

Université de Montréal

**Vérification de la corrélation entre la fonction, la structure
et la dynamique sur un chemin évolutif recombinant les
 β -lactamases TEM-1 et PSE-4**

par
Sophie Gobeil

Département de biochimie et médecine moléculaire
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor*
en biochimie

Septembre, 2016

© Sophie Gobeil, 2016

Résumé

La corrélation, déjà bien établie, entre la structure et la fonction des enzymes a permis d'expliquer le mécanisme catalytique de plusieurs d'entre elles. Toutefois, des lacunes entourant l'explication de leur capacité à accélérer, si drastiquement, la vitesse réactionnelle subsistent toujours. L'une des hypothèses propose l'inclusion d'un rôle fonctionnel aux mouvements présents dans les enzymes. Un nombre grandissant d'évidences montrant un lien entre la dynamique et la fonction des protéines nous poussent, ici, à vérifier la présence d'une telle corrélation dans un contexte évolutif et à vérifier si la dynamique devrait être prise en compte afin de mieux faire l'ingénierie des enzymes.

Le modèle enzymatique étudié sera composé de deux β -lactamases naturellement évoluées et homologues, TEM-1 et PSE-4. Par la caractérisation de ces deux enzymes, structurellement et fonctionnellement similaires, nous avons observé que TEM-1 et PSE-4 possèdent une dynamique similaire, généralement restreinte, sur les échelles de temps allant des picosecondes aux millisecondes. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle la dynamique a été évolutivement maintenue dans ces enzymes, et suggèrent que celle-ci possède un rôle envers la fonction enzymatique, d'où son maintien au cours de l'évolution.

En laboratoire, plusieurs approches peuvent être utilisées afin de faire l'ingénierie des protéines. La recombinaison d'homologues est grandement utilisée, puisque cette méthode, mimant le processus naturel d'évolution par recombinaison, permet d'intégrer un grand nombre de mutations simultanées qui ont déjà été sélectionnées au cours de l'évolution. Notre modèle enzymatique sera constitué de trois enzymes chimériques issues de la recombinaison des β -lactamases TEM-1 et PSE-4. Ces enzymes représentent de potentiels intermédiaires évolutifs entre ces deux enzymes naturellement évoluées. Ces trois chimères ont été sélectionnées en fonction de leur site actif ayant été recombinaisonné. Nos résultats démontrent une conservation de l'efficacité catalytique, de la structure et de la dynamique rapide chez ces trois chimères. Toutefois, des changements importants de dynamique lente, coïncidant avec l'échelle de temps de la vitesse catalytique de ces enzymes, ont été observés. Une exploration *in silico* des conformations adoptées par les chaînes latérales des résidus catalytiques montre

des variations corrélant aux légères variations fonctionnelles (diminution du k_{cat} pour l'hydrolyse des céphalosporines) entre les β -lactamases TEM-1, PSE-4 et ces chimères.

Ces résultats mettent en évidence l'importance de caractériser les mouvements ayant lieu sur plusieurs échelles de temps afin de pouvoir comprendre leur rôle et de considérer ceux-ci relativement à la fonction de la protéine. Nous proposons ici que la dynamique rapide de ces enzymes est impliquée au niveau de leur réactivité hydrolytique (c'est-à-dire hydrolyser un β -lactame) alors que la dynamique lente pourrait être impliquée au niveau de la grande adaptabilité évolutive (reconnaissance non native de nouveaux antibiotiques de type β -lactame) de ces enzymes de résistance bactérienne.

Mots-clés : β -lactamases, chimères, évolution, ingénierie des protéines, analyse structure-fonction-dynamique, cristallographie par diffraction de rayons X, cinétique enzymatique, résonance magnétique nucléaire, simulation de dynamique moléculaire *in silico*.

Abstract

The link between enzyme structure and function is well established and has led to the description of many catalytic mechanisms. However, how enzymes accelerate the catalytic rate so drastically is still not fully understood. A growing amount of evidence linking protein dynamics to function, suggests that protein motions might have functional implications. This compels us to verify this correlation in an evolutionary context and to verify if protein dynamics should be considered to better engineer enzymes.

Our studied enzymatic model is composed of two homologous and naturally evolved bacterial resistance enzymes, the TEM-1 and PSE-4 β -lactamases. By characterizing these structurally and functionally similar enzymes, we confirmed that protein dynamics are evolutionarily conserved. Our results show that TEM-1 and PSE-4 maintain similar patterns of restricted dynamics on timescales ranging from picoseconds to milliseconds. This supports the hypothesis that dynamics have been evolutionarily maintained in these enzymes and is consistent with a contribution of dynamics to enzyme function resulting in the evolutionary maintenance of dynamics.

Various approaches are used to engineer proteins. Homologous recombination is extensively applied, as it mimics natural evolution. This technique allows the incorporation of many simultaneous sequence variations selected over the course of evolution. Our enzymatic model includes three chimeric enzymes, resulting from the recombination of TEM-1 and PSE-4. These represent intermediates over a hypothetical evolutionary path from TEM-1 to PSE-4. These artificially-evolved enzymes were selected to compose this system of evolutionarily related protein on the basis of their active site cavity having been recombined. A conservation of function, structure and fast dynamics was found in these chimeras. Striking variations of slow dynamics, occurring on a timescale coinciding with the catalytic turnover rate, were also observed. *In silico* exploration of the conformations adopted by the catalytic residue side-chains showed variations correlating with the functional diversification between TEM-1, PSE-4, and the chimeric β -lactamases.

These results highlight the importance of probing motions on various timescales to fully comprehend their role in function. We propose that dynamics on the faster timescales are

associated with the maintenance of reactivity in these enzymes, while modification of the slow dynamics may be associated with the high evolvability of these bacterial resistance enzymes.

Keywords : β -lactamases, chimeras, evolution, protein engineering, structure-function-dynamic analysis, X-ray crystallography, enzymatic kinetics, nuclear magnetic resonance, *in silico* molecular dynamic simulations.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | iii |
| Table des matières..... | v |
| Liste des tableaux..... | ix |
| Liste des figures..... | xii |
| Liste des abréviations..... | xvii |
| Remerciements..... | xx |
| | |
| Chapitre 1 – Introduction | 22 |
| 1.1. Perspectives historiques entourant la fonction, la structure et le dynamisme des protéines..... | 22 |
| 1.1.1. Découverte de la relation fonction – structure des protéines..... | 22 |
| 1.1.2. Découverte du dynamisme des protéines..... | 25 |
| 1.2. Dynamisme des protéines et importance pour la fonction enzymatique. | 28 |
| 1.3. Position du projet de recherche..... | 31 |
| 1.4. Choix du système expérimental en fonction des objectifs spécifiques..... | 32 |
| 1.4.1. Propriétés recherchées dans le choix d'un système expérimental | 32 |
| 1.4.2. Considération 1 : Les β -lactamases, système protéique vaste | 34 |
| 1.4.3. Considération 2 : TEM-1 et PSE-4, β -lactamases homologues de classe A..... | 36 |
| 1.4.4. Considération 3 : Connaissance de la structure et du mécanisme catalytique des β -lactamases TEM-1 et PSE-4 | 38 |
| 1.4.5. Considération 4 : Chimères de TEM-1 et PSE-4, modèle pour le développement d'une compréhension du rôle du dynamisme des protéines dans un cadre d'ingénierie et d'évolution | 43 |
| 1.5. Justification des méthodologies choisies pour examiner une potentielle relation fonction/structure/dynamique | 47 |
| 1.5.1. Évaluation de la fonction des protéines | 47 |

| | |
|---|----|
| 1.5.2. Évaluation de la structure des protéines..... | 48 |
| 1.5.3. Évaluation de la dynamique des protéines..... | 50 |
| Préface au chapitre 2..... | 63 |
| Chapitre 2 | 65 |
| Maintenir la dynamique native n'est peut-être pas nécessaire pour l'ingénierie de protéines fonctionnelles..... | 65 |
| 2.1. Article 1. Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins..... | 65 |
| SUMMARY..... | 66 |
| HIGHLIGHTS..... | 66 |
| INTRODUCTION..... | 67 |
| RESULTS..... | 70 |
| DISCUSSION..... | 79 |
| SIGNIFICANCE..... | 85 |
| EXPERIMENTAL PROCEDURES..... | 85 |
| REFERENCES..... | 89 |
| Préface au chapitre 3..... | 93 |
| Chapitre 3 | 94 |
| Assignment RMN des résonances ¹⁵ N, ¹³ C et ¹ H du squelette peptidique d'un mutant déconvolué et d'une chimère artificiellement évoluée des β-lactamase de classe A TEM-1 et PSE-4..... | 94 |
| 3.1. Article 2. ¹⁵ N, ¹³ C and ¹ H backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 class A β-lactamase chimera and its deconvoluted mutant..... | 94 |
| ABSTRACT..... | 95 |
| BIOLOGICAL CONTEXT..... | 95 |
| METHODS AND EXPERIMENTS..... | 97 |
| ASSIGNMENTS AND DATA DEPOSITION..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| CONCLUSION..... | 105 |
| REFERENCES..... | 106 |
| Préface au chapitre 4..... | 111 |
| Chapitre 4 | 112 |
| Conservation de la dynamique rapide accompagnée par des modifications de la dynamique lente dans des β -lactamases évolutivement apparentées..... | 112 |
| 4.1. Article 3. Conserved Fast Dynamics Accompanied by Altered Slow Conformational Dynamics in Evolutionarily Related β -Lactamases..... | 112 |
| SUMMARY..... | 113 |
| HIGHLIGHTS..... | 113 |
| eTOC BLURB..... | 113 |
| INTRODUCTION..... | 114 |
| RESULTS..... | 117 |
| DISCUSSION..... | 128 |
| SIGNIFICANCE..... | 134 |
| METHODS..... | 134 |
| ACKNOWLEDGMENTS..... | 135 |
| DATA DEPOSITION..... | 136 |
| AUTHOR CONTRIBUTIONS..... | 136 |
| REFERENCES..... | 136 |
| Préface au chapitre 5..... | 141 |
| Chapitre 5 | 143 |
| Évidences cristallographiques du dynamisme conformationnel des β -lactamases..... | 143 |
| 5.1. Manuscrit en préparation – Article 4. Crystallographic evidence for dynamic conformational exchange in β -lactamases..... | 143 |
| INTRODUCTION..... | 144 |
| RESULTS AND DISCUSSION..... | 147 |

| | |
|--|-------|
| CONCLUSION..... | 159 |
| DATA DEPOSITION..... | 159 |
| AUTHOR CONTRIBUTIONS..... | 159 |
| ACKNOWLEDGMENTS..... | 159 |
| REFERENCES..... | 160 |
| | |
| Chapitre 6 – Discussion et conclusion..... | 164 |
| 6.1. Ligands et caractérisation de la dynamique..... | 164 |
| 6.2. Importance évolutive de la dynamique..... | 170 |
| 6.3. Conclusion..... | 174 |
| | |
| Bibliographie | i |
| | |
| Annexe 1 – Matériel supplémentaire du chapitre 2..... | xi |
| Annexe 2 – Matériel supplémentaire du chapitre 3..... | xxiii |
| Annexe 3 – Matériel supplémentaire du chapitre 4..... | xxiv |
| Annexe 4 – Matériel supplémentaire du chapitre 5..... | xlii |
| Annexe 5 – Études d’inhibition des β -lactamases TEM-1 et PSE-4 et de chimères..... | li |
| Inhibiteurs classiques – sulbactame, tazobactame et acide clavulanique..... | li |
| Inhibiteur protéique – BLIP..... | lviii |

Liste des tableaux

Chapitre 1.

| | |
|---|----|
| Tableau 1.I. Variation de la séquence dans les régions échangées chez les chimères cTEM-2m, cTEM-17m et cTEM-19m..... | 46 |
|---|----|

Chapitre 2.

| | |
|---|----|
| Tableau 2.I. Comparison of the Crystal Structure of Chimera cTEM-17m with Its Parental Homologs TEM-1 and PSE-4. | 72 |
|---|----|

Chapitre 3.

| | |
|---|-----|
| Tableau 3.I. Kinetic constants for the hydrolysis of the chromogenic substrate CENTA by chimera cTEM-19m and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T)..... | 105 |
|---|-----|

Chapitre 4.

| | |
|--|-----|
| Tableau 4.I. Reaction scheme and turnover rate constants for the hydrolysis of cephalosporins by TEM-1, the chimeric β -lactamases and PSE-4 | 127 |
|--|-----|

Chapitre 6.

| | |
|---|-----|
| Tableau 6.I. Concentration minimale inhibitrice (CMI) en présence du céfotaxime pour TEM-1 et les variants du chemin évolutif impliquant les mutations A42G, E104K, M182T et G238S..... | 173 |
|---|-----|

Annexe 1.

| | |
|---|-----|
| Table A1.I, related to Figure 2.2: ΔR_2 values $\geq 7 \text{ s}^{-1}$, derived from TROSY-based CPMG experiments, and unassigned residues (NA) in TEM-1, PSE-4 and cTEM-17m. | xi |
| Table A1.II, related to Figure 2.3: Data collection and refinement statistics for the crystal structure of the cTEM-17m chimera (PDB 4ID4)..... | xiv |
| Table A1.III, related to Figure 2.3: Dihedral angles χ_1 and χ_2 of residue 105 in apoTEM-1, TEM-1 acyl-enzyme intermediate, PSE-4 and cTEM-17m. | xiv |

Annexe 3.

| | |
|---|-------|
| Table A3.I. Refers to Figure 4.2; (a) Data collection and refinement statistics and (b) $C\alpha$ RMSD and secondary structure matching RMSD (in parentheses)..... | xxiv |
| Table A3.II. Refers to Figure 4.3; Dynamics of the naturally evolved class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4 and chimeric β -lactamases cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m..... | xxv |
| Table A3.III. Refers to Figure 4.3; $C\alpha$ -RMSD between the average structure from each 2 μ s simulation and the crystal structure used for that simulation..... | xxv |
| Table A3.IV. Refers to Figure 4.3; Per residue S^2 extracted from MD simulations.... | xxv |
| Table A3.V. Refers to Figure 4.3; Per residue $C\alpha$ -RMSF extracted from triplicate MD simulations | xxv |
| Table A3.VI. Refers to Figure 4.3; Differences in measured R_2 ($1/\tau_{cp}$) at fast ($\tau_{cp} = 0.625$ ms) and slow ($\tau_{cp} = 10$ ms) pulsing rates | xxv |
| Table A3.VIII. Refers to Table 4.I; Kinetic parameters for hydrolysis of the cephalosporins cephalothin (CF), cefazolin (CZ) and cefotaxime (CTX) and penicillins benzylpenicillin (BZ) and carbenicillin (CB) by the parental β -lactamases TEM-1 and PSE-4, the chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m and the deconvoluted mutants in the cTEM-17m context (cTEM-18m(M68L) and cTEM-18m(M69T)) and the TEM-1 context (TEM-1(M68L) and TEM-1(M69T))..... | xxvii |

Annexe 4.

| | |
|---|------|
| Table A4.I. Data collection and refinement statistics for crystal structures of chimera cTEM-19m showing different conformations..... | xliv |
| Table A4.II. Rotamer adopted by TEM-1, PSE-4 and the chimeras cTEM-2, cTEM-17m and cTEM-19m in the crystal structures and over the 6 μ s of MD simulation.... | xliv |

Annexe 5.

| | |
|---|-----|
| Tableau A5.I. Constantes cinétiques de l'inhibition de TEM-1 et du variant TEM-1(M69L) par les inhibiteurs classiques, sulbactame, tazobactame et clavulanate. | liv |
|---|-----|

| | |
|---|-------|
| Tableau A5.II. K_i calculé selon la méthode graphique de Dixon pour l'inhibition de TEM-1, PSE-4, cTEM-17m et cTEM-19m par le tazobactame et le sulbactame en présence du substrat CENTA..... | lv |
| Tableau A5.III. Concentration d'urée où une enaturation de 50% de la protéine d'intérêt (C_m) est observée lors de l'expérience de protéolyse pulsée..... | lxiii |
| Tableau A5.IV. T_m de TEM-1, BLIP et de la combinaison de ces protéines résultant fluorimétrie différentielle..... | lxvii |

Liste des figures

Chapitre 1.

| | |
|---|----|
| Figure 1.1. Schéma des modèles de reconnaissance moléculaire « <i>Lock and Key</i> » (1894) (4) et « <i>Induced Fit</i> » (1958) (11) expliquant la reconnaissance d'un substrat par une enzyme. | 24 |
| Figure 1.2. Schéma des modèles de reconnaissance moléculaire « <i>Lock and Key</i> » (1894) (4), « <i>Induced Fit</i> » (1958) (11) et sélection conformationnelle (1964) (27). | 26 |
| Figure 1.3. Représentation d'un paysage énergétique et des états de repliement d'une protéine qui y sont associés. | 27 |
| Figure 1.4. Mouvements atomiques des protéines. | 29 |
| Figure 1.5. Superposition de la structure tridimensionnelle de TEM-1 et PSE-4. | 37 |
| Figure 1.6. Topologie et murs formant la cavité du site actif des β -lactamases de classe A TEM-1 et PSE-4. | 39 |
| Figure 1.7. Représentation du mécanisme catalytique des β -lactamases TEM-1 et PSE-4 illustrant l'hydrolyse d'une pénicilline. | 40 |
| Figure 1.8. Profil de perturbation des protéines TEM-1 et PSE-4 selon l'algorithme SCHEMA. | 45 |
| Figure 1.9. Chimères cTEM-2m, cTEM-17m et cTEM-19m issue de la recombinaison de TEM-1 et PSE-4. | 46 |
| Figure 1.10. Processus du développement d'un modèle de structure atomique d'une protéine par la méthodologie de cristallographie par diffraction de rayons X. | 49 |
| Figure 1.11. Corrélation du spectre RMN-HSQC bidimensionnel aux spectres RMN tridimensionnels. | 56 |
| Figure 1.12. Représentation de la magnétisation et du transfert de celle-ci pour un résidu « i » et son voisin « i-1 » au cours des différentes expériences de RMN réalisées pour l'assignation des résonances d'une protéine. | 56 |
| Figure 1.13. Représentation d'une stratégie simplifiée d'assignation des résonances pour un résidu « i » d'une protéine utilisant différentes expériences tridimensionnelles permettant une corrélation entre les carbones suite à l'alignement avec la dimension azote. | 57 |

| | |
|--|----|
| Figure 1.14. Échelle de temps des différents mouvements atomiques présents dans les protéines et expériences RMN permettant leurs caractérisations. | 58 |
|--|----|

Chapitre 2.

| | |
|---|----|
| Figure 2.1. Relation of Chimera cTEM-17m to the Parental TEM-1 and PSE-4 Class A β -lactamases. | 69 |
| Figure 2.2. Slow Timescale Conformational Dynamics Measured by ^{15}N CPMG NMR for β -lactamase, TEM-1, PSE-4 and Chimera cTEM-17m. | 71 |
| Figure 2.3. Crystal Structure of cTEM-17m Overlaid on TEM-1. | 74 |
| Figure 2.4. Chimera cTEM-17m Has Altered Slow-Timescale Dynamics. | 76 |
| Figure 2.5. Effect of Structure-Based Recombination on Backbone Chemical Shifts and on Structure. | 77 |
| Figure 2.6. ^{15}N CPMG Conformational Dynamics for Residues Selected on the Basis of Altered Dynamics in cTEM-17m. | 82 |

Chapitre 3.

| | |
|--|-----|
| Figure 3.1. Relation of TEM-1 and PSE-4 to the chimeras cTEM-17m and cTEM-19m, and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T). | 97 |
| Figure 3.2. Two-dimensional ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the chimera cTEM-19m. | 101 |
| Figure 3.3. Two-dimensional ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the TEM-1(M68L-M69T) variant. | 102 |
| Figure 3.4. Thermal denaturation of the chimera cTEM-19m and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T). | 104 |

Chapitre 4.

| | |
|---|-----|
| Figure 4.1. Relation of chimeras and the deconvoluted mutants to the parental class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4. | 116 |
| Figure 4.2. Crystal structures of cTEM-2m and cTEM-19m. | 118 |
| Figure 4.3. β -Lactamase dynamics on the ps to ms timescales. | 124 |
| Figure 4.4. Global exchange rates (k_{ex}) of cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m. | 125 |

| | |
|---|-----|
| Figure 4.5. Distribution of motions in the β -lactamases over the 3 observed timescales in relation to the linear sequence..... | 131 |
|---|-----|

Chapitre 5.

| | |
|---|-----|
| Figure 5.1. Relation of chimeras to the parental class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4. | 145 |
| Figure 5.2. Crystal structures of cTEM-19m..... | 148 |
| Figure 5.3. C α -RMSD to TEM-1 (PDB 1XPB) of all TEM-1 and PSE-4 variants available in the PDB based on Uniprot entries P62593 and P16897..... | 149 |
| Figure 5.4. C α B-factors for PSE-4, TEM-1 and chimeras extracted from their respective PDB structures. | 151 |
| Figure 5.5. Ramachandran plot of the ϕ and ψ angles of TEM-1, PSE-4 and the chimeras cTEM-19m or cTEM-2m for residues A. Met/Thr69 and B. Glu/Thr104 and Tyr105 over the 6 μ s of simulation..... | 153 |
| Figure 5.6. Cluster analysis of the loop 214-218 for TEM-1, PSE-4, and the chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m..... | 154 |
| Figure 5.7. Superposition of all structures of TEM-1, PSE-4 and variants found in the PDB..... | 156 |

Chapitre 6.

| | |
|---|-----|
| Figure 6.1. Inhibiteurs des β -lactamases utilisés en clinique (A) et formation du complexe enzyme-inhibiteur (B). | 166 |
| Figure 6.2. Mécanisme de l'inhibition par le clavulanate montrant les différents sous-produits possibles au cours de la réaction..... | 167 |
| Figure 6.3. Analogues boronate des substrats des β -lactamases..... | 168 |
| Figure 6.4. Comparaison de l'état de transition lors de la liaison au céfotaxime ou à un analogue boronate du céfotaxime. | 168 |
| Figure 6.5. Modèle de l'interaction entre BLIP et cTEM-19m. | 169 |
| Figure 6.6. Modèle hypothétique du rôle évolutif de la dynamique envers la fonction enzymatique..... | 172 |

Annexe 1.

| | |
|--|-------|
| Figure A1.1: CPMG-NMR relaxation curves for TEM-1 (A) and PSE-4 (B) at 800MHz (full line) and 500MHz (dashed line). The residue number appears above each plot. | xv |
| Figure A1.2: Residue-specific transverse relaxation rates (R_2 for $\tau_{cp} = 0.625$ ms) for TEM-1 (A), PSE-4 (B), and cTEM-17m (C)..... | xvi |
| Figure A1.3, related to figure 2.2: Surface charges of the 150-190 region in TEM-1 (top), or cTEM-17 and PSE-4..... | xvii |
| Figure A1.4, related to figure 2.3: ^1H - ^{15}N HSQC spectra for TEM-1 (Savard and Gagné, 2006), cTEM-17m (Morin, et al., 2010) and an overlay of TEM-1/cTEM-17m..... | xviii |
| Figure A1.5, related to figure 2.2: Crystallographic B-factors for cTEM-17m..... | xix |
| Figure A1.6: CPMG-NMR relaxation curves for cTEM-17m at 800MHz (full line) and/or 600MHz (dashed line). The residue appears above each plot. | xxi |

Annexe 3.

| | |
|--|--------|
| Figure A3.1. Refers to Figure 4.3; Sequence relation in the exchanged regions of the chimeras (residues 66-73 and 150-190) to the parental TEM-1 and PSE-4 class A β -lactamases and generalized squared order parameters (S^2) along the protein sequence for the amide NH bonds..... | xxix |
| Figure A3.2. Refers to Figure 4.3; $\text{C}\alpha$ RMSF derived from triplicate 2 μs MD simulations | xxx |
| Figure A3.3. Refers to Figure 4.3 and 4.4; Effect of the recombination of regions 66-73 and 150-190 on the backbone chemical shifts. | xxxii |
| Figure A3.4a. Refers to Figure 4.3; ^{15}N -CPMG relaxation dispersion curves for cTEM-2m at 800 MHz (full line) and 500 MHz (dashed line). | xxxiii |
| Figure A3.4b. Refers to Figure 4.3; ^{15}N -CPMG relaxation dispersion curves for cTEM-19m at 800 MHz (full line) and 600 MHz (dashed line). The residue number appears above each plot. | xxxiv |

Annexe 4.

| | |
|--|------|
| Figure A4.1. Class A β -lactamases catalytic mechanism. | xlii |
|--|------|

| | |
|--|-------|
| Figure A4.2. Correlation between amount of side chain alternate states and the crystal structure resolution for all PDB entries found for uniprot entry P62593 (TEM-1) and P16897 (PSE-4). | xliii |
|--|-------|

Annexe 5.

| | |
|--|------|
| Figure A5.1. Inhibiteurs « classiques » des β -lactamases et comparaison à la structure de la benzylpénicilline. | lii |
| Figure A5.2. Mécanisme simplifié d'inhibition des β -lactamases de classe A par les inhibiteurs classiques. | lii |
| Figure A5.3. Mécanisme de l'inhibition par le clavulanate montrant les différents sous-produits possibles au cours de la réaction. | liii |
| Figure A5.4. Exemple de graphiques de Dixon pour l'inhibition des chimères cTEM-17m (A et B) et cTEM-19m (C et D) par le sulbactame (A et C) et le tazobactame (B et D). | lvi |
| Figure A5.5. Gel SDS-PAGE tricine représentatif de la pureté obtenue suite à la purification de BLIP selon le protocole exposé. | lix |
| Figure A5.6. Schéma expérimental d'une expérience type de protéolyse par impulsion. lx | |
| Figure A5.7. Quantification sur gel de la stabilité de TEM-1, BLIP et la combinaison de ces deux protéines selon la méthodologie de protéolyse pulsée. | lxii |
| Figure A5.8. Courbe de dénaturation thermique d'une protéine d'intérêt au cours d'une expérience de fluorimétrie différentielle en présence de SYPRO orange. | lxiv |
| Figure A5.9. Courbe de fluorescence (gauche) et première dérivée de celle-ci (droite) résultant de l'expérience de dénaturation thermique en présence de SYPRO orange de TEM-1 (A), BLIP (B) et de la combinaison des deux protéines (C et D) permettant l'obtention de T_m | lxvi |

Liste des abréviations

| | |
|----------------------|---|
| AMP | Ampicilline |
| bp | Paire de base (base pair) |
| BMRB | Biological Magnetic Resonance Bank |
| BZ | Benzylpénicilline (Pénicilline G) |
| CD | Dichroïsme circulaire (Circular Dichroism) |
| CF | Céphalothine |
| CPMG-NMR | Séquence de pulse électromagnétique Car-Purcell-Meiboom-Gill |
| CTX | Céfotaxime |
| CZ | Céfazoline |
| δ | Déplacement chimique |
| $\Delta\delta$ | Variation du déplacement chimique |
| Da | Dalton (1 g/mol) |
| DM (MD) | Dynamique moléculaire <i>in silico</i> |
| ε | Coefficient d'extinction molaire |
| E.C. | Numéro de classification des enzymes (Enzyme Commission number) |
| <i>E. coli</i> | Escherichia coli |
| ESBL | β -lactamase à large spectre de reconnaissance (Extended-Spectrum β -lactamase) |
| HN | Vecteur proton-azote |
| HSQC | Spectre ^1H - ^{15}N à deux dimensions (Heteronuclear Single Quantum Correlation) |
| IPTG | Isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside |
| IRT | β -lactamase résistante aux inhibiteurs (Inhibitor-Resistant TEM β -lactamase) |
| Kan | Kanamycine |
| k_{ex} | Taux d'échange conformationnel |
| k_{cat} | Constante catalytique de roulement ou turnover number |
| k_{cat}/K_M | Efficacité catalytique |
| K_M | Constante de Michaelis-Menten |
| LB | Luria-Bertani |
| MIC | Concentration minimale inhibitrice (Minimal Inhibitory Concentration) |

| | |
|-----------|---|
| MWCO | Molecular weight cut-off ou seuil de masse moléculaire |
| NOE | Nuclear Overhauser Effect |
| PBP | D-Ala-D-Ala transpeptidases (Penicillin Binding Proteins) |
| PCR | Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction) |
| PDB | Protein Data Bank |
| ppm | Partie par million |
| R_1 | Relaxation longitudinale |
| R_2 | Relaxation transversale |
| R_{ex} | Paramètre d'échange conformationnel (mouvements μ s-ms) |
| RMN (NMR) | Résonance magnétique nucléaire |
| RMSD | Root mean square deviation |
| RMSF | Root mean square fluctuation |
| S^2 | Paramètre d'ordre (mouvement ps-ns) |
| SDS-PAGE | Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium |
| SSM | Secondary structure match |
| Tris-Cl | Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol |
| TROSY | Spectroscopie optimisée de relaxation transversale (Transverse relaxation-optimized spectroscopy) |
| UV | Ultra-violet |
| WT | Wild-type ou type sauvage |
| Xaa | Acide aminé |

Dans les champs de l'observation, le hasard ne favorise que les esprits préparés.

Louis Pasteur 1854

Discours prononcé à Douai, le 7 décembre 1854, à l'occasion de l'installation solennelle
de la Faculté des lettres de Douai et de la Faculté des sciences de Lille.

*The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not
'Eureka!' but 'That's funny...'*

Isaac Asimov, 1987.

Inspired by Alexander Fleming: « . . . Fleming while explaining the staphylococcal
work to Pryce, to demonstrate a point, picked up one of the top layer of the discarded
plates when he noticed the lysis of the staphylococci (his **cry of Eureka** was **'That's
funny!'**) and then and there made a subculture of the mould. »

Ainsworth GC. Introduction to the History of Mycology. Cambridge: Cambridge
University Press; 1976.

Remerciements

Quand je pense à tout ce que cette thèse représente pour moi, je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée pour toutes ces personnes qui ont contribué de près ou de loin à mon développement scientifique !

J'aimerais tout d'abord remercier mes parents, qui dès mon plus jeune âge, ont su me pousser à toujours poser des questions et ainsi découvrir la science. Allant de mon premier kit de « chimie », avec lequel je faisais des expériences en me disant que ça allait peut-être exploser (*certaines membres du labo me reconnaîtront ici ☺*), à toutes sortes de lecture (*me menant à découvrir mon premier idole : Louis Pasteur*), vous avez su au cours de toutes ces années stimuler mon esprit curieux qui en demandait toujours plus. Merci d'avoir ouvert toutes les portes et d'avoir été présents à tous les niveaux ! (*Comme tu le dis maman : 1/3 de cette thèse t'es dû ! haha !*). Je vous en suis infiniment reconnaissante ! Alexandra, petite sœur, autant nous avons eu des années difficiles, autant aujourd'hui, je suis ébahie de te voir évoluer dans le monde scientifique. Lâche pas la grande ! C'est dur ce chemin, mais crois moi, ça en vaut le coup !

