

Université de Montréal

**La tagatose-1,6-bisphosphate aldolase et
la fructose-1,6-bisphosphate aldolase de classe I :
mécanisme et stéréospécificité.**

par Clotilde Low-Kam

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctora en Biochimie

Août 2015

Clotilde Low-Kam 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**La tagatose-1,6-bisphosphate aldolase et
la fructose-1,6-bisphosphate aldolase de classe I :
mécanisme et stéréospécificité**

présentée par :

Clotilde Low-Kam

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand, président rapporteur

Jurgen Sygusch, directeur de recherche

Gerardo Ferbeyre, membre du jury

Casimir Blonski, évaluateur externe

Javier di Noia, représentant du doyen

Résumé

La tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de *Streptococcus pyogenes* est une aldolase qui fait preuve d'un remarquable manque de spécificité vis à vis de ses substrats. En effet, elle catalyse le clivage réversible du tagatose-1,6-bisphosphate (TBP), mais également du fructose-1,6-bisphosphate (FBP), du sorbose-1,6-bisphosphate et du psicose-1,6-bisphosphate, quatre stéréoisomères, en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Aldolase de classe I, qui donc catalyse sa réaction en formant un intermédiaire covalent obligatoire, ou base de Schiff, avec son substrat, la TBP aldolase de *S. pyogenes* partage 14 % d'identité avec l'enzyme modèle de cette famille, la FBP aldolase de muscle de mammifère. Bien que le mécanisme catalytique de la FBP aldolase des mammifères ait été examiné en détails et qu'il soit approprié d'en tirer des renseignements quant à celui de la TBP aldolase, le manque singulier de stéréospécificité de cette dernière tant dans le sens du clivage que celui de la condensation n'est toujours pas éclairci. Afin de mettre à jour les caractéristiques du mécanisme enzymatique, une étude structurale de la TBP aldolase de *S. pyogenes*, un pathogène humain extrêmement versatile, a été entreprise. Elle a permis la résolution des structures de l'enzyme native et mutée, en complexe avec des substrats et des inhibiteurs compétitifs, à des résolutions comprises entre 1.8 Å et 2.5 Å. Le trempage des cristaux de TBP aldolase native et mutante dans une solution saturante de FBP ou TBP a en outre permis de piéger un authentique intermédiaire covalent lié à la Lys205, la lysine catalytique. La détermination des profils pH de la TBP aldolase native et mutée, entreprise afin d'évaluer l'influence du pH sur la réaction de clivage du FBP et

TBP et identifier le(s) résidu(s) impliqué(s), en conjonction avec les données structurales apportées par la cristallographie, ont permis d'identifier sans équivoque Glu163 comme résidu responsable du clivage. En effet, le mode de liaison sensiblement différent des ligands utilisés selon la stéréochimie en leur C3 et C4 permet à Glu163, équivalent à Glu187 dans la FBP aldolase de classe I, d'abstraire le proton sur l'hydroxyle du C4 et ainsi d'amorcer le clivage du lien C3-C4. L'étude du mécanisme inverse, celui de la condensation, grâce par exemple à la structure de l'enzyme native en complexe avec ses substrats à trois carbones le DHAP et le G3P, a en outre permis d'identifier un isomérisme du substrat G3P comme possible cause de la synthèse des isomères en C4 par cette enzyme. Ce résultat, ainsi que la découverte d'un possible isomérisme *cis-trans* autour du lien C2-C3 de la base de Schiff formée avec le DHAP, identifié précédemment, permet de cerner presque complètement les particularités du mécanisme de cette enzyme et d'expliquer comment elle est capable de synthétiser les quatre stéréoisomères 3(*S/R*), 4(*S/R*). De plus, la résolution de ces structures a permis de mettre en évidence trois régions très mobiles de la protéine, ce qui pourrait être relié au rôle postulé de son isozyme chez *S. pyogenes* dans la régulation de l'expression génétique et de la virulence de la bactérie.

Enfin, la résolution de la structure du mutant Lys229→Met de la FBP aldolase de muscle en complexe avec la forme cyclique du FBP, de même que des études cristallographiques sur le mutant équivalent Lys205→Met de la TBP aldolase de *S. pyogenes* et des expériences de calorimétrie ont permis d'identifier deux résidus particuliers, Ala31 et Asp33 chez la FBP aldolase, comme possible cause de la

discrimination de cette enzyme contre les substrats 3(*R*) et 4(*S*), et ce par encombrement stérique des substrats cycliques.

La cristallographie par rayons X et la cinétique enzymatique ont ainsi permis d'avancer dans l'élucidation du mécanisme et des propriétés structurales de cette enzyme aux caractéristiques particulières.

Mots-clés : *Streptococcus pyogenes*, tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, fructose-1,6-bisphosphate aldolase, aldolase de classe I, clivage et condensation aldolique, base de Schiff, stéréospécificité et manque de, énantiométrie, mécanisme enzymatique enzymologie, profil pH, calorimétrie isotherme, structure, cristallographie par rayons X.

Abstract:

Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase from *Streptococcus pyogenes* is a class I aldolase that shows a lack of stereospecificity that is rare in enzymes in general, and in aldolases in particular. This aldolase catalyzes the reversible cleavage of tagatose-1,6-bisphosphate (TBP), fructose-1,6-bisphosphate (FBP), sorbose-1,6-bisphosphate and psicose-1,6-bisphosphate, four stereoisomers, in dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and glyceraldehyde-3-phosphate (G3P).

A class I aldolase, the aldolase TBP *S. pyogenes* shares 14 % identity with the model enzyme of this family, mammalian FBP aldolase. Although the catalytic mechanism of the class I FBP aldolase has been examined in detail and it is appropriate to infer information as to the class I TBP aldolase, the singular lack of specificity of the latter enzyme both in the direction of cleavage and condensation is still not elucidated. To better comprehend the characteristics of the enzymatic mechanism, a structural study of the TBP aldolase of *S. pyogenes*, an extremely versatile human pathogen, has been undertaken. It has allowed the resolution of high resolution structures of the native and mutated enzyme in complex with substrates and competitive inhibitors. These same structures allowed us to gain information as to the active site of the enzyme in general and the catalytic residues in particular. TBP aldolase native and mutated soaked in a saturated solution of FBP or TBP also trapped an iminium intermediate covalently bound to Lys205, the Schiff base-forming lysine. The determination of the pH profiles of the native and mutated enzyme, carried out to assess the influence of pH on FBP and TBP cleavage and identify the residue(s) involved, in conjunction with the structural

data provided by crystallography, identified unequivocally Glu163, corresponding to Glu187 in FBP aldolase, as the residue responsible for substrate cleavage. The substantially different binding mode of the ligands, according to the stereochemistry of their C3 and C4 carbons, indeed allows Glu163 to abstract the proton in C3-OH and thus initiate C3-C4 bond cleavage. The study of the inverse mechanism, the condensation one, using for instance the crystallographic structure of native TBP aldolase in complex with DHAP and G3P, its three carbons substrates, has led us to believe that a possible isomerism of the G3P substrate was the reason for the synthesis of both C4 isomers by this enzyme.

This result, as well as the discovery of a possible *cis-trans* isomerism around the C2-C3 bond of the Schiff base formed with DHAP, identified previously, almost completely elucidated the features of this enzyme's mechanism. In addition, these structures have highlighted three highly mobile regions of the protein, which may be related to the role of its isozyme in the regulation of gene expression and virulence in *S. pyogenes*.

Lastly, the resolution of the structure of the FBP aldolase mutant Lys229 → Met in complex with the cyclic form of FBP, as well as crystallographic studies of the corresponding mutant in TBP aldolase, Lys205→Met and ITC experiments, allowed the identification of two particular residues, Ala31 and Asp33 in FBP aldolase, as responsible for this enzyme discrimination against 3(*R*) 4(*S*) substrates, by steric hindrance of the cyclic substrates.

X-ray crystallography, enzyme kinetics and isothermal calorimetry thus enabled advances in the elucidation of the mechanism and structural properties of this enzyme with singular characteristics.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, fructose-1,6-bisphosphate aldolase, class I aldolase, aldol cleavage and condensation, Schiff base, stereospecificity and lack thereof, enantiomerism, enzyme mechanism, enzymology, pH profile, isothermal calorimetry, structure, X-rays crystallography.

Table des matières:

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures	xvi
Liste des abréviations	xx
CHAPITRE1: Introduction	1
1.1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	1
1.1.1 Histoire et classification des streptocoques.....	1
1.1.2 Bactériologie de <i>Streptococcus pyogenes</i>	4
1.1.3 Constituants cellulaires, produits extracellulaires et virulence associée.....	7
1.1.4 Pathogénèse.....	13
1.1.5 Métabolisme.....	16
1.2 Les aldolases.....	20
1.2.1 Généralités et classification.....	20
1.2.2 Structure tridimensionnelle.....	22
1.2.3 Site actif et mécanisme.....	24
1.2.3.1 Lysines.....	29
1.2.3.2 Arginines.....	30

1.2.3.3 Acides glutamiques.....	31
1.2.3.4 Acide aspartiques	32
1.2.3.4 Autre « résidu » important :	
le C-terminal.....	33
1.2.4 L'aldolase et ses substrats.....	34
1.2.4.1 Condensation.....	34
1.2.4.2 Clivage.....	35
1.2.4.2.1 Anomères du FBP en solution.....	37
1.2.5 L'aldolase et ses inhibiteurs.....	40
1.2.6 Les aldolases des streptocoques : la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de <i>S. pyogenes</i>	41
1.3 Stéréospécificité des aldolases et synthèse chimique :	
avancées récentes.....	48
1.3.1 Modifier la spécificité pour le substrat.....	48
1.3.2 Modifier le contrôle stéréochimique de la réaction.....	53
1.3.3 Stabilité des aldolases pour utilisation en synthèse.....	55
1.3.4 Design <i>de novo</i> d'aldolases.....	55
1.4 Objectif du projet de recherche.....	57
1.4.1 Résidu responsable du transfert stéréospécifique du proton au C3 du DHAP.....	57
1.4.2 Résidu responsable du clivage rétro-aldolique.....	60
1.4.3 Différences entre les TBP et FBP aldolases de classe I : ouverture du cycle furanose du substrat.....	62

1.5 Méthodes.....	63
1.5.1 Purification et cristallisation de la TBP aldolase de <i>S. pyogenes</i>	63
1.5.2 Diffraction des rayons X.....	66
1.5.2.1 Trempage et congélation des cristaux.....	66
1.5.2.2 Diffraction des cristaux.....	67
1.5.2.3 Analyse des résultats de diffraction.....	78
1.5.2.4 Phasage.....	83
1.5.2.5 Affinement et Modélisation.....	85
1.5.2.6 Validation.....	87
1.5.3 Cinétiques enzymatiques.....	89
1.5.3.1 Essai couplé.....	89
1.5.3.4 Cinétiques de profil pH.....	93
1.5.3.2 Hexacyanoferrate III.....	93
1.5.3.3 Marquage isotopique.....	94
1.5.4 Calorimétrie Isothermale (<i>IsoThermal Calorimetry</i> , ITC).....	94

CHAPITRE 2 : Article 1	97
Abstract.....	98
Introduction.....	100
Experimental Procedures.....	104
Footnotes.....	110
Results.....	111
Discussion.....	118
Figures and tables.....	126
References.....	151
CHAPITRE 3 : Article 2	154
Abstract.....	155
Introduction.....	157
Experimental Procedures.....	161
Footnotes.....	164
Results.....	165
Discussion.....	169
Figures and tables.....	175
References.....	188

CHAPITRE 4 : Discussion et Conclusion	191
CHAPITRE 5 : Perspectives	207
5.1 Stéréospécificité.....	207
5.2 Mouvements conformationnels.....	208
5.3 Role dans la virulence de <i>S. pyogenes</i>	209
Références	212

Liste des tableaux

Tableau I : Taxonomie de *Streptococcus pyogenes*

Tableau II : Infections et pathogénies de *S. pyogenes*

Tableau III : Aldolases pyruvate-dépendantes (non exhaustif)

Tableau IV : Aldolases DHAP-dépendantes (non exhaustif)

Article 1

Table IA : Data collection and refinement statistics for the wild type TBP aldolase.

Table IB : Data collection and refinement statistics for the TBP aldolase Glu163Gln.

Table II : R.m.s.d of the alignment of the wild-type with the Glu163Gln mutant TBP aldolase native, in complex with FBP, TBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂

Table III : Kinetics parameters of FBP and TBP cleavage reaction for wild type and mutant Glu163Gln aldolase assayed at pH 7.5.

Table IV : Active site dimensions of wild type and Glu163Gln mutant TBP aldolase from *S. pyogenes*, and of wild type and Glu187Gln mutant FBP aldolase from rabbit muscle.

Table SI : Parameters of binding of DHAP, hexitol-P₂ and talitol-P₂ with FBP aldolase from rabbit muscle and TBP aldolase of *S. pyogenes* as determined by calorimetric titration.

Article 2

Table IA : Data collection and refinement statistics for the FBP aldolase K229M mutant.

Table IB : Data collection and refinement statistics for the TBP aldolase K205M mutant.

Table II : Parameters of binding of FBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂ with K229M mutant FBP aldolase of rabbit muscle as determined by calorimetric titration.

Table III : Parameters of binding of FBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂ with K205M mutant TBP aldolase of *S. pyogenes* as determined by calorimetric titration.

Liste des figures :

Figure 1 : Rebecca Lancefield.

Figure 2 : **A.** Bêta-hémolyse sur agar contenant du sang. **B.** *Streptococcus pyogenes* en division sous le microscope, grossissement x 900.

Figure 3 : Schéma des constituants cellulaires de *S. pyogenes*.

Figure 4 : Molécule d'acide hyaluronique.

Figure 5 : Métabolisme du glucose de *S. pyogenes*.

Figure 6 : Voie du tagatose-6-phosphate.

Figure 7 : **A.** Homotétramère de la FBP aldolase de mammifère, vu parallèlement à l'axe du tonneau bêta. **B.** Sous-unité de la FBP aldolase de mammifère vue parallèlement à l'axe du tonneau bêta.

Figure 8 : Site actif de la FBP aldolase de mammifère.

Figure 9 : Mécanisme de condensation de la FBP aldolase de mammifère.

Figure 10 : Mécanisme de clivage de la FBP aldolase de mammifère.

Figure 11 : Structures du DHAP, du G3P et analogues.

Figure 12 : Structures du FBP et analogues.

Figure 13 : Anomères du FBP en solution.

Figure 14 : FBP cyclique au site actif de la FBP aldolase de *T. tenax*.

Figure 15 : Mécanisme d'ouverture du cycle tel que proposé par Lorentzen *et al.* 2005.

Figure 16 : Structures des quatre hexoses biphosphorylés clivés par la TBP aldolase de *S. pyogenes*

Figure 17 : Synthèse du TBP et du FBP par la TBP aldolase de *S. pyogenes*.

Figure 18 : Monomère de la FBP aldolase de mammifère (A.) et de la TBP aldolase de *S. pyogenes* (B.).

Figure 19 : Alignement du site actif de la TBP aldolase de *S. pyogenes* et de la FBP aldolase de mammifère.

Figure 20 : A. Le N-acétyl mannosamine et B. le L-arabinose.

Figure 21 : Isomérisation de l'intermédiaire carbanion formé entre le DHAP et le site actif de la TBP aldolase.

Figure 22 : Diagramme de phase selon la concentration en protéine et en agent précipitant.

Figure 23 : Cristaux de TBP aldolase de *S. pyogenes*

Figure 24 : Un cristal, sa *unit cell* et son unité asymétrique.

Figure 25 : Schéma d'une expérience de diffraction des rayons X.

Figure 26 : William Henry Bragg et William Lawrence Bragg.

Figure 27 : Représentation géométrique de la loi de Bragg.

Figure 28 : Plans dans une cellule unitaire.

Figure 29 : Espace réel et espace réciproque.

Figure 30 : A. Jean Baptiste Joseph Fourier (1768-1830) et B. Représentation graphique de l'analyse de Fourier.

Figure 31 : Patron de diffraction de la TBP aldolase de *S. pyogenes*

Figure 32 : Analyse d'un patron de diffraction par le programme HKL2000.

- Figure 33 :** Limite de résolution d'une image de diffraction.
- Figure 34 :** Diagramme de Ramachandran.
- Figure 35 :** Essai couplé de l'activité aldolasique.
- Figure 36 :** Courbe et équation de Michaelis-Menten.
- Figure 37 :** Maud Menten.
- Figure 38 :** **A.** Schéma d'un microcalorimètre et **B.** Isotherme type.
- Figure 39 :** Mécanisme de décyclisation catalysé par la FBP aldolase de mammifère.
- Figure 40 :** Vue stéréo de la superposition des intermédiaires base de Schiff formés par diverses aldolase de classe I.
- Figure 41 :** Alignement de séquence primaire entre LacD.1 (LACD1_STRP1) et LacD.2 (LACD2_STRP1) de *S. pyogenes*.

Article 1

- Figure 1:** TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with TBP at acidic pH
- Figure 2:** TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with FBP at acidic pH.
- Figure 3:** TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with talitol-P₂.
- Figure 4:** TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with hexitol-P₂
- Figure 5:** Glu163Gln mutant of TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with FBP.
- Figure 6:** pH activity profiles for wild type and Glu163Gln point mutant.

Figure S1: Stereoview of the active site of the wild-type (green) and Glu163Gln mutant (cyan) TBP aldolase from *S. pyogenes*.

Figure S2: Superposition of the crystal structures of unliganded and FBP bound as Schiff base TBP aldolase from *S. pyogenes* with unliganded and FBP bound as Schiff base mammalian FBP aldolase.

Figure S3: Modeling of Schiff base intermediates with 3(*R*)-4(*S*)-psicose-P₂ and 3(*R*)-4(*R*)-sorbose-P₂ in the active site of the TBP aldolase from *S. pyogenes* bound to TBP and FBP.

Article 2

Figure 1.A: Modeling of all four 3(*R/S*)-4(*R/S*) diastereoisomers fitted into the mammalian FBP aldolase active site.

Figure 1.B: Modeling of all four 3(*R/S*)-4(*R/S*) diastereoisomers fitted into the mammalian FBP aldolase active site.

Figure 2: α -anomer of FBP bound by mammalian class I FBP aldolase K229M mutant.

Figure 3: β -anomer of FBP bound by mammalian class I FBP aldolase K229M mutant.

Figure 4. A: Isothermal titration calorimetry isotherm for the interaction of FBP with FBP aldolase K229M mutant.

Figure 4. B: Isothermal titration calorimetry isotherm for the interaction of FBP with FBP aldolase K229M mutant.

Figure 5: Modeling of all four 3(*R/S*)-4(*R/S*) diastereoisomers, as cyclic β anomers, fitted into the mammalian FBP aldolase active site.

Liste des abréviations utilisées:

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
C-terminal	Carboxy-terminal
Cys	Cystéine
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
EC	<i>Enzyme Commission</i>
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
F1P	Fructose-1-phosphate
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAS	<i>Group A Streptococcus</i>
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
Hexitol-P ₂	Hexitol-1,6-bisphosphate
ITC	<i>IsoThermal Calorimetry</i>
K	Kelvin

k_{cat}	Constante catalytique
kDa	kilo Dalton
K_i	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis
ITC	<i>Isothermal Calorimetry</i>
Lys	Lysine
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
Met	Methionine
mg	Milligramme
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
mM	Millimolaire
μM	Micromolaire
N-terminal	Amino-terminal
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pi	Phosphate inorganique
Psicose-P ₂	Psicose-1,6-bisphosphate
RMA	Rabbit Muscle Aldolase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SAD	<i>Single Anomalous Dispersion</i>
Ser	Serine
Sorbose-P ₂	Sorbose-1,6-bisphosphate

Talitol-P ₂	Talitol-1,6-bisphosphate
TBP	Tagatose-1,6-bisphosphate
TIM	Triose-phosphate isomérase
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
U	Unité d'activité enzymatique (μmol de substrat transformé par minute)

À mon père.

*To my loved ones;
you know who you are.*

CHAPITRE 1: Introduction

1.1 *Streptococcus pyogenes*

1.1.1 Histoire et classification des streptocoques

(Low-Kam 2010, Mémoire de maîtrise)

La première description de la croissance en chaîne de micro-organismes globulaires a été faite par le chirurgien Viennois Theodor Billroth en 1874 (Peuckert 1985), à partir d'exsudats de blessures ouvertes infectées (Billroth 2003). Ces mêmes organismes, finalement nommés *streptococci* (du grec *streptos*, tordable comme une chaîne, et *coccus*, micro-organisme sphérique), étaient presque au même moment isolés de la gorge de patients affectés de scarlatine, et du sang d'individus présentant la fièvre puerpérale (Whiffin 1903). Bien que de prime abord, il ait semblé que chaque type de maladie streptocoquale soit causé par une variété différente de streptocoques, ce que semblait corroborer le nombre sans cesse grandissant de types différents isolés chez l'homme et chez l'animal, il devint bientôt clair que dans les faits une seule variété de streptocoques pouvait provoquer une multitude de maladies (Sherman and Albus 1918, Evans 1936). C'est Schottmuller puis Brown qui, en 1903 et 1919, proposèrent que les streptocoques soient classifiés selon leur capacité à hémolyser les érythrocytes (Schottmuller 1903, Brown 1919, Budelmann 1969). Le terme alpha (hémolyse partielle), bêta (hémolyse complète), et gamma (pas d'hémolyse) hémolyse fut introduit

quelques années plus tard. Il faut noter que la classification des streptocoques basée sur l'hémolyse est loin de faire l'unanimité (Horstmeier and Washington 1973), et ce pour plusieurs raisons : certaines souches de certains streptocoques, considérées comme non hémolytiques après une incubation de 24 heures, peuvent présenter une alpha-hémolyse après 24 à 48 heures d'incubation supplémentaires (Jassim, Salt et al. 1989). De même, certaines variétés, considérées comme étant bêta-hémolytiques, sont en fait non hémolytiques dans certaines conditions (Orden, Navarro et al. 1991). Malgré ces défauts, c'est ce système qui est le plus largement employé, encore de nos jours, pour classer les streptocoques, l'un des groupes les plus large et hétérogène du règne bactérien (Evans 1936).



Figure 1 : Rebecca Craighill Lancefield (1895-1981). Professeur de microbiologie à Columbia, elle fut la seconde femme à devenir présidente de la *Society of American Bacteriologists* en 1943, et la première présidente de l'*American Association of Immunologists* en 1961.

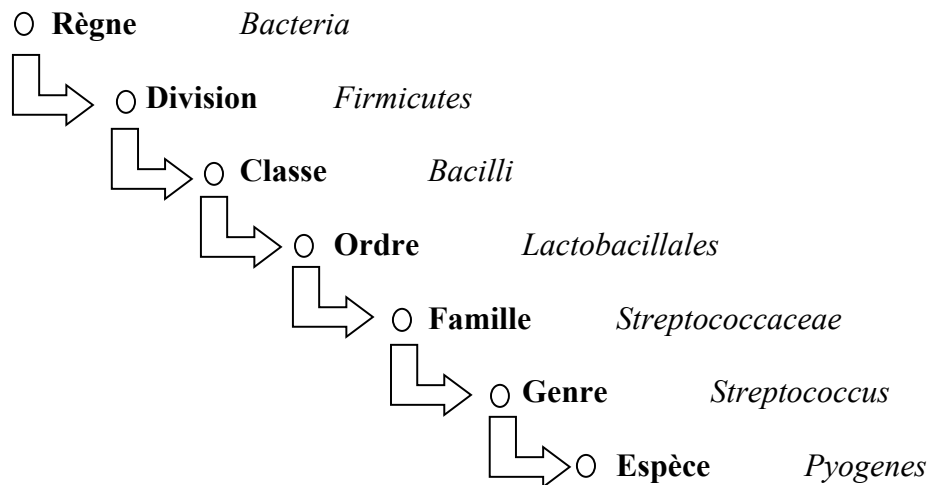
Dans les années 1930, Rebecca Lancefield (Figure 1) s'attacha à avancer un peu plus la classification des streptocoques en différenciant quinze groupes immunologiques (A à O) parmi les streptocoques bêta-hémolytiques (Lancefield 1933). C'est la nature d'un sucre sur la surface de la bactérie qui est immunogénique et discriminant. Le groupe A, au sein duquel sont retrouvés la majorité des streptocoques infectant l'homme, fut

ensuite subdivisé en différents types antigéniques selon la nature d'une protéine de surface (Davis 1973), et contient *Streptococcus pyogenes*.

1.1.2. Bactériologie de *S. pyogenes*

Au sein du règne bactérien, de la classe *Bacilli* et de l'ordre *Lactobacillales*, la famille *Streptococcaceae* est divisée en trois genres : *streptococcus*, *lactococcus* et *enterococcus* (Bottone 2006).

Tableau I : Taxonomie de *Streptococcus pyogenes*



Comme ses congénères du genre *Streptococcus*, l'espèce *S. pyogenes* se présente sous la forme de chaînes de cellules (Figure 2). *In vivo* néanmoins, elle est souvent trouvée sous forme de *diplococci*. Il semble en effet que la longueur de la chaîne soit inversement proportionnelle à la disponibilité en nutriments dans le milieu (Stollerman and Ekstedt 1957). Après division d'un *coccus* individuel, si la paire résultante ou *diplococcus* ne se sépare pas de ses voisines, il y a allongement subséquent de la chaîne. La préservation de la paroi intercoquale et donc la non-séparation du *diplococcus* du reste de la chaîne est promue par des conditions défavorables à la croissance (antibiotiques, manque de nutriments, froid par exemple), de même que par la présence d'anticorps contre les antigènes de la paroi de la bactérie (Iacono, Byrnes et al. 1985) (Stollerman and Ekstedt 1957, Lominski and Shaikh 1968).

Les streptocoques sont des bactéries Gram-positives, du fait de la couleur mauve qu'elles adoptent après avoir été colorées à la coloration de Gram, coloration mettant en évidence des caractéristiques de la paroi cellulaire. D'après le critère d'hémolyse, l'espèce *Streptococcus pyogenes* est donc une bactérie bêta-hémolytique (Figure 2), c'est à dire qu'elle provoque la complète destruction des érythrocytes lorsque cultivée sur de l'agar contenant du sang (Brooks 2007). De plus, selon la classification de Rebecca Lancefield, *S. pyogenes* fait partie du groupe A des streptocoques (Evans 1936) ; elle présente donc le le rhamnose-N-acetylgalactosamine dans sa paroi cellulaire.

Enfin, c'est une bactérie non motile, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas de flagelles moteurs, et elle ne forme pas de spores.

A.



B.



Figure 2: **A.** Bêta-hémolyse sur agar contenant du sang. **B.** *S. pyogenes* en division sous le microscope, grossissement x 900 : Les chaînes de cellules sont caractéristiques du genre *Streptococcus* et lui ont donné son nom.

Images tirées de la *Public Health Image Library*, sous l'égide du *Center for Disease Control and Prevention* du *United States Department of Health and Human Services* (domaine public).

1.1.3 Constituants cellulaires, produits extra-cellulaires et virulence associée

Les constituants cellulaires spécifiques des streptocoques de groupe A en général, et de *S. pyogenes* en particulier, sont présents à l'extérieur de la membrane cytoplasmique de la bactérie et comprennent (Figure 3):

- Antigène C spécifique du groupe : La classification des streptocoques bêta-hémolytiques en quinze groupes immunologiques A à O se fait selon la présence de sucres (*carbohydrates C*) dans leur paroi cellulaire. Dans le cas du groupe A, le rhamnose-N-acetylgalactosamine peut constituer jusqu'à 10 % de la masse nette du micro-organisme (Fung, Wicher et al. 1982). La spécificité immunologique du sucre réside principalement dans la nature du saccharide terminal sur la chaîne rhamnose, le N-acetylgalactosamine chez le groupe A (Coligan, Schnute et al. 1975, Pritchard, Coligan et al. 1981) (Karaky, Araj et al. 2014).
- Antigène M spécifique du type : Chez les streptocoques bêta-hémolytiques, le groupe A peut être subdivisé en plus d'une centaine de types sérologiques selon l'antigène M protéique de leur paroi cellulaire (Bottone 2006, Kahn, Morgelin et al. 2008). C'est l'un des plus notables facteurs de virulence de *S. pyogenes*, en effet responsable de la résistance de la bactérie à la phagocytose (Fischetti 1989). L'absence de cette protéine chez un sérotype de *S. pyogenes* se traduit par un manque de virulence (Brooks 2007) (Fiebig, Loof et al. 2015).

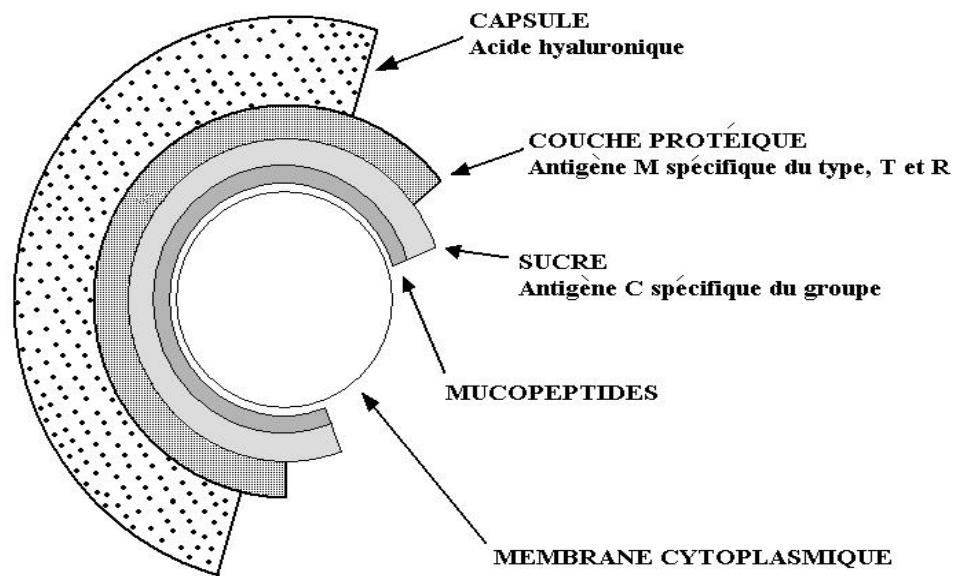


Figure 3 : Schéma des constituants cellulaires de *S. pyogenes*.

- La capsule d'acide hyaluronique : Un autre élément participant grandement à la virulence de la bactérie est sa capsule d'acide hyaluronique (Figure 4) (Okamoto, Kawabata et al. 2004, Gryllos, Tran-Winkler et al. 2008) (Mirjamali, Soufian et al. 2014). Moins étudiée et peut-être un peu négligée du fait de son caractère évanescent (elle disparaît chez les cellules en culture artificielle, possiblement en raison de l'accumulation dans le milieu de l'hyaluronidase exprimée par la bactérie elle-même), et non immunogénique (car indifférentiable chimiquement de l'acide hyaluronique des tissus conjonctifs de l'hôte), elle est néanmoins de première importance (Stollerman and Dale 2008) (Henningham, Yamaguchi et al. 2014). De concert avec la protéine M, elle permet en effet à la bactérie de se jouer de la phagocytose.

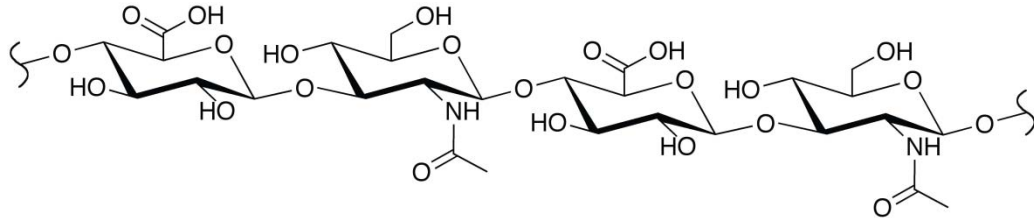


Figure 4 : Molécule d'acide hyaluronique, un polymère de disaccharides (l'acide D-glucuronique et le D-N-acétylglucosamine) liés entre eux par des liaisons glycosidiques.

- La protéine F : Cette protéine permet d'augmenter la capacité de *S. pyogenes* à adhérer aux tissus hôtes, en se liant à la fibronectine des tissus conjonctifs (Hanski, Horwitz et al. 1992) (Lee and Caparon 1996).

Viennent ensuite les toxines et enzymes exprimées par *S. pyogenes*. Il semble certain aujourd'hui (Nakamura, Hasegawa et al. 2004) que la grande variété de maladies causées par les streptocoques de groupe A soit corrélée au grand nombre de produits extra-cellulaires exprimés par ces bactéries, dont voici quelques exemples.

- Les toxines érythro- ou pyrogéniques : *S. pyogenes* exprime une variété d'exotoxines, dont les exotoxines A, B, C, G, H, J, K, et L (Bisno 2003). Les exotoxines A et C par exemple, SpeA et SpeC (pour *Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A et C*), historiquement connues comme les toxines de la scarlatine, se

lient au complexe d'histocompatibilité de classe II dans la région V β du récepteur des cellules T. Elles agissent ainsi comme des super-antigènes et provoquent la destruction des tissus de l'hôte en stimulant la production incontrôlable de certaines cytokines, ce qui active différentes cascades fibrinolytiques et amène hypotension et défaillance polyviscérale (Oelschlaeger 2000) (Beema Shafreen, Selvaraj et al. 2014). Ces toxines sont de nature protéique (Dong, Xu et al. 2008, Fraser and Proft 2008). La toxine B, ou SpeB, est une protéase à cystéine, qui est en fait la protéine la plus abondamment sécrétée par *S. pyogenes*. Elle a une activité endopeptidase et est capable de s'attaquer à la matrice extra-cellulaire de l'hôte, à ses immunoglobulines et aux composants de son complément immunitaire, en plus d'être à même d'indirectement stimuler la production de molécules au rôle biologique important, comme l'interleukine-1 ou encore l'histamine (Bisno 2003, Chiang-Ni and Wu 2008) (Wang, Gonzalez-Paez et al. 2015).

- Les streptolysines S et O : Ces deux hémolysines sont responsables de la β -hémolyse caractéristique des streptocoques du groupe A. La streptolysine O doit son nom au fait qu'elle soit inactivée par la présence d'oxygène, alors que ce facteur n'a aucun effet sur la streptolysine S (Flaherty, Puricelli et al. 2015). On peut également ajouter que la streptolysine S, bien que présentée ici comme une exotoxine, reste en fait largement attachée à la paroi cellulaire de *S. pyogenes* (Fontaine, Lee et al. 2003) (Molloy, Casjens et al. 2015). La streptolysine O est, elle, strictement extra-cellulaire (Mozola and Caparon 2015). Toutes deux

peuvent, outre celle des érythrocytes, abîmer les parois d'autres cellules hôtes, comme les leucocytes et les macrophages (Goldmann, Sastalla et al. 2009).

- La streptokinase : Il en existe deux isozymes (A et B) au sein du groupe A des streptocoques. Il semble que cette enzyme digestive soit capable de s'attaquer aux barrières de fibrine érigées par l'hôte autour des lésions streptocoquales (Nelson 2004), permettant la propagation extrêmement rapide de la bactérie (Chhatwal and McMillan 2005) (Assiri, El-Gamal et al. 2014). Il est intéressant de noter que cette enzyme est l'un des facteurs les plus importants de la spécificité des infections streptocoquales pour l'homme : l'interaction de la streptokinase de la bactérie avec le plasminogène humain est en effet cruciale dans le cadre d'une pathogénèse streptocoquale (Sun, Ringdahl et al. 2004) (Nitzsche, Rosenheinrich et al. 2015).
- La hyaluronidase : Cette autre enzyme digestive exprimée par *S. pyogenes* a un effet lytique sur les tissus conjonctifs de l'hôte, et lui permet donc également une propagation rapide (Hynes, Dixon et al. 2000). Il est curieux de remarquer, comme cela a été déjà mentionné, que cette enzyme peut dans certains cas s'attaquer à la capsule d'acide hyaluronique de la bactérie elle-même, mais que chez certaines souches de la bactérie, l'enzyme exprimée ne soit pas assez active pour lui attribuer ce rôle (Henningham, Yamaguchi et al. 2014). L'hypothèse de l'utilisation de l'acide hyaluronique (de l'hôte ou de la bactérie), comme source d'énergie alternative pour la bactérie a d'ailleurs déjà été formulée (Starr and Engleberg 2006).

S. pyogenes exprime et excrète de nombreuses autres protéines, comme des protéines de choc thermique, une streptodornase, une ADN dépolymérase, une ADNase, ou encore une α -amylase (Nakamura, Hasegawa et al. 2004).

Enfin, la simple sensibilité de la bactérie vis-à-vis de son environnement et de la disponibilité en nutriments constitue un mécanisme grâce auquel *S. pyogenes* peut progresser de la simple colonisation à la pathogénie caractérisée (Fung, Wicher et al. 1982, Rosch and Tuomanen 2007) (Loughman and Caparon 2006) (Loughman and Caparon 2007, Cusumano and Caparon 2013). Ainsi, sa tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, sujet de cette thèse, aurait un rôle dans la régulation de la virulence de la bactérie, et ce en agissant comme senseur métabolique.

1.1.3 Pathogénèse

Si *S. pyogenes* fait l'objet d'une attention toute particulière, c'est qu'elle est une bactérie extraordinairement versatile responsable d'une myriade de maladies, des plus bénignes aux plus dangereuses (Quinn and Liao 1950) (Cunningham 2000) (Fiebig, Loof et al. 2015). Bien que la bactérie soit présente sans conséquence chez jusqu'à 15 % de la population, ou porteurs sains, (Shet and Kaplan 2004), elle ne provoque des dommages sévères que si elle est capable de disséminer de son point d'infection initial et souvent superficiel jusqu'à des tissus plus profonds, *via* la circulation sanguine (Medina, Goldman et al. 2003). Parmi les maladies purulentes, elle cause directement pharyngites et pneumonies par infection du conduit respiratoire, de même que l'impétigo par infection de la peau (Hedrick 2003, Cvjetkovic, Jovanovic et al. 2008, Papadas, Karkoulas et al. 2008, Shelburne, Keith et al. 2008). Plus drastique et extrêmement rapide, le syndrome du choc toxique cause insuffisance respiratoire et défaillance polyviscérale, et peut entraîner la mort chez 30 % des patients (Thomas, Perpoint et al. 2008) (Luca-Harari, Darenberg et al. 2009) (Ikebe, Tominaga et al. 2015). C'est la production des exotoxines A ou C qui est associée à ce type d'infection létale. Ces protéines, excrétées par *S. pyogenes* se lient au récepteur des cellules T et agissent comme de super-antigènes (Fraser and Proft 2008) (Kohayagawa, Ishitobi et al. 2015). Enfin, et c'est évidemment la pathologie qui frappe le plus les esprits, *S. pyogenes* conjointement avec les autres membres du groupe A des streptocoques, est également responsable de la *fasciitis necroticans* ou nécrose fasciitique. Cette gangrène streptococcocale est une nécrose extrêmement rapide des tissus sous-cutanés, et a

récemment valu à *S. pyogenes* l'appellation de « bactérie mangeuse de chair » (Bingol-Kologlu, Yildiz et al. 2007) (Gonzalez Castro, Rodriguez-Borregan et al. 2008) (Weidle, Brankamp et al. 2009) (Nordqvist, Wallden et al. 2015). La pathogénèse de ces maladies suppuratives par *S. pyogenes* dépend en grande partie de sa faculté de propagation, et donc repose sur sa hyaluronidase et sa streptokinase, facteurs qui la promeuvent. De même sa capacité à éviter la phagocytose grâce à sa capsule d'acide hyaluronique et à sa protéine M est cruciale (Stollerman and Dale 2008) (Olsen, Shelburne et al. 2009) (Khamnuan, Chongruksut et al. 2015).

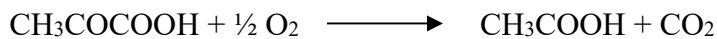
Enfin, il faut mentionner les maladies non purulentes post-streptocoquales, qui se manifestent donc après infection par *S. pyogenes* et en sont les séquelles (Karaky, Araj et al. 2014). Ainsi, la fièvre rhumatismale endommage le muscle et les valves cardiaques chez les individus ayant préalablement développé une infection streptocoquale (Cunningham 2000). Dans le cas de la glomérulonéphrite (Skattum, Akesson et al. 2006), la réaction auto-immune observée pourrait être due aux exotoxines A et C, ou à la protéine M (Burova, Thern et al. 2003).

Tableau II : Infections et pathogénies de *S. pyogenes* (adapté d’Aziz, 2008) (Aziz and Kotb 2008).

Purulente		Non purulente
Localisée	Invasive	Post-streptococcale
Pharyngite	<i>Cellulitis</i>	
<i>Tonsillitis</i>	Septicémie	Fièvre rhumatismale
Impétigo	Méningite	Glomérulonéphrite
Otite	Myosite	Maladie rhumatismale du cœur
Sinusite	Péritonite	Chorée de Sydenham
Arthrite Septique	Fièvre scarlatine	Désordre neuropsychiatrique associé à <i>Streptococcus</i>
Vaginite	Syndrome du choc toxique	
	Nécrose fasciitique	

1.1.4 Métabolisme de *Streptococcus pyogenes*

Bien que *S. pyogenes* produise la superoxyde dismutase (SOD), essentielle à la survie des streptocoques en milieu aérobie, elle est catalase-négative et cytochrome oxydase-négative, c'est à dire qu'elle n'exprime pas les autres enzymes habituellement liées à un métabolisme oxydatif (Dworkin 2006). Malgré le fait qu'elle présente des enzymes alternatives qui lui permettent de résister au stress oxydatif (Gibson, Mallett et al. 2000), son métabolisme est homofermentatif et non-respiratoire. La fermentation, « la vie sans air » de Louis Pasteur, est définie comme le métabolisme au cours duquel des composés organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons (Davis 1973). La fermentation lactique, celle des bactéries de l'ordre des *Lactobacillales*, est la plus simple des fermentations. Le pyruvate y est réduit en acide lactique, et chaque hexose produit deux molécules d'ATP. Bien que les streptocoques soient organotrophes et aérotolestants anaérobiques, ou anaérobiques facultatifs et que dans certaines conditions (anaérobique ou alcaline en particulier), la totalité du pyruvate résultat du catabolisme du glucose ne soit pas transformé en acide lactique (Pierce 1957) et qu'une portion non négligeable se trouve oxydée en acide acétique selon la réaction :



l'énergie est essentiellement tirée du métabolisme du glucose avec l'acide lactique comme produit final de la voie (Brooks 2007) (Figure 5).

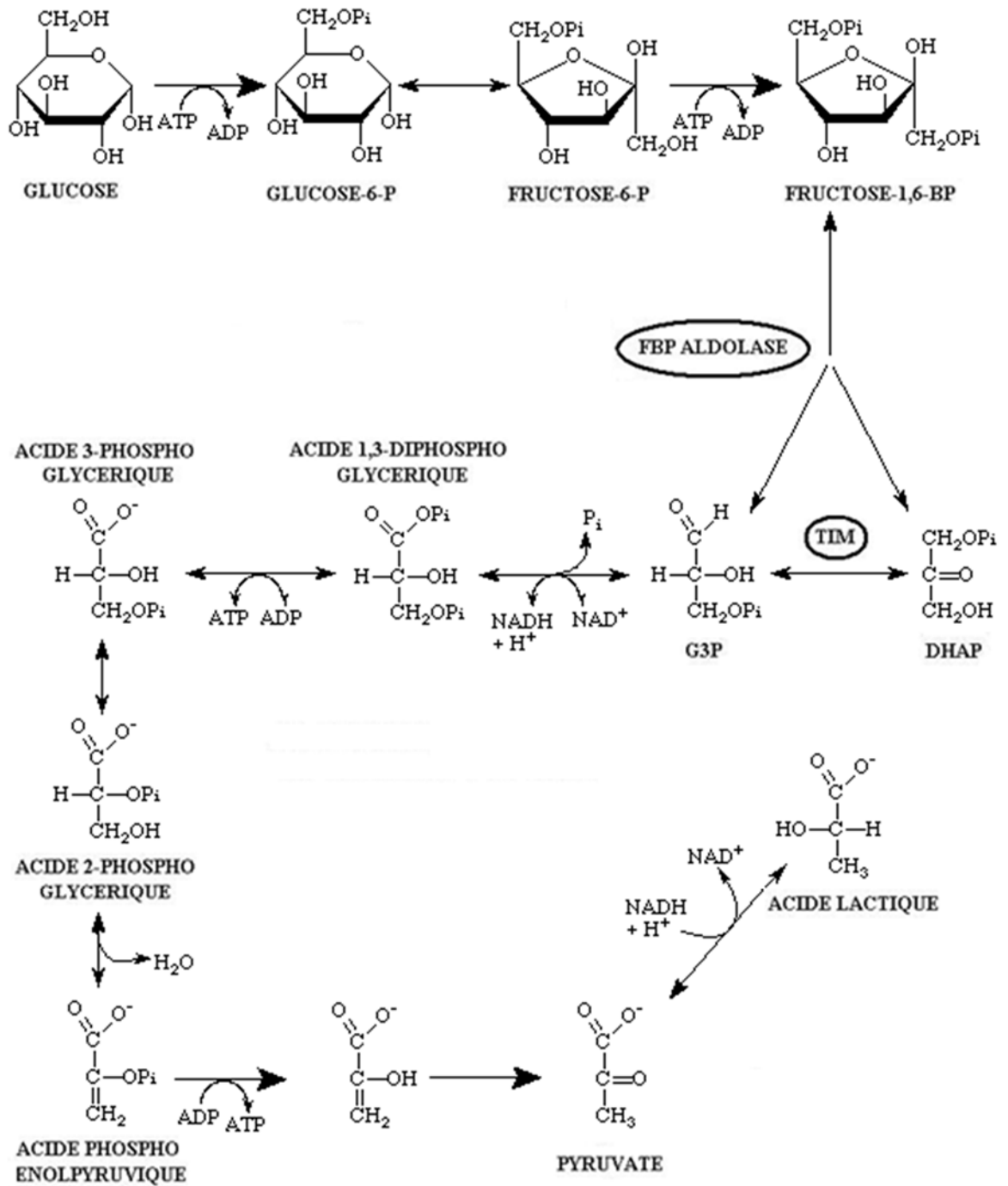


Figure 5 : Métabolisme du glucose de *Streptococcus pyogenes*. FBP aldolase : fructose-1,6-bisphosphate aldolase ; TIM : triose-isomérase.

L'accumulation d'acide lactique dans le milieu peut limiter la croissance de la bactérie, jusqu'à ce que le pH soit ajusté en conséquence.

Des hexoses autres que le glucose, comme le mannose, le galactose et le fructose sont également utilisés par *S. pyogenes* (Salminen 2004). Ces sucres s'insèrent dans la glycolyse au niveau du glucose-6-phosphate ou du fructose-6-phosphate après isomérisation ou phosphorylation. Le lactose est hydrolysé en ses moitiés glucose, ce dernier étant dirigé vers la glycolyse, et galactose. Le galactose néanmoins peut connaître deux sorts différents : la voie de Leloir, qui voit le galactose transformé en galactose-1-phosphate, en glucose-1-phosphate puis en glucose-6-phosphate qui peut ensuite rejoindre la glycolyse (Maxwell 1962). Il peut également être métabolisé grâce à la voie du tagatose-6-phosphate après avoir été phosphorylé en galactose-6-phosphate (Steele, White et al. 1954) (Figure 6).

Le groupe de gènes des enzymes de la voie du tagatose-6-phosphate, *lacABCD*, codant pour la galactose-6-phosphate isomérase, la tagatose-6-phosphate kinase, et la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, sont en fait les premiers gènes de l'opéron lactose *lacR-lacABCDFEGX* (van Rooijen, van Schalkwijk et al. 1991) (Loughman and Caparon 2007) de cette bactérie à acide lactique.

C'est justement au sein de cette voie que se retrouve l'enzyme au cœur de ce projet, la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, qui catalyse le clivage du tagatose-1,6-bisphosphate en DHAP et G3P.

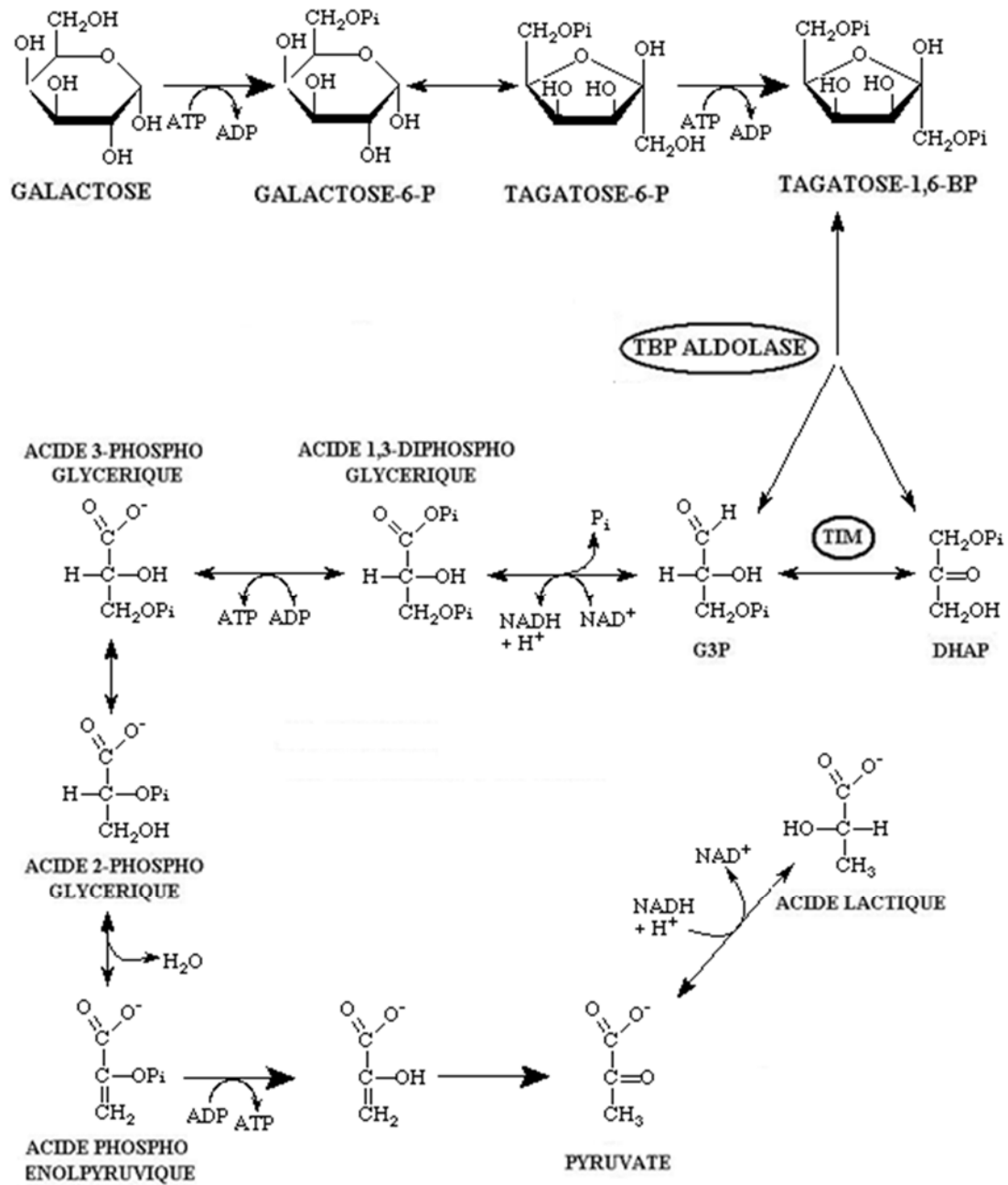


Figure 6 : Voie du tagatose-6-phosphate. TBP aldolase : tagatose-1,6-bisphosphate aldolase ; TIM : triose-isomérase.

1.2 Les aldolases

1.2.1. Généralités et classification :

C'est dans les années 1930 que l'activité enzymatique de clivage de certains hexoses biphosphorylés fut identifiée pour la première fois (Meyerhof O. 1943, Meyerhof O. 1947) (Kresge, Simoni et al. 2005), et l'enzyme responsable isolée et nommée. La réaction aldolasique, soit l'addition d'une cétone-énolate sur un accepteur aldéhyde, effectivement crée un lien carbone-carbone. Cette réaction est réversible et résulte en une multitude de différents produits, en général selon la nature de l'accepteur aldéhyde. Il existe donc de nombreuses aldolases, baptisées selon l'identité du produit de la condensation (Tableaux III et IV).

Tableau III : Différentes aldolases dépendantes du DHAP (non exhaustif).

Nom de l'aldolase	Donneur	Accepteur
Fructose-1,6-biphosphate aldolase	Dihydroxyacétone phosphate	G3P
Tagatose-1,6-biphosphate aldolase	DHAP	G3P
Fuculose-1-phosphate aldolase	DHAP	Lactaldéhyde
Rhamnulose-1-phosphate aldolase	DHAP	Lactaldéhyde

Tableau IV : Différentes aldolases dépendantes du pyruvate (non exhaustif).

Nom de l'aldolase	Donneur	Accepteur
γ -Méthyle- γ -hydroxy- α -ketoglutaric aldolase	Pyruvate	Pyruvate
2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase	Pyruvate	Glyoxylate
α -keto- β -deoxyglutarate aldolase	Pyruvate	Glyoxylate
2-keto-3-deoxygluconate-6-phosphate aldolase	Pyruvate	G3P
2-keto-3-deoxygalactonate-6-phosphate aldolase	Pyruvate	G3P

Ce n'est pourtant pas uniquement la nature du produit de la catalyse, ou même du donneur, qui sont utilisées pour classifier les aldolases. Leur séparation en deux classes se fait en effet généralement selon leur mécanisme catalytique (Rutter 1964). Les aldolases de classe I forment un intermédiaire réactionnel covalent, ou base de Schiff, avec le donneur de la réaction. Cet intermédiaire se crée entre le groupe carboxyle de la fonction cétone du donneur et l'atome d'azote de la lysine catalytique après attaque nucléophile du dernier sur le premier (Blonski, De Moissac et al. 1997) (Thomson, Howlett et al. 1998). Chez les aldolases de classe II, il y a polarisation du donneur grâce à un cation divalent, Ca^{2+} ou Zn^{2+} , qui aide également à stabiliser l'intermédiaire réactionnel (Hall, Bond et al. 2002). Bien qu'initialement, il ait semblé que les aldolases de classe I soient retrouvées essentiellement chez les organismes dits supérieurs, les

eucaryotes, et les aldolases de classe II chez les procaryotes, l'étanchéité de cette distribution est fortement remise en question aujourd'hui (Kroth, Schroers et al. 2005) (Lorentzen, Siebers et al. 2005), notamment avec l'avènement d'une sous-classe d'aldolases qui consiste en une troisième famille de séquence primaire, la classe I des *Archae* (Lorentzen, Siebers et al. 2004). Il est intéressant de noter que les deux classes d'enzymes, en plus de catalyser la même réaction, partagent en outre le même type de repliement, un tonneau ($\alpha\beta$)₈ de type triose-phosphate isomérase. Cette caractéristique conforte l'hypothèse d'une évolution divergente des deux classes (Ramsaywak, Labbe et al. 2004).

1.2.2 Structure tridimensionnelle :

Les aldolases, environ 40 kilodaltons par sous-unité, se présentent généralement sous forme d'homotétramères d'environ 160 kDa (Lorentzen, Siebers et al. 2005) pour les enzymes de classe I (Figure 7 A.), et d'homodimères d'environ 80 kDa pour celles de classe II (Galkin, Li et al. 2009). Les deux classes d'aldolases présentent un repliement de type TIM. Le tonneau bêta, au centre de l'enzyme, est formé par les huit brins bêta parallèles séparés par les hélices alpha en enjambement à droite. C'est au cœur de ce tonneau que l'on trouve le site actif de l'enzyme (Figure 7 B.) (Figure et suivantes réalisées grâce au programme PyMOL (DeLano 2004)).

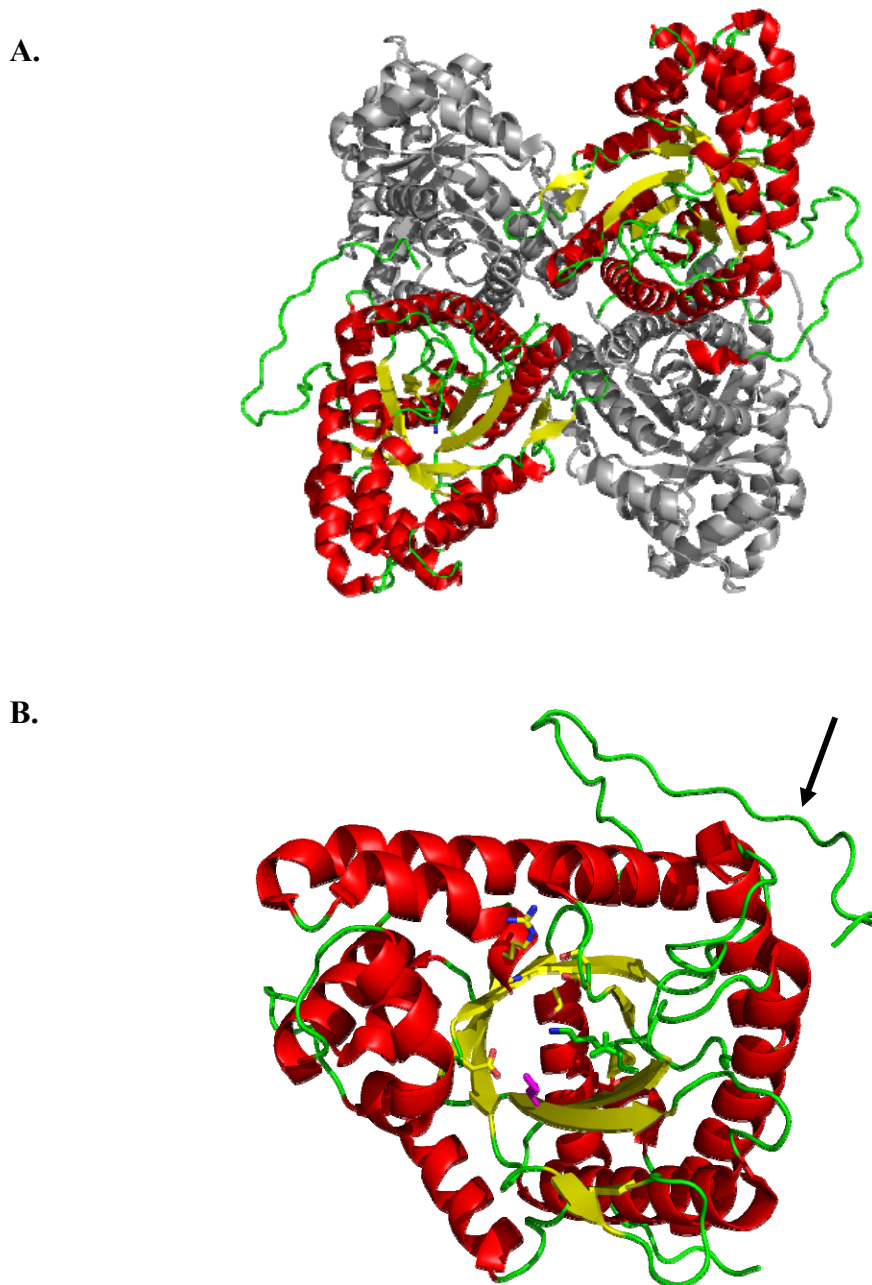


Figure 7 : A. Homotétramère de la FBP aldolase de muscle de lapin, vu parallèlement à l'axe du tonneau bêta. B. Sous-unité de la FBP aldolase de muscle de lapin vue parallèlement à l'axe du tonneau bêta. Les résidus du site actif, visibles au centre du tonneau, sont représentés en bâtonnets. Le C-terminal, modelé dans la structure PDB 1ZAH par des résidus d'occupation nulle, est indiqué par une flèche.

1.2.3 Site actif et mécanisme

L'aldolase de muscle de lapin, FBP aldolase de classe I, est depuis toujours le modèle de prédilection pour l'étude de cette classe d'enzyme. Il en existe en effet trois isoformes chez les mammifères, le A, exprimé dans les muscles, le B, retrouvé dans le foie principalement, et le C, dans le cerveau et les reins. Bien que comparables, ils possèdent néanmoins des caractéristiques de spécificité, de préférence aux substrats et de vitesse différentes (Dalby, Tolan et al. , Rutter, Richards et al. 1961, Midelfort, Gupta et al. 1976). L'isozyme B, par exemple, accepte également le fructose-1-phosphate et le FBP, ce que le A et C ne font pas.

