif (addition des termes d'énergie) facilitera le paramétrage de ligands, en plus de permettre une modification simple de paramètres existants pour reproduire la géométrie cristalline du zinc.

Les structures cristallines sont souvent incomplètes, c'est-à-dire certaines parties n'ont pas été modélisées par un manque de données. C'est souvent le cas de boucles ou

des extrémités en N- ou C-terminal de la protéine. Des chaînes latérales en surface sont aussi omises pour les mêmes raisons : un nombre important de conformations existent dû au contact avec le solvant. Il faut donc compléter la structure par la modélisation de boucles (Fiser et al., 2000). Ceci est fait en soumettant les résidus manquants à une fonction d'énergie pour trouver une conformation de faible énergie.

Le champ de force de la simulation de dynamique moléculaire doit être approprié au système : contenir les paramètres nécessaires pour effectuer la simulation sur une protéine globulaire dans une boîte d'eau, dans notre cas. Nous utilisons le champ de force CHARMM (Best et al., 2012; MacKerell et al., 1998). Par contre, ce champ de force peut montrer des lacunes quant à des aspects spécifiques d'un système donné. Un exemple d'une lacune survient en évaluant la méthodologie du paramétrage d'ions métalliques, effectué considérant l'énergie de solvation de l'ion (Marcus, 1994; Roux et al., 1990). La coordination octaédrique du  $Zn^{2+}$  est faite par six molécules d'eau dans ces conditions (Obst et Bradaczek, 1997). Le problème surgit lorsque l'on compare le comportement de ce métal de transition à l'intérieur d'une protéine, où la nature des ligands est variée et la constante diélectrique est plus faible. Durant la simulation, le cation aura tendance à perdre sa géométrie normalement tétraédrique ou pentaédrique et sera subitement solvaté par l'eau, jusqu'à même être évacué de la protéine (Pang et al., 2000). Des résultats préliminaires abondent dans ce sens, alors que la perte de l'ion de zinc d'au moins une sous-unité survient dans les premières picosecondes. Des champs de force dits polarisables ont été introduits pour reproduire le transfert de charge ; ceci stabilise les ions de métaux de transition à l'intérieur de molécules biologiques (Lamoureux et al., 2003; Zhang et al., 2012). Par contre, cette approche complique grandement les calculs, un des exemples précédents nécessite l'ajout de particules Drude doublant ainsi le nombre d'atomes lourds d'un système donné. Un autre compromis est la simulation hybride avec la mécanique quantique (Riahi et al., 2013; Riccardi et Cui, 2007; Senn et Thiel, 2009). Cette approche limite la mécanique quantique à l'environnement immédiat du métal de transition et la dynamique classique décrit le reste du système.

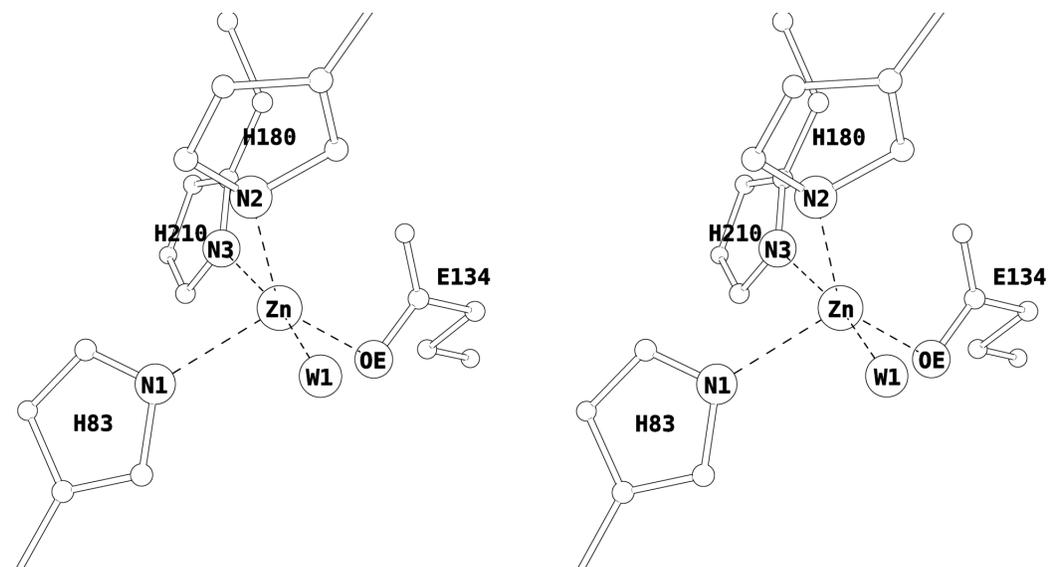
Au final, le champ de force CHARMM est choisi en vue de sa plasticité. Il est aisé

d'ajouter des termes à la fonction d'énergie potentielle pour reproduire nos propres données. L'approche utilisée pour décrire la coordination du cation de zinc est le modèle lié (*bonded model*) : l'ion est lié de façon covalente et restreint dans une géométrie de coordination (Bianchini et al., 2006). Il faut procéder au cas par cas pour ce qui est des trois structures de départ : le modèle de l'enzyme libre avec la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  prédite (ELP), le modèle de l'enzyme liée au DHAP avec boucle  $\beta 5-\alpha 7$  prédite (EDP) et le modèle de l'enzyme liée au DHAP avec la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  expérimentale (EDE). Cette approche limitera l'interprétation possible sur le mouvement du zinc et de ses ligands, qui sera biaisé pour reproduire la coordination de la structure cristalline. Nous sommes plus intéressés à évaluer la dynamique de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  pour une conformation donnée quant à la boucle  $\beta 6-\alpha 8$ , le ligand et la position de l'ion de zinc. Une conformation choisie reflèterait l'état de l'enzyme permettant le repliement de  $\beta 5-\alpha 7$  et l'abstraction de proton menant à l'énediolate — la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  en position fermée, le zinc au site exposé et le DHAP au site actif. L'établissement d'un protocole fiable permettra d'observer différents comportements de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  en variant ces autres composantes.

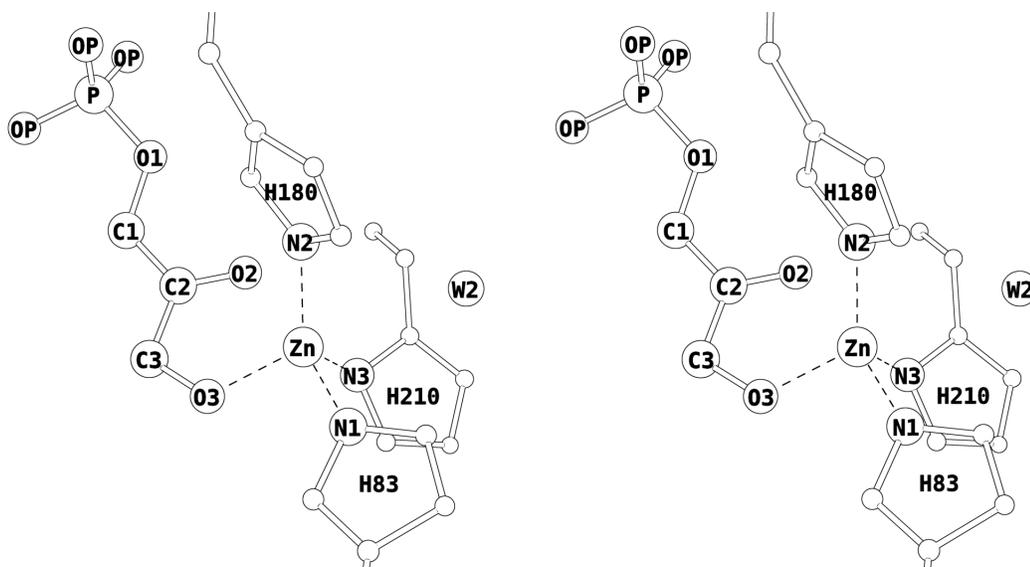
### 3.3 Méthodes expérimentales

#### 3.3.1 Préparation de structures

Les charpentes utilisées pour ELP, EDP et EDE sont respectivement la structure PDB 3C4U (Fonvielle et al., 2008), une structure HpFBPA·DHAP décrite précédemment (chapitre 2) et la structure PDB 3N9S (Daher et al., 2010). Lorsqu'absente, la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  est construite avec l'aide de MODELLER 9.15 (Fiser et al., 2000; Šali et Blundell, 1993). Le segment modélisé est constitué des résidus 138 à 152, inclusivement (les 15 résidus LMGIEDNISVDEKDA). La topologie du ligand DHAP est effectuée par analogie avec le programme CGenFF version 1.0.0 (Vanommeslaeghe et MacKerell, 2012; Vanommeslaeghe et al., 2012). Les systèmes sont préparés initialement avec le programme CHARMM, sous son interface en ligne *Quick MD Simulator* (Brooks et al., 2009; Jo et al., 2008; Lee et al., 2016). Chaque modèle est centré dans une boîte cu-



(a) Cation divalent de zinc pentaédrique de HpFBPA libre.



(b) Cation divalent de zinc tétraédrique de HpFBPA·DHAP.

Figure 3.1 – Vues stéréoscopiques de la coordination de l'ion de zinc catalytique lors des simulations de dynamique moléculaire.

bique d'eau (TIP3P) d'une largeur de 140 Å, avec une concentration en KCl de 0.15 M (Jorgensen et al., 1983; Mahoney et Jorgensen, 2000).

### 3.3.2 Simulations

Le champ de force CHARMM 36 pour les protéines est utilisé (Best et al., 2012; MacKerell et al., 1998, 2004), ainsi que décrit à la section 1.7.3.1. Le *CHARMM General Force Field* (CGenFF) version 3.1 fournit les paramètres du ligand DHAP (Vanommeslaeghe et al., 2009; Yu et al., 2012).

Les simulations de dynamique moléculaire sont exécutées par NAMD version 2.10 (Phillips et al., 2005). NAMD a été développé par "Theoretical and Computational Biophysics Group" de *Beckman Institute for Advanced Science and Technology* à University of Illinois at Urbana-Champaign. Les calculs ont été effectués sur les supercalculateurs Guillimin de l'Université McGill et Briarée de l'Université de Montréal, sous la gouverne de Calcul Québec et Calcul Canada. L'exploitation de ces supercalculateurs est financée par la Fondation canadienne pour l'innovation (FCI), le ministère de l'économie, de la science et de l'innovation du Québec (MESI), et le Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQ-NT). La parallélisation a permis de réduire un temps de calcul de près de 750 heures — pour une nanoseconde de simulation — par un facteur correspondant au nombre de processeurs utilisés, pour une efficacité d'environ 70%. La trajectoire de chacun des trois systèmes a été calculée en duplicata, pour des temps totaux par simulation de 5 et de 20 ns pour le système libre et les systèmes liés, respectivement. Le pas de temps est de 2 fs par étape ; les coordonnées des atomes du système sont rapportées à chaque mille étapes. Les systèmes ont été minimisés pendant 20 ps et équilibrés avec contraintes supplémentaires pendant 80 ps. Les conditions périodiques aux limites sont appliquées à pression et à température constantes — de 1,01325 bar et de 303,15 K — par l'utilisation de dynamique de Langevin avec un piston selon la méthode Nosé-Hoover (Feller et al., 1995; Martyna et al., 1994). Les termes non liés sont ignorés à plus de 12 Å de distance interatomique ; la sommation d'Ewald sur grille est appliquée pour calculer les potentiels électrostatiques à longue distance.

### 3.3.3 Analyse par composantes principales

Le traitement initial des données est effectué avec le programme VMD version 1.9.2 (Humphrey et al., 1996). La trajectoire du système réduit aux  $C\alpha$  est utilisée par le programme GROMACS version 5.1.2 (Berendsen et al., 1995). Ce dernier établit la matrice de covariance de positions atomiques — pour une chaîne peptidique — et effectue la diagonalisation afin d'identifier les vecteurs propres. Le premier vecteur propre englobe le maximum de variance et chaque vecteur subséquent est obtenu avec les données restantes. Ainsi, pour un vecteur propre, l'amplitude et la direction nous informent sur les mouvements principaux et corrélés du squelette peptidique. La trajectoire de la simulation est ensuite projetée sur un vecteur donné ; la projection résulte en une fonction d'un nombre scalaire dit valeur propre en fonction du temps.

## 3.4 Résultats

### 3.4.1 Coordination du zinc

Le zinc est un métal de transition dont l'ion divalent montre une grande plasticité quant à sa liaison dans un système biologique. Ses ligands sont variés, et leur nombre vont de 4 à 6 par ion de zinc (Dudev et Lim, 2003). L'ion solvaté par l'eau sera octaédrique, alors qu'un ion dans un milieu à faible constante diélectrique serait plutôt tétraédrique. Ceci complique l'établissement d'un modèle fiable et reproductible du zinc dans les simulations de dynamique moléculaire (Sousa et al., 2010). Nous avons opté pour le modèle lié afin de reproduire les structures cristallines de HpFBPA, tout en prenant en considération des distances moyennes — en fonction du ligand et de la coordination — et des prédictions à partir de structures déposées à la CSD et à la PDB (Harding, 2006; Tamames et al., 2007).

La géométrie de coordination du zinc dans l'enzyme libre (HpFBPA) est pentaédrique : une molécule d'eau est le cinquième ligand, voir figure 3.1a. La forme tétraédrique est aussi observée, chez *Escherichia coli* par exemple (Blom et al., 1996). L'ion de zinc est accessible au solvant, ce qui peut expliquer la facilité de la transition

Tableau 3.I – Géométrie de l'ion de zinc dans les simulations. Comparaison des mesures de distance et d'angles du zinc et de ses ligands entre les systèmes de HpFBPA libre (ELP) et de HpFBPA·DHAP (EDP), selon la valeur du cristal ou de la simulation de dynamique moléculaire (SDM).