J'aimerais aussi prendre le temps de souligner l'influence importante que les expos-sciences et mes premiers stages ont eus sur mes ambitions de carrière. Grâce à ce programme, à des professeurs motivés (Mme Grégoire, Mme Boyd, Mme Pelletier, M Lachapelle) et à des chercheurs qui m'ont donné l'opportunité de travailler dans leurs laboratoires malgré que je n'étais qu'une étudiante du secondaire ou CÉGEP, j'ai rapidement su que je voulais faire et vulgariser de la science. Merci à mes premiers directeurs de m'avoir permis d'explorer dans leurs laboratoires : Bertrand Bolduc, Dr Jean-Christophe Leroux (son étudiante Aude Motulsky), Dr Marc Servant (ces étudiants Simon-Pierre Gravel et Jean-François Clément), Olivier Lagueux et Dre Françoise Blain (Celmed Theratechnologies) et Dr Francis Arhin et Dr Kumar Ramakrishnan (Phagotech). Par la chance que vous m'avez offerte, vous avez su nourrir ma passion et ainsi contribuer mon projet de doctorat !

Au cours de ces années passées aux d'études graduées, j'y ai rencontré une multitude de personnes, qui toutes, m'ont influencé d'une façon ou d'une autre. Merci à vous tous : Jonathan Blanchet et Dr. Christopher Clouthier – *ceux qui m'ont supervisé dans le labo*, Dominic Bastien, Dr. Damien Colin, Vanessa Guerrero, Lorea Alejaldre (*Bonne continuation*

*pour la suite du projet et bravo pour ton projet de verdissement du labo ☺), Princesse Jacynthe Toulouse, Sarah Abraham, Natalie Rachel, Daniela Quaglia, Olivier Rousseau (*Pas Game!!!*), David Charbonneau, Natalia Kadnikova, Pierre-Yves DeWals, Jordan Volpato – Vous avez tous été des compatriotes hors-pair ! Un merci tout spécial à un collègue, collaborateur mais avant tout ami : Maximillian Ebert. Notre rencontre à l'été 2008 a marqué le début d'une amitié, qui malgré la distance et les embuches, a toujours été présente. Tous ces rires, ces idées, ces discussions et ces moments hors-labo que nous avons partagés au cours des années ont grandement contribué à rendre ces années d'études graduées encore plus mémorables ! *Merci à toi Max, Passe me voir en Caroline ! La bière t'y attendra ! (De la vieux Montréal assurément!) et bisous à Inga et Julie ☺ !**

Un grand merci à tous mes collaborateurs qui m'ont accompagné avec leurs expertises dans la réalisation de ce grand projet. Dr Nicolas Doucet – d'abord étudiant quittant le labo me léguant son projet de doc puis Professeur Doucet, Dr Donald Gagné – *toutes ces journées à analyser les courbes CPMG des méga β -lac !*, Dr Jaeok Park – *Sont-tu assez cool ces cristaux ?*).

Finalement, j'aimerais remercier deux personnes sans qui tout ceci n'aurait pas été possible : mon conjoint, Mathieu Flamand, et ma directrice de thèse, Professeur Joelle Pelletier.

Mathieu, merci d'avoir toujours été présent, écoutant, challengeant et d'être qui tu es ! *L'humour à la Mathieu ☺ !* Durant toutes ces années, tu as su être un compagnon de vie, un ami, un collègue et encore bien plus, avec qui partager tous ces fous rires, ces idées et ces projets de vie les rends tellement plus intéressants et merveilleux ! *Prêt pour les prochains défis ? On commence par ce déménagement pendant l'état d'urgence à cause de l'ouragan Matthew!*

Joelle, merci pour tout ! Au cours de toutes ces années, tu as su être une directrice exceptionnelle. Compréhensive, la porte de bureau toujours ouverte, tu as su dès mon premier stage et tout au long mon doctorat me pousser au dépassement. Aujourd'hui je quitte ton laboratoire remplie de projets et de confiance pour ce qui m'attends dans le futur ! Merci d'avoir toujours cru en moi au cours de toutes ces années et de m'avoir laissé toute la latitude nécessaire pour mon exploration ! Tu restes un modèle à suivre pour les prochaines étapes !

Chapitre 1 – Introduction

1.1. Perspectives historiques entourant la fonction, la structure et le dynamisme des protéines

1.1.1. Découverte de la relation fonction – structure des protéines

Déjà, en 1835, le chimiste organicien néerlandais Gerardus Johannes Mulder décrit une substance primaire qu'il retrouve dans des extraits cellulaires provenant de divers organismes. Il nomme cette substance, composée d'hydrogène, de carbone, d'azote, d'oxygène et de ratios variables de soufre et phosphore, « *woetelstof* » (1). En 1838, suite à des échanges avec Jons Jacob Berzelius, Mulder renomme cette substance « *protéine* » afin de mettre l'emphase sur son aspect de matière première essentielle à la vie (du grec ancien *prôtos* signifiant premier, essentiel).

Quelques années plus tard, des brasseurs de la région de Lille en France ont des difficultés de production et de conservation de leur bière. Louis Pasteur, alors professeur de chimie et doyen de la faculté des sciences de l'université Lille, est appelé à investiguer le problème de par son intérêt pour la fermentation. Entre 1854 et 1857, il observe que la production d'alcool rendant la bière si délectable est la résultante de la fermentation des sucres par des levures de bière et que, lorsque ces levures sont absentes, on assiste plutôt à une fermentation lactique rendant la solution aigre, amère et visqueuse. Pasteur propose donc qu'un élément spécifique aux levures de bière, le ferment, est essentiel à la fermentation alcoolique (2). Ce n'est que quelques années plus tard, en 1878, que le terme « *enzyme* », du grec *en-* « dans » et *-zyme* « levure », est introduit par Frederich Wilhelm Kühne. Ce terme plus général sera utilisé pour désigner des substances provenant de microorganismes et produisant des réactions chimiques, plutôt que le terme « *ferment* » précédemment utilisé. En 1897, Eduard Buchner (prix Nobel de chimie de 1907) démontre pour la première fois qu'un extrait de levures ne contenant pas des cellules intactes, soit un extrait cellulaire, est suffisant pour produire la réaction de fermentation alcoolique (3). Ceci démontrera que ce ne sont pas

les levures qui sont essentielles à la fermentation, mais plutôt ce qu'elles contiennent, ce qu'il nommera « *zymase* ».

En 1894, le chimiste allemand Emil Fischer (Prix Nobel de 1902) propose un premier mécanisme pour tenter d'expliquer le fonctionnement et la spécificité des enzymes. Ce modèle, nommé « serrure et clé » (ou *lock and key*), propose qu'un substrat (la clé) possède une conformation parfaitement complémentaire au site réactionnel de l'enzyme (la serrure) (**Figure 1.1**). Selon ce modèle, la complémentarité entre la cavité active de l'enzyme et le substrat est fondamentale et absolument nécessaire (4). Ce modèle, supposant une rigidité de l'enzyme, explique très bien la sélectivité des enzymes, mais rapidement différentes démonstrations de promiscuité de celles-ci ont mené à remettre ce modèle en question.

Jusqu'au début 1900, les enzymes sont considérées comme étant des protéines. Par contre, de par la difficulté de maintenir l'activité enzymatique au cours de l'isolation et de la purification de celles-ci, plusieurs ont pensé que les enzymes n'étaient peut-être pas actives en elles-mêmes, mais qu'elles posséderaient plutôt des composés en leur surface entraînant une activité catalytique. En 1926, James Sumner réussit pour la première fois à purifier, cristalliser et mesurer l'activité enzymatique d'une enzyme, soit de l'uréase de haricot. Par ces travaux, il fait la démonstration que les enzymes sont bel et bien des protéines actives (5). Au cours des années subséquentes, plusieurs remettront ces résultats en doute jusqu'à ce que quelques années plus tard (1930), John H. Northrop (6, 7) et Wendell M. Stanley (8) confirment les résultats de Sumner. En cristallisant et démontrant l'activité enzymatique de la pepsine, de la trypsine et de la chymotrypsine à l'état pur, Northrop et Stanley démontreront la véracité des travaux de Sumner. Ils partageront le prix Nobel de chimie de 1946 pour cette démonstration d'activité catalytique des enzymes pures dans un état cristallin (9). En 1951, Linus Pauling et Robert B. Corey proposent la première description théorique des éléments structuraux régissant l'organisation secondaire des chaînes polypeptidiques : les hélices α et les feuillets β (10).

Avec ces nouvelles évidences enzymatiques et structurelles, Daniel E. Koshland Jr. propose, en 1958, une modification au modèle « *lock and key* » de Fischer. Ce nouveau modèle tente de mieux expliquer la spécificité, la reconnaissance et la promiscuité des enzymes envers leurs substrats. Son modèle « d'ajustement induit » (ou *induced fit*) veut que la conformation du site actif d'une enzyme se module grâce à des changements de

conformation induits par la liaison d'un substrat qui, lui, est rigide (11). Ce modèle est l'un des premiers exemples où l'idée du mouvement (dynamisme) des protéines est impliquée dans la fonction enzymatique (Figure 1.1).

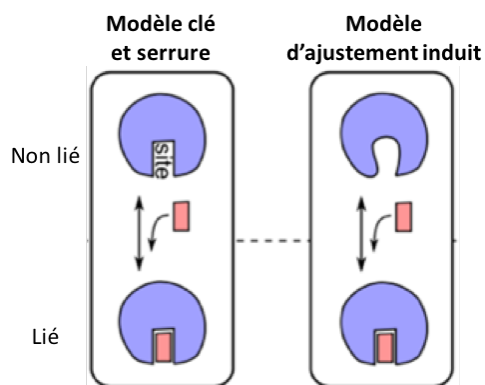


Figure 1.1. Schéma des modèles de reconnaissance moléculaire « *Lock and Key* » (1894) (4) et « *Induced Fit* » (1958) (11) expliquant la reconnaissance d'un substrat par une enzyme.

(Image adaptée de Mannige et al. 2014 (12))

Cette même année, John Kendrew et collaborateurs résolurent une première structure cristalline tridimensionnelle de protéine par diffraction de rayons X, celle de la myoglobine. La résolution obtenue est encore trop faible pour révéler le détail atomique de cette première structure, mais elle permet tout de même d'en observer le repliement tridimensionnel (13). Quelques années plus tard (1960), Max Ferdinand Perutz et collaborateurs résolurent la structure globulaire de l'hémoglobine, une protéine hétérotétramérique, révélant ainsi pour la première fois le détail atomique d'une protéine (14). Ces travaux et ceux de Kendrew leur vaudront le prix Nobel de chimie en 1962.

Au cours des années subséquentes, plusieurs structures cristallines d'enzymes ont été résolues dont notamment celle du lysozyme (1965), permettant à David Chilton Phillips de proposer un premier mécanisme catalytique pour expliquer le fonctionnement de cette enzyme (15). La résolution de la α -chymotrypsine (1967) (16), la ribonucléase (1967) (17), la carboxypeptidase (1969) (18) et la nucléase de *Staphylococcus aureus* (1971) (19) suivront de peu. Aujourd'hui, on compte près de 114 000 structures de protéines déposées dans la PDB – Protein Data Base (rcsb.org), dont près de 102 000 résolues par cristallographie par diffraction

de rayons X. On assiste actuellement à une explosion de la quantité de nouvelles données structurales. À titre d'exemple, on compte près de 8700 nouvelles structures résolues annuellement au cours des trois dernières années.

Tous ces travaux de biologie structurale et d'enzymologie ont rapidement mené à la démonstration d'un lien moléculaire entre la fonction et la structure des enzymes. Par contre, de par l'obtention de multiples structures dont certaines montrant parfois des conformations différentes de la même protéine, le concept de dynamisme des protéines a rapidement été soulevé comme ayant un potentiel rôle pour la fonction enzymatique.

1.1.2. Découverte du dynamisme des protéines

Les protéines ont longtemps été perçues comme étant statiques et rigides (20). Cette vision a été entretenue par plusieurs facteurs dont, notamment, les débuts de la résolution de structures par diffraction de rayons X, donnant une image d'une protéine dans un état cristallin et donc fixé dans le temps (comme une photographie). Le dogme d'Anfinsen (ou hypothèse de thermodynamique) proposé par Christian Boehmer Anfinsen en 1954 (prix Nobel de chimie de 1972 pour la démonstration du lien fonction/structure de la ribonucléase), proposant que la structure d'une protéine ne soit qu'uniquement déterminée par sa séquence peptidique primaire, a aussi contribué à cette vision de statisme des protéines. Selon cette proposition, il n'y aurait qu'un seul repliement énergétiquement favorable et donc fonctionnel pour une séquence peptidique donnée, soit l'état natif (21). Par contre, cette idée a rapidement été remise en doute.

En 1950, en observant une diversité de conformères présents en équilibre dans une solution d'albumine de sérum bovin, Fred Karush émet l'hypothèse de l'adaptabilité conformationnelle des protéines (22). Cette idée est aussi introduite dans le modèle d'ajustement induit de Koshland où les enzymes ne sont pas complètement rigides (11). Suite à la résolution du détail atomique des structures de la myoglobine (1958) (13) et de l'hémoglobine (1960) (14), il est devenu évident que les protéines devaient posséder un dynamisme puisqu'un mouvement des acides aminés était nécessaire afin de créer un passage pour l'atome d'oxygène retrouvé au cœur de l'hème de la protéine (23).

Entre 1954 et 1960, Kaj Linderstrøm-Lang développe la technique d'échange

hydrogène-deutérium (*H/D-exchange*) afin de caractériser diverses protéines pour confirmer la présence des éléments structuraux proposés par Pauling en 1951 (hélices α et feuillets β). Ces travaux confirmeront la présence de ces éléments structuraux et démontreront aussi que les protéines peuvent subir de grandes fluctuations structurales. Il propose les différents niveaux d'organisation du repliement de la séquence peptidique soient: primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (24, 25).

En 1964, Gordon G. Hammes tente d'expliquer le mécanisme de la ribonucléase et y inclut l'idée que les protéines possèdent un dynamisme important pour la fonction. Toutefois, par le manque d'évidences expérimentales de ces mouvements atomiques, il propose que ceux-ci ne sont simplement pas encore observables par les méthodologies disponibles à cette époque (26). Cette même année, Brunò Ferenc Straub propose le modèle de « sélection conformationnelle » (ou *conformational selection*, *population selection*, *fluctuation fit* ou *selected fit*), où la protéine est présente en solution sous différentes conformations dynamiquement interchangeables (*fluctuating enzyme*). Dans ce modèle, le substrat se lie préférentiellement à un état compatible de l'enzyme et stabilise celui-ci (Figure 1.2) (27). Ce modèle explique aussi beaucoup plus efficacement la promiscuité de certaines enzymes envers différents substrats.

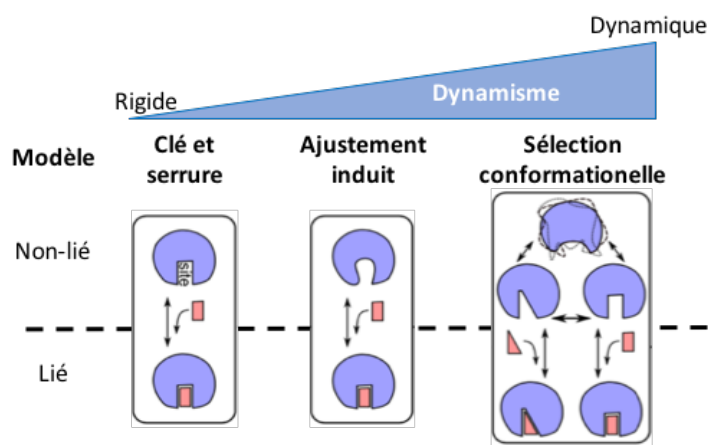


Figure 1.2. Schéma des modèles de reconnaissance moléculaire « *Lock and Key* » (1894) (4), « *Induced Fit* » (1958) (11) et sélection conformationnelle (1964) (27).

Image adaptée de Mannige et al. 2014 (12)

En 1966, Peter Zavodszky et collaborateurs obtiennent les premières évidences expérimentales de l'existence d'un tel mécanisme de dynamisme conformationnel des protéines (28). En utilisant la technique de photolyse par flash, Hans Frauenfelder et collaborateurs caractérisent en 1975 l'échange de liaison à la myoglobine entre l'oxygène et le monoxyde de carbone. Ceci leur permettra d'obtenir un portrait complet des multiples états conformationnels de cette protéine en solution (29). Leurs caractérisations des différentes barrières énergétiques séparant les intermédiaires présents en solution les mènent à proposer le concept de paysage énergétique et plus tard à mettre en évidence son importance pour la fonction (30-34) (Figure 1.3).

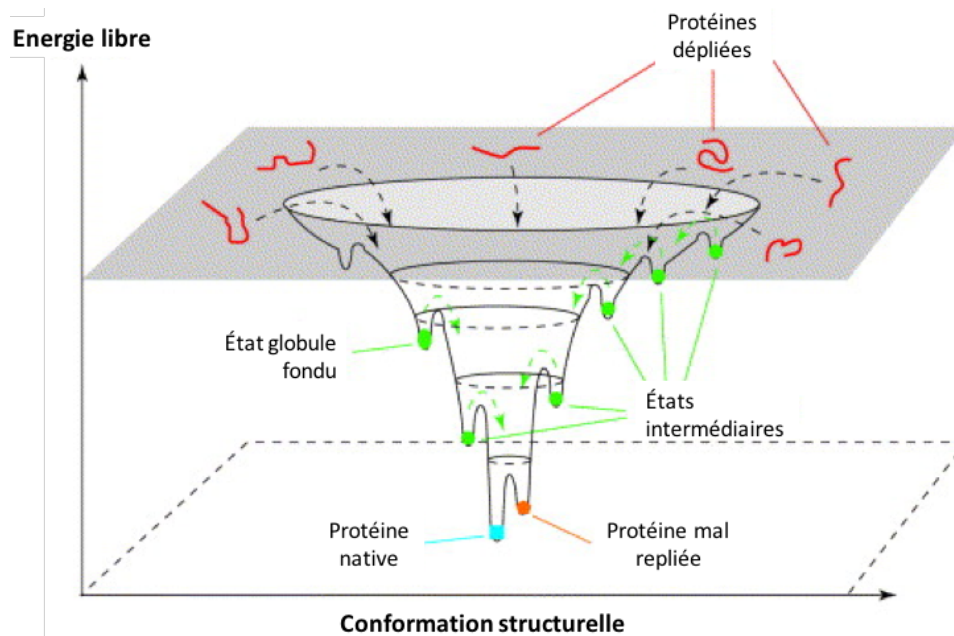


Figure 1.3. Représentation d'un paysage énergétique et des états de repliement d'une protéine qui y sont associés.

Image adaptée de Radford (2000) (35).

Au cours des années 70-80, on assiste à plusieurs révolutions techniques qui sont rapidement utilisées pour la caractérisation des protéines. La résonance magnétique nucléaire (RMN) (dont le détail sera traité ultérieurement dans ce chapitre) a particulièrement contribué à l'étude du dynamisme des protéines. Des travaux importants publiés en 1975 sur le marquage spécifique des résidus tyrosines de la trypsine pancréatique bovine et du lysozyme de poule par les groupes de Brian D. Sykes (36) et Robert J. P. Williams (37) fournissent des

évidences du dynamisme des protéines en solution à l'échelle moléculaire. Kurt Wüthrich (prix Nobel de chimie en 2002) et Gerhard Wagner publieront en 1978 une première description des différents mouvements atomiques présents dans les protéines, observables par cette méthodologie (38).

1.2. Dynamisme des protéines et importance pour la fonction enzymatique.

Les protéines sont dynamiques. Elles subissent différents types de mouvements d'amplitudes et de fréquences variables. Ces mouvements permettent non seulement d'explorer différents conformères, mais aussi différents sous-états d'un même conformère (**Figure 1.4**).

Les mouvements rapides ayant lieu sur les échelles de temps allant des femtosecondes (fs) aux nanosecondes (ns) sont de faible amplitude. Ces mouvements sont associés aux variations des sous-états d'un même conformère et sont séparés par de faibles barrières d'énergie (**Figure 1.4** : les différents sous-états du conformère A). Ces mouvements sont, par exemple, des vibrations de liaisons chimiques ou bien des rotations de chaînes latérales.

Les mouvements lents, ayant lieu sur les échelles de temps allant des nanosecondes (ns) aux millisecondes (ms) (et même aux secondes), sont généralement de plus grande amplitude. Ces mouvements sont associés à des variations structurales importantes différenciant différents conformères d'une même protéine, séparés par des barrières d'énergie élevée (**Figure 1.4** : les conformères A et B). Ces mouvements sont, par exemple, des rotations de chaînes latérales de grande amplitude ou bien des réorientations de boucles ou de domaines structuraux.

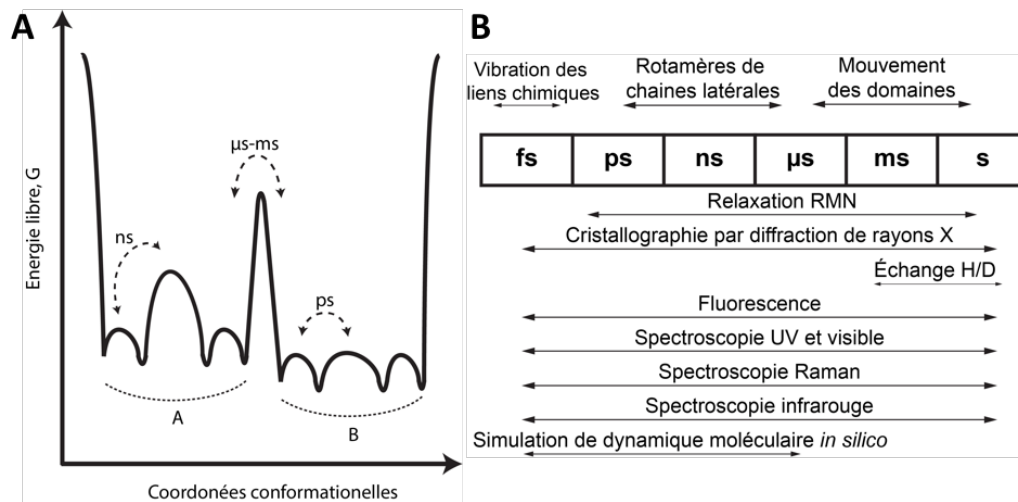


Figure 1.4. Mouvements atomiques des protéines.

(A) Paysage énergétique des différentes conformations d'une protéine, soient les conformères A et B et leurs sous-états, et les échelles de temps qui sont associée aux réarrangements structuraux. (B) Échelle de temps associée aux différents mouvements atomiques et méthodologies permettant de caractériser ces mouvements (Figure inspirée de Henzler-Wildman & Kern (2007) (39)).

Les enzymes effectuent la transformation chimique d'un substrat en produit de 10^7 à 10^{19} fois plus rapidement que la vitesse de la même réaction non-catalysée (40). Les premiers mécanismes expliquant la catalyse enzymatique, considérant les enzymes comme étant rigides, expliquaient la capacité d'une enzyme à augmenter la vitesse réactionnelle par son potentiel à lier un ligand et à stabiliser celui-ci dans une conformation favorisant l'état de transition, entraînant ainsi une réduction de la barrière d'énergie réactionnelle. Au cours des trois dernières décennies, l'inclusion d'un rôle catalytique au dynamisme des protéines a grandement gagné en popularité. Plusieurs exemples ont d'ailleurs montré que lorsque les mouvements d'une protéine étaient affectés, l'activité de celle-ci s'en voyait directement influencée (*vide infra*) (41-46). On retrouve actuellement deux écoles de pensée principales qui ont des visions différentes du rôle des mouvements présents dans les protéines. Le premier courant de pensée défend l'idée selon laquelle les mouvements présents dans les protéines ne sont pas directement impliqués dans la fonction de celles-ci. Ces mouvements peuvent influencer la catalyse en modifiant la préorganisation du site actif, mais en tant que tel, ils reflètent le paysage d'énergie libre de l'enzyme et ne sont donc pas des événements

dépendants du temps favorisant la catalyse (47). Le second courant de pensée défend l'idée que certains mouvements sont directement impliqués dans la fonction enzymatique. Ce courant est divisé en deux conceptions dépendant de la définition utilisée pour décrire la fonction enzymatique (48). Selon la première définition, la catalyse enzymatique est définie comme étant les instants entourant la transformation chimique de l'état de transition. Les mouvements associés à cette définition sont donc généralement sur les échelles de temps allant des fs aux ns. Les événements observés sont donc définis selon les constantes microscopiques caractérisant la réaction enzymatique (k_1 , k_2 etc.). Selon la seconde définition, la catalyse enzymatique englobe toutes les étapes du processus réactionnel allant de la liaison du substrat (et d'un cofacteur si nécessaire) à la libération du produit, incluant l'étape de transformation chimique du substrat. Selon cette définition, la catalyse est donc un processus ayant lieu sur les échelles de temps plus lentes, allant des ns aux ms, et mêmes aux secondes pour les enzymes moins efficaces (49). Les événements catalytiques correspondant à cette définition sont donc caractérisés par les constantes macroscopiques de catalyse k_{cat} correspondant à la constante de roulement de l'enzyme et K_M la constante d'affinité.

Au cours des dernières années, plusieurs démonstrations supportant les différentes visions ont été rapportées. Ces différents travaux ont mené à d'importants débats entourant le rôle des différents mouvements atomiques et leurs implications envers la fonction enzymatique.

Des travaux de simulations de dynamique moléculaire effectués par le groupe de Arieh Warshel (prix Nobel de chimie en 2013) caractérisant les mouvements présents dans l'enzyme adénylate kinase ont suggéré qu'il n'existait aucune corrélation significative entre le dynamisme des protéines (décrit par les coordonnées conformationnelles de l'enzyme) et la fonction enzymatique (décrite par les coordonnées réactionnelles) (47). Ces travaux ont grandement alimenté le débat entourant la question du rôle du dynamisme des protéines. Plusieurs revues de la littérature et avis provocateurs ont été publiés au cours des années suivant cet article. On retrouve entre autres des échanges publiés dans la revue PNAS où les groupes Warshel, réfutant le rôle de la dynamique, et Karplus (prix Nobel de chimie en 2013), défendant le rôle de la dynamique, exposent les problématiques des travaux de l'autre groupe (50, 51). Depuis, le groupe Warshel a publié plusieurs revues de la littérature plutôt circonscrites, défendant leur vision (52, 53).

À l'inverse, plusieurs travaux portant sur différents systèmes enzymatiques tels la ribonucléase A, la DHFR d'*Escherichia coli* (*ecDHFR*), la déshydrogénase d'alcool d'organismes thermophiles et l'adénylate kinase ont proposé que les mouvements, tant rapides que lents, influencent directement la fonction de ces enzymes (41-46). Il a, par exemple, été montré qu'une seule mutation ponctuelle de la RNase A ou de la *ecDHFR* affectent la dynamique lente de ces enzymes, entraînant une diminution drastique de l'activité catalytique. Ceci supporte donc un rôle de ces mouvements envers la fonction enzymatique (54, 55). D'autres travaux, portant sur l'adénylate kinase, ont quant à eux mené à la proposition selon laquelle les mouvements rapides et lents présents dans les protéines sont réciproquement cruciaux : les mouvements rapides serviraient à favoriser les mouvements lents de plus grande envergure (56).

Diverses méthodologies expérimentales, comprenant entre autres la cristallographie par diffraction de rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), la cryomicroscopie électronique (Cryo-ME), l'effet isotopique cinétique (KIE) et les simulations de dynamique moléculaire *in silico*, permettent d'étudier les mouvements atomiques présents dans les protéines. Chacune de ces méthodologies a ses avantages et inconvénients. Les prochaines sections aborderont les considérations expérimentales et conceptuelles des différentes méthodologies utilisées en fonction de l'objectif de la présente thèse. Plus précisément, la cristallographie par diffraction de rayons X, la RMN et les simulations de dynamique moléculaire *in silico* seront traitées. Une emphase particulière sera mise sur la RMN puisque cette technique expérimentale est reconnue comme étant particulièrement puissante pour la caractérisation des mouvements atomiques ayant lieu sur une large gamme d'échelles de temps.

1.3. Position du projet de recherche

Le rôle du dynamisme des protéines envers la fonction enzymatique est un sujet vivement discuté et débattu. La section précédente expose des travaux récents qui, dans certains cas, ont suggéré que la dynamique n'est pas impliquée dans la fonction alors que dans d'autres cas, la dynamique rapide ou lente peut être corrélée à la fonction enzymatique. Cette thèse se positionne au cœur de ce débat. La dynamique d'une protéine est-elle associée à la

fonction enzymatique de celle-ci ? Existe-t-il une corrélation fonction-structure-dynamique permettant de mieux expliquer le fonctionnement des enzymes ?

Nous aborderons ces questions dans un contexte d'ingénierie des protéines : est-il essentiel de conserver un dynamisme « natif » dans des protéines issues de l'ingénierie afin de maintenir la fonction enzymatique ? De plus, dans un contexte évolutif, la dynamique est-elle maintenue entre des homologues ? Est-ce que la tolérance à des changements de dynamique peut servir à promouvoir l'évolution de la fonction enzymatique et donc permettre éventuellement la reconnaissance de nouveaux substrats ? La dynamique corrèle-t-elle avec l'adaptabilité évolutive des enzymes ?

Ces questions seront abordées selon différents angles. Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux différentes échelles de temps caractérisant les mouvements atomiques. Est-il possible que les différents types de mouvements aient différentes implications envers la fonction et donc différents patrons de conservation ? Dans un second temps, le système étudié sera composé d'enzymes naturelles homologues nous permettant d'étudier le rôle de la conservation (ou non-conservation) de la dynamique au cours de l'évolution. Afin de renchérir sur nos conclusions au niveau évolutif, et dans un contexte d'ingénierie des protéines, nous caractériserons aussi des enzymes artificiellement évoluées issues de la recombinaison d'enzymes homologues. Nous vérifierons ainsi si la dynamique doit être conservée pour maintenir la fonction enzymatique et, puisque ce système d'enzymes artificiellement évoluées mime des processus naturels de recombinaison homologue, nous vérifierons le rôle de la dynamique dans un contexte d'évolution.

1.4. Choix du système expérimental en fonction des objectifs spécifiques

1.4.1. Propriétés recherchées dans le choix d'un système expérimental

Afin d'établir une relation entre la structure, la fonction, la dynamique et l'évolution des protéines, plusieurs conditions ont été considérées dans le choix d'un modèle expérimental.