De multiples structures tridimensionnelles de l'isozyme A de mammifère ont été déposées dans la PDB (codes 1ADO, 1ZAH, 1EWD, ou 6ALD) (Figures 7 et 8), et son mécanisme catalytique est depuis peu complètement élucidé (St-Jean, Blonski et al. , St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005, St-Jean and Sygusch 2007).

➤ Condensation

Dans le sens de la condensation du DHAP et G3P en FBP, la catalyse débute par la liaison covalente du DHAP au site actif *via* la Lys229. Lys229 attaque nucléophiliquement le C2 du DHAP, et Glu187 catalyse la formation de l'intermédiaire iminium, ce qui entraîne un rétrécissement conformationnel du site actif. La chaîne latérale d'Arg303 par exemple, est considérablement déplacée afin de lier

électrostatiquement l'oxyanion du phosphate P1. Après avoir été activé par un transfert de proton séquentiel *via* une molécule d'eau, et stabilisé par Lys146, Tyr363 peut ensuite abstraire stéréospécifiquement le proton pro-*S* du C3 de l'intermédiaire substrat-enzyme, produisant l'énamine. Glu187 est ensuite protoné par un transfert de proton séquentiel, et peut à son tour activer le G3P arrivant en le protonant en C4. Il y a ensuite attaque nucléophile du C3 de l'intermédiaire carbanion DHAP-enzyme sur le C4 du G3P, ce qui génère un nouveau lien C-C. L'étape finale de ce mécanisme catalytique est évidemment la relâche du FBP (Figure 9) (St-Jean and Sygusch 2007).

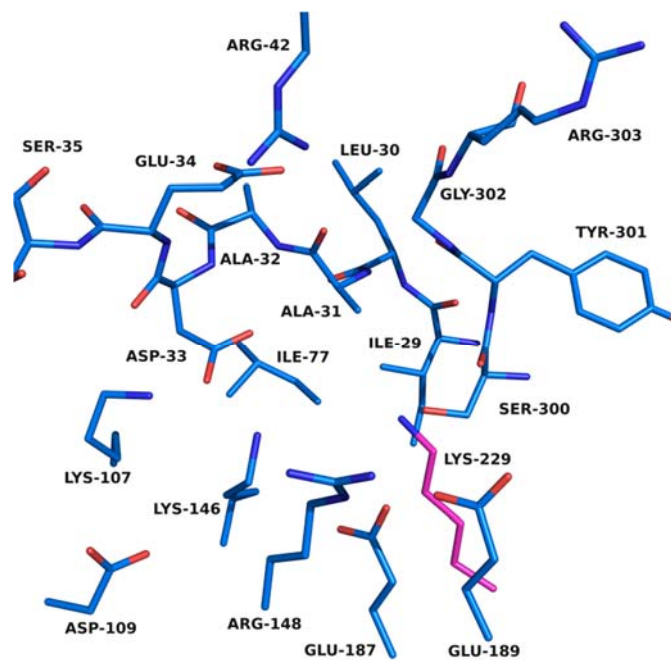


Figure 8 : Site actif de la FBP aldolase de mammifère. La lysine catalytique Lys229, qui effectue l'attaque nucléophile sur les substrats, est représentée en magenta.

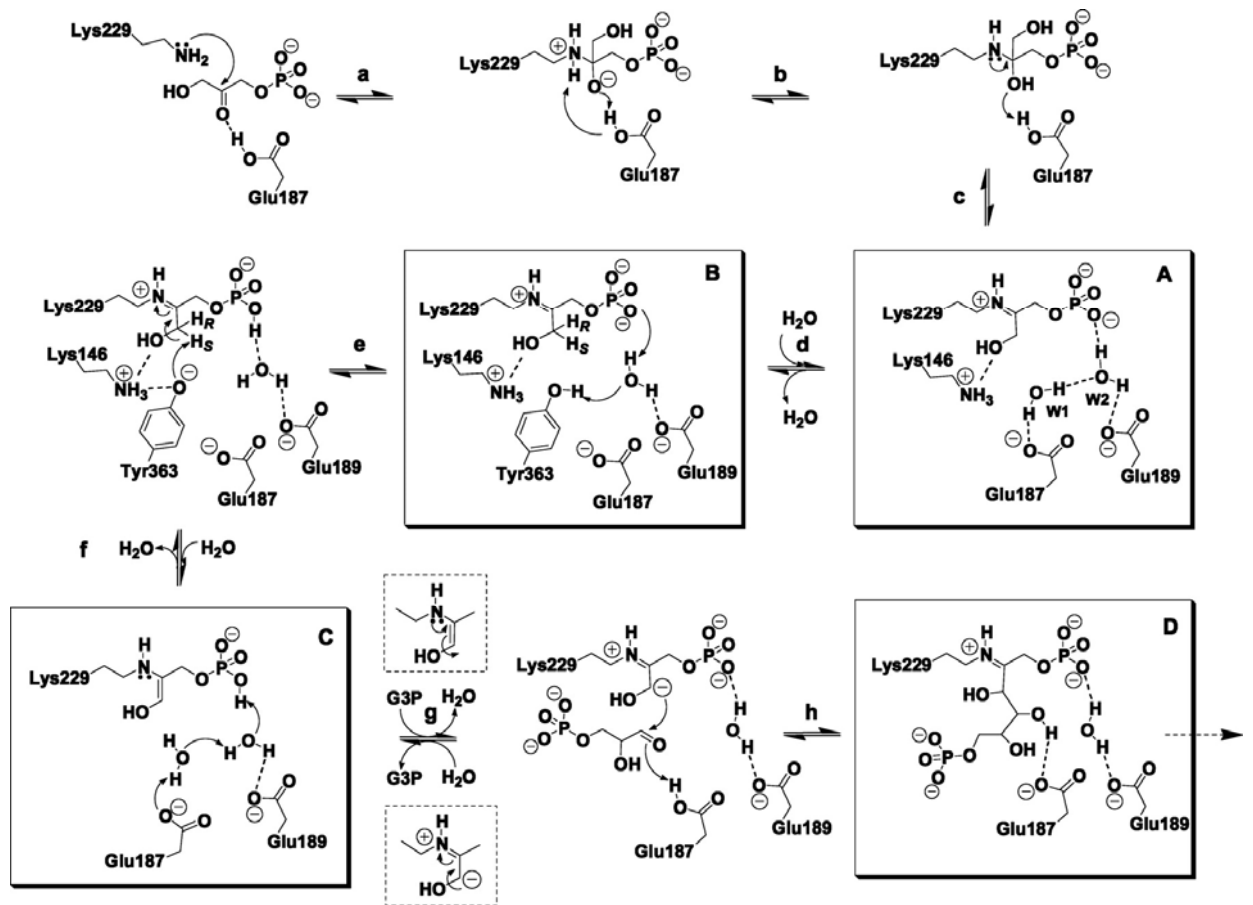


Figure 9 : Mécanisme de la condensation du DHAP et G3P par la FBP aldolase de mammifère (St-Jean, 2007).

Le phosphate P1 du DHAP est impliqué dans de nombreuses interactions stabilisatrices avec des résidus du site actif : outre Arg303, Ser271, Gly272 et Gly302 lient directement l'oxyanion phosphate. Enfin, l'hydroxyle C3 du DHAP et de FBP interagit avec Asp33 et Lys146 (St-Jean, 2007).

➤ Clivage

Dans le sens du clivage, le cycle catalytique (Figure 10) commence par la liaison du FBP au site actif. Glu187, protoné, forme des ponts-H avec à la fois le carbonyle du C2 et l'hydroxyle du C4 du substrat acyclique. Ces interactions permettent un alignement optimal du substrat pour l'attaque nucléophile obligatoire sur sa face *si*, catalysée par la Lys229 (**intermédiaire I, réaction a**). Acide général du mécanisme, Glu187 peut ensuite protoner le C2-OH de façon à former la carbinolamine neutre (**intermédiaire 1**) tout en déprotonant la Lys229 (**réaction b**), après avoir stabilisé l'éphémère forme dipolaire (**intermédiaire II**). Une seconde série de transfert d'électrons, centrée sur Glu187 encore une fois, permet de déshydrater la carbinolamine et former la base de Schiff (**intermédiaire 2, réaction c**). La charge positive marquée sur le C2 de l'intermédiaire ainsi formé, créant un puit d'électrons, permet d'acidifier le proton en OH du C4 et ainsi en faciliter l'abstraction par Glu187 dans sa forme basique (**réaction d**). Le G3P peut donc être libéré et le DHAP à sa suite, dans le mécanisme inverse de celui décrit précédemment.

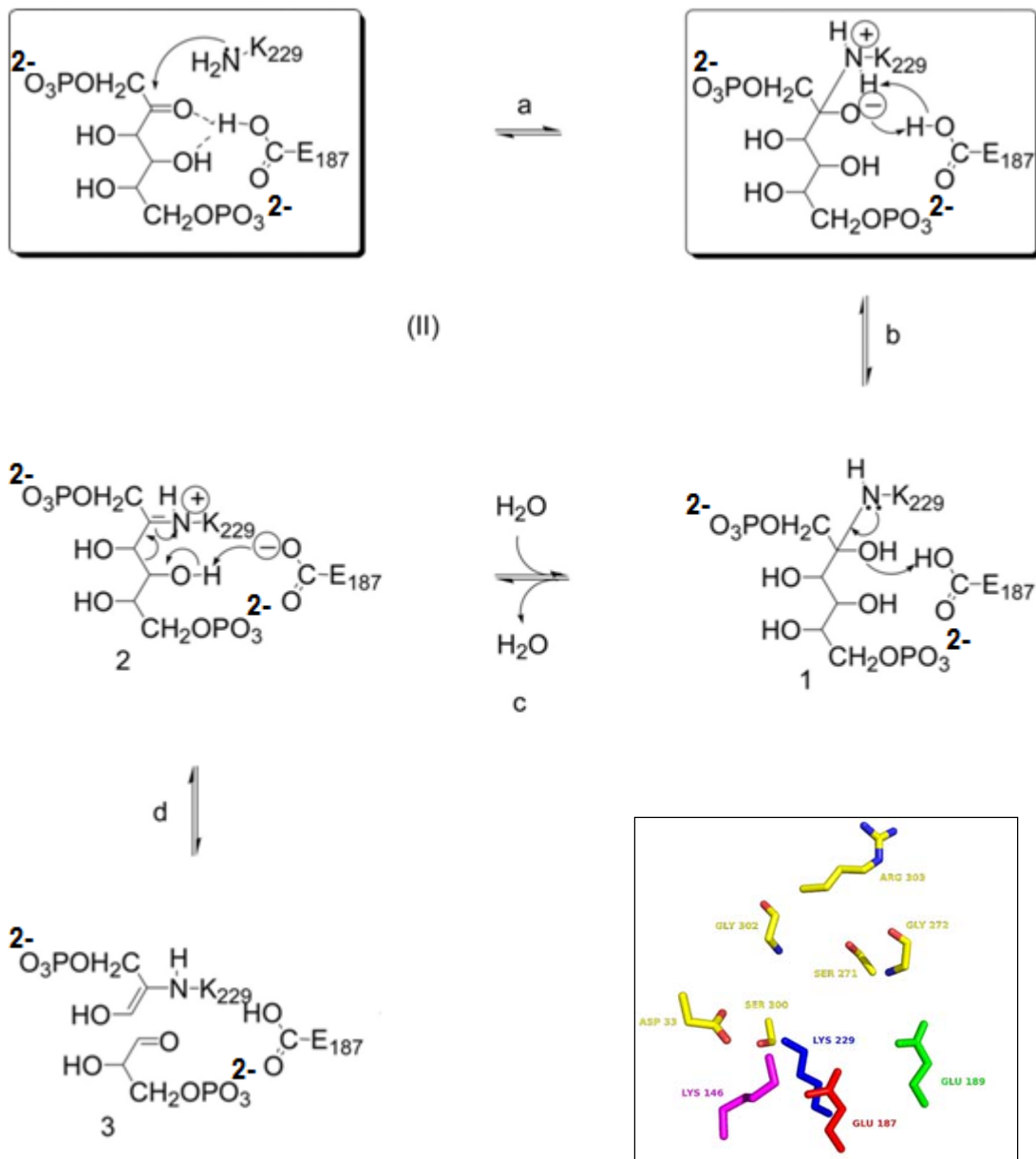


Figure 10 : Mécanisme de clivage du FBP par la FBP aldolase de muscle de mammifère. Son site actif est représenté en encadré (St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005).

La liaison des substrats au site actif de la FBP aldolase de muscle provoque de plus des changements conformationnels notables (St-Jean, 2005). Outre l'Arg303 qui, comme vu précédemment, interagit directement avec l'oxyanion du phosphate P1 du DHAP, et qui, de la structure native à celle ligandée (DHAP ou FBP), présente un r.m.s.d. d'environ 0.7 Å, les régions comprises entre les résidus 33 à 65, et 302 à 329 montrent des r.m.s.d. pouvant aller jusqu'à 1.02 et 1.25 Å, respectivement.

1.2.3.1 Les lysines

La lysine 229, responsable de l'attaque nucléophile sur le C2 des deux substrats DHAP et FBP, fut identifiée relativement tôt (Lai, Hoffee et al. 1965). Elle doit conserver un caractère nucléophile à des pH physiologiques, ce qui impliquerait une baisse considérable de son pKa. C'est néanmoins Glu187, à proximité, qui serait responsable de son activation (Maurady, Zdanov et al.) (St-Jean, Blonski et al. , St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005).

Une seconde lysine du site actif, Lys146, joue un rôle important dans le mécanisme de l'enzyme puisque sa mutation en diminue l'activité spécifique de façon non négligeable (Morris and Tolan 1994). Le résidu est en outre capable de former un intermédiaire covalent avec un analogue du substrat, le N-bromoacetyl-éthanolamine-phosphate (Hartman and Brown 1976). Cette inhibition peut être empêchée par l'incubation de l'aldolase avec du DHAP, ce qui a mené à la conclusion que la lysine a une part dans la liaison au phosphate P1. Enfin, cette même étude a permis de déterminer le pKa de ce résidu, estimé entre 6.5 et 8.5. Sa proximité avec une troisième lysine du site actif,

Lys107, peut aider à expliquer cette baisse drastique de pKa. Lys107, au pKa d'environ 8.0, est à même de former une base de Schiff avec le pyridoxal-phosphate et ainsi d'inactiver l'enzyme (Anai, Lai et al. 1973) (Dax, Coincon et al. 2005). Cette proximité spatiale entre ces deux lysines pourraient néanmoins se révéler contre-productive si leur pKa respectif s'en trouvait trop acidifié : en effet, une Lys146 protonée et donc chargée positivement est indispensable à la stabilisation de la charge négative transitoirement formée sur l'hydroxyle du C4 lors du clivage du lien C3-C4 (St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005). C'est la charge négative du résidu Asp33 qui, stabilisant électrostatiquement à la fois Lys146 et Lys107, leur permettrait de rester protonées à des pH physiologiques et les orienterait adéquatement, permettant ainsi à la réaction de clivage du FBP de procéder (St-Jean, Blonski et al.). Le mutant Asp33Asn voit d'ailleurs son activité spécifique considérablement diminuée.

1.2.3.2 Les arginines

Le site actif de l'aldolase présente trois arginines. On leur prête un rôle dans le mécanisme depuis les années 1960 déjà puisque l'utilisation de composés α -dicarbonyles inactivant spécifiquement les arginines a permis d'en faire l'hypothèse (Yankeelov, Mitchell et al. 1968). Les substrats naturels, de même que le phosphate inorganique, conférant une protection contre cette inactivation, un rôle de ces résidus dans la liaison aux phosphates a donc été proposé, et confirmé à la fois par des études enzymologiques (la mutation d'Arg303 en alaline voit une diminution de l'activité de clivage et surtout l'augmentation importante du K_M (Choi, Mazurkie et al. 1999)), et des

études structurales subséquentes (Arg303 lie le phosphate P1 de tous les substrats de l'aldolase en arquant sa chaîne latérale de 180° par rapport à la configuration sans ligand (Choi, Shi et al. 2001) (St-Jean, Blonski et al. , St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005, St-Jean and Sygusch 2007)). Deux autres arginines notables, Arg42 et 148, une fois mutées, voit l'activité de clivage du FBP diminuée, chez Arg148Ala plus que chez Arg42Ala, mais le facteur de liaison au substrat est moins affecté (Wang, Morris et al. 1996).

1.2.3.3 Les acides glutamiques

Il y a deux acides glutamiques dans le site actif de l'enzyme de mammifère : Glu187 et Glu189. Un rôle plus important de Glu187 que de Glu189 a été postulé dans notre laboratoire (Maurady, Zdanov et al.) grâce à une étude enzymologique. En effet, la mutation de Glu187 en Ala provoque une diminution de l'activité de clivage de l'enzyme de plusieurs ordres de magnitude, et les profils pH de la protéine native de même que du mutant Glu187Gln a permis de déterminer le pKa macroscopique acide de l'enzyme comme étant de 5.0, et pourrait donc être attribuable à Glu187 (mais à Glu189 également). Ce sont les études structurales entreprises par ce même laboratoire qui ont permis d'illuminer les multiples rôles de Glu187 chez l'aldolase : Glu187 active Lys229 et lui permet d'attaquer le substrat, lie le C2 et le C4 du FBP de façon à présenter le C2 électrophile dans une conformation idéale à l'attaque par Lys229, stabilise la carbinolamine dipolaire puis la protone tout en étant déprotoné par Lys229 de façon à donner la carbinolamine neutre, et enfin promeut la déshydratation de cette

carbinolamine afin de former l'iminium (St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005). Surtout, et de façon cruciale, Glu187, base générale du mécanisme, abstrait le proton en C4 de l'intermédiaire et provoque un réarrangement électronique qui mène au clivage du lien C3-C4 du FBP.

1.2.3.4 L'acide aspartique

Asp33, seul acide aspartique du site actif, est un protagoniste substantiel dans le mécanisme de l'aldolase, comme déjà discuté dans la section 1.2.3.1 portant sur les lysines du site actif. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que la mutation de ce résidu, en alanine par exemple, permet une formation normale de l'iminium du FBP, mais ralentit grièvement celle de l'énamine, impliquant le résidu dans l'abstraction du proton en C4 conduisant au clivage du lien C3-C4 (Morris and Tolan 1993). Pareillement, Asp33 a été proposé comme résidu responsable de l'abstraction du proton pro-(S) du C3 du DHAP au vu de sa proximité avec cet atome dans une des premières structures de l'enzyme en complexe avec l'un de ses substrats naturels, le DHAP (Choi, Shi et al. 2001). Néanmoins, depuis, notre laboratoire a été en mesure de montrer que la tyrosine du C-terminal, Tyr363, est responsable de l'abstraction stéréospécifique du proton en C3 du DHAP dans le sens de la condensation (St-Jean and Sygusch 2007), et que c'est Glu187 qui catalyse le clivage du lien C3-C4 du FBP en déprotonant le C4-OH de l'intermédiaire (St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005). Comme mentionné précédemment, Asp33 joue toutefois un rôle non négligeable dans le mécanisme en stabilisant la charge positive sur les deux lysines Lys107 et 146, qui, au vu de leur

mitoyenneté, et sans la charge négative de Aps33, auraient sûrement vu leur pKa baisser plus encore dans un effet décrit pour la première fois dans l'acétoacétate décarboxylase par Westheimer et collègues (Warren, Zerner et al. 1966, Frey, Kokesh et al. 1971, Schmidt and Westheimer 1971).

1.2.3.5 Autre « résidu » notable : le C-terminal

Chez les mammifères, l'aldolase possède un résidu en son C-terminal qui est totalement conservé dans les trois isoformes : Tyr363. L'enzyme traitée à la carboxypeptidase voit son activité de clivage de même que la vitesse de déprotonation du C3 du DHAP fortement diminuées (Drechsler, Boyer et al. 1959) (Rutter, Richards et al. 1961). C'est une étude structurale réalisée dans notre laboratoire qui a permis de montrer que Tyr 363, activée par l'oxyanion phosphate de l'intermédiaire iminium *via* une molécule d'eau et stabilisée par Lys146, abstrait de façon stéréospécifique le proton pro-(S) du DHAP et ainsi permet la formation de l'énamine/carbanion et celle du lien C3-C4 entre le DHAP et le G3P (St-Jean and Sygusch 2007).

1.2.4. L'aldolase et ses substrats

1.2.4.1 Condensation

L'aldolase de muscle de mammifère fait preuve d'une grande sélectivité pour son donneur le DHAP, mais accepte tout du moins un certain nombre d'accepteurs aldéhydes. Bien que les vitesses de réaction dans ce sens de la catalyse soient généralement plus faibles qu'avec le G3P, elles peuvent l'égaliser et parfois même l'excéder (Bednarski, Simon et al. 1989) (Gefflaut, Blonski et al. 1995).

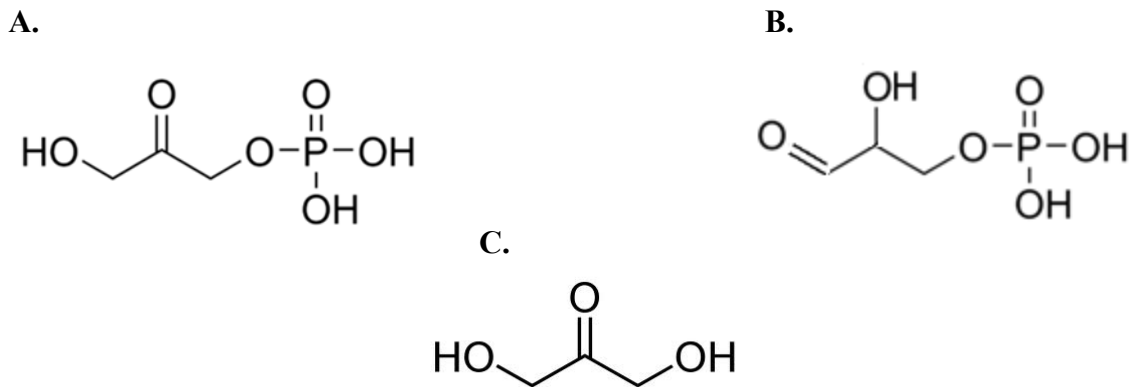


Figure 11: Structures du DHAP (A), G3P (B) et DHA (C).

Généralement, il semble que la condensation entre le DHAP et l'aldéhyde testé soit possible si ce dernier est assez réactif et ne soit pas trop volumineux. Le DHAP par contre tolère peu de changements, il ne peut par exemple être substitué en position C1

par de trop gros groupes sans diminuer fortement la vitesse de condensation : le DHAP exhibant un groupe méthyl en position 1 est le meilleur candidat, et pourtant ne présente une vitesse de condensation avec le G3P que de 10 % de la vitesse DHAP/G3P (Bednarski, Simon et al. 1989). Il ne concède aucune substitution en C3, ce qui dévoile un rôle majeur de l'hydroxyle en cette position (Richards and Rutter 1961). Enfin le DHA, soit le DHAP ayant perdu son phosphate, a une si faible affinité qu'il ne peut être considéré un substrat, tout comme le fructose-6-phosphate (Crans, Sudhakar et al. 1992). Le DHAS (le dihydroxyacétone sulfat) n'est de même pas un substrat pour l'aldolase (Grazi, Sivieri-Pecorari et al. 1973), ce qui conforte un rôle de l'oxyanion phosphate lui-même dans le mécanisme : la plus faible basicité de l'ion sulfat ne lui permet pas de jouer son rôle de base et d'activer la molécule d'eau nécessaire à la déprotonation de la Tyr363 (St-Jean and Sygusch 2007).

1.2.4.2 Clivage

Dans le sens du clivage, l'aldolase peut utiliser d'autres substrats que le FBP, mais il faut noter que ces composés partagent tous la même configuration en leur C3 et C4 : le D-sédoheptulose-1,7-bisphosphate (Horecker, Smyrniotis et al. 1955), le D-sorbose-1,6-bisphosphate (Richards and Rutter 1961) et le D-xylulose-1,5-bisphosphate (Mehler and Cusic 1967) ont tous trois la configuration absolue 3(*S*)-4(*R*) (Figure 12) et sont tolérés par l'aldolase de mammifère, au contraire du D-ribulose-1,5-bisphosphate ou du tagatose-1,6-bisphosphate, respectivement 3(*R*)-4(*R*) et 3(*S*)-4(*S*) (Hartman and Barker 1965). Par contraste, la configuration du C5 ne semble pas être d'importance, mais la

présence d'un second groupe phosphate en P6 paraît cruciale puisque la vitesse de clivage du F-1-P n'est que de 5 % de celle du FBP (Midelfort, Gupta et al. 1976) (Gefflaut, Blonski et al. 1995).

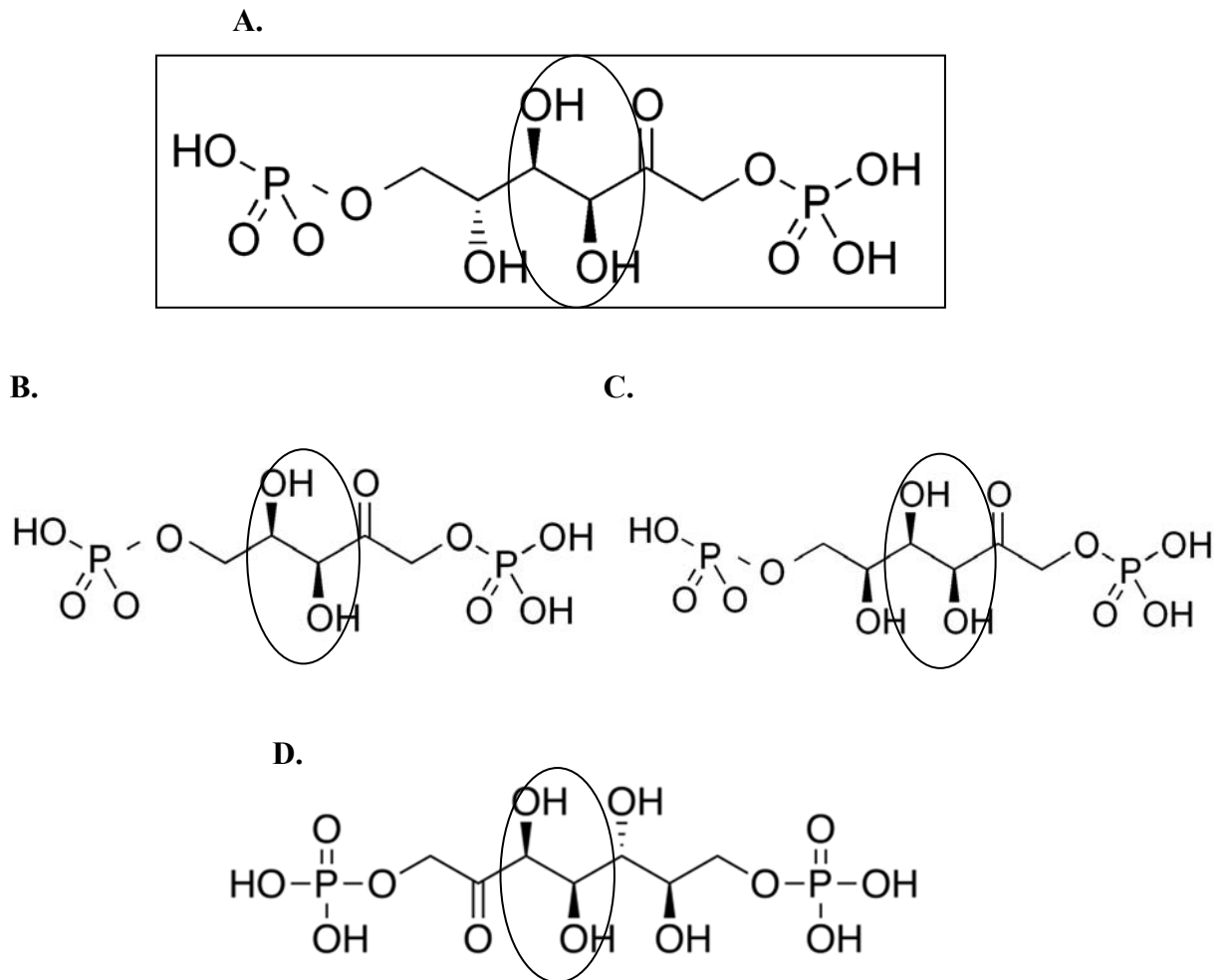


Figure 12 : Structures du FBP (A.) et analogues, le D-xylulose-1,5-bisphosphate (B.), le D-sorbose-1,6-bisphosphate (C.), et le D-sédoheptulose-1,7-bisphosphate (D.). Les C3 et C4 sont entourés.

1.2.4.2.1. Anomères du FBP en solution

Le FBP, substrat préféré de la FBP aldolase de mammifère, existe en solution sous quatre formes distinctes : deux formes cycliques furanoses, α et β , la forme cétonique résultant de l'ouverture du cycle et la forme hydrate correspondante (Blonski, Gefflaut et al. 1995) (Figure 13).

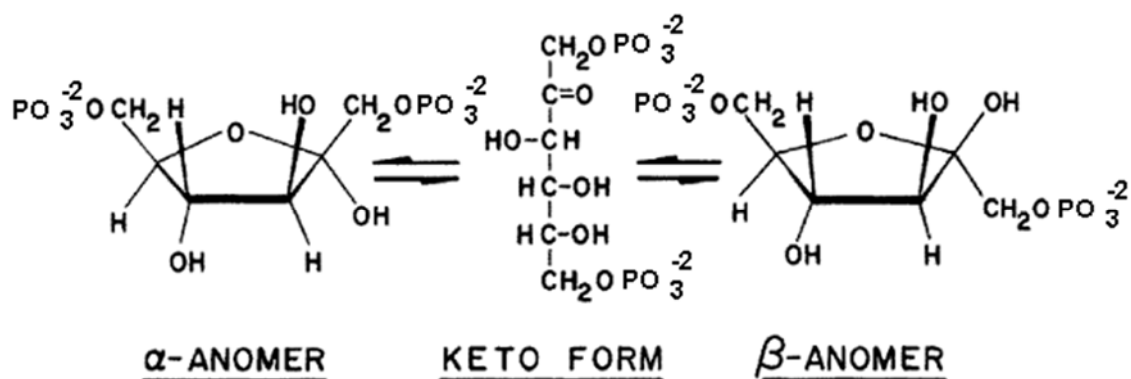


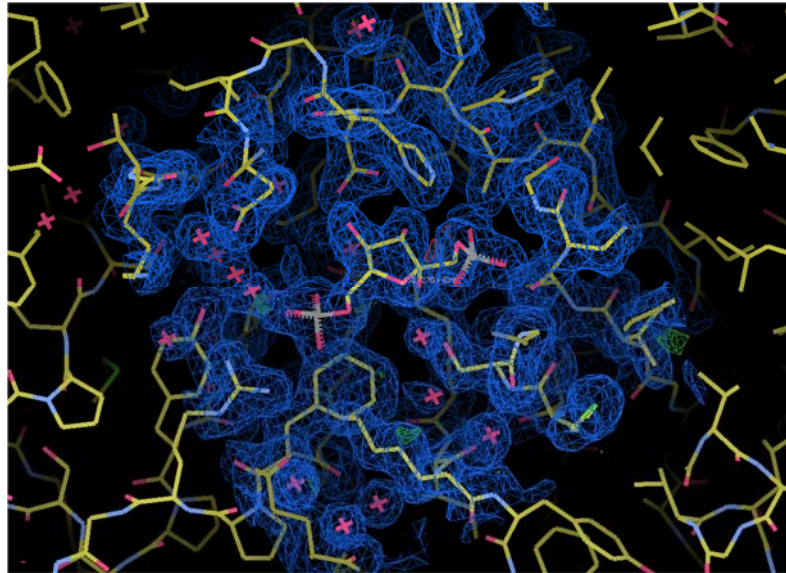
Figure 13 : Anomères du FBP en solution (Adapté de (Koerner, Voll et al. 1977)). La forme hydrate n'est pas représentée.

Ce sont les deux formes cycliques qui composent la majorité du FBP en solution, à hauteur de 88-90 % pour la forme β , et de 8-10 % pour la forme α (Gray 1971), ne laissant que 2 % de la population à l'anomère acyclique. Une première étude de l'un des pionniers du domaine, Irving A. Rose, a tout d'abord laissé à penser que la vitesse d'ouverture du cycle β en solution est telle qu'elle permet à l'enzyme de ne lier que la forme acyclique (Midelfort, Gupta et al. 1976), et a montré que le 5-deoxy-FBP, qui ne

peut être cyclisé, est un meilleur substrat que le FBP. Néanmoins, cette même étude a mis en évidence l'inhibition de l'enzyme par deux inhibiteurs compétitifs cycliques, indiquant une affinité de l'aldolase pour les composés à cycle. De plus, le même groupe s'est ensuite appliqué à démontrer, grâce à une seconde étude en *steady state* mettant à contribution la phosphofructokinase dans la production spécifique de β -FBP cyclique, que même la présence d'aldolase en excès ne voit pas diminuer la vitesse de clivage (Rose and O'Connell 1977) (elle l'aurait naturellement été si l'ouverture spontanée du cycle en solution était nécessaire au mécanisme).

Des études subséquentes ont révélé que le clivage du FBP a lieu plus rapidement que l'ouverture du cycle, et que l'aldolase ne peut utiliser que la forme β (Choi and Tolan 2004). Il faut donc prêter une activité d'ouverture du cycle furanose à l'enzyme elle-même, ce qui avait déjà été postulé au vu d'expériences d'échange isotopique de l'oxygène du groupe cétone du FBP (Model, Ponticorvo et al. 1968). Enfin la structure de l'aldolase de classe I de l'archéobactérie *Thermoproteus tenax* en complexe avec la forme β du cycle furanose du FBP a été résolue en 2005 (Lorentzen, Siebers et al. 2005), et montre une molécule d'eau à proximité du O5 faisant le pont dans le cycle (Figure 14).

A.



B.

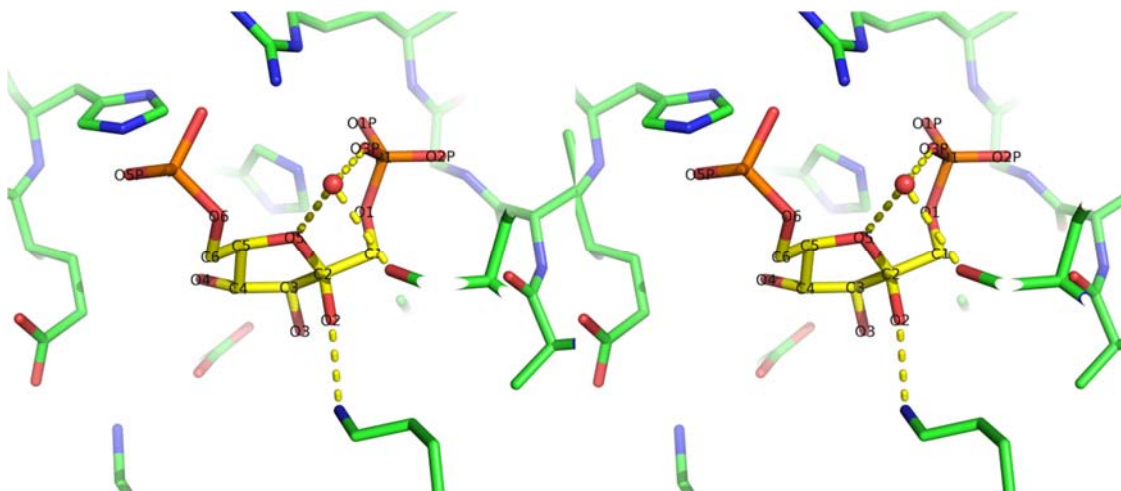


Figure 14 : Structure du β -FBP dans le site actif de la FBP aldolase de *T. tenax* (code PDB 1WS8). **A.** Carte $2F_o-F_c$ calculée à partir des facteurs de structure déposés par les auteurs (image réalisée dans Coot (Emsley and Cowtan 2004)). **B.** Vue stéréo du β -FBP cyclique (en jaune) dans le site actif de l'enzyme (vert). La molécule d'eau responsable de la décyclisation est représentée par une sphère rouge.

Activée par l'oxyanion phosphate, cette molécule d'eau pourrait protoner le O5 et ainsi mener à l'ouverture du cycle (Figure 15). Nos propres structures de l'aldolase de mammifère en complexe avec le FBP cyclique, objets du deuxième article présenté dans cette thèse, semblent indiquer plutôt un rôle de Glu187 dans l'activation d'une molécule d'eau comparable dans la structure, et donc pointer vers un mécanisme d'ouverture du cycle différent (Chapitre 3).

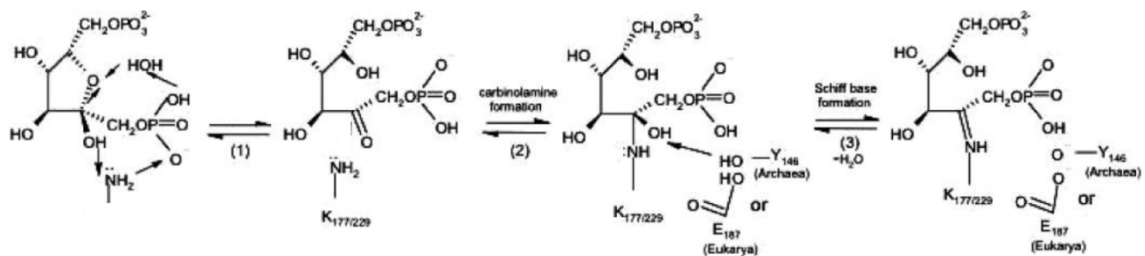


Figure 15 : Mécanisme d'ouverture du cycle tel que proposé par Lorentzen *et al.* 2005.

1.2.5. L'aldolase et ses inhibiteurs

De nombreuses études se penchant sur les composés inhibant l'aldolase ont été publiées, et les conditions dans lesquelles elles ont été effectuées (force ionique, pH, *etcetera*) semblent avoir eu un effet quant aux résultats obtenus (Gefflaut, Blonski et al. 1995). De cette abondance de littérature, quelques faits saillants peuvent se dégager : le phosphate inorganique, liant l'enzyme en deux sites distincts, en est un inhibiteur de l'ordre du mM (Ginsburg and Mehler 1966). Dans les composés monophosphorylés, c'est un analogue du DHAP, l'acide phospho-glycolohydroxamique, qui est l'inhibiteur

le plus potent de l'enzyme (Lewis and Lowe 1977). De plus, la présence d'un groupement capable de former un pont H en C3 semble être critique pour l'affinité. Des composés à six carbones, la présence d'un second groupe phosphate augmente considérablement l'affinité, et la longueur de la chaîne carbonée joue un rôle également : ce sont les composés dont la longueur se rapproche de celle du FBP acyclique qui sont les plus potents, et ce même si la configuration des différents hydroxyles est différente et d'autant plus s'ils sont bisphosphorylés (voir Gefflaut *et al.* pour une liste exhaustive).

1.2.6. Les aldolases chez les streptocoques : la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de *S. pyogenes*

S. pyogenes et ses congénères streptocoques expriment plusieurs aldolases : la 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase (EC 4.1.2.14), la 2-déhydro-3-déoxyphosphogluconate aldolase (EC 4.1.3.16), la déoxyribose-phosphate aldolase (EC 4.1.2.4), la dihydronéoptérine aldolase (EC 4.1.2.25), la fructose-1,6-bisphosphate aldolase de classe II (EC 4.1.2.13), la phospho-2-déhydro-3-déoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54), la tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 1 (EC 4.1.2.40), et la tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2 (EC 4.1.2.40). Certaines autres lyases, telles la 3-déhydroquinone déshydratase (EC 4.2.1.10) ou encore la nicotinate-nucléotide pyrophosphorylase (EC 2.4.2.19), du fait de la nature de la réaction qu'elles catalysent, peuvent ou non également rentrer dans cette large catégorie d'enzyme. *S. pyogenes* étant une bactérie à acide lactique, c'est

néanmoins la fructose-1,6-bisphosphate aldolase et la tagatose 1,6-bisphosphate aldolase qui ont le plus d'importance dans le cadre d'un métabolisme fermentatif.

L'aldolase au cœur de ce projet est la tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2, produit du gène *lacD.2*. C'est une protéine de 37 kDa qui se présente en solution sous la forme d'un homodimère de 74 kDa. Comme mentionné dans la section 1.1.5, la TBP aldolase de *S. pyogenes* se trouve à la jonction de la voie du tagatose et de la glycolyse où elle catalyse le clivage du tagatose-1,6-bisphosphate provenant du galactose en DHAP et G3P. Néanmoins, sa particularité réside dans son singulier manque de stéréospécificité. En effet, la TBP aldolase de *S. pyogenes*, au-delà du 3(*S*)-4(*S*)-tagatose-1,6-bisphosphate, est capable de cliver réversiblement le 3(*S*)-4(*R*)-fructose-1,6-bisphosphate, le 3(*R*)-4(*S*)-sorbose-1,6-bisphosphate, et le 3(*R*)-4(*R*)-psicose-1,6-bisphosphate, quatre stéréoisomères (Bissett and Anderson 1980) (Figure 16).

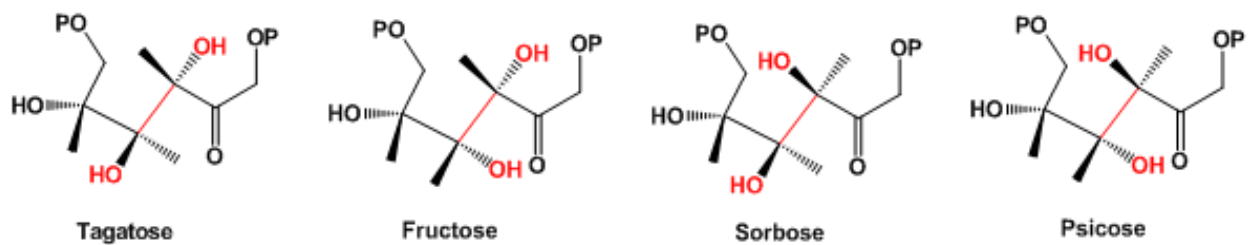


Figure 16 : Structures des quatre hexoses biphosphorylés clivés par la TBP aldolase de *S. pyogenes*. Les hydroxyles des positions C3 et C4 sont colorés en rouge.

Un tel manque de stéréospécificité relativement à la géométrie à la fois des carbones C3 et C4 des hexoses est extrêmement rare chez les aldolases. En effet, et comme mentionné dans la section 1.2.4, les aldolases DHAP-dépendantes catalysent l'addition du DHAP sur une variété d'accepteurs aldéhydes (Tableau IV), mais le font en contrôlant finement la stéréochimie des deux nouveaux stéréocentres créés, le C3, résultant de l'addition du DHAP sur l'aldéhyde, et, dans une moindre mesure, le C4, résultant du C1 de l'aldéhyde (Marcus and Shannon 1962, Shannon and Marcus 1962) (Meloche and Mehler 1973, Meloche, Mehler et al. 1975). Certaines de ces aldolases, telle la fuculose-1-phosphate aldolase par exemple, et l'aldolase de mammifère dans une moindre mesure, acceptent plusieurs accepteurs aldéhydes (Meloche 1970) (Kroemer, Merkel et al. 2003) et démontrent donc une faible spécificité au niveau du C4, dont la stéréochimie dans le produit de condensation résulte de celle de l'accepteur aldéhyde (Ghalambor and Heath 1962) (Espelt, Bujons et al. 2005). Toutefois, la stéréospécificité relativement au C3 est, elle, beaucoup plus conservée (Takayama, McGarvey et al.) (Fessner 1998). Afin de synthétiser à la fois le 3(*S*)-4(*R*)-FBP et le 3(*S*)-4(*S*)-TBP, par exemple, la TBP aldolase de *S. pyogenes* doit permettre l'attaque de la face *si* du DHAP sur la face *si* du G3P, de même que l'attaque de la face *si* du DHAP sur la face *re* du G3P, respectivement (Figure 17). L'attaque de la face *re* du DHAP sur la face *re* ou *si* du G3P donnera les produits 3(*R*), c'est-à-dire le 3(*R*)-4(*S*)-sorbose-P₂ et le 3(*R*)-4(*R*)-psicose-P₂, respectivement.

La TBP aldolase de classe I ayant été très peu étudiée jusqu'à présent, les informations enzymologiques et structurales concernant le mécanisme réactionnel de cette enzyme et

pouvant aider à comprendre son manque remarquable de stéréospécificité sont donc manquantes.

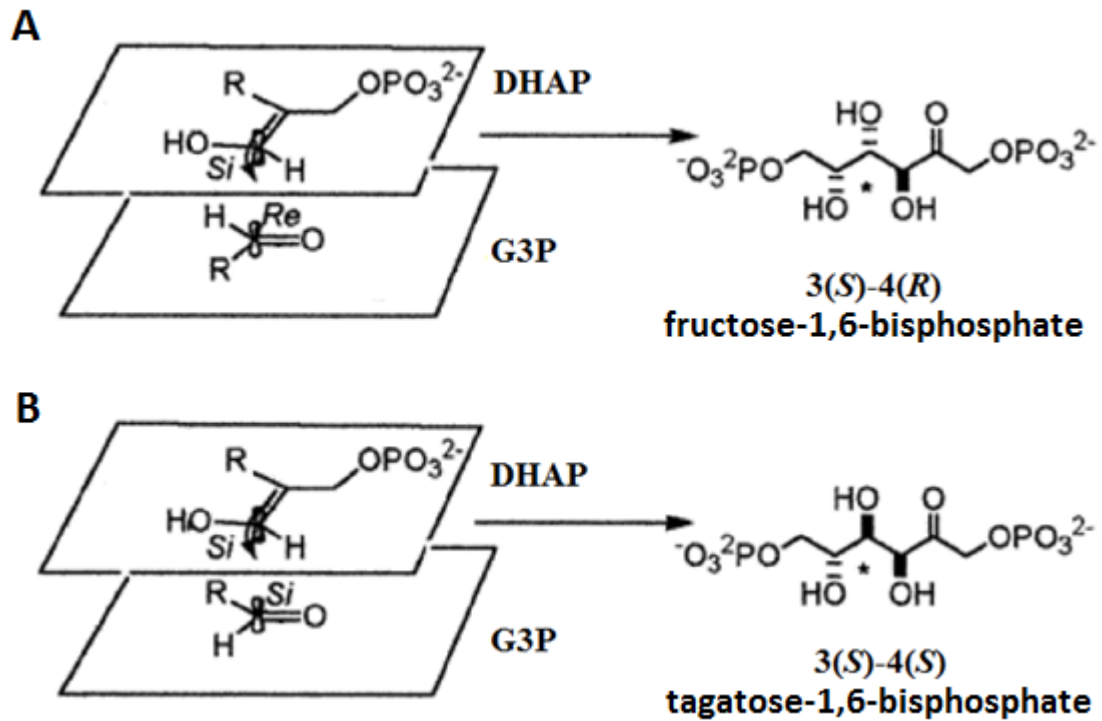


Figure 17 : Synthèse du TBP et du FBP par la TBP aldolase de *S. pyogenes*. A. L'attaque de la face *si* du DHAP sur la face *re* du G3P donne le produit 3(S)-4(S)-TBP. B. L'attaque de la face *si* du DHAP sur la face *si* du G3P donne le produit 3(S)-4(S)-FBP. (Adapté de (Varadarajan, Gam et al. 2005))

La FBP aldolase de mammifère et la TBP aldolase de *S. pyogenes*

Les deux enzymes font montre de caractéristiques cinétiques similaires mais pas identiques : alors que la FBP aldolase possède un V_{\max} pour son substrat le FBP d'environ 20 U/mg et un K_M de l'ordre du μM , la TBP aldolase, elle, a un V_{\max} pour son substrat le TBP d'environ 16 U/mg, mais surtout un K_M de l'ordre du mM.

Dans le sens du clivage, la FBP aldolase tolère, bien que de façon moins efficace, d'autres substrats tant qu'ils sont de géométrie 3(*S*)-4(*R*) (voir section 1.2.4.2). A l'inverse, la TBP aldolase accepte donc les quatre combinaisons possibles de stéréochimie 3(*R/S*)-4(*R/S*) (Bissett and Anderson 1980) (LowKam, Liotard et al. 2010) (Lee, Kim et al. 2011), et le fait avec efficacité, puisque son V_{\max} pour le FBP par exemple n'est diminué que de moitié.

La séquence primaire de la TBP aldolase de classe I de *S. pyogenes* possède 14 % d'identité et 22 % de similarité avec celle de l'aldolase de classe I modèle, la FBP aldolase de muscle de mammifère. Leurs structures tri-dimensionnelles sont pourtant grandement comparables, les deux enzymes exhibant toutes deux un repliement de type *TIM-barrel*, ou tonneau $(\alpha/\beta)_8$ (Figure 18).

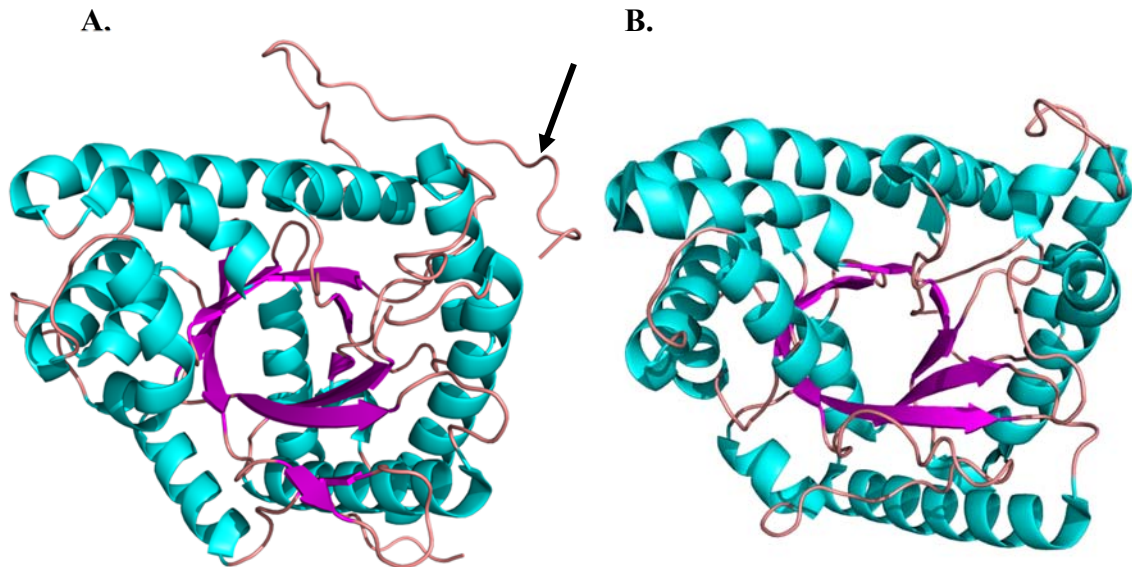


Figure 18 : Monomère de la FBP aldolase de mammifère (A.) et de la TBP aldolase de *S. pyogenes* (B.). Les deux enzymes ont un repliement TIM caractéristique. Le C-terminal mobile de la FBP aldolase est indiqué par une flèche.

Leurs sites actifs enfin, sont quasiment identiques. Tous deux situés au fond du tonneau (α/β)₈, ils présentent les mêmes résidus, mis à part quelques exceptions notables (Figure 19). Ala32, Ser35, Ile77, Lys107, Asp109, Glu189, Ser300 et Tyr301 de la FBP aldolase de classe I sont remplacés par Phe26, Arg29, Leu68, Ala90, Glu92, Leu165, Leu275 et Cys276, respectivement, chez la TBP aldolase. Les substitutions se font donc parfois pour des résidus similaires, comme dans le cas d'Ile77 de la FBP aldolase, remplacé par Leu68 chez la TBP aldolase. Lys107, Glu189 et Ser300, par contre, sont échangés pour Ala90, Leu165 et Leu275 dans la TBP aldolase. La TBP aldolase, enfin, ne possède pas de C-terminal catalytique mobile et son traitement à la carboxypeptidase

n'a que peu d'incidence sur son activité (Bissett and Anderson 1980). Il serait naturel de penser que les différences exhibées par ces deux enzymes doivent trouver leur source dans ces permutations.

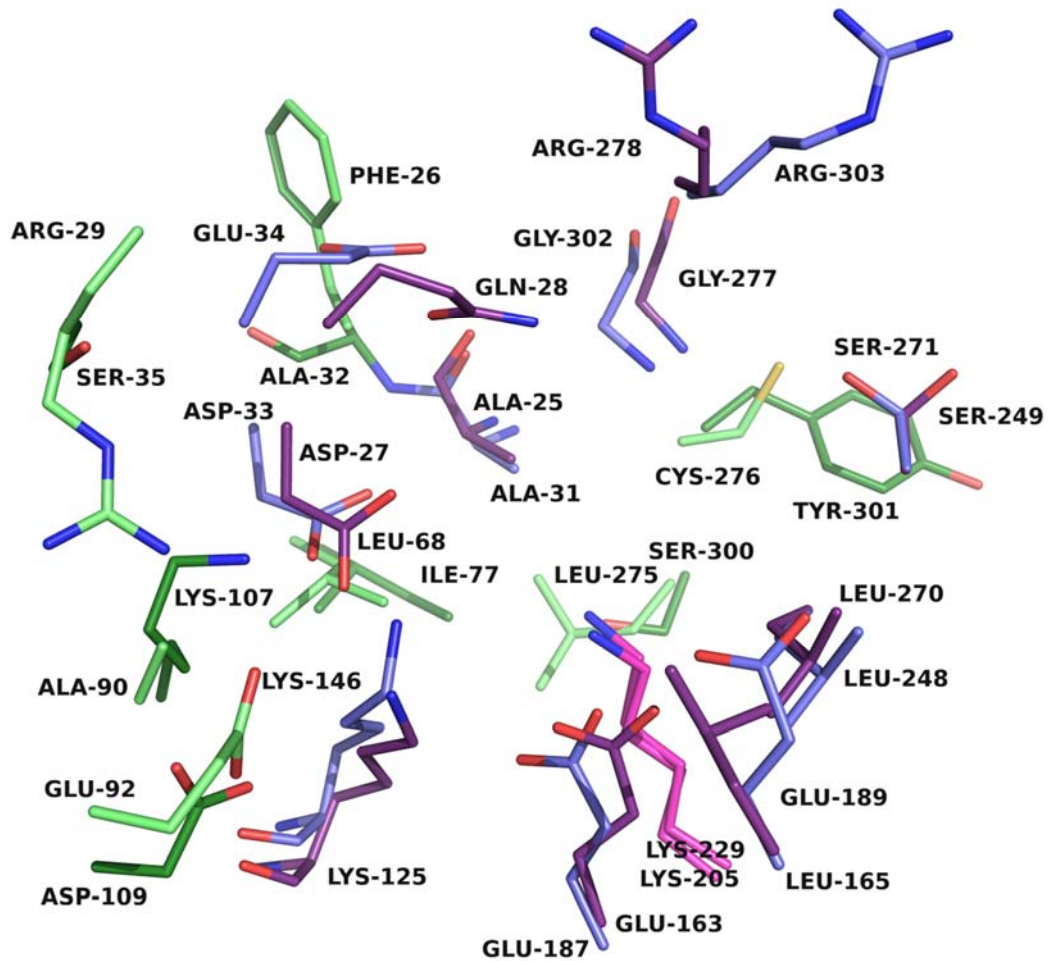


Figure 19 : Alignement du site actif de la TBP aldolase de *S. pyogenes* (violet) et de la FBP aldolase de mammifère (bleu). La lysine catalytique, Lys205 chez la TBP aldolase et Lys229 chez la FBP aldolase, sont colorées en magenta. Les résidus qui diffèrent sont en vert, clair pour la TBP aldolase et foncé pour la FBP aldolase.

1.3 Stéréospécificité des aldolases et synthèse chimique : avancées récentes

Dans la cellule, la formation et le clivage du lien carbone-carbone sont des étapes essentielles dans la synthèse et la dégradation de nombreuses molécules, des sucres aux acides nucléiques. Les enzymes catalysant ces réactions intéressent les chimistes de synthèse depuis longtemps déjà, et un nombre croissant de publications et études sont publiées chaque année se penchant sur l'utilisation de ces enzymes dans la synthèse de molécules complexes. Les enzymes font preuve de beaucoup d'avantages par rapport à la chimie organique classique : elles sont en effet stéréo- et régio-spécifiques, ce qui rend inutile la protection des groupes réactifs. De plus, les réactions peuvent être réalisées dans des conditions douces de température, de pression, et de pH. Enfin, elles sont des catalyseurs « verts » puisqu'elles ne nécessitent pas l'utilisation de solvants organiques ou de métaux lourds toxiques (Clapes, Fessner et al. 2010, Clapés and Garrabou 2011) (Windle, Muller et al. 2014).

1.3.1 Modifier la spécificité pour le substrat :

➤ Aldolases dépendantes au DHAP

Une des limitations évidentes des enzymes en chimie de synthèse est que les protéines trouvées dans la nature n'acceptent souvent qu'un ou peu de substrats. Il se peut ainsi

qu'aucune enzyme naturelle n'existe catalysant une réaction bien spécifique désirée. Les chimistes et biochimistes se sont donc appliqués à élargir la gamme de substrats acceptés par les aldolases, et ce afin de tirer le plus grand parti possible de la promiscuité catalytique pour la production des composés souhaités. Les aldolases sont, comme mentionné, généralement beaucoup plus spécifiques pour leur substrat donneur que pour leur accepteur. Parmi les aldolases dépendantes au DHAP, la FBP aldolase de muscle de lapin, par exemple, n'accepte que le DHAP comme donneur mais tolère une cinquantaine d'aldéhydes accepteurs (Rose and O'Connell 1969) (Bednarski, Simon et al. 1989). Cette particularité de ce groupe d'aldolases est problématique, puisque le DHAP est onéreux, instable, et que son groupement phosphate n'est souvent pas requis dans le produit final de la réaction de synthèse et doit être clivé. De plus, les propriétés physicochimiques similaires du DHAP et des sucres phosphorylés résultant de la réaction de condensation aldolique en font leur séparation par chromatographie difficile. Certains groupes de recherche ont ainsi essayé de produire *in situ* le DHAP requis par l'aldolase dans une approche multienzymatique : par exemple, la synthèse du 5-déoxy-5-éthyl-D-xylulose a été réussie grâce à la production de DHAP par une phytase et glycerol-3-phosphate oxydase (Schoevaart, van Rantwijk et al. 2000). L'autre pendant de cette approche est d'éviter entièrement l'utilisation de DHAP en redessinant le site de liaison au phosphate de ces enzymes par évolution dirigée ou ingénierie/mutagenèse basée sur la structure, et ce afin de les amener à utiliser la dihydroxyacétone non phosphorylée, la DHA, comme substrat (Sugiyama, Hong et al. 2007) (Garrabou, Calveras et al. 2011) : ainsi, la L-rhamulose-1-phosphate aldolase a été modifiée par évolution dirigée afin de la forcer à accepter la DHA au lieu du DHAP. Enfin, un des

candidats le plus prometteur, et qui a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, est la fructose-6-phosphate aldolase, une enzyme qui clive le fructose-6-phosphate en G3P et DHA. Dans le sens de la condensation aldolique, et avec DHA comme donneur, l'enzyme, qui ne produit uniquement que la configuration 3(*S*)-4(*R*), et a pu être altérée et utilisée en synthèse pour donner des sucres rares non phosphorylés en condensant la DHA et divers aldéhydes (Gutierrez, Parella et al. 2011) (Castillo, Calveras et al. 2006).

➤ **Aldolases non dépendantes au DHAP**

La préparation de produits stéréoisomériques grâce à l'évolution directe et l'ingénierie d'aldolases non dépendantes au DHAP a également fait ses preuves ces dernières années. Ainsi, la *N*-acetylneuraminic acid lyase, ou NAL, une aldolase de classe I qui catalyse naturellement l'addition du pyruvate sur le *N*-acétyl mannosamine, tolère une demi-douzaine d'accepteurs aldéhydes (Williams, Woodhall et al. 2005). La technique de mutagénèse saturante a été utilisée pour produire des variants capables d'accepter une plus large gamme d'aldéhydes. Un variant en particulier, siège d'une seule mutation ponctuelle par rapport à l'enzyme native, E192N, s'est montré capable de catalyser la synthèse d'une librairie entière d'analogues de structure similaire de l'acide sialique. Certains de ces composés sont aujourd'hui utilisés comme inhibiteurs de la sialidase du virus de l'influenza A (Smith, Sollis et al. 1998). La NAL a également pu être mutée par une combinaison d'évolution directe et d'ingénierie dirigée pour produire un variant qui accepte le L-arabinose au lieu du *N*-acétyl mannosamine. Ces deux substrats diffèrent

par leur nombre de carbones (6 pour le N-acétyl mannosamine et 5 pour le L-arabinose, (Figure 20)), mais surtout par la stéréochimie de leur C2 et C4. Le meilleur mutant ainsi obtenu par le laboratoire Wong présentait huit résidus mutés par rapport à l'enzyme native, et pouvait synthétiser l'épimère en C5 et C7 de la réaction naturelle (Hsu, Hong et al. 2005).