<i>Mesures</i>	<i>ELP</i>		<i>EDP</i>	
	<i>Cristal</i>	<i>SDM</i>	<i>Cristal</i>	<i>SDM</i>
<i>Distance (Å)</i>				
Zn–N1	2.264	2.215±0.043	1.983	2.025±0.037
Zn–N2	2.186	2.162±0.039	2.101	2.023±0.037
Zn–N3	2.379	2.293±0.047	2.148	2.024±0.037
Zn–O <sup>†</sup>	2.214	2.055±0.043	2.187	1.973±0.046
Zn–W <sup>‡</sup>	2.473	2.107±0.056	3.075	2.894±0.283
<i>Angle (°)</i>	<i>Cristal</i>	<i>SDM</i>	<i>Cristal</i>	<i>SDM</i>
N1–Zn–N2	96.5	98.4±2.7	100.2	102.3±2.7
N1–Zn–N3	89.9	88.7±2.5	101.3	100.9±2.7
N2–Zn–N3	101.8	98.0±2.7	129.3	132.1±4.0
N1–Zn–O <sup>†</sup>	113.3	112.8±2.8	101.1	99.8±2.9
N2–Zn–O <sup>†</sup>	144.1	146.6±3.2	118.0	116.6±3.7
N3–Zn–O <sup>†</sup>	98.2	93.7±2.8	102.1	99.4±2.8

O<sup>†</sup> : L'atome OE (E134) ou O3 (DHAP) selon le système libre ou lié.

W<sup>‡</sup> : L'atome W1 ou W2 (molécule d'eau) selon le système libre ou lié.

entre 4 à 5 ligands. La structure pentaédrique est utilisée comme référence, ce qui a permis de constater — en évitant de restreindre cette molécule d'eau — qu'un échange de ligand est possible, tout en gardant la géométrie stable, tableau 3.I. En gardant les autres paramètres du champ de force tels quels, l'on observe des distances plus courtes avec un atome d'oxygène, sans toutefois être loin des mesures rapportées pour une géométrie pentaédrique de structures à haute résolution.

L'enzyme liée à un substrat tel que le DHAP montre une coordination tétraédrique, voir figure 3.1b. L'anisotropie du cation dans les structures cristallines signifie que le zinc peut adopter plusieurs conformations. Le zinc oscillerait entre deux conformations tétraédriques, alors que les trois histidines coordonnent le zinc, ce métal se déplace sur un axe qui peut avoir comme quatrième ligand à chacune des extrémités l'oxygène en C3 du

DHAP ou une molécule d'eau (W2). Une conformation moyenne pentaédrique pourrait aussi être un troisième état stable lors de la transition entre les deux états précédents. Cependant, l'utilisation d'un modèle simple non lié n'a pas pu représenter cette liberté du zinc et le modèle lié ne peut le permettre.

La conformation avec un inhibiteur analogue de l'état de transition, qui est ainsi un chélateur de cation comme le serait l'enediolate, est restreinte à la forme tétraédrique (Fonvielle et al., 2008). Cette dernière conformation est utilisée comme référence dans le paramétrage du champ de force car il serait question d'une conformation plus près de l'état de transition. Pour continuer à utiliser une force relativement faible pour ces liens de coordination, il a été nécessaire d'apporter des modifications au potentiel de Lennard-Jones entre le cation de zinc et un atome d'azote (histidine). Le champ de force tel que disponible considère une interaction ionique entre ces deux partenaires, ce qui ne reflète pas les distances moindres vues dans les cas d'histidine dans la première sphère de coordination. Les prédictions de distances métal-ligand quant au zinc sont de 2,03 Å (Zn–N), 1,99 Å (Zn–O) et 2,09 Å (Zn–W) (Harding, 2006). Ces prédictions, basées surtout sur des systèmes tétraédriques, sont en accord avec notre système lié tétraédrique. La distance Zn–W2 d'environ 3 Å est synonyme d'un système demeurant tétraédrique (le système devenait pentaédrique en simulation non contrôlée). Les distances avec l'ion de zinc augmentent généralement avec le nombre de ligands. Les distances moyennes d'une coordination octaédrique sont de 2,18 Å (Zn–N), 2,09 Å (Zn–O) et 2,10 Å (Zn–W) (Harding, 2006). Ces distances semblent en accord avec le système libre, sauf pour une plus grande distance Zn–N3 (il s'agit du résidu histidine hors du plan trigonal, figure 3.1a).

### **3.4.2 Analyse par composante principale**

#### **3.4.2.1 Enzyme libre**

Les simulations du modèle ELP montrent un système stable pendant la durée des calculs. La structure cristalline est prise comme référence pour évaluer la valeur de

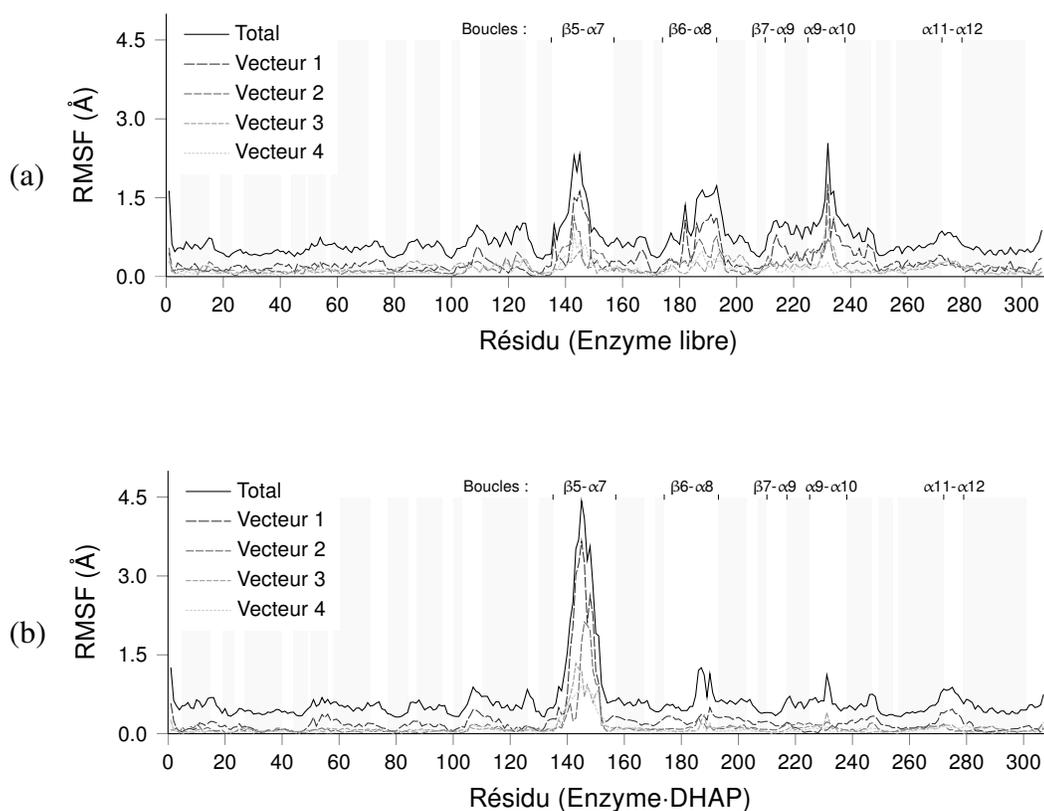


Figure 3.2 – Fluctuation moyenne quadratique des carbones  $\alpha$  des systèmes ELP et EDP en (a) et (b) respectivement. Les zones ombragées correspondent aux éléments de structures secondaires (hélice  $\alpha$  ou brin  $\beta$ ).

*root mean squared deviation* (RMSD) en fonction du temps. Le RMSD restreint aux structures secondaires — définies selon DSSP (Kabsch et Sander, 1983; Touw et al., 2015) — demeure sous 1,5 Å tout au long de la simulation. Les éléments flexibles expliquent une plus grande variation du RMSD total. L'analyse par composante principale isole la direction de mouvements corrélés de ces boucles mobiles. Le premier vecteur propre comporte 26,6 % de la covariance sur un total de 921, ou  $3N$ , vecteurs propres. Les plus grands déplacements (résidu, distance) selon la première composante principale sont retrouvés dans les boucles de surface  $\beta 5-\alpha 7$  (I145 6,35 Å),  $\beta 6-\alpha 8$  (L191 4,62 Å) et  $\alpha 9-\alpha 10$  (G232 6,89 Å). Les deux, peut-être trois, premières composantes comportent

les déplacements corrélés surtout de  $\beta 5-\alpha 7$  et  $\beta 6-\alpha 8$ , qui sont à proximité et en contact. Par contre, la position ouverte de cette deuxième boucle (en absence de ligand) coince la première ; ceci restreint le mouvement de  $\beta 5-\alpha 7$  à quelques résidus seulement. Les autres composantes principales montrent des mouvements moindres.

### 3.4.2.2 Enzyme avec DHAP

Le repliement de type *TIM-barrel* est resté stable pendant les 20 ns de simulation. Quoique le RMSD total soit élevé, ceci est en partie dû à un mouvement important de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  ; le RMSD restreint aux structures secondaires demeure sous 1,2 Å. La présence du triose phosphate promeut la rigidification de l'enzyme dans la conformation propice à la catalyse. L'identification des composantes principales renforce cette idée. Le *root mean squared fluctuation* (RMSF) permet d'identifier les parties les plus mobiles de la protéine, car il s'agit de la moyenne quadratique des différences de positions d'un atome au cours de la simulation avec sa position moyenne. La fluctuation moyenne totale ou restreinte à une seule direction, c'est-à-dire la valeur de RMSF par vecteur propre, est présentée en figure 3.2. Le complexe du système EDP montre une diminution de la fluctuation pour les boucles  $\beta 6-\alpha 8$  et  $\alpha 9-\alpha 10$ , comparé au système ELP. La boucle  $\beta 5-\alpha 7$  devient plus mobile dans le système EDP. Les deux premiers vecteurs propres de EDP représentent respectivement 39,7 % et 11,2 % de la covariance totale. L'on peut constater que les quelques premiers vecteurs propres expliquent une grande partie de la fluctuation des résidus la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ , chacun dans une direction différente. Ainsi, les mouvements principaux d'une chaîne peptidique de HpFBPA se trouvent au niveau de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ , limités aux quelques premiers vecteurs propres.

La description des quatre premiers vecteurs propres nous permet de simplifier la trajectoire selon ces quatre directions. Cette simplification, ou projection, est montrée en figure 3.3. La valeur propre représente l'amplitude du mouvement décrit par le vecteur propre. En guise d'exemple, la figure 3.3e schématise les positions minimale et maximale sur le premier vecteur propre atteintes lors de la simulation. À la rigueur, les deux premiers vecteurs suffisent pour suivre le dépliement de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ . Le plus grand