Dans un premier temps, puisque nous cherchons à étudier un modèle naturel d'évolution, le système de protéines choisi devait comporter des homologues fonctionnellement similaires (c.-à-d. catalysant la même réaction, mais pouvant varier au niveau de la spécificité et l'efficacité) afin de vérifier si la dynamique est conservée entre ceux-ci. La disponibilité d'informations sur la relation structure/fonction, corrélation est déjà fondamentalement établie, est aussi une condition sous-jacente puisque la connaissance de celle-ci nous permettra de la considérer en relation avec nos études de dynamique. Ceci signifie donc que l'activité du système enzymatique sélectionné est caractérisée et que des structures des protéines homologues, comportant le détail atomique, sont disponibles.

Dans un second temps, au cours de l'évolution des protéines, menant par exemple au développement d'une nouvelle fonction, plusieurs intermédiaires évolutifs sont générés. Puisque nous cherchons à étudier le rôle de la dynamique envers l'évolution, l'étude de variants visités au cours d'un chemin évolutif est d'intérêt. Afin de cibler un système d'homologues naturels nous permettant d'étudier un chemin évolutif, nous avons considéré comme un atout l'existence naturelle d'une diversité de variants puisque cette caractéristique suggère une permissivité évolutive et une potentielle diversification de la fonction. La connaissance d'un chemin évolutif, soit naturel ou encore artificiel (c.-à-d. créé en laboratoire) issu des homologues sélectionnées a aussi été considérée comme condition puisque cette caractéristique permettra de faire le lien avec les mécanismes d'évolution. La connaissance du mécanisme catalytique, des résidus impliqués et du positionnement structural de ceux-ci dans les enzymes homologues naturelles, nous permettra de tenter d'établir des corrélations entre des potentielles variations structurelles et fonctionnelles observées chez les intermédiaires évolutifs.

Finalement, une méthode de choix afin de caractériser les mouvements atomiques présents dans les protéines, et ce, sur près de 17 échelles de temps, est la résonance magnétique nucléaire. Toutefois, cette méthodologie pose certaines contraintes au niveau de la taille des protéines étudiées et du type d'expériences réalisables. Les protéines constituant notre modèle devront donc pouvoir être produites et purifiées en quantité suffisante, et stables dans les conditions expérimentales, afin d'être caractérisée par cette méthodologie.

Avec toutes ces considérations, le système protéique choisi est constitué de β -lactamases puisque ces enzymes répondent à la majorité des contraintes, tel qu'il le sera exposé dans les prochaines sections.

1.4.2. Considération 1 : Les β -lactamases, système protéique vaste

La première β -lactamase, la « pénicillinase », a été identifiée en 1940 chez *Bacillus escherichia* par Abraham et Chain (57), une année avant l'utilisation clinique d'un premier β -lactame (benzylpénicilline ou pénicilline G). À cette époque, l'enzyme pénicillinase semblait cliniquement peu importante puisque la benzylpénicilline ne servait qu'à traiter des infections aux bactéries *Staphylocoque* Gram positives et que cette enzyme n'avait pas été observée dans ces organismes. La pénicilline G, découverte par Alexander Flemming en 1928, ainsi que plusieurs dérivés subséquemment créés seront les maillons de l'arsenal antimicrobien de l'âge d'or de la découverte des antibiotiques (1940-1960). De par l'utilisation à grande échelle de ces antibiotiques, on assistera rapidement à une démonstration du principe de sélection naturelle décrit par Charles Darwin dans le chapitre 4 « De l'origine des espèces » :

« Can we doubt (remembering that many more individuals are born than can possibly survive) that individuals having any advantage, however slight, over others, would have the best chance of surviving and of procreating their kind? On the other hand, we may feel sure that any variation in the least degree injurious would be rigidly destroyed. This preservation of favourable variations and the rejection of injurious variations, I call Natural Selection. » (58)

Effectivement, de par l'utilisation à grande échelle de différents antibiotiques (déjà naturellement présents dans l'environnement), une pression sélective naturelle accentuée a été introduite dans le milieu des bactéries. Tel que décrit par Darwin, on assistera rapidement à la sélection des individus bactériens offrant des avantages contre ces agents antimicrobiens. Ce phénomène, mieux connu sous le nom de résistance bactérienne, n'est plus aujourd'hui considéré par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme une prédiction du futur, mais plutôt comme un problème d'importance majeur mettant à risque notre arsenal d'antimicrobiens permettant de traiter les infections les plus bénignes (59).

Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes ayant divergé évolutivement des DD-transpeptidases (souvent nommées PBP pour *Penicillin Binding Proteins*). Ces dernières sont impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne en clivant le lien intermédiaire de la D-Ala-D-Ala terminale du peptidoglycane de la paroi cellulaire et en catalysant la formation d'un lien peptidique entre la D-Ala et l'amine du peptidoglycane voisin (60). Les composés comportant un cœur β -lactame comme les pénicillines et céphalosporines, miment la D-Ala-D-Ala. Ceux-ci peuvent être acétylés par les DD-transpeptidases, mais ne peuvent que très faiblement être désacétylés par ces enzymes, entraînant ainsi un blocage de la synthèse de la paroi bactérienne. Les β -lactamases, en contrepartie, peuvent désacyler les composés comportant un cœur β -lactame 10^8 fois plus efficacement que les DD-transpeptidases. Ces enzymes sont donc des joueurs importants de la résistance bactérienne puisqu'elles inactivent ces agents antimicrobiens et permettent la prolifération bactérienne.

Des analyses phylogéniques réalisées par Fevre *et al.* ont déterminé que les premières β -lactamases sont apparues chez *Klebsiella oxytoca* il y a plus de 100 millions d'années (61). Bhullar et collaborateurs ont observé que près de 60% des souches Gram-positives présentes dans des échantillons provenant d'une caverne isolée datant de plus de 4 millions d'années possédaient une activité permettant l'hydrolyse de composés β -lactames (pénicillines et céphalosporines) (62). Des analyses d'échantillons de pergélisol datant de plus de 30 000 ans, ont eux aussi révélé la présence de matériel génétique encodant pour des β -lactamases (63). Ces travaux démontrent que les β -lactamases sont naturellement présentes dans l'environnement depuis bien avant l'utilisation clinique de premiers composés β -lactames. Il a d'ailleurs été suggéré que ces enzymes jouent depuis toujours un rôle essentiel dans la guerre naturelle pour la survie microbienne entre les microorganismes producteurs de β -lactamases et les producteurs de β -lactames comme les *Penicilliums* (64, 65).

L'utilisation à grande échelle des antibiotiques β -lactames et le développement de nouvelles molécules ayant un cœur β -lactame ont grandement favorisé l'augmentation de la prévalence et de la variété des β -lactamases retrouvées en clinique (66, 67). Actuellement, les antibiotiques β -lactames sont parmi les plus prescrits (68). La production de β -lactamases est le mécanisme de résistance prédominant chez les bactéries Gram-négatives (69). Près de 1800 différentes β -lactamases (toutes classes confondues et incluant variants) sont actuellement connues (70). Afin de disposer de nouvelles molécules pour traiter les infections aux bactéries

productrices de β -lactamases résistantes, différentes générations de céphalosporines ont été développées. Avec l'introduction clinique des céphalosporines de troisième génération, nous avons assisté à l'apparition de β -lactamases possédant des spectres élargis de reconnaissance de β -lactames (ESBLs – Extended Spectrum β -lactamases) (71). De plus, l'introduction d'inhibiteurs des β -lactamases (sulbactam, tazobactam et acide clavulanique) a aussi contribué à l'apparition des variants résistants : les IRTs - Inhibitor Resistant TEM β -lactamases (72). Ces exemples d'émergence de variants en réponse à une pression appliquée (ici par l'usage massif des β -lactames et des inhibiteurs) démontrent clairement une évolution adaptative en temps réel conforme au principe de sélection naturelle décrit par Darwin en 1859.

Les β -lactamases sont actuellement classifiées selon deux principales nomenclatures. La première, la nomenclature d'Ambler, subdivise ces enzymes en 4 grands groupes (A, B, C et D) selon leur homologie de séquence (73). Les classes A, C et D possèdent en leur site actif une sérine catalytique tandis que les enzymes de la classe B, les métallo- β -lactamases, contiennent un ou deux ions de zinc catalytique au cœur du site actif. La seconde nomenclature, « Bush-Jacoby-Mereiros », subdivise aussi ces enzymes en 4 groupes (1, 2, 3 et 4), en fonction de leur profil de reconnaissance des β -lactames et des inhibiteurs (74, 75). Ces deux nomenclatures sont couramment utilisées dans la littérature scientifique spécifique aux β -lactamases. Dans la présente thèse, nous utiliserons la nomenclature d'Ambler qui permet d'utiliser une même numérotation des acides aminés pour les différentes enzymes.

1.4.3. Considération 2 : TEM-1 et PSE-4, β -lactamases homologues de classe A

Comptant près de 550 enzymes et variants cliniques, la classe A des β -lactamases est la plus abondante (76). La première β -lactamase plasmidique de classe A provenant d'*E. coli* a été identifiée en 1963 (rapportée en 1965) et nommée TEM en l'honneur du patient de chez qui elle fut isolée (**TEM**oneira) (77). Cette enzyme est classifiée dans la catégorie des β -lactamases pouvant hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines des premières générations. La β -lactamase PSE-4 (aussi nommée CARB-1), a quant à elle été isolée pour la

première fois en 1969 de la souche Dalglish de *PSE**udomonas aeruginosa* résistant à la *CAR*Bénicilline (78, 79). Cette enzyme fait partie de la catégorie des β -lactamases hydrolysant plus efficacement la carbénicilline. TEM-1 et PSE-4 matures sont respectivement composées de 263 et 269 acides aminés. Malgré la variation de la séquence de ces deux enzymes (40% d'identité de séquence), leur structure tridimensionnelle est grandement conservée comme montré dans la **Figure 1.5** (RMSD-C α de 1,25 Å).

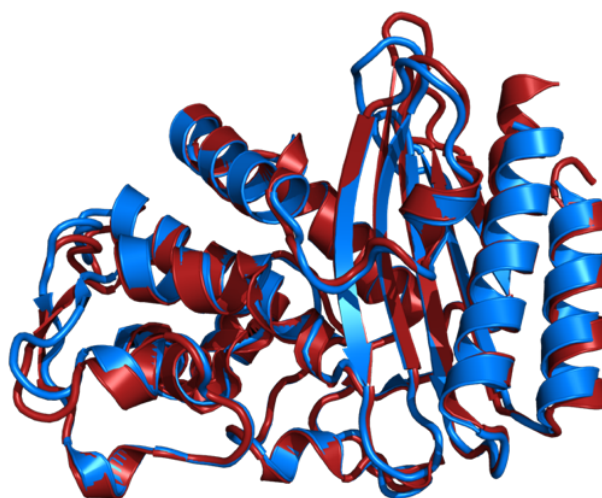


Figure 1.5. Superposition de la structure tridimensionnelle de TEM-1 et PSE-4.
(TEM-1-PDB 1XPB (80); bleu et PSE-4 PDB 1G68 (81); rouge).

En 2010, plus de 170 variants cliniques de TEM-1 étaient connus (82). Ces variants, comportant généralement d'une à cinq variations par rapport à la séquence native de TEM-1, peuvent hydrolyser une large gamme de pénicillines tout comme TEM-1, mais aussi plusieurs céphalosporines de deuxième, troisième et quatrième génération qui ne sont que faiblement reconnues par TEM-1. Ceci démontre la grande adaptabilité et la tolérance aux mutations de cette enzyme. En contrepartie, PSE-4 est cliniquement moins présente que TEM-1.

Dans le cadre de cette thèse, ces deux enzymes seront utilisées en tant que modèle puisqu'elles répondent à plusieurs des considérations exposées précédemment. En premier lieu, TEM-1 et PSE-4, sont des enzymes vastement caractérisées pour leur fonction d'hydrolyse de divers composés β -lactames donc ces méthodologies sont bien établies. Ces données serviront à titre comparatif afin de valider notre approche. De plus, on compte près d'une cinquantaine de structures cristallines de TEM-1 et variants, et 2 structures de PSE-4

dans la base de données des structures de protéines (PDB). Ceci a permis l'établissement de la corrélation fonction/structure ainsi que le mécanisme catalytique de ces enzymes.

En second lieu, dans la base de données des assignations par RMN (BMRB), on compte 8 dépositions d'assignation pour TEM-1 et variants, et une pour PSE-4. Ces données seront d'une grande utilité puisqu'elles permettront d'éliminer l'étape de l'assignation, souvent laborieuse mais nécessaire à l'étude de dynamisme des protéines par cette méthodologie, pour ces deux enzymes. Ces protéines de 30 kDa sont toutefois près de la limite supérieure de la taille pour la faisabilité par cette méthodologie. Des travaux antérieurs portant sur le dynamisme à l'échelle de temps rapide (ps à ns) ont été réalisés sur ces deux protéines, démontrant la faisabilité ([83](#), [84](#)). Ces travaux ont montré que ces deux enzymes possédaient peu de dynamique à cette échelle de temps. Au cours des prochains chapitres, nous poursuivrons ces travaux en caractérisant d'autres échelles temps, en particulier une échelle coïncidant avec la vitesse réactionnelle de ces enzymes. Ceci permettra de déterminer le rôle de ces mouvements, s'il y a, envers la fonction.

1.4.4. Considération 3 : Connaissance de la structure et du mécanisme catalytique des β -lactamases TEM-1 et PSE-4

Les β -lactamases de classe A sont exprimées sous forme de préprotéines possédant un peptide signal de localisation périplasmique (25 premiers acides aminés chez TEM-1 et 23 chez PSE-4) qui est ensuite clivé dans afin d'obtenir la forme mature de ces enzymes. Ces protéines sont constituées par deux principaux domaines : le domaine tout- α composé de huit hélices α numérotées $\alpha 2$ à $\alpha 9$, et le domaine α/β composé d'un feuillet β de cinq brins antiparallèles sur lesquels sont empaquetées les hélices α -terminales $\alpha 1$ et $\alpha 10$ - $\alpha 11$ (**Figure 1.6 A**) ([81](#), [85](#)). Ces deux domaines sont liés entre eux par des connecteurs composés des résidus 60-68 et 212-222. Le site actif de l'enzyme est localisé à l'interface de ces deux domaines et est délimité par six principaux 'murs' impliqués dans la catalyse, dénommés : S70, Y105, SDN, boucle Ω , 214-218 et 234-244 (**Figure 1.6 B et C**). Lors de sa liaison, le substrat est niché dans une cavité ouverte, délimitée par ces six murs.

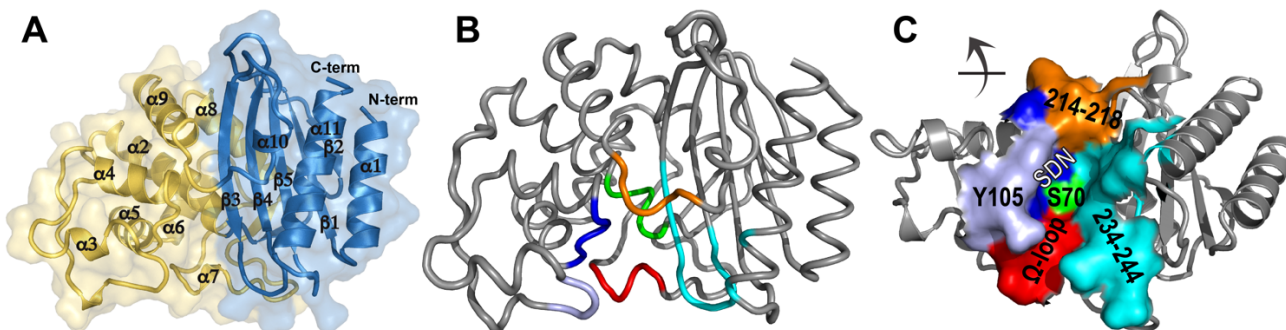


Figure 1.6. Topologie et murs formant la cavité du site actif des β -lactamases de classe A TEM-1 et PSE-4.

(A) Topologie et numérotation des hélices α et brins β . Les domaines tout- α et α/β sont respectivement colorés jaune et bleu. (B) Murs constituant la cavité du site actif coloré tel que dans (C). (C) Représentation de la cavité du site actif en fonction de la surface accessible au solvant. La structure cristalline de TEM-1 (PDB 1XPB, (80)) a été utilisée afin de générer les représentations structurales.

Le mécanisme catalytique en deux étapes des β -lactamases procède par une acylation suivie d'une désacylation (**Figure 1.7**) (86). Le rôle et l'identité des résidus impliqués dans l'étape de désacylation sont bien connus. Par contre, il existe une controverse entourant le mécanisme exact de l'étape d'acylation. Au cours de l'acylation, la Ser70, nucléophile catalytique, est déprotonnée par une base générale puis effectue une attaque nucléophile au niveau du carbonyle du cœur β -lactame du substrat (**Figure 1.7 B et C**). Par la suite, le proton de la Ser130 est transféré vers l'azote du noyau β -lactame, entraînant ainsi la formation d'un intermédiaire acyle-enzyme stable (**Figure 1.7 D**). Au cours de l'étape de désacylation, l'enzyme est régénérée et libère le produit hydrolysé et ainsi inactivé (**Figure 1.7 G**). Cette étape implique l'activation par le Glu166 d'une molécule d'eau hautement conservée au cœur du site actif afin d'effectuer l'hydrolyse du lien entre le carbonyle du β -lactame et l'oxygène de la Ser70 (**Figure 1.7 E et F**) (87).

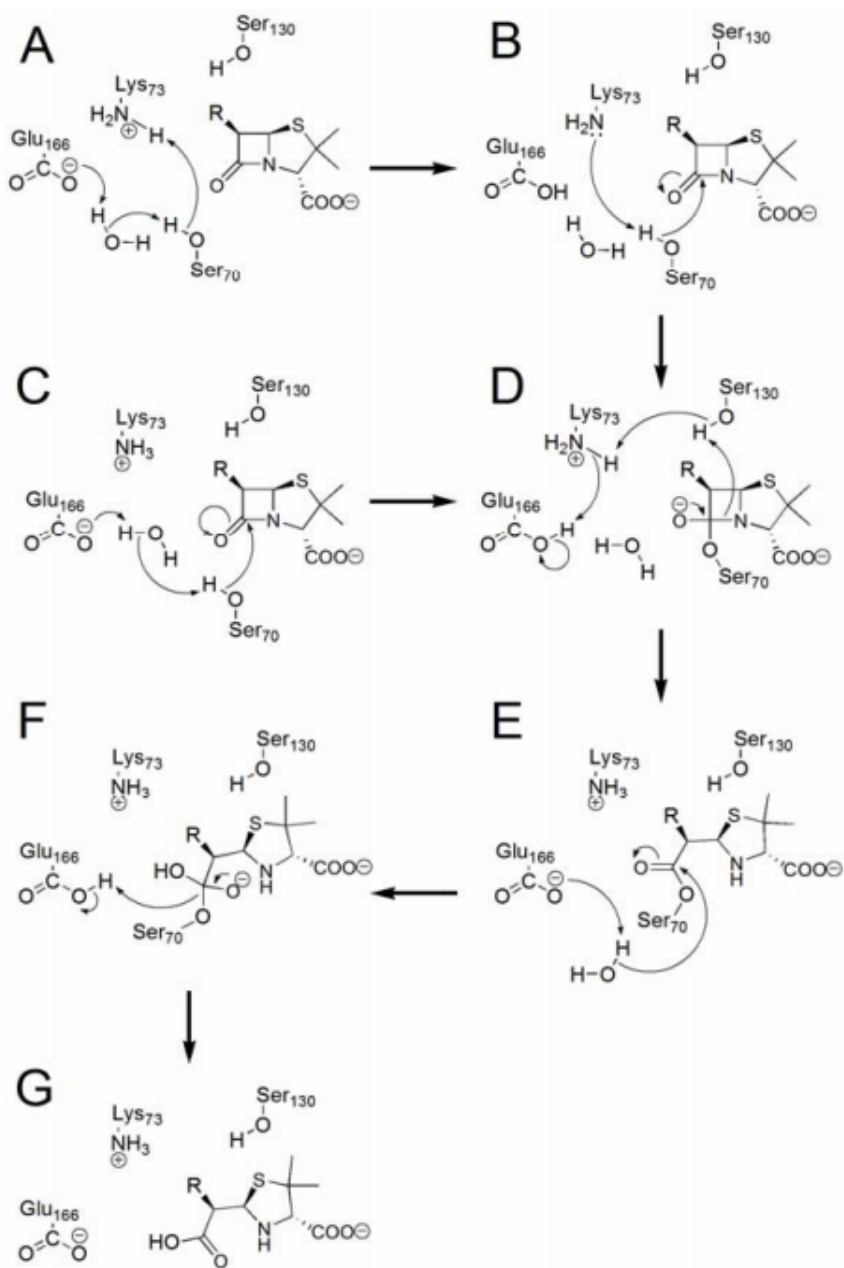


Figure 1.7. Représentation du mécanisme catalytique des β -lactamases TEM-1 et PSE-4 illustrant l'hydrolyse d'une pénicilline.

L'acylation procède par l'activation de Ser70 impliquant soit Lys73 (étape A-B-D) ou Glu166 (étapes C-D). L'intermédiaire tétraédrique est réorganisé (D) formant ainsi l'intermédiaire acyle-enzyme (E). Par la suite la désacylation impliquant Glu166 et une molécule d'eau conservé à lieu (étapes F-G) libérant ainsi le substrat hydrolysé et régénérant l'enzyme. Figure réalisée par Nicolas Doucet en compilant les données des références (93-95). Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA, USA).

Pour l'étape de désacylation, le rôle essentiel du Glu166 et de la molécule d'eau conservée au site actif est démontré et accepté (87). Par contre, des évidences expérimentales contradictoires ont semé la controverse envers le mécanisme exact de l'étape d'acylation et de l'identité du résidu jouant le rôle de base générale pour l'activation de la Ser70 (**Figure 1.7 A, B et C**). Un premier mécanisme propose que le Glu166 active la molécule d'eau conservée qui jouera ensuite le rôle de base générale. Ce mécanisme a été supporté par des simulations de mécanique quantique et mécanique moléculaire (QM/MM) et par l'observation de l'état protonné du Glu166 dans une structure cristalline de très haute résolution de TEM-1 dans l'état d'intermédiaire acyle-enzyme (PDB 1M40) (88, 89). Il a aussi été démontré que lorsque le Glu166 était muté, la vitesse de l'étape d'acylation n'était pas limitante, suggérant que ce résidu n'est pas strictement nécessaire au mécanisme catalytique (87, 90-92). Un second mécanisme impliquant plutôt la Lys73, résidu conservé du mur S70, à titre de base générale pour la déprotonation de la Ser70 a donc été proposé. Ce mécanisme est aussi supporté par des travaux de QM/MM démontrant que ce mécanisme est énergétiquement favorable (93-95). L'utilisation simultanée de ces deux mécanismes par l'enzyme, comme voie de contournement l'un de l'autre, a aussi été suggéré. Chacun des six murs du site actif implique des résidus importants pour différents aspects de la catalyse :

1) Mur S70 :

- Constitué par la section 3¹⁰ de l'hélice α 2
- Contient le motif conservé Ser70 – X – X – Lys73
- La Ser70 sert de nucléophile catalytique (85).
- La Lys73 établit un pont hydrogène avec la Ser70 et pourrait servir de base générale pour l'activation de la Ser70 au cours de l'étape d'acylation (93-95).

2) Mur Y105 :

- Constitué par une boucle
- Contient les résidus Glu104–Tyr105–Ser106
- Région connue comme étant « *gate-keeper* », contrôlant l'ouverture et la fermeture de l'accès au site actif principalement grâce à la Tyr105 (96-98).

3) Mur SDN :

- Constitué par une boucle reliant les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$
- Contient le motif conservé Ser130 – Asp131 – Asn132 (d'où le nom SDN)
- La Ser130 et l'Asn132 stabilisent la topologie du site actif par de multiples ponts hydrogènes. L'Asn132 est aussi impliquée dans la stabilisation de l'état de transition au cours de la catalyse. De plus, la Ser130 servirait de source de proton pour l'étape d'acylation ([99](#), [100](#)).

4) Mur boucle Ω :

- Constitué par une boucle qui, structurellement, prend la forme Ω (hélice $3_{10} \alpha 7$)
- Contient les résidus 163 à 178
- La Glu166 et l'Asn170 sont impliquées dans la catalyse. La Glu166 servirait de base générale pour les étapes d'acylation et de désacylation ([87](#)). L'Asn170 est impliquée dans la coordination d'une molécule d'eau catalytique faisant le pont entre le Glu166 et la Ser70 ([101](#)).

5) Mur 214-218 :

- Constitué par la boucle entre les hélices $\alpha 9$ et $\alpha 10$
- Contient les résidus 214 à 218
- Rôle structural : couvre partiellement la cavité du site actif ([85](#)).

6) Mur 234-244 :

- Constitué par les brins $\beta 3$, $\beta 4$ et la boucle les connectant
- Contient les résidus 234 à 244 (motif conservé Lys234 – Thr(Ser)235 – Gly236).
- Rôle catalytique moins bien compris : serait important pour la reconnaissance de différents substrats chez les ESBLs et IRTs ([102-104](#)).
- Lys234 stabilise le carboxylate du cycle thiazolidine/dihydrothiazidine greffé au β -lactame du substrat et agit comme potentielle source de proton pour la Ser130. Le groupement guanidinium d'Arg244 (conjointement avec Val216 et Lys234) est important pour l'affinité envers certains β -lactames grâce à un réseau d'interactions impliquant le carboxylate du β -lactame ([102-104](#)).

1.4.5. Considération 4 : Chimères de TEM-1 et PSE-4, modèle pour le développement d'une compréhension du rôle du dynamisme des protéines dans un cadre d'ingénierie et d'évolution

Comparativement à des méthodes de synthèse conventionnelles employant des solvants organiques et/ou des conditions agressives, les enzymes possèdent l'avantage d'être énergétiquement efficaces, « vertes » (respectant les principes de la chimie verte) et fonctionnelles dans des conditions expérimentales douces (température modérée, eau, pression atmosphérique) tout en générant peu ou aucun déchet de synthèse (105). De plus, leur spécificité peut être avantageuse pour produire précisément le produit désiré tout en réduisant le nombre d'étapes de purification nécessaires.

Les enzymes sont présentes dans plusieurs produits commerciaux d'usage quotidien. Par exemple, depuis la fin des années 1980, les lipases sont utilisées dans les détergents à lessive (106). L'industrie du textile emploie aussi grandement les enzymes pour, par exemple, accentuer l'effet de décoloration sur les jeans (107). On retrouve aussi des enzymes utilisées à toute sortes de fins dans l'industrie alimentaire, pour la production de bioéthanol et de bioplastiques (108-110).

Les enzymes utilisées à ces fins doivent être optimisées ou sélectionnées afin d'être efficaces dans les conditions précises de leur utilisation. Citons, à titre d'exemple, le cas des lipases dans les détergents à lessive. Des considérations écologiques et monétaires poussent les consommateurs à laver leur lessive à l'eau froide, entraînant du même coup, une demande pour des lipases fonctionnelles à de faibles températures. Différentes approches peuvent être utilisées afin d'identifier l'enzyme idéale pour ces conditions d'utilisation. Il est possible d'identifier l'enzyme désirée à partir d'un organisme psychrophile (vivant à faible température) (111). Comme alternative, il est aussi possible de faire l'ingénierie d'une protéine ayant initialement la fonction désirée afin de rendre celle-ci fonctionnelle à des températures faibles (112).

L'ingénierie des protéines s'effectue selon deux principales approches (113-116). Les approches de design rationnel visent à modifier une enzyme spécifiquement en fonction de la connaissance de sa structure et de son mécanisme fonctionnel. Ces informations ne sont toutefois pas toujours disponibles pour la protéine d'intérêt, ce qui peut limiter ce type

d'approche. Les approches d'évolution dirigée visent à imiter des processus naturels d'évolution en enchaînant des rondes de mutagenèse et de sélection pour identifier un variant possédant les caractéristiques désirées. Différentes techniques de mutagenèse, dites aléatoires, semi-aléatoires ou ciblées, permettent la création de banques de variants qui sont criblées afin d'identifier le meilleur candidat de chaque ronde d'évolution et obtenir un variant final ayant les propriétés désirées. La principale limitation de cette approche est la méthode de sélection puisqu'il peut être difficile de sélectionner pour une fonction et de maintenir d'autres fonctions natives au système au cours de l'évolution en laboratoire. Comme dit par Frances H. Arnold (Caltech, CA) : « *You get what you screen for* » ([117](#)).

La recombinaison de protéines homologues structurellement similaires est une approche d'évolution dirigée souvent pratiquée. Cette méthode tente de répliquer le processus naturel de recombinaison observé, entre autres, au cours de l'évolution d'anticorps, de synthétases et de protéases ([118](#)). Cette approche possède l'avantage principal de permettre de plus grandes variations simultanées de la séquence peptidique (mutations) relativement à d'autres techniques de mutagenèse. Le rendement et l'efficacité de cette méthodologie sont grandement dépendants de l'identité entre la séquence des homologues recombinaison puisqu'elle détermine les sites de recombinaison (*cross-over*). Il a été proposé que cette méthodologie n'est efficace qu'avec des protéines possédant un minimum de 70% d'identité de séquence ([119](#)).

Afin de remédier à cette limitation, le groupe de Frances H. Arnold a développé un algorithme informatique nommé « SCHEMA » qui, plutôt que de dépendre de l'homologie de séquence afin de déterminer les sites de recombinaison, utilise la structure tridimensionnelle des protéines. Cet algorithme identifie indépendamment, pour chacune des protéines utilisées pour la recombinaison, des sites au niveau de la structure tridimensionnelle où un minimum d'interactions entre les résidus de cette protéine seront modifiées lors de la recombinaison. L'un des premiers modèles utilisés afin de démontrer le potentiel de cette méthodologie fut les β -lactamases TEM-1 et PSE-4, puisque celles-ci possèdent une structure tridimensionnelle similaire, mais n'ont que 40% d'identité de séquence. La **figure 1.8** montre les profils de modification d'interaction selon SCHEMA obtenus pour TEM-1 (noir) et PSE-4 (gris) et utilisés pour la création d'une librairie d'enzymes chimériques issues de leur recombinaison ([120](#), [121](#)). Les minimums représentent des résidus de la protéine établissant un nombre

minimal d'interactions avec d'autres acides aminés. Par la superposition des profils de TEM-1 et PSE-4, des minimums communs aux deux protéines ont été identifiés afin d'être ciblés comme site de recombinaison de ces protéines homologues.