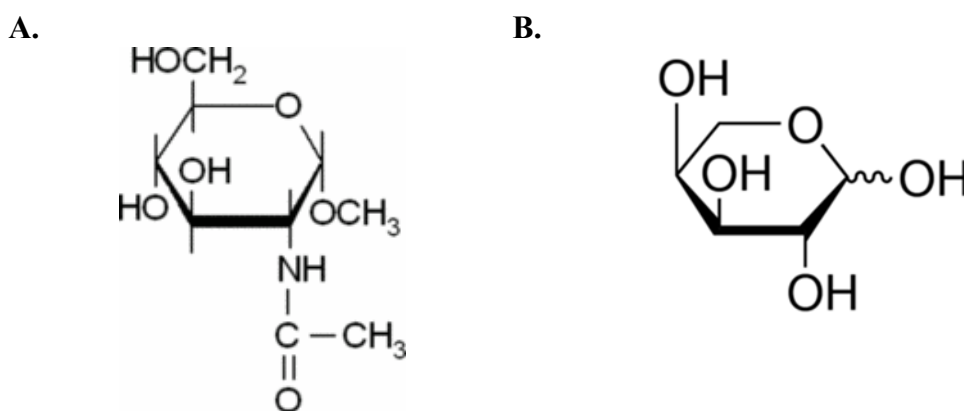


Figure 20 : **A.** le N-acétyl mannosamine et **B.** le L-arabinose.

C'est également le groupe Wong à Scripps, qui, depuis le début des années 2000, a réussi à évoluer de façon rationnelle la D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase. Cette enzyme de classe I, qui catalyse naturellement l'addition du pyruvate sur le D-glyceraldéhyde-3-phosphate, fut d'abord mutée de façon à la forcer à accepter le substrat non-phosphorylé équivalent, soit le 2-kéto-3-déoxygluconate (Fong, Machajewski et al. 2000). Grâce à plusieurs rondes de PCR à erreurs (*error-prone* PCR), un mutant exhibant une augmentation d'un facteur de presque 100 de l'efficacité catalytique pour le clivage du KDG fut produit. Ce dernier variant, de surcroît, peut également catalyser l'addition de l'énantiomère glycéraldéhyde non-phosphorylé, le L-

glycéraldéhyde, sur le pyruvate. La même équipe, continuant leur travail sur l'ingénierie des aldolases, a récemment réussi à créer une paire d'enzyme stéréo-complémentaires en mutant une enzyme comparable, la 2-kéto-3-déoxygluconate aldolase (KDGA). Cette enzyme fait preuve d'une grande promiscuité et ajoute le pyruvate à la fois sur le D-glycéraldéhyde, produisant le D-2-kéto-3-déoxy-gluconate (D-KDGlu) et le D-2-kéto-3-déoxy-galactonate (D-KDGal), mais aussi sur le L-glycéraldéhyde. Grâce à une analyse poussée des données de cristallographie disponibles, la mutagenèse dirigée a permis de générer, et ce à partir d'une enzyme naturellement peu discriminante, une paire d'enzymes stéréo-complémentaires, l'une spécifique au KDGl, et l'autre au KDGal (Royer, Haslett et al. 2010). Encore plus récemment, c'est une aldolase de classe II qui a fait l'objet d'une campagne de *design* rationnel qui a vu le renversement de la stéréochimie du produit de sa réaction (Baker, Carere et al. 2011) : l'aldolase BphI, enzyme qui catalyse l'addition du pyruvate sur l'acétaldéhyde pour former le 4(*S*)-hydroxy-2-oxopentanoate exclusivement, a ainsi été mutée grâce aux données structurales. Les variants résultants, Y290F and Y290S, peuvent utiliser à la fois l'énantiomère 4(*S*) et le 4(*R*), alors que le double mutant aux positions 87 et 290 produit l'énantiomère 4(*R*) exclusivement. Il est intéressant de noter que dans le cas de la mutation Y290F, c'est probablement et tout simplement l'élimination du groupe hydroxyle de la Tyrosine qui a permis aux deux stéréoisomères de se lier au site actif de l'aldolase.

Chez les aldolases non dépendantes au DHAP aussi, la préférence de certaines enzymes pour des substrats phosphorylés a pu être altérée. Ainsi, la 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA), qui catalyse la condensation entre deux aldéhydes, l'acétaldéhyde et

le D-G3P, a été redessinée rationnellement de manière à ce qu'elle puisse accepter des substrats non-phosphorylés (Jennewein, Schurmann et al. 2006) (DeSantis, Liu et al. 2003). La PCR à erreur a également été utilisée sur l'enzyme de façon à lui permettre de synthétiser le (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-tridéoxyhexapyranoside à partir de chloroacétaldéhyde (CAA) (au lieu du G3P) et de deux molécules d'acétaldéhyde, et ainsi pouvoir l'utiliser comme biocatalyseur dans la synthèse de statines (Jennewein, Schurmann et al. 2006).

1.3.2 Modifier le contrôle stéréochimique de la réaction :

➤ Aldolases dépendantes au DHAP

Les aldolases, qu'elles soient de classe I ou II, voient le donneur nucléophile attaquer le second substrat accepteur pour former un nouveau lien carbone-carbone, amenant *de facto* à la création d'un à deux nouveaux stéréocentres. La configuration de ce(s) stéréocentre(s) dépend de la face de l'accepteur attaquée, et dans certains cas de la face du donneur qui mène l'attaque. La plupart des aldolases contrôlent de façon stricte la formation du lien C-C et ne permettent que la formation de produits aldols spécifiques. Néanmoins, et la TBP aldolase de *S. pyogenes* en est un exemple notable, certaines de ces enzymes sont plus tolérantes des différentes combinaisons de stéréochimie possibles et synthétisent une combinaison de produits. C'est une autre TBP aldolase, de classe II celle-là, et au contrôle de la stéréospécificité beaucoup plus stringent, qui a été modifiée

par évolution dirigée afin qu'elle puisse synthétiser le (3*S*,4*S*)-FBP au lieu du (3*S*,4*R*)-TBP (Williams, Domann et al. 2003). Le changement dans la stéréochimie du produit, FBP *versus* TBP, provient de l'attaque de l'intermédiaire enzyme-DHAP sur la face *si*, au lieu de la face *re*, de l'accepteur aldéhyde, et a été rendu possible grâce à la mutation des trois positions 26, 104 et 256, résidus probablement cruciaux dans le contrôle stéréochimique de la réaction par l'enzyme.

➤ Aldolases non dépendantes au DHAP

Le résultat stéréochimique de la réaction catalysée par l'aldolase NAL, la *N*-acetylneuraminic acid lyase précédemment mentionnée, a également été altéré par le groupe de Berry et Nelson (Williams, Woodhall et al. 2006). Le variant créé préalablement, E192N, capable de tolérer de nombreux accepteurs aldéhydes mais démontrant peu de contrôle stéréochimique (Smith, Sollis et al. 1998), fut modifié *via* PCR à erreurs et plusieurs cycles de mutagenèse dirigée. L'étude citée a permis d'identifier deux doubles variants, E192N/T167V et E192N/T167G, chacun grandement spécifique pour le produit 4(*R*) et 4(*S*), respectivement. Dans cette instance, ce n'est pas la nature et la géométrie des substrats fournis qui permet à la paire d'enzymes stéréo-complémentaires de synthétiser les deux stéréoisomères, mais bien le contrôle de l'aldolase sur la stéréochimie de la réaction qui amène à la synthèse des deux isomères complémentaires par les enzymes sœurs.

1.3.3 Stabilité des aldolases pour utilisation en synthèse :

L'ingénierie des protéines a de même pu rendre les aldolase plus adaptées à la synthèse chimique en limitant leur intolérance aux solvants organiques et aux conditions de température et de pH extrêmes, par exemple. La FBP aldolase de *E. coli* a ainsi été modifiée *via* «DNA shuffling» entre *E. coli* et *Edwardsiella ictaluri*, ce qui a permis de produire un variant dont la demi-vie à 53 °C a été accrue d'environ 300 fois, et dont l'activité dans divers solvants organiques a également été améliorée (Hao and Berry 2004). Un autre exemple notable de cette approche est une transaldolase responsable de la conversion du sedoheptulose-7-phosphate (S7P) et glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) en fructose-6-phosphate (F6P) et erythrose-4-phosphate (E4P) (Chen, Hwang et al. 2012), et partie intégrante d'une cascade de réactions transformant le xylose en éthanol dans *Pichia stipites*. Un PCR à erreurs a amené à l'identification d'un mutant ponctuel qui, une fois introduit dans la bactérie, lui a permis de produire de l'éthanol de façon 40 % plus efficace.

1.3.4 Design *de novo* d'aldolases :

L'expression ultime de l'utilisation des différentes techniques d'ingénierie des protéines pour utilisation en synthèse chimique se traduit bien sûr par la création *de novo* d'une enzyme. Un exemple particulièrement frappant d'une telle approche se trouve dans la création d'abord *in silico* d'une rétro-aldolase (Althoff, Wang et al. 2012). Cette nouvelle enzyme, baptisée RA95.0, fut synthétisée puis soumise à plusieurs cycles

d'évolution dirigée, et la structure cristallographique du nouveau mutant en complexe avec un inhibiteur fut résolue après chaque ronde d'évolution. Après plusieurs rondes, le variant RA95.5 fut finalement produit, exhibant une activité pour la réaction choisie approchant celle d'une aldolase naturelle (1 U/mg), ce qui est remarquable pour une enzyme dessinée en laboratoire.

Tout le large éventail des techniques d'ingénierie des protéines a ainsi pu être mis à contribution de façon à exploiter les propriétés attrayantes des aldolases tout en améliorant leur stabilité, leur préférence au substrat et leur stéréosélectivité, et ce à la carte, et selon les besoins. Les aldolases à grande promiscuité vis-à-vis de leur substrat peuvent ainsi être modifiées de façon à accepter plus d'un stéréoisomère et synthétiser l'isomère désiré selon le substrat fourni. Il est également possible de créer des enzymes dont le contrôle stéréochimique de la réaction a été transformé, et ce à partir d'aldolases hautement stéréo-discriminantes : des paires d'enzymes stéréo-complémentaires peuvent ainsi synthétiser les deux stéréoisomères possibles en étant chacune stéréosélective.

Le (ou la) cristallographe notera avec plaisir que les données structurales obtenues par cristallographie des rayons X sont souvent déterminantes dans ces *re-design* et modifications des enzymes.

La capacité d'associer les aldolases ainsi modifiées à d'autres enzymes au sein de cascades de réactions artificiellement construites, et ce *in vitro* ou même *in vivo*, ne peut qu'ouvrir un champ de possibilités nouvelles pour leur utilisation en synthèse chimique de composés complexes.

1.4 Objectifs du projet de recherche

1.4.1 Résidu responsable du transfert stéréospécifique du proton au C3 du DHAP

Notre étude du mécanisme de la TBP aldolase de *S. pyogenes* a commencé par une enquête enzymologique et structurale afin de discerner le résidu responsable du transfert stéréospécifique du proton en C3 du DHAP. En effet, un proton doit être abstrait (condensation aldolique) ou ajouté (clivage rétro-aldolique) sur l'hydroxyle du C3 de la cétone phosphorylée. Cette réaction permet l'interconversion entre l'iminium et l'énamine formés entre la lysine nucléophile du site actif et le DHAP (Figure 1.8, intermédiaires 2 et 3). Dans le mécanisme de la FBP aldolase de classe I, le proton transféré doit être le pro-(*S*), dans la même orientation que le C4 du FBP, puisque l'enzyme ne produit que le 3(*S*)-FBP. L'abstraction du proton se fait donc avec conservation de chiralité en C3 de l'hexose naissant (St-Jean and Sygusch 2007).

Le résidu responsable chez la FBP aldolase est maintenant connu : c'est la Tyrosine 363 du C-terminal de l'enzyme, qui idéalement placée grâce à la mobilité du C-terminal, peut venir abstraire stéréospécifiquement le proton en C3 de l'intermédiaire (St-Jean and Sygusch 2007). La TBP aldolase, elle, ne possède pas de C-terminal catalytiquement important puisque son activité après traitement à la carboxypeptidase demeure inchangée (Rutter, Richards et al. 1961). De plus, elle produit quatre stéréoisomères dans le sens de la condensation, ce qui de prime abord semble plaider en défaveur d'une abstraction stéréospécifique comparable à celle observée chez la FBP

aldolase. Dans notre étude du phénomène, publiée en 2010 dans le *Journal of Biological Chemistry* et objet de mon mémoire de maîtrise, (LowKam, Liotard et al. 2010) nous avons pu répondre à cette question en utilisant notamment la cristallographie par diffraction des rayons X et des cinétiques de marquage isotopique. Nous avons découvert que contrairement aux apparences, la TBP aldolase n'est capable d'ôter, *via* une molécule d'eau W1 activée par l'oxyanion phosphate, que le proton pro(*S*) du C3 du DHAP marqué au tritium, à l'instar de la FBP aldolase. Dans le tritium, elle voit néanmoins l'équilibration et l'échange de proton avec le milieu tritié amener à une perte apparente de stéréospécificité due à une probable rotation de l'hydroxyle du C3 (Figure 21). C'est cet isomérisme cis-trans, observé chez la TBP aldolase mais pas chez la FBP aldolase, qui ne lui conserve pas la stéréochimie du C3 et résulte en l'addition du G3P en deux orientations possibles, donnant les isomères 4(*R*) et 4(*S*) (Bissett and Anderson 1980).

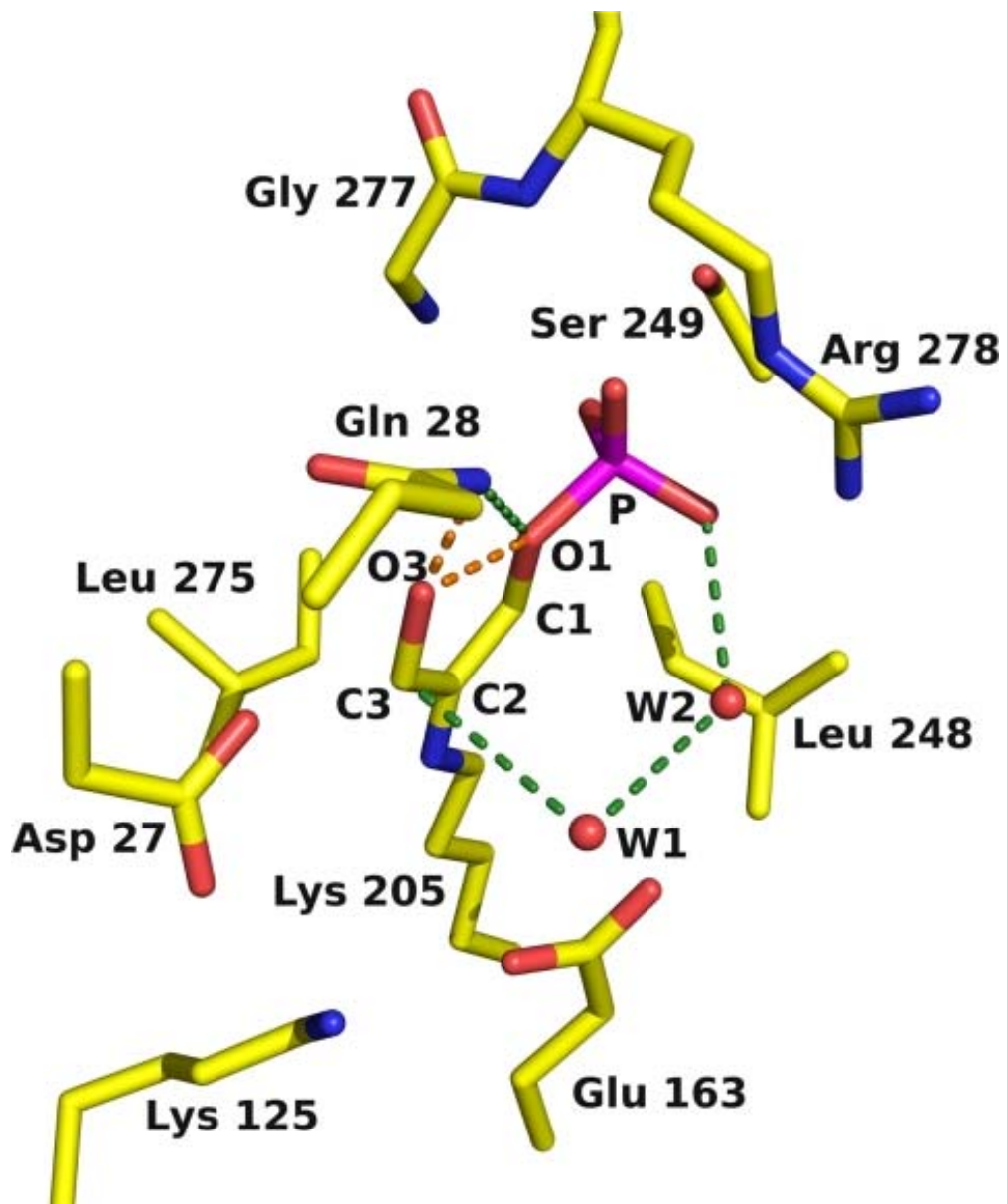


Figure 21 : Isomérisation de l'intermédiaire carbanion formé entre le DHAP et le site actif de la TBP aldolase. La molécule d'eau W1 est représentée par une sphère rouge.

1.4.2 Résidu responsable du clivage rétro-aldolique

Nous avons poursuivi notre exploration du mécanisme de la TBP aldolase de *S. pyogenes* en nous penchant sur l'identité de(s) résidu(s) responsable(s) de l'abstraction du proton en C4 du 4(*R*)-FBP et du 4(*S*)-TBP, tous deux clivés par l'enzyme. En effet, le mécanisme de la FBP aldolase voit le FBP-iminium transformé en DHAP-énamine/carbanion (Figure 8, **intermédiaires 3 et 4**) grâce à l'abstraction du proton en O4 du FBP et TBP et clivage subséquent du lien C3-C4.

Cette étape est nécessaire et doit avoir lieu quelle que soit la stéréochimie du C4 du substrat, 4(*S*)-FBP ou 4(*R*)-TBP pour la TBP aldolase. Le résidu responsable est à présent connu chez les FBP aldolases de classe I de mammifères : des études de mutagenèse dirigée, de cristallographie des rayons X et de cinétiques enzymatiques (Maurady, Zdanov et al.) (St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005) ont fini par identifier la base comme étant l'acide glutamique Glu187 de la FBP aldolase, résidu strictement conservé dans les aldolases à base de Schiff et à même d'abstraire le proton du (*S*)-C4 du FBP. Or, la TBP aldolase doit faire de même sur le C4-OH du (*S*)-FBP tout comme sur celui du (*R*)-TBP. Comment en est-elle capable ? Un seul résidu est-il incriminé, ou l'enzyme utilise-t-elle deux mécanismes différents selon le substrat ? Les modalités de liaison de la TBP aldolase à ses substrats sont-elles différentes de celle de la FBP aldolase de mammifère au sien, ce qui expliquerait leur grand écart de K_M ? Nous avons employé la mutagenèse dirigée, la cristallographie des rayons X, des cinétiques enzymatiques de profil pH et la calorimétrie isotherme pour conduire cette étude, dont

les résultats sont présentés au Chapitre 2. Ils constituent la première partie des résultats de cette thèse.

1.4.3 Différences entre les TBP et FBP aldolases de classe I ; ouverture du cycle furanose du substrat.

Enfin, l'énigme persistait quant à la raison de la disparité entre la TBP aldolase et la FBP aldolase, toutes deux de classe I, dans leur comportement envers les deux stéréoisomères que sont le TBP et le FBP, puisqu'elles partagent même le résidu responsable du clivage grâce à la grande souplesse du site actif de la TBP aldolase. De fait, alors que la TBP aldolase est capable de cliver/former à la fois les deux hexoses avec des vitesses très comparables, la FBP aldolase de mammifères, elle, ne peut utiliser que le 4(*R*)-FBP (Gray and Barker 1970). En outre, le TBP agit comme inhibiteur compétitif chez la FBP aldolase, illustrant une incapacité à le cliver qui ne semble être due qu'à la stéréochimie en son C4. Les sites actifs des deux enzymes étant hautement similaires, la question se posait de quel aspect de la TBP aldolase différait de la FBP aldolase et pourrait éclairer cette disparité.

Pour tenter d'y répondre, nous avons utilisé à nouveau la cristallographie des rayons X, conjointement avec du *docking in silico* et des expériences de calorimétrie isothermique. Les résultats de cette dernière étude, qui nous ont également permis d'éclairer le mécanisme d'ouverture du cycle furanose par l'enzyme, sont exposés au Chapitre 3 et composent la deuxième et dernière partie des résultats de cette thèse.

1.5 Méthodes

1.5.1 Purification et cristallisation de la TBP aldolase de *S. pyogenes*

La TBP aldolase recombinante a été exprimée dans *Escherichia coli*. La souche JM-109 a été transformée avec un plasmide pKK222-2 codant pour la protéine d'intérêt. La surexpression est induite grâce à l'adjonction d'IPTG dans le milieu de culture. La TBP aldolase est ensuite purifiée grâce à un système en trois étapes (Liotard and Sygusch 2003) (LowKam, Liotard et al. 2010). Après la lyse des bactéries sur-exprimant la protéine, le culot est passé sur un échangeur anionique de type DEAE. Les fractions sont testées pour l'activité aldolasique grâce à un test couplé (Racker 1947), et les fractions actives sont rassemblées et passées sur une colonne hydrophobe Phényl-sépharose. Après une précipitation la nuit durant dans une solution saturante de sulfate d'ammonium, les fractions actives sont ensuite soumises à une filtration sur gel. Le résultat est environ 30 milligrammes de TBP aldolase parfaitement pure par litre de culture bactérienne.

La cristallisation de la protéine est réalisée grâce à la méthode de la goutte pendante (*hanging drop*). La solution de 5 milligramme par millilitre de protéine est mélangée à proportion égale avec la solution précipitante. La goutte ainsi obtenue est suspendue dans le puit hermétique d'une plaque de cristallisation dont le fond contient environ 1 millilitre de la solution précipitante. Après équilibration du système *via* l'évaporation de l'eau contenue dans la goutte, la supersaturation est atteinte. En effet, l'évaporation

progressive de l'eau de la goutte permet d'y augmenter de manière tout aussi progressive la concentration en protéine et en agents précipitants (Figure 22). Il y a alors nucléation de la protéine, ce qui a pour effet d'en faire diminuer la concentration en solution dans la goutte. Les cristaux de TBP aldolase commencent de croître.

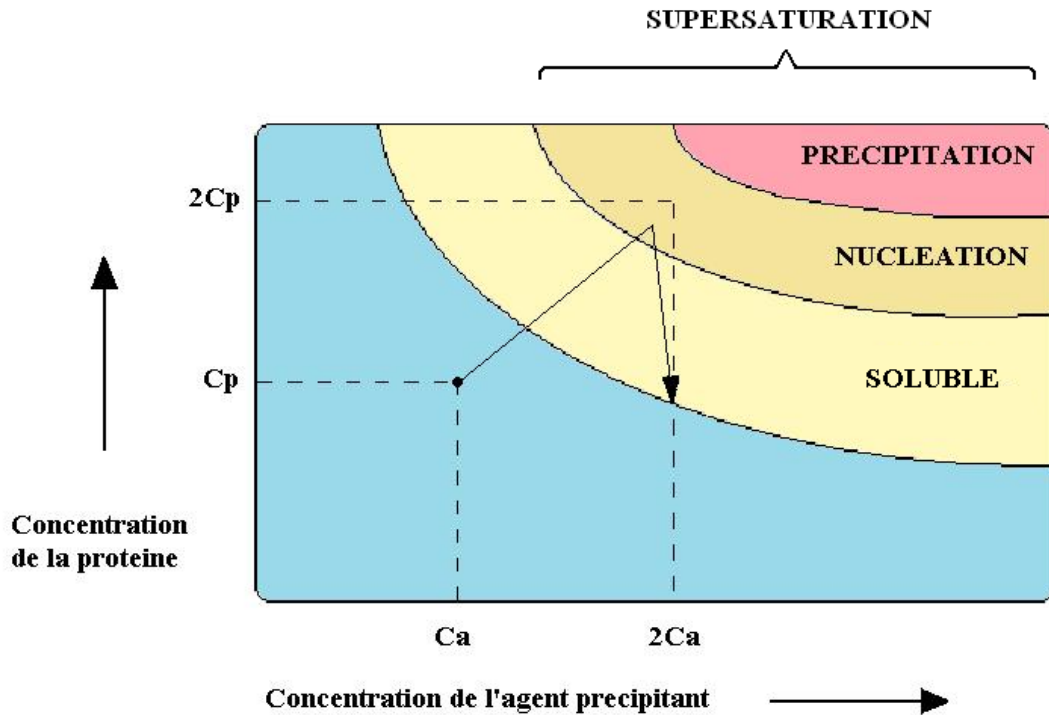


Figure 22: Diagramme de phase selon la concentration en protéine et en agent précipitant. Le chemin emprunté par le système lors d'une expérience de goutte pendante, par évaporation de l'eau contenue dans la goutte et équilibration avec le réservoir contenant la solution précipitante, est représenté par une flèche.

Les cristaux de TBP aldolase adaptés à la diffraction des rayons X apparaissent selon ce protocole en moins d'une heure sous forme de plaques minces (Figure 23).

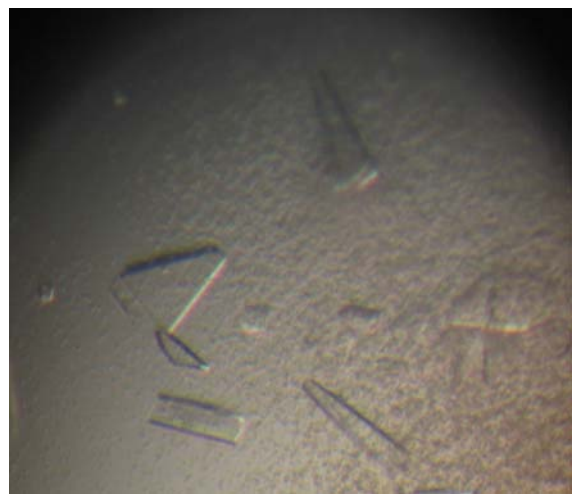


Figure 23 : Cristaux de TBP aldolase après 48 heures de croissance. À noter, la présence d'un précipité protéique visible dans la goutte, et qui n'est pas obstacle à la croissance des cristaux, ni à leur diffraction.

1.5.2 Diffraction des rayons X

1.5.2.1 Trempage et congélation des cristaux

Après trois jours environ, les cristaux ainsi obtenus sont suffisamment gros et surtout épais pour l'expérience de diffraction des rayons X. Les cristaux choisis pour la diffraction sont trempés dans une solution à hauteur de 20 % de cryoprotectant, du glycérol en l'occurrence, et dans une solution saturante de ligand le cas échéant. Dans le cas des structures de la TBP aldolase native et mutée complexée aux inhibiteurs hexitol-P₂ et talitol-P₂, une solution de 5 mM de ligand a ainsi été utilisée. Les cristaux des mutants de la TBP aldolase complexée au FBP et TBP ont été trempés et congelés de la même manière. La TBP aldolase native, néanmoins, du fait de son activité catalytique conservée dans la maille cristalline, a du faire l'objet d'un protocole amendé. En effet, pour essayer de piéger les deux hexoses intacts et non clivés au site actif, nous avons baissé progressivement (sur quelques minutes) le pH de la solution de trempage jusqu'à 4.5. Les cristaux ont été baignés dans la solution ultime, contenant à la fois le ligand et le cryoprotectant, puis immédiatement plongés dans l'azote liquide et congelés. C'est cette technique qui nous a permis de saisir les intermédiaires covalents entre le FBP et le TBP et le site actif de l'enzyme.

Après immersion immédiate dans l'azote liquide, le cristal est soumis au flux de rayons X. La congélation du cristal permet de minimiser les dommages causés par le faisceau de photons de haute énergie, et la cryoprotection permet elle d'éviter la formation de glace dommageable à l'analyse des résultats.

1.5.2.2 Diffraction des cristaux

Une expérience de cristallographie des rayons X se poursuit ensuite par la diffraction des photons par le cristal, arrangement ordonné de molécules empaquetées régulièrement et maintenues ensemble grâce à des interactions non covalentes. Il est d'usage d'évoquer le cristal en termes de cellule unitaire, *unit cell*, qui est définie comme le plus petit ensemble capable de représenter entièrement le cristal par des opérations de symétrie translationnelle seulement (Drenth 2007). L'unité asymétrique, elle, est une composante de la cellule unitaire, et décrit la cellule unitaire par toute opération de symétrie possible dans les macromolécules biologiques (Figure 24).

Le cristal, exposé à un faisceau intense de rayons X, diffracte les photons sous la forme d'un patron de diffraction qui est détecté et mesuré précisément par un détecteur spécialisé (Figure 25).

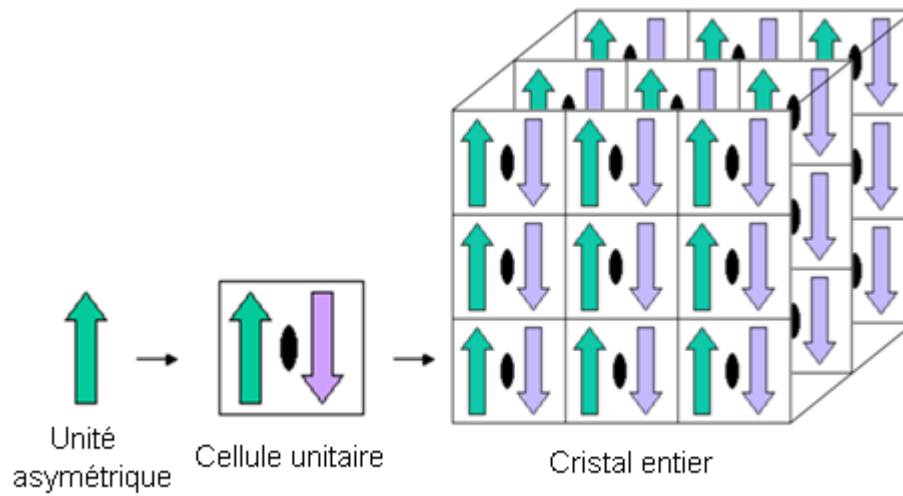


Figure 24 : Un cristal, sa cellule unitaire ou *unit cell*, et son unité asymétrique

(Adapté de : rcsb.org)

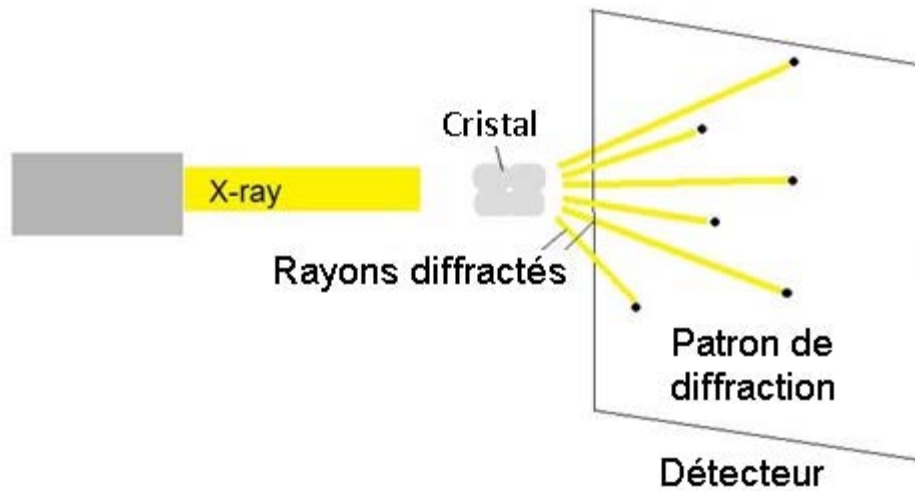


Figure 25 : Expérience de diffraction des rayons X par un cristal protéique.

➤ **Le modèle de Bragg**

Les Bragg, père et fils (Figure 26), ont démontré que la diffraction des rayons X par un cristal pouvait être expliquée en termes de réflexion de ces rayons par des ensembles de plans parallèles au sein du cristal.

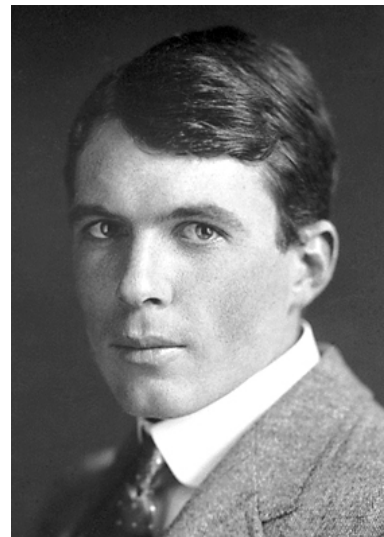
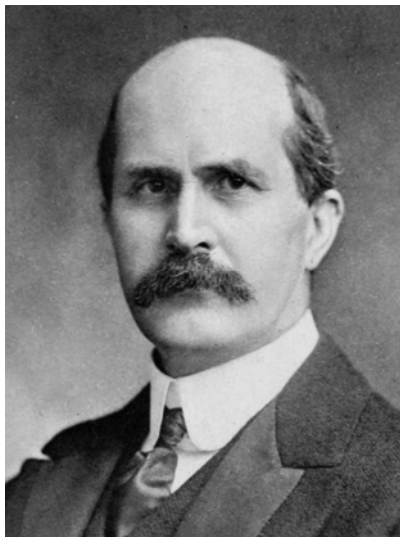


Figure 26 : William Henry Bragg (1862-1942) et son fils William Lawrence Bragg (1890-1971). Prix Nobel de Physique conjointement en 1915, pour « leurs services dans l'analyse de la structure des cristaux grâce aux rayons X ». William Lawrence Bragg a reçu le prix Nobel à l'âge de 25 ans.

Un cristal peut être décrit entièrement par sa cellule unitaire, dont les dimensions sont a , b et c , les longueurs des axes, et α , β et γ , les angles entre les axes. Bien que l'ensemble de plans le plus flagrant soit donc celui dessiné par les faces de la cellule unitaire, on peut imaginer le cristal traversé d'un nombre infini d'ensemble de plans équivalents et parallèles (Figure 27). Chaque ensemble de plans peut être dépeint par trois indices h , k , et l appelés les indices de maille ou indices de Miller.

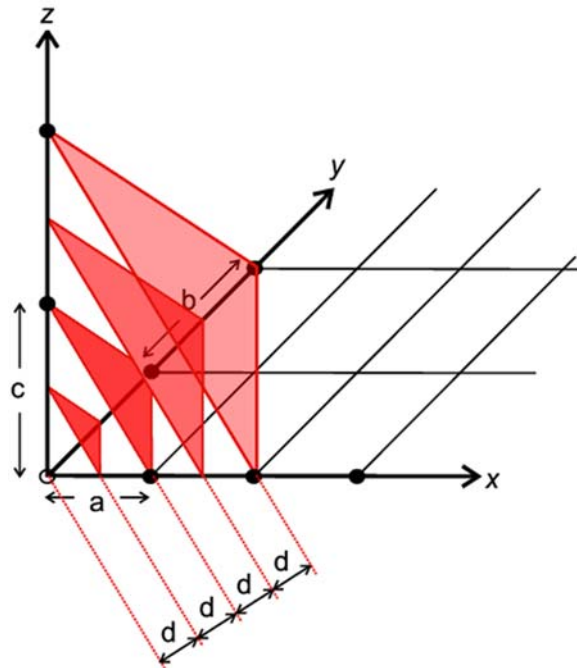


Figure 27 : Ensemble de plans dans une cellule unitaire (Adapté de : rscsb.org). a , b , et c décrivent l'intersection des plans avec l'axe des x , y et z , respectivement. La distance inter-plans est dénotée d .

Les plans décrits par les indices h , k et l intersectent l'axe a (x) à $1/h$, l'axe b (y) à $1/k$, et l'axe c (z) à $1/l$, et sont séparés par une distance d . Dans le modèle de Bragg, la diffraction est la réflexion des rayons X par ces ensembles de plans parallèles, avec chaque ensemble de plan agissant comme un seul « élément diffractant » et produisant une seule réflexion.

➤ **La loi de Bragg :**

Chaque ensemble de plans possède une distance d entre les plans : d augmente quand les indices de Miller correspondant diminuent. La loi de Bragg propose qu'un ensemble de plans d'indice hkl et de distance entre les plans d_{hkl} produiront un rayons X diffracté quand un faisceau de longueur d'onde λ atteindra les plans à angle θ incident, et si et seulement si :

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda. \quad \text{Équation 1}$$

où n est un nombre entier.

Si les rayons X émergent des plans d'un ensemble de plans satisfont la loi de Bragg, ils sortiront du cristal en phase l'un avec l'autre (Figure 28); ils interféreront de façon constructive et produiront une réflexion, ou tache de diffraction, sur le patron de diffraction.

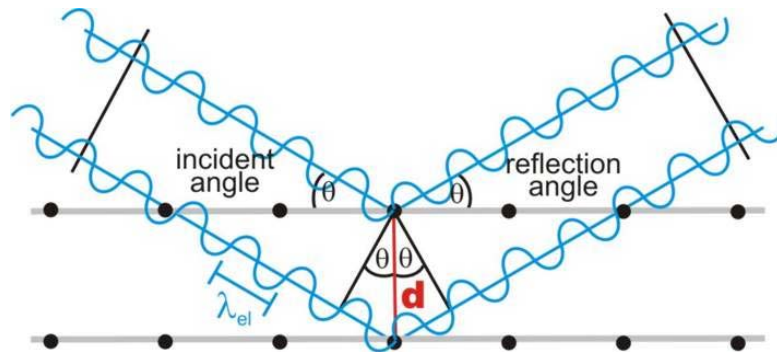


Figure 28 : Représentation géométrique de la loi de Bragg (*Adapté de rcsb.org*).

L'intensité du rayon diffracté sera dépendante du nombre d'atomes (et de leur densité électronique) se situant sur l'ensemble de plans en question : une forte densité électronique sur les plans diffractant se traduira par un rayon de forte intensité, alors que la réflexion sera faible s'il y a peu d'électrons sur les plans.

L'espace réel et l'espace réciproque :

L'espace occupé par les réflexions est appelé l'espace réciproque : le patron de diffraction en est donc une représentation. Le cristal et sa maille cristalline se trouvent eux dans l'espace réel, qui est l'inverse de l'espace réciproque (Figure 29). La maille réciproque, construite à partir de la maille réelle dans l'espace réciproque, permet de prédire la direction et donc la position de chaque rayon diffracté sur le patron de diffraction. L'espace inter-plan de la maille réciproque est simplement l'inverse de l'espace inter-plan de la maille réelle : la distance entre les réflexions mesurées sur le

détecteur et les dimensions de la cellule unitaire du cristal et sa maille sont donc liées, ce qui permet de mesurer les dimensions de la cellule unitaire à partir du patron de diffraction.

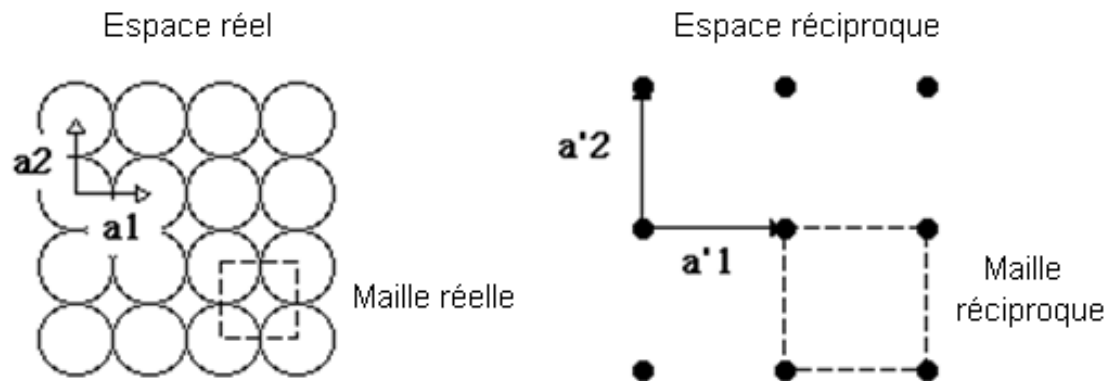


Figure 29 : L'espace réel et l'espace réciproque (Adapté de : pd.chem.ucl.ac.uk).

➤ Le modèle de Fourier

Chaque rayon X diffracté par le contenu du cristal produit une réflexion, ou tache de réflexion, qui peut être décrite comme la somme des contributions de tous les éléments diffractant dans la cellule unitaire du cristal. Autrement dit, chaque atome de la cellule unitaire contribue à chaque réflexion du patron de diffraction. La somme ainsi produite,

et qui décrit un rayon X, c'est-à-dire une onde lumineuse, est connue comme un facteur de structure, ou *structure factor*. Le facteur de structure est une onde qui est en fait une somme d'ondes, qui chacune résulte de la diffraction d'un seul atome : le facteur de structure est en fait une sommation de Fourier, du nom du mathématicien français du XVIII-XIX^{ème} siècle Jean Baptiste Joseph Fourier (Figure 30). Ce dernier a montré que toute fonction périodique complexe peut être décomposée en une somme, ou série, de fonctions périodiques plus simples.

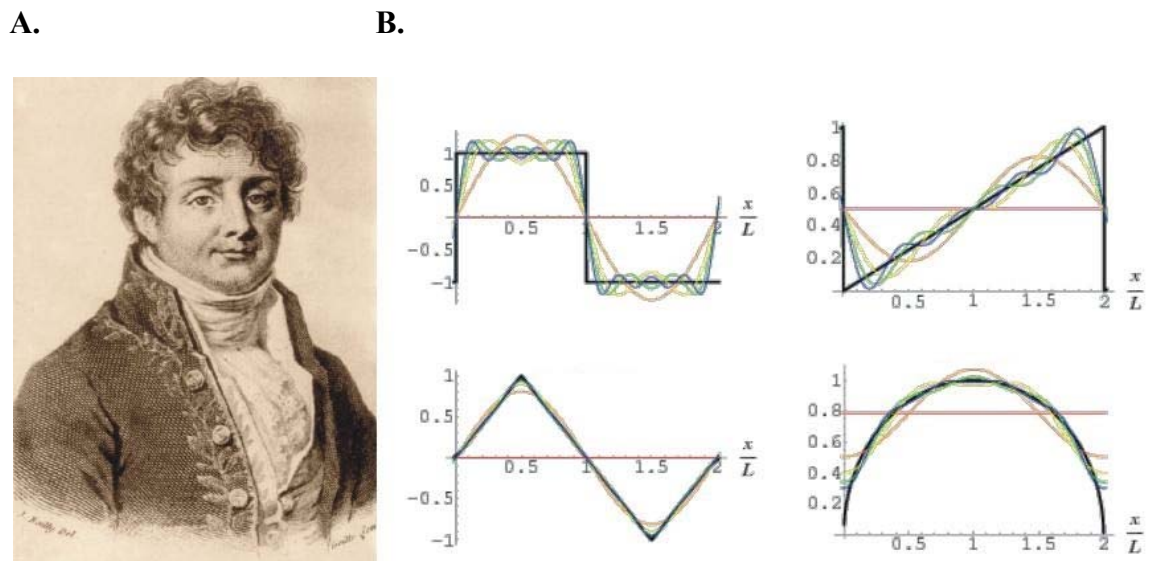


Figure 30 : A. Jean Baptiste Joseph Fourier (1768-1830) et B. Représentation graphique de l'analyse de Fourier. Fourier décompose une fonction mathématique complexe en une somme infinie de fonctions *sinus* et *cosinus* plus simples.

Ce sont véritablement les électrons contenus dans le cristal qui sont les éléments diffractant les rayons X. La diffraction enregistrée et analysée va donc renseigner sur la localisation et distribution des électrons au sein du cristal : c'est pourquoi on parle généralement de carte de densité électronique. Cette carte de densité électronique est bien sûr un moyen de se représenter la forme de la molécule d'intérêt, ses frontières, et du fait de la nature périodique du cristal qui est une répétition d'une même cellule unitaire, cette carte peut être décrite comme une fonction également périodique. Cette fonction est appelée $\rho(x, y, z)$; elle prend donc une valeur ρ selon la position x, y, z dans la cellule unitaire (et dans le cristal).

Puisque les éléments diffracteurs du cristal sont en fait les électrons, et que la diffraction peut être décrite par un facteur de structure par réflexion, chaque facteur de structure, décrivant chacun une onde et donc une fonction périodique, peut être exprimé comme la sommation de Fourier de la diffraction par électron, ou par un « volume » d'électrons (Rhodes). Chaque facteur de structure sera donc une équation ou sommation, décrivant la diffraction des rayons X par un cristal donné en termes de densité électronique.

Ainsi, pour une cellule unitaire contenant n atomes ou volume d'électrons, le facteur de structure F_{hkl} est la somme de Fourier des facteurs de structures atomiques individuels f_{hkl} .

$$f_{hkl} = f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad \text{Équation 2}$$

Le terme f_j est le facteur de diffraction de l'atome j . Le terme en exponentielle décrit une fonction périodique tri-dimensionnelle.

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad \text{Équation 3}$$

où l'équation 3 ne décrit qu'une seule réflexion.

Si on exprime le facteur de structure comme la somme de Fourier des facteurs de structures de chaque volume d'électrons :

$$F_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} dx dy dz \quad \text{Équation 4}$$

ou, alternativement,

$$F_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} dV \quad \text{Équation 5}$$

où l'intégration est faite sur V , le volume total de la cellule unitaire. L'équation 5 montre que l'expression mathématique du facteur de structure F_{hkl} est la transformée de Fourier de la densité électronique $\rho(x, y, z)$.

La densité électronique $\rho(x, y, z)$ est à son tour la transformée de Fourier inverse des facteurs de structure, et peut être exprimée à son tour :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad \text{Équation 6}$$

où le facteur de structure F_{hkl} est lui-même une sommation de Fourier décrivant une réflexion du patron de diffraction, et donc une onde lumineuse.

Or, une onde, pour être correctement représentée, doit l'être selon trois paramètres : son amplitude, sa fréquence, et sa phase. L'amplitude de F_{hkl} est proportionnelle au carré de l'intensité de la réflexion, et est donc mesurable et calculable directement : l'intensité de chaque tâche du patron de diffraction est donc une information cruciale. Les trois fréquences de la fonction d'onde tri-dimensionnelle sont h , k et l , c'est-à-dire les indices des plans qui produisent la réflexion décrite par F_{hkl} . Malheureusement, le dernier paramètre nécessaire, la phase, n'est pas directement mesurable dans les expériences de diffraction de rayons X. Cette limitation, intrinsèque à la technique, et les moyens de la contourner, seront discutés section 1.4.2.4.

Pour le moment, il faudra se souvenir que c'est l'intensité relative des taches de diffraction qui contient l'information quant à l'arrangement des atomes et molécules au sein de la maille cristalline.

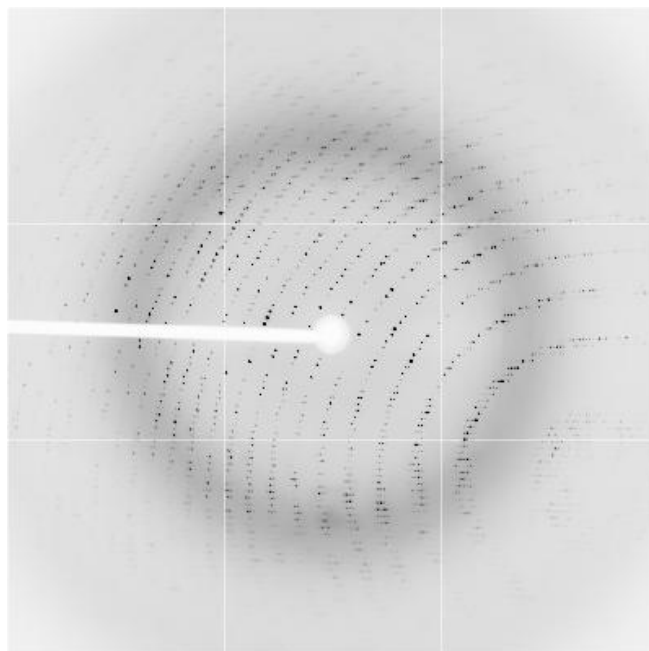
En résumé, le modèle de Bragg nous dit où trouver les données et prédit la symétrie du cristal, alors que le modèle de Fourier nous révèle où sont quels atomes dans le cristal (voir (Rhodes) ou (Drenth 2007) pour une explication de la théorie de diffraction des rayons X par un cristal protéique).

1.5.2.3 Analyse des résultats de diffraction

Le patron de diffraction obtenu (Figure 31), qui est en fait des centaines d'images contenant des milliers de réflexions individuelles, est ensuite analysé, réduit et utilisé pour résoudre la structure en trois dimensions de la macromolécule d'intérêt.

La première étape de ce processus consiste à soumettre le patron à l'analyse de programmes informatiques spécialisés (Kabsch) (Otwinowski 1997). Ces derniers vont mesurer l'intensité de chaque tache de diffraction, de même que sa position.

A.



B.

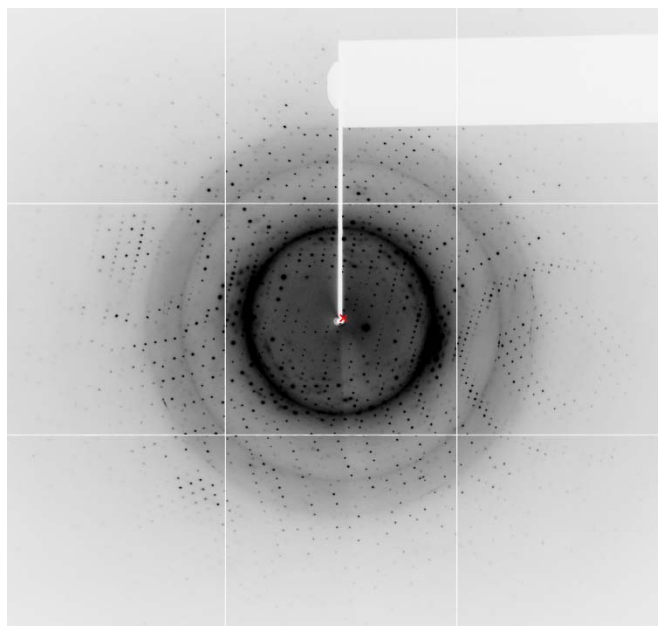


Figure 31 : Patrons de diffraction de la TBP aldolase de *S. pyogenes*. A. Patron diffractant à 2.0 Å. **B.** Patron diffractant à 1.2 Å. Les deux patrons ont été collectés au synchrotron NSLS du *Brookhaven National Laboratory*, NY.

Cette dernière information est suffisante pour inférer les paramètres de maille du cristal objet de l'expérience, ce qui permet d'en connaître le groupe d'espace.

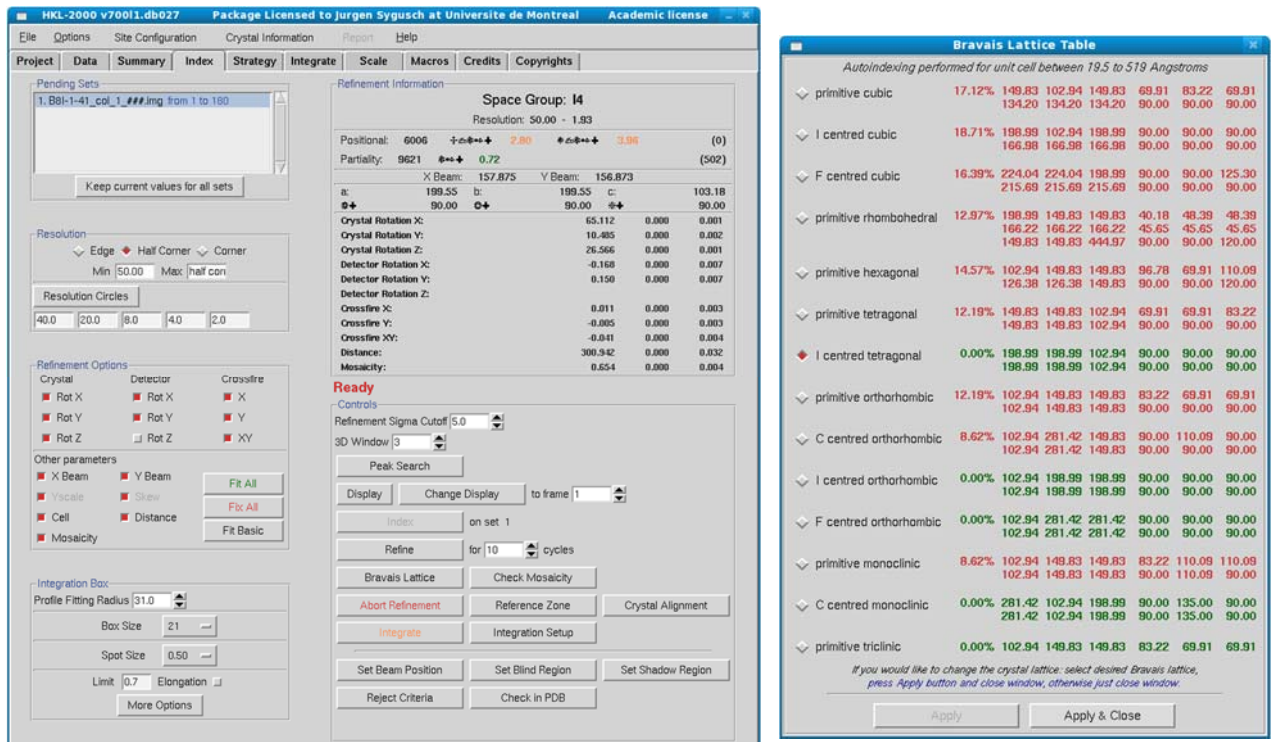
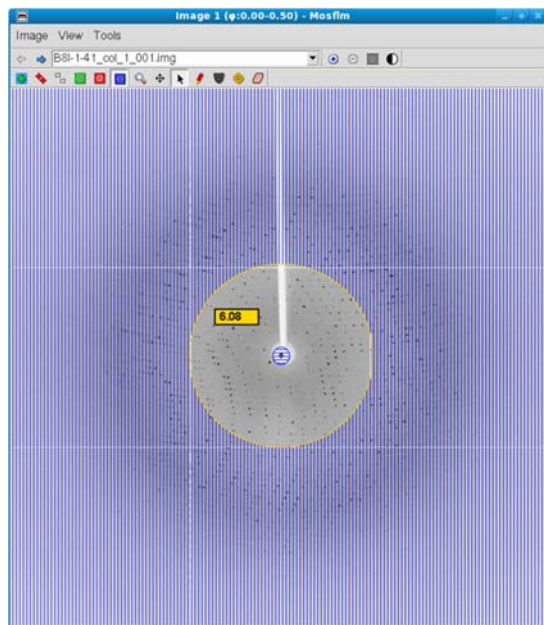


Figure 32 : Analyse d'une image de diffraction par le programme HKL2000 (Otwinowski 1997). Le groupe d'espace, avec les paramètres de maille correspondants, est déterminé dans la fenêtre de droite.

Les taches de diffraction enregistrées dans les petits angles (proches du centre du détecteur, hauts indices de Miller), correspondent aux données de basse résolution, alors que celles dans les grands angles (éloignés du centre du détecteur, petits indices de

Miller) représentent les données de haute résolution (Figure 33). La limite de résolution atteinte par le jeu de données examiné peut donc être déterminée dès les premières images de diffraction. D'autres paramètres quant à la qualité de la diffraction peuvent également être calculés : la mosaïcité du cristal et son désordre, qui se traduit par exemple par un élargissement des taches.

A.



B.

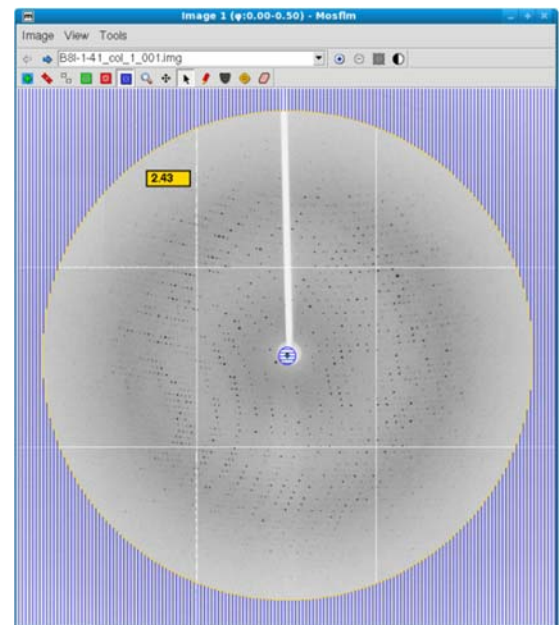


Figure 33 : Limite de résolution atteinte par le jeu de données de diffraction. A. Les taches de diffraction dans les petits angles, proche du centre du détecteur, correspondent aux données de faible résolution. **B.** À l'inverse, les taches dans les grands angles correspondent aux données de haute résolution.

Il faut se souvenir néanmoins qu'une image d'un patron de diffraction n'est pas suffisante pour obtenir la structure du cristal en son entier; en effet elle ne représente qu'une petite partie de la sommation de Fourier totale, qui doit être faite sur la plus grande partie de l'espace réciproque possible. C'est afin d'atteindre la plus grande partie possible de l'espace réciproque, et ainsi collecter le plus d'information possible, que le cristal doit être tourné petit à petit de 180° et qu'une image de diffraction doit être enregistrée à chaque angle. Si le cristal possède une plus grande symétrie, toutefois, il ne sera pas nécessaire de compléter 180° , et une plus petite « tranche » de 90° ou même 45° , sera peut être suffisante.

L'indexation du patron de diffraction peut alors se faire. La position des taches de diffraction sur le détecteur suffit aux programmes informatiques pour inférer les dimensions de la cellule unitaire tout en assignant à chaque tache une position dans l'espace réciproque. La symétrie et le groupe d'espace auquel appartient le cristal peuvent ainsi être déterminés.

Les dernière étapes du processus d'analyse du patron de diffraction proprement dit sont l'intégration, qui convertit les centaines d'images collectées en un seul fichier, le *merging*, qui identifie quelles taches de diffraction apparaissent dans plusieurs images, et enfin le *scaling*, qui permet de niveller les différentes images afin qu'elles exhibent une intensité constante. C'est à partir de l'unique fichier résultant de ce processus complexe que la structure tri-dimensionnelle de la molécule d'intérêt va être déterminée.

1.5.2.4 Phasage

On peut donc se représenter une expérience de diffraction des rayons X par un cristal comme une transformée de Fourier inverse, où les programmes informatiques spécialisés jouent le rôle d'une lentille qui permettrait de remonter du patron de diffraction (espace réciproque) vers la densité électronique contenue dans le cristal (espace réel) (Rhodes). L'intensité de chaque tache de diffraction est proportionnelle au carré de l'amplitude du facteur de structure, F_{hkl} , nombre complexe sommé dans la transformée de Fourier et contenant de l'information sur l'amplitude, la fréquence et la phase. La phase du faisceau diffracté ne peut en effet pas être mesurée et demeure inconnue : la phase du faisceau diffracté ne peut en effet pas être observée et enregistrée lors d'une expérience de diffraction. Cette limitation inhérente à la physique quantique est connue comme le problème de phase. Plusieurs techniques existent pour contourner cette difficulté et se procurer des phases initiales.