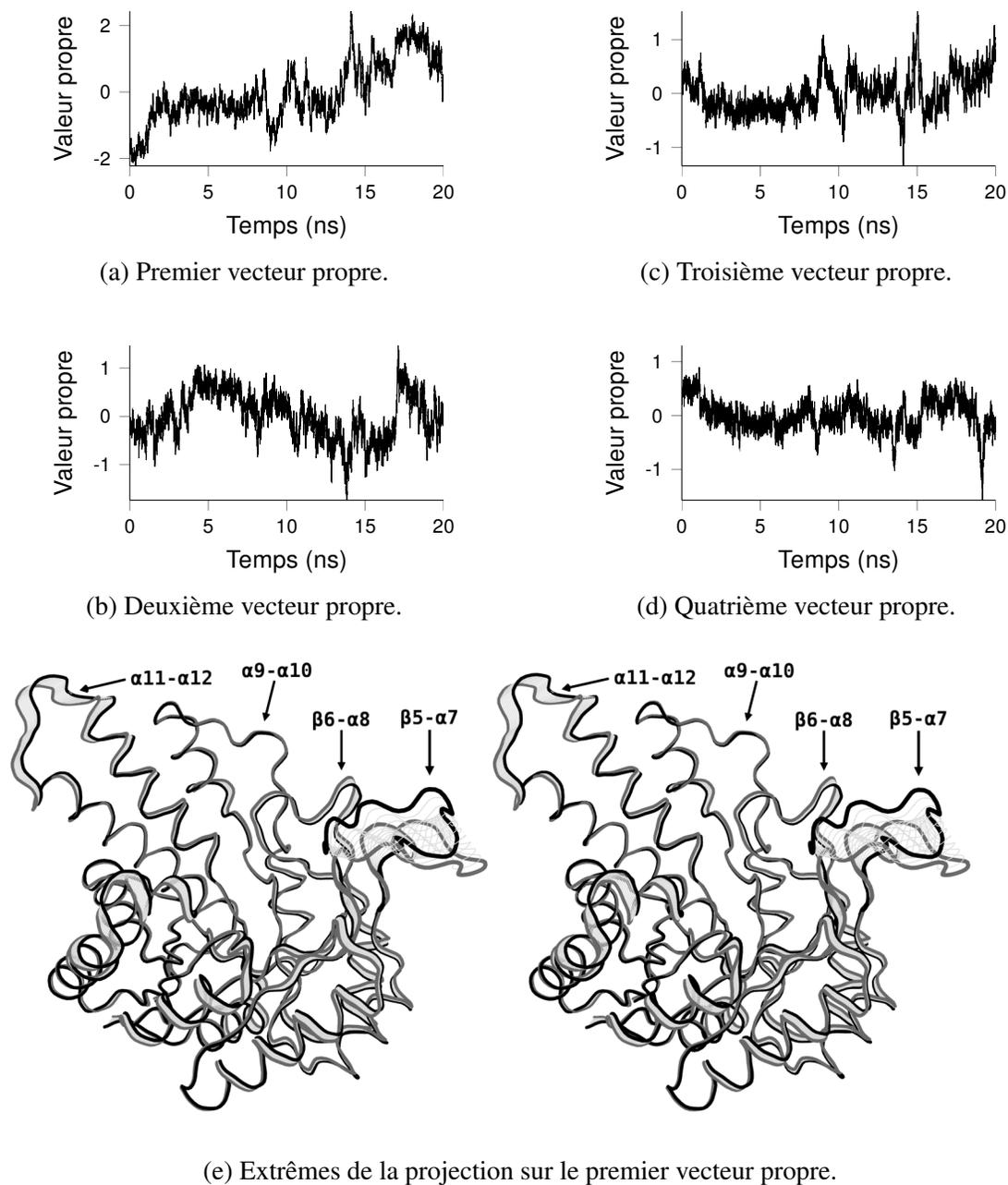


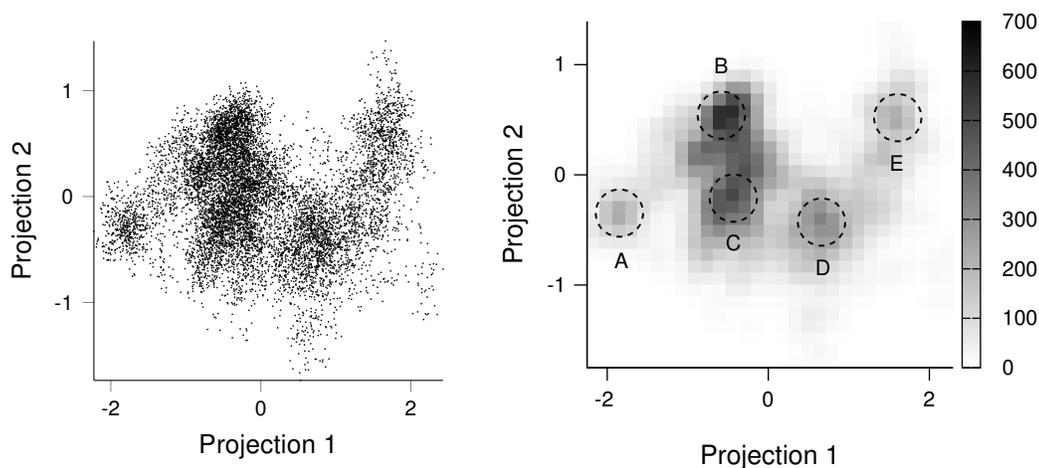
Figure 3.3 – Projection de la trajectoire de EDP sur (a) à (d) les quatre premiers vecteurs propres. Visualisation en (e) image stéréoscopique du déplacement du système EDP sur le premier vecteur propre. Des interpolations sont présentées en gris pâle montrant la transition, et donc la progression sur ce vecteur

déplacement sur le premier vecteur est le  $C\alpha$  du résidu 145, qui est de 18,77 Å. Le deuxième vecteur propre montre un mouvement dans une autre direction, où le plus grand déplacement est effectué par le résidu 146, de 14,09 Å. Le résidu catalytique d'acide glutamique (E142) effectue un mouvement net de 10,45 Å.

Le système ainsi réduit à quelques variables (les projections), il est plus aisé de décrire leur relation. La corrélation entre les deux premiers vecteurs est détaillée en figure 3.4. Ce profil peut être comparé à un schéma de l'espace conformationnel visité pendant la simulation. L'on peut aussi considérer ce schéma comme les coordonnées de réaction : la séquence de conformations adoptées par la boucle. Les zones les plus peuplées sont étiquetées de A à E, sur la figure 3.4b. Le déplacement effectué sur le premier vecteur propre nécessite des déplacements corrélés sur le deuxième vecteur afin de se déplacer séquentiellement à travers ces zones. Ceci est aussi observé en incluant les troisième et quatrième vecteurs. La contribution des quatre premiers vecteurs est prise en compte dans la représentation de la conformation moyenne de ces zones, figure 3.4c.

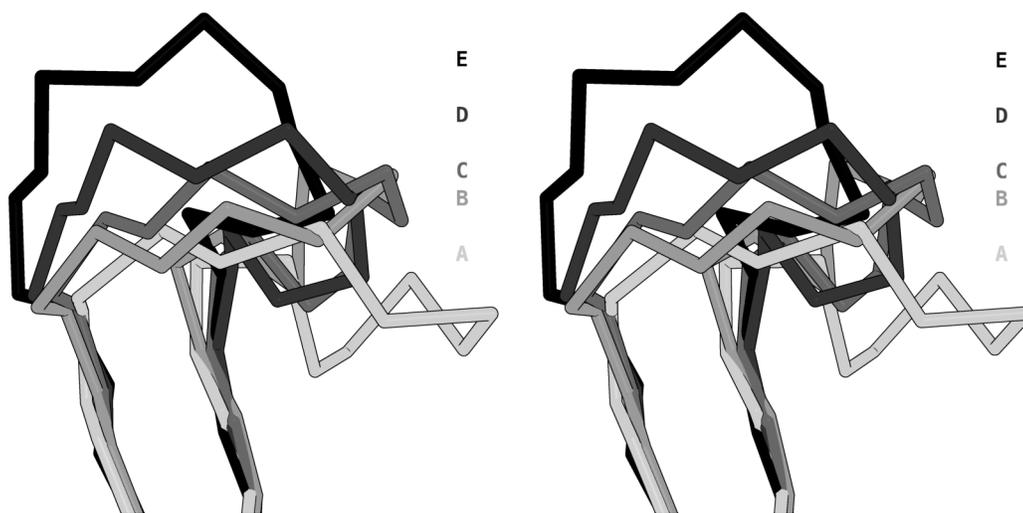
### 3.5 Discussion

Selon les données à notre disposition, les simulations effectuées sont une représentation réaliste de l'aldolase de *Helicobacter pylori*. Le zinc se comporte de manière prévisible et aisément configurable pour reproduire la géométrie de coordination et les distances appropriées. Le comportement du DHAP avec nos paramètres concorde avec une observation dans certaines structures cristallines. Le ligand phosphate ou bisphosphate présente une faible densité électronique autour d'un carbone en particulier, celui liant le groupement phosphate au locus P1 — carbone C1 du DHAP. Cette diminution en densité, en apparence le bris du lien avec le phosphate, serait due à une réaction d'élimination catalysée par l'aldolase comme il a été constaté chez la triose-phosphate isomérase (Phillips et Thornalley, 1993; Richard, 1991, 1993). Nous n'avons par contre pas pu détecter la production *in vitro* de l'espèce glyoxal ainsi générée. Dans nos simulations, la position de ce carbone fluctue rapidement entre deux positions représentées par des valeurs moyennes de l'angle de torsion O1—C1—C2 —C3 de 105 et de 165°.



(a) Corrélration de projections.

(b) Carte thermique.



(c) Conformations identifiées en (b).

Figure 3.4 – Espace conformationnel visité lors de la simulation EDP. La corrélation entre les premières composantes principales représente une grande partie du déplacement de la boucle pendant la simulation. Cette corrélation est présentée en (a) nuage de points et en (b) carte thermique. Les conformations de la boucle en chaîne  $C\alpha$  les plus souvent visitées sont identifiées de A à E et présentées en (c) image stéréoscopique, en prenant aussi compte des valeurs propres des troisième et quatrième vecteurs propres.

Nous pouvons estimer une fréquence de 143 inversions entre ces deux populations par nanoseconde de simulation. Cette plus grande liberté du C1 de DHAP ou de FBP, imputée à l'absence de liaisons avec O1, explique ainsi une diminution de son pouvoir de diffraction.

Quoiqu'une comparaison avec les facteurs B d'une structure cristalline ne peut être directement appliquée — les simulations ne sont pas faites dans une maille cristalline —, la fluctuation moyenne des atomes dans les simulations indique les mêmes structures mobiles. Comme dans les cristaux, l'enzyme libre montre une plus grande flexibilité quant aux boucles  $\beta 5-\alpha 7$ ,  $\beta 6-\alpha 8$  et  $\alpha 9-\alpha 10$ . Lorsqu'un composé se lie au site P1, la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  interagit avec ce dernier par plusieurs résidus, ce qui la rigidifie ainsi que la boucle  $\alpha 9-\alpha 10$ , à proximité. La seule structure mobile restante est la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  chez la structure liée. Puisqu'aucun résidu à proximité du substrat dans cette conformation ne peut catalyser l'étape de déprotonation en C3 du DHAP, il est autant plus évident que la boucle ait un rôle catalytique, spécifiquement par le résidu E142 identifié par des tests enzymatiques (Zgiby et al., 2002).

Ce que l'on peut retenir de l'analyse d'une simulation présentée dans les résultats est la possibilité de suivre en termes simples (projections) le changement conformationnel d'une boucle de surface flexible. Les simulations n'ont pas abouti à une conformation où la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  se replie au site actif, rapprochant le résidu catalytique E142 à une distance permettant l'échange de proton. Les simulations classiques de dynamiques moléculaires ont des contraintes évidentes qui limitent leur application, toutefois dans les mêmes conditions (paramétrage et champ de force) d'autres approches sont envisageables. Les problèmes d'une simulation classique sont engendrés par la réduction d'un phénomène macroscopique — ici la cinétique enzymatique où ce que l'on observe est le comportement d'une population de protéines — au niveau microscopique d'une simulation où l'on représente une molécule unique. Les expériences au niveau macroscopique nous portent à croire qu'une enzyme seule catalyse la réaction à une vitesse constante, qu'il s'agisse d'un phénomène déterministe. La fréquence catalytique obtenue par essai enzymatique ne peut être simplement inversée pour déterminer le temps requis pour un

cycle catalytique. Du point de vue de molécule unique, le trajet réactionnel n'est pas complété dans les mêmes délais, d'une catalyse à l'autre. Concrètement, l'utilisation d'une énergie potentielle pour calculer la trajectoire entraîne une recherche d'un état de faible énergie, ce qui peut causer un piégeage du système dans un puits d'énergie. L'on parle, du point de vue d'une molécule unique, d'un événement rare lorsqu'une barrière énergétique est franchie.

Nous avons identifié des conformations moyennes relatant le trajet de la boucle catalytique durant la simulation. Le calcul d'énergie potentielle pour une chaîne peptidique ajouté à l'esquisse de l'espace conformationnel de la figure 3.4 nous donne un aperçu du paysage énergétique du déplacement de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ . Ce que l'on note de cette dimension supplémentaire (et relative) est une énergie similaire quant aux conformations B, C et D, alors que les conformations A et E suppose des repliements un peu moins favorables. Nous observons une exploration diffuse de l'espace conformationnel à l'intérieur d'un puit et de faibles barrières distinctes entre ces puits. En considérant la dimension du temps, un retour à une conformation précédente semble fréquent.

Ce paysage énergétique avec de faibles et nombreux puits énergétiques n'est pas sans rappeler le problème du repliement de protéines (Dill et al., 2008; Richards, 1991). En théorie, la solution est obtenue par l'exploration de l'espace énergétique à la recherche du plus faible puit énergétique : la conformation native. Dans notre cas, nous commençons dans une conformation aléatoire de faible énergie par la construction *de novo* de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ . La conformation où la boucle se replie de façon à rapprocher le résidu E142 du DHAP n'est pas non plus connue et serait probablement de faible énergie. Une recherche exhaustive et efficace de l'espace conformationnel est requise. Nous observons que beaucoup de temps de simulation est perdu à échantillonner des espaces connus, dans la simulation présentée plus tôt et dans d'autres simulations similaires où la boucle ne passe pas outre l'équivalent de la conformation C dans les mêmes délais. En un mot, cette approche classique s'avère inefficace.

Une solution simple à apporter au système serait d'incorporer un terme supplémentaire, une force harmonique entre les deux atomes s'échangeant un proton par exemple.

Ceci empêcherait le système de s'égarer dans le trajet réactionnel. Toutefois, ajouter une force supplémentaire va biaiser le système, sous la forme d'une pénalité que le système cherchera à compenser d'une manière imprévisible. De plus, nous ignorons avec quel partenaire, si partenaire il y a, le résidu Glu142 interagit. Dans le cas du zinc, cette approche était valide, car nous voulions justement modifier la fonction d'énergie potentielle afin de reproduire la géométrie de coordination du zinc. Ces termes pour le zinc ont été ajoutés alors qu'ils se trouvent déjà à leur minimum ce qui résulterait en une pénalité énergétique uniquement si la géométrie de coordination change. Pour utiliser cette approche avec la boucle  $\beta 5$ - $\alpha 7$ , nous aurions besoin de données expérimentales sur les interactions de la boucle avec le reste de la protéine. Des expériences de *cross-linking* et d'échange hydrogène-deutérium pourraient nous renseigner sur ces interactions intraprotéiques. Il serait par la suite valide d'utiliser ces interactions comme contraintes supplémentaires.

Deux approches purement *in silico* sont envisageables. En premier lieu, nous avons la méthode de *replica exchange molecular dynamics* (REMD) (Sugita et Okamoto, 1999). Cette méthode implique des simulations indépendantes effectuées en parallèle. Un facteur varie entre les simulations et, de façon aléatoire, des systèmes sont échangés entre simulations. Le plus commun est de varier la température, permettant aux systèmes d'adopter des conformations autrement difficiles d'accès. Des ensembles sont ainsi obtenus, représentant un espace conformationnel plus vaste que par simulation classique, et il est possible de procéder à des calculs de thermodynamique avec précision. Une autre approche serait la métadynamique (Laio et Gervasio, 2008; Laio et Parrinello, 2002). Pour reprendre l'image donnée par ces auteurs, cette technique se rapporte à un homme pris dans un trou qui place du sable à ces pieds jusqu'au point où il lui est possible de sortir dudit trou. Concrètement, les variables des coordonnées de réaction sont définies et le système place un potentiel d'énergie (une gaussienne) à ce point du trajet. Ce procédé est réitéré pendant les calculs, rendant les endroits déjà visités moins favorables, et l'ensemble de ces gaussiennes reproduit quantitativement le profil énergétique des coordonnées réactionnelles. Il s'agit de biaiser l'échantillonnage de l'espace défini

afin de permettre au système de sortir efficacement du puit d'énergie, tout en évaluant la profondeur de ce puit. Ceci requiert des variables collectives, qui doivent être simples et restreintes à un nombre minimal pouvant expliquer le trajet réactionnel. Ces variables sont, par exemples, de simples mesures géométriques, des modes normaux ou de composantes principales. En effet, nous pouvons utiliser les composantes principales, obtenues par des simulations plus courtes, comme variables collectives dans la métadynamique. Il serait en suite aisé d'explorer plus amplement l'espace conformationnel observé en figure 3.4, tout en évitant de rebrousser chemin et pouvant même résulter en un profil énergétique fiable du repliement de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ . Pour résumer, les deux approches pourraient être toutes aussi facilement appliquées à d'autres systèmes, alors que cette boucle diffère entre homologues. Les champs de force et les programmes utilisés permettent l'implantation des deux méthodes précédentes (REMD et métadynamique), ce qui est un autre avantage.