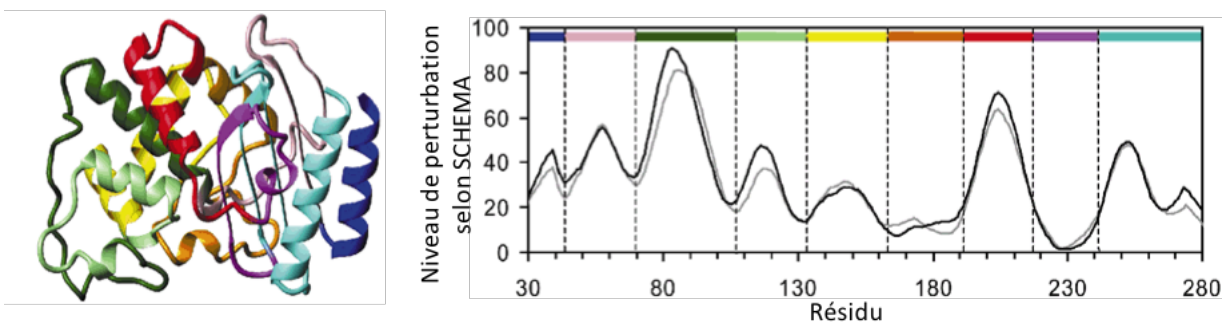


Figure 1.8. Profil de perturbation des protéines TEM-1 et PSE-4 selon l'algorithme SCHEMA.

Les sites de recombinaison favorables sont identifiés sur les courbes de profil de TEM-1 (courbe noire) et PSE-4 (courbe grise) par les lignes pointillées verticales. Les différents blocs recombinés sont identifiés sur la structure tridimensionnelle de la protéine en respectant les couleurs identifiées au-dessus des courbes de profil (Figure adaptée de Voigt et al. (2002) ([120](#))).

Ainsi, le système-modèle étudié dans cette thèse est constitué des enzymes naturelles TEM-1 et PSE-4 et de trois chimères issues de leur recombinaison. Ces dernières sont fonctionnelles, ayant été sélectionnées pour leur capacité à conférer aux bactéries une résistance à l'ampicilline. Puisque les chimères sont issues de la recombinaison homologue de TEM-1 et PSE-4, celles-ci représentent de potentiels intermédiaires sur un chemin évolutif entre ces deux enzymes et nous permettent de vérifier si la dynamique est maintenue au cours d'une évolution. Pour développer la corrélation complète entre la structure, la fonction et la dynamique, ces trois enzymes artificiellement évoluées seront caractérisées au niveau de leur structure et fonction.

Les chimères, cTEM-2m, cTEM-17m et cTEM-19m, suivent la nomenclature suivante : cTEM indique leur nature de chimères ayant une plus grande identité de séquence avec TEM-1; le nombre 2, 17 ou 19 suivi d'un **m** (**m**utations) indique le nombre de résidus dont l'identité a été changée au cours de la recombinaison entre TEM-1 et PSE-4. La chimère cTEM-2m a été recombinée au niveau des résidus 66 à 73, constituant le mur S70 du site actif

(**Figure 1.9**). Cette recombinaison introduit 2 substitutions par rapport à TEM-1 : Met68Leu et Met69Thr. La chimère cTEM-17m a été recombriquée au niveau des résidus 150 à 190, constituant le mur Ω -loop du site actif (résidu 163 à 178). Cette recombinaison introduit 17 substitutions relativement à TEM-1 (**Tableau 1.I**). Finalement, la chimère cTEM-19m combine ces deux régions de recombinaisons (66 à 73 + 150 à 190), introduisant ainsi 19 substitutions par rapport à TEM-1 (**Figure 1.9** et **Tableau 1.I**). Ces chimères ont été sélectionnées parmi une banque comportant 256 membres issus de ce patron de recombinaison (2^8 , 2 protéines recombriquées selon 8 blocs) en fonction des sites de recombinaisons situés au niveau de la cavité du site actif. De plus, le lien entre les régions recombriquées de ces chimères nous permettra de déconvoluer les effets de cette chimérisation.

Tableau 1.I. Variation de la séquence dans les régions échangées chez les chimères cTEM-2m, cTEM-17m et cTEM-19m.

| Residue | 68 | 69 | 150 | 153 | 154 | 155 | 158 | 159 | 165 | 168 | 172 | 173 | 174 | 175 | 177 | 182 | 184 | 186 | 188 |
|----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TEM-1 | M | M | A | H | N | M | H | V | W | E | A | I | P | N | E | M | A | M | T |
| cTEM-2m | L | T | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cTEM-17m | M | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cTEM-19m | L | T | D | R | Q | I | K | E | I | D | G | K | L | G | T | L | K | I | S |
| PSE-4 | L | T | | | | | | | | | | | | | | | | | |

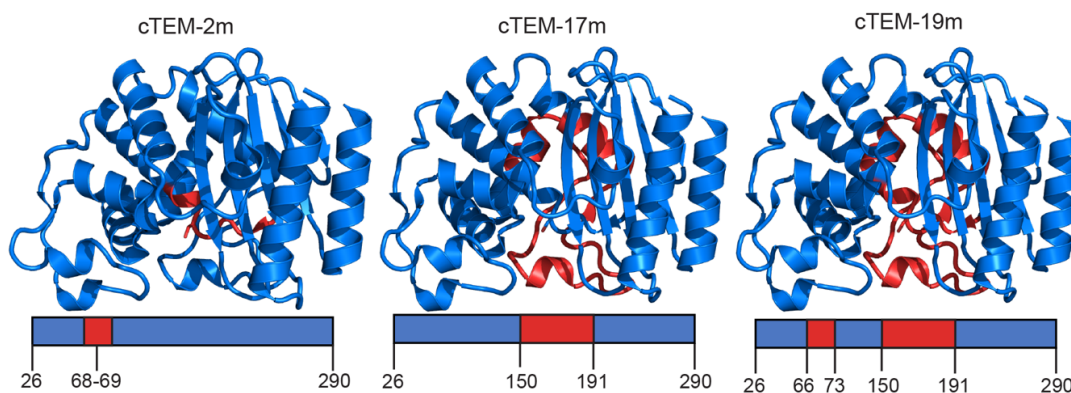


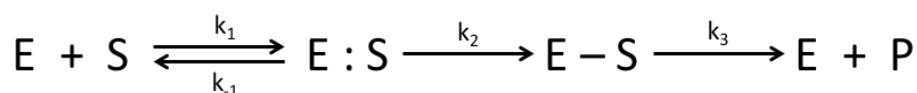
Figure 1.9. Chimères cTEM-2m, cTEM-17m et cTEM-19m issue de la recombinaison de TEM-1 et PSE-4.

La coloration est tel que le bloc provenant de TEM-1 et PSE-4 sont respectivement colorés bleu ou rouge. La chimère cTEM-2m est recombriquée au niveau de la région 66 à 73, la chimère cTEM-17m porte la région recombriquée 150 à 190 et finalement la chimère cTEM-19m comporte ces deux régions échangées de TEM-1 vers PSE-4.

1.5. Justification des méthodologies choisies pour examiner une potentielle relation fonction/structure/dynamique

1.5.1. Évaluation de la fonction des protéines

Afin de vérifier l'effet de la recombinaison sur la fonction des chimères de TEM-1 et PSE-4, une approche de cinétique enzymatique a été choisie puisque celle-ci a précédemment été utilisée pour caractériser les enzymes natives. La fonction enzymatique des β -lactamases peut se caractériser, soit par la capacité de l'enzyme à hydrolyser des composés comportant un cœur β -lactame, ou encore par la capacité de l'enzyme à permettre la survie d'une cellule bactérienne en présence d'un antibiotique β -lactame. Dans le second cas, plusieurs facteurs peuvent influencer le taux de survie conféré par la β -lactamase, par exemple le choix des cellules utilisées, du vecteur, ou encore, le fait d'induire ou non la surexpression de l'enzyme. Puisque l'objectif est de caractériser la fonction des chimères et de comparer celles-ci aux enzymes natives, l'élimination de facteurs pouvant influencer la fonction est une considération importante. La fonction des β -lactamases sera donc définie en termes de la capacité de l'enzyme isolée purifiée à hydrolyser des antibiotiques β -lactames, selon leur cinétique enzymatique. L'activité catalytique des β -lactamases peut être décrite selon l'équation simplifiée suivante :



où E représente l'enzyme, S le substrat, E : S le complexe de *Michaelis*, E-S l'intermédiaire acyle-enzyme et P le produit de la réaction. Les constantes k_1 et k_{-1} correspondent à l'association et à la dissociation de l'enzyme et du substrat alors que k_2 et k_3 correspondent respectivement aux constantes de vitesse des étapes d'acylation et de désacylation (86). Les constantes catalytiques K_M , la constante de Michaelis rapportant sur l'affinité productive de l'enzyme, et k_{cat} , la constante de roulement définie par k_2 et k_3 (ou vitesse catalytique, soit la transformation du substrat en produit par quantité d'enzyme), seront déterminées pour chacune des enzymes chimériques du système et comparées aux enzymes natives. De plus, nous vérifierons l'hydrolyse de différents substrats de type pénicilline (benzylpénicilline et carbénicilline) et céphalosporine de première (céphalotine, céfazoline) et troisième génération

(céfotaxime) puisque pour les pénicillines, l'étape de désacylation est limitante alors que pour les céphalosporines, l'étape d'acylation est limitante (122). Les analyses graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk permettront de déterminer les constantes catalytiques. Le système β -lactamase/ β -lactame comporte certaines particularités. Pour l'étude de la cinétique de ces enzymes suivies par mesure spectrophotométrique, il est difficile d'utiliser des concentrations saturantes de substrats. En effet, la consommation du substrat est suivie plutôt que l'apparition du produit. Étant donné les valeurs élevées de K_M de ces enzymes, des concentrations élevées de substrat sont requises afin de pouvoir analyser la cinétique selon la représentation graphique de Michaelis-Menten qui prend la forme d'une hyperbole où le K_M est l'asymptote. Puisque l'absorbance initiale est élevée aux concentrations importantes de substrat, la détermination de la vitesse réactionnelle initiale est limitée en fonction de la sensibilité de l'appareil. Pour remédier à cette limitation, la transformation linéaire de Lineweaver-Burk, soit la double inverse de la représentation de Michaelis-Menten, est utilisée puisqu'elle ne nécessite pas de données aux concentrations saturantes de substrat. Toutefois cette représentation possède le désavantage d'augmenter les incertitudes pour la détermination des constantes catalytiques.

1.5.2. Évaluation de la structure des protéines

Puisque les chimères étudiées ici sont des enzymes évoluées en laboratoire issues de la recombinaison d'enzymes naturelles, il nous sera nécessaire de vérifier si la structure native est maintenue. De plus, obtenir le détail atomique est d'un grand intérêt : si des variations de fonction sont observées, une connaissance de la structure nous permettra d'établir des hypothèses quant au rôle de potentielles modifications structurales. Différentes méthodologies, telles la RMN, le cryo-EM ou encore le SAXS, peuvent être utilisées afin de caractériser la structure d'une protéine. Toutes ces méthodologies sont par contre limitées au niveau de la possibilité d'obtenir le détail atomique de la structure de ces protéines de 30 kDa. La cristallographie par diffraction de rayons X a donc été choisie puisqu'elle permet d'obtenir une représentation plus complète de la structure de la protéine à l'état statique.

1.5.2.1. Cristallographie par diffraction de rayons X

L'obtention d'une structure de protéine par cristallographie à diffraction de rayons X se réalise en 4 grandes étapes (**Figure 1.10**) ([123](#)). Dans un premier temps, il est nécessaire d'obtenir la protéine dans un état cristallin, étape souvent critique puisque plusieurs paramètres (pureté de l'échantillon, température, pH, précipitants, additifs, sels) doivent être optimisés. Par la suite, le cristal est placé dans un faisceau de rayons X afin d'obtenir des patrons de diffraction. La troisième étape consiste en la construction d'une carte de densité électronique qui sera utilisée pour le développement d'un modèle structural en fonction de la séquence peptidique de la protéine. Dans les cas d'obtention de structure de protéines ayant des homologues avec des structures déjà résolues, ces informations peuvent être utilisées afin d'employer une approche simplifiée de remplacement moléculaire.

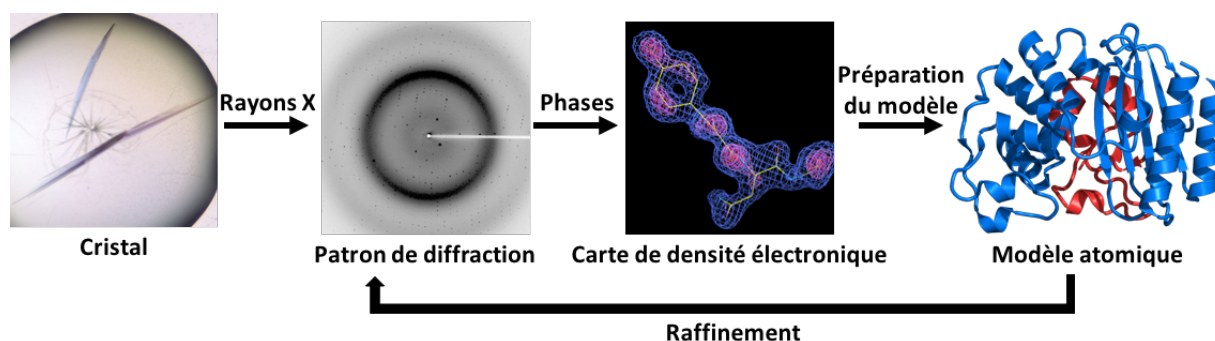


Figure 1.10. Processus du développement d'un modèle de structure atomique d'une protéine par la méthodologie de cristallographie par diffraction de rayons X.

Le modèle structural final contient les coordonnées de localisation (x, y, z) de chaque atome, le facteur de température (ou B-factor ou Debye-Waller Factor) ainsi que l'occupation (*occupancy*). Cette dernière information permet, dans le cas de conformations alternatives d'un atome, de connaître la probabilité de présence de chaque conformation. Cette donnée peut suggérer du dynamisme. Le facteur de température renseigne sur la distribution de la densité électronique autour de l'emplacement moyen d'un atome. Par ce paramètre, il est aussi possible de suggérer du dynamisme. Par contre, un facteur de température élevé peut aussi indiquer des lacunes au niveau du modèle structural.

La cristallographie est avantageuse puisqu'elle permet de visualiser le positionnement des atomes de la protéine sans limitation au niveau de la taille de celle-ci. Toutefois, puisque la protéine est dans un état cristallin et que la diffraction s'effectue généralement à des températures très basses, afin de préserver l'intégrité du cristal, le principal désavantage de cette méthodologie réside dans le fait que les mouvements atomiques peuvent être figés. Des travaux récents ont d'ailleurs démontré que pour 30 différentes protéines cristallisées, la distribution des conformères observables de plus de 35% des chaînes latérales était remodelée en fonction de la température de diffraction entraînant la non-résolution de conformations alternatives et masquant ainsi des informations importantes pour l'analyse structure/fonction (124). Le facteur de température, peut induire l'expérimentateur en erreur au niveau de l'interprétation qu'il en fait. De plus, dans les cas où le facteur de température révèle du dynamisme, il n'identifie pas l'échelle de temps associée au mouvement.

1.5.3. Évaluation de la dynamique des protéines

Tel que précédemment présenté, le rôle du dynamisme des protéines envers la fonction enzymatique (toujours débattu) est une idée qui a grandement gagné en popularité afin d'expliquer l'efficacité des enzymes. Considérant le nombre grandissant de démonstrations d'une corrélation entre la fonction enzymatique et les mouvements atomiques, et ce, dans plusieurs systèmes enzymatiques différents, nous nous intéresserons ici à vérifier si les mouvements d'une protéine sont conservés chez des homologues de celle-ci, vérifiant ainsi un potentiel maintien ou changement évolutif de la dynamique. De plus, tel qu'il l'a été précédemment suggéré, si la dynamique est essentielle à la fonction enzymatique, il semble logique que celle-ci soit conservée chez des intermédiaires d'un chemin évolutif. Le système composé de chimères de TEM-1 et PSE-4 est ici un modèle permettant d'investiguer le rôle évolutif de la dynamique envers la fonction enzymatique. Finalement, une meilleure compréhension du rôle du dynamisme des protéines envers leur fonction sera d'intérêt pour le développement d'une approche plus complète d'ingénierie des protéines basée non seulement sur la structure, mais aussi sur le dynamisme, afin d'optimiser la fonction.

Au cours des chapitres suivants, les mouvements ayant lieu sur différentes échelles de temps seront caractérisés par l'utilisation de deux principales approches. Dans un premier

temps, la résonance magnétique nucléaire (RMN) sera utilisée puisque cette méthodologie permet d'étudier les mouvements sur plusieurs échelles de temps allant des picosecondes à plusieurs secondes. De plus, cette méthodologie expérimentale peut permettre d'étudier les protéines en solution et dans des conditions physiologiquement acceptables. Dans un second temps, puisque la RMN possède certaines limitations qui seront exposées au cours des prochaines sections, nous utiliserons aussi une approche de simulations de dynamique moléculaire *in silico* (MD) afin d'accéder à certaines échelles de temps. Une emphase particulière sera mise sur la description de la RMN puisque cette méthodologie est centrale à cette thèse.

1.5.3.1. Historique de la RMN : de la caractérisation de petites molécules vers les protéines

Le principe fondamental de la RMN, soient les propriétés magnétiques des noyaux d'absorbé puis d'émettre à une fréquence de résonance précise de l'énergie électromagnétique lorsque dans un champ magnétique, a été pour la première fois mesuré et décrit en 1938 par Isidor Isaac Rabi et collaborateurs (prix Nobel de physique de 1944) ([125](#)). En 1946, les groupes de Felix Bolch (Stanford) ([126](#)) et Edward Purcell (Massachusetts Institute of Technology) ([127](#)) (prix Nobel de physique de 1952) ont indépendamment effectué les premières mesures de résonance magnétisme nucléaire dans un champ magnétique induit. En 1951, Russell H. Varian dépose un premier brevet portant sur la corrélation existant entre la force du champ magnétique utilisé et la fréquence de la résonance émise par les noyaux atomiques ([128](#)). Ses travaux mèneront, en 1952, au développement du premier aimant commercialement disponible pour effectuer des mesures de RMN, offert par la compagnie Varian Associates.

En ces débuts, la spectroscopie RMN était principalement utilisée pour étudier de petites molécules dû à la complexité d'analyse des spectres résultants. En 1950, grâce à la caractérisation de molécules de plus en plus complexes, W. Proctor et W. Dickinson expliquent le phénomène de déplacement chimique, soit l'influence de l'environnement chimique d'un noyau sur les signaux produits par celui-ci ([129](#), [130](#)). Au cours années suivantes, des premiers essais sur de petites molécules biologiques, des acides aminés, des di- et des tri- peptides, sont effectués. C'est en 1957 que le premier spectre de proton (^1H)

résultant de l'analyse d'une protéine, la ribonucléase pancréatique bovine, a été obtenu en utilisant l'aimant de la plus haute puissance disponible à cette époque (40 MHz) et un environnement d'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) afin de minimiser les signaux dus aux ^1H de l'eau (131).

Dans les années 1960, grâce à d'importantes améliorations technologiques permettant le développement d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants et par l'augmentation de la capacité de calcul informatique, la méthodologie RMN se voit profiter de grandes améliorations de la sensibilité. L'introduction de la RMN par transformation de Fourier (FT-NMR) ou RMN impulsionnelle en 1966 par Ernst et Anderson marquera un point tournant dans le développement de cette méthodologie puisque cette amélioration permettra d'exciter simultanément différents noyaux atomiques et de déconvoluer les signaux produits par ceux-ci (132). Suite à l'introduction de la FT-RMN, un grand nombre de séquences de magnétisation excitant les différents noyaux atomiques ont vu le jour, menant au développement en 1976, par Richard Ernst (prix Nobel de chimie de 1991), de la RMN multidimensionnelle. Cette approche élargira les applications possibles de la RMN, permettant entre autres, une caractérisation plus complète des protéines puisqu'il sera possible d'établir des corrélations entre les résonances des différents noyaux atomiques (133).

La première résolution *de novo* par RMN bidimensionnelle d'une structure de protéine fut celle de la BUSI (bull seminal protease inhibitor, protéine de 57 acides aminés) en 1984 par le groupe de Kurt Wüthrich (prix Nobel de Chimie de 2002) (134). Ces résultats seront toutefois controversés et plusieurs penseront que la structure obtenue avait été produite à partir d'une structure cristalline précédemment obtenue (135). Afin de clore ce débat, en 1984, le cristallographe Rober Huber lance le défi à Kurt Wüthrich de résoudre *de novo* par RMN la structure de l' α -amylase, alors que son groupe en déterminera la structure par cristallographie. En 1988, le « *Journal of Molecular Biology* » publie un rapport de plus de 50 pages portant sur la méthodologie employée par le groupe de Kurt Wüthrich pour déterminer la structure d'une protéine par RMN. Ces travaux marqueront les débuts de l'utilisation de la RMN pour l'étude des protéines (136).

1.5.3.2. Principe de la RMN

Dans « le guide de poche de la RMN biomoléculaire » écrit par Doucleff, Hatcher-Skeers et Crane, une image simple, mais très efficace est employée afin de représenter la spectroscopie RMN (137). Cette illustration est basée sur la comparaison de la RMN à un chœur de clochettes où chacune d'entre elles représente un type d'atome. L'expérience RMN est représentée par un marteau fournissant l'énergie nécessaire aux clochettes pour se mettre à résonner. Lorsque de l'énergie est donnée aux clochettes, les plus imposantes joueront des notes graves dont la fréquence est plus basse (période longue) alors que les petites clochettes joueront des sons aigus ayant une fréquence haute (période courte). Au cours de l'expérience la plus simple de spectroscopie RMN, on mesure donc la résonance des clochettes suite à un coup de marteau. Dans le cas des expériences plus complexes, on mesure plutôt un transfert d'énergie entre les clochettes, suite à un coup de marteau, un peu à l'idée d'un pendule de Newton.

Globalement, la spectroscopie RMN utilise la propriété intrinsèque de spin non nul des noyaux atomiques. Rappelons qu'un atome est décrit par 3 principales composantes propres soient : 1) sa masse atomique, 2) sa charge et 3) son spin (ou moment cinétique de spin) défini selon le nombre de protons et de neutrons composant le noyau. Lorsque le moment cinétique de spin est non-nul, celui-ci, avec le rapport gyromagnétique (propriété spécifique à chaque type de noyau), permettent de décrire le vecteur du moment magnétique. En l'absence d'un champ magnétique, le moment magnétique des spins peut s'orienter dans n'importe quelle orientation. Toutefois, lors de l'application d'un champ magnétique fixe, le moment magnétique s'orientera en fonction de celui-ci (soit aligné ou opposé à l'orientation du champ magnétique stable). De plus, en présence d'un champ magnétique fixe, le moment magnétique du spin tournera autour de l'orientation du champ magnétique stable. Cette caractéristique définit le moment magnétique angulaire. Tel que mentionné précédemment, un spin peut s'orienter différemment selon l'orientation du champ magnétique stable et selon les niveaux énergétiques possibles pour un spin. Le nombre d'états énergétiques possibles pour un spin est défini selon $2I+1$ où I est le nombre quantique du spin d'un noyau atomique. Par exemple, dans le cas de l'hydrogène et de l'azote, le nombre quantique de spin est de $\frac{1}{2}$. Le nombre d'états énergétiques de spin est donc de $2(2*\frac{1}{2}+1)$ soit, orienté dans la direction ou opposé à

la direction du champ magnétique fixe. En fonction de leur nombre de spins, les différents noyaux atomiques se comportent différemment en spectroscopie RMN. Les noyaux ayant un nombre de masse et un nombre de protons pair, comme l'isotope ^{12}C (isotope le plus abondant pour le carbone), auront un spin de 0 et ne produisent pas de signal en spectroscopie RMN. Les noyaux atomiques ayant un nombre de masse pair et un nombre de protons impair, comme l'isotope ^{14}N (isotope le plus abondant de l'azote), possèdent un nombre entier décrivant le spin. Lors d'expérience RMN, ceux-ci résonneront, mais leur durée sera très courte dû au moment électrique quadripolaire décrivant la distribution de charge qui, dans ce cas, est non sphérique. Finalement, les noyaux atomiques ayant un nombre de masse impair possèdent un spin demi-entier ($1/2$, $3/2$, etc.). Ce sont ces noyaux qui sont généralement étudiés au cours d'expérience de spectroscopie RMN sur des protéines. Ces noyaux ne possédant pas de moment électrique quadripolaire et sont donc idéaux pour l'étude de leur signal de résonance. La première étape afin de caractériser une protéine par RMN sera donc de produire celle-ci avec des isotopes ayant un nombre de spins demi-entier c'est-à-dire en utilisant les isotopes ^1H , ^{13}C et ^{15}N .

Le signal observé en RMN est le résultat de l'application de radiations électromagnétiques de fréquences spécifiques et de courte durée (pulse - le marteau) sur les spins alignés par un champs magnétique fixe. Ce pulse entraîne le phénomène de résonance des noyaux, c'est à dire que ceux-ci ne seront plus alignés avec le champ magnétique fixe suite au pulse, et qu'en fonction du temps, ceux-ci retourneront à leur état d'équilibre avant l'application du pulse par le phénomène de la relaxation. C'est ce phénomène de résonance qui permet l'obtention d'un pic sur un spectre RMN. En fonction de l'environnement chimique de chaque noyau, cette fréquence sera plus ou moins affectée.

Plusieurs différents facteurs peuvent influencer la qualité des spectres obtenus par spectroscopie RMN ([138](#), [139](#)). Dans un premier temps, la taille de la protéine est un facteur considérable pour l'utilisation de la spectroscopie RMN. Puisque chaque acide aminé (à l'exception des prolines) créera un pic de résonance sur le spectre HSQC (qui sera exposé dans la section suivante), plus la taille de la protéine est importante plus le spectre sera bondé de signaux pouvant entraîner un encombrement important compliquant l'assignation des résonances. Dans un second temps, la puissance de l'électroaimant corrèle directement avec la différence énergétique (ΔE) entre les différents états de spin selon l'équation $\Delta E = \hbar\gamma B_0 /$

2π , où h est la constante de Planck, γ le ratio gyromagnétique et B_0 la force du champ magnétique fixe. Plus celui-ci est intense, plus la différence entre les états énergétiques est grande et donc meilleure sera la dispersion spectrale. Finalement, la production d'une protéine de taille importante dans un environnement riche en deutérium (D_2O) est aussi une approche permettant d'augmenter la qualité des spectres. En effet, lorsque la protéine d'intérêt possède plus de 250 acides aminés (>20 kDa), l'impact négatif de deux principaux phénomènes, soient la diminution du ratio signal sur bruit et la diminution de la résolution spectrale (dûe à l'augmentation du nombre de signaux) peuvent être atténués par la deutération pour réduire la prédominance des signaux des 1H . L'incorporation de deutérium à la place d'hydrogène dans une protéine permet de diminuer l'effet de la diffusion et de la relaxation des spins.

1.5.3.3. Assignation des résonances d'une protéine

Afin de savoir à quel acide aminé appartient chaque signal de résonance sur un spectre corrélant les résonances 1H et ^{15}N , il est nécessaire d'effectuer l'assignation de ceux-ci en fonction des résonances émises selon différentes expériences. Le spectre généralement utilisé à titre de référence est celui résultant de l'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence ou Heteronuclear Single Quantum Correlation) où la magnétisation s'effectue au niveau des atomes 1H et ^{15}N du squelette peptidique (**Figure 1.12 A**). Ce spectre comporte les dimensions 1H et ^{15}N (en plus de l'intensité) (**Figure 1.11**). Au cours de cette expérience, chaque acide aminé, à l'exception des prolines (amide peptidique tertiaire), produira des signaux qui seront observables sur le spectre. Afin d'assigner les résonances du spectre HSQC, des spectres bidimensionnels et tridimensionnels tels les HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB et HN(CO)CACB seront nécessaires (**Figure 1.12**). En alignant le HSQC avec les autres spectres, il est ainsi possible d'obtenir une corrélation entre l'azote et l'hydrogène du lien peptidique et les carbones et carbonyles associés (**Figure 1.11 B**). Les spectres tridimensionnels seront ensuite analysés par tranches en dimension carbone, lorsqu'alignés dans la dimension azote. Ceci permettra donc l'attribution des résonances comme un puzzle où les signaux doivent être alignés entre les spectres horizontalement et verticalement (**Figure 1.11 C**). La **figure 1.13** représente un exemple simple de la stratégie d'assignation permettant de lier à chaque résonance 1H - ^{15}N les $C\alpha_i$, $C\alpha_{i-1}$, $C\beta_i$ et $C\beta_{i-1}$, permettant ainsi de déterminer

l'identité du résidu en fonction des déplacements chimiques des carbones α et β , et de la séquence peptidique connue.

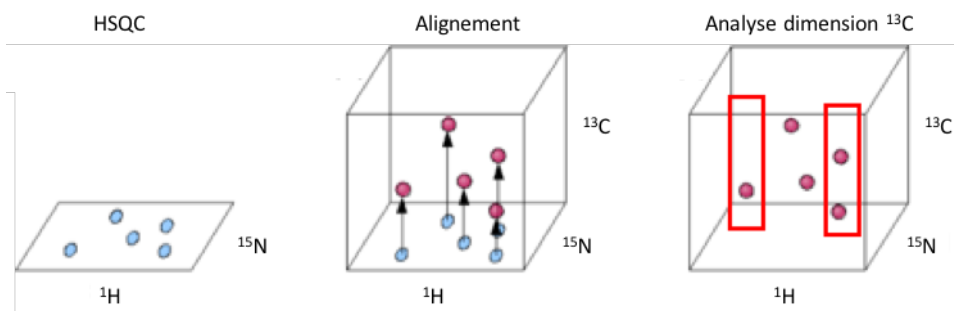


Figure 1.11. Corrélation du spectre RMN-HSQC bidimensionnel aux spectres RMN tridimensionnels.

Image tirée et adaptée du site web : « Protein NMR – Visualising 3D spectra » (140).