- **Le remplacement moléculaire** : cette technique emploie la structure déjà connue d'une molécule homologue. Elle sera utilisée comme modèle préliminaire et permettra de déduire des phases préalables.
- **Multiple-wavelength Anomalous Dispersion (MAD) ou Single-wavelength Anomalous Dispersion (SAD)** : est fondé sur le principe du signal anomal, ou diffraction anormale. Selon le type d'atomes, le signal de diffraction va subir des changements substantiels à certaines longueurs d'ondes du faisceau de rayons X incident : certains atomes y sont capables d'émettre mais aussi d'absorber les

rayons X. Ces longueurs d'ondes particulières, correspondant en fait à l'énergie de certaines transitions électroniques, varient selon le type d'atome. Ce sont les atomes lourds qui sont utilisés en cristallographie des macromolécules dû à leur fort pouvoir anomal, et le sélénium en particulier est employé de façon à obtenir des dérivés séléno-méthionine de la protéine d'intérêt. Lors d'une expérience de phasage par MAD, trois collectes de données seront effectuées à trois longueurs d'onde différentes, alors que le SAD ne se fera qu'à une seule longueur d'onde. Le signal anomal des atomes lourds introduits dans la protéine permettra ensuite à des programmes informatiques spécialisés de les localiser dans la maille cristalline, et ainsi d'obtenir des phases initiales.

- ***Multiple Isomorphous Replacement (MIR)*** : utilise pareillement les atomes lourds introduits par trempage dans la maille cristalline, mais pour leur fort pouvoir diffractant dû à leur haut numéro atomique. Leur localisation permettra à nouveau de générer des phases initiales utilisables pour la résolution de la structure.

1.5.2.5 Affinement et Modélisation

Les phases initiales permettent d'obtenir un modèle en trois dimensions initial, qui prend la forme d'un fichier contenant les coordonnées cartésiennes de chaque atome de la molécule. Une première carte de densité électronique peut subséquemment être générée, grâce aux données directes de l'expérience de diffraction (intensité des taches du patron de diffraction), et celles indirectes du modèle préalable (phases inférées par remplacement moléculaire ou MAD/MIR).

Une fois qu'une carte de densité électronique initiale est calculée en utilisant les intensités observées (I_{obs}) et les phases estimées (α_{calc}), les atomes individuels de la molécule d'intérêt peuvent y être placés grâce à des programmes informatiques spécialisés (Emsley and Cowtan 2004). Ce modèle initial va ensuite pouvoir être amélioré grâce au processus itératif d'affinement et de modélisation. Le modèle et sa carte sont inspectés visuellement, et les régions à replacer/remodeller sont travaillées en conséquence. Les molécules d'eau, présentes à hauteur de 40 à 60 % du contenu total du cristal, sont ajoutées. La présence du ligand, le cas échéant, est vérifiée, et le modèle ainsi amélioré est ensuite affiné. D'autres programmes informatiques vont ainsi utiliser divers algorithmes de façon à parfaire le modèle : de nouveaux facteurs de structures F_{calc} sont calculés à partir du modèle nouveau et amélioré, ces nouveaux F_{calc} contenant de meilleures phases (Adams, Grosse-Kunstleve et al. 2002) (Winn, Ballard et al. 2011). Une nouvelle carte de densité est ensuite générée à partir des mesures d'intensités initiales et des dernières phases, et cette carte rectifiée permettra de produire un modèle

plus détaillé et proche de la réalité, qui lui-même permettra le calcul de nouveaux facteurs de structure aux phases améliorées.

La progression du procédé d'affinement est vérifiée tout au long du processus : à chaque cycle, les facteurs de structures F_{calc} contiennent à la fois les phases mais aussi de nouvelles intensités I_{calc} . Le cristallographe doit s'assurer que les valeurs de I_{calc} convergent vers celles de I_{obs} , soient les valeurs d'intensité mesurées directement sur le patron de diffraction. Les facteurs statistiques R , le R_{cryst} et le R_{free} , sont ainsi couramment utilisés à cette fin :

$$R = \frac{\sum ||\mathbf{F}_{obs}| - |\mathbf{F}_{calc}||}{\sum |\mathbf{F}_{obs}|} \quad \text{Équation 7}$$

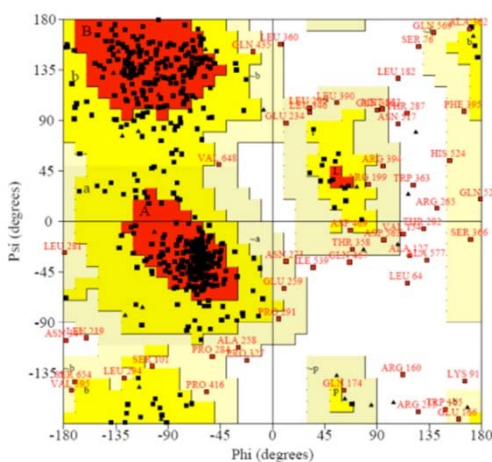
avec R_{free} correspondant à une portion (1 à 5 % en général) des données conservées et non utilisées pendant l'affinement : le facteur R_{free} évalue donc la différence entre le modèle et les données non biaisées. Les programmes d'affinement employés en cristallographie des macromolécules prendront également en compte les positions individuelles des atomes, leur facteur d'agitation thermique B , les opérations de symétrie non-cristallographiques, et essaieront d'en minimiser l'énergie.

1.5.2.6 Validation

À ce jour, plus de 110000 structures, dont 98044 cristallographiques, ont été publiées dans la *Protein Data Bank* (rcsb.org). Plusieurs milliers sont publiées chaque année. Afin d'utiliser au mieux l'information précieuse qu'elles apportent, il est essentiel d'en vérifier la validité. Là aussi, une pléthore de programmes et suites informatiques existent qui aident le cristallographe (entre autre) à juger de la qualité du modèle proposé (Davis, Leaver-Fay et al. 2007).

Il faudra par exemple s'assurer de vérifier l'accord du modèle avec les bases de données géométriques: le diagramme de Ramachandran du modèle protéique doit comporter un pourcentage le plus élevé possible de résidus dont les angles sont conformes à la norme, tout en exhibant un nombre minimal de résidus dans les zones non-autorisées (Figure 34). Les angles de torsion des chaînes latérales doivent également être acceptables, de même que les rotamères. Les contacts trop proches entre les atomes, que ce soit ceux du solvant ou ceux de la protéine d'intérêt, doivent être modiques.

A.



B.

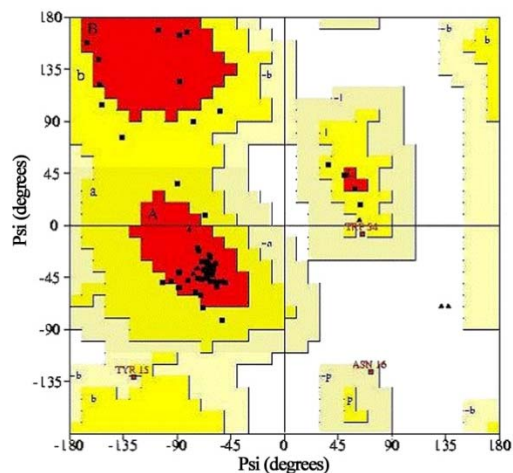


Figure 34 : Diagrammes de Ramachandran, illustrant un mauvais (A.) et un meilleur (B.) exemple.

Enfin, la présence réelle du ligand annoncé doit être inspectée. En effet, il faut se souvenir que le modèle final, aussi bon soit-il, contient des informations de phases qui ont été obtenues de façon plus ou moins indirecte, et qui sont donc biaisées par le modèle qui les a enfantées. La carte de densité électronique *omit-map* est la technique de choix du cristallographe pour s'assurer de la présence patente d'un ligand : elle est calculée sans que ce dernier ne soit inclus dans le modèle, et permet donc d'en ôter le biais.

La structure native de la TBP aldolase de *S. pyogenes* a été résolue grâce à un modèle préalablement construit par MAD. Ce modèle initial a servi de départ à un remplacement moléculaire dont le résultat, après de multiples étapes d'affinement, est la structure native de la TBP aldolase (code PDB : 3MHF). Le trempage de cristaux de la

TBP aldolase dans une solution saturante de DHAP a de même permis de piéger un intermédiaire réactionnel enzyme-substrat, soit la structure de la TBP aldolase liée au DHAP (code PDB : 3MHG). Pour ce qui est des structures présentées dans cette thèse, les cristaux de la TBP aldolase native et mutée (Glu163Gln et Lys205Met) ont été trempés dans des solutions saturantes des composés indiqués (voir la section 1.4.2.1). Les structures de la FBP aldolase présentées ici, et notamment celle du mutant K229M en complexe avec le FBP cyclique, ont été obtenues grâce à la même technique de *soaking*.

1.5.3 Cinétiques enzymatiques

1.5.3.1 Essai couplé

L'évaluation de l'activité des aldolases étudiées dans le cadre de ce projet se fait grâce à l'utilisation d'un essai couplé entre la triose-phosphate isomérase (TIM) et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH) (Figure 35).

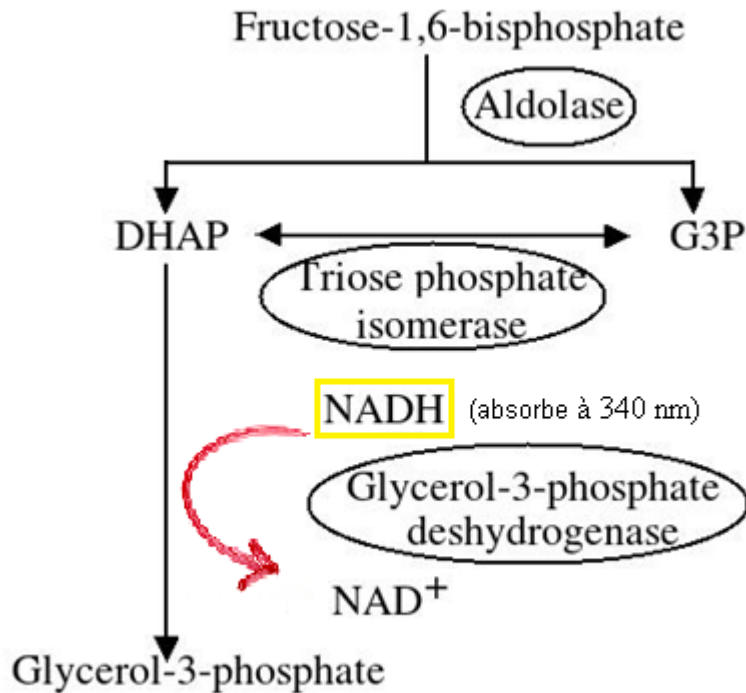
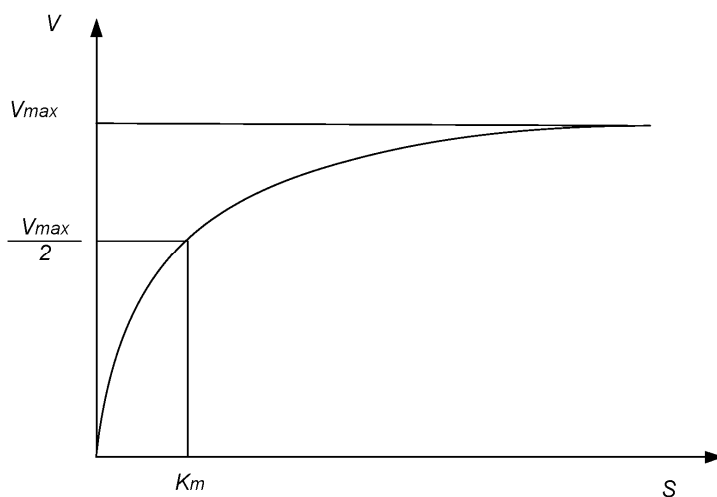


Figure 35 : Essai couplé de l'activité aldolasique utilisant la triose phosphate isomérase (TIM) et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH). C'est l'utilisation du NADH, absorbant à 340 nm, par la GDH qui est mesurée et convertie en unité d'activité enzymatique.

L'aldolase clive le substrat (FBP ou TBP) en DHAP et G3P, et l'enzyme TIM, en excès dans la solution de dosage, isomériser immédiatement le G3P en DHAP. La G3P-déshydrogénase (GDH), à son tour, transforme le DHAP en glycérol-3-phosphate en utilisant une molécule de NADH, son co-facteur (Figure 35). C'est la disparition du NADH, dont le pic d'absorption de la lumière se trouve à 340 nm, qui est suivi spectrophotométriquement. L'oxydation du NADH en NAD⁺ par la GDH est

proportionnelle au nombre de molécules de FBP ou TBP clivées par l'aldolase : une molécule de FBP ou TBP clivée donnera deux molécules de DHAP *via* la TIM, et donc la consommation de deux molécules de NADH par la GDH. Les mesures sont réalisées dans des cuvettes de quartz de 1, 0.5 ou 0.25 mL et effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda II ou Cary 300. La détermination des paramètres cinétiques (V_{max}/k_{cat} et K_M) de l'enzyme étudiée, TBP aldolase native ou mutée et FBP aldolase native ou mutée, est accomplie en évaluant l'activité d'une quantité précise et connue d'enzyme à diverses concentrations du substrat et/ou de l'inhibiteur considéré. L'activité spécifique de l'enzyme dans ces conditions, définie comme la quantité de substrat consommée par unité de temps et par milligramme d'enzyme, permet d'estimer la vitesse maximale V_{max} , le *turnover* k_{cat} et la constante de Michaelis-Menten K_M à partir de l'équation de Michaelis-Menten (Figure 36).



$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Figure 36 : Courbe et équation de Michaelis-Menten.

Le biochimiste allemand Léonor Michaelis (1875-1949), en collaboration avec Maud Menten, médecin-chercheur canadienne (1879-1960) (Figure 37), grâce à leur étude de l'enzyme invertase, ont proposé un modèle mathématique de la cinétique enzymatique où la vitesse de catalyse, c'est-à-dire de production du produit P, est proportionnelle à la concentration en substrat S et complexe enzyme-substrat E-S, jusqu'à atteindre un plateau de vitesse maximale V_{\max} . De nos jours encore, la plupart de réactions biochimiques simples sont analysées à l'aune de ce modèle ubiquitaire, même si plusieurs de ses suppositions et approximations (équilibre, diffusion libre *etctera*) ne sont pas toujours discutées.



Figure 37 : Maud Leonora Menten (1879-1960). L'une des premières femmes à avoir obtenu un diplôme de docteur en médecine au Canada (Université de Toronto, 1911); elle a dû quitter ce pays pour poursuivre sa carrière en recherche puisque les femmes n'y étaient pas autorisées. Ayant rejoint le laboratoire de Leonor Michaelis à Berlin, elle fut co-auteur de l'article décrivant le modèle de catalyse enzymatique homonyme (Michaelis and Menten 2013).

1.5.3.2 Cinétiques de profil pH

L'activité de la TBP aldolase de *S. pyogenes* a également été évaluée en fonction du pH du milieu de dosage. Les valeurs de pKa, déterminées selon la variation de l'activité spécifique en fonction du pH, renseignent ainsi sur l'état ionique de résidus importants du site actif. Les profils pH de la TBP aldolase native et de son mutant Glu163Gln ont ainsi été établis en mesurant l'activité spécifique de l'enzyme d'intérêt à plusieurs valeurs de pH, de 4.5 à 10.5, et ce à chaque quart de point de pH. Les paramètres cinétiques ainsi obtenus ont été rentrés dans le programme GraFit qui a ensuite pu calculer les valeurs de pKa sur l'éventail de pH évalué.

1.5.3.3 Hexacyanoferrate III

Afin de vérifier la présence d'un intermédiaire covalent de nature carbanionique lorsque la TBP aldolase est liée au DHAP, la réduction de l'indicateur redox hexacyanoferrate III a été suivie spectrophotométriquement à 420 nm (Healy and Christen 1973). La réaction, gardée à 25 °C et initiée par l'adjonction de la TBP aldolase, nécessite la présence à la fois de l'enzyme et du DHAP, et a permis d'évaluer le K_M et V_{max} de la liaison covalente du DHAP à la TBP aldolase. Il faut noter que la réduction de l'hexacyanoferrate a également été observée lorsque le FBP remplace le DHAP, ce qui est conforme à ce qui est connu du mécanisme de l'enzyme.

1.5.3.4 Marquage isotopique

Afin de caractériser l'échange $^3\text{H}/^1\text{H}$ au C3 du DHAP catalysé par TBP aldolase, et d'en mesurer la vitesse, des expériences de marquages ont été entreprises. Le protocole (Rose and Rieder 1958) permet de suivre le marquage du DHAP sous forme de (*S*)-[3- $^3\text{H}_1$]DHAP ou (*R*)-[3- $^3\text{H}_1$]DHAP par la TBP aldolase à partir d'eau tritiée et de DHAP. La position du H3, pro-(*R*) ou pro-(*S*), est déterminée grâce à deux enzymes capables de déprotoner de manière stéréospécifique le C3 du DHAP : en pro-(*R*) pour la TIM et en pro-(*S*) pour la RMA. De même, la formation d'eau tritiée à partir de (*S*)-[3- $^3\text{H}_1$]DHAP et (*R*)-[3- $^3\text{H}_1$]DHAP a été suivie afin de mesurer le démarquage du DHAP catalysé par la TBP aldolase.

1.5.4 Calorimétrie isotherme (*IsoThermal Calorimetry*, ITC)

La titration calorimétrique isothermique, (*IsoThermal Calorimetry*, ITC), est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour étudier les interactions entre macromolécules biologiques. Simplement, elle consiste à mesurer la chaleur libérée ou absorbée lors de la liaison d'un ligand à un récepteur, et ce grâce à l'utilisation d'un microcalorimètre très précis, comprenant deux cellules (Figure 38).

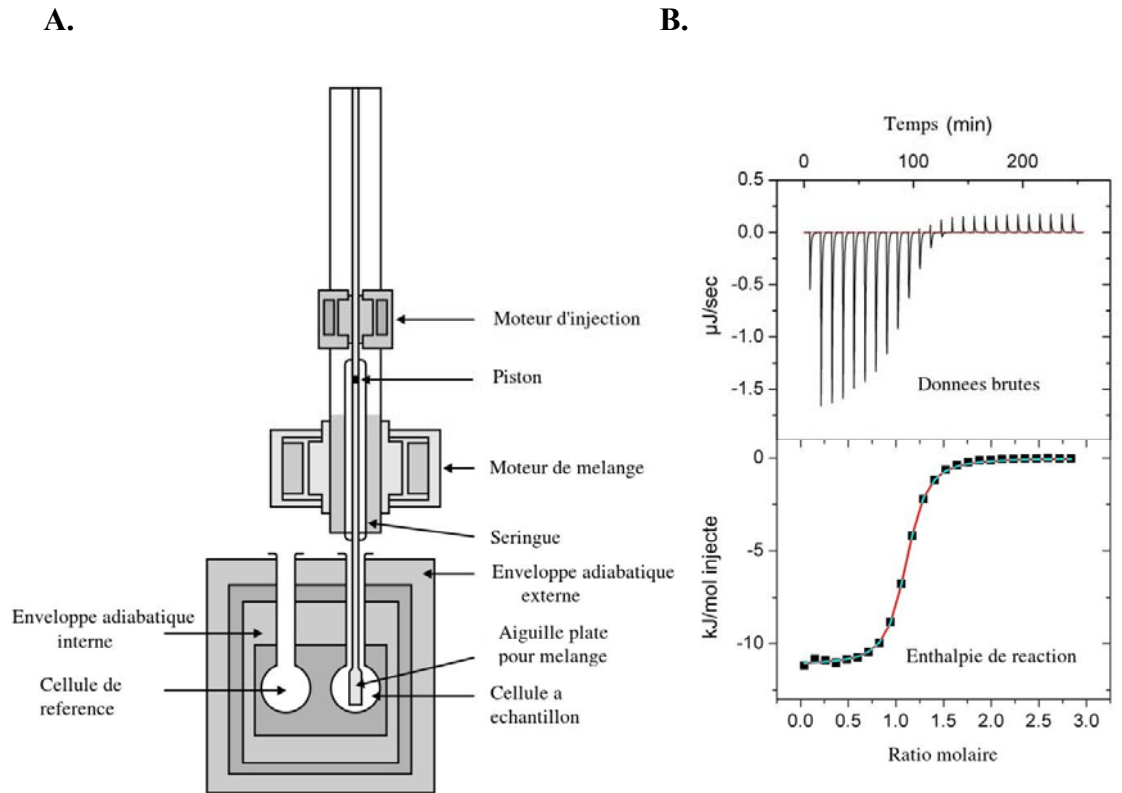


Figure 38: Calorimétrie isotherme. A. Schéma d'un microcalorimètre. **B.** Courbe isotherme type (*Adapté de pharmaxchange.info*)

L'une de ces cellules sert de référence et ne contient que de l'eau, alors que la seconde contient l'échantillon d'intérêt. L'appareil maintient en tout temps ces deux cellules à une température parfaitement égale en compensant, dans un sens ou dans l'autre, toute différence de chaleur détectée. Le récepteur, ou protéine d'intérêt, est placé dans la cellule de mesure, alors que le ligand dont on cherche à analyser la liaison au récepteur est contenu dans une seringue contrôlée par un système d'injection automatique et

précis. Le ligand est injecté en une série de petits volumes dans la cellule de mesure. Si liaison, et donc libération ou absorption de chaleur il y a, ces variations calorimétriques seront détectées par l'appareil, mesurées et compensées. Au fur et à mesure des injections, les sites de liaison du ligand au récepteur sont occupés, jusqu'à leur saturation : il n'y a plus alors d'échange de chaleur mesurable. La mesure de ce transfert thermique permettra de déterminer les constantes de liaison (K_D), la stoechiométrie (n), l'enthalpie (ΔH) et l'entropie (ΔS) de la réaction.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Équation 8}$$

$$\Delta G = RT \ln K_d \quad \text{Équation 9}$$

ΔG :	Energie libre de Gibbs
ΔH :	Variation d'enthalpie
ΔS :	Variation d'entropie
T :	Température en Kelvin
R :	Constante des gaz parfaits
K_d :	Constante de dissociation

Plusieurs données expérimentales peuvent ainsi être obtenues à partir d'une unique expérience : la constante de dissociation, renseignant sur l'affinité du composé pour son récepteur, mais aussi les contributions respectives de l'enthalpie et de l'entropie à l'énergie de liaison, qui peuvent en éclaircir les modalités (rôle des ponts hydrogènes, de l'expulsion de molécules d'eau, de changements conformationnels *etcetera*).

CHAPITRE 2 : Article 1

Nous avons entrepris la résolution des structures de la TBP aldolase de *Streptococcus pyogenes* native et mutée en complexe avec le TBP, le FBP et deux inhibiteurs compétitifs analogues au FBP, le hexitol-P₂ et le talitol-P₂. Le piégeage de l'intermédiaire FBP-iminium avec l'enzyme native et le mutant Glu163Gln a permis d'observer les résidus impliqués dans la liaison du substrat et les changements structuraux qui l'accompagnent. Nous avons donc pu observer que Glu163 interagit avec l'hydroxyle du FBP C4, ce qui suggère que ce résidu soit responsable de l'abstraction du proton menant du clivage du FBP.

Les résultats de cette étude ont été présentés dans un article intitulé «NON-STEREOSPECIFIC SUBSTRATE CLEAVAGE BY TAGATOSE-BISPHOSPHATE CLASS I ALDOLASE», soumis dans le *Journal of Biological Chemistry*.

J'ai produit et purifié toutes les aldolases, natives et mutantes, mentionnées dans l'article. J'ai effectué toutes les collectes de données cristallographiques, mis à part celle de la TBP aldolase native en complexe avec le DHAP-G3P, qui a été collectée par Brigitte Liotard en 2006. J'ai résolu et exécuté les affinements de toutes les structures, et j'ai procédé à l'analyse finale des structures et leur déposition dans la *Protein Data Bank*. J'ai effectué la totalité des expériences cinétiques et celles d'isothermie calorimétrique. J'ai également réalisé les figures et rédigé le manuscrit avec le Dr. Jurgen Sygusch.

**NON-STEREOSPECIFIC SUBSTRATE CLEAVAGE BY
TAGATOSE-BISPHOSPHATE CLASS I ALDOLASE**

A CONSERVED CATALYTIC MECHANISM RESPONSIBLE FOR BOTH
4(*R*)-FBP AND 4(*S*)-TBP CLEAVAGE

Clotilde Low-Kam, Brigitte Liotard and Jurgen Sygusch¹

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

¹Correspondance to: Jurgen Sygusch, CP 6128, Station Centre Ville, Montréal H3C 3J7, QC, Canada.

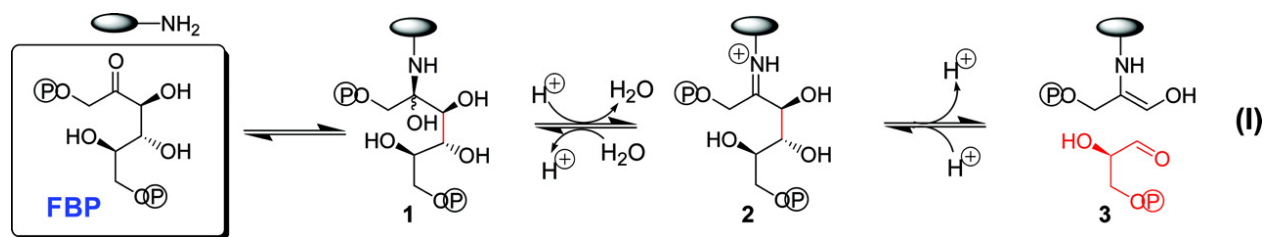
The Schiff base forming class I tagatose-1,6-biphosphate (TBP) aldolase from *Streptococcus pyogenes* exhibits a remarkable lack of chiral discrimination, and is nonspecific with respect to the epimeric configuration of hydroxyl groups at C3 and C4 positions of substrates. To elucidate the enzymatic mechanism capable of generating chiral diversity from common substrates, high resolution crystal structures were determined of TBP aldolase in complex with diastereoisomers, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) and TBP, and with competitive inhibitors, hexitol-1,6-bisphosphate and talitol-1,6-bisphosphate. TBP aldolase in complex with FBP and with TBP was cryotrapped as covalent Schiff-base intermediates under acid conditions to minimize substrate turnover. In both Schiff base intermediates, the same active site residues make identical interactions with both diastereoisomers, differing marginally in the attachment geometries of their hydroxyl moieties. Binding geometry of competitive inhibitors, trapped as Michealis complexes at pH 7.5, mimicked the covalent carbinolamine precursor. Structural and enzymological data

support a reaction mechanism that implicates proton transfers catalyzed by the conjugate base of Glu163 leading to C3-C4 bond cleavage in 4(*S*)-TBP and 4(*R*)-FBP. A Schiff base intermediate formed with FBP cryotrapped at physiological pH in crystals of the catalytically compromised mutant Glu163Gln corroborated the reaction mechanism. The active site architecture promotes rotational isomerization in both aldehyde and ketone substrates. Equilibration of the rotamer populations prior to C3-C4 bond formation forms the mechanistic basis for diastereoisomer formation in the active site. Calorimetric measurements supported differential desolvation as a basis for tighter ligand binding by the specific mammalian class I FBP aldolase compared to TBP aldolase.

Introduction

Aldolases are functionally important enzymes of sugar catabolism in living organisms due to their essential role in metabolic pathways such as gluconeogenesis and glycolysis. Their ability to control the stereochemistry of the carbon-carbon bond formation makes them models for *de novo* preparation of carbohydrates (1), and ideal alternatives to traditional methods in synthetic organic chemistry (2, 3, 4). Aldolases have thus been the focus of much interest as green biocatalysts and have been used successfully to generate mono- and oligo-saccharides (5,6), enzyme inhibitors [1] or pharmaceutical intermediates (7, 8). Tagatose-1,6-bisphosphate (TBP) aldolase is an inducible enzyme, a component of the tagatose 6-phosphate pathway used by Gram-positive bacteria to metabolize lactose and galactose (9). This enzyme exhibits greatest affinity for D-tagatose-1,6-bisphosphate but uses also the bisphosphorylated D-hexose stereo-isomers sorbose-P2, psicose-P2 and fructose-P2 as substrate (10) which are diastereoisomers and differ in stereochemistry at carbon 3 and at carbon 4 with respect to the configuration of their hydroxyl groups. The cleavage of the four phosphorylated sugars produces D-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP), while the condensation of G3P and DHAP produces a mixture of the four D-hexoses in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* (10, 11).

Mechanistically, two distinct classes of aldolases capable of catalyzing the same chemical reaction can be recognized. Class I aldolases form Schiff-base intermediates in the active site (12, 13, 14) and class II aldolases use a divalent transition metal ion cofactor, which acts as a Lewis acid to polarize the substrate ketose in the active site (15, 16). Bacterial TBP aldolase is a class I aldolase and shares a common $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel fold with class I FBP mammalian aldolases as well as a high homology among active site residues (11). Of all aldolases, the mechanism of the highly specific mammalian class I FBP aldolase from rabbit muscle has been the most extensively studied (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23) and is summarized in Scheme I.



Scheme I : Intermediates of the catalytic mechanism of the class I FBP aldolase (23).

In the forward reaction (**Scheme I**), C3-C4 bond cleavage involves three essential catalytic residues. Lys²²⁹ carries out the nucleophilic attack on the C2 ketone of the incoming FBP, yielding a neutral carbinolamine species (**1**). Dehydration of the intermediate then produces the protonated iminium form of the Schiff base (**2**). Glu-187 acts as a conjugate base that abstracts the proton of the C4 hydroxyl, initiating C3-C4 bond cleavage following electron rearrangement (22, 23). An additional catalytic role of Glu-187 has been postulated from kinetic and structural data (23) where Glu-187 mediates proton transfers in carbinolamine formation. Lys-146 serves to stabilize the developing negative charge at the C4-hydroxyl upon proton abstraction (23). Following G3P release from the active site; the enamine (**3**) undergoes stereospecific proton transfer resulting in a new Schiff base that, following hydrolysis, dissociates as DHAP, thereby regenerating the active site. Structures reported of rabbit muscle aldolase bound to FBP and mannitol-P2 (MBP) (23) showed that the enzyme, albeit strictly specific for the 3(*S*)-4(*R*)-FBP isomer in both the aldol and reverse-aldol reactions (24), was nevertheless capable of promiscuous attachment by bisphosphorylated substrate analogues as long as the distance between phosphates corresponded to the distance between the aldolase's P1 and P6 binding sites (23, 25, 26, 27). Although binding of TBP, which competitively inhibits rabbit muscle aldolase, was observed crystallographically, only densities for the P1 and P6 phosphate moieties were visible in the electron density maps (23), corroborating the strict stereospecificity of the muscle isozyme.

The specificity of class I TBP aldolase from *S. pyogenes* was altered in a study (28) in which mutants L275S and L165E and double mutant L165E/L275S alluded to substrate preference for FBP instead of

TBP; however substrate preference was derived on basis of activities measured at a single substrate concentration¹. One of the first enzyme used to establish the capability to alter the stereochemical conclusion of an aldolase reaction was a class II bacterial TBP aldolase [2], whose natural and strict (99:1) preference towards TBP was switched to a 4:1 preference towards FBP *via* directed evolution, after structure-based mutagenesis of active site residues had failed to yield significant results. The changes introduced by directed evolution (P256L and H26Y) were thought to induce subtle rearrangement of a crucial arginine, Arg257, thought to bind the G3P moiety of the hexoses substrates, bringing about the changes in discrimination observed. However, structural data to underpin this interpretation was not reported.

Racemic aldol condensation products with respect to the configuration at C4 have been noted in a number of aldolases. In 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase (29) and in L-fuculose-1-phosphate aldolase, racemisation occurs at C4 of the condensation products, resulting from random orientation of the aldehyde during stereofacial attack (30), and from its chemical nature (31). In contrast, configuration at both C3 and C4 is not retained in the catalytic mechanism of the class I TBP aldolase from *S. aureus* (10) and *S. pyogenes* (11) as aldol condensation yields a mixture of sorbose-P2, psicose-P2, fructose-P2 and tagatose-P2. Attempts have been made to switch specificity of class II TBP aldolases; however these have been met with limited success (32, 33).

Recent developments in the field of stereochemistry engineering have made progress and modified the broad substrate specificity of the stereochemically promiscuous class I enzyme 2-keto-3-deoxygluconate aldolase (KDGA), which normally produces a 55:45 mixture of D-2-keto-3-deoxygluconate (KDGLu): D-2-keto-3-deoxygalactonate (KDGal). The enzyme was altered to create a pair of complementary stereoselective enzymes, KDGLu mutant 2 (Thr157Phe/Tyr132Val) and KDGal mutant 1 (Thr157Val/Ala198Leu/Asp181Gln) through structurally informed mutagenesis (34). More recently, the stereochemical preference of the class II 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase BphI from *Burkholderia*

¹ Our kinetic data for the mutant L275S stands in contradistinction with strong preference for TBP as substrate rather than FBP. The k_{cat} values for both TBP and FBP substrates were 0.61 and 0.005 s⁻¹ respectively and K_m values of 1.68 mM and 3.50 mM respectively.

xenovorans was switched using site-directed mutagenesis from a strict preference for 4(*S*)-hydroxy-2-oxopentanoate to both the 4(*S*)-enantiomer and the 4(*R*)-enantiomer 4(*R*)-hydroxy-2-oxopentanoate in two variants, and to a strict preference for the 4(*R*)-enantiomer in the double mutants (35). In this study, steric interference between the 4(*R*)-enantiomer of the substrate and Tyr290 was alleviated by mutating the latter residue to phenylalanine and Leu87 to Asp or Trp. Since no structure of BphI was available, the mutations were carried out using prior knowledge gained from the X-rays structure of its orthologue, DmpG from *Pseudomonas putida*.

Mechanistic insight into the loss of stereospecificity at the C3 position in the condensation reaction was gained from a structural and kinetic analysis of *S. pyogenes* aldolase, highly homologous to *S. aureus* aldolase (11). In this study, the loss of stereospecificity at C3 during condensation with the aldehyde substrate was not due to degeneracy in active site recognition of DHAP, but was rather a consequence of rotational isomerization in the carbanion intermediate around the DHAP C2-C3 bond. The isomerization in the carbanionic intermediate enabled stereospecific proton transfer at the C3 position by a conserved water molecule on both the carbanion *si* and *re face*, leading to the formation of both the 3(*R*) and the 3(*S*) products. To investigate the mechanism of how the same enzyme generates enantiomeric promiscuity, but at the C4 position, crystallographic and kinetic studies were undertaken of the class I TBP aldolase from *S. pyogenes*.

We thus determined high resolution structures of the native TBP enzyme in complex with natural substrates, FBP and TBP. As TBP aldolase crystals are catalytically active, covalent reaction intermediates of native TBP aldolase formed with substrates were trapped under acidic conditions to minimize single turnover. To ensure that the acidic cryotrapping conditions did not compromise structural integrity, the crystal structures of the native enzyme in complex with competitive inhibitors, hexitol-P₂ and talitol-P₂, were also determined to high resolution under physiological conditions. The structural studies were supported by pH-profile measurements to corroborate the identification of active site residues responsible for nonspecific substrate cleavage in the Schiff-base adduct. In particular, the kinetic

studies sought to address whether the same or a different reaction mechanism mediated cleavage of the C4 epimers in TBP aldolase.

The data analysis uncovered Glu163 and Lys125, homologous to Glu187 and Lys146, respectively, in mammalian FBP aldolase, as the catalytic residues responsible for substrate cleavage. Their respective contribution to enzymatic activity of TBP aldolase was then probed kinetically using isosteric mutants Glu163Gln and Lys125Met, and crystal structures of the mutant structures were determined and assessed to validate structural integrity of the mutant protein active sites. The very slow turnover of FBP by the TBP mutant Glu163Gln at neutral pH made it possible to cryotrap 4(*R*)-FBP in complex with the mutant enzyme in the crystal structure under physiological conditions, which served to validate the active site architecture corresponding to incipient proton transfer during substrate cleavage. The structural analysis of TBP aldolase crystals into which D-G3P and DHAP were diffused provided the conceptual basis for understanding diastereoisomer formation by TBP aldolase.

Finally, given the high similarity of active site residues between the discriminating class I mammalian FBP aldolase and the promiscuous TBP aldolase, calorimetric analysis using competitive inhibitors, hexitol-P₂ and talitol-P₂ as probes was undertaken to assess the structural basis for large differences in thermodynamic binding affinities of these two enzymes. In the specific mammalian enzyme, active site ligand binding displaces a large number of tightly bound water molecules (23) while in the non-discriminating TBP aldolase, water molecules participate in active site ligand binding, suggesting a contributing role by water molecules in the modulation of binding affinity.

Experimental Procedures:

TBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂ were a generous gift of Dr W. D. Fessner (University of Darmstadt). Prior to use, the TBP cyclohexylammonium ion was exchanged for the sodium ion using a strong cationic exchanger and neutralised with NaOH. TBP sodium salt was used in all experiments described. Hexitol-1,6-bis(phosphate) and Talitol-1,6-bis(phosphate) were prepared by NaBH₄ reduction of FBP as described

previously and yields a mixture of two diastereoisomers: (2R)-mannitol-1,6-bis(phosphate) and (2S)-glucitol-1,6-bis(phosphate) (36) while reduction of TBP yielded 2(R)-talitol-1,6-bis(phosphate) and 2(S)-allitol-1,6-bis(phosphate).

D-G3P, FBP, DHAP and TIM/GDH were obtained from Sigma-Aldrich.

Purification: Native and mutant TBP aldolase from *S. pyogenes* was expressed and purified as reported previously [3, 4]. Briefly, plasmid pKK-223-3 coding for the enzyme and the corresponding point mutants was transformed and overexpressed using the JM109 strain (Promega) in *Escherichia coli*. Recombinant TBP aldolase was purified to homogeneity by a combination of three chromatographic steps consisting of ion exchange (DEAE Sepharose Fast Flow), followed by hydrophobic affinity (Phenyl Sepharose, Amersham Biosciences), and lastly a gel filtration column for final cleanup (Superdex™ 200, Amersham Biosciences).

Native FBP aldolase from rabbit muscle was also purified as described previously (23). Plasmid ppB14 containing the recombinant gene for the enzyme was transformed and overexpressed in the BL21 star strain (Promega). FBP aldolase was then purified using an anion exchange chromatography (DEAE Sepharose Fast Flow), followed by a CM cation exchanger (Sepharose Fast Flow), and polished by size exclusion chromatography (Superdex™ 200, Amersham Biosciences).

Cleavage Assay: The substrate cleavage rate was determined by measuring the decrease in A_{340}/min using a coupled assay containing triose isomerase TIM and glycerol-3-phosphate dehydrogenase GDH (11, 17). Aldolase was diluted in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and added to a cuvette containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.16 mM NADH, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ glycerol-3-phosphate dehydrogenase / triose-phosphate isomerase. Assays (0.5 or 1.0 mL) were performed in triplicate at 25°C following addition of enzyme (0.5 μg for native TBP aldolase; 50 - 200 μg for mutants Glu163Gln and Lys125Met), unless otherwise stated. Protein concentrations of mammalian FBP aldolase and TBP aldolase were determined spectrophotometrically at 280 nm, with extinction coefficient value of $A = 0.98$ and 1.05 for 1 mg/mL, respectively, and corroborated using the BCA protein assay reagent (Pierce), using bovine serum albumin as a standard. The protein concentrations determined by the two methods were identical within

typical error.

Effect of the pH on activity: Enzymatic activities were measured in 50mM Tris-Acetic acid buffer from pH 4.5 to 10 at varying concentrations of FBP and TBP for each given half pH point to determine kinetic parameters V_{Max} and K_{M} as a function of pH. The cleavage rate for substrates, FBP and TBP, was measured over a concentration range of 50 - 10000 μM for TBP and 400 - 20000 μM for FBP, using ~ 1 μg of native and up to 1 mg of mutated enzyme

Crystallization: The purified proteins were precipitated overnight using a 90 % saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, DTT 0.3 mM, pH 7.0 solution, and stored at 4°C. For crystallization of TBP aldolase, the precipitated protein solution was dialyzed against in 20 mM Tris-Acetate pH 7.0 prior to crystallization.

TBP aldolase crystals grew in a 5 μL hanging drop, from a 1:1 mixture of protein solution (5 mg/mL made up in 20 mM Tris-AcetateClotilde, pH 7.0) and precipitant buffer (9 - 11 % polyethylene glycol 4000 in 0.1 M Calcium acetate and 0.2 M Tris-Acetate, pH 7.0) that was equilibrated against a reservoir of precipitant (11).

Data Collection and Processing: Native TBP aldolase crystals binding FBP and TBP were soaked in drops of mother liquor at pH 7.5 with 5 mM FBP or TBP, then transferred into progressively more acidic soaking conditions first to pH 6.0 and then to pH 4.0. Soaking times were chosen to minimize substrate turnover in the crystalline state. Crystal soaking using higher substrate concentration was unsuccessful due to insolubility issues with the mother liquor that compromised crystal diffraction patterns. Native and mutant TBP aldolase crystals were soaked in hexitol- P_2 or talitol- P_2 buffer (mother liquor plus 5 mM hexitol- P_2 or talitol- P_2) for 5 minutes or less. Longer soaking times 10 minutes or longer with substrates or inhibitors invariably resulted in crystal cracking making them unusable for data collection. Native crystals were also soaked with products (mother liquor plus 2 mM D-G3P and 2 mM DHAP) for 6 minutes. Crystals were mounted in nylon cryoloops (Hampton Research) after brief immersion in cryoprotectant (soaking conditions plus 20% glycerol) and then immediately flash cooled in a nitrogen-gas stream at 100 K. Diffraction data was collected at beamlines X25 and X29 of the National

Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, NY). Data indexing and integration was performed using HKL2000 (37) or XDS (38) and the results are presented in Table I.

Molecular replacement and Refinement: Initial phases for all liganded native and mutant TBP aldolase's structures were acquired through molecular replacement in Phenix (39) using a structure of the native enzyme determined previously as a search probe (Protein Data Bank code 3MHF).

All liganded crystal structures were isomorphous with the crystal structure of the native TBP aldolase and belonged to space group $P2_12_12_1$ with four protomers in the asymmetric unit. Structure refinement used all reflections having an $I/\sigma(I) > 1$, however electron density maps were calculated to the resolution indicated in Table 1 to ensure at least ~90% completeness in the highest resolution shell with an $I/\sigma(I) > 2$.

After an initial round of rigid body refinement, the resulting structures were submitted to several rounds of TLS and ADP refinement with Phenix, and of model building using Coot (40). Water molecules were gradually included during each refinement cycle by Phenix and manually near the end of refinement. Electron density maps were calculated with structure factor coefficients $2\|F_o\| - \|F_c\|$ and $\|F_o\| - \|F_c\|$.

N-terminal residues 1-3, C-terminal residues 324-326, residues 25-50 (region 1), residues 245-250 (region 2) and 275-295 (region 3), which were previously identified as being conformational flexible (11) displayed weak electron density until the final rounds of refinement and were modeled with the help of simulated annealing omit maps. The final maps showed clear and continuous density of the entire polypeptide backbone in all subunits.

The presence of ligands in the final models was confirmed by inspection of simulated annealing $\|F_o\| - \|F_c\|$ omit and kicked maps (39). Ligand modeling was then carried out based on interpretation of the electron density maps and using the elBOW program to generate ligand topology and parameter files [5]. Substrate turnover in the crystalline state was tested by modeling the electron densities corresponding to the FBP or TBP substrate and the obligate product DHAP using occupancy refinement in Phenix. TBP, FBP and DHAP were refined as a covalent intermediate bound to Lys²⁰⁵ in the pertinent protomer. Hexitol-P2 was modelled as the mannitol-P₂ isomer while the talitol-P₂ corresponded to the bound talitol-

P₂ isomer. In all cases, refinement yielded a dominant intermediate with a refined occupancy of > 0.6. Difference electron density ($\|F_o\| - \|F_c\|$) simulated annealing omit maps were computed in the final round of refinement and showed unequivocal binding in only one subunit (A) for all structures.

Final model statistics, calculated with MolProbity [6] are shown in Table 1. Multiplicity-weighted R factors [5] as output by SCALA in CCP4 [7] are also shown in Table I. The atomic coordinates and structure factors for native aldolases bound with FBP, TBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂ as have been deposited to the Protein Data Bank (PDB # xxxx, PDB # yyyy, respectively), those for mutant Glu163Gln with and without FBP (PDB # xxxx, PDB # yyyy, respectively) and Lys125Met (PDB # yyyy), and those for products D-G3P and DHAP (PDB # xxxx). Errors in hydrogen bond distances and positional differences reported as standard deviations were estimated based on their value in each aldolase protomer unless specified otherwise. All figures were prepared using the program PyMOL (41).

Structure Comparisons: Superpositions were performed with the program PyMOL, using the C α coordinates of the entire polypeptide chain of TBP aldolase for structural comparisons among the various TBP aldolase structures. The calculated root mean square (r.m.s.) differences were < 0.269Å when using the entire structure for alignment (Comparison between TBP aldolase – rabbit muscle FBP aldolase structures were performed as described previously (11) and corroborated the extensive identity and spatial dispositions including water molecule(s) amongst active site residues as previously reported for identically bound structures. Appropriate RMS deviations are given in Table II.

Comparison of active site geometries are shown in table II, r.m.s. differences of compared identically bound structures of TBPA vs RMA and used C α coordinates.

3(R)-4(S)-psicose-P₂ and 3(R)-4(R)-sorbose-P₂ were generated based on the TBP and FBP substrates respectively using the program elBOW.

Active site volume & surface area: Calculations of active site volume and surface area were performed using the CastP server (Computed Atlas of Surface Topography of proteins) (42). CastP uses the weighted Delaunay triangulation and the alpha complex for shape and volume measurements. It can

uncover the size and volume of surface accessible pockets as well as interior cavities of proteins. In our case, a 1.4 Å radius probe was employed, and the output of the analysis was a list of residues surrounding each cavity, as well as the number, the boundary of mouth openings of each pocket, and the surface and area, for both the solvent accessible surface (SA, Richards' surface), and the molecular surface (MS, Connolly's surface) (43).

Footnotes:

The atomic coordinates and structure factors (code 5F2G ,code 5F2I ,code 5F2J and code 5F2L for the native, and code 5F2M ,code 5F4S ,code 5F4V and 5F4W for the Glu163Gln mutant TBP aldolase from S. pyogenes) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

Research was supported by funding to JS from Natural Science and Engineering Research Council (Canada).

Work was carried out in part at 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 and from the National Center for Research Resources of the National Institutes of Health. Kind assistance by beamline personnel, Drs D.K. Schneider, A. Soares, A. Héroux and H. Robinson, is gratefully acknowledged.

The abbreviations used are: TBP, tagatose-1,6-bis(phosphate); FBP, fructose-1,6-bis(phosphate); hexitol-P₂, hexitol-1,6-bis(phosphate); mannitol-P₂, mannitol-1,6-bis(phosphate); talitol-P₂, talitol-1,6-bis(phosphate); D-G3P, D-glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; TIM, triose phosphate isomerase; GDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; ITC, isothermal calorimetry.

Results:

Schiff base intermediate: Native TBP aldolase crystals soaked at acidic pH with high concentrations of substrates, FBP and TBP, and flash cooled trapped covalent enzymatic intermediates in one active site of the four protomers from the two TBP dimers present in the asymmetric unit cell. The active site of TBP aldolase is situated deep in the center of the α/β_8 barrel fold, with continuous electron density extending from Lys205 N ζ to either the TBP or FBP C2 (Fig. 1A and Fig. 1B respectively) shows formation of a stable covalent intermediate consistent with Schiff base formation.

The TBP structure bound as a Schiff base exhibited weaker density for its nascent G3P moiety, indicating partial turnover by TBP even at acidic pH. To assess turnover, the active site ligand density was refined as a composite model of bound TBP and bound DHAP. The conformation of DHAP bound as enamine in the active site was distinguishable in the occupancy refinement from the TBP adduct by virtue of the lower P1 phosphate occupancy, the accessory water molecules associated with DHAP binding as well as an associated chloride ion. The occupancy of the bound TBP molecule as Schiff base was 0.59 corroborating partial substrate turnover. The corresponding electron density is shown in the inset of Figure 1A. In contrast, occupancy of the Schiff base formed by FBP of 0.73 is consistent with near saturation and exhibited similar B factors for the P1 and P6 phosphate.

The P1 phosphate oxyanion of the Schiff base intermediates is engaged in numerous interactions with active site residues and was identical to the P1 phosphate binding of DHAP with TBP aldolase (11) (Protein Data Bank entry 3MHG) and very similar to those described for rabbit muscle FBP aldolase in complex with FBP (23) (Protein Data Bank entries 1ZAI and 1ZAJ). Arg278, equivalent to Arg303 in FBP aldolase, sees its side chain dramatically curl around from its unbound position to interact electrostatically with the P1 oxyanion, which then interacts with the main chain amine of Gly277 in addition of Arg278. Additional hydrogen bonds made by the phosphate oxyanion with Ser249 and Ala250, as well as with an invariant water molecule, including an interaction by O1 with Gln28, provide further anchorage of the ligands in the active site binding pocket.

The binding of the P6 phosphate oxyanion was much less extensive and included a hydrogen bond interaction by one oxyanion oxygen with backbone amides of Arg29, Gly30 and Ala31 residues as well as with Thr94 *via* its side chain hydroxyl to a second oxyanion oxygen. The remaining interactions implicated a network of water molecules (Fig.3, 4 and 5). The amide dipoles at the N-terminal end of the α -helix (residues 29-41) provided additional stabilization to the P6 phosphate oxyanion binding (44).

Whereas the C3 and C5 hydroxyls of both the 4(*R*)-FBP and 4(*S*)-TBP intermediates made very similar hydrogen bonds with Asp27, the active site interaction by the C4 hydroxyls was subtly different depending on the stereochemistry of the adduct. The C4 hydroxyls of the two diastereoisomers engaged in hydrogen bonding with the same Glu163 carboxylate oxygen, Oe2, consistent with conserved Glu163 as candidate for initiating proton abstraction at the C4 hydroxyl in both diastereoisomers; however, the geometry of their hydrogen bonding interaction was dissimilar. In the 4(*S*)-TBP Schiff base intermediate, the proton to be transferred at the C4 hydroxyl faces towards the Glu163 carboxylate oxygen Oe2, resulting in an in-line geometry optimal for proton transfer (45). In the 4(*R*)-FBP Schiff base adduct, although the C4 oxygen also faces the Glu163 carboxylate oxygen Oe2, the C4 hydroxyl proton would face the Glu163 carboxylate Oe1 with which it makes a close contact (3.21 Å), and corresponding to a sub-optimal geometry for proton transfer (45 au-dessus). In both diastereoisomeric structures, the C4 hydroxyl also engages in hydrogen bonding to a conserved water molecule W2 which in turn hydrogen bonds the oxyanion of the P1 phosphate and Arg278 (Fig 1 and 2).

Carbinolamine intermediates, 2(*R*)-mannitol-P₂ and 2(*R*)-galactitol-P₂ - The diastereoisomer analogues, hexitol-P₂ and talitol-P₂ trapped in the active site of native TBP aldolase are shown Fig.3 and 4, coherent with their role of competitive inhibitors of the TBP aldolase. The tetrahedral shapes of the electron density at the C2 carbon of both inhibitors is consistent with 2(*R*)-mannitol-P₂ and 2(*R*)-talitol-P₂ bound in the native TBP crystals soaked with hexitol-P₂ and with talitol-P₂ respectively. Binding of 2(*S*)-glucitol-P₂ and 2(*S*)-allitol-P₂ stereoisomers was not observed in electron density maps. Similar B-factors by the phosphate moieties of hexitol-P₂ and talitol-P₂ with those of the neighboring residues of the active site supports full active site binding by these two conformers; while the acyclic hydroxyls of both

conformers engaged in hydrogen bonds with the same active site residues. 2(*R*)-talitol-P₂ could be fitted into the electron density using two orientations which are symmetrical with respect to a twofold axis of rotation centered on the C3-C4 bond and superposes the P1 phosphate with the P6 phosphate moiety. The only distinguishing feature was that the C4 hydroxyl of the conformer in superposition with the substrates engages in two hydrogen bonds with Lys125 and Glu163 while the C4 hydroxyl of conformer bound inversely engages in one hydrogen bond with Asp27. Refinement indicated 2(*R*)-talitol-P₂ bound as the conformer bound in the inverse direction was a minor species with occupancy of 0.35, supporting slight conformer discrimination in active site binding. For the 2(*R*)-mannitol-P₂ isomer, due to its internal two-fold axis, such an inverse binding mode is not distinguishable. Additional minor configurations cannot be excluded for 2(*R*)-mannitol-P₂ inhibitor as refinement of the inhibitor occupancy was 0.75. The C2 hydroxyl in both diastereoisomer analogues, the dominant 2(*R*)-mannitol-P₂ and the 2(*R*)-talitol-P₂ conformers, makes close contact with Glu163 that would enable Glu163 to interact with the C2 hydroxyl in the carbinolamine intermediate, which is coherent with a role by Glu163 in proton transfer leading to carbinolamine **1** dehydration and subsequent iminium **2** formation (Scheme 1).

Aldolase activities and pH-profiles – The kinetic parameters obtained for the cleavage reaction of FBP and TBP by the native TBP aldolase and the Glu163Gln mutant are shown in Table III. Cleavage activity by TBP aldolase towards TBP and FBP was comparable, differing by less than a factor of 3, while respective K_M values diverged less than two-fold. The activity of the Glu163Gln mutant in comparison with the native enzyme indicated a large loss in activity at pH 7.5, greater for FBP than TBP, yet only small changes in K_M towards both substrates. The pH-profiles of the native enzyme showed a characteristic bell-shaped curve for both FBP and TBP cleavage (Fig.6), with virtually identical pK_a values of 5.2 for pK_{a1} and 9.1 for pK_{a2}, indicating a likely Asp or Glu as the residue protonated in the acidic limb of the curve.

Characterization of point mutants – Glu163Gln and Lys125Met: The very slow turnover of FBP by the TBP mutant Glu163Gln at neutral pH enabled cryotrapping of 4(*R*)-FBP in a Schiff base complex with the mutant enzyme in the crystal structure under physiological conditions. The complex is shown in

Figure 5. The Schiff base intermediate formed with FBP in the Glu163Gln mutant corresponded to full occupancy of the FBP binding site, consistent with the expected very slow substrate turnover. Superimposition of the active site architecture of the Schiff base complex with FBP in the native and the mutant enzymes yielded r.m.s. deviation value of 0.138 Å, while comparison of the entire subunit generated r.m.s. deviation value of 0.146 Å, shown in Table II, supporting that the acid soaking conditions that led to the trapping of TBP and FBP in the native enzyme did not perturb the tertiary structures nor the active site architecture. The structural identity of the active site, and the identical interactions made by FBP with active site residues reinforce the role of Glu163 as the conjugate base mediating proton transfer from the C4-hydroxyl in the native enzyme under physiological conditions.

The mutation of Lys125Met reduced catalytic activity towards FBP and TBP, albeit to a lesser extent less than for the Glu163Gln mutant, while K_M values differed only slightly with respect to the native enzyme. Surprisingly, the reduction in catalytic activity inverted cleavage preference for TBP and FBP compared to the native enzyme. In all our structures, Lys125 did not interact directly with either substrate, demonstrating a long range indirect electrostatic effect by Lys125 on the active site environment. Lys125 interacts with Asp27 in all bound structures, suggesting polarization of the Asp27 carboxylate at the proximal oxygen and weakening of the interaction between the C5-hydroxyls and the Asp27 carboxylate distal oxygen. Additionally, Lys125 engaged in a weak hydrogen bond with Glu163 (3.1 Å), in all structures, sufficient for Coulomb interaction with Glu163 that could lower its pKa. Mutation of Lys125Met did not perturb the tertiary structures or the active site architecture with respect to the native enzyme, indicating that the change in electrostatics at the active site center did not perturb structural integrity.

Product binding: Native TBP aldolase crystals soaked with products of the cleavage reaction, D-G3P and DHAP, and flash cooled, trapped DHAP as the covalent enzymatic intermediate in the active sites of only two protomers of one of two TBP dimers present in the asymmetric unit cell, as previously reported (11). The D-G3P substrate was bound at the P6 phosphate binding locus in the same two subunits, and

showed the aldehyde moiety facing outwards from the active site. Furthermore, the aldehyde phosphate was not coincident from the P6 phosphate binding site of the hexose bisphosphates, but displaced by 1.56 Å. The carbonyl of the aldehyde was positioned *trans* with respect to its C2 hydroxyl, and interacted with one water molecule and Arg34 in one subunit, and two water molecules and Arg34 in the other. The C2 hydroxyl H-bonded with Arg34 in only the A subunit, and made a weak interaction (3.8 Å) with the same residue in the other subunit occupied by the substrates. The phosphate oxyanion was the most extensively stabilized, with interactions akin to the one observed around the P6 phosphate of bisphosphorylated ligands bound to the enzyme: one phosphate oxygen bound to the main chain imines of Arg39, Gly30 and Ala31, another interacted with the side chain hydroxyl of Thr94 and the third with a water molecule. The bridging O3 (O6 in bisphosphorylated hexoses) could be seen binding a water molecule in only the A subunit.

Structures alignments – Superposition of the native enzyme in complex with FBP and with the hexitol-P₂ structure (r.m.s. deviation 0.146 ± 0.026 Å using all residues and 0.103 ± 0.010 Å using residues invariant to substrate binding, namely 100-230), as well as native enzyme in complex with TBP and with talitol-P₂ structures (r.m.s. deviation 0.212 ± 0.073 Å using all residues and 0.116 ± 0.041 Å using residues 100-230), showed indistinguishable binding modes by the P1 oxyanion of both ligands, however the C4 to P2 oxyanion's binding was not identical in all ligands. The molecular structural design of active site residues implicated in inhibitor and substrate binding displayed very similar conformations, with the largest r.m.s. difference less than 0.058 Å. The mutated Glu163Gln structures of FBP and hexitol-P₂ (r.m.s. deviation 0.176 ± 0.037 Å using all residues and 0.093 ± 0.019 Å using residues 100-230) exhibited the same modes of binding, complete with the same slight differences in P6 oxyanion binding. The same observation was made when the mutant structures of TBP and the dominant talitol-P₂ conformer were aligned (r.m.s. deviation 0.246 ± 0.036 Å using all residues and 0.161 ± 0.015 Å using residues 100-230).

Conformational changes: The superimposition of the bound structures of the native and Glu163Gln TBP aldolase structures with their corresponding unbound counterparts revealed matching conformational

changes in all four subunits compared to the unliganded structures. Active site binding induces conformational changes with respect to the native TBP enzyme in region 1, 2 and 3 as previously described for TBP aldolase bound with DHAP in the active site (Low-Kam et al, 2010) and is shown in Figure S2. Region 1 corresponded to displacement by α -helix (residues 29-40) towards the bound P6 phosphate (average r.m.s. deviation difference $2.62 \pm 0.22\text{\AA}$), region 2 corresponded to a displacement by a loop (residues 250-255) towards the bound P1 phosphate (r.m.s. difference $2.87 \pm 0.08\text{\AA}$), while region 3 further mediated P1 phosphate attachment by α -helix (residues 275-290) displacement (average r.m.s. difference of $2.15 \pm 0.07\text{\AA}$), where r.m.s. difference were calculated for the same subunit and averaged over all liganded structures. These conformational changes were largely confined to the ligand binding subunit, however lesser yet identical changes were observed in subunits that exhibited partial ligand binding.

Inspection of crystal lattice packing of the TBP aldolase revealed steric hindrance to the conformational changes upon active site binding by substrate and inhibitor, and differential crystallographic packing as the basis for the variable subunit occupancies. Subunit A, which demonstrated near complete occupancy for all ligands, was the most accessible protomer, with its mobile regions 1 and 3 making only weak contacts ($\geq 3.2\text{\AA}$) with subunits C and D in neighboring asymmetric unit cells. By contrast, subunit C, which showed the lowest occupancy for all the ligands used in this study, was hindered in its conformational changes, due to interactions between mobile region 1 with subunits A and C and mobile region 2 with subunit D of neighboring asymmetrical units. Subunit B showed an accessible path through the crystal lattice to its active site with only mobile regions 2 and 3 interacting with subunit D in neighboring asymmetrical units. The active site of subunit D was accessible and the subunit interacted through its mobile region 3 with subunit B of neighboring asymmetrical units. The crystal packing hindrance and the limited ligand soaking times to avoid crystal cracking resulted in partial active site occupancy of subunits B and D when TBP aldolase crystals were soaked with ligands talitol-P₂ and TBP in structures presented in this study. All description of active site binding is based on binding events occurring in subunit A throughout.