### 3.6 Conclusion

Les simulations de dynamique moléculaire appliquées sur la FBPA de classe II de *Helicobacter pylori* reflètent les données cristallines. Le repliement en tonneau  $(\beta\alpha)_8$  est une structure stable. Seules les boucles entre les éléments de structure secondaire montrent une liberté de mouvement. Les mouvements principaux des simulations avec DHAP sont restreints à la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ , qui comporte le résidu catalytique Glu142, sensé s'approcher du substrat par le repliement de la boucle. Quoique cette conformation d'attaque n'est pas observée, cette approche demeure prometteuse comme le montre l'analyse par composante principale. Les quelques premiers (entre un et cinq) vecteurs propres sont suffisants pour définir les mouvements de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  et pour décrire ces conformations ainsi que les énergies potentielles y étant reliées. Nous en concluons que le profil énergétique de l'espace conformationnel n'est pas suffisamment échantillonné par la dynamique classique pour trouver une solution, mais que les outils sont en place pour prendre avantage de la métadynamique ou de la méthode de REMD.

Pour représenter correctement le comportement du métal, les paramètres du champ

de force le concernant ont été modifiés selon la géométrie connue. La géométrie de coordination demeure stable et cette approche peut même permettre l'échange d'un ligand du métal. Ceci s'avérerait utile pour donner la possibilité au résidu catalytique His180 de se dissocier du métal divalent.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Par des méthodes de cristallographie et d'enzymologie, nous avons reconstruit des étapes clés du trajet réactionnel afin de confirmer le rôle de deux résidus dans la catalyse enzymatique. Les essais enzymatiques fournissent une réponse simple à l'effet d'une mutation sur des étapes de la catalyse — taux catalytiques menant à la formation de produits ou d'intermédiaires réactionnels. Cette information transposée aux structures d'états intermédiaires nous amène à réévaluer le mécanisme réactionnel généralement accepté.

La FBPA de classe II est une enzyme qui catalyse la réaction réversible de l'aldolisation. Cette réaction comporte notamment deux échanges de protons et un réarrangement électronique ; celle-ci inclut le bris d'un lien C—C. La catalyse enzymatique implique le mouvement de deux boucles de surface, ainsi qu'un résidu catalytique porté par chacune. Un élément supplémentaire de la catalyse est la présence d'un ion divalent d'un métal de transition qui migre entre deux sites durant la catalyse, l'une des positions place l'ion à proximité du ligand, lui permettant de stabiliser un état intermédiaire. Nous avons jusqu'ici évalué l'importance de ces deux résidus et de leur boucle, avec l'aldolase de *Helicobacter pylori* comme modèle d'étude principal, tout en incorporant le comportement de l'ion métallique pour établir un mécanisme réactionnel, en figure 4.1. Ce mécanisme catalytique en trois étapes est la catalyse de l'aldolisation, celle vue en figure 1.5, appliquée à l'aldolase de classe II.

Le cycle catalytique de l'aldolisation débute avec la liaison du DHAP au site actif, suivi par le déplacement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  qui contribue à la fixation du phosphate en C1. Deux mouvements sont impliqués dans la catalyse de l'abstraction du proton de DHAP, la première étape de la figure 4.1. Il s'agit de la migration de l'ion de zinc et du repliement de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ . L'ion de zinc n'est pas requis à la liaison du DHAP, alors que le métal se retrouverait au site I. Suite à la migration au site II (d'où une interaction

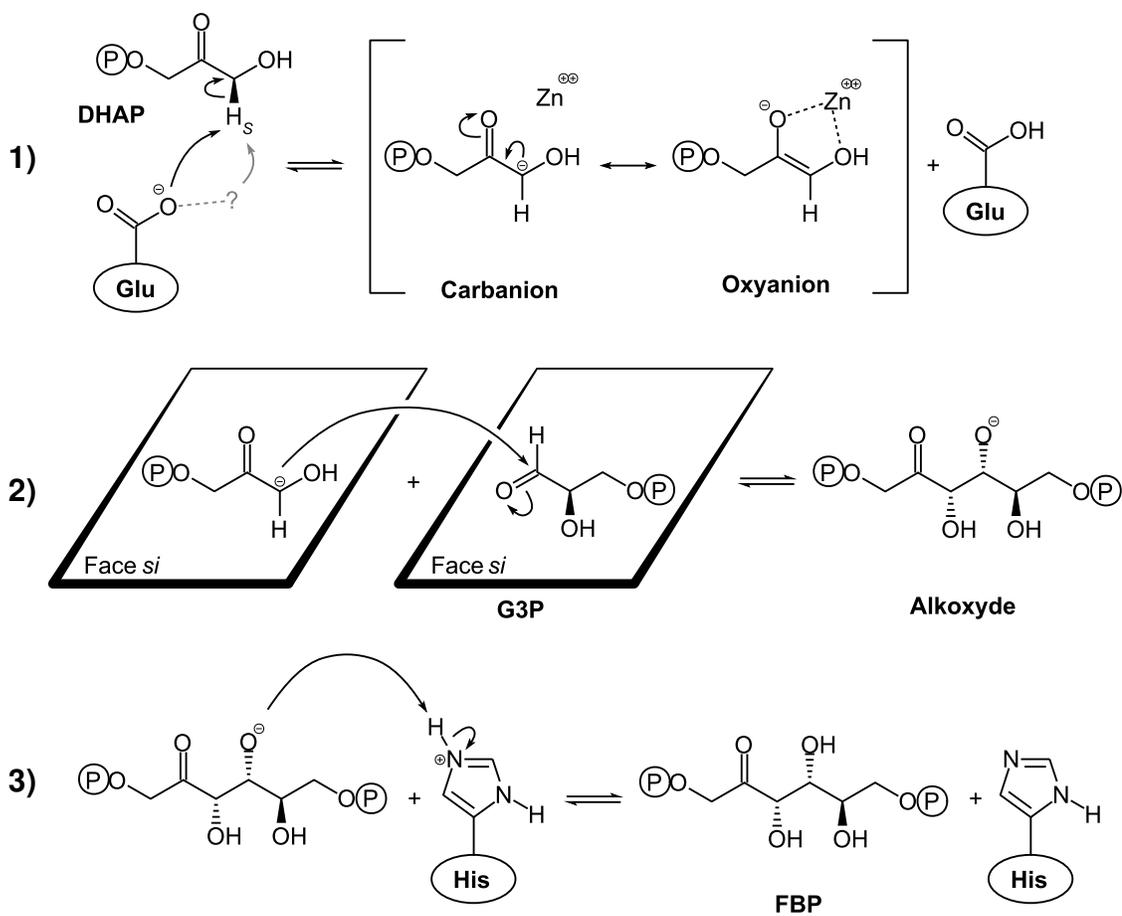


Figure 4.1 – Mécanisme de la réaction aldolique catalysée par l'aldolase de classe II en trois étapes avec DHAP et G3P, édition de la figure 1.5. Les résidus indiqués sont Glu142 et His180 de HpFBPA.

avec le DHAP est possible), le métal divalent pourrait contribuer à la formation de l'énédiolate par la polarisation du carbonyle (Riordan et Christen, 1969; Szwergold et al., 1995). Cet effet pourrait être indirect et il a été suggéré qu'un résidu histidine agisse comme intermédiaire (Smith et al., 1980). Par contre, il a été montré chez la ScFBPA et la EcFBPA qu'un effet de polarisation ne serait pas dépendant du métal (Belasco et Knowles, 1983; Plater et al., 1999). Une autre interaction entre le carbonyle du DHAP et l'amide peptidique du résidu conservé Gly211 pourrait suffire à la polarisation (Ando et al., 1988; Asakawa et al., 1992; Bundi et Wüthrich, 1979). L'abstraction en  $\alpha$  d'un carbonyle polarisé serait facilitée sans que le métal soit impliqué, signifiant que la migration du zinc du site I au site II peut survenir plus loin dans le mécanisme catalytique.

Suite à la fixation du DHAP, la boucle  $\beta 5$ - $\alpha 7$  est libre de se replier sur le site actif. Cette conformation a été observée à quelques reprises, mais laissant planer le doute dû à des artéfacts de cristallographie (Hall et al., 1999; Pegan et al., 2013). L'implication de cette boucle dans la catalyse est démontrée par une étude cinétique sur l'aldolase de *Escherichia coli* (Zgiby et al., 2002). Une aldolase mutante dont la flexibilité de la boucle est réduite (mutation de quatre glycines en alanines) présente une réduction de la vitesse d'oxydation de l'énédiolate à partir du DHAP de 1400 fois. Il s'agit d'un effet beaucoup plus important que sur la réaction d'oxydation suite au clivage (réduction de 3 fois); la conformation de la boucle serait essentielle pour la formation de l'intermédiaire énédiolate. La mutation du résidu conservé présumément catalytique de cette boucle (E182A) ralentit la réaction d'oxydation de l'énédiolate à partir du DHAP de 50 fois; un effet isotopique important est observé pour ce mutant, signifiant un transfert de proton comme étape limitante. La mutation d'un résidu voisin (E181A) n'a que peu d'effet sur la catalyse (une augmentation dans le cas de l'oxydation de l'énédiolate à partir du DHAP). Chez l'aldolase de *Helicobacter pylori* (tableau 2.II), la mutation du résidu conservé E142A entraîne une réduction de la vitesse d'oxydation à partir de DHAP de 100 fois, alors que l'effet est moindre quant à l'oxydation à partir du FBP. L'effet de la mutation E142A sur la réaction de clivage de FBP est une réduction de 10 fois, ce qui peut indiquer que le résidu est moins critique dans la réaction de rétroaldo-

lisation. Par contre, cette réduction est de 300 fois chez la EcFBPA-E182A et de 1800 fois chez MtFBPA-E169A, deux aldolases de classe IIa (Pegan et al., 2013; Zgiby et al., 2002). Il faut noter que l'activité des enzymes natives EcFBPA et MtFBPA est 10–15 fois plus élevée que HpFBPA (classe IIb) ; l'étape limitante de l'aldolase native doit être due aux changements conformationnels requis. L'on peut noter deux différences entre ces sous-classes : la classe IIb possède une boucle plus grande entre  $\beta 7$  et  $\alpha 10$  (une vingtaine de résidus en plus) et une boucle plus petite entre  $\alpha 11$  et  $\alpha 12$  (une vingtaine de résidus en moins). Ces deux boucles interagissent avec la boucle  $\beta 6$ - $\alpha 8$  (figures 1.3a et 1.6a/b). Les  $k_{\text{cat}}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) respectifs des mutants HpFBPA-E142A, EcFBPA-E182A et MtFBPA-E169A sont de 4, 2 et 0,4. L'étape limitante dans ces cas est la protonation de l'intermédiaire énediolate, en compétition avec la réaction inverse — formation de FBP. La cinétique du mutant HpFBPA-E149A et la structure obtenue après trempage avec FBP montrent des caractéristiques de l'enzyme sauvage (figures 2.2A et 2.7). La structure du mutant E142A en présence de FBP (code PDB 5UCP) montre différents produits selon la sous-unité. Par l'interprétation de la densité, la position de l'ion de zinc (site I et II) et des distances interatomiques (lien C3–C4 par exemple), nous observons que le clivage survient de façon évidente dans une sous-unité et dans une moindre mesure dans l'autre. Une sous-unité présente ainsi du DHAP (occupance 0.80) et du G3P (*trans* 0.26 et *cis* 0.39) ; nous soupçonnons du FBP résiduel. L'autre sous-unité présente du FBP (occupance 0.70) ; les deux trioses sont probablement présents mais résiduels (indistinguables sous l'autre produit majoritaire). Les deux sous-unité présentent l'ion de zinc au site I (occupance 0.4) et sous deux positions isotropiques au site II (extérieur 0.2 et intérieur 0.3). Puisque la mutation n'a que peu d'impact sur l'étape clivage, l'on observe probablement le résultat de la réversibilité de la réaction.

Selon la première étape de l'aldolisation à la figure 4.1, Glu142 de HpFBPA catalyse l'abstraction du proton du DHAP. Il est possible que cette abstraction se fasse par contact direct ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Pegan et al., 2013). Le  $\text{p}K_a$  du C3 de DHAP en présence de l'ion de zinc pourrait diminuer d'une dizaine d'unités, entre 8 et 9 (Kimura et al., 1999). Un environnement hydrophobe (le repliement de la boucle  $\beta 5$ - $\alpha 7$

au site actif) peut entraîner l'augmentation du  $pK_a$  d'un résidu glutamate (Glu142) en favorisant sa forme neutre (Neurath et Petra, 1971; Parsons et Raftery, 1972). L'augmentation de l'acidité du proton en C3 du DHAP et l'augmentation de la basicité du Glu142 permettraient cet échange de proton ( $pK_{a2}$  de la rétro-aldolisation en figure 2.3).