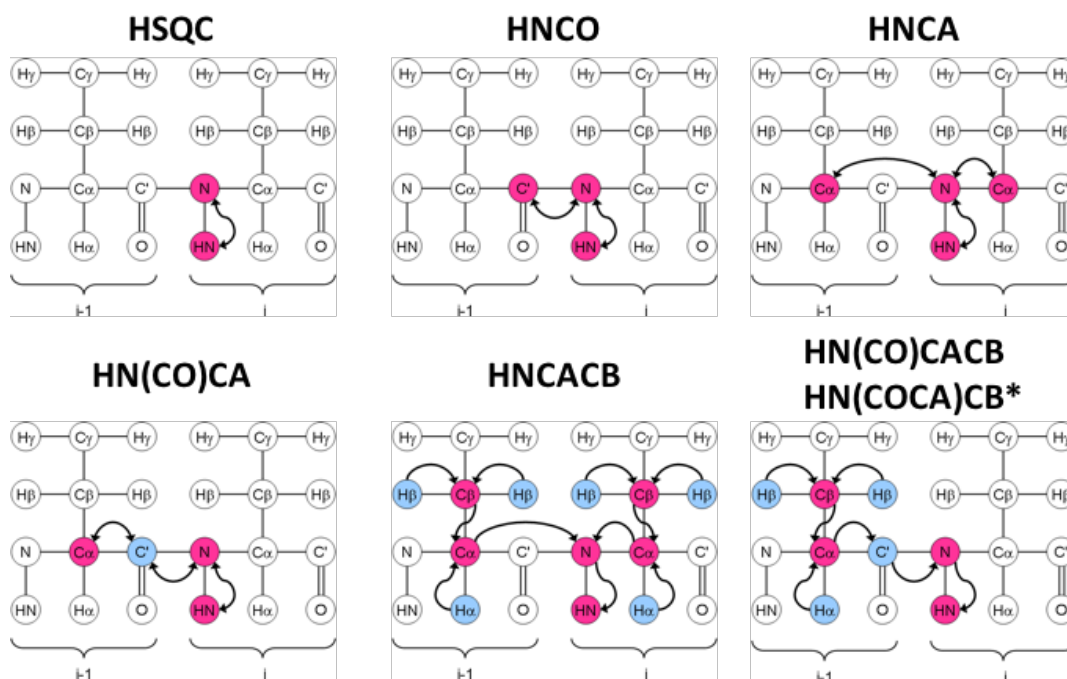


Figure 1.12. Représentation de la magnétisation et du transfert de celle-ci pour un résidu « i » et son voisin « i-1 » au cours des différentes expériences de RMN réalisées pour l'assignation des résonances d'une protéine.

Les atomes observés sont colorés rose alors que les atomes où la magnétisation est transférée sont coloré bleu. Le spectre HN(COCA)CB est une modification du spectre HN(CO)CACB où seul le $C\beta_{i-1}$ est observé dans la dimension C. Image tirée et adaptée du site web : « Protein NMR – Spectrum Descriptions » (141).

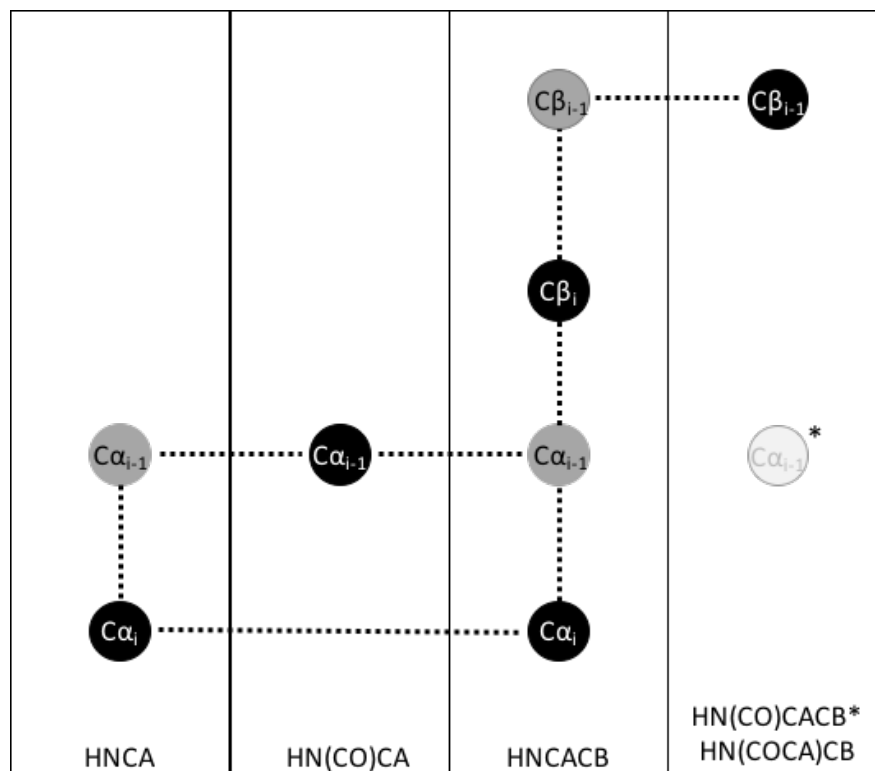


Figure 1.13. Représentation d'une stratégie simplifiée d'assignation des résonances pour un résidu « i » d'une protéine utilisant différentes expériences tridimensionnelles permettant une corrélation entre les carbones suite à l'alignement avec la dimension azote.

L'intensité des résonances observées est représentée respectivement en gris (signal plus faible) et en noir (signal plus intense) en fonction de la magnétisation. Les lignes pointillées horizontales représentent des résonances pour le même atome présent dans les différents spectres tandis que les lignes pointillées représentent la corrélation entre les atomes des résidus « i » et « i-1 ». Le spectre HN(COCA)CB est une modification du spectre HN(CO)CACB où seul le $C\beta_{i-1}$ est observé.

1.5.3.4. Caractérisation du dynamisme d'une protéine par RMN

Suite à l'assignation des résonances d'une protéine, différentes expériences peuvent être effectuées en RMN pour mesurer la relaxation des spins et ainsi caractériser les mouvements atomiques présents dans celle-ci et ce pour une vaste gamme d'échelle de temps (**Figure 1.14**) ([142](#)).

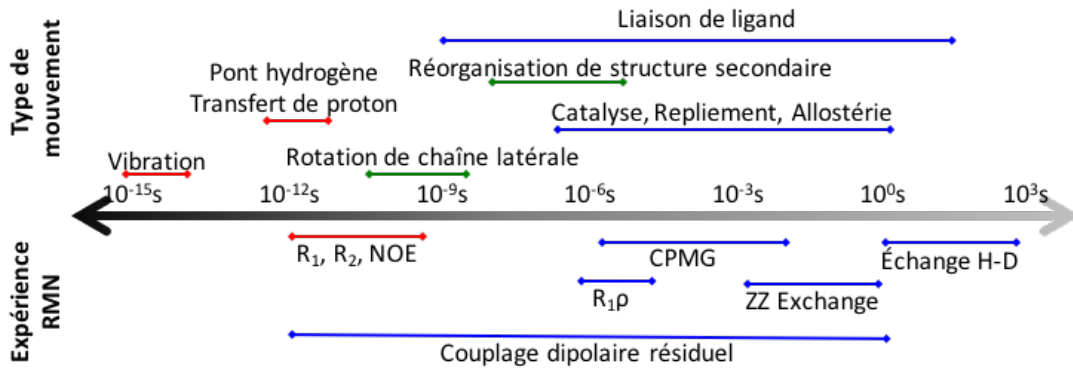


Figure 1.14. Échelle de temps des différents mouvements atomiques présents dans les protéines et expériences RMN permettant leurs caractérisations.
(Inspiré de Doucet & Pelletier (2009) (143)).

Le signal RMN observé est aussi nommé FID pour « Free Induction Decay ». Le signal obtenu suite à une expérience de RMN représente une onde constituée par l'ensemble de tous les spins excités. Par une transformation de Fourier, il est ensuite possible de déconvoluer l'ensemble des ondes composant le FID, permettant ainsi d'obtenir un pic de résonance pour chaque spin en fonction de la fréquence de l'onde spécifique à celui-ci. Le signal FID, tel que son nom l'indique, diminue en fonction du temps selon la relaxation des spins. La relaxation s'effectue selon deux principaux phénomènes. Dans un premier temps, le taux de relaxation dit longitudinal est défini par R_1 . Ce taux de relaxation est calculé selon $1/T_1$ où T_1 correspond au temps nécessaire aux noyaux pour retourner à leur état initial soit avant l'application du pulse électromagnétique. Dans un second temps, la relaxation s'effectue aussi selon la relaxation dite transversale. Ce taux de relaxation, R_2 , est calculé selon $1/T_2$ où T_2 correspond au temps où la perte de cohérence entre l'ensemble des ondes d'un même spin dans différentes molécules est observée. Cette perte de cohérence entraîne un élargissement du pic de résonance observé sur le spectre RMN, car plutôt que d'observer une seule fréquence de résonance suite à la transformation de Fourier on observe plusieurs différentes fréquences pour un même noyau.

Les mouvements atomiques ayant lieu sur l'échelle de temps des ps aux ns sont mesurés par les expériences de R_1 , R_2 et NOE et une interprétation utilisant l'algorithme « Modelfree ». L'effet Overhauser nucléaire (NOE) correspond à la relaxation causée par un transfert de magnétisation spatial lors du couplage dipolaire entre des noyaux. Par l'analyse

utilisant l'algorithme Modelfree, il est possible de calculer le paramètre d'ordre S^2 correspondant à l'amplitude du mouvement et allant sur une échelle de 0 à 1 (où 1 est une protéine complètement rigide et 0 une protéine dénaturée) et le taux de relaxation (R_{ex}) qui indique du dynamisme sur l'échelle de temps ps-ns.

L'expérience RMN de couplage dipolaire résiduel (Residual Dipolar Coupling, RDC) permet d'étudier les mouvements atomiques ayant lieu sur l'échelle de temps allant des ps aux ms. Cette méthodologie, utilisant le couplage dipolaire entre les spins, permet, en fonction de l'angle du champ magnétique appliqué et du vecteur HN, d'extraire des informations structurelles et temporelles sur la conformation de la protéine. Toutefois, afin de pouvoir extraire les vecteurs de couplage dipolaire, il est nécessaire d'utiliser des milieux dits d'alignement avec le champ magnétique, par exemple des phages filamenteux, des bicelles ou des gels de polyacrylamide (144). Cette technique expérimentale est laborieuse puisqu'il est nécessaire d'utiliser un minimum de 5 différents milieux d'alignement. De plus, cette méthode se limite généralement aux protéines de petite taille puisque la qualité spectrale influence directement les erreurs expérimentales produites par cette méthode. Pour ces raisons, les expériences de RDC n'ont pas été utilisées.

Finalement, l'expérience de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG-RMN) permet de mesurer les mouvements atomiques ayant lieu sur l'échelle de temps de la μ s à la ms (0,3 à 10 ms) (144). Cette expérience est basée sur la mesure de T_2 , soit le temps de relaxation transversal. Les mouvements lents modifient les fréquences de résonances des atomes, entraînant du même coup un élargissement important des signaux de résonance. L'expérience CPMG utilise une série de pulses électromagnétiques « *refocussants* » appliqués selon différentes intervalles de temps. Cette expérience permet d'obtenir les paramètres R_{ex} , indiquant le dynamisme, ainsi que de calculer k_{ex} , la constante de relaxation caractérisant la fréquence du mouvement.

Le principal avantage de la CPMG-RMN est d'être effectuée en solution, dans des conditions expérimentales physiologiquement intéressantes, et de permettre l'étude de mouvements ayant lieu sur diverses échelles de temps. Toutefois, cette méthodologie possède deux limitations principales, soit 1) au niveau de la taille des protéines qui sont caractérisables et 2) de l'étude des chaînes latérales. Puisque les β -lactamases sont volumineuses, celles-ci seront produites dans un milieu de deutération afin d'obtenir une bonne résolution spectrale.

De plus, la quantité importante de signaux émis par ces protéines limite la caractérisation des chaînes latérales. Finalement, les études de dynamique des protéines en RMN sont généralement effectuées au niveau du vecteur N-H du squelette peptidique. Pour les protéines telles les β -lactamases où la fonction est principalement réalisée par les chaînes latérales, cette méthodologie peut être insuffisante pour la détermination du lien entre les mouvements et la fonction. Une alternative pour caractériser les mouvements atomiques des protéines, tant au niveau du squelette peptidique que des chaînes latérales, sont les simulations de dynamique moléculaire *in silico*.

1.5.3.5. Simulations de dynamique moléculaire *in silico* (MD)

Puisque les β -lactamases sont des protéines volumineuses et que l'étude de leurs mouvements par RMN est incomplète, l'utilisation de simulations de dynamique moléculaire *in silico* (MDs pour Molecular Dynamics simulation) est une alternative intéressante. Celles-ci sont de plus en plus présentes dans la littérature scientifique afin d'étudier le dynamisme des protéines. Cette approche permet de générer un modèle présentant les mouvements de la protéine en fonction du temps. L'avantage principal de cette approche est qu'elle permet d'étudier la protéine dans son ensemble en incluant les chaînes latérales et le solvant. Afin de générer le modèle de mécanique moléculaire, chaque atome de la protéine est considéré comme une sphère ayant des propriétés physiques spécifiques. Les atomes liés chimiquement sont reliés entre eux par des forces modélisées telles des ressorts. Les forces internes ressenties par le modèle structural en fonction du temps sont décrites par plusieurs équations mathématiques qui sont par la suite résolues dans un ensemble (le champ de force) afin d'obtenir une représentation de la protéine à chaque instant. Par exemple, la loi de Hooke permet de décrire les interactions entre les atomes liés chimiquement tandis que l'équation de potentiel de Lennard-Jones permet de décrire les interactions entre des atomes voisins non liés entre eux. En utilisant l'ensemble d'équations pour les différents paramètres physiques caractérisant la protéine à l'étude, la simulation résout l'équation du mouvement de Newton, permettant ensuite de visualiser les mouvements présents dans la protéine en fonction du temps ([145](#)).

Le développement du concept de simulations de dynamique moléculaire a initialement été introduit dans les années 50 par des physiciens théoriciens. La première simulation est

attribuée à Alder et Wainwright, qui en 1957, ont utilisé le modèle « hard-sphère » selon lequel les atomes n'interagissent entre eux que selon des collisions (146). En 1964, Rahman améliore ce premier modèle afin de mieux décrire les interactions interatomes (147). Au cours des années 70, grâce aux améliorations importantes apportées aux ordinateurs, et de par leur puissance de calcul grandissante, on assistera à d'importants développements pour cette méthodologie. C'est en 1976 que la première simulation de dynamique moléculaire d'une protéine, soit l'inhibiteur de la trypsine bovine (BPTI), une protéine de 500 atomes, a été effectuée en utilisant des fonctions d'énergie (148). Cette première simulation caractérisait 9,2 ps de mouvement. Aujourd'hui les simulations sont généralement effectuées avec une phase d'équilibration du système de plusieurs nanosecondes, soit extensivement plus longues que cette première simulation. La première simulation dans l'ordre des μ s a été rapportée en 1998 afin de caractériser un sous-domaine de la villine, une protéine de liaison à l'actine (149). C'est en 2009 que l'ordre de la ms a été atteint pour la première fois afin de caractériser BPTI sur le serveur ANTON (150). Aujourd'hui, les simulations sont aussi effectuées sur des systèmes beaucoup plus imposants comportant généralement de 10^4 à plus de 10^6 atomes. Le nombre de publications rapportant des simulations de dynamique moléculaire a augmenté de façon exponentielle au cours des deux dernières décennies (145). À ce jour, plusieurs différentes méthodologies ont été développées afin de caractériser les différents processus impliquant des protéines, allant de la liaison d'un ligand au mouvement des protéines dans les membranes lipidiques.

Une approche de MD sera utilisée dans les prochains chapitres afin d'étudier les mouvements atomiques ayant lieu sur l'échelle de temps de la ns à la μ s, puisque tel qu'exposé précédemment, la caractérisation de ces mouvements par RMN est techniquement limitée pour les protéines volumineuses. Malgré le fait que cette approche *in silico* génère des modèles devant être analysés avec prudence, elle est d'intérêt ici, de par sa complémentarité avec la RMN. Cette approche nous permettra aussi de visualiser les mouvements des chaînes latérales des acides aminés qui ne sont pas caractérisés par les approches de RMN utilisés dans les prochains chapitres.

Par l'application de toute ces approches, nous vérifierons la présence d'une corrélation entre la structure la fonction et la dynamique des protéines dans un contexte d'évolution. De

plus, nous vérifierons l'importance de la considération de la dynamique dans un contexte d'ingénierie des protéines. Il est toutefois important ici, de spécifier que les expériences de dynamique effectuées sont réalisées en absence de substrat et donc, que les mouvements ne peuvent être que considérés coïncidant avec la fonction et non causale de celle-ci. L'importance de ce facteur et les alternatives possibles seront discutées au chapitre 6 et dans l'annexe 5.

Préface au chapitre 2

Les protéines sont dynamiques. La compréhension du rôle de ces mouvements est cruciale afin d'avoir un portrait complet du mécanisme fonctionnel d'une enzyme. La compréhension de l'impact de la dynamique des protéines envers la fonction est d'un grand intérêt pour l'ingénierie des protéines. Dans cet article, nous démontrons dans un premier temps que deux enzymes naturellement évoluées, homologues et possédant une grande similarité structurale et fonctionnelle, conservent aussi entre elles une dynamique similaire. Un ensemble restreint de résidus dynamiques sur une échelle de temps lente est conservé entre ces enzymes suggérant donc que la dynamique est un trait fonctionnellement important et conservé au cours de l'évolution. Ces deux enzymes homologues ont précédemment été recombinaisonnées afin de générer des chimères artificiellement évoluées. Nous démontrons ici que la structure cristalline à haute résolution (1.05 Å) de l'une des chimères actives est essentiellement identique à celles des enzymes natives. Par contre, une différence significative de la dynamique lente sur l'échelle de la milliseconde observée par RMN CPMG est observée chez cette chimère relativement aux des enzymes natives. Cette différence inclut plusieurs résidus fonctionnellement importants. La chimère artificiellement évoluée est donc fonctionnellement tolérante à des changements de dynamique sur l'échelle de la constante catalytique de consommation du substrat. Cette tolérance à des changements de dynamique démontre que la stricte maintenance de la dynamique native n'est pas nécessaire pour l'ingénierie de protéine fonctionnelle.

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue *Chemistry & Biology* en octobre 2014 (depuis 2015, *Cell Chemical Biology*). Initialement, l'idée de cet article, soit de caractériser la dynamique lente dans un système de β -lactamases naturellement et artificiellement évoluées a été développé par Nicolas Doucet, Christopher Clouthier et moi-même sous la direction de Joelle Pelletier. Ayant réalisé les expériences constituant cet article tant au niveau de la préparation des échantillons que de l'exécution et l'analyse des résultats de cinétique enzymatique, de résonance magnétique nucléaire et de cristallisation des protéines, ma contribution à cet article est centrale. De plus, j'ai aussi grandement contribué à tous les niveaux de rédaction de l'article, de la préparation des figures

et à la coordination des efforts des coauteurs. Dr. Christopher Clouthier, a contribué à cet article par l'exécution et l'analyse des expériences préliminaires de résonance magnétique nucléaire (RMN) ainsi qu'à la mise en place des protocoles de purification et de cinétique enzymatique compris dans cet article. Il a aussi contribué à l'écriture de cet article. Dr. Jaeok Park, a contribué à l'obtention de structures cristallines des protéines à l'étude et à déterminer le modèle final qui a été déposé dans la base de données des structures de protéines (PDB) le tout, sous la direction de Albert Berguis (Université McGill). Donald Gagné a contribué par son aide à l'analyse des données de RMN sous la direction de Nicolas Doucet (INRS-Armand Frappier).

Chapitre 2

Maintenir la dynamique native n'est peut-être pas nécessaire pour l'ingénierie de protéines fonctionnelles.

2.1. Article 1. Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins.

Sophie M. C. Gobeil^{1,2}, Christopher M. Clouthier^{1,3}, Jaeok Park^{1,4,5}, Donald Gagné^{1,5,6}, Albert M. Berghuis^{1,4,5}, Nicolas Doucet^{1,5,6} & Joelle N. Pelletier^{1,2,3,7} *

¹ PROTEO Network, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6 Canada

² Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada

³ Département de chimie, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada

⁴ Department of Biochemistry and Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, QC, H3G 1Y6, Canada

⁵ GRASP Network, McGill University, Montréal, QC H3G 1Y6, Canada

⁶ INRS–Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC H7V 1B7, Canada

⁷ Center for Green Chemistry and Catalysis (CCVC), Montréal, QC H3A 0B8, Canada

Cell Chemical Biology, 21(10), 1330 – 1340, 2014.

SUMMARY

Proteins are dynamic systems, and understanding dynamics is critical for fully understanding protein function. Therefore, the question of whether laboratory engineering has an impact on protein dynamics is of general interest. Here, we demonstrate that two homologous, naturally evolved enzymes with high degrees of structural and functional conservation also exhibit conserved dynamics. Their similar set of slow timescale dynamics is highly restricted, consistent with evolutionary conservation of a functionally important feature. However, we also show that dynamics of a laboratory-engineered chimeric enzyme obtained by recombination of the two homologs exhibits striking difference on the millisecond timescale, despite function and high-resolution crystal structure (1.05 Å) being conserved. The laboratory-engineered chimera is thus functionally tolerant to modified dynamics on the timescale of catalytic turnover. Tolerance to dynamic variation implies that maintenance of native-like protein dynamics may not be required when engineering functional proteins.

HIGHLIGHTS

- Natural homologs conserve very limited millisecond dynamics
- A laboratory-evolved chimera tolerates dynamic variation on the catalytic timescale
- An underlying potential for flexibility may promote evolvability of function
- Conservation of native-like dynamics is not essential when engineering enzymes

INTRODUCTION

Our understanding of the interplay between protein dynamics and enzyme function is nascent. Beyond the large domain movements required for the function of certain proteins, we can now experimentally observe protein motions on a smaller scale with respect to amplitude and timescale. In particular, enzymes are now seen as populations of conformers in continuous exchange, some among which are conformationally tuned to bind their cognate ligand and turn it over (Hammes, Benkovic et al. 2011). While it is not known whether enzyme motions contribute directly to transition-state chemistry (Kamerlin and Warshel 2010, Liu, Stewart et al. 2013), many studies correlate conformational dynamics (where dynamics refer here to conformational exchange over time) with enzymatic processes such as ligand binding, catalysis, regulation, inhibition, and product release, where motions on the slow (microsecond-to-millisecond [μs - ms]) and the fast (picosecond- to-nanosecond [ps - ns]) timescales have been proposed to be functionally relevant (see, for example, (Bakan and Bahar 2009, Doucet and Pelletier 2009, Doucet, Watt et al. 2009, Fraser, Clarkson et al. 2009, Boehr, McElheny et al. 2010, Bhabha, Lee et al. 2011, Carroll, Mauldin et al. 2012, Wang, Abeysinghe et al. 2012, Klinman and Kohen 2013, Whittier, Hengge et al. 2013).

If enzyme dynamics are functionally relevant, cross-species conservation of dynamics may be expected. The conservation of conformational fluctuations near the active site, on the timescale of the reaction, was computationally predicted within each of the CypA, DHFR, and ribonuclease (RNase) A families (Ramanathan and Agarwal 2011) and has been recently verified by nuclear magnetic resonance (NMR) for RNase A homologs (Gagné, Charest et al. 2012, Gagné and Doucet 2013). In this report, we further evaluate cross-species dynamic conservation in enzymes by examining the slow timescale motions in the homologous class A TEM-1 and PSE-4 β -lactamases. Both have been predicted by model-free calculations of NMR spin relaxation to exhibit global rigidity on the slow timescale (μs - ms motions) (Savard and Gagné 2006, Morin and Gagné 2009). We now report their ^{15}N Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) NMR relaxation dispersion, experimentally confirming their conserved, high rigidity on the millisecond timescale.

Can altered protein dynamics be functionally tolerated upon enzyme modification? While slow protein motions appear to be evolutionarily conserved, is it essential to maintain

native-like dynamics while engineering an enzyme? Although there has been some investigation of the impact of point mutations on dynamics and enzyme function (Fraser, Clarkson et al. 2009, Bhabha, Lee et al. 2011), little is known about the effects of large-scale laboratory recombination on dynamics and whether they are related to functional modifications (Doucet, Watt et al. 2009, Gagné, Charest et al. 2012). We thus investigate a laboratory-recombined chimeric TEM-1/PSE-4 β -lactamase (Voigt, Martinez et al. 2002) to explore the linkage between function and dynamics on the catalytic timescale. The TEM-1/PSE-4 chimera cTEM-17m (Morin, Clouthier et al. 2010) is highly related to TEM-1, although one face of its active site originates from PSE-4 (residues 150–190), introducing 17 mutations relative to TEM-1 in and near the catalytically essential Ω -loop. NMR backbone resonances, circular dichroism, and thermal scanning fluorescence assays of cTEM-17m are characteristic of a well-folded β -lactamase, and its catalytic activity is essentially indistinguishable from that of the “parental” TEM-1 and PSE-4 β -lactamases (Morin, Clouthier et al. 2010, Clouthier, Morin et al. 2012) (**Figure 2.1**). Nonetheless, NMR showed important backbone resonance line broadening, implying the introduction of motions on the slow μ s-ms time-scale in the active-site area. This suggested that laboratory recombination had a disruptive effect on protein motions (Morin, Clouthier et al. 2010). Model-free extraction of the S^2 order parameter further suggested slow timescale motions spanning the entire cTEM-17m structure (Clouthier, Morin et al. 2012).

Here, we provide direct evidence of a far-ranging dynamic perturbation resulting from laboratory recombination. Although the high-resolution crystal structure of the chimera cTEM-17m (1.05 Å resolution) showed high structural conservation with respect to TEM-1 and PSE-4, the slow timescale dynamics sampled by ^{15}N CPMG NMR relaxation dispersion revealed a vastly modified dynamic landscape and a dynamically perturbed active site. We demonstrate that these related class A β -lactamases have conserved rigidity on the slow timescale yet functionally tolerate broad dynamic perturbation on the timescale of catalytic turnover following laboratory engineering. These results imply that strict maintenance of native-like protein dynamics may not be required when engineering functional proteins.

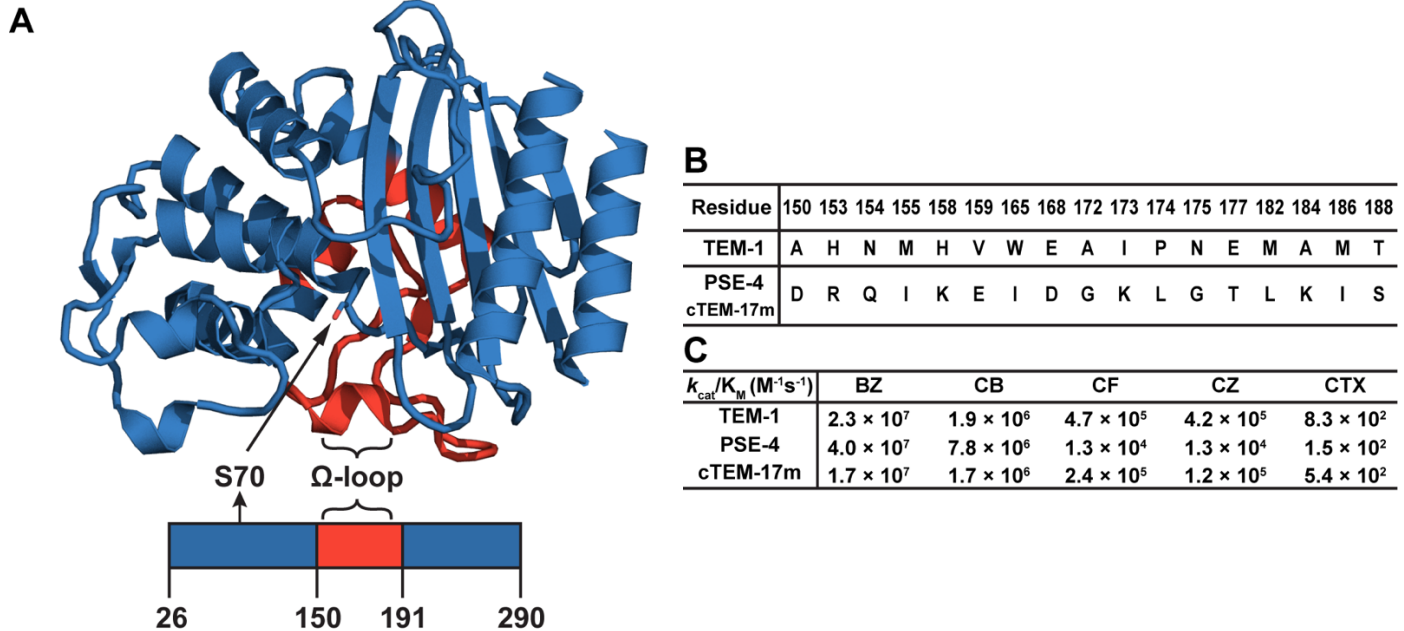


Figure 2.1. Relation of Chimera cTEM-17m to the Parental TEM-1 and PSE-4 Class A β -lactamases.

(A) Structural representation of the sequence blocks exchanged during chimera formation to yield chimera cTEM-17m. The sequence blocks originate from TEM-1 (blue) or from PSE-4 (red). Chimera cTEM-17m shares 94% sequence identity with TEM-1 β -lactamase, with 17 substitutions between residues 150-190 differentiating them. It shares 49% sequence identity with PSE-4 β -lactamase, as 133 substitutions in the 26-149 and 191-290 regions differentiate them (residue numbering is according to (Ambler, Coulson et al. 1991)). The catalytic nucleophile, Ser70 (in sticks), and the catalytically-relevant Ω -loop are indicated to highlight the blended composition of the active-site region. The nomenclature of the chimera is as follows: c indicates chimera formation, and 17 refers to the number of substitutions (or mutations: m) relative to the TEM-1 parental sequence. The cTEM-17m coordinates (PDB ID: 4ID4) were used to generate the figure using PyMOL. (B) Identity of the 17 differing residues in the exchanged sequence block (region 150-190), in the area preceding (helix h6), including and leading out (helix h8) of the catalytically-essential Ω -loop; chimera cTEM-17m harbors the same 150-190 sequence block as PSE-4. (C) Catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) toward the penicillins benzylpenicillin (BZ) and carbenicillin (CB), the first generation cephalosporins cephalotin (CF) and cefazolin (CZ), and the third generation cephalosporin cefotaxime (CTX), as reported by Clouthier, et al. (2012).

RESULTS

Comparison of the Backbone Dynamics of TEM-1 and PSE-4 β -lactamases. The class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4 share 40% sequence identity. Their reaction mechanisms are conserved, and they recognize an overlapping set of β -lactam-type substrates. NMR spin relaxation experiments and model-free analyses previously found TEM-1 and PSE-4 to be highly ordered on the ps-ns timescale (Savard and Gagné 2006, Morin and Gagné 2009). The extracted R_{ex} exchange parameters predicted that some residues near their active sites possess slow μ s-ms motions. To directly verify backbone dynamics of TEM-1 and PSE-4 β -lactamases, we performed TROSY-based ^{15}N -CPMG NMR relaxation dispersion experiments. They enable the characterization of protein motions on the ms timescale ($\approx 50 - 3000 \text{ s}^{-1}$), as measured by the transverse relaxation rate constant (R_2) (Manley and Loria 2012). TEM-1 and PSE-4 β -lactamases possess few residues with significant ΔR_2 ($1/\tau_{cp}$) values (**Figure 2.2, Figure A1.1 and Table A1.I**). The dynamic residues in TEM-1 occur predominantly in the α/β domain, and in loop 217-225 leading into it. The global exchange rate of the four residues where the exchange rate, k_{ex} , could be calculated was $850 \pm 210 \text{ s}^{-1}$. In PSE-4, the few dynamic residues were mostly observed in the all- α domain; k_{ex} could be calculated only for one residue. The active-site residues Ser70 and Ala237 are the only unassigned residues of TEM-1 and PSE-4, where line broadening could be indicative of slow timescale motions (Savard and Gagné 2006, Morin and Gagné 2009). The lack of ms dynamics for the majority of residues in TEM-1 and PSE-4 is consistent with evolutionary dynamic conservation within class A β -lactamases. We also observed elevated R_2 at a number of homologous residues in TEM-1 and PSE-4, including the active-site area residues Ser71, Val216 and Gly238 (**Figure A1.2**). This implies that those residues undergo molecular motions faster than the upper limit probed by CPMG ($\approx 3000 \text{ s}^{-1}$) (Kempf and Loria 2004) and suggests that some among these restricted conserved molecular motions may be functionally relevant.