The binding of DHAP and D-G3P triggered the same conformational changes as observed with hexose bisphosphate ligands, with the highest occupancy found in subunit A. The covalent-bound DHAP superimposed with the nascent ketone moiety (C1 to C3) of the hexose bisphosphate substrates (eg Fig 1A. Mobile region 1 however underwent a smaller conformational change in the two subunits not occupied by G3P than in those where G3P could be observed in the omit map (average r.m.d. deviation $1.68 \pm 0.04 \text{ \AA}$ and $2.32 \pm 0.05 \text{ \AA}$, respectively).

Structural basis for lack of stereospecificity – 3(*S*)-4(*R*)-psicose-P₂ and 3(*S*)-4(*S*)-sorbose-P₂ were built into the active site using the parent structures of FBP-bound and TBP-bound in native TBP aldolase (Fig. S3) respectively as guides. In both cases, the resultant position of 3(*S*)-C3 hydroxyl did not introduce any steric clashes with active site residues. The 3(*S*)-C3 hydroxyl of both 3(*S*)-4(*S*)-sorbose-P₂ and 3(*S*)-4(*R*)-psicose-P₂ hydrogen-bonded with active site residue Asp27.

DISCUSSION

Flash freezing of TBP aldolase crystals in the presence of the substrates, TBP and FBP, trapped covalent complexes in the active site. Continuous electron density extending beyond Lys-205 N_z, shown in Fig. 1 and 2, indicates formation of stable covalent adducts with both TBP and FBP. The planar shape of the electron density observed around the TBP and FBP C2 carbon indicates trigonal hybridization that is consistent with trapping of a Schiff base intermediate in each aldolase structure. Both Schiff base intermediates are extensively stabilized by numerous and identical electrostatic interactions and hydrogen bonds with the same active site residues, which are similar as those observed in the Schiff base complex that was trapped in class I FBP aldolase (Figure 1 and 2). The only notable difference is the interaction of the FBP C4 hydroxyl with Lys146 in the class I FBP aldolase, whereas in TBP aldolase the C4 hydroxyls of FBP and TBP do not interact nor make close contact with the equivalent active site residue, Lys125. The crystal structures show partial turnover of the Schiff base intermediates created with substrate TBP that resulted in the formation of the common covalent enamine intermediate formed with DHAP. Under acidic conditions used to trap the Schiff base intermediates, native TBP aldolase retains catalytic activity consistent with crystallization of a catalytically competent conformation of the enzyme. The formation of Schiff base intermediates with 3(*S*)-4(*R*)-psicose-P₂ and 3(*S*)-4(*S*)-sorbitose-P₂ modeled into the TBP aldolase active site using the coordinates of the 3(*S*)-4(*R*)-fructose-P₂ and 3(*S*)-4(*S*)-tagatose-P₂ intermediates, respectively, and shown in Fig S3, yielded a clash free fit at the 3(*R*) hydroxyl that did not require adjustment of the model coordinates. The clash free modeling using the observed Schiff base templates indicates that C3 epimers are substrates of TBP aldolase and reinforces the interpretation that a catalytically competent conformation of the enzyme was crystallized.

Active site similarity: The similarity of active site residues and their structural interactions by the Schiff base intermediates in both enzymes is extensive. In addition to covalent intermediate formation involving an equivalent lysine residue on both TBP and FBP aldolase, the mode of substrate binding in the active sites of both enzymes was isomorphous and made use of similar arginine, serine and glycine

residues to grasp the P1 phosphate oxyanion. Although the bound P6 phosphate is positioned isostructurally and solvated in both enzymes, different interactions were used to take hold of the phosphate: backbone amides of residues 29-31 and Thr62 side chain were used in TBP aldolase while side chains of Ser35, Ser38 and Lys107 in FBP aldolase. The hydrogen bonding pattern by the ketohexoses of the two diastereoisomers is quite parsimonious, limited to interaction with two active site residues, shown in Fig. 1 and 2. The C₃ and C₅ hydroxyls of both substrates interact with the same anionic active site residue, Asp27, while in FBP aldolase the C5 hydroxyl interacts solely with water molecules. Similar to that of class I FBP aldolase, TBP and FBP C₄ hydroxyls each hydrogen-bond with an equivalent conserved glutamate residue, Glu163 in TBP aldolase. This latter interaction was also observed in class I FBP aldolase with Glu187 (23) and implies a configuration consistent with incipient C₃-C₄ bond cleavage.

Glu163 - Proton abstraction: The kinetic data supports identification of Glu163 as the candidate residue responsible for initiating proton transfer at the C4 hydroxyl. The pKa of 5.2 for the acidic limb of the pH profile supports an aspartate or glutamate residue as responsible for promoting C₃-C₄ bond cleavage. The identical pKas for both substrates is consistent with a common cleavage mechanism, reflected by the geometric disposition of Glu163 with respect to the trapped Schiff base intermediate of both substrates. The isosteric mutation of Glu163Gln reduces enzyme activity by more than two orders of magnitude and reinforces the assignment of Glu163 as the residue mediating proton abstraction. Protonation of this residue at pH 4.0 would promote the trapping of substrate as a Schiff base intermediate in the crystalline state, as was observed. The equivalent Glu187 in the mammalian FBP enzyme, which is responsible for initiating substrate cleavage, exhibits the same pKa within experimental error, further corroborating the proton abstraction role of Glu163 in TBP aldolase.

The proton transfer geometry between the exchangeable C4-hydroxyl and Glu163 influences the cleavage rate and hence the nascent aldehyde release in the two Schiff bases. An in-line geometry of proton transfer in the TBP Schiff base is more efficient and predicts a smaller relative solvent isotope

effect. Indeed, a significant solvent isotope effect was observed with the largest $k_{\text{cat}}^{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{cat}}^{\text{D}_2\text{O}}$ ratio of 3.3 measured for FBP as substrate, compared to 2.3 for TBP (11).

Conversely, the mutation Glu163Gln would afford significant ground state stabilization of the FBP C4-hydroxyl, since the mutant Gln163 would acquire an in-line hydrogen bond with the FBP C4-hydroxyl through its carboxamide nitrogen. The gain in stabilization by the TBP C4-hydroxyl would be less as it is merely an exchange of in-line hydrogen bonds. The greater relative reduction in cleavage activity towards FBP compared to TBP is consistent with greater ground state stabilization by the mutation.

Charge stabilization: The Glu163 side chain is partially buried and has as immediate neighbors Leu127, Leu165 and Leu248 as well as Lys125 to which it makes a charged hydrogen bond. The pKa of Glu163 is influenced by the competing influences of the Coulomb interaction with Lys125 and the hydrophobic environment by the aforementioned Leu residues. Coulomb interactions generally decrease solution pKa values by 0.5 -1.0 units for carboxylate moieties of aspartate and glutamate residues, while a hydrophobic environment destabilizes the ionized form of an amino acid side chain by as much as 1-3 units (46). The pKa of 5.2 for Glu163 is thus a compromise between two opposing tendencies and predicts that loss of the Coulomb interaction (charged hydrogen bond) with Lys125 by Glu163 reduces enzyme activity by diminishing the population of the conjugate base of Glu163 responsible for proton abstraction. The mutation of Lys125 to an uncharged Met residue indeed diminishes catalytic activity by one to two orders in magnitude depending on the substrate used to assay activity (Table III). A direct electrostatic role by Lys125 in the stabilization of the developing negative charge on the C4-hydroxyl upon proton abstraction cannot be ruled out as catalytic activity was greatly diminished by the equivalent mutation of Lys146Met in FBP aldolase (47). In the mammalian enzyme, Lys146 makes a strong charged hydrogen bond with the FBP C4 hydroxyl, whereas in TBP aldolase, the larger distance of approximately 5Å between FBP and TBP C4 hydroxyls to Lys125 would reduce the strength of the electrostatic stabilization and consequently have a reduced impact on enzymatic activity upon loss of the positive charge.

Additional charge stabilization may originate from water molecule W2, which makes a hydrogen bond with TBP and FBP C4-hydroxyls, the P1 phosphate oxyanion and Arg278 in TBP aldolase. The equivalent water molecule in FBP aldolase participates in a hydrogen bond with the P1 oxyanion and Glu189 but not the FBP C4-hydroxyl nor Arg303. In TBP aldolase, the equivalent residue to FBP aldolase's Glu189 is Leu165, which does not compete with the C4-OH for W2 interaction. The charged hydrogen bonds between W2 and the P1 oxyanion and Arg278 would orient W2 to act as hydrogen bond donor with the C4-hydroxyl and thereby enhance electrostatic charge stabilization during cleavage. In FBP aldolase, the equivalent W2 would make charged hydrogen bonds with the P1 oxyanion and Glu189. Such an interaction would orient the lone electron pairs of W2 toward those of the C4-hydroxyl: W2 would compete for the C4-hydroxyl proton and disfavor both proton abstraction and charge stabilization.

Aldehyde release: The slight inversion in cleavage preference for FBP compared to TBP by the mutation Lys125 to Met suggests a role by Asp27 in moderating the release of the nascent aldehyde. Loss of the polarized hydrogen bond between Lys125 and the carboxylate Od2 oxygen of Asp27 due to Lys125 mutation would enable both TBP and FBP C5-hydroxyls to reorient and strengthen their interaction with the carboxylate Od1 oxygen of Asp27 compared to the native enzyme, which would thus inhibit nascent aldehyde release. Differential stability of this hydrogen bond with respect to the TBP and FBP C5-hydroxyls would entail differential inhibition of aldehyde release and hence of activity, as was observed.

Conformational changes: In Figure S2, three regions in the native enzyme are shown to undergo small yet significant conformational changes upon active site binding by substrate, as was previously observed for DHAP (11). The conformational changes consist of rigid body movements induced by substrates that serve to stabilize the Schiff base intermediate, D-G3P - DHAP products, and mimic those observed in the structures of rabbit muscle aldolase bound to DHAP and FBP (17). Both FBP and TBP aldolases respond to active site binding by identical active site narrowing implicating equivalent α helices and regions of β turn flanking the active site. Conformational displacements by these secondary structure features serve to stabilize the P1 and P6 phosphate oxyanion in the active site. The conformational

changes tighten up the tertiary subunit structure by reducing B-factors globally and hence the flexibility of the mobile regions.

The greater conformational change due to G3P binding in the DHAP-G3P bound TBP aldolase structure underpins the functional role of mobile region 1 to capture and respond to changes in P6 phosphate moiety position during the catalytic cycle. Aldehyde condensation with the enamine reduces the P1-P6 interatomic distances as the reaction progresses and the tracking of the P6 phosphate by mobile region 1 optimizes the active site alignment and stabilization of the nascent hexose bisphosphate as the reaction progresses.

Enzyme chimeras of LacD.1, a paralogue of TBP aldolase (LacD.2) in *S. pyogenes* and to which TBP aldolase is highly homologous (73% identical and 86% similar) (48, 49), identified two stretches of sequence, residues 255-271 and 285-296, adjacent to or overlapping with mobile regions 2 and 3 respectively in TBP aldolase, that were functionally coupled (50). Networks of statistically coupled amino acids, termed sectors, are linked to conservation of function including enzymatic reactions or substrate-binding motifs, and constitute fundamental units of evolution for repurposing to novel function (51,52). LacD.1 is as a putative metabolic sensor that regulates global transcription of virulence genes in *S. pyogenes*, a role that depends on substrate recognition (48, 49). In TBP aldolase, the conformational response of regions 2 and 3 ensures binding of the P1 phosphate, trapping it in a pincer like movement, a property shared with mammalian class I aldolase. A similar conformational response by LacD.1 would enable it to communicate active site binding by rigidifying the two stretches of sequence, ensuring high molecular recognition and thereby allowing LacD.1 to fulfill its regulatory role and to maintain fitness under carbohydrate-rich conditions where the *lac.2* operon is highly expressed.

Diastereoisomer formation - rotational isomerization: In a previous structural and kinetic study of *S. pyogenes* aldolase, mechanistic insight was gained into epimerization at the C3 position in the condensation reaction (11). C3 epimerization was a consequence of rotational isomerization about the DHAP C2-C3 bond in the carbanion intermediate. Free rotation around the C2-C3 bond in the DHAP intermediate of TBP and FBP aldolases is however precluded due to its double bond character that limits

the rotamers to the two discrete isomers; *E* where the DHAP O3 hydroxyl is oriented *cis* to the DHAP C2 - Lys205 N ζ bond, and *Z* where the orientation is *trans*. The *cis-trans* isomerization in the carbanionic intermediate enabled stereospecific proton transfer at the C3 position by the same conserved water molecule on both the carbanion *si* and *re face*, leading to the formation of both 3(*R*) and 3(*S*) products. This interpretation relies on enolization as well as C-C bond cleavage or synthesis proceeding at rates greater than release of the products from the enzyme, thereby allowing sufficient time for rapid equilibration by *cis-trans* isomerisation around the DHAP C2-C3 bond. The relative population are controlled by the active site stabilization of each isomer and their rate of interconversion is determined by the height of the rotational barrier, which depends on the extent of the double bond character at C2-C3. The rotational barrier would be greater in the enamine than in the carbanion which has reduced *sp*² character.

Cleavage of the C3-C4 bond in TBP and FBP leaves the nascent aldehyde bound in the active site and oriented with its nucleophile either *re* or *si face* with respect to the prochiral face of the carbanion. Both isomers of the nascent aldehyde make identical interactions with the same active site residues including a hydrogen bond by the carbonyl oxygen with the now protonated Glu163. They are distinguished by a configurational geometry where the C1 carbonyl is *anti* with respect to the C2-OH bond in the nascent aldehyde for FBP, and for TBP the orientation of the same carbonyl is *syn*. The two configurational geometries stabilized in the active site can be interconverted by rotational isomerization about the D-G3P C1-C2 bond that is restricted due to steric hindrances and interaction with the protonated Glu163. The displacement of the aldehyde phosphate isomers towards the D-G3P phosphate binding site ensures conformational freedom for rotational isomerization, albeit hindered, around the C2-OH bond in the aldehyde. Rotation about the C1-C2 bond of - 60° for the D-G3P obtained by cleavage of FBP or + 30° for the D-G3P obtained by cleavage of TBP generates a *gauche* configuration where the aldehyde is oriented parallel to the plane defined by the DHAP enamine/carbanion, and suitable for *si* or *re face* nucleophilic attack respectively. The displacement promoted by Glu163 protonation places the D-G3P C2 carbonyl at a distance of 2.95 Å from the DHAP C3 carbon of the C-C bond to be formed. The continued

stabilization of the D-G3P phosphate by mobile region 1 and hydrogen bond interaction of the C2 hydroxyl with Asp27 in both isomers would ensure retention and orientation of D-G3P while allowing rotational isomerization of its aldehyde. In the direction of condensation, such hindered or restricted rotational isomerization around the aldehyde C1-C2 bond in the active site generates an epimerisation mechanism at the hexose C4 position consistent with nucleophilic attack from either *re* or *si* face of the aldehyde.

Diastereoisomer formation is thus a consequence of the evolution of an active site architecture permissive to rotational isomerization, hindered or restricted, of both aldehyde and ketone substrates in TBP aldolase. In mammalian FBP aldolase, the active site architecture suppresses rotational isomerization at C3 and C4 positions through steric hindrance of the rotamer populations. C3 epimerization is prevented by the substitution of Gln28 for Glu34 in FBP aldolase, which effectively suppresses the *E*-isomer of DHAP. Epimerization at C4 would be disfavored by tight active site binding of the aldehyde carbonyl oxygen with Lys146 and the protonated Glu187, ensuring *si* face attack by the aldehyde.

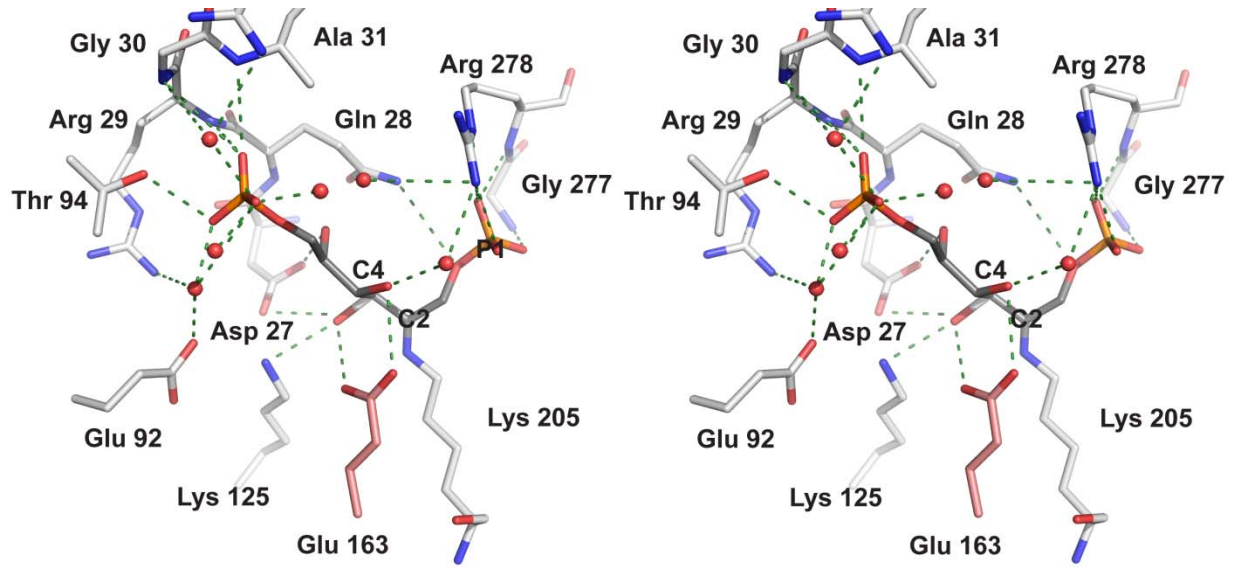
Mechanism of substrate cleavage - The catalytic mechanism in accordance with enzymological and structural data begins with active site binding by FBP/TBP substrates. Binding induces conformational changes in three mobile regions, each contributing ligand-binding residues to grasp the phosphate oxyanions of both substrates. The conserved Glu163 residue, by hydrogen-bonding both the C2 and the C4 hydroxyls of FBP and TBP in their acyclic forms, serves to align the substrate for face *si* nucleophilic attack by Lys205. A round of proton transfer mediated by Glu163 forms the carbinolamine intermediate that is then dehydrated by the same Glu163 acting as general acid, producing the protonated Schiff base/iminium. The positive charge on the imine of the catalytic lysine acts as an electron sink, polarizing the intermediate, and increasing the acidity of the C4 hydroxyl proton, which is then abstracted by the conjugate base of Glu163. The electron rearrangement thus brought about induces the cleavage of the C3-C4 bond, liberating G3P. The remaining active site residues are critical for substrate alignment in the active site and afford electrostatic stabilization of charges during proton transfers. The mechanism is consistent with a trajectory of least atomic motion requiring only slight torsion by the Glu163 side chain.

This cleavage mechanism is very akin to the FBP aldolase cleavage mechanism and differs only subtly in TBP aldolase by the stabilization of the transient negative charge on the C4 oxygen involving a water conserved molecule W2, and by the aldehyde release implicating Asp27 through its interaction with the C5 hydroxyl.

TBP aldolase has evolved subtle changes in the active site architecture with respect to the highly discriminating mammalian FBP enzyme that allow it to stabilize productively Schiff base intermediates formed of diastereoisomers. The resultant substrate attachment geometry is degenerated, being capable of binding geometrically distinct isomers, yet maintaining catalytic competency to cleave the same C3-C4 bond in each diastereoisomer through a common mechanism of proton abstraction of the C4 hydroxyl proton. The common active site architecture furthermore ensures configurational freedom thereby allowing equilibration among configurational isomers of each product of the cleavage reaction to take place prior to their condensation.

The extensive likeness of active site residues and their structural interactions with the Schiff base intermediates in the mammalian FBP and bacterial TBP enzymes, similarity in conformational response to active site binding, and identical reversible cleavage mechanism is surprising, given the low sequence homology between these two class I aldolases (11). That the two enzymes are functionally very similar suggests that the alpha/beta barrel platform is functionally robust and able to tolerate considerable sequence divergence while retaining essentially identical catalytic mechanisms. The conserved dynamical response to active site binding in the two aldolases, invariant to the same degree of sequence divergence, points to an energetic origin for the apparent sequence divergence. Computational results have shown that similar molecular architecture exhibits similar large-scale dynamic behavior (53). The energetic coupling underpinning the dynamic behavior is distinct from the identity of the amino acid sequence. Different sequences can give rise to the same energetic coupling and hence the large scale dynamic behavior would be permissive to sequence divergence.

A.



B.

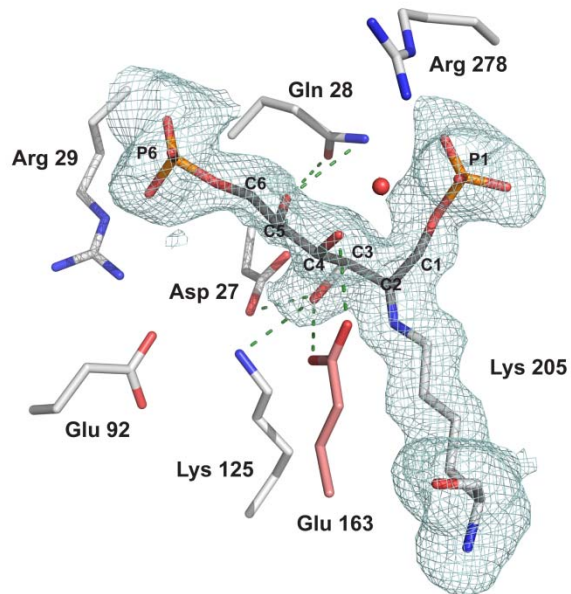
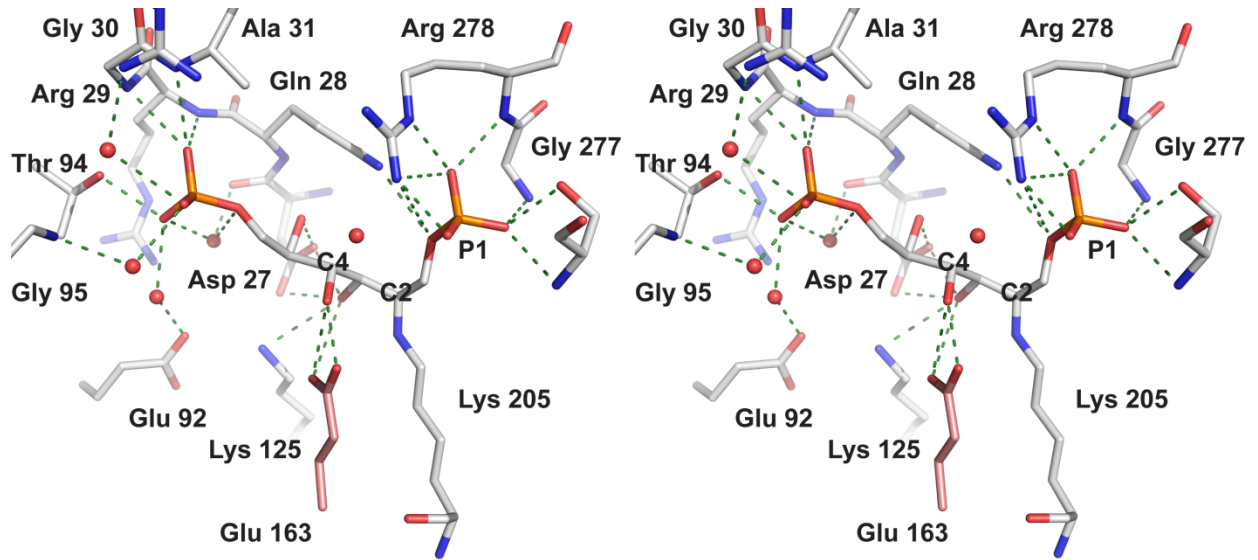


Figure 1: TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with TBP at acidic pH. **A.** Stereoview of the complex: the P1 oxyanion makes interactions with Arg278, Gly277, Ser249 and Ala250, while the P6 phosphate interacts with Arg29, Gly30 and Ala31. The P6 oxyanion also interacts with Glu92, Thr94, the side chain of Arg29 and Arg34 *via* water molecules. Asp27 bonds with the hydroxyls of C3 and C5, Lys125 with C3-OH while Glu163 interacts with both C3 and C4 hydroxyls. **B.** Difference electron density map of the same complex, calculated from a 1.87 Å simulated annealing *F_o – F_c* omit map encompassing Lys205 and the bound TBP contoured at 2.75 σ . The covalent adduct has sp² geometry at the Lys205 N ξ , corroborating the intermediate identification as the iminium. *Green dashes*, hydrogen bonds; *red spheres*, water molecules.

A.



B.

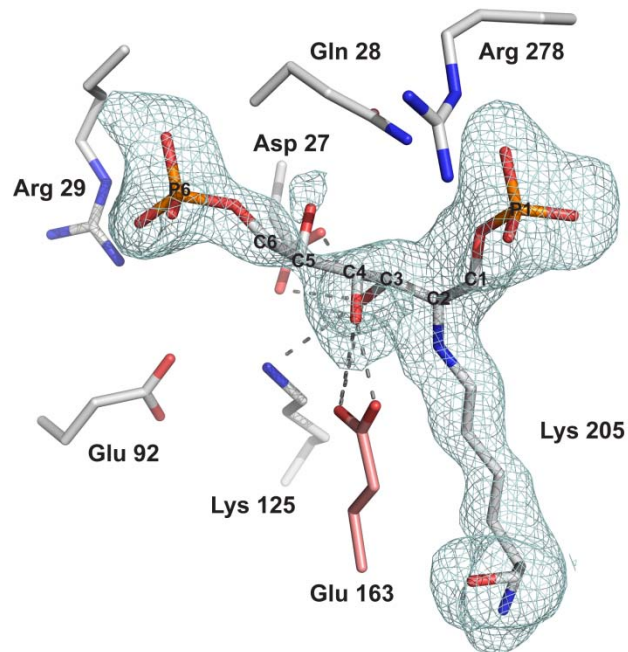
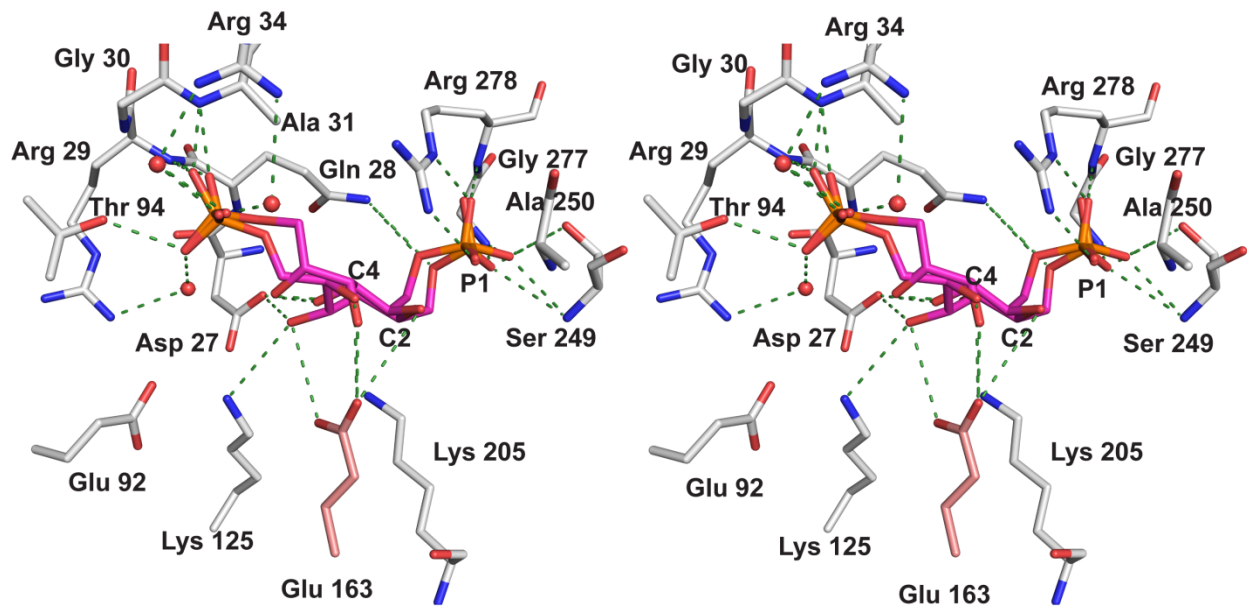


Figure 2: TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with FBP at acidic pH. **A.** Stereoview of the complex: the P1 oxyanion makes interactions with Arg278, Gly277, Ser249 and Ala250, while the P6 phosphate interacts with Arg29, Gly30 and Ala31. The P6 oxyanion also interacts with Glu92, Thr94, the side chain of Arg29 and Arg34 *via* water molecules. Asp27 bonds with the hydroxyls of C3 and C5, Lys125 with C3-OH while Glu163 interacts with both C3 and C4 hydroxyls. **B.** Difference electron density map of the same complex, calculated from a 2.07 Å simulated annealing $F_o - F_c$ omit map encompassing Lys205 and the bound FBP contoured at 2.75 σ . The covalent adduct has sp^2 geometry at the Lys205 N ξ , corroborating the intermediate identification as the iminium. *Green dashes*, hydrogen bonds; *red spheres*, water molecules.

A.



B.

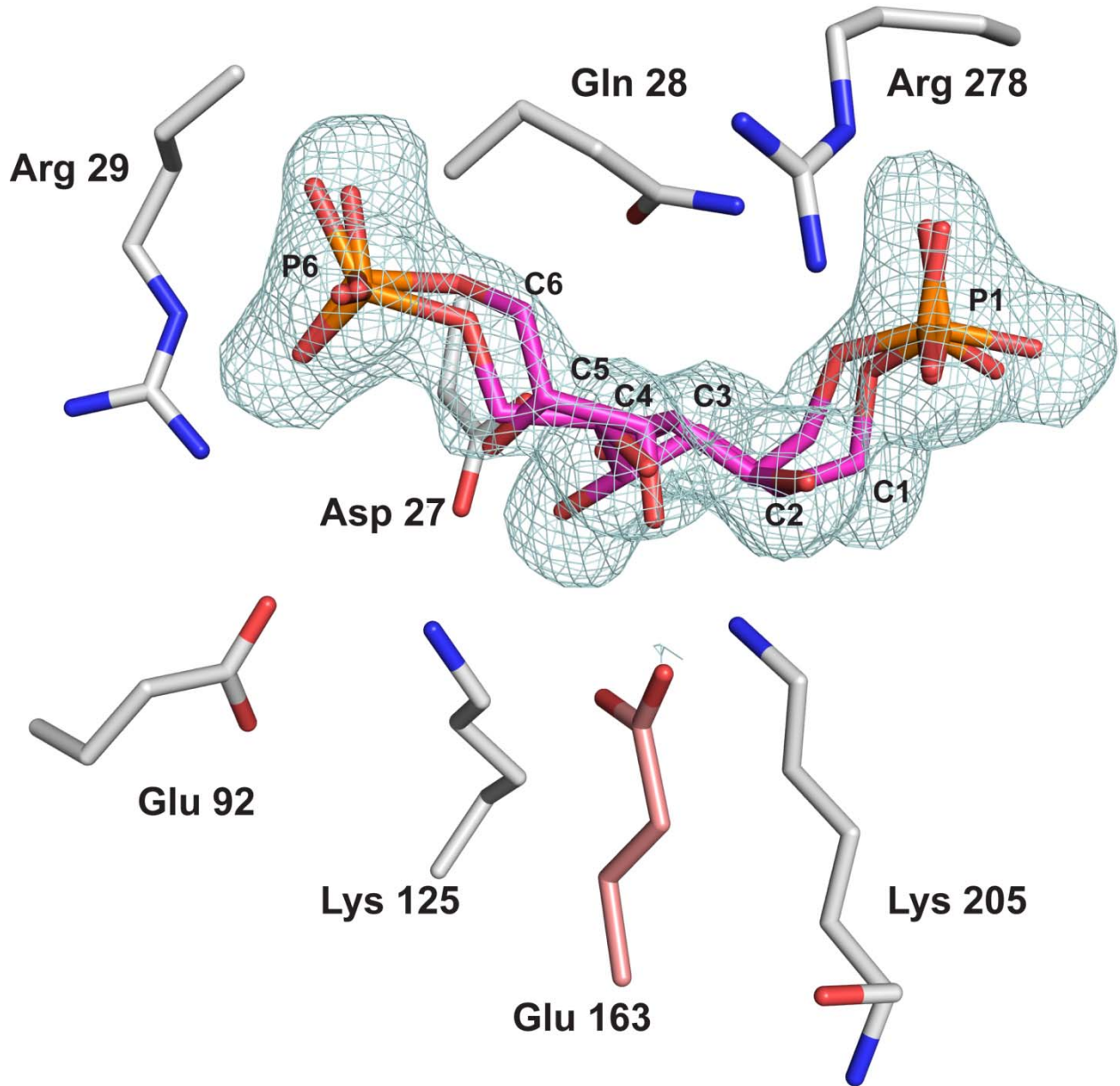
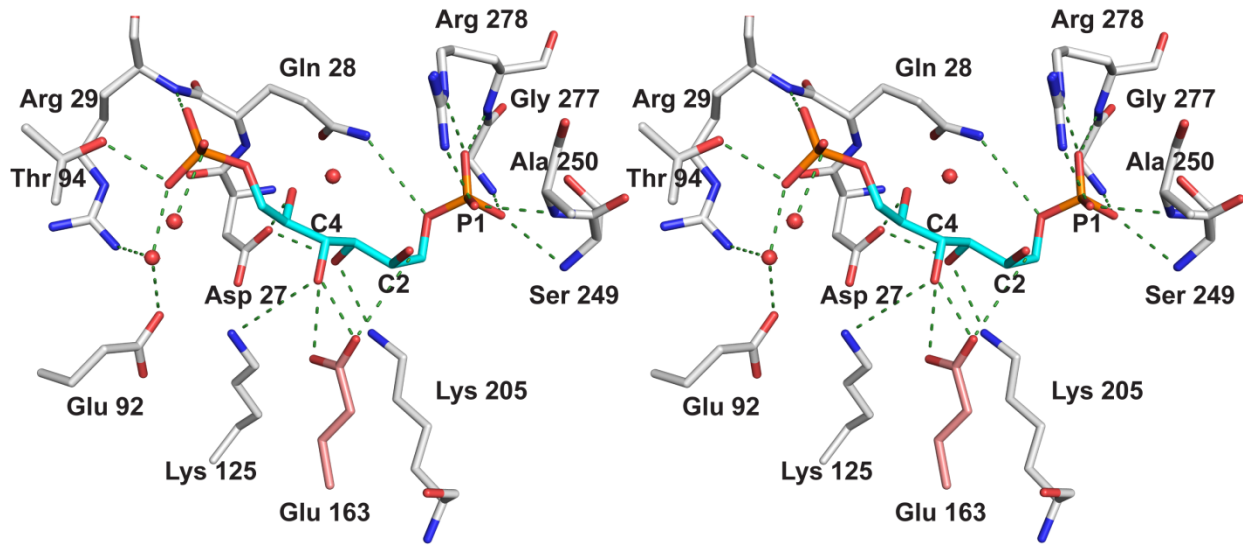


Figure 3: TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with talitol-P₂. **A.** Stereoview of the complex: the P1 oxyanion makes interactions with Arg278, Gly277, Ser249 and Ala250, while the P6 phosphate interacts with Arg29, Gly30 and Ala31. The P6 oxyanion also interacts with Glu92, Thr94, the side chain of Arg29 and Arg34 *via* water molecules. Asp27 bonds with the hydroxyls of C3 and C5, Lys125 with C3-OH while Glu163 interacts with both C3 and C4 hydroxyls. **B.** Difference electron density map of the same complex, calculated from a 1.90 Å simulated annealing $F_o - F_c$ omit map the bound talitol-P₂ and contoured at 2.85 σ . The talitol-P₂ molecule labeled is the dominant conformation. The intermediate does not show electron density extending from the Lys205 N ξ , corroborating its identity as a Michaelis complex of 2(*R*) geometry. *Green dashes*, hydrogen bonds; *red spheres*, water molecules.

A.



B.

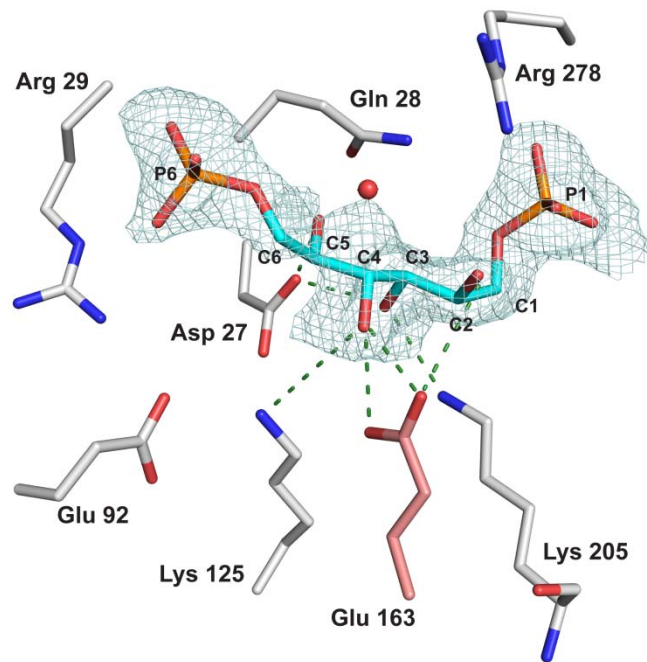
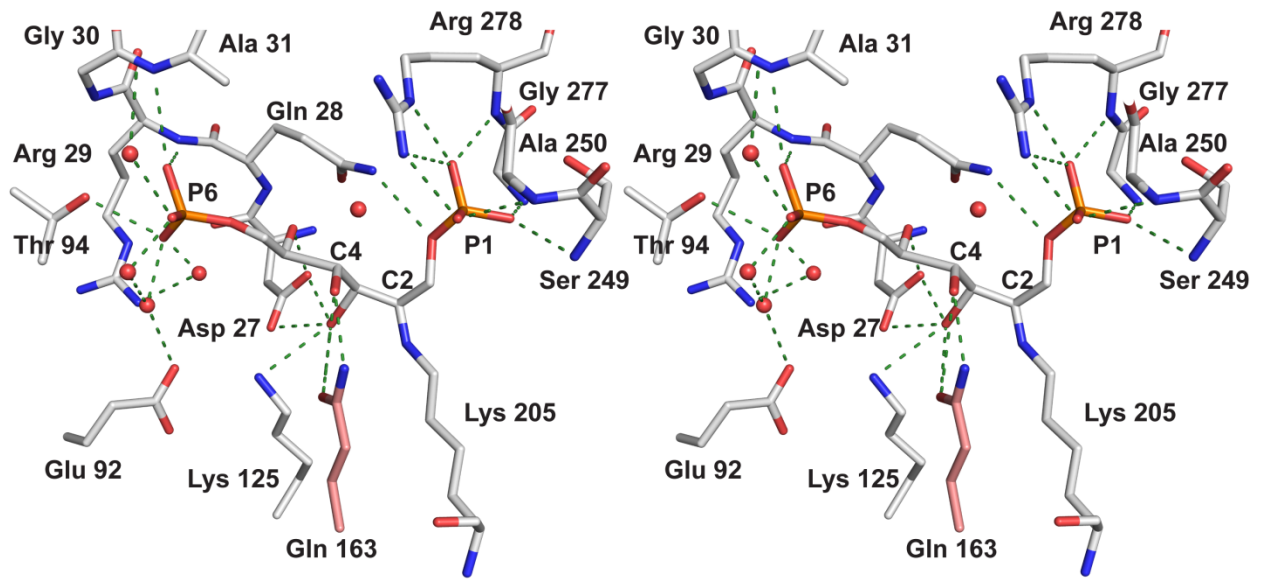
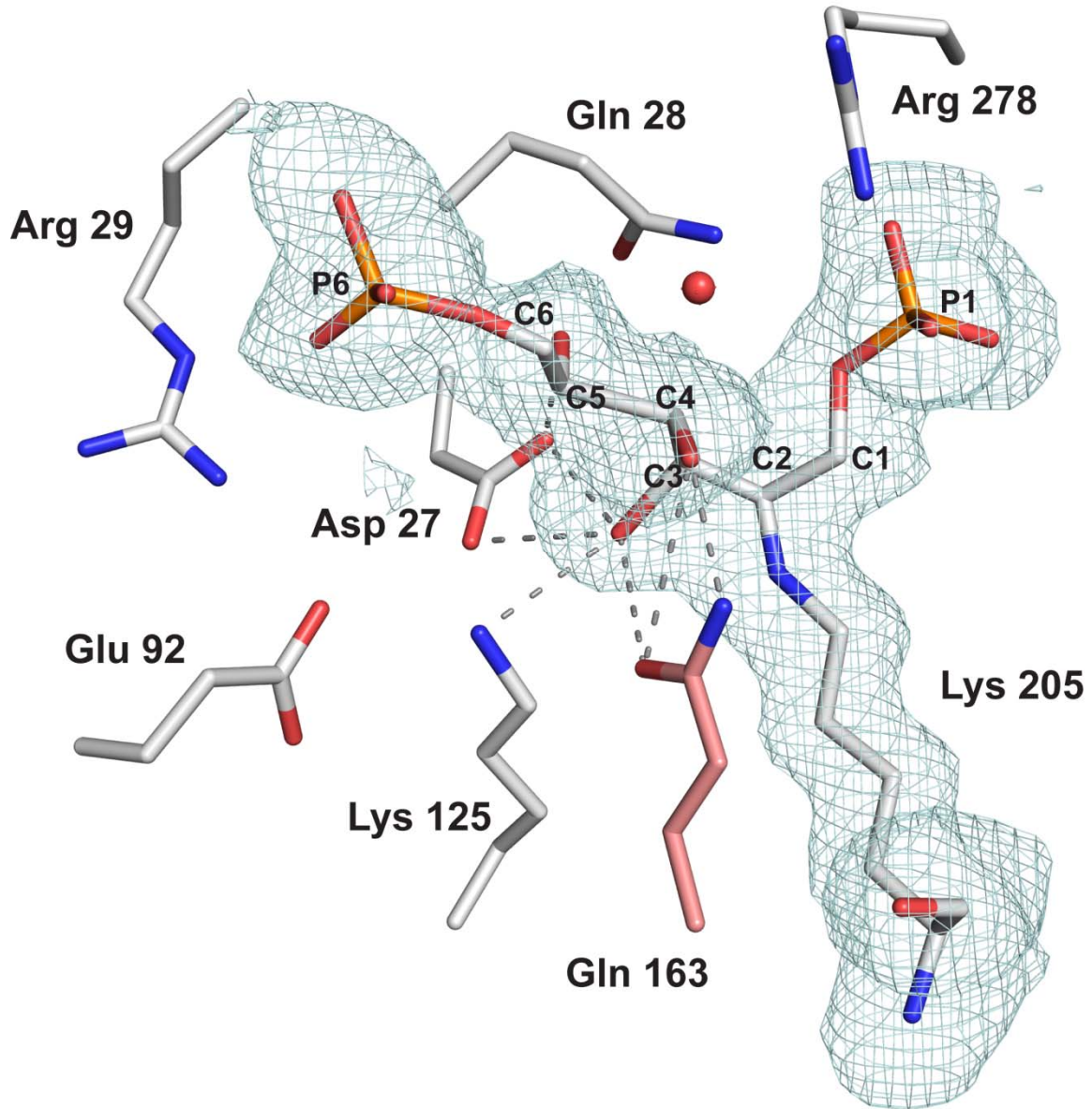


Figure 4: TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with hexitol-P₂. **A.** Stereoview of the complex: the P1 oxyanion makes interactions with Arg278, Gly277, Ser249 and Ala250, while the P6 phosphate interacts with Arg29, Gly30 and Ala31. The P6 oxyanion also interacts with Glu92, Thr94, the side chain of Arg29 and Arg34 *via* water molecules. Asp27 bonds with the hydroxyls of C3 and C5, Lys125 with C3-OH while Glu163 interacts with both C3 and C4 hydroxyls. **B.** Difference electron density map of the same complex, calculated from a 1.92 Å simulated annealing *F_o – F_c* omit map the bound talitol-P₂ and contoured at 2.65 σ. The intermediate does not show electron density extending from the Lys205 Nξ, corroborating its identity as a Michaelis complex of 2(*R*) geometry. *Green dashes*, hydrogen bonds; *red spheres*, water molecules.

A.



B.



C.

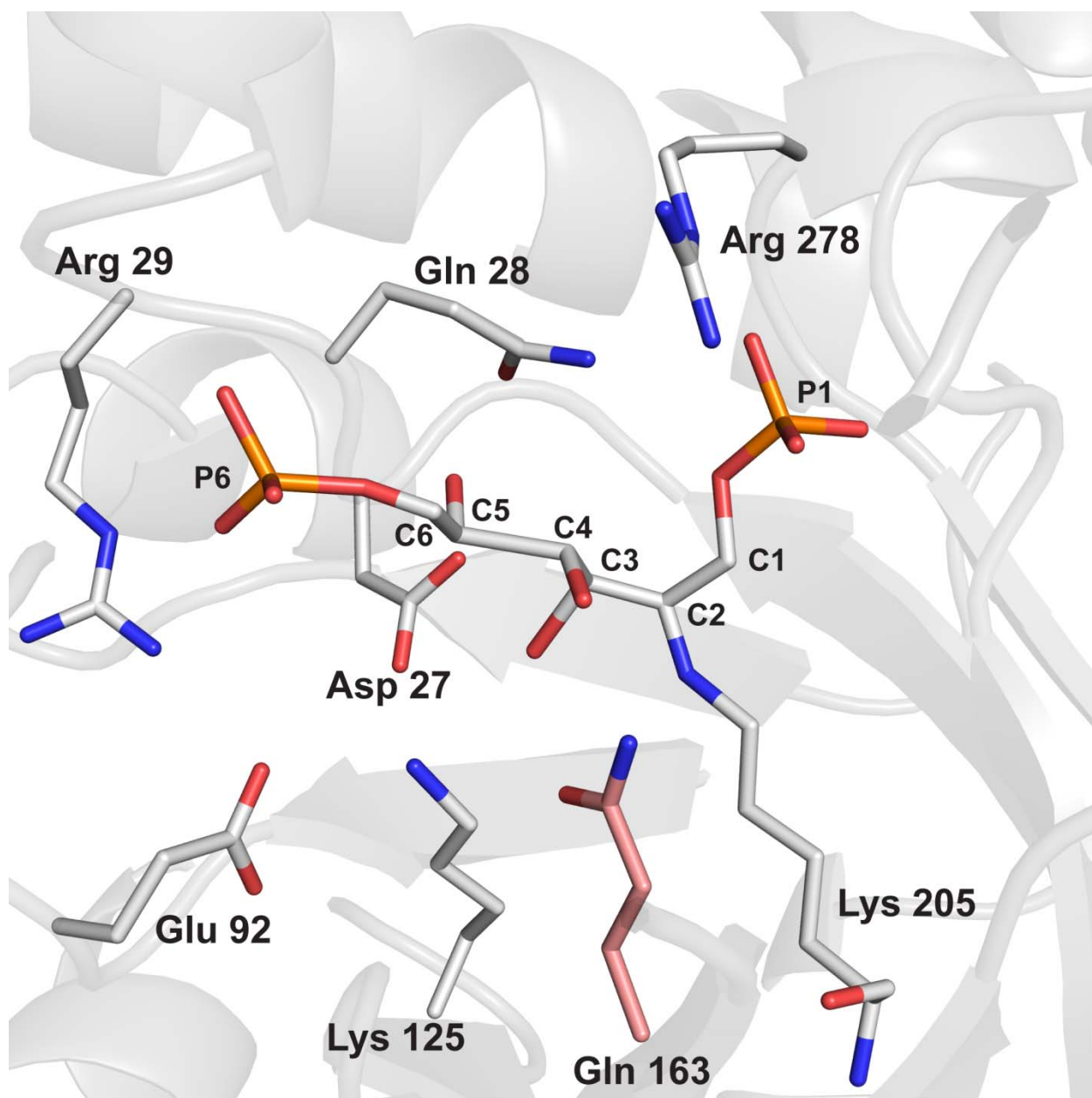
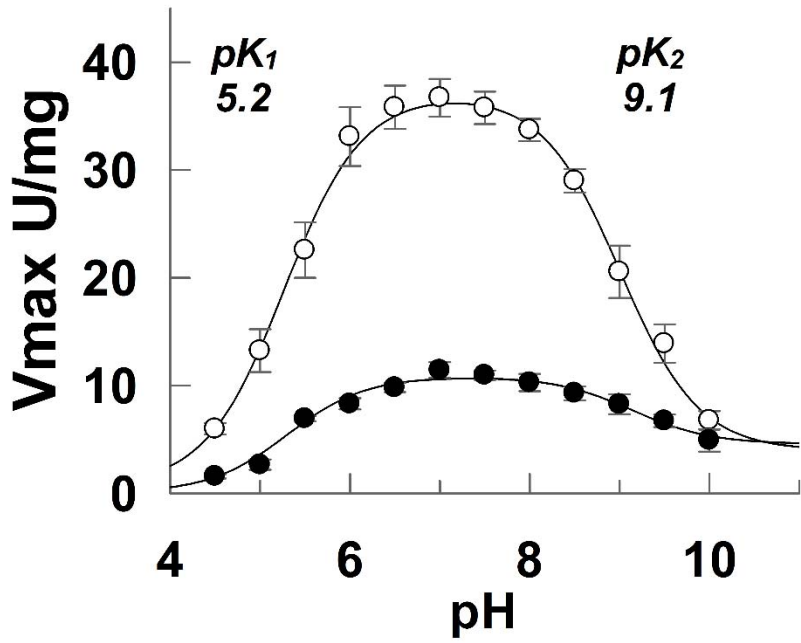


Figure 5: Glu163Gln mutant of TBP aldolase from *S. pyogenes* in complex with FBP. **A.** Stereoview of the complex: the P1 oxyanion makes interactions with Arg278, Gly277, Ser249 and Ala250, while the P6 phosphate interacts with Arg29, Gly30 and Ala31. The P6 oxyanion also interacts with Glu92, Thr94, the side chain of Arg29 and Arg34 *via* water molecules. Asp27 bonds with the hydroxyls of C3 and C5, Lys125 with C3-OH while Glu163 interacts with both C3 and C4 hydroxyls. **B.** Difference electron density map of the same complex, calculated from a 1.94 Å simulated annealing $F_o - F_c$ omit map encompassing Lys205 and the bound FBP contoured at 2.75 σ . The covalent adduct has sp^2 geometry at the Lys205 N ξ , corroborating the intermediate identification as the iminium. *Green dashes*, hydrogen bonds; *red spheres*, water molecules. **C.** FBP bound to Lys205 in the active site of the TBP aldolase Glu163Gln monomer represented as a cartoon.

A.



B.

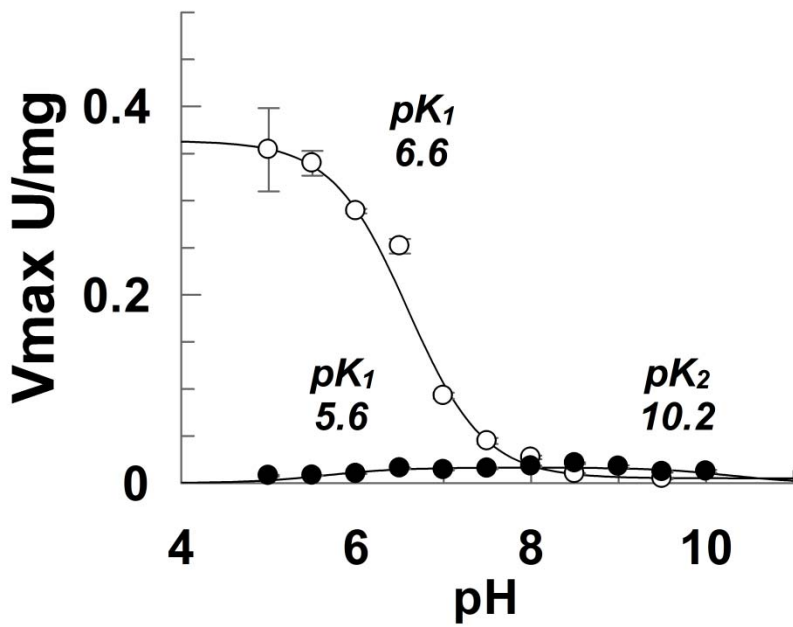


Figure 6: pH activity profiles for wild type and Glu163Gln point mutant. **A.** Wild type enzyme's FBP and TBP profiles; **B.** FBP and TBP profiles for mutant Glu163Gln. TBP :open circles; FBP : closed circles. The effect of pH on the kinetics of the cleavage reaction was determined as presented in Materiel & Methods. Each experiment was performed in triplicate.

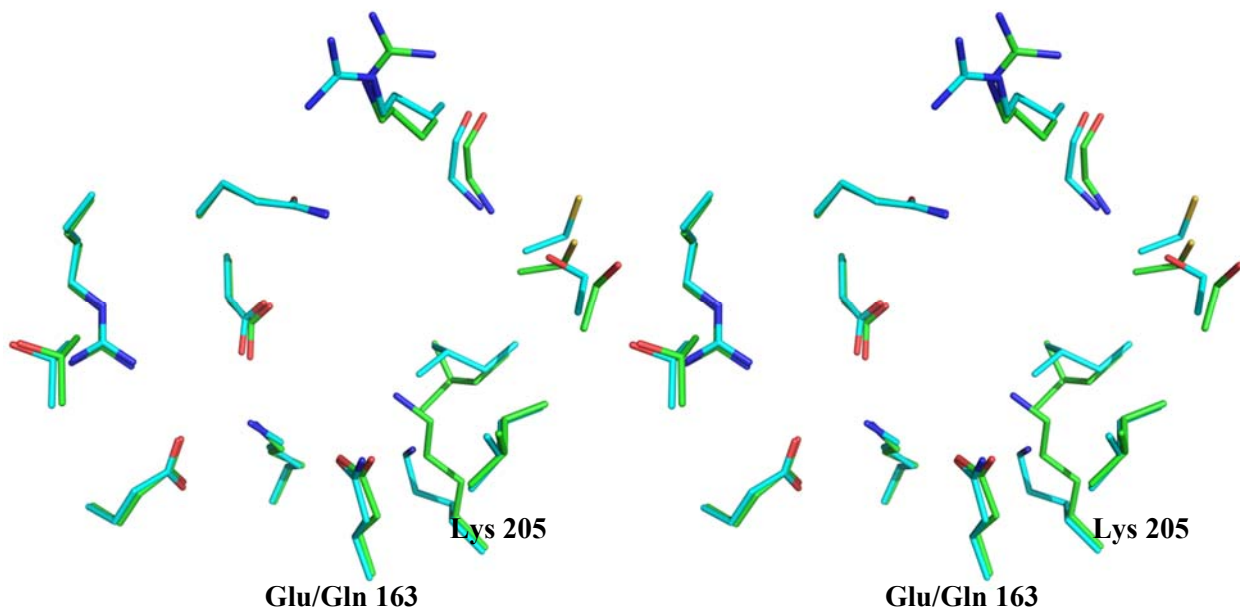


Figure S1: Stereoview of the active site of the wild-type (green) and Glu163Gln mutant (cyan) TBP aldolase from *S. pyogenes*. Lys205 is located at the bottom of the active site cavity, next to the mutated Glu163 residue.

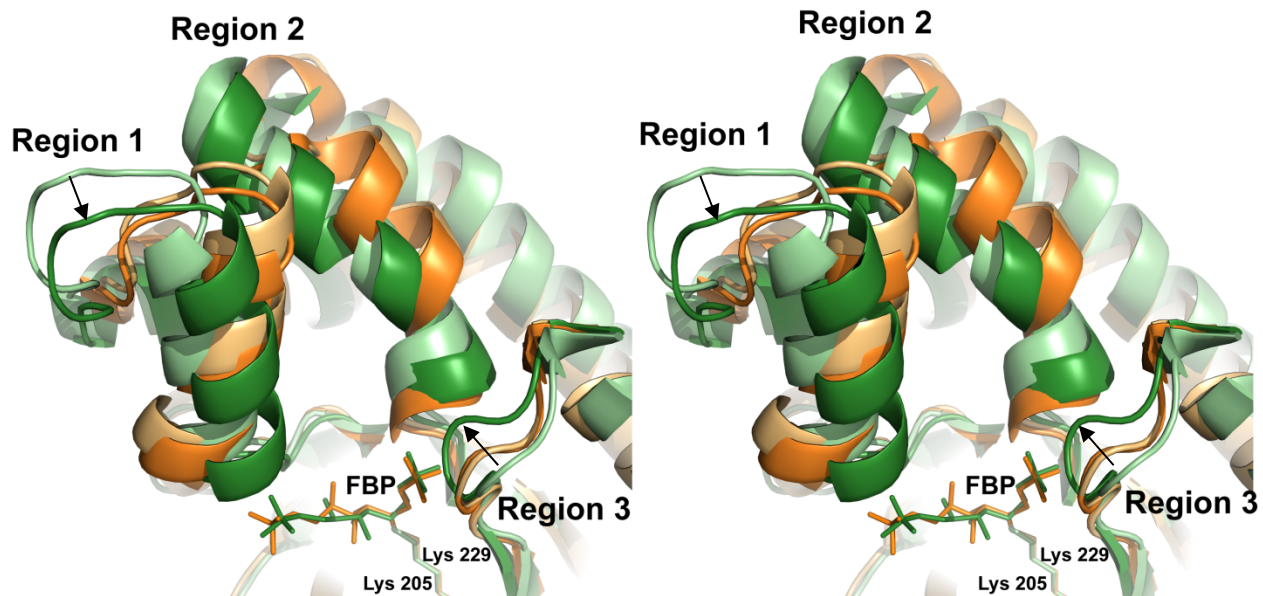


Figure S2: Superposition of the crystal structures of unliganded (pale green) and FBP bound as Schiff base (dark green) TBP aldolase from *S. pyogenes* with unliganded (pale orange) and FBP bound as Schiff base (dark orange) mammalian FBP aldolase. The regions 1, 2 and 3 which undergo conserved conformational displacement upon ligand binding are labeled, and the direction of the movement is indicated by an arrow. The overall folds of the TBP and FBP aldolases bound to FBP are shown in cartoon representation. The image is in stereo.

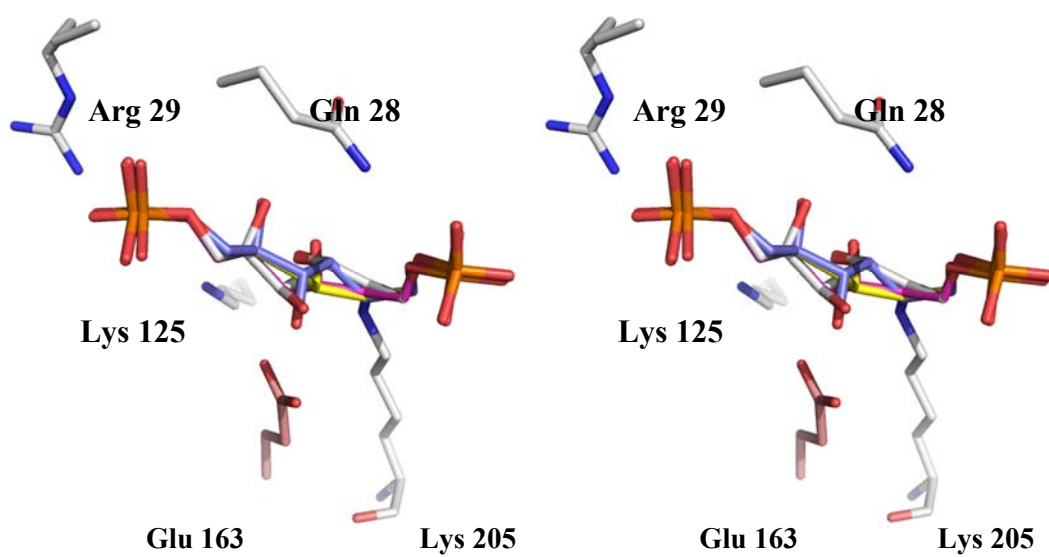


Figure S3: Modeling of Schiff base intermediates with 3(*R*)-4(*R*)-psicose-P₂ and 3(*R*)-4(*S*)-sorbose-P₂ in the active site of the TBP aldolase from *S. pyogenes* bound to TBP and FBP. TBP is in grey, FBP in blue, psicose-P₂ in yellow and sorbose-P₂ in magenta.