Plusieurs interrogations subsistent quant au déroulement exact de l'étape de l'abstraction du proton *pro-S* du DHAP C3. Il n'est pas certain non plus si le G3P se lie avant l'abstraction ou alors qu'un intermédiaire énediolate stable se trouve au site actif, lié au zinc. Un état stable possible suivant la formation de l'intermédiaire et la liaison du G3P est un complexe ternaire où le G3P interagit aussi avec le zinc, polarisant le carbonyle de l'aldéhyde en C3 (Belasco et Knowles, 1983; Plater et al., 1999). Certaines de nos structures montrent cet état (G3P en *cis* exposant sa face *re*), suggérant un état inactif alors que le TBP serait produit dans le cas contraire. D'autres hypothèses de cette polarisation sont un effet direct de la proximité du carbanion avec le G3P ou l'interaction avec le résidu échangeant un proton avec l'alkoxyde ; ces derniers décrivent des états transitoires.

Pour la formation du lien C—C, il est suggéré que l'interaction de l'intermédiaire réactionnel avec l'ion de zinc faiblisse pour favoriser la forme limite carbanion responsable de l'attaque nucléophile. L'éloignement du zinc implique aussi la perte de la liaison du métal avec G3P, ce dernier est libre d'exposer sa face *si* pour l'attaque par la face *si* du DHAP. La formation de l'espèce alkoxyde est favorisée par la stabilisation de la charge sur l'oxygène en C4 (G3P C1 aldéhyde) due à l'interaction avec  $N\delta$  de His83. Donc, la migration du zinc au site enfoui (site I) coïncide avec la formation du lien C—C de l'intermédiaire alkoxyde.

Le bris du lien de coordination du zinc (migration au site I) avec le résidu His180 de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  libère ce résidu ; un simple mouvement de la chaîne latérale peut le placer à proximité de l'alkoxyde en C4. Un aspect manquant à cette catalyse est la façon dont His180 acquerrait un proton en  $N\epsilon$ , c'est-à-dire la formation de l'imidazolium. Il est possible que le bris de la coordination avec le zinc survienne plus tôt dans le mécanisme catalytique et que la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  soit impliquée. Nonobstant cette lacune, l'échange

de proton entre His180 et l'alkoxyde achève la formation du FBP. Cette dernière étape réversible de l'aldolisation pourrait différer du modèle classique. En effet, les différentes interactions dans la production et la stabilisation de l'espèce alkoxyde peuvent être mises à profit pour élaborer un mécanisme concerté. L'espèce alkoxyde fait plutôt partie d'un mécanisme dans le cas d'une lente catalyse chimique à pH élevé ; il ne serait pas étonnant que la catalyse enzymatique soit plus expéditive pour passer d'un intermédiaire stable à un autre, le tout à pH physiologique.

L'importance du résidu His180 dans la catalyse d'une étape concertée est mise de l'avant en décrivant l'étape de la réaction de rétro-aldolisation menant au clivage. La liaison du FBP est suivie du mouvement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  et la restriction du zinc au site enfoui, libérant *de facto* le résidu His180. Les groupes carbonyle et hydroxyle en C2 et C4 sont stabilisés par des interactions respectives avec Gly211 et His83. Le résidu libre His180 se positionne avec le groupe hydroxyle en C4 et nous suggérons une activation de cette conformation par le résidu Glu142 qui viendrait modifier la basicité de l'histidine et favoriser le tautomère protoné en  $N\delta$  (Blomberg et al., 1977; Platzer et al., 2014). Le clivage serait effectué en une seule étape à partir du FBP, réaction catalysée par His180 selon l'état de transition en figure 4.2. La forme imidazolium de His180 est ainsi produite et il reste à comprendre son rôle dans le reste de la catalyse. L'inactivation à bas pH de l'aldolase serait due à l'état d'ionisation de ce résidu histidine (imidazolium) lorsqu'il est libéré et exposé au solvant avant l'abstraction — le  $pK_{a1}$  (figure 2.3) est une unité plus élevé que la constante de la chaîne latérale de l'histidine.

La nouveauté de ce mécanisme de clivage de FBP se trouve donc dans l'implication d'un résidu catalytique histidine et dans la contribution dynamique de l'ion de zinc. Le mécanisme le plus récemment proposé dans la littérature présente plutôt une interaction persistante du zinc avec les substrats et intermédiaires réactionnels (Pegan et al., 2013). Un résidu d'acide aspartique est présenté dans l'étape initiale de clivage de FBP (étape finale de sa formation), pour laquelle nous suggérons de le remplacer par un résidu histidine. Le résidu Asp82 de HpFBPA possède plutôt un rôle structural dans le maintien de l'intégrité du site actif et dans le positionnement du substrat. Asp82 interagit notamment

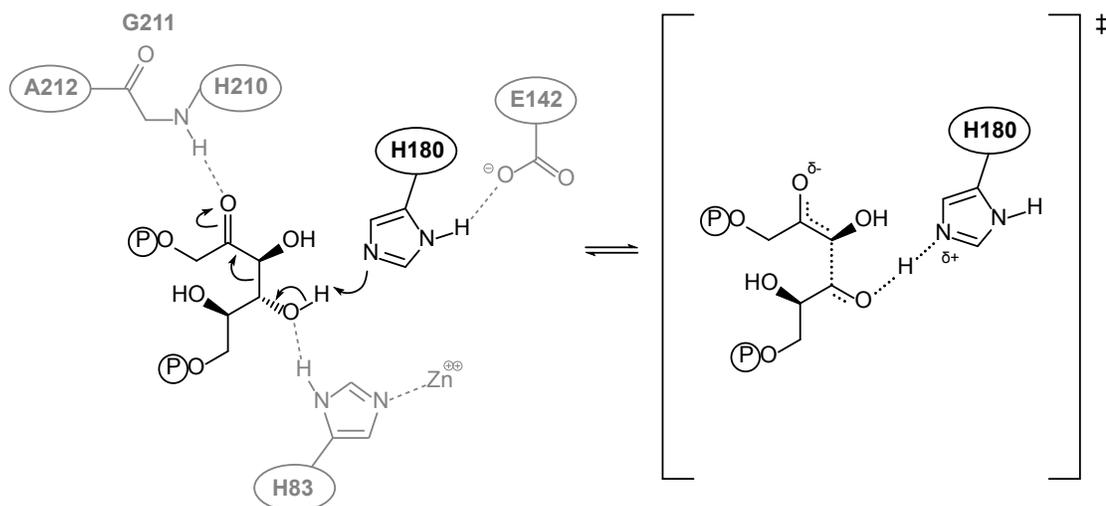


Figure 4.2 – État de transition de l'étape de clivage de la réaction rétro-aldolique par l'hypothèse que les étapes réversibles 2 et 3 de la figure 4.1 soient concertées.

avec His83 (coordination de seconde sphère de l'ion de zinc au site enfoui), Asn23, un ion monovalent, et le groupe hydroxyle en C3 de DHAP. Aucune donnée structurale ne montre ce résidu dans la possibilité d'interagir à une distance suffisante avec le groupe hydroxyle en C4 de FBP. La mutation de ce résidu en alanine entraîne la perte de ces interactions et ainsi une déformation du site actif, comme vu en figure 1.7. Ce rôle structural est renforcé dans nos résultats : une mutation de His180 de HpFBPA nous montre une structure inactive vis-à-vis du clivage où ce résidu Asp82 est dans la même position que chez l'enzyme de type sauvage ; cette même position qui a mené à l'hypothèse d'un rôle catalytique dudit résidu aspartate. À l'opposé de Asp82, His180 a un rôle plus important dans la catalyse que dans le maintien de la structure. Ce résidu His n'est pas requis à la coordination et à la migration de l'ion de zinc. Non plus nécessaire à la liaison du substrat, His180 est exposé au solvant et peut aisément interagir avec le groupe hydroxyle en C4 de FBP pour promouvoir un échange de proton.

Pour renforcer notre argumentation contre un rôle catalytique attribué à Asp82, nous avons produit un mutant isoforme D82N de HpFBPA. Nous en avons tenté de décrire la cinétique catalytique et des structures ont été résolues depuis des cristaux avec et sans trempage de FBP ou DHAP. Selon nos essais, l'activité de clivage de FBP chez ce mu-

tant était à la limite de détection. Une quantité plus importante d'enzymes pourrait être utilisée jusqu'à avoir une activité évidente — quoiqu'une quantité 300 fois plus élevée n'était pas suffisante. Quant aux structures, les ligands — ni aucun intermédiaire réactionnel — n'ont pu être piégés au site actif. En fait, les structures avec et sans trempage sont identiques. Les ions divalent de zinc et monovalent de sodium sont présents. Toutefois, le zinc est observé au site exposé — en absence de ligand, donc — et la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  n'a pu être modélisée dans la faible densité. Nous interprétons la perte apparente d'activité due à la simple mutation D82N modifiant la cavité du site actif, voir figure 4.3. La subtile différence chez le mutant est un déplacement dans la chaîne latérale de ce résidu. L'interaction de Asn82 avec Asn23 diffère de l'enzyme native : les deux  $N\delta$  de groupes amides pointent l'un vers l'autre et se trouvent ainsi à plus de 4 Å de distance (le carbonyle de la chaîne latérale de Asn82 pointe vers l'ion de sodium). L'interaction entre Asp82 et Asn23 chez le type-sauvage est d'environ 3 Å, qu'il y ait un ligand au site actif ou non. Il s'agit donc d'un déplacement de plus de 1 Å du  $N\delta$  comparé au  $O\delta$  correspondant chez le type sauvage.

Cette perte d'interaction et le déplacement de Asn82 inhiberait la catalyse en deux points. Premièrement, la contribution dans la coordination de seconde sphère du zinc au site enfoui normalement offerte par ce résidu peut s'en trouver diminuée ce qui favoriserait la migration du zinc au site exposé, car le résidu de seconde sphère de ce site — Asp104 — est toujours disponible. Ceci favoriserait donc la présence du zinc au site exposé, conformation non propice à la liaison du substrat (DHAP ou FBP). Deuxièmement, le déplacement de la chaîne latérale, nommément l'atome  $N\delta$  de Asn82, vers la cavité du site actif en réduirait le volume. Le ligand et le  $N\delta$  de Asn82 seraient trop près l'un de l'autre pour imiter le mode de liaison du type sauvage : moins de 1,8 Å avec le groupe hydroxyle en C3 du FBP ou du DHAP. Cette interaction est d'environ 2,7 Å chez le type sauvage. Nous suggérons que ni le FBP ni le DHAP ne peuvent se lier dans cette cavité en raison de la préférence d'une conformation défavorable ou de la présence de contraintes stériques non négligeables, voir figure 4.3. Afin de supporter ces observations, il serait intéressant d'utiliser de l'hydroxyacétone phosphate pour prouver la

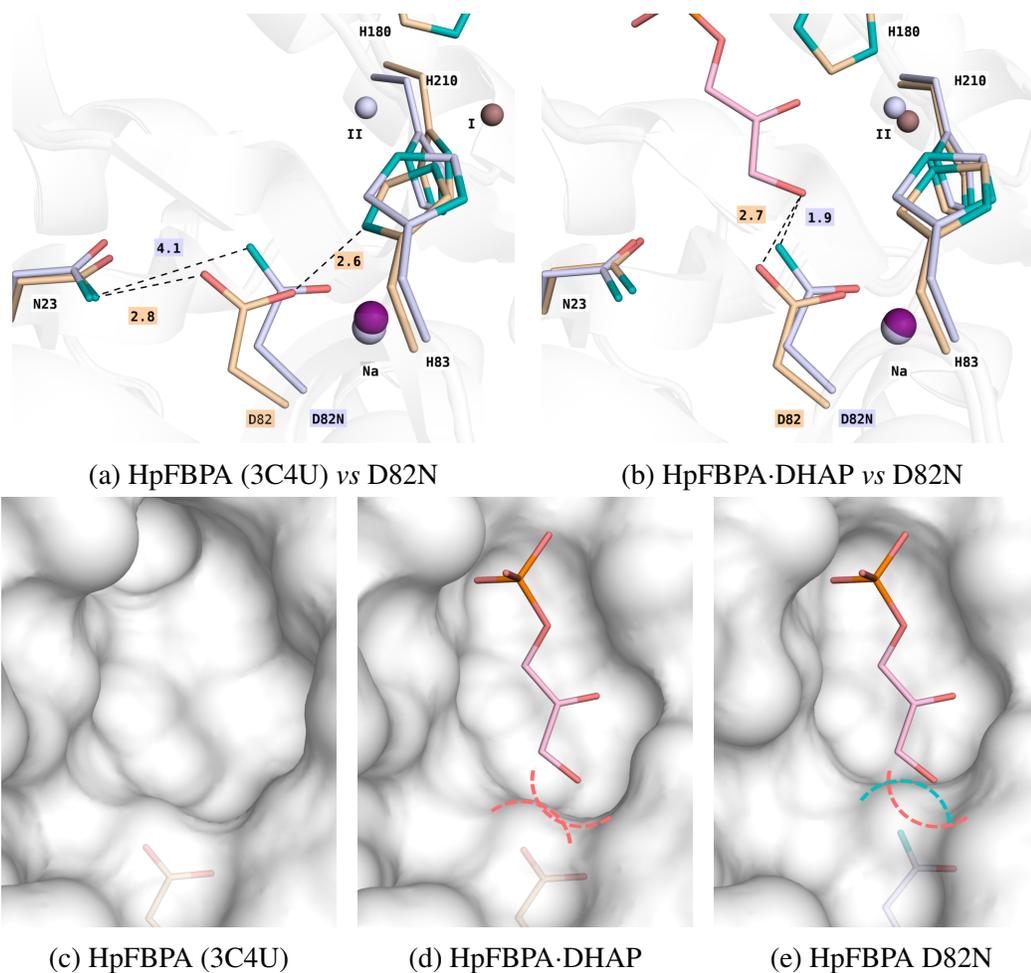


Figure 4.3 – Comparaison de structure du mutant D82N avec le type sauvage de HpFBPA avec et sans substrat. La déformation du site actif par la mutation isoforme D82N est mise en évidence en (a) et (b) par des interactions différentes du mutant (en bleu) notamment avec Asn23. Les structures du type sauvage (en orangé) sont l'enzyme libre PDB 3C4U (Fonvielle et al., 2008) et l'enzyme de type sauvage lié au DHAP (voir chapitre 2). En (c) à (e), la cavité du site actif est représentée montrant l'effet de la mutation sur la capacité à lier le DHAP, structures respectives de l'enzyme libre, l'enzyme de type sauvage lié au DHAP et le mutant D82N avec le DHAP de l'alignement en (a) et (b).

capacité au mutant D82N de lier un triose phosphate uniquement en l'absence du groupe C3-hydroxyle.