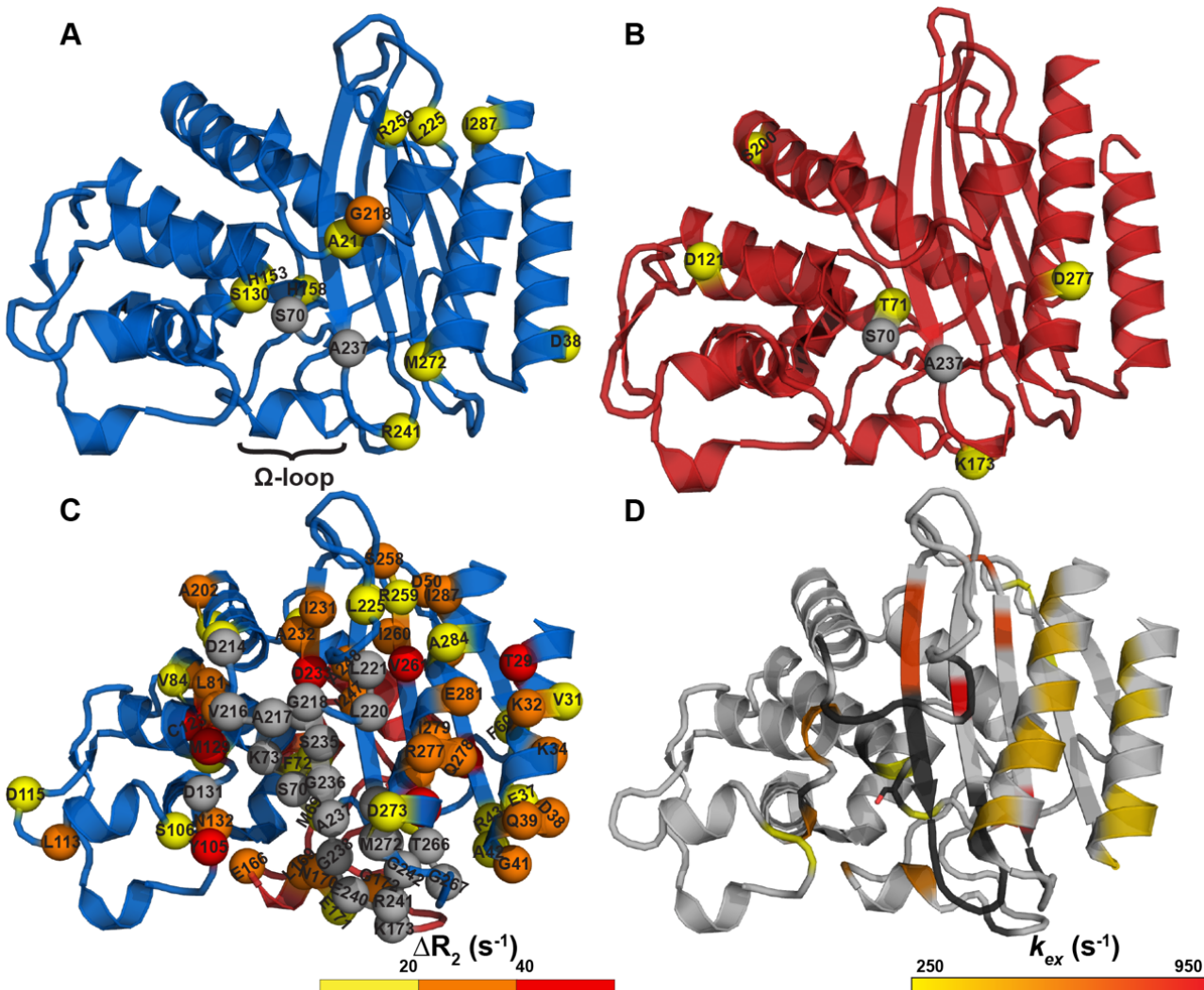


Figure 2.2. Slow Timescale Conformational Dynamics Measured by ^{15}N CPMG NMR for β -lactamase, TEM-1, PSE-4 and Chimera cTEM-17m.

Slow timescale conformational dynamics measured by ^{15}N CPMG NMR for β -lactamase (A) TEM-1, (B) PSE-4, and (C and D) chimera cTEM-17m. Conformational dynamics for residues undergoing conformational exchange with a ΔR_2 ($1/\tau_{cp}$) $> 7 \text{ s}^{-1}$ are illustrated as yellow ($< 20 \text{ s}^{-1}$), orange ($20\text{-}40 \text{ s}^{-1}$), or red ($> 40 \text{ s}^{-1}$) spheres. Relaxation dispersion curves are shown in **Figure A1.1**. Residues for which backbone NMR assignments are missing due to extreme line broadening are illustrated as grey spheres. cTEM-17m is colored in blue or red according to the parental origin of the segments, as in **Figure 2.1** (PDB ID: 4ID4). (D) Global exchange rate, k_{ex} , per region on the crystal structure of TEM-17m colored with a yellow (250 s^{-1}) to red (950 s^{-1}) gradient. Unassigned residues are dark gray. The active site Ser70 is shown as sticks. Fitted regions: h1, 29-41; h11, 273-287; Ω -loop, 166-170; active site, 69-72; SDN loop, 128-129; gate-keeper, 105-106; α/β -domain, 231-260. The figure was generated using PyMOL.

High-Resolution Structure Determination of the Chimeric β -lactamase cTEM-17m. It is important to determine how protein engineering alters dynamics: if modified dynamics alter aspects of function, this could modulate our capacity to engineer functional proteins. Because protein recombination blends segments of homologous proteins and can minimize the disruption of intraprotein contacts (as for the SCHEMA recombination algorithm (Voigt, Martinez et al. 2002)), it is reasonable to assume that functional chimeric proteins should conserve structural and, potentially, dynamic homology with their “parental” proteins. To verify this hypothesis, the high-resolution structure and the slow timescale dynamics of the TEM-1/PSE-4 β -lactamase chimera cTEM-17m were examined. High-quality crystals of cTEM-17m were obtained. Molecular replacement and further refinement following X-ray diffraction analysis resulted in a high-resolution structure model (1.05 Å resolution; Protein Data Base [PDB] ID: 4ID4; **Figure 2.3 A; Table A1.II**). The α -carbon root-mean-square deviation (RMSD) was smaller with respect to TEM-1 than PSE-4 (**Table 2.I; Figure 2.3 B**), consistent with their respective sequence divergences. Structural comparison using the secondary structure matching (SSM) function implemented in COOT showed a similar trend (**Table 2.I**). This confirms maintenance of a TEM-1-like structure, despite the 17 residues exchanged with PSE-4. The high-resolution structure revealed higher anisotropy on the surface of the α/β domain as well as on the side-chain of Tyr105. However, observation of anisotropy in an individual structure should not be interpreted as necessarily indicating motion, because one cannot discriminate between inherent disorder and artifacts due to the crystallization process.

Tableau 2.I. Comparison of the Crystal Structure of Chimera cTEM-17m with Its Parental Homologs TEM-1 and PSE-4.

| Homolog | PDB ID | Resolution (Å) | RMSD ^a with cTEM-17m (or TEM-1) (Å) | SSM RMSD ^b with cTEM-17m (or TEM-1) (Å) |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|--|--|
| TEM-1 (Stec, Holtz et al. 2005) | 1ZG4 ^c | 1.55 | 0.70 | 0.53 |
| PSE-4 (Lim, Sanschagrin et al. 2001) | 1G68 | 1.95 | 1.38 (1.25) | 1.15 (0.98) |

^a α -carbon RMSD.

^b Secondary structure matching (SSM) RMSD function implemented in COOT.

^c TEM-1 (PDB ID 1ZG4) was selected for comparison to cTEM-17m (1.05 Å resolution; PDB ID 4ID4) due to the absence of SO₄ in both active sites.

Exchanged Region Constituting the Ω -Loop. The active-site region of cTEM-17m is chimeric (**Figure 2.1**): the catalytically important Ω -loop (residues 161-179) originates from PSE-4, within a TEM-1-like active site. The 17 substitutions in the exchanged segment 150-190 produced no major structural changes in the Ω -loop area, despite the introduction of two negatively (A150D, V159E) and two positively (I173K, A184K) charged residues with no counterbalancing loss of charge (**Figure A1.3**). We observed only a 1 Å displacement of the backbone of 174-177, located on the protein surface, relative to TEM-1 and PSE-4. This region includes the exchanged residues I173K, P174L and N175G. Modification of the central residue of the Ω -loop (E168D) did not visibly alter its interactions within the protein.

Greater Active-Site Area and Active-Site Walls. Despite high structural conservation in the exchanged region 150-190, significant differences were observed in the greater active-site area of cTEM-17m. Strikingly, the volume of its active-site cavity (746 Å³) was estimated to be nearly twice that of TEM-1 (389 Å³), mainly as a result of the reorientation of the Tyr105 side chain and of loop 213-220. The Tyr105 phenol ring cTEM-17m was assigned to the *m*-30° conformation (**Figure 2.3 C and 2.3 D**), in contrast with the flipped *t*80° conformation assigned in all native and mutant apoenzyme structures of TEM-1 and PSE-4 (**Table A1.III**). We note that its side chain showed the highest anisotropy. The predominant *m*-30° conformation observed here may be a consequence of the dynamics of Tyr105 rather than of a structural alteration relative to TEM-1; further investigation of the motion of this “gate-keeping residue” is ongoing.

The active-site wall formed by the random coil loop 213-220 connects the all- α domain and the α/β domain and lies across the active site from the exchanged sequence block, which it does not contact. Residues 214-217 were significantly displaced in cTEM-17m relative to TEM-1 and PSE-4 (**Figure 2.3 D**). The Val216 backbone carbonyl and the Arg244 guanidinium stabilize a conserved water molecule, which then stabilizes the substrate C3 carboxylate in TEM-1 (Wang, Minasov et al. 2002). In cTEM-17m, a >6 Å displacement of the Val216 backbone carbonyl disrupts the interaction with the conserved water molecule, consistent with increased backbone dynamics of Val216 as discussed later. The loop displacement also shifts Lys215, disrupting contacts between Ser223 and both Ala280 and Leu220 (**Figure 2.3 D**). Thus, the interaction network extending from the active site to the outer face of the enzyme in TEM-1 has been modified, and the active-site cavity enlarged in

the crystal structure of cTEM-17m, presumably as a result of the substitutions in the 150-190 sequence block. Although this region is involved in substrate stabilization (Huang, Petrosino et al. 1996, Sabbagh, Theriault et al. 1998), cTEM-17m is functionally tolerant of the enlarged active-site conformation.

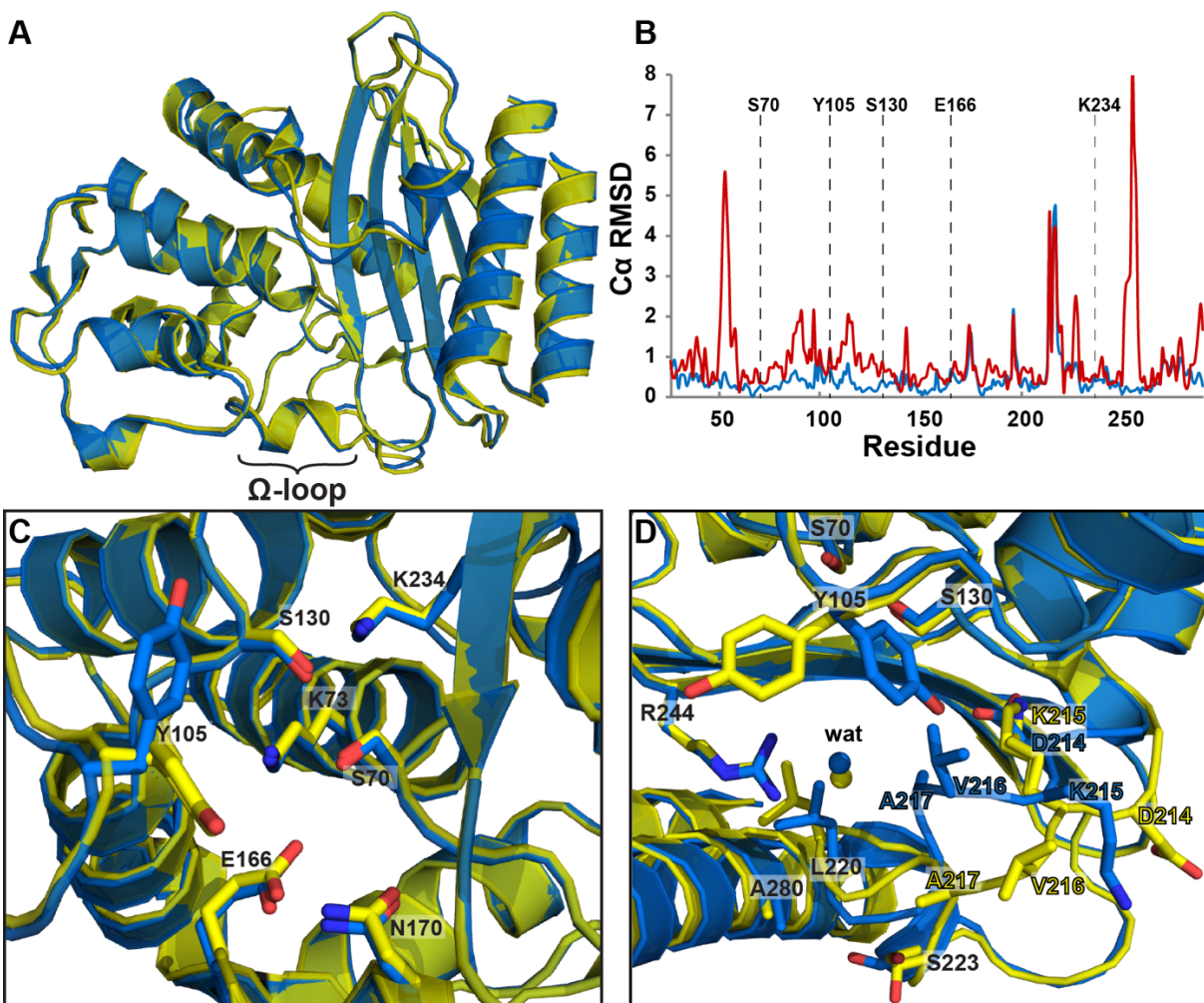


Figure 2.3. Crystal Structure of cTEM-17m Overlaid on TEM-1.

(A) Backbone overlay of the crystal structures of cTEM-17m (PDB ID 4ID4, yellow) and TEM-1 (PDB ID 1ZG4, blue). **(B)** Ca RMSD per residue of cTEM-17m relative to TEM-1 (PDB 1ZG4, blue) and PSE-4 (PDB ID: 1G68, red). **(C)** Overlay of the active-site residues in cTEM-17m and TEM-1 structures. **(D)** Overlay of loop 214-217 including side chains of cTEM-17m and TEM-1. Key residues of the active site (S70, Y105 and S130) are shown as a reference for orientation. The main-chain RMSD for residues 214-217 is 1.93 Å relative to TEM-1 (4.05 Å for all atoms), and 2.04 Å relative to PSE-4 (2.95 Å for all atoms). The conserved water molecule stabilizing benzylpenicillin (BZ) in BZ-bound TEM-1 (Wat294; PDB ID: 1FQG) overlays with Wat1001 in apo-TEM-1 (blue sphere) and Wat431 in cTEM-17m (yellow sphere). See also **Table A1.II**.

Comparison of NMR Chemical Shift Assignments. Comparison of the reported backbone chemical shift assignments of cTEM-17m (Morin, Clouthier et al. 2010) with TEM-1 (Savard, Sosa-Peinado et al. 2004) immediately suggests that cTEM-17m has altered slow-timescale dynamics. In TEM-1, all residues were assigned except for the catalytic nucleophile, Ser70, and Ala237. In a striking contrast, despite producing spectra of comparable quality (**Figure A1.4**), backbone resonance assignments could not be ascribed to 8.8% of cTEM-17m (22 of 251 assignable residues; **Table A1.I**) due to exchange broadening (**Figure 2.4**). Important regions of cTEM-17m undergo slow conformational exchange, indicative of altered dynamics. Notably, backbone ^1HN and ^{15}N resonance assignments were missing for the active-site residues Asp131 of the SDN-loop (Ser130, Asp131, Asn132); the majority of the loop 213-220 interdomain linker region implicated in substrate positioning (Huang, Petrosino et al. 1996); and the entire Lys234-Arg244 β 3-loop- β 4 segment, involved in modulating specificity and stabilizing the bound substrate (**Table A1.I**) (Zafaralla, Manavathu et al. 1992, Diaz, Sordo et al. 2003). This corroborates that laboratory recombination has altered the dynamic behavior of the greater active-site area of cTEM-17m on a slow timescale. We note that the region comprising the residue substitutions themselves (150-190) was well resolved.

Significant chemical shift differences ($\Delta\delta$) were mapped relative to TEM-1 (**Figure 2.5 A**). As a direct result of the amino acid substitutions within the exchanged segment 150-190, modified short-range interactions were observed, particularly for the conserved Ala185 and Ala187 sandwiched between substituted residues. Longer range perturbations were also observed, such as the 0.4-0.5 parts per million (ppm) $\Delta\delta$ of residues 63-65. They are at the heart of the active-site pocket and lie within 5.5 Å of the M182T substitution, suggesting that those variations are related (**Figure 2.5 B**). Residues Thr118, Thr140, Arg222 and Ala280, located as far as 26 Å from the exchanged region 150-190, also exhibited significant $\Delta\delta$. Displacement of the active-site wall 213-220, discussed earlier, has modified the network extending through Arg222 and Ser223 to Leu220 and Ala 280 (**Figure 2.5 C**) as reflected in the high $\Delta\delta$ of Arg222 and Ala280; Leu220 was unassigned.

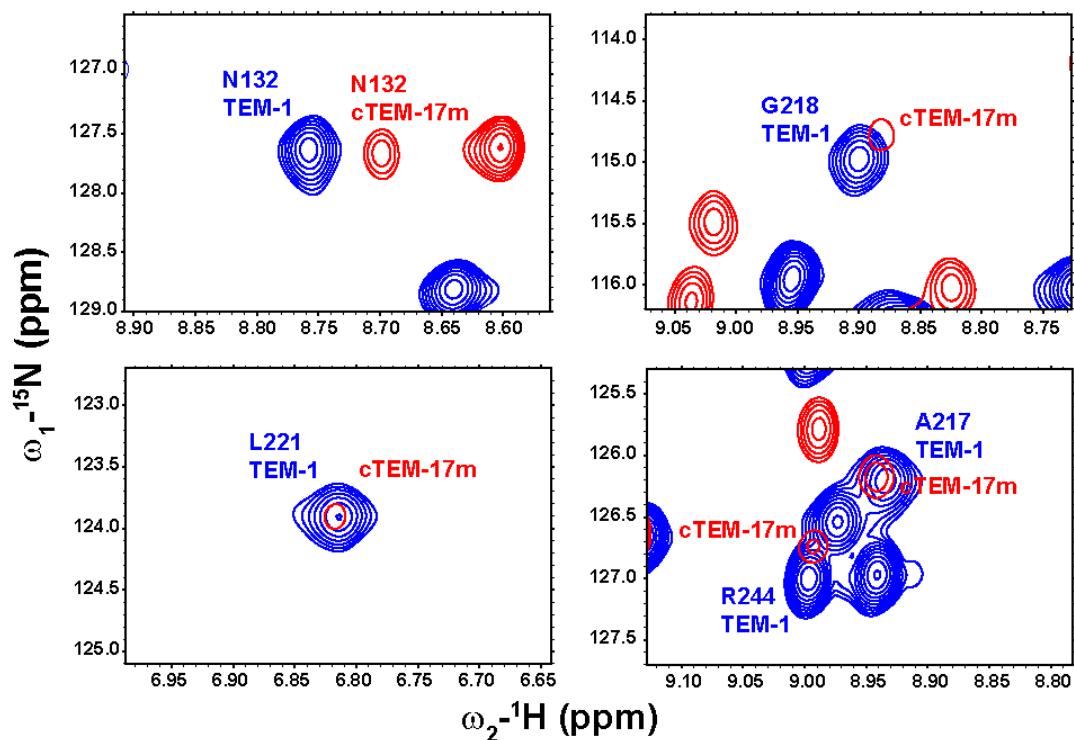


Figure 2.4. Chimera cTEM-17m Has Altered Slow-Timescale Dynamics.
Zoomed views for residues N132, A217, G218, L221, and R244 exhibiting line broadening in cTEM-17m, consistent with increased slow-timescale dynamics at positions relative to wild-type TEM-1.

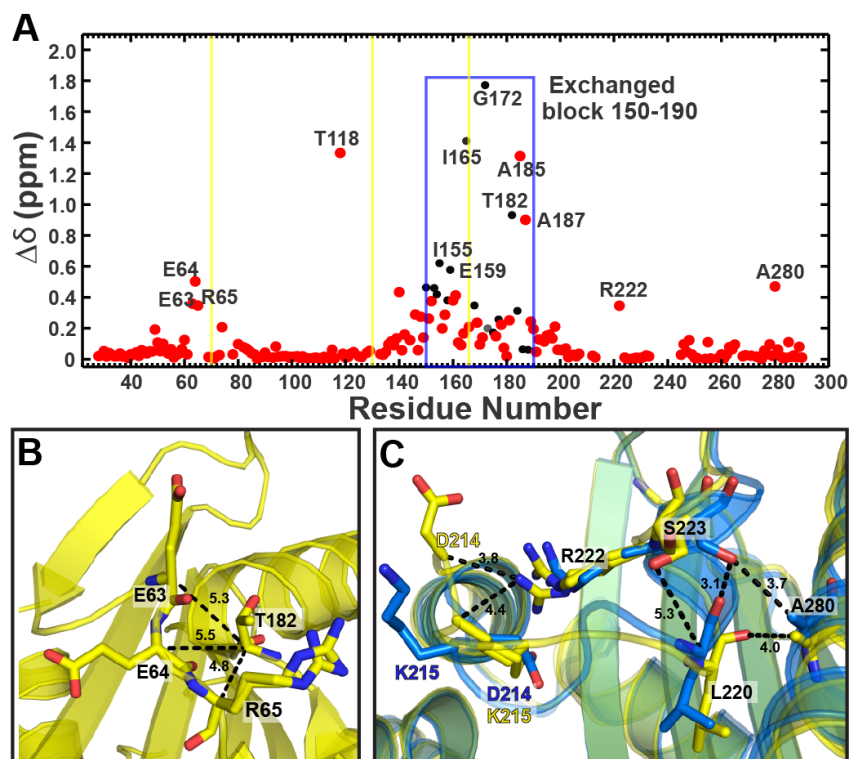


Figure 2.5. Effect of Structure-Based Recombination on Backbone Chemical Shifts and on Structure.

(A) Chemical shift differences for TEM-1 versus cTEM-17m (red spheres) are shown as a function of amino acid sequence. The exchanged sequence block (residues 150-190) of cTEM-17m is outlined in blue; the 17 residues substituted in cTEM-17m as result of structure-based recombination are identified (black spheres). Select residues associated with class A β -lactamase catalytic mechanism (residues Ser70, Ser130, and Glu166) are highlighted in yellow. Data are shown as a composite of the amide ^1H and ^{15}N chemical shift values calculated according to the equation $\Delta\delta$ (ppm) = $[(\Delta\delta_{\text{HN}}^2 + \Delta\delta_{\text{N}^25}^2)/2]^{1/2}$, where $\Delta\delta$ is the difference in chemical shift between the two proteins for $^{\text{N}}\text{H}$ and $^{\text{H}}\text{N}$ nuclei (Grzesiek, Stahl et al. 1996). Substitutions giving rise to altered chemical shifts include the M155I ($\Delta\delta = 0.62$ ppm), V159E ($\Delta\delta = 0.58$ ppm), W165I ($\Delta\delta = 1.4$ ppm), A172G ($\Delta\delta = 1.7$ ppm), and M182T ($\Delta\delta = 1.3$ ppm). **(B)** Crystal structure of cTEM-17m (PDB ID: 4ID4) showing the exchanged residue M182T with neighboring residues E63, E64 and R65 showing an elevated $\Delta\delta$. Shortest distances to Thr182 are shown. **(C)** Overlay of cTEM-17m (yellow, PDB ID: 4ID4) and TEM-1 (blue, PDB ID: 1ZG4) showing the network of residues implicating the displaced Asp214 and Lys215, as well as Leu 220, Arg222, Ser223 and Ala280. Arg222 and Ala280 exhibit an elevated $\Delta\delta$, while residues Asp214 and Leu220 are characterized by missing backbone NMR assignments. In addition, dual conformers of Arg222 and Ser 223 are illustrated, as identified in the crystal structure.

Chimera cTEM-17m Exhibits Increased ¹⁵N Millisecond Backbone Dynamics. The missing backbone assignments in cTEM-17m, indicative of increased millisecond timescale motions, are consistent with the inference of increased slow motions from the model-free formalism (Savard and Gagné 2006, Morin and Gagné 2009, Clouthier, Morin et al. 2012). Crystal structure (as discussed in the present study), circular dichroism and thermal scanning fluorescence (Clouthier, et al., 2012) are all consistent with a well-folded protein, excluding local unfolding or aggregation as being the cause of the increased line widths. Backbone ¹⁵N CPMG relaxation dispersion for cTEM-17 was performed to experimentally verify the dynamic effects of substituting multiple residues in the active-site area. The relaxation dispersion data revealed 60 assigned residues which undergo conformational exchange with a $\Delta R_2 (1/\tau_{cp}) > 7.0 \text{ s}^{-1}$ (**Figure A1.6 and Table A1.I**) and were therefore deemed to undergo slow timescale motion. This differs importantly from TEM-1 and PSE-4 (11 and 5 residues, respectively), and directly confirms that the chimeric cTEM-17m has strikingly increased conformational exchange on the timescale of $\approx 50 - 3000 \text{ s}^{-1}$ (**Figure 2.2**). Repeating the experiment with a 3-fold diluted sample confirmed that the dispersion profiles observed were not due to aggregation. Residues exhibiting conformational exchange are located throughout the protein, with many clustering in the active-site area and near the *N*- and *C*-terminal α -helices. While only two of the 17 substituted residues of cTEM-17m (Gly172 and Lys173) were found to be dynamic on that timescale, several conserved residues in the 150-190 segment showed increased conformational exchange: the catalytically relevant Glu166 and Asn170, as well as Leu169 and Glu171. The active-site residues Met69, Thr71, Phe72, Met129, Asn132, Tyr105 and Ser106 also showed altered motions in cTEM-17m. Thus, the substitutions in the exchanged segment 150-190 have dramatically altered the slow dynamics in the active-site area and throughout the enzyme.

We note that in TEM-1, PSE-4 and cTEM-17m, the mean transverse relaxation rate was in the range of 10 s^{-1} , indicating a similar extent to which μs - ms motions were not suppressed. A similar number of residues exhibit transverse relaxation rates above the standard deviation for the mean R_2 (29 residues in TEM-1, 25 in PSE-4 and 33 in cTEM-17m) (**Figure A1.2**).

DISCUSSION

Over 200 natural variants of TEM-1 (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>) procure resistance to β -lactam antibiotics. Laboratory evolution has examined the high mutability of β -lactamases (Deng, Huang et al. 2012), including simultaneous mutations and concurrent recombinations which are less likely in nature (Meyer, Silberg et al. 2003, De Wals, Doucet et al. 2009). This has revealed that class A β -lactamases are highly adaptable, readily maintaining activity and broadening substrate specificity. TEM-1 variants of the active-site Tyr105 showed a correlation between inferred slow dynamics and catalytic efficiency, suggesting that motions promote function in class A β -lactamases (Doucet, Savard et al. 2007). The evolvability of TEM-1 was found to include a weak functional tradeoff with respect to latent and promiscuous protein function (Soskine and Tawfik 2010). This tradeoff may result from protein conformational flexibility, where a population of alternative conformation(s) would mediate the new function without severely compromising the conformation mediating the native function. In other words, tolerance to modifications in dynamics may be one of the mechanisms for sustaining evolutionary variability.

Here, a system comprising both natural and laboratory-engineered homologs of β -lactamases provides further insight into the role of dynamics in enzyme function. We experimentally observed the conservation of high rigidity in TEM-1 and PSE-4 β -lactamases on the slow timescale, accompanied by millisecond timescale motions in a restricted number of residues. The inclusion of slow motions at the active site supports the hypothesis that they play a functional role and that they may be evolutionarily conserved (Ramanathan and Agarwal 2011, Gagné, Charest et al. 2012). The slow motions previously predicted by Lipari-Szabo model-free analysis were only partially confirmed: model-free formalism overestimated the number of residues possessing dynamic character on the slow timescale ($\approx 50 - 3000 \text{ s}^{-1}$), predicting 20 and 32 residues undergoing slow dynamics in TEM-1 and PSE-4, respectively (Savard and Gagné 2006, Morin and Gagné 2009), while 11 in TEM-1 and 5 in PSE-4 were experimentally identified by ^{15}N CPMG relaxation dispersion. Molecular dynamics simulations and model-free analysis of TEM-1 and PSE-4 are in agreement with their being highly ordered. The high-amplitude motions that were computationally predicted at the tip of

the Ω -loop (Bos and Pleiss 2009, Morin and Gagné 2009, Fisette, Morin et al. 2010) were not observed here, potentially because the timescales examined differed.