Table I. a: Data collection and refinement statistics for wild type TBP aldolase

	FBP	TBP	hexitol-P ₂	talitol-P ₂
Data collection				
Resolution	50-2.07 (2.14-2.07) ^a	50-1.87 (1.92-1.87) ^a	50-1.92 (1.99-1.92)	50-1.90 (1.94-1.90)
Wavelength	0.9795	1.1	1.1	1.1
Unique reflections	125563 (7547)	170703 (9275)	120096 (8746)	155209 (7408)
Completeness (%)	94.1 (99.8)	88.7 (97.2)	94.9 (70.2)	94.1 (91.2)
Average I/σ(I)	7.2 (1.6)	7.9 (1.6)	30.1 (2.1)	23.5 (1.9)
CC ^{1/2}	0.997 (0.497)	0.997 (0.876)		
CC*	0.999 (0.815)	0.999(0.966)		
R _{sym} ^b	0.092 (0.513)	0.092 (0.513)		
R _{pim} ^c	0.071 (0.419)	0.071 (0.419)		
R _{meas} ^d	0.113 (0.650)	0.113 (0.650)		
Unit cell parameters				
a(Å), b(Å), c(Å)	64.0, 109.1, 238.3	63.9, 107.4, 237.7	63.9, 107.8, 237.8	63.9, 108.0, 237.4
Space group	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21
Refinement				
Number of atoms				
Protein	10248	10415	10305	10312
Water	1238	1288	1326	1278
Hetero	5 Ca, 19 FBP,6 DHAP	7 Ca, 19 TBP, 6 DHAP	7 Ca, 19 hexitol-P ₂	7 Ca, 38 talitol-P ₂
Sigma cutoff; I/σ(I) >	1	1	1	1
R _{cryst} (%) ^e	18.5 (22.2)	17.1 (26.2)	16.5	16.6
R _{free} (%) ^d	22.4 (22.7)	20.2 (33.9)	21.5	19.6
Root mean square deviation				
Bond length (Å)	0.013	0.018	0.008	0.017
Bond angle (°)	1.450	1.64	1.09	1.57
Average B-factor (Å ²)	32.75	39.30	33.5	30.9
Ramachandran analysis^e (%)				
Favoured	95.74	96.0	97.0	97.0
Allowed	3.8	3.5	2.8	2.9
Outliers	0.47	0.5	0.23	0.077

^a Values in parentheses are given for the highest resolution shell.

^b $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \bar{I}(hkl)| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ with i running over the number of independent observations of reflection hkl .

^c $R_{pim} = \sum_{hkl} \sqrt{(1/(n-1)) \sum_i (|I_i - I_{mean}|) / \sum_{hkl} \sum_i I_i}$

^d $R_{meas} = \sum_{hkl} \sqrt{(n/(n-1)) \sum_i (|I_i - I_{mean}|) / \sum_{hkl} \sum_i I_i}$

^e $R_{cryst} = \sum_{hkl} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|| / \sum_{hkl} F_o(hkl)$

^f $R_{free} = \sum_{hkl \in T} |F_o(hkl) - |F_c(hkl)|| / \sum_{hkl \in T} F_o(hkl)$ where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. Test data set was not used throughout refinement and contains 5% of the total unique reflections.

° Analyzed by MolProbity.

Table I. b: Data collection and refinement statistics for Glu163Gln mutant TBP aldolase

	Unliganded	FBP	TBP	hexitol-P ₂	talitol-P ₂
Data collection					
Resolution	50-1.95 (1.98-1.95)	50-1.94 (1.99-1.94) ^a	50-2.10 (2.17-2.10)	50-2.05 (2.09-2.05)	50-1.94 (1.99-1.94)
Wavelength	0.9795	1.1	1.1	1.1	1.1
Unique reflections	94857 (4512)	136191 (9275)	170658 (9525)	89498 (5278)	145391 (7908)
Completeness (%)	85.8 (78.5)	73.3 (82.0)	89.1 (99.9)	83.8 (81.6)	75.5 (83.9)
Average I/σ(I)	19.7 (3.5)	16.5 (2.7)	6.7 (1.9)	27.1 (4.3)	6.9 (1.08)
CC ^{1/2}		0.9979(0.953)	0.998 (0.832)		
CC*		1.000(0.988)	0.999 (0.953)		
R _{sym} ^b		0.092 (0.513)	0.101 (0.326)		
R _{pim} ^c		0.071 (0.419)	0.045 (0.186)		
R _{meas} ^d		0.113 (0.650)	0.120 (0.440)		
Unit cell parameters					
a(Å), b(Å), c(Å)	63.0, 98.5, 237.9	63.7, 106.8, 238.4	63.9, 106.5, 239.1	64.0 106.6 237.7	63.9, 109.2, 238.3
Space group	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21
Refinement					
Number of atoms					
Protein	10173	11616	10230	10251	10357
Water	937	1252	982	1352	1572
Hetero	7 Ca	7 Ca, 19 FBP, 6 DHAP	7 Ca, 6 DHAP	7 Ca, 19 hexitol-P ₂	7 Ca, 19 talitol-P ₂
Sigma cutoff; I/σ(I) >	1	1	1	1	1
R _{cryst} (%) ^c	18.46 (22.44)	16.07 (19.84)	21.44 (27.90)	15.47	18.73
R _{free} (%) ^d	22.31 (27.74)	20.21 (21.60)	25.12 (24.30)	20.94	22.76
Root mean square deviation					
Bond length (Å)	0.008	0.018	0.008	0.010	0.008
Bond angle (°)	1.17	1.58	1.09	1.16	1.14
Average B-factor (Å ²)	29.6	39.00	22.22	31.8	29.2
Ramachandran analysis^e (%)					
Favoured	97.0	96.0	97.0	97.0	96.0
Allowed	2.77	3.62	2.9	2.85	3.69
Outliers	0.23	0.38	0.077	0.15	0.31

^a Values in parentheses are given for the highest resolution shell.

^b $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \bar{I}(hkl)| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ with i running over the number of independent observations of reflection hkl .

^c $R_{pim} = \sum_{hkl} \sqrt{(1/(n-1)) \sum_i (|I_i - I_{mean}|) / \sum_{hkl} \sum_i I_i}$

^d $R_{meas} = \sum_{hkl} \sqrt{(n/(n-1)) \sum_i (|I_i - I_{mean}|) / \sum_{hkl} \sum_i I_i}$

$$^e R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_o(\text{hkl})| - |F_c(\text{hkl})||}{\sum_{\text{hkl}} |F_o(\text{hkl})|}$$

^f $R_{\text{free}} = \frac{\sum_{\text{hkl} \in T} |F_o(\text{hkl})| - |F_c(\text{hkl})|}{\sum_{\text{hkl} \in T} |F_o(\text{hkl})|}$ where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. Test data set was not used throughout refinement and contains 5% of the total unique reflections for all structures.

^e Analyzed by MolProbity.

Table II: R.m.s.d of the alignment of the wild-type with the Glu163Gln mutant TBP aldolase native, in complex with FBP, TBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂. The calculations were done using all subunits, unless otherwise stated. The values in parenthesis are for the A subunit only and indicated the residue with the most important displacement when indicated.

	r.m.s.deviations (Å)				
	All	Residues 100-230	Region 1 (25-50)	Region 2 (250-255)	Region 3 (275-290)
WT-TBP subunits	0.163 ± 0.03 (0.191)	0.100 ± 0.002 (0.119)	0.180 ± 0.04 (Gln40 = 3.8)	0.420 ± 0.37 (Gly251= 4.9)	0.190 ± 0.08 (Glu290 = 3.2)
WT-FBP subunits	0.189 ± 0.02 (0.204)	0.134 ± 0.006 (0.126)	0.591 ± 0.23 (Gln40 = 4.2)	0.473 ± 0.34 (Gly251 = 5.2)	0.352 ± 0.07 (Glu290 = 3.3)
WT and Glu163Gln unliganded	0.269 ± 0.06	0.120 ± 0.02	0.946 ± 0.47	2.008 ± 0.09	1.126 ± 0.36
WT-FBP and Glu163Gln-FBP	0.146 ± 0.02	0.094 ± 0.1	0.0962 ± 0.38	0.341 ± 0.19	0.746 ± 0.56
WT unliganded and WT-FBP	0.198 ± 0.04	0.128 ± 0.03	1.897 ± 0.69 (2.755)	1.705 ± 1.20 (2.870)	1.661 ± 0.58 (2.228)
WT-FBP and WT-hexitolP₂	0.148 ± 0.03	0.103 ± 0.01	1.615 ± 0.88 (0.397)	0.331 ± 0.33 (0.175)	0.962 ± 0.70 (0.317)
WT-TBP and WT-talitolP₂	0.246 ± 0.04	0.161 ± 0.01	0.792 ± 0.29 (0.704)	1.342 ± 0.83 (0.199)	0.685 ± 0.38 (0.230)
Glu163Gln unliganded and Glu163Gln-FBP	0.230 ± 0.05	0.111 ± 0.02	1.013 ± 0.66 (1.95)	1.432 ± 0.26 (1.619)	0.807 ± 0.412 (1.406)
Glu163Gln-FBP and Glu163Gln-hexitolP₂	0.146 ± 0.03	0.103 ± 0.1	1.089 ± 0.81 (0.376)	1.056 ± 1.2 (0.224)	0.964 ± 0.53 (0.315)
Glu163Gln-TBP (DHAP) and Glu163Gln-talitolP₂	0.246 ± 0.04	0.161 ± 0.01	2.009 ± 0.57 (2.418)	1.956 ± 1.14 (0.244)	1.727 ± 0.45 (1.531)

Table III: Kinetics parameters of FBP and TBP cleavage reaction for wild type and mutant Glu163Gln aldolase assayed at pH 7.5.

Enzyme	k_{cat} (s ⁻¹)		K_m (μ M)	
	FBP	TBP	FBP	TBP
Wild type	6.75 \pm 0.28	23.01 \pm 1.66	2074 \pm 194.1	1380 \pm 150.8
Glu163Gln	0.009 \pm 0.001	0.025 \pm 0.003	1418 \pm 188.4	2950 \pm 248.2
Lys125Met	0.324 \pm 0.02	0.117 \pm 0.03	2358 \pm 303.8	1751 \pm 310.1

Table IV: Active site dimensions of wild type and Glu163Gln mutant TBP aldolase from *S. pyogenes*, and of wild type and Glu187Gln mutant FBP aldolase from rabbit muscle.

Enzyme	Volume (Å ³)	Surface Area (Å ²)
Wild-type TBP aldolase	2975.40	1654.39
Wild-type TBP aldolase - DHAP	2434.61	1525.24
Wild-type TBP aldolase - FBP	2306.74	1433.70
Wild-type TBP aldolase - TBP	2278.95	1331.77
Wild-type FBP aldolase	1308.02	672.06
Wild-type FBP aldolase - DHAP	572.61	370.28
Wild-type FBP aldolase - FBP	841.04	483.62

Table S1: Parameters of binding of FBP, TBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂ with FBP aldolase of rabbit muscle and TBP aldolase of *S. pyogenes* as determined by calorimetric titration (see Material and Methods section).

Ligand	Enzyme	n	K (L mol ⁻¹)	ΔH (cal mol ⁻¹)	ΔS (cal K ⁻¹ mol ⁻¹)	-TΔS (cal mol ⁻¹)	ΔG (cal mol ⁻¹)
DHAP	FBP aldolase	1.06± 0.059	1.02*10 ⁵ ± 2.65*10 ⁴	-3002± 217.5	12.9	-3.84 *10 ³	-6842
Hexitol-P ₂	FBP aldolase	1.05±0.047	1.74*10 ⁵ ± 6.55*10 ⁴	5168± 286.2	41.3	-12.3 *10 ³	-7132
	TBP aldolase	1.1±0.06	4.9*10 ⁴ ±1.4* 10 ³	-1044± 83.8	18.0	-5.36 *10 ³	-6404
Talitol-P ₂	FBP aldolase	0.99±0.032	4.07*10 ⁵ ± 1.61*10 ⁵	4220± 78.3	39.8	-11.8 *10 ³	-7580
	TBP aldolase	1.08±0.06	4.05*10 ⁴ ±9.5 *10 ³	-1097± 82.1	17.4	-5.18 *10 ³	-6278

References:

-
- ¹ Suri, J.T., Mitsumori, S., Albertshofer, K., Tanaka, F., Barbas, C.F. 3rd. Dihydroxyacetone variants in the organocatalytic construction of carbohydrates: mimicking tagatose and fucose aldolase. (2006) *J. Org. Chem.* **71**, 3822-3828.
- ² Takayama, S., McGarvey, G.J., Wong, C.H. Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars. (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 285-310.
- ³ Fessner, W.D. Enzyme mediated C-C bond formation. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**(1), 85-97.
- ⁴ Wong, C.H., Whitesides, G. M. (1994), *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry* 1st ed., Elsevier Science & Technology Books.
- ⁵ Koeller, K. M. Wong C. H. Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies. (2000) *Chem Rev* **100**(12): 4465-4494.
- ⁶ Samland AK, Sprenger GA. Microbial aldolases as C-C bonding enzymes—unknown treasures and new developments. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol.* Jul; **71**(3): 253-64. Review.
- ⁷ Panke S, Wubbolts M. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. (2005) *Curr Opin Chem Biol.* Apr; **9**(2):188-94. Review.
- ⁸ Clapés P, Fessner, WD, Sprenger GA, Samland AK. (2010). Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Curr Opin Chem Biol* **14**(2): 154-167.
- ⁹ Rosey EL, Oskouian B, Stewart GCLactose metabolism by *Staphylococcus aureus*: characterization of lacABCD, the structural genes of the tagatose 6-phosphate pathway. (1991). *J. Bacteriol.* **173**:5992–5998.
- ¹⁰ Bissett, D.L. and Anderson, R.L. Lactose and D-galactose metabolism in *Staphylococcus aureus*. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 8750-8755.
- ¹¹ LowKam C, Liotard B, Sygusch J. Structure of a class I tagatose-1,6-bisphosphate aldolase: investigation into an apparent loss of stereospecificity. (2010) *J Biol Chem.* Jul 2; **285**(27) :21143-52.
- ¹² Lee, J.H., Bae, J., Kim, D., Choi, Y., Im, Y.J., Koh, S., Kim, J.S., Kim, M.K., Kang, G.B., Hong, S.I., Lee, D.S., Eom, S.H. Stereoselectivity of fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Thermus caldophilus*. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 616-625.
- ¹³ Grazi, E., Rowley, P.T., Cheng, T., Tchola, O., Horecker, B.L. The mechanism of action of aldolases. III. Schiff base formation with lysine. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 38-43.
- ¹⁴ Kobashi, K., Lai, C.Y., Horecker, B.L. Organic phosphate groups in native and borohydride-reduced aldolase. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 437-444.
- ¹⁵ Kobes, R.D., Simpson, R.T., Vallee, R.L., Rutter, W.J. A functional role of metal ions in a class II aldolase. (1969) *Biochemistry.* **8**, 585-588.
- ¹⁶ Harris, C.E., Kobes, R.D., Teller, D.C., Rutter, W.J. The molecular characteristics of yeast aldolase. (1969) *Biochemistry.* **8**, 2442-2454.
- ¹⁷ St-Jean, M. and Sygusch, J. Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 31028-31037.
- ¹⁸ Rose, I.A. (1969) *Glycolysis : Regulation and mechanisms of the enzymes; Comprehensive Biochemistry*, Vol. 17, ed. Florkin, M. & Stoltz, E.H., Elsevier, Amsterdam, London and New York
- ¹⁹ Rose IA, O'Connell EL. Studies on the interaction of aldolase with substrate analogues. (1969) *J Biol Chem.* Jan 10; **244**(1):126-34.
- ²⁰ Grazi E, Rowley PT, Cheng T, Tchola O, Horecker BL. The mechanism of action of aldolases. III. Schiff base formation with lysine. (1962) *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 25; **9**:38-43.
- ²¹ Lorentzen E, Siebers B, Hensel R, Pohl E. Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. (2005) *Biochemistry.* Mar 22; **44**(11):4222-9.
- ²² Maurady A, Zdanov A, de Moissac D, Beaudry D, Sygusch J. A conserved glutamate residue exhibits multifunctional catalytic roles in D-fructose-1,6-bisphosphate aldolases. (2002) *J Biol Chem.* Mar 15; **277**(11):9474-83.

- ²³ St-Jean M, Lafrance-Vanasse J, Liotard B, Sygusch J. High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit. (2005) *J Biol Chem.* Jul 22; **280**(29):27262-70.
- ²⁴ Gefflaut T, Blonski C, Perie J, Willson M. Class I aldolases: substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. (1995) *Prog Biophys Mol Biol.* **63**(3):301-40.
- ²⁵ Hartman FC, Barker R. An exploration of the active site of aldolase using structural analogs of fructose diphosphate. (1965) *Biochemistry.* Jun; **4**(6):1068-75.
- ²⁶ Gray GR, Barker R. Studies on the substrates of D-fructose 1,6-diphosphate aldolase in solution. (1970) *Biochemistry.* Jun 9; **9**(12):2454-62.
- ²⁷ Mehler AH, Cusic ME Jr. Aldolase reaction with sugar diphosphates. (1967) *Science.* Mar 3; **155** (3766):1101-3.
- ²⁸ Lee SJ, Kim HS, Kim do J, Yoon HJ, Kim KH, Yoon JY, Suh SW. Crystal structures of LacD from *Staphylococcus aureus* and LacD.1 from *Streptococcus pyogenes*: insights into substrate specificity and virulence gene regulation. (2011) *FEBS Lett.* Jan 21; **585**(2):307-12.
- ²⁹ Kobes, R.D., and Dekker, K.E. 2-Keto-4-hydroxyglutarate aldolase of bovine liver. Purification, criteria of purity, and general properties, (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1919-1925
- ³⁰ Meloche, H.P. and Mehler, L. The stereochemistry at carbon 3 of pyruvate lyase condensation products. Aldolases forming condensation products racemic at carbon 4. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6333-6338.
- ³¹ Espelt, L., Bujons, J., Parella, T., Calveras, J., Joglar, J., Delgado, A., Clapés, P. Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-fuculose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde (2005) *Chemistry.* **11**, 1392-1401.
- ³² Zgiby, S.M., Thomson, G.J., Qamar, S., Berry, A. Exploring substrate binding and discrimination in fructose-1,6-bisphosphate and tagatose-1,6-bisphosphate aldolases (2000) *Eur.J.Biochem.* **267**, 1858-1868.
- ³³ Williams, G.J., Domann, S., Nelson, A., Berry, A. Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3143-3148.
- ³⁴ Royer SF, Haslett L, Crennell SJ, Hough DW, Danson MJ, Bull SD. Structurally informed site-directed mutagenesis of a stereochemically promiscuous aldolase to afford stereochemically complementary biocatalysts. (2010) *J Am Chem Soc.* Aug 25; **132**(33):11753-8.
- ³⁵ Baker, P. and S. Y. Seah. Rational design of stereoselectivity in the class II pyruvate aldolase BphI. (2012) *J Am Chem Soc* **134**(1): 507-513.
- ³⁶ Ginsburg A, Mehler AH. Specific anion binding to fructose diphosphate aldolase from rabbit muscle. *Biochemistry.* 1966 Aug; **5**(8):2623-34..
- ³⁷ Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. (1997) *Methods Enzymol.* **276**: 307-326.
- ³⁸ Kabsch W. XDS. (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Feb; **66**(Pt 2):125-32.
- ³⁹ Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung LW, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Nov; **58** (Pt 11):1948-54.
- ⁴⁰ Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Dec; **60**(Pt 12 Pt 1):2126-32.
- ⁴¹ DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>.
- ⁴² Binkowski TA, Naghibzadeh S, Liang J. CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. (2003) *Nucleic Acids Res.* Jul 1; **31**(13):3352-5.
- ⁴³ Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. (2006) *Nucleic Acids Res.* Jul 1; **34**(Web Server issue):W116-8.

-
- ⁴⁴ Aqvist J, Luecke H, Quioco FA, Warshel A. Dipoles localized at helix termini of proteins stabilize charges. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 1;88(5):2026-30.
- ⁴⁵ Scheiner, S. (1999) Proton transfers in models biomolecules. In *Computational Molecular Biology 1st* ed. Leszczynski J. editor; Elsevier Science; pp35-65
- ⁴⁶ Isom DG, Castañeda CA, Cannon BR, García-Moreno B. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 29; **108**(13):5260-5.
- ⁴⁷ St-Jean M, Sygusch J. Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. (2007) *J Biol Chem*. Oct 19;**282**(42):31028-37.
- ⁴⁸ Loughman, J.A. and Caparon, M.G. A novel adaptation of aldolase regulates virulence in *Streptococcus pyogenes*. (2006) *EMBO J*. **25**, 5414-5422.
- ⁴⁹ Loughman, J.A. and Caparon, M.G. Comparative functional analysis of the lac operon in *Streptococcus pyogenes*. (2007) *Molecular Microbiology*. **64**, 269-280.
- ⁵⁰ Cusumano Z, Caparon M. Adaptive evolution of the *Streptococcus pyogenes* regulatory aldolase LacD.1. *J Bacteriol*. 2013 Mar;**195**(6):1294-304.
- ⁵¹ Halabi N, Rivoire O, Leibler S, Ranganathan R. 2009. Protein sectors: evolutionary units of three-dimensional structure. *Cell* **138**:774–786.
- ⁵² Süel GM, Lockless SW, Wall MA, Ranganathan R. 2003. Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nat. Struct. Biol.* 10:59–69.
- ⁵³ Keskin O, Jernigan RL, Bahar I (2000) Proteins with similar architecture exhibit similar large-scale dynamic behavior. *Biophys J* **78**: 2093–2106

CHAPITRE 3 : Article 2

Nous avons ensuite effectué une étude des différences de spécificité entre la FBP aldolase de mammifère et la TBP aldolase de *S. pyogenes*. Pour ceci, la structure du mutant K229M de la FBP aldolase de mammifère en complexe avec le FBP cyclique a été résolue. En parallèle, les structures du mutant équivalent de la TBP aldolase, K205M, en complexe avec les inhibiteurs compétitifs hexitol-P₂ et talitol-P₂ ont également été déterminées. Ces données structurales ont permis de mettre en évidence les résidus Ala31 et Asp33 de la FBP aldolase comme causes de l'absence d'activité aldolase de cette dernière sur les isomères du FBP, et ce par encombrement stérique.

Les résultats de cette étude ont été présentés dans un article intitulé «DECYCLIZATION DETERMINES DIASTEREOISOMERIC SUBSTRATE SPECIFICITY OF MAMMALIAN CLASS I FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE ALDOLASE», en préparation pour le *Journal of the American Chemical Society*.

J'ai produit et purifié toutes les aldolases, natives et mutantes, mentionnées dans l'article. J'ai effectué toutes les collectes de données cristallographiques, mis à part celle du mutant K229M de la FBP aldolase en complexe avec le FBP, qui a été collectée par Guillaume Arthus-Cartier en 2010. J'ai résolu et exécuté les affinements de toutes les structures, et j'ai procédé à leur analyse finale et leur déposition dans la *Protein Data Bank*. J'ai effectué la totalité des expériences cinétiques et celles d'isothermie calorimétrique. J'ai également réalisé les figures et rédigé le manuscrit avec le Dr. Jurgen Sygusch.

**DECYCLIZATION DETERMINES DIASTEREOISOMERIC
SUBSTRATE SPECIFICITY OF MAMMALIAN CLASS I
FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE ALDOLASE**

INSIGHTS INTO STEREOSPECIFICITY

Clotilde Low-Kam, Guillaume Arthus-Cartier and Jurgen Sygusch¹

From the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal,

Montréal H3C 3J7, Québec, Canada

¹Correspondance to: Jurgen Sygusch, CP 6128, Station Centre-Ville, Montréal H3C 3J7, QC.

Mammalian fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolase and tagatose-1,6-bisphosphate (TBP) aldolase from *Streptococcus pyogenes* have remarkably similar reaction mechanisms, active site residues, and active site architecture. The mammalian enzyme is highly discriminating using only one diastereoisomer as substrate, 3(*S*)-4(*R*)-FBP, while the bacterial enzyme recognizes four diastereoisomers 3(*S*)-4(*R*)-FBP, 3(*S*)-4(*S*)-TBP, 3(*R*)-4(*R*)-psicose-P₂ and 3(*R*)-4(*S*)-sorbose-P₂. Diastereoisomers modeled as Schiff bases into the active site of the mammalian enzyme did not produce steric clashes or catalytic incompetent geometries. To investigate the structural basis for high stereoselectivity of the mammalian enzyme, the crystal structure was solved of an isosteric mutant of mammalian aldolase, Lys229Met; the lysine residue responsible for Schiff base formation. The mutation permits FBP binding but precludes formation of covalent intermediates. Mutant crystals soaked in saturating FBP solution cryotrapped the cyclic β anomer of FBP in a catalytically

competent configuration as well as the cyclic α anomer of FBP in a nonproductive binding mode. The β anomer binding mode implicated Glu187 as the residue catalyzing ring opening. Proton transfer by Glu187 from the furanose C2 hydroxyl to a conserved water molecule W1 which protonates the furanose O5 oxygen initiates ring opening and is facilitated by Lys229 stabilizing the transient negative charge on the C2 oxygen. Modeling the cyclic forms of the unproductive diastereoisomers into the active site in geometry competent for decyclization was compromised sterically. The mammalian enzyme discriminates against selective diastereoisomers as substrates by promoting active site binding modes incompetent for decyclization. Crystallographic, inhibition, and calorimetric data with the diastereoisomer TBP support this interpretation.

Introduction

One of the central reactions of the glycolysis pathway is the reversible cleavage of D-fructose-1,6-bisphosphate (FBP) into dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and glyceraldehyde-3-phosphate (G3P). Aldolases are the ubiquitous enzymes that catalyze this central reaction, and have been the subject of numerous studies investigating their mechanism (1, 2, 3,4, 5), their interaction with cellular components (6, 7, 8,9) and their applications in synthetic chemistry given their C-C bond forming ability (10,11, 12, 13,14). Class I aldolases catalyze their reaction through Schiff base formation with substrate implicating a lysine residue, while class II enzymes use an obligatory divalent cation to polarize the carbonyl group of the open chain aldehyde and facilitate proton transfer (15).

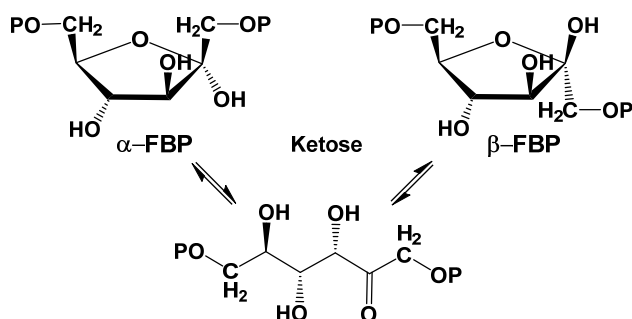
The canonical class I aldolase is FBP aldolase from rabbit muscle. It has been the focus of numerous investigations, and its catalytic mechanism has been extensively investigated (4,5, 16). Although tagatose-1,6-bisphosphate (TBP) aldolase from *Streptococcus pyogenes* shares many similarities with its mammalian counterpart, it displays one notable difference: it has the ability to use as substrates the bisphosphorylated D-hexose stereo-isomers, sorbose-P₂, psicose-P₂, tagatose-P₂ and fructose-P₂ (17, 18). The four sugars are diastereoisomers and differ in stereochemistry at carbon 3 and at carbon 4 with respect to the configuration of their hydroxyl groups. As with class I FBP aldolase, the cleavage of the four sugars by TBP aldolase from *S. pyogenes* produces G3P and DHAP, while the condensation of G3P and DHAP produces a mixture of the four D-hexoses (18).

In the retro-aldol cleavage reaction of the class I mechanism, a lysine residue in the active site of the enzyme carries out a nucleophilic attack onto the C2 ketose of the incoming FBP, forming a neutral carbinolamine. Subsequent dehydration of the carbinolamine intermediate yields the substrate in a protonated iminium form of the Schiff base. In rabbit muscle FBP aldolase, Glu187 residue then abstracts the proton from the C4 hydroxyl of the intermediate, triggering C3-C4 bond cleavage (4,19). In TBP aldolase, Glu163 performs the same proton abstraction in to cleave the C3-C4 bond, however, different

from the mammalian FBP aldolase, the same reaction mechanism is used by the TBP aldolase to cleave all four diastereoisomers. Following cleavage, D-G3P is released from the active site of each enzyme while stereospecific proton transfer to the three carbon enamine generates a Schiff base that upon hydrolysis releases DHAP by the inverse sequence of elementary rate steps.

To assess at which step in the reaction mechanism discrimination takes place against the unproductive diastereoisomers by the mammalian enzyme, the Schiff base intermediates of 3(*R*)-4(*R*)-psicose-P₂, 3(*R*)-4(*S*)-sorbose-P₂ and 3(*S*)-4(*S*)-tagatose-P₂ were modelled into the active site of the mammalian enzyme. The modelling consisted of generating the appropriate C3 and C4 epimers using the crystal structure of the Schiff base intermediate formed with 3(*S*)-4(*R*)-fructose-P₂ as template (4) and is shown in Figure 1A. The unproductive intermediates did not show any clashes with active site residues and the C4 hydroxyls were within hydrogen bonding distance of Glu187 suggesting catalytically competent configurations. Additionally, the four diastereoisomers bound in the active site of TBP aldolase (20) were fitted as Schiff base intermediates into the active site of mammalian aldolase using the Schiff base intermediate formed with 3(*S*)-4(*R*)-fructose-P₂ of the mammalian enzyme as template and is shown in Figure 1B. Although the configuration of the modelled diastereoisomers was slightly different from Figure 1A, the configurations did not result in steric clashes and the C4 hydroxyls were within hydrogen bonding distance of Glu187 reinforcing that the four diastereoisomers are potential substrates of the enzyme. Since the mammalian enzyme only recognizes FBP as substrate, the discrimination against the nonproductive diastereoisomers must occur at a rate step prior to Schiff base formation.

Aqueous solutions of FBP contain several interconverting, tautomeric forms. At equilibrium, FBP exists predominantly in cyclic form as α and β anomers (Scheme 1). The non-enzymatic mechanism of interconversion of FBP tautomers in solution involves an acyclic keto form, which represents only ~2% of all species present, as an obligatory intermediate (21,22). The equilibrium in solution favors the β -furanose form, representing ~80% of the FBP population, with the α anomer representing the minor population of ~20% (21,23,24,25,26). The cyclic form of the bisphosphorylated substrate is not catalytically competent



Scheme I: Interconversion of tautomeric forms of FBP in solution.

for the aldolase reaction and must be first converted to the acyclic intermediate to undergo Schiff base formation. Whether the spontaneous rate ring opening of the β -anomer is essential for catalysis, or the acyclic keto form is the sole substrate and facilitates ring opening in solution through mass action once bound has been a matter of long standing

debate. Trapping by mammalian FBP aldolase of the β -anomer specifically produced by phosphofruktokinase showed that aldolase can use both β and acyclic forms at about the same rates as substrates (3). Whether mammalian FBP aldolase catalyzes the conversion of the cyclic β -FBP into the acyclic ketose was resolved in a pre-steady state kinetic study that indicated ring-opening activity in mammalian FBP aldolase. The single-turnover experiments showed that the rate of Schiff base formation ($\geq 60 \text{ s}^{-1}$) was faster than the ring-opening in solution (4 s^{-1}) at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, signifying a catalytic role by the enzyme in furanose ring-opening (27). A second observation indicated that FBP aldolase initially reacts in a fast reaction with 70-80 % of the β -FBP anomer present at equilibrium in solution, and that the remaining 20-30 % of the α -FBP anomer reacts in a slow phase only after it converts to the β -anomer. This slow phase was consistent with earlier reports that the α -anomer binds unproductively (233).

To investigate how furanose ring opening is catalyzed by class I aldolases, and to shed light onto the differences observed between the FBP and TBP aldolases with regards to their substrate preference, we determined high resolution structure of the Lys229Met mutant of FBP aldolase in complex with its natural substrate FBP. This mutation abrogates Schiff base formation such that FBP binding can be studied prior to Schiff base formation. The crystallographic data indeed showed trapping of both α - and β -anomeric forms of FBP in the active site of different subunits of the K229M mutant that delineated a mechanism for ring opening of the β -anomer on the enzyme. To corroborate the partial active site occupancy observed for the FBP anomers and high active site mobility by the anomers, calorimetry data was measured to assess the

strength of the active site interactions of the K229M mutant with FBP and TBP. Docking of the β -anomeric form of all four diastereoisomeric substrates of the promiscuous TBP aldolase into the active site of the highly selective FBP aldolase implicated two residues, Ala31 and Asp33, *via* steric hindrance, as being responsible for the substrate discrimination observed in the mammalian enzyme. The mammalian enzyme apparently discriminates against selective diastereoisomers at the mechanistic level of ring opening.

Experimental Procedures

DHAP, FBP and TIM/GDH were purchased from Sigma-Aldrich and TBP was a generous gift of Dr W. D. Fessner (University of Darmstadt).

Purification & Crystallization: The mutant Lys229Met (K229M) of FBP aldolase from rabbit muscle was expressed and purified using a protocol previously reported (4). Plasmid pPB14 coding for the K229M point mutant was transformed and overexpressed in the *E. coli* BL21-SI (Invitrogen) strain. The enzyme was purified in a three step procedure consisting of an anion-exchange step (DEAE Sepharose Fast Flow), followed by a cation-exchange step (CM Sepharose Fast Flow), and then polished by size exclusion chromatography (Superdex™ 200, Amersham Biosciences).

FBP aldolase crystals were also grown using the hanging drop method, from a 1:1 mixture of protein solution (10mg/mL in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0) and precipitant solution (17.5 % polyethylene glycol 4000 in 0.1 M Na-HEPES, pH 7.5) (4,28).

Data Collection and Processing: Crystals of the K229M mutant of rabbit muscle FBP aldolase were soaked in FBP buffer (mother liquor plus 5 mM FBP) for 5 minutes. Crystals were then mounted in nylon cryoloops (Hampton Research) after brief immersion in cryoprotectant (soaking conditions plus 20% glycerol) and then immediately flash cooled in a nitrogen-gas stream at 100 K. Diffraction data was collected at beamlines X8C and X29 of the National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, NY). Data set for the unbound K229M mutant was also collected as control. Data indexing and integration was performed using HKL2000 (29) and the results are presented in Table I.

Molecular replacement and Refinement: Initial phases for bound and unbound K229M mutant were acquired by molecular replacement in Phenix (30) using the native enzyme structure determined previously as a search probe (Protein Data Bank code 1ZAH).

The structures of the K229M aldolase mutant were isomorphous with the native enzyme and belonged to space group P2₁. Structure refinement used all reflections having an $I/\sigma(I) > 1$, however electron density

maps were calculated to the resolution indicated in Table 1 to ensure at least ~90% completeness in the highest resolution shell with an $I/\sigma(I) \geq 2$.

After an initial round of rigid body refinement, the resulting structures were submitted to several rounds of TLS and ADP refinement with Phenix, and model building using Coot(31). Water molecules were gradually included during each refinement cycle by Phenix and manually near the end of refinement. Electron density maps were calculated with structure factor coefficients $2\|F_o\| - \|F_c\|$ and $\|F_o\| - \|F_c\|$.

The presence of ligand in the final models was confirmed by inspection of simulated annealing $\|F_o\| - \|F_c\|$ omit and kicked maps. Ligand modeling was carried out from interpretation of the electron density maps and using the elBOW program to generate ligand topology and parameter files (30). Difference electron density $\|F_o\| - \|F_c\|$ simulated annealing omit maps were computed in the final round of refinement and showed unambiguous binding in all four subunits of the K229M FBP aldolase structure. The electron density in subunits B and D allowed unambiguous continuous tracing of the cyclic FBP anomers bound in the active site while corresponding density in the remaining subunits was weaker and discontinuous.

Final model statistics, calculated with MolProbity (32), are shown in Table 1. Multiplicity-weighted R factors (30) as output by SCALA in CCP4 (33) are also shown in Table 1. The atomic coordinates and structure factors for the K229M mutant of FBP aldolase bound to cyclic FBP have been deposited to the Protein Data Bank (PDB # 5F4X, PDB # 5F4Y, respectively). The final structure models have R_{cryst} (R_{free}) values of 0.164 (0.198) and 0.191 (0.238), respectively. Errors in differences are reported as standard deviations hydrogen bond distances and positional and were estimated based on their value in each aldolase protomer unless specified otherwise. All figures were prepared using the program PyMOL (34).

The diastereoisomers, 3(*S*)-4(*R*)-psicose-P₂ and 3(*S*)-4(*S*)-sorbose-P₂ and 3(*R*)-4(*S*)-tagatose-P₂, were generated from the 3(*R*)-4(*R*)-FBP substrate with the program elbow and respective Schiff base intermediates and cyclic forms of diastereoisomers were built using the bound 3(*R*)-4(*R*)-FBP substrate as template. The modelled forms were inspected for close contacts and clashes with active site residues using the program Coot.

Structure Comparisons: Superpositions were performed with the PyMOL program and using the Ca coordinates of identical blocks of 166 residues for the TBP aldolase – rabbit muscle aldolase comparisons as reported previously (20). Root mean square (r.m.s.) deviations are given in Table II.

Cleavage Assay: The substrate cleavage rate for the FBP mutant aldolase was determined by measuring the decrease in A_{340}/min using a coupled assay (35). Aldolase ($\leq 1 \mu\text{g}$) was diluted in 50mM Tris-HCl, pH 7.5, and added to a cuvette containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.16 mM NADH, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ glycerol-3-phosphate dehydrogenase / triose-phosphate isomerase. Assays (0.5 mL) were performed in triplicate at 25°C following addition of enzyme. FBP aldolase concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm, with extinction coefficient value of $A = 0.98$ for 1 mg/mL. Activity of the K229M mutant was found to be diminished by 5 orders of magnitude compared to the native enzyme.

ITC studies: Calorimetric titrations were performed in duplicate on a MicroCal VP-ITC or an ITC200 calorimeter. All measurements were made at 25°C using degassed solutions. The proteins were dialyzed against 25 mM Tris-Acetate at pH 7.5. The measurement cell (1.4275 mL for the VP-ITC and 0.3 mL for the ITC200) contained the 50 μM aldolase solution and was titrated with the ligand solution in the same buffer, using twelve 8 μL injections for the VP-ITC and sixteen 3 μL injections for the ITC200. The stirring rate was kept at 372 rpm for all measurements. Ligand only was injected in buffer so as to account for the heat of dilution and mixing, and the resulting isotherm was subtracted from the enzyme data prior to analysis. Data was analyzed by means of a one-site model using the Origin software (version 7.0).

Footnotes:

The atomic coordinates and structure factors (code 5F4X and 5F4Y for the FBP aldolase K229M mutant from rabbit muscle) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

Research was supported by funding to JS from Natural Science and Engineering Research Council (Canada) and Canadian Institutes for Health Research.

Work was carried out in part at 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, and from the National Center for Research Resources of the National Institutes of Health. Assistance by beamline personnel, Drs D.K. Schneider, A. Soares, and H. Robinson, is gratefully acknowledged.

The abbreviations used are: TBP, tagatose-1,6-bis(phosphate); FBP, fructose-1,6-bis(phosphate); hexitol-P₂, hexitol-1,6-bis(phosphate); talitol-P₂, talitol-1,6-bis(phosphate); G3P, D-glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; TIM, triose phosphate isomerase; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; ITC, isothermal calorimetry

Results:

Crystal structures of cyclic FBP bound to mammalian class I FBP aldolase mutant K229M. The crystal structure of the K229M mutant was first determined to assess the impact on structural integrity by the mutation of the Schiff base forming residue. The unit cell of the mutated FBP aldolase was isomorphous to the native enzyme, and showed one tetramer per asymmetrical unit (4). Comparison of the free mutant structure with that of the native structure revealed no noteworthy structural changes, other than for the mutated residue, and the active site of the mutant aligned identically with that of the native FBP aldolase (r.m.s.d. < 0.2 Å for C α coordinates). To acquire insight into the substrate attachment geometry with the class I FBP aldolase prior to Schiff base formation, the structure of mutant K229M was determined in complex with FBP. The refinement of the K229M mutant structure in complex with FBP showed continuous electron density that could be interpreted in terms of the cyclic anomers bound in the active site of subunits B and D, shown in Figure 2A and 2B respectively. However in the active site of subunits A and C, the same electron density was found to be discontinuous, even though the densities of the phosphate oxyanion moieties were clearly visible. The binding of the cyclic anomers was consistent with the pentagonal shape of the electron density connected to two tetrahedral shaped electron densities that are characteristic of phosphate oxyanions. Which anomeric form was bound in subunit B and D was resolved by modeling either anomer in each active site and then using kicked and simulated-annealing omit electron density maps to assess which fit had the least discrepancy with the tested model. The interpretation of the electron density maps revealed that the β -anomer was bound in subunit B and the α -anomer was bound in subunit D of the aldolase tetramer and are shown as such in the panels of Figure 2. The binding mode of the α -anomer was inverted with respect to the β -anomer such that the P1 and P6 phosphate binding loci of the α -anomer coincided with P6 and P1 phosphate binding loci respectively of the β -anomer.

Binding by FBP in the K229M mutant structure induced similar conformational changes in the tertiary structure as were observed for the Schiff base intermediate formed with FBP of the native protein (4); differences based on C α coordinates between bound native and K229M mutant structures were slight even

in the two mobile regions (rmsd < 0.5 Å). Active site ligand binding induces conformational changes in two α -helical regions, residues 34-65 and residues 302-329, that serve to trap the P6 and P1 moieties in the active site, respectively. Contrary to the native enzyme, binding by FBP did not rigidify the tertiary structure but increased overall mobility as indicated by increase in B factors. The crystallization buffer used to crystallize the mutant affords full activity in the native enzyme indicating that the trapped cyclic forms are not artifacts of the crystallization conditions.

Anomeric forms of cyclic FBP. To validate the interpretation as to the identity of the anomeric forms bound in subunits B and D, the acyclic keto form of the substrate was built into the electron densities in the two subunits and the structures refined. The refinement indicated that the acyclic form could not be correctly positioned within the constraints of the electron density shapes calculated from kicked and simulated-annealing omit electron density maps. The largest discrepancy was due to the longer intramolecular length of the two phosphate oxyanions in the acyclic keto form that could not be accommodated relative to the cyclic forms of FBP. In all four subunits, the electron density maps displayed no continuous electron density extending from the mutated residue Met229 to the substrate, as was expected, corroborating the inability of mutant K229M to form a Schiff base intermediate.

Refinement indicated partial occupancies of 0.85 for the α -anomer and 0.75 for the β -anomer. Water molecules present in the active site of the unbound structure and displaced by the anomers were used as alternate conformations and refined to account for the remaining occupancies. Both anomers refined with high B-factors compared to their interacting side chains indicating considerable mobility or positional disorder by the bound anomers. Except for the C2 hydroxyls, the two anomers exhibited very similar binding geometries.

The two anomers engage in very similar interactions with active site residues by their phosphate oxyanions that include Ser35, Ser38, and Lys107 for the P6 phosphate binding loci and Ser271, Gly272, and Arg303 in case of the P1 phosphate binding loci, shown in Figure 2A and 2B. Additional interactions made by the P1 phosphate in the Schiff base intermediate with backbone amides of Arg303 and Gly302 are absent (4). The furanose ring engages in only two interactions in case of the β -anomer (Fig. 2A), the C3

hydroxyl hydrogen bonds with Asp33 while the bridging oxygen O5 makes a hydrogen bond with conserved water molecule W1 that in turn hydrogen bonds Glu187 and Arg148. W1 engages in an additional hydrogen bond with conserved water molecule W2 that is positioned through hydrogen bonding with Glu189 and an oxygen of the phosphate oxyanion. In the α -anomer, additional interactions are made by the C2 hydroxyl with Lys107 and Lys146. The cyclic forms of FBP make at least four fewer interactions compared to the Schiff base intermediate in the native enzyme and not counting the covalent bond formed between the C2 and Lys229 Nz atoms. The reduced number of active site interaction is not inconsistent with greater active site mobility or positional disorder by the anomers. Similarly, the two fewer interactions made by the β -anomer is consistent with its higher B-factor and hence positional disorder compared to the α -anomer. Active site binding expelled a total of 10-12 water molecules per bound anomer into the bulk solvent.

Isothermal calorimetry experiments. The interaction of ligands FBP and TBP with the mutant K229M was examined by ITC to assess whether the two C4 epimers differed in their binding affinity. ITC allows, in one experiment, the determination of the association/dissociation constants, enthalpy, and stoichiometry of binding. The ΔG° of binding may be calculated using the relationship $\Delta G^\circ = -RT \ln K$, where R is the gas constant, T is the temperature, and K is the association constant. The entropy of binding ΔS° is then calculated from $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$.

The ITC data for binding affinity of FBP and TBP to the catalytically incompetent aldolase are summarized in Table II. The data were fitted best to a model that specifies sub-micromolar binding to a single set of sites and showed very similar affinities for FBP and TBP. The binding isotherm and the fitted data for binding of FBP and TBP to the K229M mutant aldolase are shown in Figure 3A and 3B. Surprisingly, the binding data to mammalian FBP aldolase consistently exhibited a small positive unfavorable ΔH° of binding for the both ligands that was compensated by a very large favorable ΔS° . Small unfavorable enthalpy changes characterize weak active site interactions made by FBP and TBP with the K229M mutant. The sub-micromolar dissociation constant is thus a consequence of the very large favorable ΔS° indicating that the binding affinity is largely entropically driven (36).

Modeling of cyclic diastereoisomer. The modeling of the uncleavable diastereoisomers in β -anomeric form onto the β -anomer of FBP is shown in Figure 5A to 5D for 3(*S*)-4(*R*)-FBP, 3(*R*)-4(*R*)-psicose-P₂, 3(*R*)-4(*S*)-sorbose-P₂ and 3(*S*)-4(*S*)-tagatose-P₂. Inspection revealed a close contact of 2.5 Å made by the C3 hydroxyls of the 3(*R*) epimers with Ala31, indicated in Figure 5B and 5C, and which could not be relieved without disrupting the interaction between the bridging oxygen O5 with water molecule W1 and C2 hydroxyl with Lys229. In case of the 4(*S*) epimers, the C4 hydroxyl made a symmetric but repulsive interaction with the Asp33 carboxylate oxygens. The close approach of the O4 oxygen with each of the Asp 33 carboxylate oxygens (2.4 Å) although favorable for hydrogen bonding with one carboxylate oxygen would create a repulsive interaction between the lone pairs of the O4 and those of other carboxylate oxygen, and can be seen in Figure 5D. The repulsive interaction could not be relieved without disrupting the interaction between the bridging oxygen O5 with water molecule W1. The modeling of the same uncleavable diastereoisomers in α -anomeric form onto the α -anomer of FBP was also attempted (not shown) and resulted in close contacts by the 3(*R*) epimer with Ala31 and the same repulsive interaction as before by the C4 hydroxyls of the 4(*S*) epimers with the Asp33 carboxylate oxygens. The active site in mammalian FBP aldolase induces binding geometries of the uncleavable diastereoisomers that differ with respect to the 3(*S*)-4(*R*)-FBP cyclic diastereoisomeric forms, show as comparison in Figure 5A.

Discussion:

Bisphosphorylated hexoses can exist in three different forms: the acyclic, open form, and two cyclic configurations, α and β . The mammalian FBP aldolase uses both acyclic keto and β form at the same rate (3). Pre-steady state kinetics experiments with the mammalian enzyme are consistent with the enzyme forming a Schiff base intermediate from the β -anomer (27) indicating that the enzyme catalyzes FBP decyclization from the β -anomer. The enzyme also uses the FBP α -anomer, albeit at the slower rate, after its interconversion to the acyclic ketose or β -anomer, which is consistent with an unproductive binding mode by the α -anomer on the enzyme (2, 27). The trapping of both α and β anomers in different subunits with similar occupancies may be unrepresentative as the mutation of Lys229Met abrogates the interaction of the C2 hydroxyl in the β -anomeric form with Lys229 and thus skews the binding preference by the enzyme.

Ring-opening mechanism. The trapping of FBP in both cyclic forms in the active site of the mammalian class I aldolase afforded the unique opportunity to examine in atomic detail the furanose ring opening mechanism of this enzyme. In the non-enzymatic opening of a hemiacetal ring to an open-chain aldehyde, reversible protonation and deprotonation of the substrate is facilitated by acid-base catalysis. The conversion of the cyclic FBP into the acyclic keto form in the context of an enzymatic reaction then requires proton donation to the bridging oxygen O5 to open the furanose ring and proton removal from the ring C2 hydroxyl to assist in aldehyde formation. In the crystal structure, O5 makes a single interaction (~ 2.9 Å) with conserved water molecule, W1, in both anomers and activation of W1 by proton transfer from Glu187 suggests W1 as the general acid responsible for the protonation of O5. Indeed, Glu187 plays multifunctional roles in FBP aldolase by promoting proton transfers in elementary steps in the cleavage mechanism (4, 37). In the β -anomer, the most likely base responsible for proton abstraction of the C2-OH proton is not the catalytic lysine 229: when modelled onto the Met 229 Lys229 would make a charged hydrogen bond with the furanose C2 hydroxyl (see Figure 2A and 2B). Lys229 would preferentially bind and stabilize the anomeric oxygen of the β -anomer in the active site. Glu187, which is within hydrogen bonding distance of

the C2 hydroxyl, and could transfer the proton from the C2 hydroxyl to W1, allowing the reaction to proceed, is the most likely candidate. The proposed mechanism is consistent with a productive binding mode by β -anomer that enables enzymatic catalysis of ring opening or decyclization.

In the α -anomer, Lys146 by virtue of its interaction with the anomeric oxygen, would preferentially bind and stabilize the α -anomer in the active site. Different from the β -anomer, Glu187 in the α -anomer however is not within hydrogen bonding distance of the C2 hydroxyl. From the pre-steady state kinetics data, the binding mode of the α -anomer with the enzyme is unproductive with respect to catalysis of ring opening (27). Taken together, this suggests that in order for ring opening to occur, the proton transfer step mediated by Glu187 from the C2 hydroxyl is requisite. The reaction mechanism thus implicates sequential proton transfers mediated by Glu187 from the C2 hydroxyl to W1 thereby allowing W1 to act as a general acid onto O5. The ammonia group on Lys229 stabilizes the transient negative charge developed on the C2 hydroxyl subsequent to proton transfer, which accelerates ring opening.

Our mechanism differs from the ring opening mechanism that was proposed by Lorentzen *et al* based on a structure of a double mutant of an archaeal class I FBP aldolase from *T. tenax* (38). The Trp144Glu/Tyr146Phe mutant protein, seemingly impaired in the ring-opening mechanism, trapped the β -anomer of FBP in its active site: the C2-OH group was hydrogen bonded to the Schiff base-forming Lys177, while the bridging O5 of the furanose ring interacted with the P1 phosphate oxyanion through a water molecule. It was hence proposed that the ring-opening of FBP was enzyme catalyzed *via* proton abstraction from the C2-OH group by the catalytic lysine, whilst protonation of the bridging oxygen was promoted by the P1 phosphate oxyanion through a water molecule by intramolecular catalysis. The salient difference is that the activation of the water molecule in the model by Lorentzen *et al* implicates the phosphate oxyanion, while our proposed mechanism implicates Glu187. In order for the catalytic Lys177 in *T. tenax* aldolase to be a candidate for abstraction of the β -anomeric proton, it requires that the ammonium group of Lys177 be deprotonated in order to make the subsequent nucleophilic attack on the acyclic FBP. However, there appears to be no proton transfer mechanism apparent capable of performing the task of deprotonation of Lys177 (38). In this structure, a potential crystallization artefact resulting in an unproductive binding mode

by the cyclic FBP anomer cannot be ruled out given the acidic crystallization conditions pH 5.0 (39). Under these conditions, lysine residues would be fully protonated, carboxylates of Asp and Glu residues at least partially protonated, while the P1 phosphate would be present as a monanion capable of acting as a proton donor. Lys177 would make a charged hydrogen bond with the anomeric oxygen under this conditions rather than a weaker hydrogen bond, were Lys177 in its nucleophilic form, and which could result in artifactual stabilization of the observed configuration of cyclic FBP. In our proposed mechanism, it is Glu187 that mediates proton transfer from the C2 hydroxyl in the mammalian enzyme and not Lys229. Although the pKa of Lys229 has not been firmly established, the Coulomb interaction of Lys229 with Glu187 would tend to stabilize the charged form of Lys229, favouring a role for Lys229 intransient charge stabilization. The stronger active site attachment by the charged Lys229 with the anomeric oxygen of the β -anomer enhances stabilization of a conformation competent for ring opening. A role by Glu187 of mediating proton transfers in the active site is coherent with crystallographic and enzymological evidence where in the covalent intermediate, Glu187 participates in step-wise proton transfers leading to Schiff base formation and substrate cleavage and appears capable of deprotonating Lys229 for nucleophilic attack (4, 19).

Substrate discrimination by unproductive binding. The isostructural docking of the uncleavable diastereoisomers into the active site using cyclic FBP as template results in steric conflicts independent of which anomeric form is used. The steric conflict arises from close contact made by the ligands with conserved active site residues, Ala31 and Asp33. The molecular architecture of the active site is highly conserved among class I FBP aldolase, suggesting that these two residues may be central in controlling diastereoisomeric discrimination in these aldolases. From a synthetic stereoselective perspective, Asp33, which plays a key role in charge stabilization of conserved active site residues Lys107 and Lys146, when mutated to Asn and having lost its negative charge, saw a diminished activity of ~ 2500 fold (16), suggesting that Asp33 mutants would be functionally handicapped and display poor synthetic activity. On the other hand, mutation of Ala31 to Gly, for instance, would not engender steric conflicts and the larger cavity created by loss of the methyl group would readily accommodate 3(*R*)-4(*R*) stereoisomers, opening a potential enzymatic route for synthesis of the rare sugar, 3(*R*)-4(*R*)-psicose-P₂, by this mutant.

The steric conflicts require the uncleavable diastereoisomers to adopt alternate active site configurations with respect to the 3(*S*)-4(*R*)-fructose-P₂ in order to maintain active site attachment. The alternate configurations however will not be competent for decyclization if these engender steric conflicts with active site residues Glu187 and/or Lys229, or if the resultant configurations, free of steric conflicts, exhibit an active site orientation no longer capable of sustaining proton transfers mediated by Glu187, charge stabilization by Lys229 or general acid catalysis by W1. The steric conflicts imply that substrate discrimination of the mammalian enzyme arises from steric conflicts with both anomeric forms of the unproductive diastereoisomers, and that the resolution of these steric conflicts results in a binding mode incompetent for ring opening.

Nature of ligand binding affinity. A salient feature of binding to the mutant aldolase is the number of water molecules solvating the active site, many of which are tightly engaged with active site residues. The binding of FBP expelled into the bulk solution 10 and 12 water molecules, respectively, from the binding interface in the active site of subunits B and D. The energetic consequences are a gain in entropy resulting in a favorable contribution to the binding entropy ΔS° and hence ΔG° (40). However, the dehydration of active site residues will diminish enthalpy, making an unfavorable, or positive, contribution to the binding enthalpy ΔH° . The large gain in entropy in the mutant aldolase, seen in the calorimetric data, offsets the positive unfavorable binding enthalpy, ensuring high binding affinity with the active site. However, the weak or few interactions made by FBP in the active site, are consistent with the relatively high mobility of the bound cyclic anomers in subunits B and D that is reflected by the electron densities of lower or fuzzier ‘resolution’ delineating the anomers. The discontinuous electron density in the active site of subunits A and C reinforce enhanced configurational disorder by the cyclic anomers in their binding site. Higher mobility is also observed by the entire structure upon active site binding, as reflected by higher B factors. Active site mobility is essential in order that the appropriate configurational rearrangements can take place during decyclization. Ring opening in the β -anomer requires the C4 hydroxyl in the cyclic form to migrate 5.5 Å, from facing Asp33 in the active site interior to facing outwards and interacting with Glu187 in the covalently bound acyclic structure. The migration is facilitated by the C4 hydroxyl and the bridging O5

making no direct interaction with active site residues in the β -anomer, resulting in a reduced energy barrier along the reaction coordinates during decyclization. Fewer active interactions are not inconsistent with greater positional disorder by the bound anomers indicated by the calorimetric data, and hence reduced definition of the electron density maps delineating the anomers bound in the active site.

The binding affinity of FBP to K229M is very similar to the inhibition constant reported for the competitive inhibitor hexitol-P₂, a substrate analogue, of 0.45 μ M with the native enzyme (4, 21). Hexitol-P₂ consists of an equal mixture of two diastereoisomers: 2(*R*)-mannitol-P₂ and 2(*S*)-glucitol-P₂ (41) and only 2(*R*)-mannitol-P₂ is found tightly bound in the crystal state of the native enzyme. The inhibition constant for mannitol-P₂ is however much weaker, with a value of $8.0 \pm 0.5 \mu$ M (42), when not pre-incubated with the native FBP aldolase, suggesting that mannitol-P₂ and by extension FBP in K229M may behave as a slow binding inhibitors. Slow binding behavior would similarly reconcile the apparent tight binding by TBP observed during calorimetry ($0.85 \pm 0.15 \mu$ M) with the mutant K229M and the weaker competitive inhibition against the native enzyme of $12.5 \pm 1.6 \mu$ M (4).

Attachment by the 4(*S*)-TBP epimer with the native mammalian enzyme shows only electron densities for the phosphate oxyanions (4). The furanose moiety is disordered and no additional electron density is observed extending beyond the Nz atom of Lys229 that is well defined in the electron density. The absence of Schiff base formation with Lys229 is consistent with cyclic anomer attachment while the completely disordered furanose moiety indicates higher positional disorder compared to the binding of the 4(*R*)-FBP cyclic epimer in the K229M mutant. The inability of the C4 hydroxyl in the cyclic form of TBP to resolve its steric clash with Asp33, indicated in Figure 5, would necessitate a change in its configuration with respect to that of the 4(*R*)-FBP cyclic epimer. From the crystallographic perspective, the resultant configuration(s) of TBP appear to preclude a configuration that is competent for decyclization, in agreement with the conclusion reached by the docking results.

Mammalian FBP aldolases appear to discriminate against particular diastereoisomers as substrates by promoting active site binding modes that are incompetent for ring opening and thus preventing their cleavage.

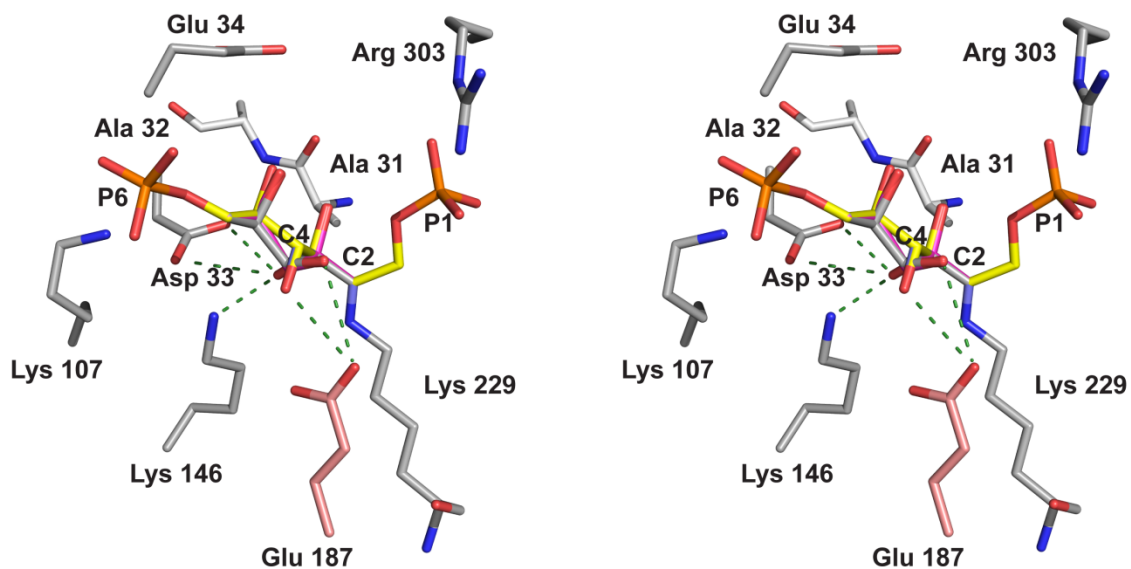


Figure 1A : Modeling of all four 3(*R/S*)-4(*R/S*) diastereoisomers fitted into the mammalian FBP aldolase active site. All four stereoisomers were modeled from the Schiff base structure of FBP aldolase with FBP (PDB code 1ZAI). FBP is in yellow, TBP in grey, sorbose-P₂ in magenta and psicose-P₂ in blue.