L'inclusion du résidu His de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  dans le mécanisme catalytique signifie de nouvelles approches dans la conception d'inhibiteurs aux FBPA de classe II. L'on apporte des structures supplémentaires d'états intermédiaires où la coordination du zinc n'est pas une priorité, contrairement à une approche commune (Han et al., 2016). Une structure en particulier montre même que l'ion de zinc serait enclin à quitter son site de coordination suite au piégeage du substrat cétohexose-bisphosphate. Du moins, ces nouveaux éléments nous aident à comprendre les forces en jeu permettant la migration du zinc au site exposé où il interagit avec un inhibiteur avec des propriétés de chélation. Des développements sur l'inhibition non compétitive nous donnent un aperçu d'une perte apparente d'activité par le déplacement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$  et la facilité inhérente à remplacer His catalytique dans sa coordination de l'ion de zinc (Capodagli et al., 2014a, b). Il est donc possible de mettre à profit la dynamique de la catalyse — mouvement de boucles et déplacement de l'ion de zinc — dans la conception d'inhibiteurs. Les boucles ne sont pas bien conservées entre aldolases, ce qui en peut en faire une cible intéressante pour les distinguer. Un inhibiteur potentiel pourrait ainsi contrevenir à la fermeture de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$ , en ciblant la surface de contact ou la boucle elle-même qui diffère entre aldolases (1.7c et d). Il s'agirait d'une approche qui n'est pas basée sur la capacité de l'inhibiteur à chélater le zinc. La structure HpFBPA-H180Q-FBP nous renseigne sur un état où l'ion de zinc est au site I en présence de ligand (figure 2.5a). Au lieu de développer des inhibiteurs analogues liant le zinc au site II, il serait possible de concevoir ou cribler des molécules ciblant le zinc au site I, suite au déplacement de la boucle  $\beta 6-\alpha 8$ . De plus, cibler cette cavité près du site I pourrait contrevenir au repliement de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$ , quoique peu de renseignement est disponible à propos de la conformation de cette boucle.

Pour compléter la description de la première étape de ce mécanisme réactionnel, nous avons tenté de déterminer la ou les conformations propices à l'abstraction du proton C3 *pro-S* du DHAP. Les plupart des structures cristallines n'ont pu capturer la conformation

moyenne de cette boucle  $\beta 5-\alpha 7$  hautement flexible. Nous nous sommes donc tournés vers une méthode *in silico* : la simulation de dynamique moléculaire. Ce calcul appliqué à un dimère de HpFBPA comportant une modélisation de faible énergie de la boucle manquante laisse libre cours à ladite boucle d'explorer l'espace conformationnel permis. Nous avons mis sur pied des paramètres suffisants à la reproduction d'une géométrie cristalline de la coordination de l'ion divalent de zinc ; le champ de force d'origine cause une perte quasi immédiate et possiblement irréversible du zinc. À défaut d'avoir capturer la précieuse conformation (repliement de la boucle  $\beta 5-\alpha 7$  sur le site actif), nous avons mis sur pied une méthodologie pour évaluer l'évolution de la boucle et l'espace conformationnel visité durant la simulation. La mise en œuvre d'un protocole, compatible avec les paramètres du champ de force, permettant une recherche dirigée ou exhaustive du repliement d'une boucle de plus d'une quinzaine de résidus serait nécessaire pour aboutir à une réponse satisfaisante. Au final, nous en saurions plus sur les interactions spécifiques favorables à la conformation fermée et sur la possibilité que le Glu142 s'approche suffisamment du substrat pour une interaction, qu'il y ait un intermédiaire soit une molécule d'eau ou un résidu encore inconnu.

Les éléments du mécanisme catalytique sont retrouvés dans la plus large famille des aldolases de classe II. En effet, l'on peut même étendre ces résultats jusqu'aux TBPA de classe II. L'alignement entre deux FBPA de chaque sous-classe et quatre TBPA est présenté en figure 1.8. Des nombreux résidus conservés, nous retrouvons les deux résidus catalytiques du mécanisme (numérotation subséquente de HpFBPA) : Glu142 et His180. Les résidus coordonnant l'ion divalent sont aussi conservés, Glu134 liant le zinc au site enfoui ainsi que les trois résidus histidine 83, 180 et 210. Les résidus liant le DHAP sont aussi conservés, à l'exception de Lys184 — alors qu'il est remplacé par un ion monovalent chez les FBPA de classe IIa et chez la structure de EcTBPA (kbaY) (Hall et al., 2002) — et de Thr256 dont le changement en Ser chez GIFBPA ne change en rien l'interaction par le groupe hydroxyle de la chaîne latérale. L'on retrouve donc aussi l'équivalent de Gly211 et Asp82, quant aux liaisons respectives avec le C2-carbonyle et le C3-hydroxyle. Puisque les FBPA et les TBPA utilisent le DHAP pour produire leur

diastéréoisomère respectif, ceci n'est pas surprenant. Leur spécificité respective devrait reposer sur le positionnement du D-G3P.

Les données structurales quant aux TBPA de classe II sont limitées à une structure de EcTBPA avec PGH (Hall et al., 2002). Il n'y a donc pas d'autres informations autres que la modélisation ou l'alignement avec des structures de FBPA avec un hexocétose bisphosphate ou composé analogue pour comprendre les différences dans la liaison du G3P. L'alignement de séquence en figure 1.8 suggère ce différent mode de liaison. Par exemple, Ser49 qui devient Thr dans ces TBPA pourrait influencer le positionnement du substrat dû à un groupement méthyle supplémentaire pointant vers ce dernier. L'on note aussi Asp255 qui devient Ala ; ceci implique la perte d'une interaction avec le groupe C5-hydroxyle ainsi qu'un positionnement différent des molécules d'eau avoisinantes. Une autre différence avec des conséquences inconnues est la présence de Arg chez FBPA de classe IIb (Arg259 HpFBPA), Gln pour la classe IIa et maintenant Lys chez ces TBPA. Ce dernier résidu pourrait autant interagir avec le phosphate en C6 qu'avec le groupe C5-hydroxyle. Pourtant, ces observations — explorées par des mutations simples ou multiples — ne sont pas suffisantes pour comprendre les détails de la spécificité d'une aldolase (Zgiby et al., 2000). Il serait nécessaire d'obtenir une structure de TBPA de classe II avec un substrat bisphosphate ou un analogue pour confirmer le mode de liaison du phosphate en C6 ainsi que les groupes hydroxyles en C4 et C5. Connaître ainsi les fins détails du mécanisme de reconnaissance de substrat faciliterait la tâche de produire une aldolase capable de catalyser la formation de lien C—C dans la production de composés non naturels.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allen K., Lavie A., Farber G., Glasfeld A., Petsko G. et Ringe D. Isotopic exchange plus substrate and inhibition kinetics of D-xylose isomerase do not support a proton-transfer mechanism. *Biochemistry*, 33(6):1481–1487, février 1994.
- Allen M. et Tildesley D. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, 1987.
- Ando S., Ando I., Shoji A. et Ozaki T. Intermolecular hydrogen-bonding effect on carbon-13 NMR chemical shifts of glycine residue carbonyl carbons of peptides in the solid state. *Journal of the American Chemical Society*, 110(11):3380–3386, mai 1988.
- Asakawa N., Kuroki S., Kurosu H., Ando I., Shoji A. et Ozaki T. Hydrogen-bonding effect on carbon-13 NMR chemical shifts of L-alanine residue carbonyl carbons of peptides in the solid state. *Journal of the American Chemical Society*, 114(9):3261–3265, avril 1992.
- Baldwin S. A., Perham R. N. et Stribling D. Purification and characterization of the class-II D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli* (Crookes' strain). *Biochemical Journal*, 169(3):633–641, mars 1978.
- Banner D. W., Bloomer A. c., Petsko G. A., Phillips D. C. et Wilson I. A. Atomic coordinates for triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 72(1):146–155, septembre 1976.
- Bard R. C. et Gunsalus I. C. Glucose metabolism of *Clostridium perfringens* : existence of a metallo-aldolase. *Journal of Bacteriology*, 59(3):387–400, mars 1950.
- Baron C. B., Ozaki S., Watanabe Y., Hirata M., LaBelle E. F. et Coburn R. F. Inositol 1,4,5-trisphosphate binding to porcine tracheal smooth muscle aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35):20459–20465, septembre 1995.

- Belasco J. G. et Knowles J. R. Polarization of substrate carbonyl groups by yeast aldolase : investigation by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 22(1): 122–129, janvier 1983.
- Berendsen H. J. C., van der Spoel D. et van Drunen R. GROMACS : A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91(1):43–56, septembre 1995.
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N. et Bourne P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1): 235–242, janvier 2000.
- Berry A. et Marshall K. E. Identification of zinc-binding ligands in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 318(1):11–16, février 1993.
- Best R. B., Zhu X., Shim J., Lopes P. E. M., Mittal J., Feig M. et MacKerell A. D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and side-chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  dihedral angles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9):3257–3273, septembre 2012.
- Bianchini G., Bocedi A., Ascenzi P., Enrico Gavuzzo, Mazza F. et Aschi M. Molecular dynamics simulation of *Leishmania major* surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). *Proteins*, 64(2):385–390, août 2006.
- Blau K., Portnoi M., Shagan M., Kaganovich A., Rom S., Kafka D., Caspi V. C., Porgador A., Givon-Lavi N., Gershoni J. M., Dagan R. et Nebenzahl Y. M. Flamingo cadherin : a putative host receptor for *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Infectious Diseases*, 195(12):1828–1837, juin 2007.
- Blom N. et Sygusch J. Product binding and role of the C-terminal region in class I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Nature Structural Biology*, 4(1):36–39, janvier 1997.

- Blom N. S., Tétreault S., Coulombe R. et Sygusch J. Novel active site in *Escherichia coli* fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Nature Structural Biology*, 3(10):856–862, octobre 1996.
- Blomberg F., Maurer W. et Rueterjans H. Nuclear magnetic resonance investigation of nitrogen-15-labeled histidine in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 99(25):8149–8159, décembre 1977.
- Böck A. et Neidhardt F. C. Properties of a mutant of *Escherichia coli* with a temperature-sensitive fructose-1,6-diphosphate aldolase. *Journal of Bacteriology*, 92(2):470–476, août 1966.
- Brooks B. R., Brooks C. L., Mackerell A. D., Nilsson L., Petrella R. J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caflisch A., Caves L., Cui Q., Dinner A. R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoscek M., Im W., Kuczera K., Lazaridis T., Ma J., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R. W., Post C. B., Pu J. Z., Schaefer M., Tidor B., Venable R. M., Woodcock H. L., Wu X., Yang W., York D. M. et Karplus M. CHARMM : The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10): 1545–1614, juillet 2009.
- Bundi A. et Wüthrich K. Use of amide <sup>1</sup>H-NMR titration shifts for studies of polypeptide conformation. *Biopolymers*, 18(2):299–311, février 1979.
- Capodagli G. C., Lee S. A., Boehm K. J., Brady K. M. et Pegan S. D. Structural and functional characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*'s class IIb fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry*, 53(48):7604–7614, décembre 2014a.
- Capodagli G. C., Sedhom W. G., Jackson M., Ahrendt K. A. et Pegan S. D. A noncompetitive inhibitor for *Mycobacterium tuberculosis*'s class IIa fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry*, 53(1):202–213, janvier 2014b.
- Cashel M. et Kalbacher B. The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia*

- coli. V. Characterization of a nucleotide associated with the stringent response. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(9):2309–2318, mai 1970.
- Chaves E. G. A., Weber S. S., Bao S. N., Pereira L. A., Bailao A. M., Borges C. L. et Soares C. M. d. A. Analysis of Paracoccidioides secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *BMC Microbiology*, 15: 53, 2015.
- Coinçon M. *Étude structure-fonction des fructose-1,6-bisphosphate aldolases metallo-dépendantes : mécanisme catalytique et développement d'antimicrobiens*. Thèse de doctorat, Université de Montréal, mars 2011.
- Colak A. T., Colak F., Yesilel O. Z. et Buyukgungor O. Synthesis, spectroscopic, thermal, voltammetric studies and biological activity of crystalline complexes of pyridine-2,6-dicarboxylic acid and 8-hydroxyquinoline. *Journal of Molecular Structure*, 936 (1–3):67–74, novembre 2009.
- Collins K. D. An activated intermediate analogue. The use of phosphoglycolohydroxamate as a stable analogue of a transiently occurring dihydroxyacetone phosphate-derived enolate in enzymatic catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 249(1):136–142, janvier 1974.
- Consortium T. U. UniProt : a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43 (D1):D204–D212, janvier 2015.
- Cooper S. J., Leonard G. A., McSweeney S. M., Thompson A. W., Naismith J. H., Qamar S., Plater A., Berry A. et Hunter W. N. The crystal structure of a class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure*, 4(11):1303–1315, novembre 1996.
- Creighton D. et Hamilton D. Brief history of glyoxalase I and what we have learned about metal ion-dependent, enzyme-catalyzed isomerizations. *Archives of biochemistry and biophysics*, 387(1):1–10, mars 2001.