The structure-based recombination of TEM-1 and PSE-4 generated chimera cTEM-17m, which has a catalytic efficiency (catalytic rate constant/Michaelis-Menten constant; k_{cat}/K_M) similar to the parental TEM-1 and PSE-4 toward five β -lactam substrates (**Figure 2.1 C**). This demonstrates that the catalytic machinery of cTEM-17m is intact (similar k_{cat}), though some alterations in productive substrate binding have occurred (some increases in K_M) (Clouthier, Morin et al. 2012). The high-resolution crystal structure confirms that the laboratory-generated cTEM-17m is only subtly altered, despite the poor tolerance to mutation of several residues in the exchanged 150-190 segment (Huang, Petrosino et al. 1996, Deng, Huang et al. 2012). However, cTEM-17m exhibits a vastly modified dynamic pattern on the slow timescale relative to both parental enzymes. The extent of dynamics observed by ^{15}N CPMG (60 residues with ΔR_2 ($1/\tau_{\text{cp}}) \geq 7.0\text{s}^{-1}$) was consistent with model-free analysis (61 residues predicted) (Clouthier, Morin et al. 2012). While the predicted residues differed significantly, they generally clustered in the same regions, suggesting that the timescales sampled by model-free analysis and by ^{15}N CPMG differed to some extent.

Some of the 60 residues showing significant relaxation dispersion in cTEM-17m have structural or functional relevance. Simulated annealing of TEM-1 previously revealed conformational exchange between *m* and *t* rotamers of Tyr105, which may favor ligand binding (Doucet, De Wals et al. 2004, Doucet and Pelletier 2007). Here, the *m* rotamer was captured in an apoenzyme structure (**Figure 2.3 C**). Conformational exchange for Tyr105 was observed by ^{15}N CPMG only in cTEM-17m (**Figure 2.6 A**), indicating that the timescale of the conformational exchange in TEM-1 must be faster or slower than that investigated. The global exchange rate for Tyr105 and its neighbor Ser106 was $300 \pm 90 \text{ s}^{-1}$, similar to other active-site regions such as the environment of Ser70 (Met69 and Phe72, global $k_{\text{ex}} = 480 \pm 110 \text{ s}^{-1}$), Glu166 ($k_{\text{ex}} = 330 \pm 90 \text{ s}^{-1}$) and the S130 region (Thr128 and Met129, $k_{\text{ex}} = 630 \pm 100 \text{ s}^{-1}$) (**Figures 2.2 D and 2.6 B**). The global exchange rate for those active site regions was $440 \pm 70 \text{ s}^{-1}$; we note the coincidence with k_{cat} (benzylpenicillin) = 480 s^{-1} . For TEM-1, the rate-limiting step for hydrolysis of penicillins is deacylation, while hydrolysis of cephalosporins (first and third generation) is rate-limited at the acylation step (Saves, Burlet-Schiltz et al. 1995). There is no evidence pointing to a change in rate-limiting step for cTEM-17m. As the

slow dynamics of cTEM-17m differ from those of TEM-1, acylation (as verified by cephalosporin hydrolysis) and deacylation (as verified by penicillin hydrolysis) are shown to tolerate altered dynamics. In particular, the native-like catalytic efficiency of cTEM-17m indicates that the Ω -loop residue Glu166, which appears to be implicated in the deacylation step (Saves, Burlet-Schiltz et al. 1995) can be rigid (TEM-1 and PSE-4) or more dynamic (cTEM-17m) on the timescale of catalytic turnover (**Figure 2.6**). Thus, conservation of slow motions is not essential for the rate-limiting acylation and deacylation steps.

Indirect evidence of increased slow timescale dynamics of cTEM-17m suggested by the incomplete backbone assignment is now supported by NMR observation of increased dynamics flanking the unassigned residues. Residues 231-233 and 247-248 (global $k_{ex} = 1,100 \pm 250 \text{ s}^{-1}$), flanking the unassigned 234-244 segment (**Figure 2.6**), exhibit increased slow dynamics, confirming the introduction of slow conformational exchange in this region. This shift in motion is striking, given that this region participates in the oxyanion hole and is linked to substrate recognition (Marciano, Brown et al. 2009).

The *N*- and *C*-terminal helices (h1 and h11) pack side by side and on to a five-stranded antiparallel β sheet to constitute the α/β domain. Chimera cTEM-17m showed significantly increased slow timescale dynamics in both terminal helices, despite being distal from the exchanged sequence block 150-190 and from the active site (**Figure 2.6 A and C**). High crystallographic B-factors (Val31, Lys32, Gln39 and Glu281) and residues identified as having double occupancy (Asp35, Asp38, Glu274 and Arg275) also suggest motion. During functional selection of the libraries of β -lactamase chimeras, having both terminal helices (h1 and h11) originating from the same parent was correlated with a greater selective advantage (Meyer, Hochrein et al. 2006). The exchange rate, k_{ex} , is matched for both helices ($450 \pm 60 \text{ s}^{-1}$ and $440 \pm 50 \text{ s}^{-1}$ for h1 and h11, respectively), suggesting that the altered, correlated motions in the cTEM-17m terminal helices maintain integrity of the α/β domain.

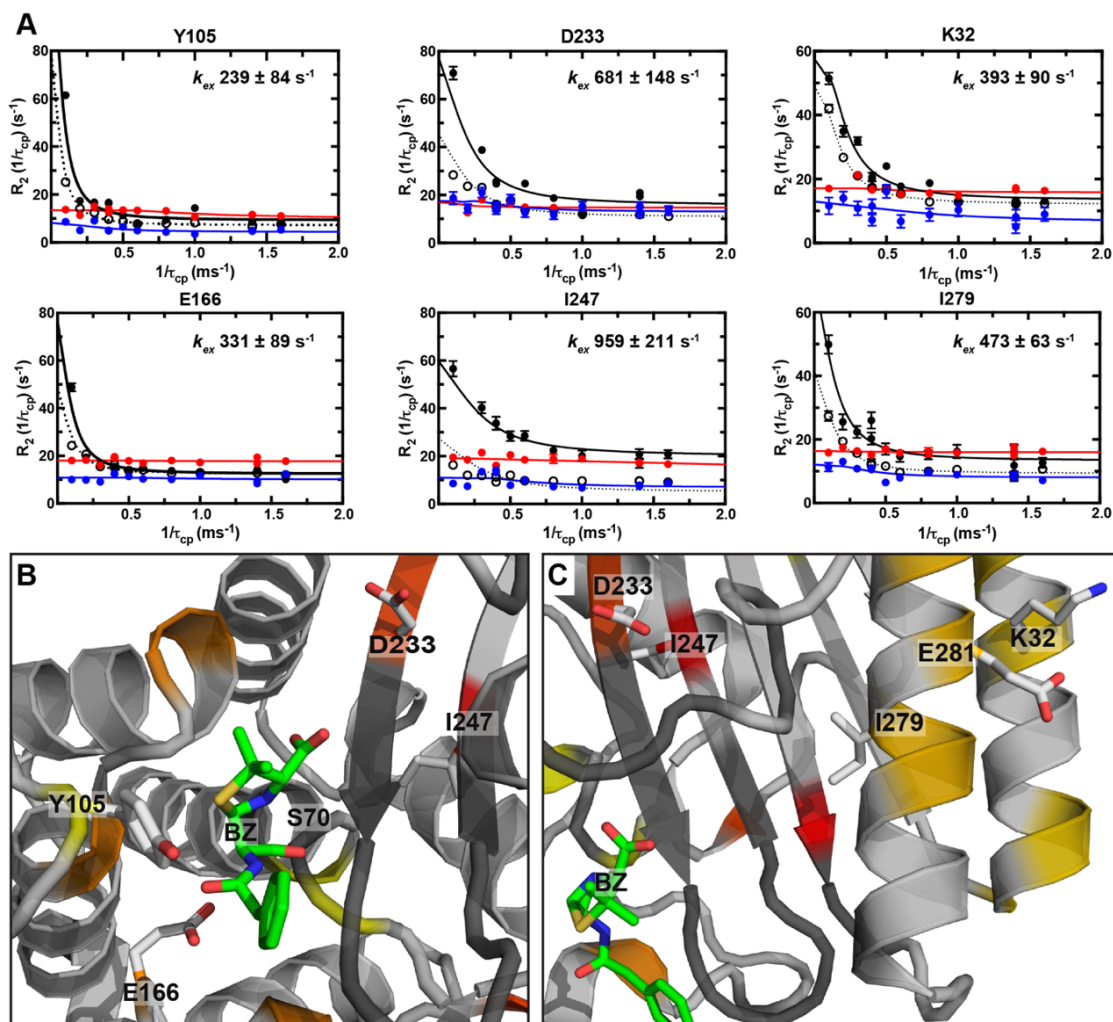


Figure 2.6. ^{15}N CPMG Conformational Dynamics for Residues Selected on the Basis of Altered Dynamics in cTEM-17m.

(A) ^{15}N CPMG relaxation dispersion curves for active site residues Tyr105 and Glu166; oxyanion hole residues Asp233 and Ile 247 (unassigned region 234-244 in cTEM-17m); and helices h1, Lys32 and h11, Ile279 for TEM-1 (blue), PSE-4 (red) and cTEM-17m (black). All relaxation dispersion curves are shown in **Figure A1.6**. The exchange rate, k_{ex} , for cTEM-17m was obtained from two-field fits of ^{15}N CPMG data acquired at 800MHz (full line) and 600MHz (dashed line). (B and C) The catalytic Ser70 is presented in sticks. The active site is indicated by the benzylpenicillin (BZ) substrate (from PDB ID 1FQG, overlaid on the cTEM-17m structure PDB ID 4ID4) and the catalytic Ser70, both in green sticks. Unassigned residues are dark gray. Residues with a $\Delta R_2(1/\tau_{cp})$ greater than 7 s^{-1} are colored in yellow to red gradient as in **Figure 2D**. (B) Residues Tyr105, Glu166, Asp233, and Ile247 are in sticks. (C) Lys32 and Ile279 of the N- and C-terminal helices h1 and h11 are in sticks. The figures were generated using PyMOL. See also **Figure A1.6**.

The active-site cavity of cTEM-17m was found to be significantly enlarged as a result of displacement of potentially mobile elements: Tyr105 and loop 213-220. Enlargement of the cavity has been proposed to favor hydrolysis of bulky third-generation cephalosporins among some extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) (Chen, Shoichet et al. 2005), while others maintain a cavity size similar to TEM-1 but show anisotropic B-factors in the β -3 strand (residues 230-237) (Delmas, Chen et al. 2008), suggesting motion which may play a functional role (Chen, Shoichet et al. 2005). The β -3 strand was unassigned in cTEM-17m, suggesting that it has adopted motions similar to those that evolved naturally in the CTX-M ESBLs. Although the β -3 strand of cTEM-17m did not exhibit higher than average B-factors, neighboring residues 227-229 did (**Figure A1.4**); motions inferred from NMR in solution were apparently frozen out in the crystal form. Despite increased active-site cavity size and dynamic changes observed or inferred in residues 233-247, chimera cTEM-17m has native-like hydrolytic capacity toward CTX (Clouthier, Morin et al. 2012); we note that this phenotype had not been selected for during laboratory evolution (Voigt, Martinez et al. 2002). Our results indicate that the active-site area functionally tolerates variations in dynamics, which may contribute to the evolvability of class A β -lactamases.

Our results are consistent with the β -lactam hydrolase function of class A β -lactamases (native TEM-1 and PSE-4) having naturally evolved within a rigid framework supplemented with a limited number of motions on the catalytic timescale yet also demonstrate that the fold and hydrolytic function are compatible with a drastically altered dynamic pattern (laboratory-evolved cTEM-17m). This work vividly illustrates the adaptability of class A β -lactamases to variations in dynamics on the timescale of catalysis. The conservation of slow dynamics in naturally-evolved enzymes (Ramanathan and Agarwal 2011, Gagné, Charest et al. 2012) is not at odds with variation of dynamics following laboratory engineering and functional selection. Laboratory evolution does not imitate a natural setting where nutrient scarcity, rigors of life as a single-cell organism, and lower expression levels may reveal detrimental aspects of the increased dynamic makeup that were not identified here. Furthermore, some evidence suggests that the motions observed in cTEM-17m may result from a shift in timescale: residues 212, 215, 216 and 221 in TEM-1 exhibit elevated transverse relaxation rate (**Figure A1.2**) while residues 217-218 exhibit millisecond dynamics (**Figure A1.1**). This region (214-221) is mostly unassigned in cTEM-17m, suggesting that motions in the two proteins occur on a

different timescale. Thus it may be that underlying dynamics in TEM-1 and PSE-4 are not probed by the current ^{15}N CPMG experiments. Proteins exist as a statistical ensemble of conformations where the native state is the predominantly accessible state (Henzler-Wildman, Lei et al. 2007, Boehr, McElheny et al. 2010). Conformational heterogeneity is increasingly being linked to protein function (Boehr, Nussinov et al. 2009, Bhabha, Lee et al. 2011). Mutations may shift the conformational equilibrium, making alternative conformers more accessible and permitting promiscuous functions and specificities (Boehr, Nussinov et al. 2009). A putative underlying dynamic population in the parental TEM-1 and PSE-4 could contribute to the evolvability of β -lactamases. Indeed, the high evolvability of β -lactamases is seen in their divergent natural evolution to numerous homologs and in their “real-time” evolution as evidenced by the hundreds of drug-resistant clinical isolates with altered specificity (Bush 2013). The Ω -loop interchange in cTEM-17m may have unveiled an underlying dynamic population. The observed fitness of chimera cTEM-17m suggests that tolerance to variations in the dynamic landscape may be an enabling factor in natural evolution: if not absolutely fixed in evolution, a modified dynamic landscape could provide access to new evolutionary paths.

The concept of enzyme dynamics being linked to evolvability has only recently been proposed as one of four criteria associated with the potential evolvability of an enzyme towards a promiscuous function (Tokuriki and Tawfik 2009, Glembo, Farrell et al. 2012) and, in particular, with respect to evolvability of class A β -lactamases (Risso, Gavira et al. 2013). More generally, the alteration of an enzyme’s dynamic makeup may shift the distribution of available states in solution to favor one or more possessing a new binding preference. The present relaxation dispersion study suggests that class A β -lactamases possess the potential for inherent flexibility within the active site and throughout the structure, in the setting of a rigid native state. Given the requirement for β -lactamases to evolve rapidly, we propose that the high evolvability of their broad substrate promiscuity is linked with a tolerance to dynamic substate population shifts.

SIGNIFICANCE

This work examines the relation between protein dynamics (or motions) and function in both native and engineered homologs of an enzyme. First, we determined that the motions on the catalytic timescale for two homologous β -lactamases are few but that some occur within the active site. This supports the hypothesis that, like sequence and structure, millisecond protein motions are conserved throughout natural evolution. A growing body of evidence indicates that motions on the slow timescale are implicated in enzyme function. This could have important implications for the field of protein engineering if proteins cannot withstand alterations in their dynamics that would occur upon modifying the amino acid sequence. We thus verified the slow motions of a laboratory-engineered chimera, which had been previously produced by blending fragments of those homologous β -lactamases. While the chimera was fully functional and its structure essentially unchanged, its slow motions were vastly altered. This illustrates that an equally efficient enzyme can be engineered, which differs from its natural homologs by its dynamic properties. In effect, a tolerance to dynamic alterations should render proteins more evolvable than an incapacity to adapt to motional alterations.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Nitrocefin was purchased from Calbiochem. Kanamycin, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), components for growth media and purification materials were from BioShop Canada. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and $^2\text{H}_2\text{O}$ were purchased from Cambridge Isotope Laboratories. Tris-Cl, PEG 4000 and MgCl_2 used for protein crystallization were from Sigma-Aldrich.

Protein expression and purification. The cTEM-17m expression construct has been described (Morin, Clouthier et al. 2010). Expression was essentially as performed previously (Savard and Gagné 2006, Doucet, Savard et al. 2007, Morin, Clouthier et al. 2010). For crystallography, a 4 mL overnight culture in ZYP-0.8G autoinducing media (Studier 2005) was used to inoculate 400 mL of ZYP-5052 containing 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin. Cells were propagated with agitation at 37°C for 2h, then overnight at 22°C. Induced cells were sedimented by centrifugation (5000 \times g, 30 min, 4°C). The cell pellet was resuspended in 50

mL of 10 mM Tris-Cl pH 7.0. Lysis was performed using a Constant Systems cell disrupter. Cellular debris were sedimented by centrifugation ($20000 \times g$, 30 min, 4°C), the supernatant was filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ filter and the protein was purified as previously described (Savard and Gagné 2006, Doucet, Savard et al. 2007, Morin, Clouthier et al. 2010) with the following modifications. Following sample application, the DEAE-Sepharose Fast Flow column ($1.6 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$) was washed with 3 column volumes (CV) of 10 mM Tris-Cl pH 7.0. A linear gradient to 200 mM Tris-Cl pH 7.0 was achieved over 4 CV, and the column wash over 3 CV. Fractions containing β -lactamase were identified using a nitrocefin hydrolysis assay (Calbiochem) and by 15% SDS-PAGE with Coomassie blue staining. Fractions containing $\geq 75\%$ β -lactamase were concentrated to 1.5 mL using an Amicon concentrator (MWCO 10000, Millipore) and applied to a Superdex 75 column ($1.6 \text{ cm} \times 55 \text{ cm}$) pre-equilibrated with 50 mM Tris-Cl pH 7.0. Elution was at a flow rate of 1 mL/min. Fractions containing β -lactamase were identified by 15% SDS-PAGE with zinc-imidazole staining. Sample purity was $\geq 95\%$ as estimated on gel with ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Enzyme concentration was determined with the Bradford assay (Bio-Rad). For NMR experiments, unlabeled and uniformly [^{15}N]- and [^2H , ^{15}N]-labeled TEM-1, PSE-4, and cTEM-17m samples were overexpressed in modified M9 minimal media containing $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and 100% $^2\text{H}_2\text{O}$ and purified as previously described (Savard and Gagné 2006, Doucet, Savard et al. 2007, Morin, Clouthier et al. 2010). Samples were dialyzed against distilled, deionized water overnight at 4°C and concentrated to 0.6 mM using a 10000 MWCO Amicon concentrator while the buffer was changed to 3 mM imidazole, 0.01% NaN_3 , and 10% D_2O , pH 6.7. The final pH was verified using a pH meter with a microprobe.

Crystallization of cTEM-17m and data collection. cTEM-17m was concentrated to 25 mg/mL (0.8 mM) in 50 mM Tris-Cl pH 7.0. Crystals were grown at 22°C in hanging drops prepared by mixing 1 μL of the protein solution and 1 μL of the reservoir solution (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 26% PEG 4000 and 0.25 M MgCl_2). Diffraction data were collected from a single crystal flash-frozen in liquid nitrogen, at the Canadian Macromolecular Crystallography Facility Beamline 08ID-1 (Canadian Light Source, Saskatoon, SK). Data processing and refinement statistics are summarized in **Table A1.II**. The collected diffraction images were processed with the XDS program package (Kabsch 2010). The initial structure model was constructed by molecular replacement with PHASER (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007),

using a native TEM-1 structure (PDB ID: 1ZG4) (Stec, Holtz et al. 2005) as an input model. The structure model was further improved through iterative rounds of manual model building with COOT (Emsley and Cowtan 2004) and automated refinement with PHENIX (Adams, Afonine et al. 2010) and REFMAC5 (Vagin, Steiner et al. 2004). Data collection and refinement statistics are summarized in **Table A1.II**.

Active site volume estimation. The active-site cavity volume of cTEM-17m (PDB: 4ID4), TEM-1 (PDB: 1ZG4) and PSE-4 (PDB: 1G68) was estimated using 3V (Voss Volume Voxelator) (Voss and Gerstein 2010). The estimation was made using a 1.5-Å radius small sphere and an 8-Å radius large sphere.

Solution NMR experiments. All NMR experiments were performed at 31.5°C as calibrated with a standard methanol sample (Cavanagh, Fairbrother et al. 2007) on Agilent 18.8T and 11.7T (TEM-1 and PSE-4) or 14.1T (cTEM-17m) NMR instruments equipped with a triple-resonance probe and pulsed-field gradient. [²H,¹⁵N]-Labeled TEM-1, PSE-4, or cTEM-17m (0.6 mM) were used to perform all relaxation experiments. Backbone resonances for TEM-1, PSE-4, or cTEM-17m were previously assigned (TEM-1 BMRB: 6024, 6357 and 7328; PSE-4 BMRB: 6838; cTEM-17m BMRB: 16598) (Savard, Sosa-Peinado et al. 2004, Morin, Levesque et al. 2006). Microsecond-millisecond protein dynamics for TEM-1, PSE-4, and cTEM-17m were characterized using ¹⁵N TROSY relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill (rcCPMG) experiments (Loria, Rance et al. 1999). NMR relaxation data was typically acquired using a spectral width of 13000 Hz with the ¹H carrier frequency centered on the water resonance. The ¹⁵N carrier frequency was centered at 120 ppm with ¹⁵N spectral widths of 2400, 2100, and 2800 Hz for TEM-1, PSE-4, and cTEM-17m, respectively. Sixteen transients were acquired for each of 128 t_1 points on the 18.8T and doubled for the 11.7 and 14.1T magnets. Spin-relaxation rate constants at each CPMG pulse repetition time (τ_{cp}) were acquired in a constant time manner. Transverse spin-relaxation data using the TROSY rcCPMG experiment for TEM-1, PSE-4, and cTEM-17m were acquired with interpulse delays, τ_{cp} , of 0.0, 0.625, 0.714 ($\times 2$), 1.0, 1.25, 1.67, 2.0, 2.50 ($\times 2$), 3.33, 5.0, and 10.0 ms during the nitrogen relaxation period for a constant, total relaxation time of 20 ms. The individual spectra were acquired as an interleaved 3D experiment in which the 2D planes were extracted and peak intensities determined from a 3 \times 3 grid using software written and

provided by J. P. Loria *et al.* (Yale). Conformational exchange was considered when the difference in measured R_2 ($\Delta R_2 (1/\tau_{cp})$) at fast ($\tau_{cp} = 0.625$ ms) and slow ($\tau_{cp} = 10$ ms) pulsing rates on the 18.8T data set was greater than 7 s^{-1} in relaxation dispersion profiles. This threshold was selected based on relaxation dispersion error estimation, to eliminate false positives resulting from a poor fit. To verify that the dispersion curves obtained for cTEM-17m were not a result of aggregation, the ^{15}N -CPMG experiment was performed on a diluted (0.2mM) cTEM-17m sample in identical buffer conditions at 14.1T. Sensitivity was increased by increasing the scan number to 64, to compensate for low sample concentration.

ACCESSION NUMBER

The structure of cTEM-17m was deposited to the Protein Data Bank under the ID code 4ID4.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Michelle M. Meyer and Frances H. Arnold for providing the cTEM- 17m construct; Tara Sprules and Sameer Wahid of the Quebec/Eastern Canada High Field NMR Facility for technical assistance; Michael Osborne of the Institute for Research in Immunology and Cancer Biophysics Research Facilities; and J. Patrick Loria for insight into relaxation parameters. This work was supported by National Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grants Program—Individual #227853 (to J.N.P.) and #402623 (to N.D.) and by Canadian Institutes of Health Research Grant MOP-13107 (to A.M.B.). A.M.B. holds a Canada Research Chair in Structural Biology, and N.D. holds a Fonds de la Recherche en Santé Québec (FRQS) Research Scholar Junior 1 Career Award. S.G. is the recipient of a FRQNT Graduate Scholarship, J.P. is supported through a FRQS postdoctoral fellowship, and D.G. holds an Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarship.

REFERENCES

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221.
- Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., and Waley, S.G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 276 (Pt 1), 269-270.
- Bakan, A., and Bahar, I. (2009). The intrinsic dynamics of enzymes plays a dominant role in determining the structural changes induced upon inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14349-14354.
- Bhabha, G., Lee, J., Ekiert, D.C., Gam, J., Wilson, I.A., Dyson, H.J., Benkovic, S.J., and Wright, P.E. (2011). A dynamic knockout reveals that conformational fluctuations influence the chemical step of enzyme catalysis. *Science* 332, 234-238.
- Boehr, D.D., McElheny, D., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2010). Millisecond timescale fluctuations in dihydrofolate reductase are exquisitely sensitive to the bound ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1373-1378.
- Boehr, D.D., Nussinov, R., and Wright, P.E. (2009). The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition *Nature Chemical Biology* 5, 954-954.
- Bos, F., and Pleiss, J. (2009). Multiple molecular dynamics simulations of TEM beta-lactamase: dynamics and water binding of the omega-loop. *Biophys J* 97, 2550-2558.
- Bush, K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277, 84-90.
- Carroll, M.J., Mauldin, R.V., Gromova, A.V., Singleton, S.F., Collins, E.J., and Lee, A.L. (2012). Evidence for dynamics in proteins as a mechanism for ligand dissociation. *Nature Chem Biol* 8, 246-252.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W., Palmer, III, Rance, M., and Skelton, N. (2007). *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*.
- Chen, Y., Shoichet, B., and Bonnet, R. (2005). Structure, Function, and Inhibition along the Reaction Coordinate of CTX-M β -Lactamases. *J Am Chem Soc* 127, 5423-5434.
- Clouthier, C.M., Morin, S., Gobeil, S.M.C., Doucet, N., Blanchet, J., Nguyen, E., Gagné, S.M., and Pelletier, J.N. (2012). Chimeric β -Lactamases: Global Conservation of Parental Function and Fast Time-Scale Dynamics with Increased Slow Motions. *PLoS ONE* 7, e52283.
- De Wals, P.Y., Doucet, N., and Pelletier, J.N. (2009). High tolerance to simultaneous active-site mutations in TEM-1 beta-lactamase: Distinct mutational paths provide more generalized beta-lactam recognition. *Protein Sci* 18, 147-160.
- Delmas, J., Chen, Y., Prati, F., Robin, F., Shoichet, B.K., and Bonnet, R. (2008). Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases. *J Mol Biol* 375, 192-201.
- Deng, Z., Huang, W., Bakalbasi, E., Brown, N.G., Adamski, C.J., Rice, K., Muzny, D., Gibbs, R.A., and Palzkill, T. (2012). Deep sequencing of systematic combinatorial libraries reveals beta-lactamase sequence constraints at high resolution. *J Mol Biol* 424, 150-167.

- Diaz, N., Sordo, T.L., Merz Jr, K.M., and Suarez, D. (2003). Insights into the acylation mechanism of class A beta-lactamases from molecular dynamics simulations of the TEM-1 enzyme complexed with benzylpenicillin. *J Am Chem Soc* 125, 672-684.
- Doucet, N., De Wals, P.Y., and Pelletier, J.N. (2004). Site-saturation mutagenesis of Tyr-105 reveals its importance in substrate stabilization and discrimination in TEM-1 beta-lactamase. *J Biol Chem* 279, 46295-46303.
- Doucet, N., and Pelletier, J.N. (2009). Gaining Insight into Enzyme Function through Correlation with Protein Motions. In *Protein Engineering Handbook*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 187-211.
- Doucet, N., and Pelletier, J.N. (2007). Simulated annealing exploration of an active-site tyrosine in TEM-1 beta-lactamase suggests the existence of alternate conformations. *Proteins* 69, 340-348.
- Doucet, N., Savard, P.Y., Pelletier, J.N., and Gagné, S.M. (2007). NMR investigation of Tyr105 mutants in TEM-1 beta-lactamase: dynamics are correlated with function. *J Biol Chem* 282, 21448-21459.
- Doucet, N., Watt, E.D., and Loria, J.P. (2009). The Flexibility of a Distant Loop Modulates Active Site Motion and Product Release in Ribonuclease A. *Biochemistry* 48, 7160-7168.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
- Fisette, O., Morin, S., Savard, P.Y., Lague, P., and Gagné, S.M. (2010). TEM-1 backbone dynamics-insights from combined molecular dynamics and nuclear magnetic resonance. *Biophys J* 98, 637-645.
- Fraser, J.S., Clarkson, M.W., Degnan, S.C., Erion, R., Kern, D., and Alber, T. (2009). Hidden alternative structures of proline isomerase essential for catalysis. *Nature* 462, 669-673.
- Gagné, D., Charest, L.-A., Morin, S., Kovrigin, E.L., and Doucet, N. (2012). Conservation of Flexible Residue Clusters among Structural and Functional Enzyme Homologues. *J Biol Chem* 287, 44289-44300.
- Gagné, D., and Doucet, N. (2013). Structural and functional importance of local and global conformational fluctuations in the RNase A superfamily. *Febs Journal*, 280(22):5596-607.
- Glembo, T.J., Farrell, D.W., Gerek, Z.N., Thorpe, M.F., and Ozkan, S.B. (2012). Collective Dynamics Differentiates Functional Divergence in Protein Evolution. *PLoS Comput Biol* 8, e1002428.
- Grzesiek, S., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., and Bax, A. (1996). The CD4 Determinant for Downregulation by HIV-1 Nef Directly Binds to Nef. Mapping of the Nef Binding Surface by NMR. *Biochemistry* 35, 10256-10261.
- Hammes, G.G., Benkovic, S.J., and Hammes-Schiffer, S. (2011). Flexibility, Diversity, and Cooperativity: Pillars of Enzyme Catalysis. *Biochemistry* 50, 10422-10430.
- Henzler-Wildman, K.A., Lei, M., Thai, V., Kerns, S.J., Karplus, M., and Kern, D. (2007). A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* 450, 913-916.
- Huang, W., Petrosino, J., Hirsch, M., Shenkin, P.S., and Palzkill, T. (1996). Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity. *J Mol Biol* 258, 688-703.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125-132.