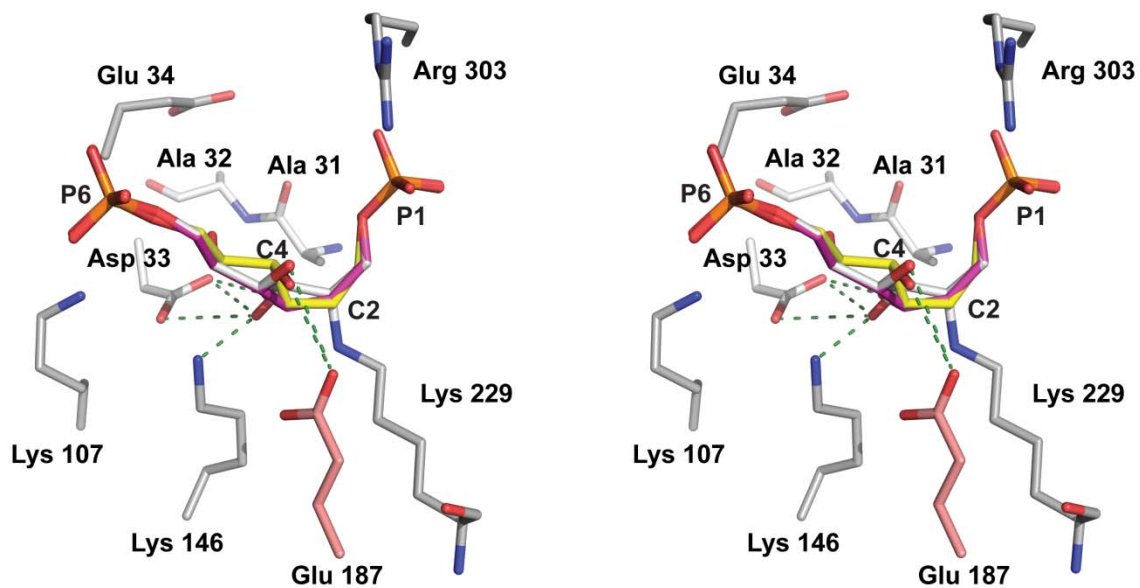
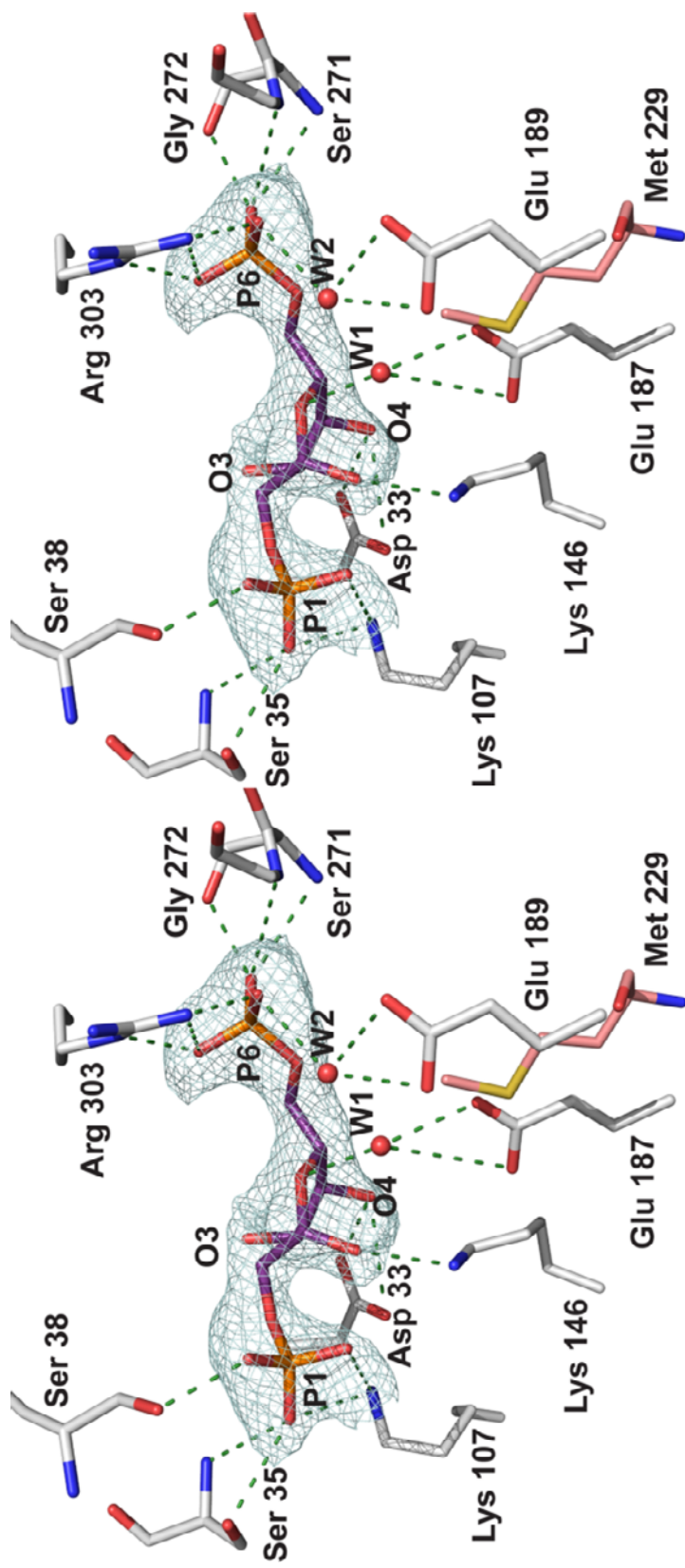


Figure 1B : Modeling of all four 3(*R/S*)-4(*R/S*) diastereoisomers fitted into the mammalian FBP aldolase active site. All four stereoisomers were modeled from the Schiff base structure of TBP aldolase with FBP. FBP is in yellow, TBP in grey, sorbose-P₂ in magenta and psicose-P₂ in blue.



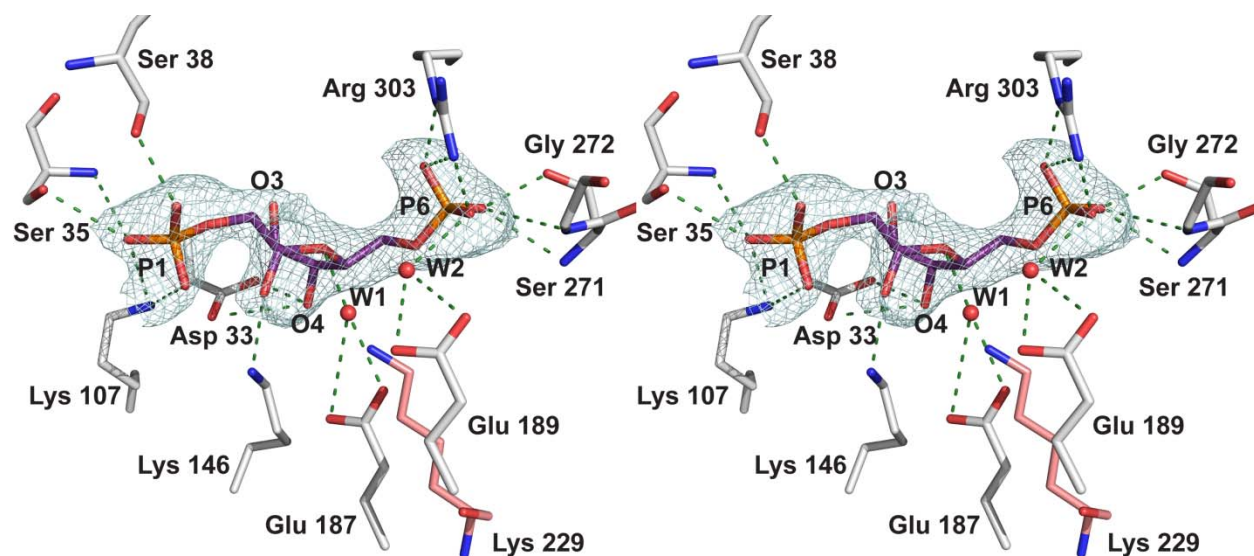
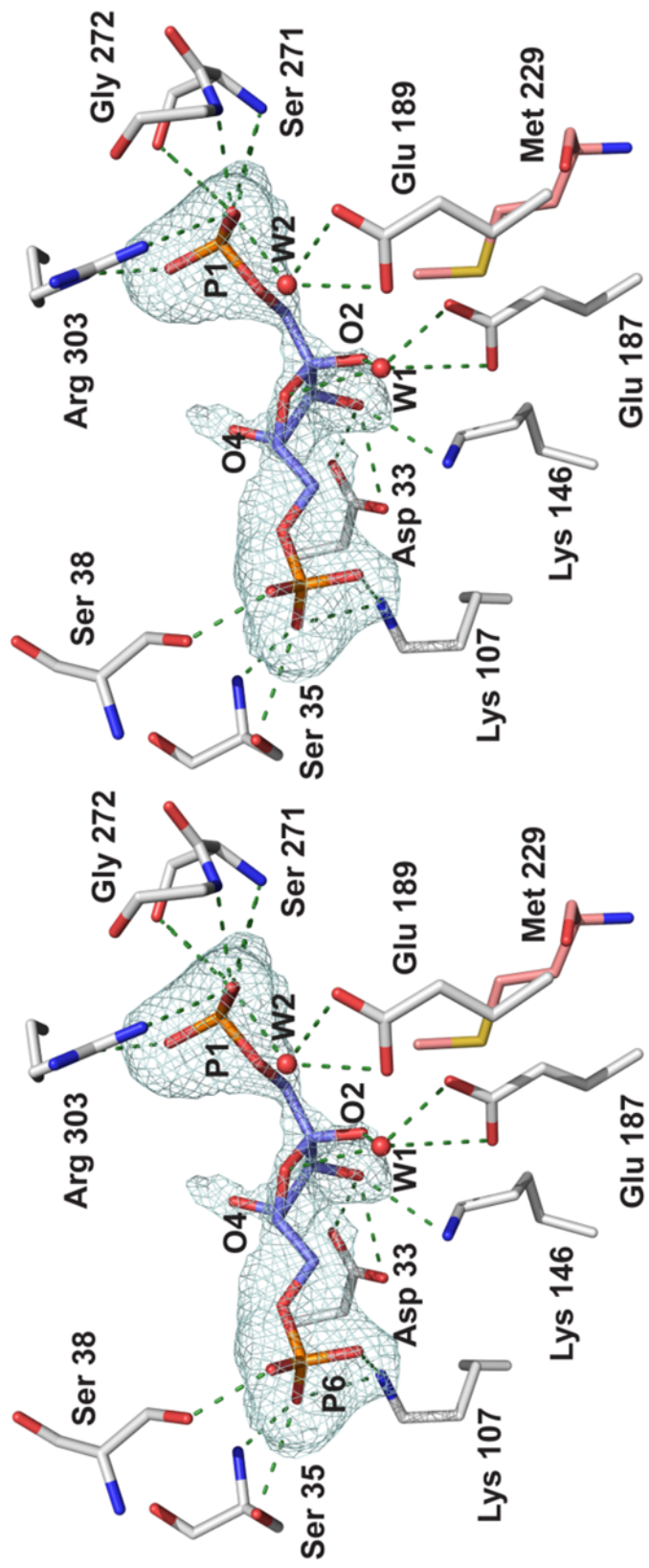


Figure 2A : α -anomer of FBP bound by mammalian class I FBP aldolase K229M mutant. A. The Met229 is represented. **B.** The Lys229 is modeled in the K229M mutant. Water molecule W1 makes contact (2.4 Å) with the bridging O5 oxygen of FBP and bonds also with Glu187. Difference electron density was calculated from a 2.03 Å simulated annealing *Fo-Fc* omit map contoured at 3 σ . The D subunit is represented. *Red spheres*: water molecules; *green dashes*: hydrogen-bonds.



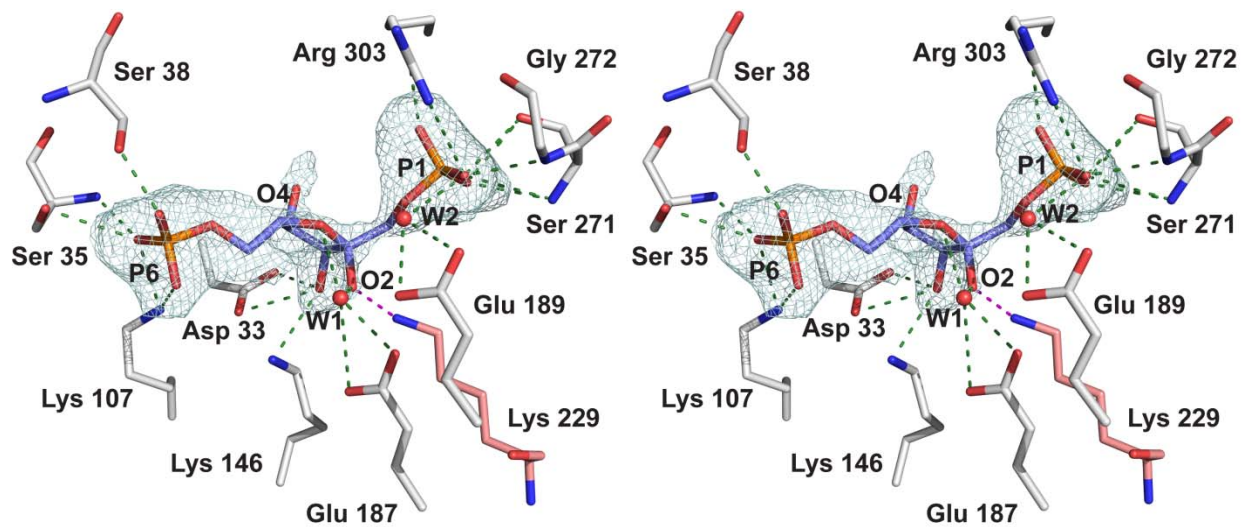


Figure 2B : β -anomer of FBP bound by mammalian class I FBP aldolase K229M mutant. A. The Met229 is represented. **B.** The Lys229 is modeled in the K229M mutant. Water molecule W1 makes contact (2.5 Å) with the bridging O5 oxygen of FBP and bonds also with Glu187. The modeled Lys229 binds to the furanose O2. Difference electron density was calculated from a 2.03 Å simulated annealing *Fo-Fc* omit map contoured at 3 σ . The B subunit is represented. *Red spheres*: water molecules; *green dashes*: hydrogen-bonds; *magenta dashes*: hydrogen bond between the modeled Lys229 and FBP O2.

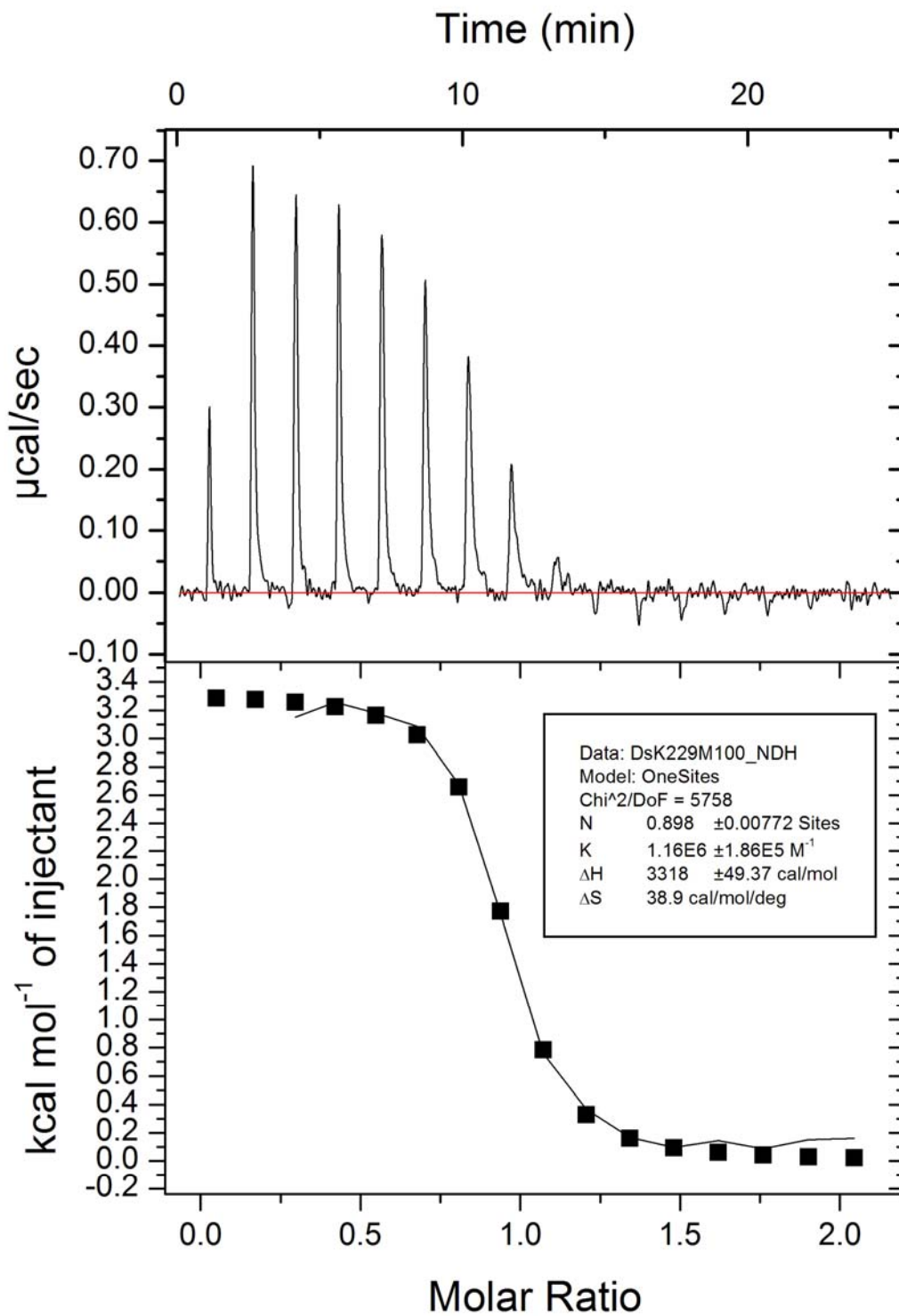


Figure 3.A : Isothermal titration calorimetry isotherm for the interaction of FBP with FBP aldolase K229M mutant.

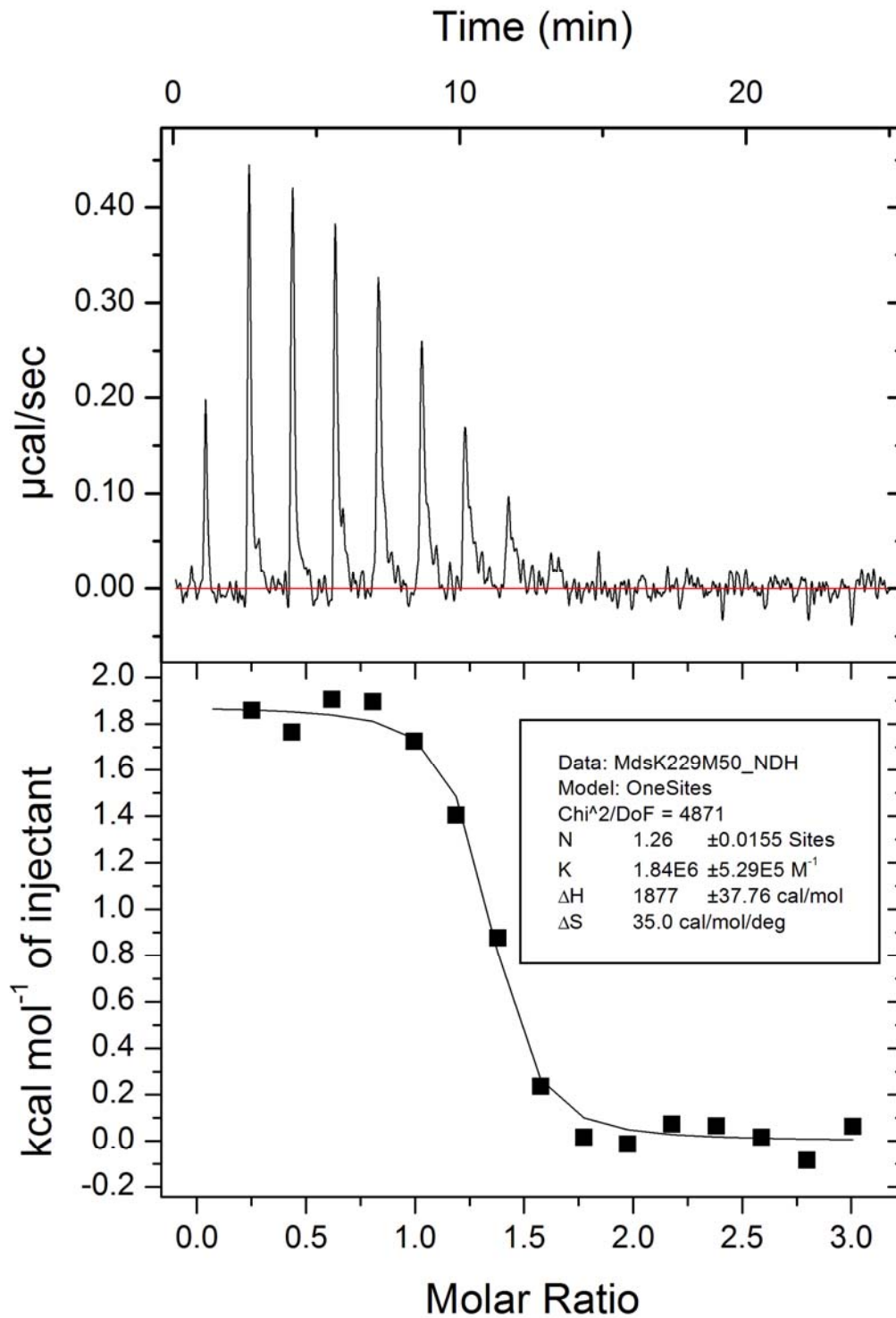
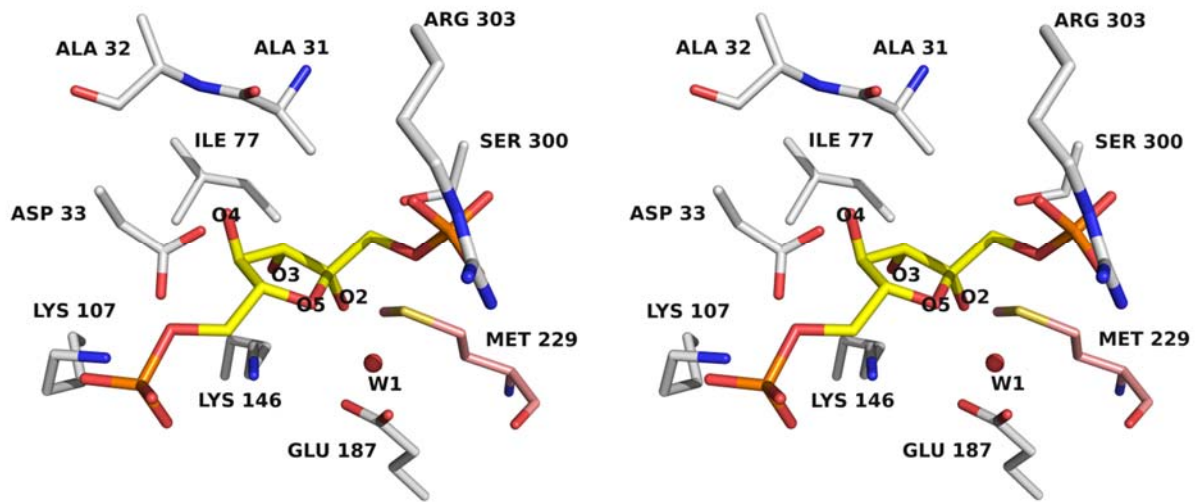
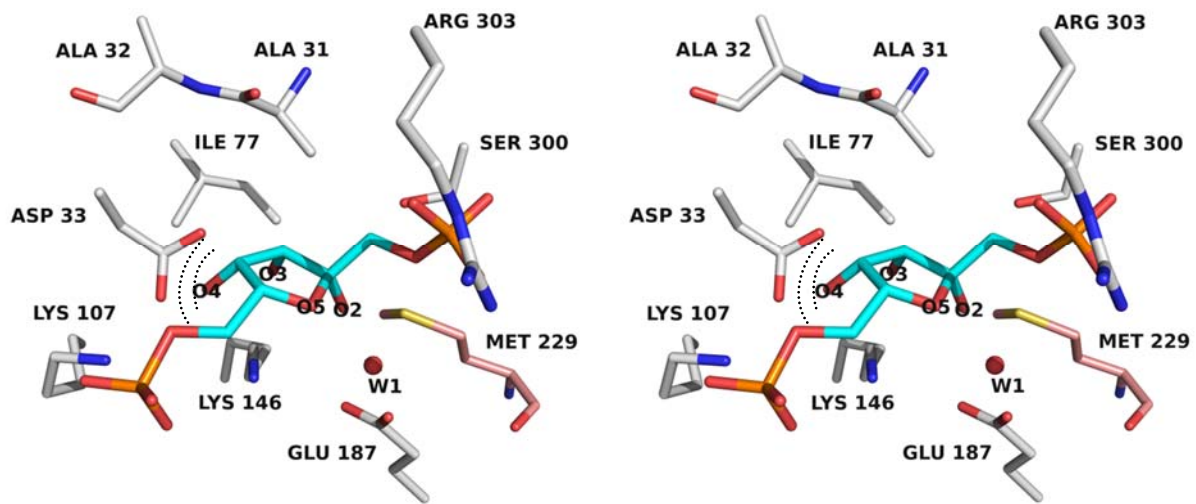


Figure 3.B : Isothermal titration calorimetry isotherm for the interaction of TBP with FBP aldolase K229M mutant.

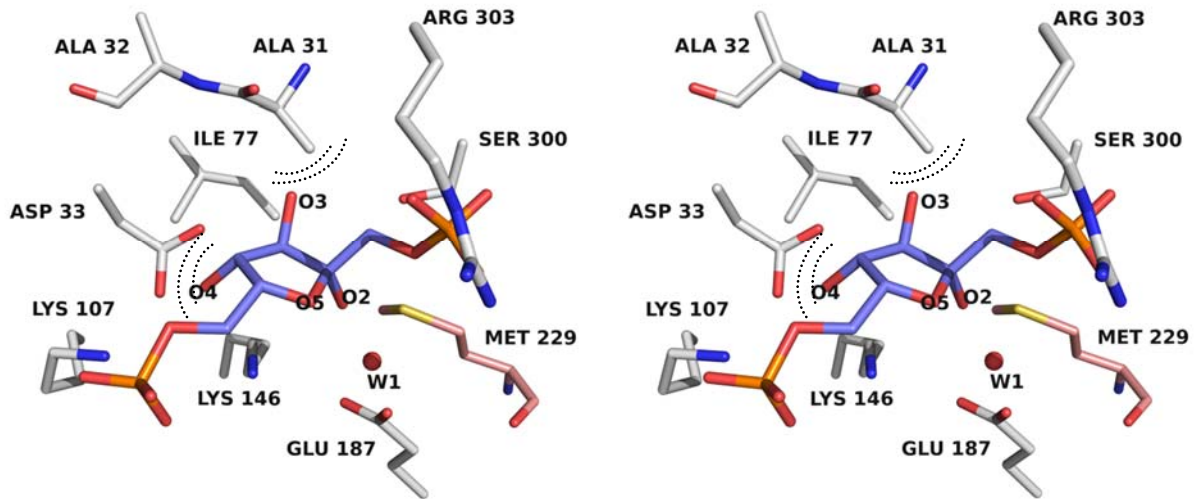
A.



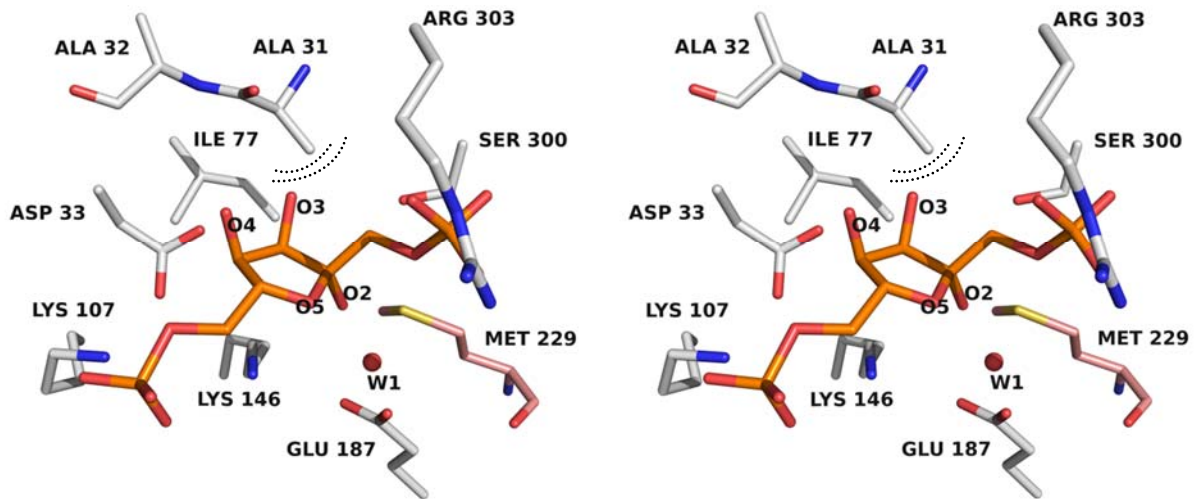
B.



C.



D.



E.

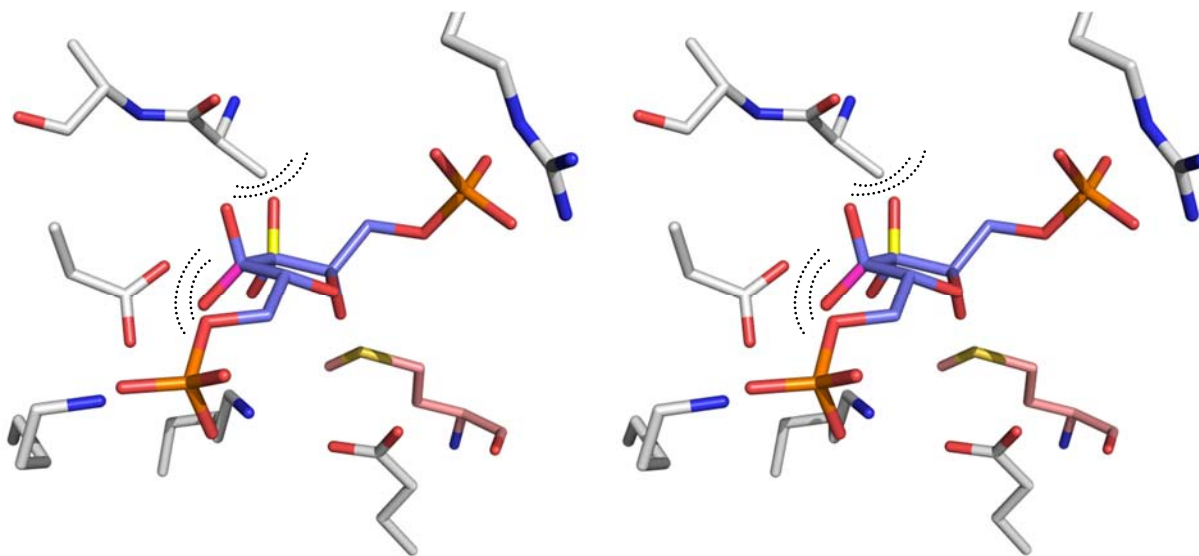


Figure 4 : Modeling of all four 3(*R/S*)-4(*R/S*) diastereoisomers, as cyclic β anomers, fitted into the mammalian FBP aldolase active site. A. FBP (yellow); B. TBP (blue); C. sorbose-P2 (blue) and D. psicose-P2 (orange) were modelled into the cyclic FBP trapped in the K229M mutant FBP aldolase. E. Overlay of all four stereoisomers. Steric clashes with Ala31 and Asp33 are represented as dashed arcs.

Table I : Data collection statistics for structures of FBP aldolase K229M mutant.

	Unliganded PDB ID 5F4X	FBP-bound PDB ID 5F4Y
Data collection		
Resolution	50-1.94 (2.04-1.87) ^a	50-2.03 (2.13-2.03)
Wavelength	0.9795	0.9795
Unique reflections	144212 (15756)	142361 (12153)
Completeness (%)	82.5 (74.8)	85.9 (74.1)
Average I/σ(I)	7.1 (1.4)	7.8 (2.9)
R _{sym} ^b	0.092 (0.513)	0.101 (0.326)
R _{pim} ^c	0.071 (0.419)	0.045 (0.186)
R _{meas} ^d	0.113 (0.650)	0.120 (0.440)
Unit cell parameters		
a(Å), b(Å), c(Å)	63.7, 106.2, 238.5	64.1, 108.2, 238.7
Refinement		
Number of atoms		
Protein	10248	10192
Water	2336	2597
Hetero	-	FBP atoms
Sigma cutoff; I/σ(I) >	1	1
R _{cryst} (%) ^e	17.5	16.1
R _{free} (%) ^d	21.8	19.9
Root mean square deviation		
Bond length (Å)	0.005	0.004
Bond angle (°)	0.929	0.869
Average B-factor (Å ²)	32.75	22.22
Ramachandran analysis^e (%)		
Favoured	96.3	97.1
Allowed	3.7	2.9

^a Values in parentheses are given for the highest resolution shell.

^b $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \bar{I}(hkl)| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ with i running over the number of independent observations of reflection hkl .

^c $R_{pim} = \sum_{hkl} \sqrt{(1/(n-1)) \sum_i (|I_i - I_{mean}|) / \sum_{hkl} \sum_i I_i}$

^d $R_{meas} = \sum_{hkl} \sqrt{(n/(n-1)) \sum_i (|I_i - I_{mean}|) / \sum_{hkl} \sum_i I_i}$

^e $R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_o(hkl) - |F_c(hkl)|| / \sum_{hkl} |F_o(hkl)|$

^f $R_{free} = \sum_{hkl \in T} |F_o(hkl) - |F_c(hkl)|| / \sum_{hkl \in T} |F_o(hkl)|$ where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. Test data set was not used throughout refinement.

^c Analyzed by MolProbability.

Table II: Parameters of binding of FBP, TBP, hexitol-P₂ and talitol-P₂ with K229M mutant FBP aldolase of rabbit muscle as determined by calorimetric titration (see Material and Methods section).

Ligand	n	K (L mol⁻¹)	ΔH (cal mol⁻¹)	ΔS (cal K⁻¹ mol¹)	TΔS (cal mol¹)	ΔG (cal mol⁻¹)
FBP	0.898± 0.0077	1.16*10 ⁶ ± 1.86*10 ⁵	3318±49.4	38.9	11.6*10 ³	-8274
TBP	1.26± 0.015	1.84*10 ⁶ ± 5.29*10 ⁵	1877±37.8	35.0	10.4*10 ³	-8553
Hexitol-P ₂	0.825± 0.022	9.45*10 ⁵ ± 2.87*10 ⁵	4134±153.4	41.2	12.3*10 ³	-8144
Talitol-P ₂	1.39± 0.017	2.92*10 ⁶ ± 1.56*10 ⁶	1554±35.6	34.8	10.4*10 ³	-8816

References

- ¹Rose, I. The absolute configuration of dihydroxyacetone phosphate tritiated by aldolase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 1958 **80**: 5835-5836.
- ²Rose IA, Rieder SV. Studies on the mechanism on the aldolase reaction; isotope exchange reactions of muscle and yeast aldolase. *J Biol Chem* 1958 **231**: 315-329.
- ³Rose IA, O'Connell EL. Specificity of fructose-1, 6-P₂ aldolase (muscle) and partition of the enzyme among catalytic intermediates in the steady state. *J Biol Chem* 1977 **252**(2): 479-482.
- ⁴ St-Jean M, Lafrance-Vanasse J, Liotard B, Sygusch J. High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22; **280**(29):27262-70.
- ⁵St-Jean M, Sygusch J. Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem* 2007 **282**: 31028-31037.
- ⁶ St-Jean M, Izard T, Sygusch J. A hydrophobic pocket in the active site of glycolytic aldolase mediates interactions with Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J Biol Chem.* 2007 May 11; **282**(19):14309-15.
- ⁷ Wang J, Morris AJ, Toland DR, Pagliaro L. The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *J Biol Chem.* 1996 Mar 22; **271**(12):6861-5.
- ⁸ Kroth PG, Schroers Y, Kilian O. The peculiar distribution of class I and class II aldolases in diatoms and in red algae. *Curr Genet.* 2005 Dec; **48**(6):389-400.
- ⁹ Dawson NJ, Biggar KK, Storey KB. Characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase during anoxia in the tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*: an assessment of enzyme activity, expression and structure. *PLoS One.* 2013 Jul 18; **8**(7):e68830. doi: 10.1371/journal.pone.0068830.
- ¹⁰ Fessner WD, Helaine V. Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Dec; **12**(6):574-86. Review.
- ¹¹ Castillo JA, Calveras J, Casas J, Mitjans M, Vinardell MP, Parella T, Inoue T, Sprenger GA, Joglar J, Clapés P. Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays. *Org Lett.* 2006 Dec 21; **8**(26):6067-70.
- ¹² Bolt A, Berry A, Nelson A. Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry. *Arch Biochem Biophys.* 2008 Jun 15; **474**(2):318-30. Review.
- ¹³ Clapés P, Fessner WD, Sprenger GA, Samland AK. Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Curr Opin Chem Biol.* 2010 Apr; **14**(2):154-67. Review.
- ¹⁴ Clapés P, Garrabou X. (2011). Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases. *Advanced Synthesis & Catalysis.* **353**(13): 2263-2283
- ¹⁵ Richards OC, Rutter WJ. Comparative properties of yeast and muscle aldolase. *J Biol Chem* 1961 **236**: 3185-3192
- ¹⁶ St-Jean M, Blonski C, Sygusch J. Charge stabilization and entropy reduction of central lysine residues in fructose-bisphosphate aldolase. *Biochemistry.* 2009 Jun 2; **48**(21):4528-37.
- ¹⁷Bissett DL, Anderson RL. Lactose and D-galactose metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 1980 **255**: 8750-8755
- ¹⁸ LowKam C, Liotard B, Sygusch J. Structure of a class I tagatose-1,6-bisphosphate aldolase: investigation into an apparent loss of stereospecificity. *J Biol Chem.* 2010 Jul 2; **285**(27) :21143-52.
- ¹⁹Maurady A, Zdanov A, de Moissac D, Beaudry D, Sygusch J. A conserved glutamate residue exhibits multifunctional catalytic roles in D-fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *J Biol Chem.* 2002 Mar 15; **277**(11):9474-83.
- ²⁰ LowKam C, Liotard B, Sygusch J. Non-Stereospecific substrate cleavage by Tagatose-Bisphosphate Class I Aldolase: A conserved catalytic mechanism responsible for both 4(R)-fructose-P₂ and 4(S)-tagatose-P₂ cleavage. *J Biol Chem.* Submitted
- ²¹ Midelfort CF, Gupta RK, Rose IA. Fructose 1,6-bisphosphate: isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases. *Biochemistry.* 1976 May 18; **15**(10):2178-85.

-
- ²² Pierce J, Serianni AS, Barker R. Anomerization of furanose sugars and sugar phosphates. *J Am Chem Soc* 1985 **107**(8): 2448-2456.
- ²³ Schray KJ, Fishbein R, Bullard WP, Benkovic SJ. The anomeric form of D-fructose 1,6-bisphosphate used as substrate in the muscle and yeast aldolase reactions. *J Biol Chem*. 1975 Jul 10;**250**(13):4883-7.
- ²⁴ Koerner TA Jr, Cary LW, Bhacca NS, Younathan ES. Tautomeric composition of D-fructose phosphates in solution by Fourier transform carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973 Apr 2;**51**(3):543-50.
- ²⁵ Benkovic SJ, Engle JL, Mildvan AS. Magnetic resonance studies of the anomeric distribution and manganese binding properties of fructose phosphates. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972 May 26;**47**(4):852-8.
- ²⁶ Gray GR. An examination of D-fructose 1,6-diphosphate and related sugar phosphates by fourier transform 31 P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*. 1971 Dec 7;**10**(25):4705-11.
- ²⁷Choi, KH, Tolan DR. Presteady-State Kinetic Evidence for a Ring-Opening Activity in Fructose-1,6-(bis)phosphate Aldolase. *J Am Chem Soc* 2004**126**(11): 3402-3403.
- ²⁸St-Jean M, Sygusch J. Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J.Biol.Chem* 2007 **282**: 31028-31037.
- ²⁹Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*.1997 **276**: 307-326.
- ³⁰Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung LW, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002 Nov; **58** (Pt 11):1948-54.
- ³¹Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Dec; **60**(Pt 12 Pt 1):2126-32.
- ³² Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB 3rd, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jul;**35**(Web Server issue):W375-83
- ³³ Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011 Apr;**67**(Pt 4):235-42.
- ³⁴ DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web.2002<http://www.pymol.org>
- ³⁵Racker E. Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity. *J Biol Chem*. 1947 Mar;**167**(3):843-54.
- ³⁶ Leavitt S, Freire E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol*. 2001 Oct;**11**(5):560-6. Review.
- ³⁷Maurady A, Zdanov A, de Moissac D, Beaudry D, Sygusch J. A conserved glutamate residue exhibits multifunctional catalytic roles in D-fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *J Biol Chem*. 2002Mar 15;**277**(11):9474-83.
- ³⁸ Lorentzen E, Siebers B, Hensel R, Pohl E. Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry*. 2005 Mar 22;**44**(11):4222-9.
- ³⁹ Lorentzen E, Pohl E, Zwart P, Stark A, Russell RB, Knura T, Hensel R, Siebers B. Crystal structure of an archaeal class I aldolase and the evolution of (beta alpha)₈ barrel proteins. *J Biol Chem*. 2003 Nov 21;**278**(47):47253-60.
- ⁴⁰Dunitz JD. The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules. *Science*. 1994 Apr 29; **264**(5159):670.
- ⁴¹Ginsburg A, Mehler AH. Specific Anion Binding to Fructose Diphosphate Aldolase from Rabbit Muscle.*Biochemistry*1966**5**, 2623-2634.

⁴² Mabila-Bassiloua CG, Arthus-Cartier G, Hannaert V, Th  risod H, Sygusch J, Th  risod M. Mannitol Bis-phosphate Based Inhibitors of Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolases. *ACS Med Chem Lett.* 2011 Sep 3;2(11):804-8.

CHAPITRE 4: Discussion et conclusions

Résumé : Nos recherches nous ont permis de découvrir que la TBP aldolase de *S. pyogenes*, peu stéréospécifique, était en fait capable de cliver les quatre isomères FBP, TBP, sorbose-P₂ et psicose-P₂ grâce à un même résidu Glu, conservé à travers de nombreuses espèces aussi dissimilaires et éloignées que des bactéries Gram positive, des *archae* ou des mammifères. Nous avons également relevé que la spécificité sévère de la FBP aldolase de mammifère serait en fait due à une incapacité à accommoder et surtout à décycliser les différents stéréoisomères du FBP, et ce du fait d'encombrements stériques provoqués par Ala31 et Asp33.

Nous avons entamé notre étude du mécanisme de la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de *Streptococcus pyogenes* en déterminant la structure native de l'enzyme et celle complexée à son substrat à trois carbones le DHAP. Les cinétiques de transfert de proton réalisées en conjonction avec l'étude structurale ont permis d'établir que l'enzyme, qui est capable de synthétiser les quatre stéréoisomères 3(*S*)-4(*R*)-fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 3(*S*)-4(*S*)-tagatose-1,6-bisphosphate (TBP), 3(*R*)-4(*S*)-sorbose-1,6-bisphosphate et 3(*R*)-4(*R*)-psicose-1,6-bisphosphate, ne pouvait démarquer que le côté pro-(*S*) du DHAP tritié. La formation des isomères 3(*R*) nécessite pourtant l'attaque du côté pro-(*R*) du DHAP déprotonné sur le G3P. Notre analyse de la structure de l'enzyme native et liée au DHAP nous a permis de postuler un isomérisme *cis-trans* autour du lien C2-C3 de l'intermédiaire covalent, qui ainsi isomérisé en solution après

déprotonation en C3, pourrait attaquer le G3P à partir des deux faces *si* et *re* de l'intermédiaire aldolase-DHAP. La présence d'une molécule d'eau conservée à proximité du C3 de l'intermédiaire à caractère carbanionique laisse suggérer un rôle de cette molécule de solvant dans le transfert de proton.

La résolution des structures de la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de *Streptococcus pyogenes* native et mutée en complexe avec ses substrats FBP et TBP a permis de déposer dans la *Protein Data Bank* les structures tridimensionnelles d'une TBP aldolase de classe I exhibant un intermédiaire covalent en son site actif. Les structures de la TBP aldolase native et du mutant Glu163Gln en complexe avec les deux inhibiteurs hexitol-P₂ et talitol-P₂ ont également été résolues et sont rapportées au Chapitre 2. Les cinétiques en fonction du pH réalisées sur l'enzyme native de même que sur le mutant ont permis de désigner le résidu Glu163, équivalent du Glu187 dans la FBP aldolase de mammifère, comme responsable de l'abstraction du proton OH du C4 de l'intermédiaire enzyme-hexose menant au clivage du lien C3-C4.

En outre, la liaison de la TBP aldolase avec les quatre composés 3(*S*)-4(*S/R*) utilisés dans cette étude nous ont permis de confirmer que la TBP aldolase ne discrimine pas les substrats/inhibiteurs au niveau de leur hydroxyle. En effet, chaque composé est capable de lier la TBP aldolase de façon presque isostérique, avec les sites de liaison aux deux phosphates comme « points d'ancrage » invariants. Nous avons constaté que la TBP aldolase pouvait lier également l'hexitol-P₂ et le talitol-P₂, ce dernier dans deux conformations alternatives, l'une comparable à celle adoptée par l'hexitol-P₂, le FBP et le TBP, et l'autre qui voit le phosphate P2 lier le site P1 de l'enzyme et *vice versa*.

Les expériences de calorimétrie isotherme effectuées sur la TBP aldolase et la FBP aldolase toutes deux natives ont de plus permis de déterminer qu'elles lient toutes deux le DHAP, l'hexitol-P₂ et le talitol-P₂ avec des affinités inégales, beaucoup plus grandes chez la FBP aldolase (μM) que la TBP aldolase (mM). Cette disparité a été confirmée par des expériences spectrophotométriques de détermination des K_i des deux inhibiteurs. De plus, elles le font de façon exothermique pour la TBP aldolase et endothermique pour la FBP aldolase et le ΔH° , l'enthalpie de liaison, est défavorable chez la FBP aldolase, alors que la contribution de l'entropie à l'énergie de liaison y est favorable. Les paramètres thermodynamiques de la TBP aldolase montrent eux une enthalpie et une entropie favorables, bien que beaucoup plus restreintes que pour la FBP aldolase. Ces inégalités de liaison, notamment des amplitudes de ΔH° et de ΔS beaucoup plus conséquentes chez la FBP aldolase que chez la TBP aldolase, pourrait avoir un lien avec la contribution des molécules d'eau du site actif à la liaison aux substrats ou inhibiteurs. En effet, les structures cristallographiques ont montré que celle-ci s'accompagne chez la FBP aldolase de l'expulsion de nombreuses molécules d'eau du site actif, alors qu'elle se fait chez la TBP aldolase *via* des molécules d'eau qui restent dans la cavité même après liaison du substrat ou inhibiteur. La solvation/désolvation du site actif pourrait donc expliquer en partie les inégalités d'affinité des deux enzymes à leurs substrats/inhibiteurs.

La taille respective des sites actifs de la TBP aldolase de *S. pyogenes* et de la FBP aldolase de mammifère apporte un premier élément de réponse quant au manque de spécificité de la TBP aldolase. En effet, il est d'environ 30 % plus volumineux chez la

TBP aldolase que chez la FBP aldolase, et peut accommoder le G3P dans diverses conformations, ce qui pourrait expliquer la façon dont le DHAP peut attaquer la face *si* et *re* de l'aldéhyde pour former les stéréoisomères 4(*S*) et 4(*R*). La structure cristallographique de la TBP aldolase en complexe avec le DHAP et le G3P montre d'ailleurs le G3P lié dans sa cavité mais présentant son carbonyle vers la sortie du site actif. Cette même structure permet de s'apercevoir que le G3P, grâce à une isomérisation autour de son C1-C2, pourrait former les deux stéréoisomères *cis* et *trans* et ainsi, en étant attaqué soit sur sa face *re* soit sur la *si* par le DHAP, générer les hexoses stéréoisomères en C4.

Le Chapitre 3 expose les résultats de la dernière partie de notre exploration de la TBP aldolase de *S. pyogenes*. Le mutant K205M, c'est-à-dire le changement du résidu responsable de la formation de la base de Schiff en méthionine, a été cristallisé. Sa structure libre de tout ligand, de même que ses complexes avec les inhibiteurs compétitifs hexitol-P₂ et talitol-P₂ ont été résolues. En parallèle, les structures du mutant K229M de la FBP aldolase de mammifère libre et lié au FBP ont été résolues. C'est la forme cyclique du FBP, ses deux anomères α et β , qui a été piégée au site actif des quatre monomères de l'unité asymétrique, dans une conformation qui évoque un rôle d'une molécule d'eau dans le mécanisme d'ouverture du cycle, et ce par catalyse acide. Glu163, encore, serait en position idéale pour activer cette molécule d'eau qui pourrait ensuite protonner l'O5 faisant le pont dans le cycle *via* activation par Glu187. Malgré tous nos efforts, le mutant équivalent chez la TBP aldolase, K205M, ne nous a pas permis de capter ni le FBP, ni le TBP, ni même le DHAP sous quelque forme que ce soit, au site actif de l'enzyme. Les données d'expériences d'ITC recueillies, et qui

montrent une grande différence d'affinité de la TBP aldolase pour le DHAP, l'hexitol-P₂ et le talitol-P₂ par rapport à la FBP aldolase, affinité qui est exothermique chez la TBP aldolase et endothermique chez la FBP aldolase, ont également signalé que K205M ne se liait ni au TBP, ni au FBP, ni même au DHAP dans les conditions de l'expérience, ce qui confirme les données cristallographiques obtenues. Nous avons relevé que les structures du mutant K205M de la TBP aldolase sont caractérisées par une rigidité des trois régions mobiles de la protéine, qui semblent dans ce mutant adopter la conformation fermée qui n'est observée dans la structure native que lorsqu'elle est liée à un de ses substrats/inhibiteurs. Le mutant de la FBP aldolase K229M, lui, s'est montré capable de liaison à tous les composés testés.

C'est l'analyse des structures obtenues des deux aldolases mutées sur leur lysine catalytique qui nous a permis de pointer du doigt une autre possible explication des différences entre les deux enzymes quant à leur stéréospécificité : alors que le site actif de la TBP aldolase native s'accommode très bien du *docking* du TBP, FBP, sorbose-P₂ et psicose-P₂ sous forme cyclique, celui de la FBP aldolase semble beaucoup moins conciliant et exhibe des encombrements stériques entre ses résidus et certains atomes du TBP, sorbose-P₂ et psicose-P₂ sous forme cyclique. C'est surtout Ala31 dont la chaîne latérale, bien que peu volumineuse, semble entrer en contact avec le C4-OH des composés 4(*S*). De même, Asp33 semble entraver le positionnement du C3-OH des substrats 3(*R*). Lorsque les formes acycliques de ces hexoses sont « dockées » dans le site actif de la FBP aldolase, sous forme d'intermédiaires covalents, aucun empêchement stérique ou géométrique n'est observé, et les quatre sucres

bisphosphorylés stéréoisomères peuvent être accommodés dans la cavité. L'ensemble de ces résultats permet de supposer que c'est en fait au niveau de la décyclisation du substrat, catalysé dans les deux aldolases par Glu187/Glu163 et une molécule d'eau conservée, que se ferait la discrimination de la FBP aldolase contre les isomères du FBP.

Mécanisme de clivage de la TBP aldolase de *S. pyogenes*.

Le cycle catalytique commence par la liaison de la TBP aldolase à l'anomère β du FBP ou du TBP (ou sorbose-P₂ et psicose-P₂). Celui-ci est présent à raison de 98 % sous forme cyclique en solution, et à 70-80 % sous sa forme β . Une fois le FBP/TBP cyclique présent dans le site actif, l'enzyme s'emploie, grâce à des molécules d'eau, à catalyser l'ouverture du cycle furanose par catalyse acide. Le lien intramoléculaire O5-C2 du FBP cyclique va ainsi être clivé *via* protonation de l'O5 par une molécule d'eau observée au site actif (Figure 39). La structure cristallographique d'une aldolase bactérienne liée au FBP cyclique suggérait déjà un rôle d'une molécule d'eau conservée au site actif dans le mécanisme d'ouverture du cycle (Lorentzen, 2005). Bien que cette structure envisageait un rôle de l'oxyanion phosphate dans l'activation de la molécule d'eau catalytique, il semble que nos structures indiquent préférentiellement Glu163 dans cette fonction. C'est encore Glu163, Glu187 dans la FBP aldolase de mammifère, qui déprotonnerait le O2 du FBP/TBP (Figure 37), ce que l'étude de Lorentzen *et. al* ne prévoyait pas et que le piégage du FBP cyclique au site actif du mutant K229M de la

FBP aldolase confirme. Lys205, rendue nucléophile grâce à un transfert de proton vers Glu163, peut ensuite attaquer nucléophiliquement le C2 du FBP/TBP acyclique. Glu163, dans un rôle multiple, doit donc être capable d'échanger continuellement son proton avec Lys205 et d'activer la lysine de façon à ce qu'elle puisse attaquer le C2 après la décyclisation amenée par l'abstraction du proton en O2 du FBP/TBP cyclique par le Glu. Le FBP/TBP acyclique est ensuite attaqué de façon nucléophile par la Lys205, ce qui conduit à la formation d'une carbinolamine transitoirement dipolaire. La protonation de l'O2 par Glu163 va permettre, *via* déshydratation de l'intermédiaire, de former l'intermédiaire iminium. À ce stade, la stéréochimie du substrat en son C4, *R* pour le FBP et *S* pour le TBP, n'est pas capitale pour le bon fonctionnement de l'enzyme quant au clivage de ces deux hexoses. En effet, son site actif peut accommoder les deux isomères et ne discriminer pas selon l'orientation de l'hydroxyle en C4, ou même C3 puisqu'il tolère le psicose-P₂ et sorbose-P₂. La formation de la base de Schiff/iminium protoné est ultimement effectuée afin de faciliter l'abstraction du proton de l'hydroxyle en C4, qui est rendu d'autant plus acide grâce au puit d'électrons du C2 de l'intermédiaire. C'est encore une fois Glu163 qui, en catalyseur basique cette fois, est capable d'abstraire le proton de géométrie à la fois *R* et *S*. En effet, nos structures cristallographiques montrent ce résidu à distance et orientation idéales pour ôter le proton OH-C4 des intermédiaires FBP- et TBP-enzyme.

Le lien C3-C4 une fois clivé par réarrangement des électrons, le G3P peut être libéré. La structure de la TBP aldolase en complexe avec le DHAP-G3P, que nous avons déjà résolue, montre le G3P lié dans sa cavité (celle du P2), mais dans une position non conductive à la formation ou au clivage immédiat du lien C3-C4 entre les deux

substrats, et qui pourrait indiquer le « trajet » réactionnel emprunté par le G3P quand il rentre/quitte le site actif.

Le DHAP est ensuite hydrolysé par le mécanisme inverse de la formation de l'intermédiaire covalent et peut, également, être relâché dans le milieu.

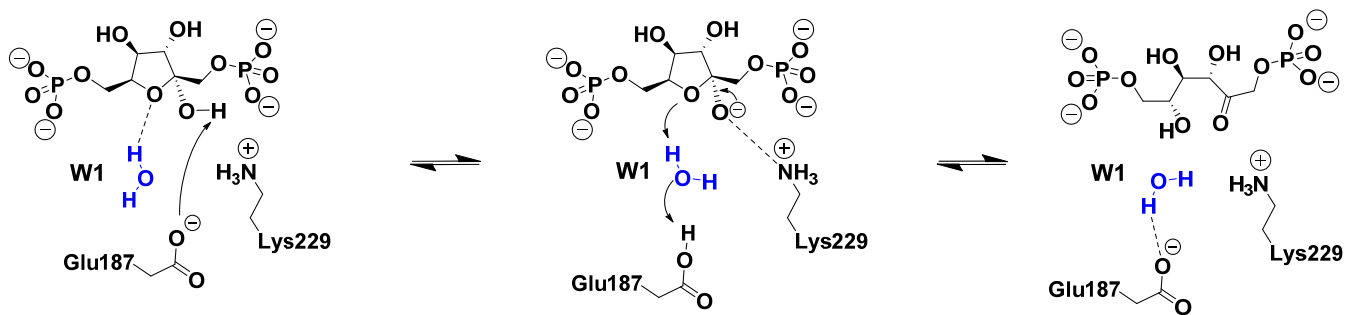


Figure 39 : Mécanisme de décyclisation catalysé par la FBP aldolase de mammifère. Glu187 (Glu163 dans la TBP aldolase), déprotonne l'hydroxyle du C2, et, au centre d'un transfert de protons avec une molécule d'eau conservée, protonne le O5 pour permettre l'ouverture du cycle.

Un mécanisme conservé ...

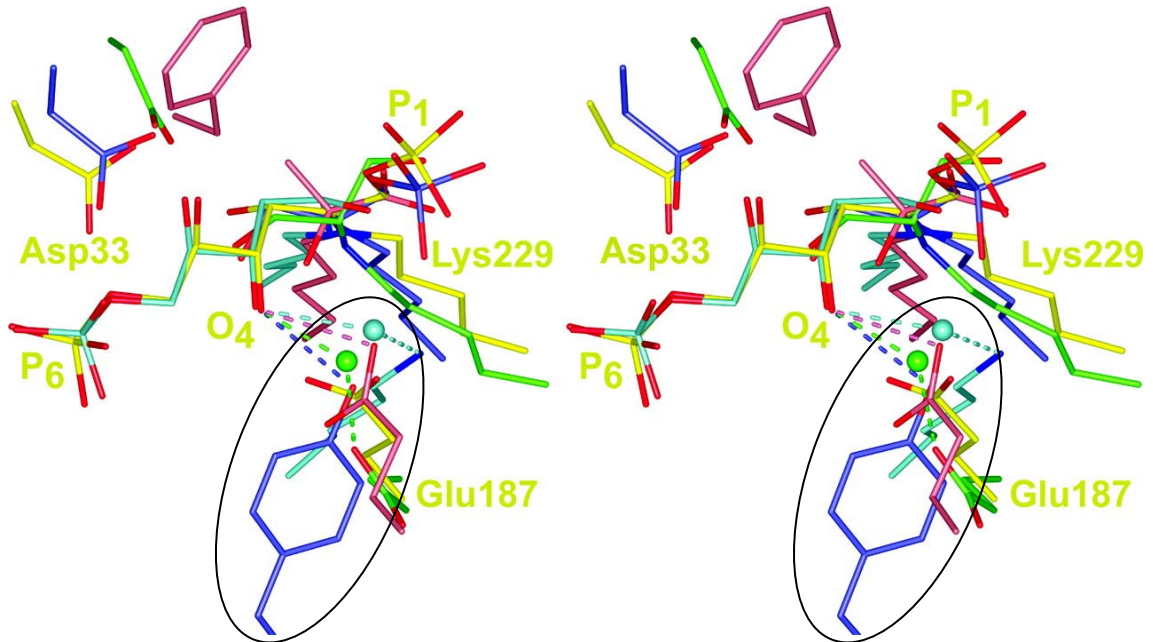


Figure 40 : Vue stéréo de la superposition des intermédiaires base de Schiff formés par diverses aldolase de classe I. En cyan, la D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) de *E. coli*; en vert, la transaldolase B de *E. coli*; en violet la FBP aldolase de *T. tenax*; en rose la KDPG aldolase de *E. coli*. La FBP aldolase de mammifère est en jaune et la TBP aldolase de *S. pyogenes* en bleu (St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005). Les résidus responsables de l'abstraction en C4-OH et du clivage sont entourés.