- da Fonseca C. A., Jesuino R. S. A., Felipe M. S. S., Cunha D. A., Brito W. A. et Soares C. M. A. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection*, 3(7):535–542, juin 2001.
- Daher R., Coinçon M., Fonvielle M., Gest P. M., Guerin M. E., Jackson M., Sygusch J. et Therisod M. Rational design, synthesis, and evaluation of new selective inhibitors of microbial class II (zinc dependent) fructose bis-phosphate aldolases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(21):7836–7842, novembre 2010.
- de la Paz Santangelo M., Gest P. M., Guerin M. E., Coinçon M., Pham H., Ryan G., Puckett S. E., Spencer J. S., Gonzalez-Juarrero M., Daher R., Lenaerts A. J., Schnappinger D., Therisod M., Ehrt S., Sygusch J. et Jackson M. Glycolytic and non-glycolytic functions of *Mycobacterium tuberculosis* fructose-1,6-bisphosphate aldolase, an essential enzyme produced by replicating and non-replicating bacilli. *Journal of Biological Chemistry*, 286(46):40219–40231, novembre 2011.
- Dill K. A., Ozkan S. B., Shell M. S. et Weikl T. R. The protein folding problem. *Annual review of biophysics*, 37:289–316, juin 2008.
- Dudev T. et Lim C. Principles governing Mg, Ca, and Zn binding and selectivity in proteins. *Chemical Reviews*, 103(3):773–788, mars 2003.
- Eisenberg R. C. et Dobrogosz W. J. Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93(3):941–949, mars 1967.
- Ellis R. J. Macromolecular crowding : an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1):114–119, février 2001.
- Elzainy T. A., Hassan M. M. et Allam A. M. New pathway for nonphosphorylated degradation of gluconate by *Aspergillus niger*. *Journal of Bacteriology*, 114(1):457–459, avril 1973.

- Entner N. et Doudoroff M. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 196(2):853–862, juin 1952.
- Feller S. E., Zhang Y., Pastor R. W. et Brooks B. R. Constant pressure molecular dynamics simulation : The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(11):4613–4621, septembre 1995.
- Fernández-Arenas E., Molero G., Nombela C., Diez-Orejas R. et Gil C. Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *PROTEOMICS*, 4(4):1204–1215, avril 2004.
- Fessner W.-D. Enzyme-catalyzed aldol additions. Dans Rainerhrwald P. D., éditeur, *Modern Aldol Reactions*, pages 201–272. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2004.
- Fessner W.-D., Schneider A., Held H., Sinerius G., Walter C., Hixon M. et Schloss J. V. The mechanism of class II, metal-dependent aldolases. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 35(19):2219–2221, 1996.
- Fiser A., Do R. K. G. et Šali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein science*, 9(09):1753–1773, 2000.
- Fonvielle M., Coinçon M., Daher R., Nicolas Desbenoit, Kosieradzka K., Barilone N., Brigitte Gicquel, Sygusch J., Jackson M. et Therisod M. Synthesis and biochemical evaluation of selective inhibitors of class II fructose bisphosphate aldolases : towards new synthetic antibiotics. *Chemistry*, 14(28):8521–8529, 2008.
- Fonvielle M., Weber P., Dabkowska K. et Therisod M. New highly selective inhibitors of class II fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(11):2923–2926, juin 2004.
- Forman D., Newell D. G., Fullerton F., Yarnell J. W., Stacey A. R., Wald N. et Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer : evidence from a prospective investigation. *BMJ*, 302(6788):1302–1305, juin 1991.

- Gaal T., Bartlett M. S., Ross W., Turnbough C. L. et Gourse R. L. Transcription regulation by initiating NTP concentration : rRNA synthesis in bacteria. *Science*, 278 (5346):2092–2097, décembre 1997.
- Galkin A., Kulakova L., Melamud E., Li L., Wu C., Mariano P., Dunaway-Mariano D., Nash T. E. et Herzberg O. Characterization, kinetics, and crystal structures of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human parasite, *Giardia lamblia*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7):4859–4867, février 2007.
- Galkin A., Li Z., Li L., Kulakova L., Pal L. R., Dunaway-Mariano D. et Herzberg O. Structural insights into the substrate binding and stereoselectivity of giardia fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry*, 48(14):3186–3196, avril 2009.
- Gerdes S. Y., Scholle M. D., Campbell J. W., Balazsi G., Ravasz E., Daugherty M. D., Somera A. L., Kyrpides N. C., Anderson I., Gelfand M. S., Bhattacharya A., Kapratral V., D'Souza M., Baev M. V., Grechkin Y., Mseeh F., Fonstein M. Y., Overbeek R., Barabasi A.-L., Oltvai Z. N. et Osterman A. L. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *Journal of Bacteriology*, 185(19):5673–5684, octobre 2003.
- Ginsburg A. et Mehler A. H. Specific anion binding to fructose diphosphate aldolase from rabbit muscle. *Biochemistry*, 5(8):2623–2634, août 1966.
- Gray G. R. Examination of D-fructose 1,6-diphosphate and related sugar phosphates by Fourier transform phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 10(25):4705–4711, décembre 1971.
- Grazi E., Cheng T. et Horecker B. L. The formation of a stable aldolase-dihydroxyacetone phosphate complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7(3):250–253, avril 1962.
- Hall D. R., Leonard G. A., Reed C. D., Watt C. I., A. Berry et Hunter W. N. The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex

- with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *Journal of Molecular Biology*, 287(2):383–394, mars 1999.
- Hall D. R., Bond C. S., Leonard G. A., Watt C. I., Berry A. et Hunter W. N. Structure of tagatose-1,6-bisphosphate aldolase : Insight into chiral discrimination, mechanism, and specificity of class II aldolases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24):22018–22024, juin 2002.
- Han X., Zhu X., Zhu S., Wei L., Hong Z., Guo L., Chen H., Chi B., Liu Y., Feng L., Ren Y. et Wan J. A rational design, synthesis, biological evaluation and structure–activity relationship study of novel inhibitors against cyanobacterial fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(1):73–81, janvier 2016.
- Harding M. M. Small revisions to predicted distances around metal sites in proteins. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography*, 62(6):678–682, juin 2006.
- Healy M. J. et Christen P. Mechanistic probes for enzymic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase). *Biochemistry*, 12(1):35–41, janvier 1973.
- Henze K., Morrison H. G., Sogin M. L. et Müller M. Sequence and phylogenetic position of a class II aldolase gene in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Gene*, 222(2):163–168, novembre 1998.
- Herrera V. et Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(11):971–976, novembre 2009.
- Humphrey W., Dalke A. et Schulten K. VMD : Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, février 1996.

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*, volume 61 de *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. World Health Organization, 1994.
- Ishihama Y., Schmidt T., Rappsilber J., Mann M., Hartl F. U., Kerner M. J. et Frishman D. Protein abundance profiling of the Escherichia coli cytosol. *BMC Genomics*, 9:102, 2008.
- Jacobs M. A., Alwood A., Thaipisuttikul I., Spencer D., Haugen E., Ernst S., Will O., Kaul R., Raymond C., Levy R., Chun-Rong L., Guenther D., Bovee D., Olson M. V. et Manoil C. Comprehensive transposon mutant library of Pseudomonas aeruginosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24):14339–14344, novembre 2003.
- Jagannathan V., Singh K. et Damodaran M. Carbohydrate metabolism in citric acid fermentation. 4. Purification and properties of aldolase from Aspergillus niger. *Biochemical Journal*, 63(1):94–105, mai 1956.
- Jo S., Kim T., Iyer V. G. et Im W. CHARMM-GUI : A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11):1859–1865, août 2008.
- Joerger A. C., Gosse C., Fessner W.-D. et Schulz G. E. Catalytic action of fuculose 1-phosphate aldolase (class II) as derived from structure-directed mutagenesis,. *Biochemistry*, 39(20):6033–6041, mai 2000.
- Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W. et Klein M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2):926–935, juillet 1983.
- Kabsch W. et Sander C. Dictionary of protein secondary structure : Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12):2577–2637, décembre 1983.

- Kao A. W., Noda Y., Johnson J. H., Pessin J. E. et Saltiel A. R. Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25):17742–17747, juin 1999.
- Karkhoff-Schweizer R. et Knull H. R. Demonstration of tubulin-glycolytic enzyme interactions using a novel electrophoretic approach. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 146(2):827–831, juillet 1987.
- Kimura E., Gotoh T., Koike T. et Shiro M. Dynamic enolate recognition in aqueous solution by zinc(II) in a phenacyl-pendant cyclen complex : implications for the role of zinc(II) in class II aldolases. *Journal of the American Chemical Society*, 121(6): 1267–1274, février 1999.
- Kobes R. D., Simpson R. T., Vallee B. L. et Rutter W. J. Functional role of metal ions in a class II aldolase. *Biochemistry*, 8(2):585–588, février 1969.
- Koerner T. A. W., Cary L. W., Bhacca N. S. et Younathan E. S. Tautomeric composition of D-fructose phosphates in solution by fourier transform carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 51(3):543–550, avril 1973.
- Kovalevsky A. Y., Hanson L., Fisher S. Z., Mustyakimov M., Mason S. A., Forsyth V. T., Blakeley M. P., Keen D. A., Wagner T., Carrell H., Katz A. K., Glusker J. P. et Langan P. Metal ion roles and the movement of hydrogen during reaction catalyzed by D-xylose isomerase : a joint x-ray and neutron diffraction study. *Structure*, 18(6): 688–699, juin 2010.
- Kulkarni R. R., Parreira V. R., Sharif S. et Prescott J. F. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(9):1070–1077, septembre 2007.
- Labbe G. *Dynamics and inhibition of class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase*. Thèse de doctorat, University of Waterloo, avril 2009.

- Labbé G., Krismanich A. P., Groot S. d., Timothy Rasmusson, Shang M., Brown M. D. R., Dmitrienko G. I. et Guillemette J. G. Development of metal-chelating inhibitors for the Class II fructose 1,6-bisphosphate (FBP) aldolase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 112:49–58, juillet 2012.
- Laio A. et Gervasio F. L. Metadynamics : a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science. *Reports on Progress in Physics*, 71(12):126601, décembre 2008.
- Laio A. et Parrinello M. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20):12562–12566, octobre 2002.
- Lamoureux G., MacKerell Jr A. D. et Roux B. A simple polarizable model of water based on classical Drude oscillators. *The Journal of Chemical Physics*, 119(10):5185–5197, septembre 2003.
- Lee J., Cheng X., Swails J. M., Yeom M. S., Eastman P. K., Lemkul J. A., Wei S., Buckner J., Jeong J. C., Qi Y., Jo S., Pande V. S., Case D. A., Brooks C. L., MacKerell A. D., Klauda J. B. et Im W. CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1):405–413, janvier 2016.
- Lewis D. J. et Lowe G. Phosphoglycolhydroxamic acid : an inhibitor of class I and II aldolases and triosephosphate isomerase. A potential antibacterial and antifungal agent. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (19):713–715, 1973.
- Li D., Han X., Tu Q., Feng L., Wu D., Sun Y., Chen H., Li Y., Ren Y. et Wan J. Structure-based design and synthesis of novel dual-target inhibitors against cyanobacterial fructose-1,6-bisphosphate aldolase and fructose-1,6-bisphosphatase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31):7453–7461, août 2013a.

- Li F.-q., Ma C.-f., Shi L.-n., Lu J.-f., Wang Y., Huang M. et Kong Q.-q. Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. *BMC Infectious Diseases*, 13:253, mai 2013b.
- Li Z., Liu Z., Cho D. W., Zou J., Maozhen Gong, Breece R. M., Galkin A., Li L., Zhao H., Maestas G. D., Tierney D. L., Herzberg O., Dunaway-Mariano D. et Mariano P. S. Rational design, synthesis and evaluation of first generation inhibitors of the *Giardia lamblia* fructose-1,6-biphosphate aldolase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(4):509–517, avril 2011.
- Ling E., Feldman G., Portnoi M., Dagan R., Overweg K., Mulholland F., Chalifa-Caspi V., Wells J. et Mizrahi-Nebenzahl Y. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clinical & Experimental Immunology*, 138(2): 290–298, novembre 2004.
- MacKerell A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T. K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J. C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D. et Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18): 3586–3616, 1998.
- MacKerell A. D., Feig M. et Brooks C. L. Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields. *Journal of the American Chemical Society*, 126(3):698–699, janvier 2004.
- Mahoney M. W. et Jorgensen W. L. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. *The Journal of Chemical Physics*, 112(20):8910–8922, mai 2000.

- Marcus Y. A simple empirical model describing the thermodynamics of hydration of ions of widely varying charges, sizes, and shapes. *Biophysical Chemistry*, 51(2):111–127, août 1994.
- Marsh J. J. et Lebherz H. G. Fructose-bisphosphate aldolases : an evolutionary history. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(3):110–113, mars 1992.
- Martyna G. J., Tobias D. J. et Klein M. L. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5):4177–4189, septembre 1994.
- Merkulova M., Hurtado-Lorenzo A., Hosokawa H., Zhuang Z., Brown D., Ausiello D. A. et Marshansky V. Aldolase directly interacts with ARNO and modulates cell morphology and acidic vesicle distribution. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 300(6):C1442–C1455, juin 2011.
- Michaelis L. et Menten M. L. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49:333–369, 1913.
- Midelfort C. F., Gupta R. K. et Rose I. A. Fructose 1,6-bisphosphate : isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases. *Biochemistry*, 15(10):2178–2185, mai 1976.
- Mildvan A. S., Kobes R. D. et Rutter W. J. Magnetic resonance studies of the role of the divalent cation in the mechanism of yeast aldolase. *Biochemistry*, 10(7):1191–1204, mars 1971.
- Morris A. J. et Tolan D. R. Site-directed mutagenesis identifies aspartate 33 as a previously unidentified critical residue in the catalytic mechanism of rabbit aldolase A. *Journal of Biological Chemistry*, 268(2):1095–1100, janvier 1993.
- Nagano N., Orengo C. A. et Thornton J. M. One fold with many functions : The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *Journal of Molecular Biology*, 321(5):741–765, août 2002.