La superposition des structures de base de Schiff dans diverses aldolases de classe I, parmi lesquelles la D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) de *E. coli* (code *Protein Data Bank* 1JCJ), la transaldolase B de *E. coli* (code PDB 1UCW), la KDPG

aldolase, toujours d'*E. coli*, (code PDB 1EUA), avec celle de la TBP aldolase de *S. pyogenes* (code PDB 3MHF) est présentée Figure 40. Elle illustre la conservation du mécanisme de clivage en positionnant le C4-OH du substrat de chaque enzyme représentée face à un possible accepteur de proton, un Glu dans la plupart des cas, mais également une Tyr pour la FBP aldolase de *T. tenax* et une molécule d'eau coordonnée à une Lys pour la DERA de *E. coli*. Le mécanisme de clivage, essentiellement identique chez de nombreuses espèces, implique donc un résidu parfois différent, et semble indiquer une solution distincte quoique similaire trouvée par ces organismes à un problème commun (St-Jean, Lafrance-Vanasse et al. 2005).

Chez la TBP aldolase de *S. pyogenes*, comme de nombreuses autres espèces donc, le résidu responsable du clivage est un Glu, mais ce dernier est également à même d'abstraire le proton sur les deux stéréochimies possibles du C4.

... mais un site actif accommodant.

C'est donc le résidu Glu163, équivalent de Glu187 dans la FBP aldolase, qui semble être responsable du clivage des substrats 4(*S*) et 4(*R*) chez la TBP aldolase. Cette observation, surprenante et quelque peu décevante, permet de conférer le même rôle de catalyseur basique au même résidu chez la TBP et la FBP aldolase, bien que cette dernière ne puisse utiliser les substrats 4(*S*). Les sites actifs des deux enzymes étant très similaires, nous sommes obligés d'en déduire que de subtiles disparités entre les deux permettent à la TBP aldolase non seulement de lier les divers composés, ce que la FBP aldolase semble également être capable de faire au vu des expériences d'ITC, mais

surtout d'employer le mécanisme canonique des aldolases de classe I pour les cliver. Son site actif, moins « rigide » que celui de la FBP aldolase, permet à tous les substrats 3(*R/S*)-4(*R/S*) d'adopter une conformation *ad hoc* pour la déprotonation en C4-OH par Glu163. Il doit donc exister chez la FBP aldolase de mammifère un obstacle à une pareille malléabilité du mécanisme de clivage conservé chez les classes I, et la TBP aldolase ne serait pas tant une TBP aldolase qu'une FBP/TBP aldolase dégénérée. Nous proposons ici que cet obstacle chez la FBP aldolase se situe au niveau de l'ouverture du cycle furanose, et des recherches supplémentaires seront nécessaires pour confirmer nos propositions.

La taille de la cavité du site actif de la TBP aldolase de *S. pyogenes*, que ce soit son site de liaison au G3P comme celui au DHAP, permet d'ailleurs de commencer à comprendre son absence de spécificité dans le sens de la condensation, cette fois.

En effet, alors que la formation des isomères en C3 peut être expliquée par l'isomérisme *cis-trans* probablement possible autour du lien C2-C3 de l'intermédiaire enzyme-DHAP, ce qui permet à la face *si* comme *re* du DHAP de jouer le rôle de donneur de la réaction de condensation aldolique (LowKam, Liotard et al. 2010), c'est le volume relativement plus important du site de liaison au G3P qui nous a permis d'éclairer la synthèse des isomères en C4. Le site actif de la TBP aldolase est près de 30 % plus volumineux que celui de la FBP aldolase, suggérant que la TBP aldolase concède plus de liberté de mouvement au G3P que la FBP aldolase, et expliquant que le G3P puisse présenter sa face *re* comme *si* au DHAP qui mène l'attaque nucléophile. Une observation similaire avait déjà été faite dans une FBP aldolase de classe II, celle de

Termus caldophilus, donc la cavité de liaison au G3P est de 25 % plus large que celle de la TBP aldolase et de la FBP de classe II d'*E. coli*, et pourrait éclaircir son manque de spécificité vis-à-vis du FBP et du TBP, qu'elle clive et condense tous deux (Lee, Bae et al. 2006).

Chez une autre bactérie, *E. coli*, on retrouve les deux classes de FBP aldolases (Stribling and Perham 1973), de même qu'une TBP aldolase, de classe II seulement. La FBP aldolase de classe I est encodée par *fbab* et est inducible par l'adjonction de substrats gluconéogéniques uniquement, alors que celle de classe II, encodée par *fbaa*, est exprimée de façon constitutive, impliquant l'aldolase de classe I dans la gluconéogénèse et celle de classe II dans la glycolyse préférentiellement (Scamuffa and Caprioli 1980), et liant la croissance et la survie de la bactérie dans divers milieux à sa capacité à adapter son métabolisme (voir section suivante). Sa FBP aldolase de classe II est hautement spécifique à son substrat le FBP, mais sa TBP aldolase démontre peu de contrôle sur l'issue de la réaction et est capable d'accepter le glycoaldéhyde, le L-glyceraldéhyde, l'acétaldéhyde et l'isobutyraldéhyde comme accepteur aldéhyde, ce que sa FBP aldolase ne fait pas. Une étude structurale de la TBP aldolase de classe II avait du reste conclu que son manque relatif de stéréocontrôle était dû à la plus grande liberté de mouvement permise au G3P dans sa cavité, plus spacieuse que celle de la FBP aldolase de classe II (Hall, Bond et al. 2002). Quatre mutations, H26Y/D104G/V121A/P256L, ont été réalisées par évolution dirigée et ont permis de renverser la spécificité de l'enzyme dans le sens de la condensation, d'un ratio 99:1 en faveur du TBP dans l'enzyme native vers un ratio de 4:1 pour le FBP dans l'enzyme

mutée (Williams, Domann et al. 2003). Asp104 forme un réseau de ponts H avec His83, l'une des trois histidines coordonnant le cation obligatoire, et Asp82, le résidu responsable de la protonation/déprotonation en C4-OH. His26 est située entre le site actif et une boucle contenant Pro256 et Arg257, responsables de la liaison au P6 phosphate. Les changements introduits par l'évolution dirigée ont donc permis de subtilement repositionner les deux substrats et ainsi produire les changements de stéréochimie observés. Ces quatre mutations ne touchent pas de résidus directement impliqués dans le mécanisme, que ce soit de clivage ou de condensation; d'ailleurs une étude précédente, qui avait muté les résidus du site actif par mutagenèse dirigée basée sur la structure (Zgiby, Thomson et al. 2000), n'avait pu parvenir à un résultat concluant quant au renversement de la spécificité de la TBP aldolase de classe II. La mutagenèse basée sur la structure seule n'est ainsi pas toujours efficace, et l'évolution dirigée semble une méthode alternative avantageuse pour parvenir à introduire chez les enzymes les caractéristiques désirées.

Signification microbiologique.

La voie du tagatose-6-phosphate est encodée par l'opéron lac (*lacABCD*) des bactéries à acide lactique (Bissett and Anderson 1980). Cette voie, en lui permettant de cataboliser le lactose et le galactose directement sans passer par la glycolyse, à l'inverse de la voie de Leloir par exemple (Holden, Rayment et al. 2003), est essentielle à la survie de *Staphylococcus aureus* dans les milieux riches en lactose comme le lait, puisque, si inactivée, elle voit l'accumulation du galactose et du lactose et l'inhibition de la croissance de la bactérie (Bettenbrock, Siebers et al. 1999). La bactérie ainsi mutée est également incapable de croître dans des milieux riches en fructose et en deux de ses stéréoisomères en C2, le mannitol et le glucitol.

Chez *Streptococcus bovis*, la croissance se fait plus rapidement dans le glucose que dans le lactose, et les quantités intracellulaires en FBP sont beaucoup plus faibles dans les milieux riches en lactose (Bond, Tsai et al. 1998). Le glucose et la moitié glucose du lactose étant métabolisés par la glycolyse, il en résulte des concentrations en FBP élevées, intermédiaire métabolique que la voie du tagatose-6-phosphate, responsable de la dégradation de la moitié galactose du lactose, ne produit normalement pas. Un mutant capable de métaboliser simultanément le lactose (galactose) et le glucose s'est avéré capable de croître plus rapidement dans le glucose, et *S. bovis* sauvage peut croître sur le galactose et le mélibiose, un mélange de sucres contenant une moitié galactose, mais en mettant également à contribution la glycolyse *via* la galactokinase et la voie de Leloir (Bond, Tsai et al. 1998). Les bactéries à acide lactique, qui démontrent une énorme capacité à utiliser divers sucres comme source d'énergie tout en s'adaptant à différentes

conditions environnementales et en modifiant leur métabolisme, ont d'ailleurs prouvé que leur abilité à co-métaboliser différents substrats carbonés était nécessaire à leur survie. D'autres bactéries peuvent également métaboliser simultanément des substrats glycolytiques et gluconéogéniques, c'est-à-dire entrant dans la glycolyse avant et après la FBP aldolase respectivement, et cette capacité est essentielle par exemple à *Mycobacterium tuberculosis* pour survivre *in vitro* et infecter *in vivo* (Puckett, Trujillo et al. 2014).

Dans les faits, le lien entre disponibilité et variabilité des substrats sucrés et la croissance des bactéries a été établi par des études qui se sont penchées sur les motifs d'expression de gènes dans différents milieux de croissance (Chaussee, Dmitriev et al. 2008, Sitkiewicz and Musser 2009). La glycolyse, voie métabolique préférentielle des bactéries à acide lactique en croissance rapide, voit l'oxydation d'une molécule de glucose aboutir en la formation de deux molécules d'ATP. Ce résultat, peu énergiquement rentable, se fait *via* la réduction du NAD^+ en NADH, co-facteur de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Afin de conserver l'équilibre rédox de la cellule, deux molécules de cet accepteur d'électrons doivent donc être ré-oxydées par molécule de glucose consommée, et cette régénération se fait grâce à la lactate déshydrogénase. Cette enzyme tétramérique transforme les deux molécules de pyruvate produites par la glycolyse en lactate, et a comme activateur allostérique puissant le FBP (Crow and Pritchard 1977). L'enzyme de *S. pyogenes* est, des quatre bactéries à acide lactique étudiées dans un récent article, celle qui est la plus sensible et donc dépendante à l'activation par le FBP (Feldman-Salit, Hering et al. 2013). Il serait intéressant de se

demander si la capacité de la TBP aldolase de cet organisme à synthétiser le FBP de même que son substrat préféré le TBP pourrait conférer un avantage à la bactérie en lui permettant de conserver un flux rapide à travers la glycolyse et ainsi prospérer dans divers milieux.

CHAPITRE 5: Perspectives

5.1 Stéréospécificité

En 2011, (Lee, Kim et al. 2011) a publié un article qui s'est attaché à étudier les déterminants du manque de stéréospécificité de LacD.2 (notre TBP aldolase). Les auteurs ont ainsi muté les deux résidus du site actif Leu165 et Leu275 en résidus correspondant dans la FBP aldolase de mammifère, Glu189 et Ser300, et en ont conclu que leurs mutants Leu165Glu et Leu275Ser ainsi que leur double mutant Leu165Glu/Leu275Ser présentaient une préférence accrue pour le FBP par rapport à l'enzyme native. Ayant nous-même synthétisé le mutant Leu275Ser, nous avons essayé de reproduire ces résultats, sans aucun succès malheureusement. En effet, notre mutant Leu275Ser exhibe au contraire une préférence encore plus marquée pour le TBP dans nos essais enzymatiques, de l'ordre de 10:1 en faveur du TBP dans le mutant *versus* 4:1 environ dans l'enzyme native.

Ces expériences de mutagenèse dirigée dans le site actif à des fins de renversement/contrôle de la spécificité de l'enzyme, à l'intérêt évident, sont donc indéniablement à refaire et devraient être complétées par des mutations d'autres résidus du site actif. Plusieurs candidats attrayants existent, comme Asp27, Gln28 et Leu98 qui remplace la Lys107 de la FBP aldolase. Nous avons déjà résolu les structures de Asp27Asn, Gln28Glu, Leu275Ser et Leu275Ala non liées et en complexe avec

différents substrats, et des explorations cinétiques, calorimétriques et bio-informatiques seraient donc nécessaires pour compléter ces études structure/fonction de cette enzyme. Il serait également envisageable d'entreprendre une campagne d'évolution dirigée de la TBP aldolase, comme cela a déjà été pratiqué à de nombreuses reprises dans des aldolases à spécificité dégénérée (voir partie 1.2 de cette thèse), et ce afin de peut-être mettre à jour des déterminants de son manque de stéréospécificité et de son mécanisme que seule la mutagenèse basée sur la structure n'a pas encore été capable de dévoiler.

5.2 Mouvements conformationnels

Un analyse de dynamique moléculaire sur les trois régions mobiles de la TBP aldolase a l'entrée de son site actif serait également pertinente. En effet, nous avons vu que leur position et leur stabilité dépendait de l'état de liaison au site actif, et que leurs mouvements étaient beaucoup plus larges que ceux des régions correspondantes de la FBP aldolase de mammifère. En outre, la résolution des structures de certains mutants de résidus du site actif, notamment Lys205 et Leu275, nous a enseigné que ces mutations au sein du site actif influaient sur la mobilité de ces trois régions, qui dans les structures cristallographiques de Lys205Met et Leu275Ser non liées étaient plus rigides et adoptaient la conformation fermée de la protéine même sans ligand au site actif. Une analyse plus approfondie de ces résultats, de même que des dynamiques moléculaires *coarse grain* par exemple, pourrait aider à mieux comprendre ce phénomène. Des expériences *in silico* semblables ont par exemple permis de réaliser que les larges mouvements conformationnels subis par la FBP aldolase et la TBP aldolase de *E. coli*

après liaison à ses substrats sont primordiales (Katebi and Jernigan 2015). Ils facilitent en effet le mécanisme catalytique en aidant le recrutement du substrat dans la conformation ouverte et en amenant les résidues du site actif dans leur conformation la plus active.

Chez l'enzyme immédiatement en amont de la TBP aldolase dans l'opéron lactose et dans la voie du tagatose-6-phosphate, LacC ou tagatose-6-phosphate kinase, des mouvements conformationnels après liaison sont essentiels au mécanisme, et ce en assistant le recrutement des co-facteurs obligatoires, le magnésium et l'ATP (Miallau, Hunter et al. 2007).

5.3 Rôle dans la virulence de *S. pyogenes*

Pour terminer, au-delà de son activité purement métabolique, et par extension de ses applications à la synthèse chimique, la TBP aldolase de *S. pyogenes* pourrait également démontrer un rôle de senseur et par extension, de régulateur de virulence chez la bactérie (Loughman et Caparon, 2006). Il est déjà connu que des enzymes glycolytiques, comme l'hexokinase, la lactate déshydrogénase ou encore la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, ont été adaptées afin de jouer un rôle de régulation de l'expression génétique chez certains organismes (Kim et Dang, 2005).

P63703	LACD1_STRP1	1	--MTITANKRHYLEKVS	HQGIISALAFDQRGALKQ	MMAHQEGEATVTQIETL	KVLVSEE	58			
P63705	LACD2_STRP1	1	MTITLTENKRKSM	EKLSVDGVI	SALAFDQRGALKR	MMAQHQTKEPTVEQIEELKSLVSEE	60			
			:*:*	***:	:*:*	*:*:*****:*** ** * ** ** *				
P63703	LACD1_STRP1	59	LTPYASSILLDPEYGLL	ATKVRANQTGLLLAYEKT	GYDATTT	SRLPDCLV	SVKRLKAA	118		
P63705	LACD2_STRP1	61	LTPFASSILLDPEYGLP	ASRVRSEEAGLLAYEKT	GYDATTT	SRLPDCLD	WWSAKRIKEA	120		
			:**	*:*:	*:*:	:*****:*****	*:*:* *			
P63703	LACD1_STRP1	119	GADAIKFLLLYYD	VGDGEQINLQKQAYIERI	GSECT	AEDI	PFLELLSYDERISDNN	SAAY	178	
P63705	LACD2_STRP1	121	GAEA	VKFLLLYYDIDGDDQDVNE	QKKAYIERI	GSECR	AEDI	PFYLEILTYDEKIDN	ASPEF	180
			:**	*:*:	*:*:	:*****:*****	*:*:*:*:*:	*:* *		
P63703	LACD1_STRP1	179	AKLKPHKVN	GAMSVFSDKRF	GVDVLKVEVPVNMAY	VEGFT	EGEVHYSQAEAI	KAFODQEA	238	
P63705	LACD2_STRP1	181	AKVK	AHKVNEAMKVF	SKERFGVDVLKVEVPVNMK	FVEGF	ADGEVLF	KEEAQAFRDQEA	240	
			:*	*** *	***:	:**:*****	:*****:***	::* * :*:*:***		
P63703	LACD1_STRP1	239	ASHLPYIYL	SAGVSAKLFQETLY	FAAAAGAQF	SGVLCGRAT	WAGSV	PVYITKGEDEARKW	298	
P63705	LACD2_STRP1	241	STDLPYIYL	SAGVSAKLFQDTLV	FAAESGAKF	NGVLCGRAT	WAGSV	KVYIEEGPQAAREW	300	
			::	:*****:*****	*:* *	:*****:*****	*** *	:* * :*:*:***		
P63703	LACD1_STRP1	299	LCTEGFQNI	DELNRVLEET	ASPWTEKI				325	
P63705	LACD2_STRP1	301	LRTGFKNI	DELNKLVDKT	ASPWTEKM				327	
			*	***:*****	*:*:	:*****:*****				

Figure 41 : Aligement de séquence primaire entre LacD.1 (LACD1_STRP1) et LacD.2 (LACD2_STRP1) de *S. pyogenes*. Les résidus identiques sont surlignés de gris foncé; les similaires de gris clair.

L'autre isozyyme de la TBP aldolase chez *S. pyogenes*, la TBP aldolase 1, ou LacD.1, avec laquelle elle partage 72.6 % d'identité et 82 % de similarité de séquence (Figure 41), serait pour sa part capable de lier directement RopB, un facteur impliqué dans la régulation du métabolisme du streptocoque, et dans l'activation de l'expression de certains gènes impliqués dans sa virulence, dont celui codant pour SpeB (section 1.1) (Loughman et Caparon, 2006; Loughman et Caparon, 2007 ;(Cusumano and Caparon 2013). Le gène codant pour cette protéase à cystéine est l'un des plus hautement exprimé *in vivo* lors d'une infection par *S. pyogenes*, et répond à différents signaux environnementaux. Or, le mutant LacD.1⁻ n'est plus sensible à ces signaux, et présente une expression aberrante de SpeB, phénotype complètement corrigé par l'introduction

d'un plasmide codant pour LacD.1. Dans le modèle proposé dans l'étude citée, la liaison de LacD.1 à ses substrats, DHAP et G3P, en conditions d'excès d'énergie *via* la glycolyse, y induirait un changement conformationnel qui lui permettrait de séquestrer RopB, inhibant ainsi l'activation des gènes cibles de RopB, dont celui de SpeB. Ce rôle de senseur métabolique et de régulateur de virulence serait donc subordonné aux différents changements conformationnels adoptés par cette aldolase après liaison à son (ses) substrat(s). La structure cristallographique de LacD.1 a récemment été résolue (Lee, Kim et al. 2011), mais la co-structure de LacD.1 en complexe avec RopB serait évidemment beaucoup plus excitante et pourrait ouvrir la voie à des tentatives de modulation de cette interaction protéine-protéine par mutagenèse dirigée. Notre laboratoire a déjà à sa disposition les plasmides codant pour la TBP aldolase LacD.1 et RopB recombinants, et nous avons déjà effectué des essais de co-cristallisation.

Références :

1. Adams, P. D., R. W. Grosse-Kunstleve, L. W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter and T. C. Terwilliger (2002). "PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination." Acta Crystallogr.Sect.D **58**: 1948-1954.
2. Althoff, E. A., L. Wang, L. Jiang, L. Giger, J. K. Lassila, Z. Wang, M. Smith, S. Hari, P. Kast, D. Herschlag, D. Hilvert and D. Baker (2012). "Robust design and optimization of retroaldol enzymes." Protein Sci **21**(5): 717-726.
3. Anai, M., C. Y. Lai and B. L. Horecker (1973). "The pyridoxal phosphate-binding site of rabbit muscle aldolase." Arch Biochem Biophys **156**(2): 712-719.
4. Assiri, A. S., B. A. El-Gamal, E. E. Hafez and M. A. Haidara (2014). "Production of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* isolate and its potential for thrombolytic therapy." Saudi Med J **35**(12): 1482-1488.
5. Aziz, R. K. and M. Kotb (2008). "Rise and persistence of global MIT1 clone of *Streptococcus pyogenes*." Emerg Infect Dis **14**(10): 1511-1517.
6. Baker, P., J. Carere and S. Y. Seah (2011). "Probing the molecular basis of substrate specificity, stereospecificity, and catalysis in the class II pyruvate aldolase, BphI." Biochemistry **50**(17): 3559-3569.
7. Bednarski, M. D., E. S. Simon, N. Bischofberger, W. D. Fessner, M. J. Kim, W. Lees, T. Saito, H. Waldmann and G. M. Whitesides (1989). "Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis." Journal of the American Chemical Society **111**(2): 627-635.
8. Beema Shafreen, R. M., C. Selvaraj, S. K. Singh and S. Karutha Pandian (2014). "In silico and in vitro studies of cinnamaldehyde and their derivatives against LuxS in *Streptococcus pyogenes*: effects on biofilm and virulence genes." J Mol Recognit **27**(2): 106-116.
9. Bettenbrock, K., U. Siebers, P. Ehrenreich and C.-A. Alpert (1999). "Lactobacillus casei 64H Contains a Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System for Uptake of Galactose, as Confirmed by Analysis of ptsH and Different gal Mutants." Journal of Bacteriology **181**(1): 225-230.
10. Billroth, T. (2003). "Pathology and therapeutics, in fifty lectures. 1871." Clin Orthop Relat Res(408): 4-11.
11. Bingol-Kologlu, M., R. V. Yildiz, B. Alper, A. Yagmurlu, E. Ciftci, I. H. Gokcora, E. Ince, M. Emiroglu and H. Dindar (2007). "Necrotizing fasciitis in children: diagnostic and therapeutic aspects." J Pediatr Surg **42**(11): 1892-1897.
12. Bisno, A. L., Brito, M.O., Collins, C.M. (2003). "Molecular basis of group A streptococcal virulence." Lancet Infect. Dis. **3**(4): 191-200.
13. Bissett, D. L. and R. L. Anderson (1980). "Lactose and D-galactose metabolism in *Staphylococcus aureus*." J.Biol.Chem. **255**: 8750-8755.
14. Blonski, C., D. De Moissac, J. Perie and J. Sygusch (1997). "Inhibition of rabbit muscle aldolase by phosphorylated aromatic compounds." Biochem J **323** (Pt 1): 71-77.

15. Blonski, C., T. Gefflaut and J. Perie (1995). "Effects of chirality and substituents at carbon 3 in dihydroxyacetone-phosphate analogues on their binding to Rabbit muscle aldolase." Bioorganic & Medicinal Chemistry **3**(9): 1247-1253.
16. Bond, D. R., B. M. Tsai and J. B. Russell (1998). "The diversion of lactose carbon through the tagatose pathway reduces the intracellular fructose 1,6-bisphosphate and growth rate of *Streptococcus bovis*." Appl Microbiol Biotechnol **49**(5): 600-605.
17. Bottone, E. J. (2006). An Atlas of the Clinical Microbiology of Infectious Diseases, Informa Health Care.
18. Brooks, G. F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, McGraw-Hill Professional.
19. Brown, J. H. (1919). "The use of blood agar for the study of streptococci." Rockefeller Institute Medical Research Monograph **9**.
20. Budelmann, G. (1969). "Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis." Internist (Berl) **10**(3): 92-101.
21. Burova, L., A. Thern, P. Pigarevsky, M. Gladilina, V. Seliverstova, E. Gavrilova, V. Nagornev, C. Schalen and A. Totolian (2003). "Role of group A streptococcal IgG-binding proteins in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit." APMIS **111**(10): 955-962.
22. Castillo, J. A., J. Calveras, J. Casas, M. Mitjans, M. P. Vinardell, T. Parella, T. Inoue, G. A. Sprenger, J. Joglar and P. Clapes (2006). "Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays." Org Lett **8**(26): 6067-6070.
23. Chaussee, M. A., A. V. Dmitriev, E. A. Callegari and M. S. Chaussee (2008). "Growth phase-associated changes in the transcriptome and proteome of *Streptococcus pyogenes*." Arch Microbiol **189**: 27-41.
24. Chen, S. H., D. R. Hwang, G. H. Chen, N. S. Hsu, Y. T. Wu, T. L. Li and C. H. Wong (2012). "Engineering transaldolase in *Pichia stipitis* to improve bioethanol production." ACS Chem Biol **7**(3): 481-486.
25. Chhatwal, G. S. and D. J. McMillan (2005). "Uncovering the mysteries of invasive streptococcal diseases." Trends Mol Med **11**(4): 152-155.
26. Chiang-Ni, C. and J. J. Wu (2008). "Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*." J Formos Med Assoc **107**(9): 677-685.
27. Choi, K. H., A. S. Mazurkie, A. J. Morris, D. Utheza, D. R. Tolan and K. N. Allen (1999). "Structure of a fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase liganded to its natural substrate in a cleavage-defective mutant at 2.3 Å." Biochemistry **38**(39): 12655-12664.
28. Choi, K. H., J. Shi, C. E. Hopkins, D. R. Tolan and K. N. Allen (2001). "Snapshots of catalysis: the structure of fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase covalently bound to the substrate dihydroxyacetone phosphate." Biochemistry **40**(46): 13868-13875.
29. Choi, K. H. and D. R. Tolan (2004). "Presteady-State Kinetic Evidence for a Ring-Opening Activity in Fructose-1,6-(bis)phosphate Aldolase." Journal of the American Chemical Society **126**(11): 3402-3403.

30. Clapes, P., W. D. Fessner, G. A. Sprenger and A. K. Samland (2010). "Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases." Curr Opin Chem Biol **14**(2): 154-167.
31. Clapés, P. and X. Garrabou (2011). "Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases." Advanced Synthesis & Catalysis **353**(13): 2263-2283.
32. Coligan, J. E., W. C. Schnute, Jr. and T. J. Kindt (1975). "Immunochemical and chemical studies on streptococcal group-specific carbohydrates." J Immunol **114**(6): 1654-1658.
33. Crans, D. C., K. Sudhakar and T. J. Zamborelli (1992). "Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions." Biochemistry **31**(29): 6812-6821.
34. Crow, V. L. and G. G. Pritchard (1977). "Fructose 1,6-diphosphate-activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*: kinetic properties and factors affecting activation." J Bacteriol **131**(1): 82-91.
35. Cunningham, M. W. (2000). "Pathogenesis of group A streptococcal infections." Clin Microbiol Rev **13**(3): 470-511.
36. Cusumano, Z. and M. Caparon (2013). "Adaptive evolution of the *Streptococcus pyogenes* regulatory aldolase LacD.1." J Bacteriol **195**(6): 1294-1304.
37. Cvjetkovic, D., J. Jovanovic, I. Hrnjakovic-Cvjetkovic, M. Aleksic-Dordevic and S. Stefan-Mikic (2008). "[Significance of group A streptococcal infections in human pathology]." Med Pregl **61**(9-10): 529-532.
38. Dalby, A. R., D. R. Tolan and J. A. Littlechild "The structure of human liver fructose-1,6-bisphosphate aldolase." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **57**(0907-4449 (Print)): 1526-1533.
39. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., (1973). Microbiology, 2nd Edition, Harper & Row Publishers.
40. Davis, I. W., A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall, 3rd, J. Snoeyink, J. S. Richardson and D. C. Richardson (2007). "MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W375-383.
41. Dax, C., M. Coincon, J. Sygusch and C. Blonski (2005). "Hydroxynaphthaldehyde phosphate derivatives as potent covalent Schiff base inhibitors of fructose-1,6-bisphosphate aldolase." Biochemistry **44**(14): 5430-5443.
42. DeLano, W. L. (2004). The PyMOL Molecular Graphics System.
43. DeSantis, G., J. Liu, D. P. Clark, A. Heine, I. A. Wilson and C. H. Wong (2003). "Structure-based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase." Bioorg Med Chem **11**(1): 43-52.
44. Dong, H., G. Xu, S. Li, Q. Song, S. Liu, H. Lin, Y. Chai, A. Zhou, T. Fang, H. Zhang, C. Jin, W. Lu and G. Cao (2008). "Beta-haemolytic group A streptococci emm75 carrying altered pyrogenic exotoxin A linked to scarlet fever in adults." J Infect **56**(4): 261-267.

45. Drechsler, E. R., P. D. Boyer and A. G. Kowalsky (1959). "The catalytic activity of carboxypeptidase-degraded aldolase." J Biol Chem **234**: 2627-2634.
46. Drenth, J. (2007). Principles of protein X-ray crystallography Springer.
47. Dworkin, M., Falkow, S. (2006). The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, Springer.
48. Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr.Sect.D **60**: 2126-2132.
49. Espelt, L., J. Bujons, T. Parella, J. Calveras, J. Joglar, A. Delgado and P. Clapes (2005). "Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-fuculose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde." Chemistry **11**(5): 1392-1401.
50. Evans, A. C. (1936). "Studies on Hemolytic Streptococci: II. Streptococcus pyogenes." J Bacteriol **31**(6): 611-624.
51. Feldman-Salit, A., S. Hering, H. Messiha, N. Veith, V. Cojocar, A. Sieg, H. Westerhoff, B. Kreikemeyer, R. C. Wade and T. Fiedler (2013). "Regulation of the Activity of Lactate Dehydrogenases from Four Lactic Acid Bacteria." J Biol Chem **288**(29): 21295-21306.
52. Fessner, W. D. (1998). "Enzyme mediated C-C bond formation." Curr Opin Chem Biol **2**(1): 85-97.
53. Fiebig, A., T. G. Loof, A. Babbar, A. Itzek, J. J. Koehorst, P. J. Schaap and D. P. Nitsche-Schmitz (2015). "Comparative Genomics of Streptococcus pyogenes M1 isolates differing in virulence and propensity to cause systemic infection in mice." Int J Med Microbiol.
54. Fischetti, V. A. (1989). "Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior." Clin Microbiol Rev **2**(3): 285-314.
55. Flaherty, R. A., J. M. Puricelli, D. L. Higashi, C. J. Park and S. W. Lee (2015). "Streptolysin S promotes programmed cell death and enhances inflammatory signaling in epithelial keratinocytes during Group A Streptococcal infection." Infect Immun **83**(10): 4118-4133.
56. Fong, S., T. D. Machajewski, C. C. Mak and C. Wong (2000). "Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars." Chem Biol **7**(11): 873-883.
57. Fontaine, M. C., J. J. Lee and M. A. Kehoe (2003). "Combined contributions of streptolysin O and streptolysin S to virulence of serotype M5 Streptococcus pyogenes strain Manfredo." Infect Immun **71**(7): 3857-3865.
58. Fraser, J. D. and T. Proft (2008). "The bacterial superantigen and superantigen-like proteins." Immunol Rev **225**: 226-243.
59. Frey, P. A., F. C. Kokesh and F. H. Westheimer (1971). "A reporter group at the active site of acetoacetate decarboxylase. I. Ionization constant of the nitrophenol." J Am Chem Soc **93**(26): 7266-7269.
60. Fung, J. C., K. Wicher and M. McCarty (1982). "Immunochemical analysis of streptococcal group A, B, and C carbohydrates, with emphasis on group A." Infect Immun **37**(1): 209-215.

61. Galkin, A., Z. Li, L. Li, L. Kulakova, L. R. Pal, D. Dunaway-Mariano and O. Herzberg (2009). "Structural insights into the substrate binding and stereoselectivity of giardia fructose-1,6-bisphosphate aldolase." Biochemistry **48**(14): 3186-3196.
62. Garrabou, X., J. Calveras, J. Joglar, T. Parella, J. Bujons and P. Clapes (2011). "Highly efficient aldol additions of DHA and DHAP to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-rhamnulose-1-phosphate and L-fuculose-1-phosphate aldolases in aqueous borate buffer." Org Biomol Chem **9**(24): 8430-8436.
63. Gefflaut, T., C. Blonski, J. Perie and M. Willson (1995). "Class I aldolases: Substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects." Progress in Biophysics and Molecular Biology **63**(3): 301-340.
64. Ghalambor, M. A. and E. C. Heath (1962). "The metabolism of L-fucose. II. The enzymatic cleavage of L-fucose 1-phosphate." J Biol Chem **237**: 2427-2433.
65. Gibson, C. M., T. C. Mallett, A. Claiborne and M. G. Caparon (2000). "Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of *Streptococcus pyogenes*." J Bacteriol **182**(2): 448-455.
66. Ginsburg, A. and A. H. Mehler (1966). "Specific anion binding to fructose diphosphate aldolase from rabbit muscle." Biochemistry **5**(8): 2623-2634.
67. Goldmann, O., I. Sastalla, M. Wos-Oxley, M. Rohde and E. Medina (2009). "*Streptococcus pyogenes* induces oncosis in macrophages through the activation of an inflammatory programmed cell death pathway." Cell Microbiol **11**(1): 138-155.
68. Gonzalez Castro, A., J. C. Rodriguez-Borregan, T. Obeso, A. Castellanos, A. Perez-Ceballos and J. R. Sesmero (2008). "Necrotizing fasciitis after cesarean section." Arch Gynecol Obstet **277**(6): 579-581.
69. Gray, G. R. (1971). "An examination of D-fructose 1,6-diphosphate and related sugar phosphates by fourier transform 31 P nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochemistry **10**(25): 4705-4711.
70. Gray, G. R. and R. Barker (1970). "Studies on the substrates of D-fructose 1,6-diphosphate aldolase in solution." Biochemistry **9**(12): 2454-2462.
71. Grazi, E., C. Sivieri-Pecorari, R. Gagliano and G. Trombetta (1973). "Complexes of fructose diphosphate aldolase with dihydroxyacetone phosphate and dihydroxyacetone sulfate." Biochemistry **12**(14): 2583-2590.
72. Gryllos, I., H. J. Tran-Winkler, M. F. Cheng, H. Chung, R. Bolcome, 3rd, W. Lu, R. I. Lehrer and M. R. Wessels (2008). "Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16755-16760.
73. Gutierrez, M., T. Parella, J. Joglar, J. Bujons and P. Clapes (2011). "Structure-guided redesign of D-fructose-6-phosphate aldolase from *E. coli*: remarkable activity and selectivity towards acceptor substrates by two-point mutation." Chem Commun (Camb) **47**(20): 5762-5764.
74. Hall, D. R., C. S. Bond, G. A. Leonard, I. Watt, A. Berry and W. N. Hunter (2002). "Structure of tagatose-1,6-bisphosphate aldolase." Journal of Biological Chemistry **277**: 22018-22024.

75. Hanski, E., P. A. Horwitz and M. G. Caparon (1992). "Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells." Infect Immun **60**(12): 5119-5125.
76. Hao, J. and A. Berry (2004). "A thermostable variant of fructose biphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents." Protein Eng Des Sel **17**(9): 689-697.
77. Hartman, F. C. and R. Barker (1965). "An exploration of the active site of aldolase using structural analogs of fructose diphosphate." Biochemistry **4**(6): 1068-1075.
78. Hartman, F. C. and J. P. Brown (1976). "Affinity labeling of a previously undetected essential lysyl residue in class I fructose biphosphate aldolase." J Biol Chem **251**(10): 3057-3062.
79. Healy, M. J. and P. Christen (1973). "Mechanistic probes for enzymatic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase)." Biochemistry **12**: 35-41.
80. Hedrick, J. (2003). "Acute bacterial skin infections in pediatric medicine: current issues in presentation and treatment." Paediatr Drugs **5 Suppl 1**: 35-46.
81. Henningham, A., M. Yamaguchi, R. K. Aziz, K. Kuipers, C. Z. Buffalo, S. Dahesh, B. Choudhury, J. Van Vleet, Y. Yamaguchi, L. M. Seymour, N. L. Ben Zakour, L. He, H. V. Smith, K. Grimwood, S. A. Beatson, P. Ghosh, M. J. Walker, V. Nizet and J. N. Cole (2014). "Mutual exclusivity of hyaluronan and hyaluronidase in invasive group A *Streptococcus*." J Biol Chem **289**(46): 32303-32315.
82. Holden, H. M., I. Rayment and J. B. Thoden (2003). "Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism." J Biol Chem **278**(45): 43885-43888.
83. Horecker, B. L., P. Z. Smyrniotis, H. H. Hiatt and P. A. Marks (1955). "Tetrose phosphate and the formation of sedoheptulose diphosphate." J Biol Chem **212**(2): 827-836.
84. Horstmeier, C. and J. A. Washington, 2nd (1973). "Microbiological study of streptococcal bacteremia." Appl Microbiol **26**(4): 589-591.
85. Hsu, C. C., Z. Hong, M. Wada, D. Franke and C. H. Wong (2005). "Directed evolution of D-sialic acid aldolase to L-3-deoxy-manno-2-octulosonic acid (L-KDO) aldolase." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9122-9126.
86. Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton and L. J. Aridgides (2000). "The extracellular hyaluronidase gene (*hylA*) of *Streptococcus pyogenes*." FEMS Microbiol Lett **184**(1): 109-112.
87. Iacono, V. J., T. P. Byrnes, I. T. Crawford, B. L. Grossbard, J. J. Pollock and B. J. MacKay (1985). "Lysozyme-mediated de-chaining of *Streptococcus mutans* and its antibacterial significance in an acidic environment." J Dent Res **64**(1): 48-53.
88. Ikebe, T., K. Tominaga, T. Shima, R. Okuno, H. Kubota, K. Ogata, K. Chiba, C. Katsukawa, H. Ohya, Y. Tada, N. Okabe, H. Watanabe, M. Ogawa and M.

- Ohnishi (2015). "Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010 to 2012." Epidemiol Infect **143**(4): 864-872.
89. Jassim, S., W. G. Salt and R. J. Stretton (1989). "In vitro studies of haemolysis by some staphylococci grown in chemically defined media." J Appl Bacteriol **67**(5): 511-520.
90. Jennewein, S., M. Schurmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts and D. Mink (2006). "Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase." Biotechnol J **1**(5): 537-548.
91. Kabsch, W. "XDS."
92. Kahn, F., M. Morgelin, O. Shannon, A. Norrby-Teglund, H. Herwald, A. I. Olin and L. Bjorck (2008). "Antibodies against a surface protein of *Streptococcus pyogenes* promote a pathological inflammatory response." PLoS Pathog **4**(9): e1000149.
93. Karaky, N. M., G. F. Araj and S. T. Tokajian (2014). "Molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* group A isolates from a tertiary hospital in Lebanon." J Med Microbiol **63**(Pt 9): 1197-1204.
94. Katebi, A. R. and R. L. Jernigan (2015). "Aldolases Utilize Different Oligomeric States To Preserve Their Functional Dynamics." Biochemistry **54**(22): 3543-3554.
95. Khamnuan, P., W. Chongruksut, K. Jearwattanakanok, J. Patumanond and A. Tantraworasin (2015). "Necrotizing fasciitis: epidemiology and clinical predictors for amputation." Int J Gen Med **8**: 195-202.
96. Koerner, T. A., Jr., R. J. Voll and E. S. Younathan (1977). "A proposed model for the regulation of phosphofructokinase and fructose 1,6-bisphosphatase based on their reciprocal anomeric specificities." FEBS Lett **84**(2): 207-213.
97. Kohayagawa, Y., N. Ishitobi, Y. Yamamori, M. Wakuri, C. Sano, K. Tominaga and T. Ikebe (2015). "Streptococcal toxic shock syndrome from necrotizing soft-tissue infection of the breast caused by a mucoid type strain." J Infect Chemother **21**(2): 144-147.
98. Kresge, N., R. D. Simoni and R. L. Hill (2005). "Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway." J Biol Chem **280**(4): e3.
99. Kroemer, M., I. Merkel and G. E. Schulz (2003). "Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase." Biochemistry **42**(36): 10560-10568.
100. Kroth, P. G., Y. Schroers and O. Kilian (2005). "The peculiar distribution of class I and class II aldolases in diatoms and in red algae." Curr Genet **48**(6): 389-400.
101. Lai, C. Y., P. Hoffee and B. L. Horecker (1965). "Mechanism of action of aldolases. XII. Primary structure around the substrate binding site of rabbit muscle aldolase." Arch Biochem Biophys **112**(3): 567-579.
102. Lancefield, R. C. (1933). "A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci." J. Exptl. Med **57**: 571-595.
103. Lee, J. H. L., J. Bae, D. Kim, Y. Choi, Y. J. Im, S. Koh, J. S. Kim, M.-K. Kim, G. B. Kang, S.-I. Hong, D.-S. Lee and S. H. Eom (2006).

- "Stereoselectivity of fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Thermus caldophilus*." Biochemical and Biophysical Research Communications **347**: 616-625.
104. Lee, J. Y. and M. Caparon (1996). "An oxygen-induced but protein F-independent fibronectin-binding pathway in *Streptococcus pyogenes*." Infect Immun **64**(2): 413-421.
 105. Lee, S. J., H. S. Kim, J. Kim do, H. J. Yoon, K. H. Kim, J. Y. Yoon and S. W. Suh (2011). "Crystal structures of LacD from *Staphylococcus aureus* and LacD.1 from *Streptococcus pyogenes*: insights into substrate specificity and virulence gene regulation." FEBS Lett **585**(2): 307-312.
 106. Lewis, D. J. and G. Lowe (1977). "Inhibition of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from rabbit muscle and *Bacillus stearothermophilus*." Eur J Biochem **80**(1): 119-133.
 107. Liotard, B. and J. Sygusch (2003). "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of native and selenomethionine class I tagatose-1,6-bisphosphate aldolase from *Streptococcus pyogenes*." Acta.Cryst.Sect.D **60**: 528-530.
 108. Lominski, I. and M. R. Shaikh (1968). "Long-chain mutants of *Streptococcus faecalis* induced by ultraviolet irradiation." J Med Microbiol **1**(2): 219-220.
 109. Lorentzen, E., B. Siebers, R. Hensel and E. Pohl (2004). "Structure, function and evolution of the Archaeal class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase." Biochem Soc Trans **32**(Pt 2): 259-263.
 110. Lorentzen, E., B. Siebers, R. Hensel and E. Pohl (2005). "Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates." Biochemistry **44**(11): 4222-4229.
 111. Loughman, J. A. and M. G. Caparon (2006). "A novel adaptation of aldolase regulates virulence in *Streptococcus pyogenes*." EMBO(25): 5414-5422.
 112. Loughman, J. A. and M. G. Caparon (2007). "Comparative functional analysis of the lac operon in *Streptococcus pyogenes*." Molecular Microbiology **64**: 269-280.
 113. LowKam, C., B. Liotard and J. Sygusch (2010). "Structure of a class I tagatose-1,6-bisphosphate aldolase: investigation into an apparent loss of stereospecificity." J Biol Chem **285**(27): 21143-21152.
 114. Luca-Harari, B., J. Darenberg, S. Neal, T. Siljander, L. Strakova, A. Tanna, R. Creti, K. Ekelund, M. Koliou, P. T. Tassios, M. van der Linden, M. Straut, J. Vuopio-Varkila, A. Bouvet, A. Efstratiou, C. Schalen, B. Henriques-Normark and A. Jasir (2009). "Clinical and Microbiological Characteristics of Severe *Streptococcus pyogenes* Disease in Europe." J Clin Microbiol.
 115. Marcus, A. and L. M. Shannon (1962). "gamma-Methyl-gamma-hydroxy-alpha-ketoglutaric aldolase. II. Studies with pyruvate-C14." J Biol Chem **237**: 3348-3353.

116. Maurady, A., A. Zdanov, D. de Moissac, D. Beaudry and J. Sygusch "A conserved glutamate residue exhibits multifunctional catalytic roles in D-fructose-1,6-bisphosphate aldolases." *J Biol Chem* **277**(11): 9474-9483.
117. Maxwell, E. S., K. Kurahashi, H. M. Kalekar (1962). *Enzymes of the Leloir pathway*, Academic Press Inc., New York.
118. Medina, E., O. Goldmann, A. W. Toppel and G. S. Chhatwal (2003). "Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion." *J Infect Dis* **187**(4): 597-603.
119. Mehler, A. H. and M. E. Cusic, Jr. (1967). "Aldolase reaction with sugar diphosphates." *Science* **155**(3766): 1101-1103.
120. Meloche, H. P. (1970). "The 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase catalyzed pyruvate-proton exchange reaction: enzymic synthesis of crystalline sodium 3H-pyruvate." *Anal Biochem* **38**(2): 389-392.
121. Meloche, H. P. and L. Mehler (1973). "The stereochemistry at carbon 3 of pyruvate lyase condensation products. Aldolases forming condensation products racemic at carbon 4." *J Biol Chem* **248**(18): 6333-6338.
122. Meloche, H. P., L. Mehler and J. M. Wurster (1975). "The stereochemistry at carbon 3 of pyruvate lyase condensation products. 2-Keto-3-deoxygluconate-6-phosphate aldolase." *J Biol Chem* **250**(17): 6870-6874.
123. Meyerhof O., J.-K. R. (1943). "The equilibria of isomerase and aldolase, and the problem of the phosphorylation of glyceraldehyde phosphate." *J. Bio. Chem* **149**: 71-92.
124. Meyerhof O., O. P. (1947). "The mechanism of the oxydative reaction in fermentation." *J. Bio. Chem* **170**: 1-22.
125. Miallau, L., W. N. Hunter, S. M. McSweeney and G. A. Leonard (2007). "Structures of *Staphylococcus aureus* D-tagatose-6-phosphate kinase implicate domain motions in specificity and mechanism." *J Biol Chem* **282**(27): 19948-19957.
126. Michaelis, L. and M. M. L. Menten (2013). "The kinetics of invertin action: Translated by T.R.C. Boyde Submitted 4 February 1913." *FEBS Letters* **587**(17): 2712-2720.
127. Midelfort, C. F., R. K. Gupta and I. A. Rose (1976). "Fructose 1,6-bisphosphate: isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases." *Biochemistry* **15**(10): 2178-2185.
128. Midelfort, C. F., R. K. Gupta and I. A. Rose (1976). "Fructose 1,6-bisphosphate: isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases." *Biochemistry* **15**(10): 2178-2185.
129. Mirjamali, N. A., S. Soufian, N. Molaei, S. S. Abbasian and H. Abtahi (2014). "Cloning and expression of the enzymatic region of Streptococcal hyaluronidase." *Iran J Basic Med Sci* **17**(9): 667-672.
130. Model, P., L. Ponticorvo and D. Rittenberg (1968). "Catalysis of an oxygen-exchange reaction of fructose 1,6-diphosphate and fructose 1-phosphate with water by rabbit muscle aldolase." *Biochemistry* **7**(4): 1339-1347.
131. Molloy, E. M., S. R. Casjens, C. L. Cox, T. Maxson, N. A. Ethridge, G. Margos, V. Fingerle and D. A. Mitchell (2015). "Identification of the minimal

- cytolytic unit for streptolysin S and an expansion of the toxin family." BMC Microbiol **15**: 141.
132. Morris, A. J. and D. R. Tolan (1993). "Site-directed mutagenesis identifies aspartate 33 as a previously unidentified critical residue in the catalytic mechanism of rabbit aldolase A." J Biol Chem **268**(2): 1095-1100.
 133. Morris, A. J. and D. R. Tolan (1994). "Lysine-146 of rabbit muscle aldolase is essential for cleavage and condensation of the C3-C4 bond of fructose 1,6-bis(phosphate)." Biochemistry **33**(40): 12291-12297.
 134. Mozola, C. C. and M. G. Caparon (2015). "Dual modes of membrane binding direct pore formation by Streptolysin O." Mol Microbiol.
 135. Nakamura, T., T. Hasegawa, K. Torii, Y. Hasegawa, K. Shimokata and M. Ohta (2004). "Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the abundance of virulent exoproteins of group A streptococcus caused by environmental changes." Arch Microbiol **181**(1): 74-81.
 136. Nelson, L. (2004). "Potential drug target for flesh-eating bug." Drug Discov Today **9**(20): 862.
 137. Nitzsche, R., M. Rosenheinrich, B. Kreikemeyer and S. Oehmcke-Hecht (2015). "Streptococcus pyogenes triggers activation of the human contact system by streptokinase." Infect Immun.
 138. Nordqvist, G., A. Wallden, H. Brorson and J. Tham (2015). "Ten years of treating necrotizing fasciitis." Infect Dis (Lond) **47**(5): 319-325.
 139. Oelschlaeger, T. A., Hacker, J. (2000). Bacterial Invasion Into Eukaryotic Cells, Springer.
 140. Okamoto, S., S. Kawabata, Y. Terao, H. Fujitaka, Y. Okuno and S. Hamada (2004). "The Streptococcus pyogenes capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacterial-viral superinfection." Infect Immun **72**(10): 6068-6075.
 141. Olsen, R. J., S. A. Shelburne and J. M. Musser (2009). "Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis." Cell Microbiol **11**(1): 1-12.
 142. Orden, B., C. Navarro, E. Donoso and A. Franco (1991). "Streptococcus pyogenes not producing beta hemolysis during aerobiosis." Enferm Infecc Microbiol Clin **9**(8): 516-517.
 143. Otwinowski, Z. a. M. W. (1997). "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." Methods Enzymol. **276**: 307-326.
 144. Papadas, T. A., K. P. Karkoulis, N. S. Mastronikolis, F. L. Sampsonas and K. B. Spiropoulos (2008). "Concurrent tonsillitis and pneumonia due to S. pyogenes." Clin Ter **159**(1): 33-34.
 145. Peuckert, W. (1985). "Microbiology of streptococcal infections." Klin Padiatr **197**(1): 5-8.
 146. Pierce, W. A., Jr. (1957). "Glucose and galactose metabolism in Streptococcus pyogenes." J Bacteriol **74**(2): 186-193.
 147. Pritchard, D. G., J. E. Coligan, S. E. Speed and B. M. Gray (1981). "Carbohydrate fingerprints of streptococcal cells." J Clin Microbiol **13**(1): 89-92.

148. Puckett, S., C. Trujillo, H. Eoh, J. Marrero, J. Spencer, M. Jackson, D. Schnappinger, K. Rhee and S. Ehrt (2014). "Inactivation of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Prevents Optimal Co-catabolism of Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Substrates in *Mycobacterium tuberculosis*." PLoS Pathog **10**(5): e1004144.
149. Quinn, R. W. and S. J. Liao (1950). "A comparative study of antihyaluronidase, antistreptolysin "O," antistreptokinase, and streptococcal agglutination titers in patients with rheumatic fever, acute hemolytic streptococcal infections, rheumatoid arthritis and non-rheumatoid forms of arthritis." J Clin Invest **29**(9): 1156-1166.
150. Racker, E. (1947). "Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity." J Biol Chem **47**: 843-854.
151. Ramsaywak, P. C., G. Labbe, S. Siemann, G. I. Dmitrienko and J. G. Guillemette (2004). "Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*--a novel Class II A tetramer." Protein Expr Purif **37**(1): 220-228.
152. Rhodes, G. Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models, Academic Press.
153. Richards, O. C. and W. J. Rutter (1961). "Comparative properties of yeast and muscle aldolase." J Biol Chem **236**: 3185-3192.
154. Rosch, J. W. and E. Tuomanen (2007). "Adapting a diet from sugar to meat: double-dealing genes of *Streptococcus pyogenes*." Mol Microbiol **64**(2): 257-259.
155. Rose, I. A. and E. L. O'Connell (1969). "Studies on the interaction of aldolase with substrate analogues." J Biol Chem **244**(1): 126-134.
156. Rose, I. A. and E. L. O'Connell (1977). "Specificity of fructose-1, 6-P2 aldolase (muscle) and partition of the enzyme among catalytic intermediates in the steady state." J Biol Chem **252**(2): 479-482.
157. Rose, I. A. and S. V. Rieder (1958). "Studies on the mechanism on the aldolase reaction; isotope exchange reactions of muscle and yeast aldolase." J Biol Chem **231**: 315-329.
158. Royer, S. F., L. Haslett, S. J. Crennell, D. W. Hough, M. J. Danson and S. D. Bull (2010). "Structurally informed site-directed mutagenesis of a stereochemically promiscuous aldolase to afford stereochemically complementary biocatalysts." J Am Chem Soc **132**(33): 11753-11758.
159. Rutter, W. J. (1964). "Evolution of Aldolase." Fed Proc **23**: 1248-1257.
160. Rutter, W. J., O. C. Richards and B. M. Woodfin (1961). "Comparative studies of liver and muscle aldolase. I. Effect of carboxypeptidase on catalytic activity." J Biol Chem **236**: 3193-3197.
161. Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (2004). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, CRC Press.
162. Scamuffa, M. D. and R. M. Caprioli (1980). "Comparison of the mechanisms of two distinct aldolases from *Escherichia coli* grown on gluconeogenic substrates." Biochim Biophys Acta **614**(2): 583-590.

163. Schmidt, D. E., Jr. and F. H. Westheimer (1971). "pK of the lysine amino group at the active site of acetoacetate decarboxylase." Biochemistry **10**(7): 1249-1253.
164. Schoevaart, R., F. van Rantwijk and R. A. Sheldon (2000). "A four-step enzymatic cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol." J Org Chem **65**(21): 6940-6943.
165. Schottmuller, H. (1903). "Die Arunterscheidung des fur den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar." Munch. med. Wochschr. **50**: 849-853, 909-912.
166. Shannon, L. M. and A. Marcus (1962). "Gamma-Methyl-gamma-hydroxy-alpha-ketoglutaric aldolase. I. Purification and properties." J Biol Chem **237**: 3342-3347.
167. Shelburne, S. A., 3rd, D. B. Keith, M. T. Davenport, N. Horstmann, R. G. Brennan and J. M. Musser (2008). "Molecular characterization of group A Streptococcus maltodextrin catabolism and its role in pharyngitis." Mol Microbiol **69**(2): 436-452.
168. Sherman, J. M. and W. R. Albus (1918). "Some Characters which Differentiate the Lactic-acid Streptococcus from Streptococci of the Pyogenes Type Occurring in Milk." J Bacteriol **3**(2): 153-174.
169. Shet, A. and E. Kaplan (2004). "Addressing the burden of group A streptococcal disease in India." Indian J Pediatr **71**(1): 41-48.
170. Sitkiewicz, I. and J. Musser (2009). "Analysis of growth-phase regulated genes in Streptococcus agalactiae by global transcript profiling." BMC Microbiology **9**(1): 32.
171. Skattum, L., P. Akesson, L. Truedsson and A. G. Sjöholm (2006). "Antibodies against four proteins from a Streptococcus pyogenes serotype M1 strain and levels of circulating mannan-binding lectin in acute poststreptococcal glomerulonephritis." Int Arch Allergy Immunol **140**(1): 9-19.
172. Smith, P. W., S. L. Sollis, P. D. Howes, P. C. Cherry, I. D. Starkey, K. N. Copley, H. Weston, J. Scicinski, A. Merritt, A. Whittington, P. Wyatt, N. Taylor, D. Green, R. Bethell, S. Madar, R. J. Fenton, P. J. Morley, T. Pateman and A. Beresford (1998). "Dihydropyranocarboxamides related to zanamivir: a new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 1. Discovery, synthesis, biological activity, and structure-activity relationships of 4-guanidino- and 4-amino-4H-pyran-6-carboxamides." J Med Chem **41**(6): 787-797.
173. St-Jean, M., C. Blonski and J. Sygusch "Charge stabilization and entropy reduction of central lysine residues in fructose-bisphosphate aldolase." Biochemistry **48**(21): 4528-4537.
174. St-Jean, M., J. Lafrance-Vanasse, B. Liotard and J. Sygusch (2005). "High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-biphosphate aldolase." J.Biol.Chem. **280**: 27262-27270.
175. St-Jean, M. and J. Sygusch (2007). "Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase." J.Biol.Chem **282**: 31028-31037.

176. Starr, C. R. and N. C. Engleberg (2006). "Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus." Infect Immun **74**(1): 40-48.
177. Steele, R. H., A. G. White and W. A. Pierce, Jr. (1954). "The fermentation of galactose by *Streptococcus pyogenes*." J Bacteriol **67**(1): 86-89.
178. Stollerman, G. H. and J. B. Dale (2008). "The importance of the group A streptococcus capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective." Clin Infect Dis **46**(7): 1038-1045.
179. Stollerman, G. H. and R. Ekstedt (1957). "Long chain formation by strains of group A streptococci in the presence of homologous antiserum: a type-specific reaction." J Exp Med **106**(3): 345-356.
180. Stribling, D. and R. N. Perham (1973). "Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from *Escherichia coli* (Crookes' strain)." Biochem J **131**(4): 833-841.
181. Sugiyama, M., Z. Hong, W. A. Greenberg and C. H. Wong (2007). "In vivo selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD)." Bioorg Med Chem **15**(17): 5905-5911.
182. Sun, H., U. Ringdahl, J. W. Homeister, W. P. Fay, N. C. Engleberg, A. Y. Yang, L. S. Rozek, X. Wang, U. Sjobring and D. Ginsburg (2004). "Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection." Science **305**(5688): 1283-1286.
183. Takayama, S., G. J. McGarvey and C. H. Wong "Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars." Annu Rev Microbiol **51**: 285-310.
184. Thomas, D., T. Perpoint, O. Dauwalder, G. Lina, B. Floccard, J. C. Richard, A. Bouvet, D. Peyramond, B. Allaouchiche, C. Chidiac, F. Vandenesch, J. Etienne and T. Ferry (2008). "In vivo and in vitro detection of a superantigenic toxin Vbeta signature in two forms of streptococcal toxic shock syndrome." Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
185. Thomson, G. J., G. J. Howlett, A. E. Ashcroft and A. Berry (1998). "The *dhnA* gene of *Escherichia coli* encodes a class I fructose biphosphate aldolase." Biochem J **331** (Pt 2): 437-445.
186. van Rooijen, R. J., S. van Schalkwijk and W. M. de Vos (1991). "Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*." J Biol Chem **266**(11): 7176-7181.
187. Varadarajan, N., J. Gam, M. J. Olsen, G. Georgiou and B. L. Iverson (2005). "Engineering of protease variants exhibiting high catalytic activity and exquisite substrate selectivity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(19): 6855-6860.
188. Wang, A. Y., G. E. Gonzalez-Paez and D. W. Wolan (2015). "Identification and Co-complex Structure of a New *S. pyogenes* SpeB Small Molecule Inhibitor." Biochemistry **54**(28): 4365-4373.

189. Wang, J., A. J. Morris, D. R. Tolan and L. Pagliaro (1996). "The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants." *J Biol Chem* **271**(12): 6861-6865.
190. Warren, S., B. Zerner and F. H. Westheimer (1966). "Acetoacetate decarboxylase. Identification of lysine at the active site." *Biochemistry* **5**(3): 817-823.
191. Weidle, P. A., J. Brankamp, N. Dedy, C. Haenisch, J. Windolf and M. Jonas (2009). "Complication of a closed Colles-fracture: necrotising fasciitis with lethal outcome. A case report." *Arch Orthop Trauma Surg* **129**(1): 75-78.
192. Whiffin, R. A. (1903). "Puerperal Septicemia." *Cal State J Med* **1**(13): 395-397.
193. Williams, G. J., S. Domann, A. Nelson and A. Berry (2003). "Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3143-3148.
194. Williams, G. J., T. Woodhall, L. M. Farnsworth, A. Nelson and A. Berry (2006). "Creation of a pair of stereochemically complementary biocatalysts." *J Am Chem Soc* **128**(50): 16238-16247.
195. Williams, G. J., T. Woodhall, A. Nelson and A. Berry (2005). "Structure-guided saturation mutagenesis of N-acetylneuraminic acid lyase for the synthesis of sialic acid mimetics." *Protein Eng Des Sel* **18**(5): 239-246.
196. Windle, C. L., M. Muller, A. Nelson and A. Berry (2014). "Engineering aldolases as biocatalysts." *Curr Opin Chem Biol* **19**: 25-33.
197. Winn, M. D., C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin and K. S. Wilson (2011). "Overview of the CCP4 suite and current developments." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**(Pt 4): 235-242.
198. Yankeelov, J. A., Jr., C. D. Mitchell and T. H. Crawford (1968). "A simple trimerization of 2,3-butanedione yielding a selective reagent for the modification of arginine in proteins." *J Am Chem Soc* **90**(6): 1664-1666.
199. Zgiby, S. M., G. J. Thomson, S. Qamar and A. Berry (2000). "Exploring substrate binding and discrimination in fructose-1,6-bisphosphate and tagatose-1,6-bisphosphate aldolases." *Eur.J.Biochem* **267**: 1858-1868.