- Neurath H. et Petra P. H. Modification of carboxyl groups in bovine carboxypeptidase A. II. Chemical identification of a functional glutamic acid residue and other reactive groups. *Biochemistry*, 10(17):3171–3177, août 1971.
- Nomura A., Stemmermann G. N., Chyou P.-H., Kato I., Perez-Perez G. I. et Blaser M. J. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New England Journal of Medicine*, 325(16):1132–1136, octobre 1991.
- Obst S. et Bradaczek H. Molecular dynamics simulations of zinc Ions in water using CHARMM. *Molecular modeling annual*, 3(6):224–232, juin 1997.
- O'Reilly G. et Clarke F. Identification of an actin binding region in aldolase. *FEBS Letters*, 321(1):69–72, avril 1993.
- Palm J. E. D., Weiland M. E.-L., Griffiths W. J., Ljungström I. et Svärd S. G. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *Journal of Infectious Diseases*, 187(12):1849–1859, juin 2003.
- Pang Y.-P., Xu K., Yazal J. E. et Prendergast F. G. Successful molecular dynamics simulation of the zinc-bound farnesyltransferase using the cationic dummy atom approach. *Protein Science*, 9(10):1857–1865, octobre 2000.
- Pardo M., Monteoliva L., Pla J., Sánchez M., Gil C. et Nombela C. Two-Dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts : a novel approach to study the cell wall. *Yeast*, 15(6):459–472, avril 1999.
- Parsonnet J., Friedman G. D., Vandersteen D. P., Chang Y., Vogelman J. H., Orentreich N. et Sibley R. K. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 325(16):1127–1131, octobre 1991.
- Parsons S. M. et Raftery M. A. Ionization behavior of the cleft carboxyls in lysozyme-substrate complexes. *Biochemistry*, 11(9):1633–1638, avril 1972.

- Pegan S. D., Rukseree K., Capodagli G. C., Baker E. A., Krasnykh O., Franzblau S. G. et Mesecar A. D. Active site loop dynamics of a class IIa fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 52(5):912–925, février 2013.
- Pegan S. D., Rukseree K., Franzblau S. G. et Mesecar A. D. Structural basis for catalysis of a tetrameric class IIa fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology*, 386(4):1038–1053, mars 2009.
- Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kalé L. et Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1781–1802, décembre 2005.
- Phillips S. A. et Thornalley P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *European Journal of Biochemistry*, 212(1):101–105, février 1993.
- Pitt D. et Mosley M. J. Pathways of glucose catabolism and the origin and metabolism of pyruvate during calcium-induced conidiation of *Penicillium notatum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 51(4):365–384, juillet 1985.
- Plater A. R., Zgiby S. M., Thomson G. J., Qamar S., Wharton C. W. et Berry A. Conserved residues in the mechanism of the *E. coli* class II FBP-aldolase. *Journal of Molecular Biology*, 285(2):843–855, janvier 1999.
- Platzer G., Okon M. et McIntosh L. P. pH-dependent random coil 1h, 13c, and 15n chemical shifts of the ionizable amino acids : a guide for protein pKa measurements. *Journal of Biomolecular NMR*, 60(2-3):109–129, novembre 2014.
- Plaumann M., Pelzer-Reith B., Martin W. F. et Schnarrenberger C. Multiple recruitment of class-I aldolase to chloroplasts and eubacterial origin of eukaryotic class-II aldolases revealed by cDNAs from *Euglena gracilis*. *Current Genetics*, 31(5):430–438, mai 1997.

- Qamar S., Marsh K. et Berry A. Identification of arginine 331 as an important active site residue in the Class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Protein Science*, 5(1):154–161, janvier 1996.
- Riahi S., Roux B. et Rowley C. N. QM/MM molecular dynamics simulations of the hydration of Mg(II) and Zn(II) ions. *Canadian Journal of Chemistry*, 91(7):552–558, juillet 2013.
- Riccardi D. et Cui Q.  $pK_a$  Analysis for the zinc-bound water in human carbonic anhydrase II : Benchmark for “multiscale” QM/MM simulations and mechanistic implications. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(26):5703–5711, juillet 2007.
- Richard J. P. Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction’s physiological significance. *Biochemistry*, 30(18):4581–4585, mai 1991.
- Richard J. P. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochemical Society Transactions*, 21(2):549–553, mai 1993.
- Richards F. M. The protein folding problem. *Scientific American*, 264(1):54–7, 60–63, janvier 1991.
- Richards O. C. et Rutter W. J. Preparation and properties of yeast aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 236(12):3177–3184, décembre 1961.
- Riordan J. F. et Christen P. Carbanion intermediates in the reaction of yeast and muscle aldolase. *Biochemistry*, 8(6):2381–2386, juin 1969.
- Rodaki A., Young T. et Brown A. J. P. Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans* : Implications for antifungal drug target discovery. *Eukaryotic Cell*, 5(8): 1371–1377, août 2006.

- Rogers M. et Keeling P. J. Lateral transfer and recompartimentalization of Calvin cycle enzymes of plants and algae. *Journal of Molecular Evolution*, 58(4):367–375, avril 2004.
- Rose I. A., O'Connell E. L. et Mehler A. H. Mechanism of the aldolase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 240(4):1758–1765, avril 1965.
- Rose I. A. et Rieder S. V. Studies on the mechanism of the aldolase reaction isotope exchange reactions of muscle and yeast aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 231(1):315–329, mars 1958.
- Roux B., Yu H. A. et Karplus M. Molecular basis for the Born model of ion solvation. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(11):4683–4688, mai 1990.
- Roux C., Bhatt F., Foret J., de Courcy B., Gresh N., Piquemal J.-P., Jeffery C. J. et Salmon L. The reaction mechanism of type I phosphomannose isomerases : new information from inhibition and polarizable molecular mechanics studies. *Proteins*, 79(1):203–220, janvier 2011.
- Rupp B. *Biomolecular Crystallography*. Garland Science, 2009.
- Rutter W. J. Evolution of aldolase. *Federation Proceedings*, 23:1248–1257, décembre 1964.
- Saber M., Diab T., Hammam O., Karim A., Medhat A., Khela M. et El-Dabaa E. Protective and anti-pathology effects of Sm fructose-1,6-bisphosphate aldolase-based DNA vaccine against schistosoma mansoni by changing route of injection. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(2):155–163, avril 2013.
- Salama N. R., Shepherd B. et Falkow S. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 186(23):7926–7935, décembre 2004.

- Šali A. et Blundell T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3):779–815, décembre 1993.
- Sánchez L. B., Horner D. S., Moore D. V., Henze K., Embley T. M. et Müller M. Fructose-1,6-bisphosphate aldolases in amitochondriate protists constitute a single protein subfamily with eubacterial relationships. *Gene*, 295(1):51–59, juillet 2002.
- Schneider D. A. et Gourse R. L. Changes in Escherichia coli rRNA promoter activity correlate with changes in initiating nucleoside triphosphate and guanosine 5' diphosphate 3'-diphosphate concentrations after induction of feedback control of ribosome synthesis. *Journal of Bacteriology*, 185(20):6185–6191, octobre 2003.
- Schray K. J., Fishbein R., Bullard W. P. et Benkovic S. J. The anomeric form of D-fructose 1, 6-bisphosphate used as substrate in the muscle and yeast aldolase reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 250(13):4883–4887, 1975.
- Schwelberger H. G., Kohlwein S. D. et Paltauf F. Molecular cloning, primary structure and disruption of the structural gene of aldolase from Saccharomyces cerevisiae. *European Journal of Biochemistry*, 180(2):301–308, mars 1989.
- Senn H. M. et Thiel W. QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7):1198–1229, février 2009.
- Shams F., Oldfield N. J., Lai S. K., Tunio S. A., Wooldridge K. G. et Turner D. P. J. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase of Neisseria meningitidis binds human plasminogen via its C-terminal lysine residue. *MicrobiologyOpen*, 5(2):340–350, avril 2016.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D. et Higgins D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1):539, janvier 2011.

- Smith G. M. et Mildvan A. S. Nuclear magnetic resonance and chemical modification studies of the role of the metal in the yeast aldolase. *Biochemistry*, 20(15):4340–4346, juillet 1981.
- Smith G. M., Mildvan A. S. et Harper E. T. Nuclear relaxation studies of the interaction of substrates with a metalloaldolase from yeast. *Biochemistry*, 19(6):1248–1255, mars 1980.
- Solomons T. W. G. et Fryhle C. B. *Organic chemistry*. John Wiley, Hoboken, NJ, 9th ed édition, 2008.
- Sousa S. F., Fernandes P. A. et Ramos M. J. Molecular dynamics simulations : difficulties, solutions and strategies for treating metalloenzymes. Dans Paneth P. et Dybala-Defratyka A., éditeurs, *Kinetics and Dynamics*, pages 299–330. Springer Netherlands, Dordrecht, 2010.
- St-Jean M. et Sygusch J. Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42): 31028–31037, août 2007.
- St-Jean M. *Multifonctionnalité de l'aldolase glycolytique : mécanisme catalytique et interaction avec un peptide de la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich*. Thèse de doctorat, Université de Montréal, mai 2008.
- St-Jean M., Izard T. et Sygusch J. A hydrophobic pocket in the active site of glycolytic aldolase mediates interactions with Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19):14309–14315, mai 2007.
- St-Jean M., Lafrance-Vanasse J., Liotard B. et Sygusch J. High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase substrate cleavage and induced fit. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29):27262–27270, juillet 2005.
- Stern R. et Höcker B. Catalytic versatility, stability, and evolution of the  $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme fold. *Chemical Reviews*, 105(11):4038–4055, novembre 2005.

- Stribling D. et Perham R. N. Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from *Escherichia coli* (Crookes' strain). *Biochemical Journal*, 131(4): 833–841, avril 1973.
- Su C. H., Merlie J. P. et Goldfine H. Rapid cessation of phospholipid synthesis in fructose-1,6-diphosphate aldolase mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 122(2):565–569, mai 1975.
- Sugita Y. et Okamoto Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*, 314(1-2):141–151, novembre 1999.
- Swenson C. A. et Barker R. Proportion of keto and aldehyde forms in solutions of sugars and sugar phosphates. *Biochemistry*, 10(16):3151–3154, août 1971.
- Szwergold B. S., Ugurbil K. et Brown T. R. Properties of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli* : an NMR analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(1):244–252, février 1995.
- Takayama S., McGarvey G. J. et Wong C.-H. Enzymes in organic synthesis : recent developments in aldol reactions and glycosylations. *Chemical Society Reviews*, 26(6): 407–415, janvier 1997.
- Tamames B., Sousa S. F., Tamames J., Fernandes P. A. et Ramos M. J. Analysis of zinc-ligand bond lengths in metalloproteins : Trends and patterns. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(3):466–475, juillet 2007.
- Thomson G. J., Howlett G. J., Ashcroft A. E. et Berry A. The *dhnA* gene of *Escherichia coli* encodes a Class I fructose bisphosphate aldolase. *Biochemical Journal*, 331(2): 437, avril 1998.
- Touw W. G., Baakman C., Black J., te Beek T. A. H., Krieger E., Joosten R. P. et Vriend G. A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Research*, 43(D1):D364–D368, janvier 2015.

- Trentham D. R., McMurray C. H. et Pogson C. I. The active chemical state of d-glyceraldehyde 3-phosphate in its reactions with d-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochemical Journal*, 114(1): 19–24, août 1969.
- Tung T. C., Ling K. H., Byrne W. L. et Lardy H. A. Substrate specificity of muscle aldolase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 14(4):488–494, août 1954.
- Tunio S. A., Oldfield N. J., Berry A., Ala'Aldeen D. A. A., Wooldridge K. G. et Turner D. P. J. The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis* : surface localization and role in host cell adhesion. *Molecular Microbiology*, 76(3):605–615, mai 2010.
- Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I. et Mackerell A. D. CHARMM general force field : A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, pages NA–NA, 2009.
- Vanommeslaeghe K. et MacKerell A. D. Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) I : Bond perception and atom typing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12):3144–3154, décembre 2012.
- Vanommeslaeghe K., Raman E. P. et MacKerell A. D. Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) II : Assignment of bonded parameters and partial atomic charges. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12):3155–3168, décembre 2012.
- Verlet L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review*, 159(1):98–103, juillet 1967.
- Voet D. et Voet J. G. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 3rd édition, 2004.

- Walsh J. L., Keith T. J. et Knull H. R. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 999(1):64–70, novembre 1989.
- Warburg O. et Christian W. [Isolation and crystallisation of the enzyme zymohexose]. *Biochemische Zeitschrift*, 314:149, 1943.
- Xin H. et Cutler J. E. Vaccine and monoclonal antibody that enhance mouse resistance to candidiasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(10):1656–1667, octobre 2011.
- Yu W., He X., Vanommeslaeghe K. et MacKerell A. D. Extension of the CHARMM general force field to sulfonyl-containing compounds and its utility in biomolecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 33(31):2451–2468, décembre 2012.
- Zgiby S., Plater A., Bates M., Thomson G. et Berry A. A functional role for a flexible loop containing Glu182 in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 315(2):131–140, janvier 2002.
- Zgiby S. M., Thomson G. J., Qamar S. et Berry A. Exploring substrate binding and discrimination in fructose1, 6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(6):1858–1868, mars 2000.
- Zhang J., Yang W., Piquemal J.-P. et Ren P. Modeling structural coordination and ligand binding in zinc proteins with a polarizable potential. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(4):1314–1324, avril 2012.