- Kamerlin, S.C.L., and Warshel, A. (2010). At the dawn of the 21st century: Is dynamics the missing link for understanding enzyme catalysis? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78, 1339-1375.
- Kempf, J., and Loria, J.P. (2004). Measurement of Intermediate Exchange Phenomena. In *Protein NMR Techniques*, A.K. Downing, ed. (Humana Press), pp. 185-231.
- Klinman, J.P., and Kohen, A. (2013). Hydrogen Tunneling Links Protein Dynamics to Enzyme Catalysis. *Annu Rev Biochem* 82, 471-496.
- Lim, D., Sanschagrin, F., Passmore, L., De Castro, L., Levesque, R.C., and Strynadka, N.C.J. (2001). Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies. *Biochemistry* 40, 395-402.
- Liu, C.T., Stewart, R.J., and Benkovic, S.J. (2013). Too fast for catalysis. *Biocatal Biotransfor* 31, 269-271.
- Loria, J.P., Rance, M., and Palmer, A.G., 3rd. (1999). A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins. *J Biomol NMR* 15, 151-155.
- Manley, G., and Loria, J.P. (2012). NMR insights into protein allostery. *Arch Biochem Biophys* 519, 223-231.
- Marciano, D.C., Brown, N.G., and Palzkill, T. (2009). Analysis of the plasticity of location of the Arg244 positive charge within the active site of the TEM-1 β -lactamase. *Protein Science* 18, 2080-2089.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658-674.
- Meyer, M.M., Hochrein, L., and Arnold, F.H. (2006). Structure-guided SCHEMA recombination of distantly related beta-lactamases. *Protein Eng Design & Selection* 19, 563-570.
- Meyer, M.M., Silberg, J.J., Voigt, C.A., Endelman, J.B., Mayo, S.L., Wang, Z.G., and Arnold, F.H. (2003). Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination. *Protein Science* 12, 1686-1693.
- Morin, S., Clouthier, C.M., Gobeil, S., Pelletier, J.N., and Gagné, S.M. (2010). Backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 Class A β -lactamase chimera. *Biomol NMR Assignments* 4, 127-130.
- Morin, S., and Gagné, S.M. (2009). NMR Dynamics of PSE-4 β -Lactamase: An Interplay of ps-ns Order and μ s-ms Motions in the Active Site. *Biophys J* 96, 4681-4691.
- Morin, S., Levesque, R.C., and Gagné, S.M. (2006). ^1H , ^{13}C , and ^{15}N backbone resonance assignments for PSE-4, a 29.5 kDa class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biomol NMR* 36 11.
- Ramanathan, A., and Agarwal, P.K. (2011). Evolutionarily Conserved Linkage between Enzyme Fold, Flexibility, and Catalysis. *Plos Biology* 9, e1001193.
- Risso, V.A., Gavira, J.A., Mejia-Carmona, D.F., Gaucher, E.A., and Sanchez-Ruiz, J.M. (2013). Hyperstability and Substrate Promiscuity in Laboratory Resurrections of Precambrian β -Lactamases. *J Am Chem Soc* 135, 2899-2902.
- Sabbagh, Y., Theriault, E., Sanschagrin, F., Voyer, N., Palzkill, T., and Levesque, R.C. (1998). Characterization of a PSE-4 mutant with different properties in relation to penicillanic acid sulfones: Importance of residues 216 to 218 in class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2319-2325.
- Savard, P.Y., and Gagné, S.M. (2006). Backbone dynamics of TEM-1 determined by NMR: evidence for a highly ordered protein. *Biochemistry* 45, 11414-11424.

- Savard, P.Y., Sosa-Peinado, A., Levesque, R.C., Makinen, M.W., and Gagné, S.M. (2004). ¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone resonance assignments for TEM-1, a 28.9 kDa beta-lactamase from *E. coli*. *J Biomol NMR* 29, 433-434.
- Saves, I., Bulet-Schiltz, O., Maveyraud, L., Samama, J.P., Prome, J.C., and Masson, J.M. (1995). Mass spectral kinetic study of acylation and deacylation during the hydrolysis of penicillins and cefotaxime by beta-lactamase TEM-1 and the G238S mutant. *Biochemistry* 34, 11660-11667.
- Soskine, M., and Tawfik, D.S. (2010). Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nat Rev Genet* 11, 572-582.
- Stec, B., Holtz, K.M., Wojciechowski, C.L., and Kantrowitz, E.R. (2005). Structure of the wild-type TEM-1 beta-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 1072-1079.
- Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207-234.
- Tokuriki, N., and Tawfik, D.S. (2009). Protein Dynamism and Evolvability. *Science* 324, 203-207.
- Vagin, A.A., Steiner, R.A., Lebedev, A.A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., and Murshudov, G.N. (2004). REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2184-2195.
- Voigt, C.A., Martinez, C., Wang, Z.G., Mayo, S.L., and Arnold, F.H. (2002). Protein building blocks preserved by recombination. *Nature Struct Biol* 9, 553-558.
- Voss, N.R., and Gerstein, M. (2010). 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acids Research* 38, W555-562.
- Wang, X., Minasov, G., and Shoichet, B.K. (2002). The Structural Bases of Antibiotic Resistance in the Clinically Derived Mutant β -Lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *J Biol Chem* 277, 32149-32156.
- Wang, Z., Abeysinghe, T., Finer-Moore, J.S., Stroud, R.M., and Kohen, A. (2012). A Remote Mutation Affects the Hydride Transfer by Disrupting Concerted Protein Motions in Thymidylate Synthase. *J Am Chem Soc* 134, 17722-17730.
- Whittier, S.K., Hengge, A.C., and Loria, J.P. (2013). Conformational motions regulate phosphoryl transfer in related protein tyrosine phosphatases. *Science* 341, 899-903.
- Zafaralla, G., Manavathu, E.K., Lerner, S.A., and Mobashery, S. (1992). Elucidation of the role of arginine-244 in the turnover processes of class A beta-lactamases. *Biochemistry* 31, 3847-3852.

Préface au chapitre 3

L'utilisation clinique à grande échelle des antibiotiques de type β -lactame a mené à une augmentation importante de la prévalence et du nombre de variants de ces enzymes de résistances bactériennes. Une meilleure compréhension de la relation entre la structure et la fonction de ces enzymes est essentielle afin d'adresser l'incidence croissante de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Précédemment, l'assignation RMN de la chaîne polypeptidique principale d'une protéine chimérique constituée des segments des β -lactamases de classe A TEM-1 et PSE-4 a été déterminée. Cette chimère fonctionnelle, cTEM-17m, comportant 17 acides aminés substitués relativement à TEM-1, possède un repliement natif. Par contre, une augmentation importante de la dynamique lente relativement aux enzymes natives a été observée. Dans cet article, nous rapportons l'assignation par RMN des résonances ^1H , ^{13}C et ^{15}N de la chaîne polypeptidique principale d'une seconde chimère soit, cTEM-19m, comportant 19 substitutions relativement à TEM-1. Cette chimère possède deux substitutions additionnelles localisées au niveau du site actif. De plus, nous caractérisons le variant de TEM-1 ne contenant que ces deux mutations soit TEM-1(M68L-M69T) (ou cTEM-2m). Cette étude constitue la première étape afin d'effectuer une caractérisation de la dynamique de ces enzymes.

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue *Biomolecular NMR Assignments* en avril 2016 (en ligne septembre 2015). Ma contribution à cet article se situe principalement au niveau de la préparation des échantillons analysés, de l'exécution et de l'interprétation des différentes expériences (purification de protéines, dénaturation thermique suivie par fluorimétrie différentielle, dichroïsme circulaire, assignation de protéines par résonance magnétique nucléaire) ainsi qu'au niveau de la rédaction et la confection des figures. Le tout a été exécuté sous la direction du Professeur Joelle Pelletier (Université de Montréal). Donald Gagné, étudiant sous la direction de Nicolas Doucet (INRS-Armand Frappier), a contribué à cet article par son aide pour l'analyse des données de résonance magnétique.

Chapitre 3

Assignation RMN des résonances ^{15}N , ^{13}C et ^1H du squelette peptidique d'un mutant déconvolué et d'une chimère artificiellement évoluée des β -lactamase de classe A TEM-1 et PSE-4.

3.1. Article 2. ^{15}N , ^{13}C and ^1H backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 class A β -lactamase chimera and its deconvoluted mutant.

Sophie M. C. Gobeil^{1,2}, Donald Gagné^{1,4,6}, Nicolas Doucet^{1,4,6} & Joelle N. Pelletier^{1,2,3,7} *

¹ PROTEO Network, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6 Canada

² Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada

³ Département de chimie, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada

⁴ GRASP Network, McGill University, Montréal, QC H3G 1Y6, Canada

⁶ INRS–Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC H7V 1B7, Canada

⁷ Center for Green Chemistry and Catalysis (CCVC), Montréal, QC H3A 0B8, Canada

Biomolecular NMR Assignments, Vol. 10, Issue 1, p. 93-99 (2016).

ABSTRACT.

The widespread use of β -lactam antibiotics has given rise to a dramatic increase in clinically-relevant β -lactamases. Understanding the structure/function relation in these variants is essential to better address the ever-growing incidence of antibiotic resistance. We previously reported the backbone resonance assignments of a chimeric protein constituted of segments of the class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4 (Morin, Clouthier et al.). That chimera, cTEM17m, held 17 amino acid substitutions relative to TEM-1 β -lactamase, resulting in a well-folded and fully functional protein with increased dynamics. Here we report the ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone resonance assignments of chimera cTEM-19m, which includes 19 substitutions and exhibits increased active-site perturbation, as well as one of its deconvoluted variants, as the first step in the analysis of their dynamic behaviours.

BIOLOGICAL CONTEXT.

Class A β -lactamases are the most prominent group of enzymes implicated in antibiotic resistance. This class of hydrolases, comprising hundreds of members, is specific for β -lactam compounds such as penicillins and cephalosporins (Pimenta, Fernandes et al. 2014). The class A β -lactamase TEM-1 has been extensively characterized. Its structure, kinetic parameters and dynamics have been studied by X-ray crystallography, molecular dynamics simulations and NMR (Minasov, Wang et al. 2002, Savard and Gagné 2006). Its homolog, PSE-4, was also characterized by NMR and X-ray crystallography to report its structure, dynamics and kinetics (Lim, Sanschagrín et al. 2001, Morin and Gagné 2009). TEM-1 and PSE-4 share moderate sequence identity (40%) and conserved folds (backbone RMSD 0.99 Å). Native TEM-1 and PSE-4 β -lactamases were previously recombined using the structural recombination algorithm SCHEMA to create libraries of β -lactamase chimeras, which were functionally selected for ampicillin hydrolysis (Voigt, Martínez et al. 2002, Meyer, Silberg et al. 2003, Meyer, Hochrein et al. 2006). Because both ‘parental’ enzymes are well characterized, the artificially-evolved chimeras resulting from their recombination provide a means to characterize the effect of multiple simultaneous substitutions on enzyme structure and activity. In an effort to better understand the high tolerance of these enzymes to mutations, we previously reported the

structure, function and dynamics of a highly blended TEM-1/PSE-4 chimera, cTEM-17m (Clouthier, Morin et al. 2012, Gobeil, Clouthier et al. 2014). This chimera harbours 17 TEM-1 to PSE-4 substitutions in one of the active-site walls (residues 150 to 190 according to the standard Ambler numbering scheme, *i.e.* numbered from 26 to 290, with gaps at positions 239 and 253 (Ambler, Coulson et al. 1991) (**Figure 3.1**). Here, we characterize a more highly perturbed chimera, cTEM-19m, sharing the same exchanged region as cTEM-17m, in addition to a second exchanged region (residues 66 to 73) that neighbours the catalytic Ser70 (Figure 1). This second region introduced two additional active-site substitutions at positions 68 (M68L) and 69 (M69T). Met68 is moderately conserved in TEM-1 clinical variants while the more highly conserved Met69 has only been observed as Ile, Val and Leu variants. Chimera cTEM-19m thus holds 19 active-site substitutions relative to TEM-1 and 131 substitutions relative to PSE-4. In addition, to evaluate the impact of these two new substitutions relative to chimera cTEM-17m, we also created the deconvoluted variant of cTEM-19m in the TEM-1 context: TEM-1(M68L-M69T).

Here, we report the ^{15}N , ^{13}C and ^1H backbone NMR assignments of chimera cTEM-19m and the deconvoluted TEM-1(M68L-M69T) variant. We assigned 92.1% of backbone amide resonances for cTEM-19m and 98.4% for TEM-1(M68L-M69T). To verify that the missing assignments in cTEM-19m were not due to protein degradation or unfolding, we evaluated secondary structure, thermal stability and activity toward CENTA hydrolysis, confirming protein fitness.

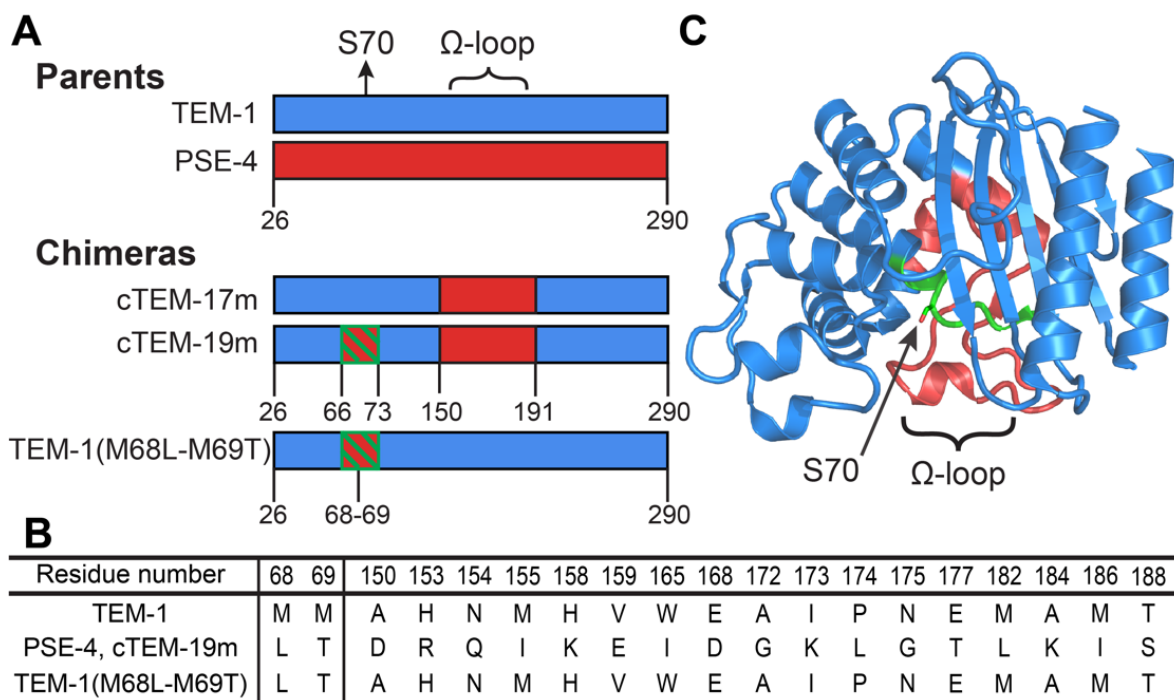


Figure 3.1. Relation of TEM-1 and PSE-4 to the chimeras cTEM-17m and cTEM-19m, and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T).

(A) Sequence segments exchanged during chimera formation. Segments originating from TEM-1 are blue and from PSE-4 are red. The newly exchanged active-site PSE-4 segment (residues 66 to 73) is highlighted with green hatching. (B) Sequence variation introduced during chimeragenesis. Among the 17 amino acid substitutions that result from exchanging region 150-190 from TEM-1 to PSE-4 in both cTEM-17m and cTEM-19m, a Pro is exchanged for a Leu (position 174) and 2 Gly are inserted (positions 172, 175). (C) Crystal structure of cTEM-17m (PDB 4ID4; (Gobeil, Clouthier et al. 2014)) colored as in (A). The catalytic Ser70 is in sticks representation.

METHODS AND EXPERIMENTS.

DNA constructs, expression and purification. The original cTEM-19m gene was reported by Voigt *et al.* (Voigt, Martinez et al. 2002, Meyer, Silberg et al. 2003). Subcloning of chimera cTEM-19m into pET-24 with the OmpA signal sequence was performed as previously described (Clouthier, Morin et al. 2012). To generate the TEM-1(M68L-M69T) mutant, oligonucleotide primers were synthesized by Alpha DNA (Montréal, QC) and the QuickChange site-directed mutagenesis method developed by Stratagene (La Jolla, CA) was

used with the I-Proof High Fidelity DNA polymerase (Bio-Rad, Mississauga, ON) using pET24-TEM-1 as the template (Clouthier, Morin et al. 2012). The PCR product was *DpnI*-digested for 1 hour at 37°C to eliminate the methylated non-mutated parental DNA template and butanol-precipitated before being transformed into *E. coli* XL1 Blue. Cells were plated on LB-agar containing 50 µg/mL kanamycin. One colony was selected for DNA extraction to confirm the DNA sequence of the entire coding region and for retransformation into *E. coli* BL21(DE3) for expression. For NMR, uniformly [¹⁵N]- and [¹³C, ¹⁵N]-labeled cTEM-19m and TEM-1(M68L-M69T) proteins were overexpressed in modified M9 minimal medium containing ¹⁵NH₄Cl and ¹³C-glucose and purified as previously described (Morin, Clouthier et al. , Clouthier, Morin et al. 2012, Gobeil, Clouthier et al. 2014). Samples were dialyzed against distilled, deionized water overnight at 4°C. For applications other than NMR, proteins were overexpressed in auto-inducing ZYP-5052 medium (Studier 2005) and purified as previously described (Clouthier, Morin et al. 2012, Gobeil, Clouthier et al. 2014). Sample purity was determined by SDS-PAGE revealed by the zinc-imidazole method. Typical yields were 25 mg/L of > 98% pure protein in minimal medium and 50 mg/L in auto-inducing medium.

Solution NMR spectroscopy. [¹³C,¹⁵N]-labeled and [¹⁵N]-labeled NMR samples were concentrated to 0.6 mM using a 10,000 MWCO Amicon concentrator. The buffer was changed to 3 mM imidazole, 0.1% NaN₃ and 10% D₂O, pH 6.7. The final pH was verified using a pH meter with a microprobe. All NMR experiments were performed at 31.5°C as calibrated with a standard methanol sample (John Cavanagh 2006) on a Varian 18.8 T (800MHz) NMR spectrometer equipped with a triple-resonance probe and pulsed-field gradient. ¹H-¹⁵N HSQC and a TROSY version of HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB and HNCO triple-resonance experiments were performed. NMR data were processed using NMRPipe (Delaglio, Grzesiek et al. 1995) and analyzed using Sparky (Kneller) and NMRViewJ version 8.0 (Johnson and Blevins 1994).

Circular dichroism and thermal scanning fluorometry. Circular dichroism (CD) using a Jasco spectropolarimeter with a Peltier element, and thermal scanning fluorometry with Sypro Orange using a LightCycler 480 apparatus (Roche), were performed as previously described (Clouthier, Morin et al. 2012). Briefly, for CD experiments, protein solutions were at a final concentration of 0.1 mg/mL (3.5 µM) in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, in a 2 mm path length cuvette. Initial spectra were acquired at 25°C from 200–260 nm at a scan rate of 50

nm/min. Thermal denaturation experiments were performed by monitoring changes in ellipticity at 222 nm, at a scan rate of 20°C/hour. T_m values were determined using the derivatives function of the Jasco Spectra Manager software with the Savitzky-Golay algorithm. For thermal scanning fluorometry, each combination of 5×, 3.33× and 2.5× SYPRO Orange solution (Invitrogen) with 4 mM, 2 mM or 1 mM of test protein was prepared in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, to a final volume of 20 μ L. Controls consisted of SYPRO Orange in buffer. Samples were heated from 20°C to 95°C with a ramp speed of 0.04°C/s and 15 acquisitions/°C. Fluorescence was monitored with a CCD camera, using $\lambda_{exc} = 483$ nm and $\lambda_{em} = 568$ nm and a 1 s exposure time. T_m calculations were performed as previously described (Clouthier, Morin et al. 2012).

Kinetics. K_M and k_{cat} of CENTA hydrolysis were determined as previously reported (Clouthier, Morin et al. 2012). The hydrolysis of CENTA (35–1000 μ M) was assayed with 15 nM enzyme using the extinction coefficient $\Delta\epsilon_{405nm} = 6,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. The assay was performed at room temperature in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, using a DTX 880 plate-reader (Beckman Coulter) and 96-well plates (Corning Costar flat-bottomed model 9017) with 200 μ L samples per well, giving a path length of 0.7 cm.

ASSIGNMENTS AND DATA DEPOSITION.

Despite their high molecular weight of 30 kDa, chimera cTEM-19m and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T) gave rise to good quality ^1H - ^{15}N HSQC spectra (**Figures 3.2** and **3.3** respectively), as previously observed for TEM-1, PSE-4 and cTEM-17m (Morin, Clouthier et al. , Savard, Sosa-Peinado et al. 2004, Morin, Levesque et al. 2006).

Chimera cTEM-19m holds two amino acid substitutions relative to chimera cTEM-17m, originating from PSE-4 (M68L and M69T). As a result, the majority of the peaks in the cTEM-19m ^1H - ^{15}N HSQC were assigned using a superimposition strategy with the ^1H - ^{15}N HSQCs of chimera cTEM-17m (BMRB 16598) (Morin, Clouthier et al.), TEM-1 (BMR 6024, 6357 and 7238) (Savard, Sosa-Peinado et al. 2004), PSE-4 (BMRB: 6838) (Morin, Levesque et al. 2006) and the RunAbout tool in NMRViewJ. The final level of completeness obtained for cTEM-19m was 92.1% (232/252) of the non-proline backbone $^1\text{H}_N$ and ^{15}N resonances, 89.4% (235/263) of $^{13}\text{C}_\alpha$ and 76.7% (184/240) of $^{13}\text{C}_\beta$. The missing assignments in cTEM-19m

(listed as supplementary material (**Annexe 2**)) overlap importantly with those reported for cTEM-17m and were either undetectable or gave signals too weak to allow confident assignment. Slow motions may cause peak broadening, rendering the signal indistinguishable from background noise. Most unassigned residues are clustered around the exchanged region 150-190. Active site residues D¹³¹, N¹³², A²¹⁷ and K²³⁴ were assigned in cTEM-19m though not observed in cTEM-17. Residues R²²², G²⁴⁵ and I²⁴⁶, flanking the main unassigned regions in cTEM-17m (residues 214-221, 234-244) could not be assigned in cTEM-19m, suggesting a slightly longer region experiencing slow motions relative to cTEM-17m. H²⁶ could not be identified with certitude, as it is the *N*-terminal residue of the mature protein and is followed by P²⁷.

Assignment of the ¹H-¹⁵N HSQC of TEM-1(M68L-M69T) variant revealed that the two mutations produced no major structural changes resonance frequency changes relative to TEM-1 indicating maintenance of the global structure. The majority of the resonances in the TEM-1(M68L-M69T) ¹H-¹⁵N HSQC were assigned using an overlaying strategy with the ¹H-¹⁵N HSQC of TEM-1 and the RunAbout tool in NMRView. The level of completeness obtained was 98.4% (247/251) of the non-proline backbone ¹H_N and ¹⁵N resonances, 93.5% (246/263) of ¹³C_α and 87.6% (212/242) of ¹³C_β. Missing assignments for H²⁶, S⁷⁰ and A²³⁷ were as for TEM-1 and PSE-4, resulting from peak broadening in the active-site vicinity.

The ¹H, ¹⁵N and ¹³C and backbone resonance assignments for chimera cTEM-19m and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T) have been deposited in the BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) under the accession codes 26590 and 26586, respectively. These chemical shift assignments are the first step in the analysis of their backbone dynamic behaviour.

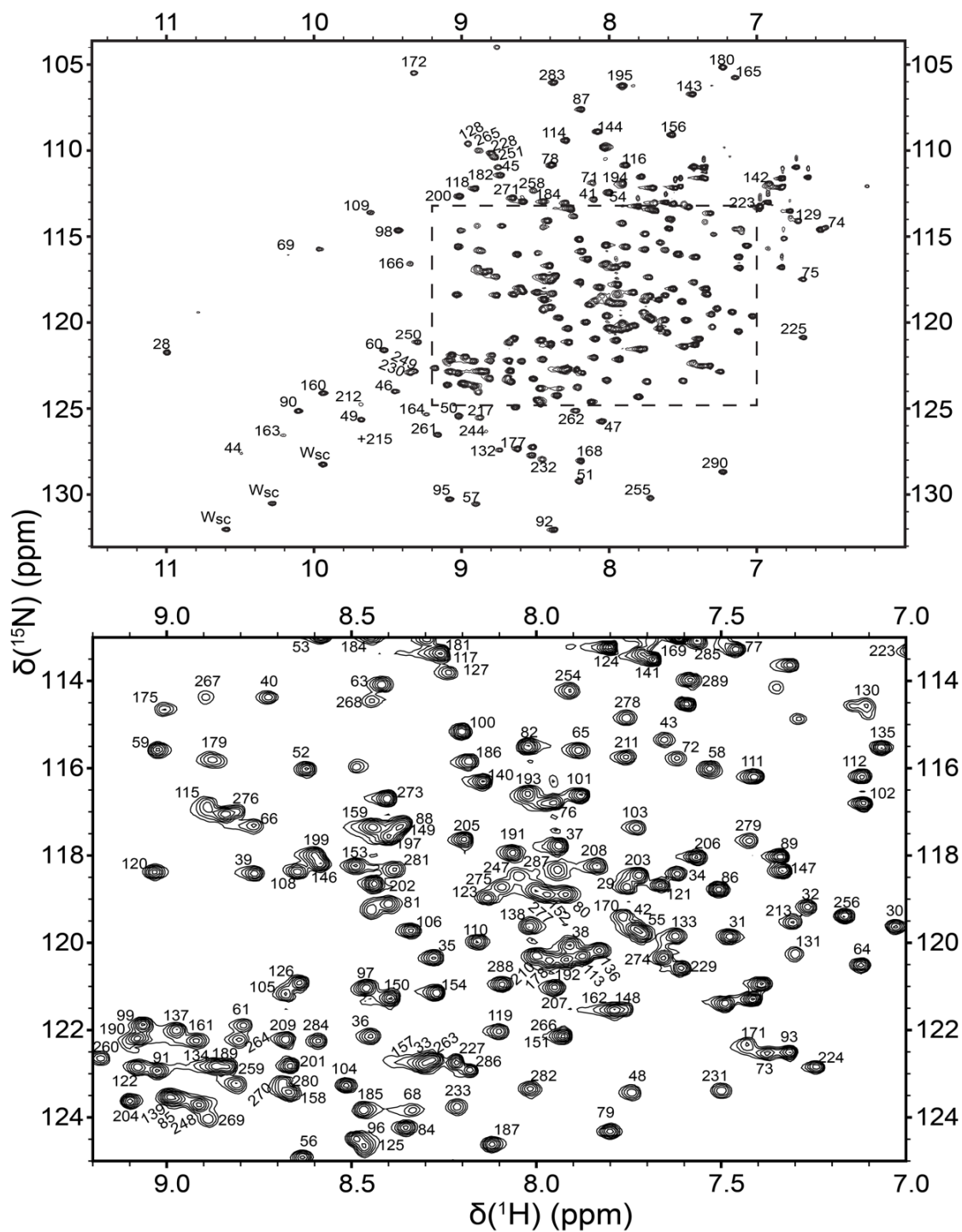


Figure 3.2. Two-dimensional ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the chimera cTEM-19m.

Assigned peaks are labeled according to Ambler numbering. The section marked by a dashed square is presented in an expanded format. Tryptophan side chains are marked by Wsc. Residue 215 is marked by “+” as its signal is of lower intensity.

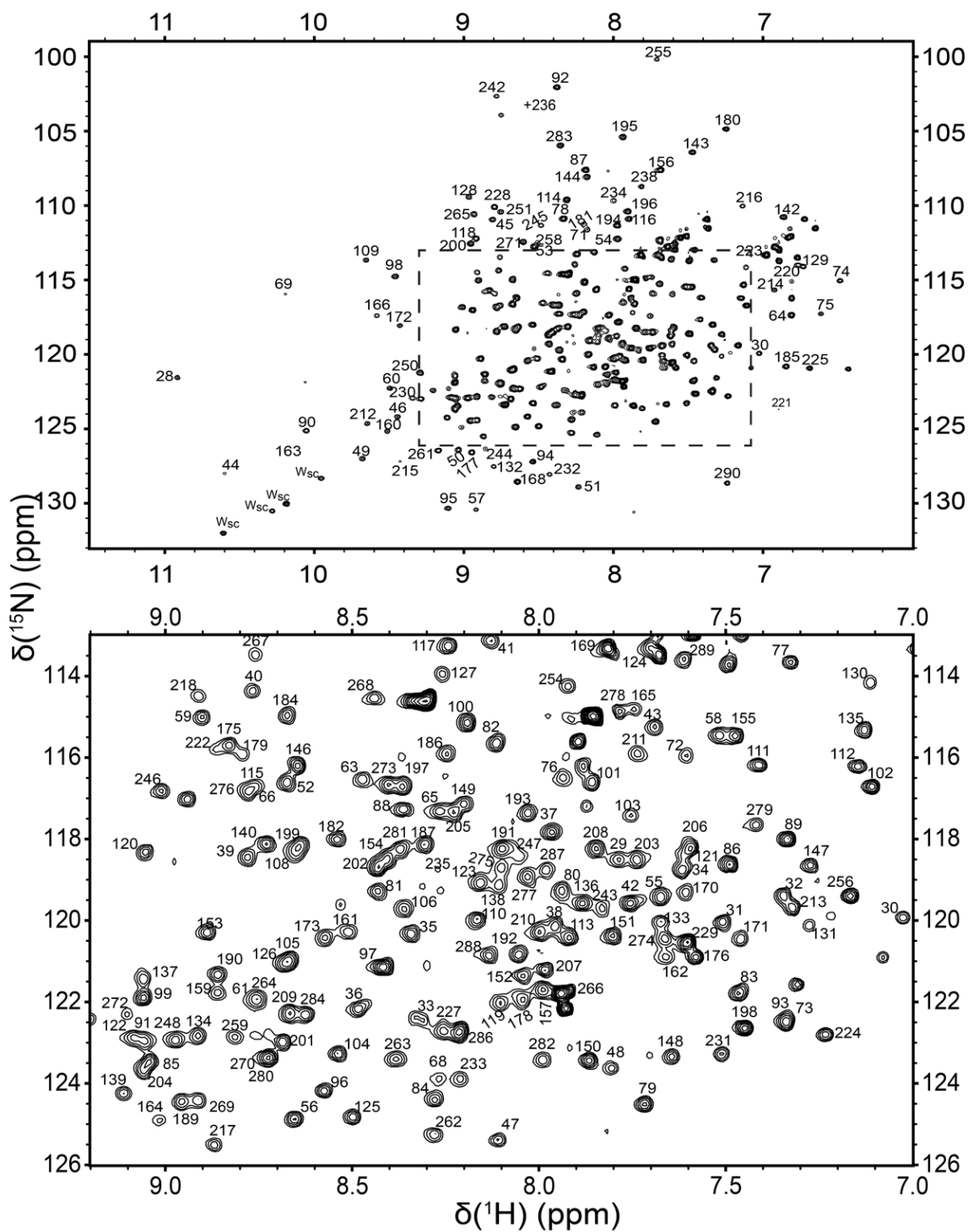


Figure 3.3. Two-dimensional ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the TEM-1(M68L-M69T) variant.

Assigned peaks are labeled according to the Ambler numbering. The central section highlighted by a dashed square is presented in an expanded format. Wsc marks tryptophan side chains.

To verify whether the missing assignments in cTEM-19m resulted from partly unfolded or degraded protein, maintenance of its secondary structure, characterized by a high α -helical content, was confirmed by far-UV CD (**Figure 3.4 A**). The disulfide bridge between C⁷⁷ and C¹²³ was confirmed according to the C _{β} shifts at 45.0 and 42.4 ppm, indicating oxidation. Thermal denaturation of secondary structure elements of cTEM-19m using CD at 222 nm ($T_m = 49^\circ\text{C}$; **Figure 3.4 B**) was indistinguishable from the T_m recorded by the same method for the parental TEM-1 and PSE-4 β -lactamases (49.6°C and 48.6°C , respectively (Clouthier, Morin et al. 2012)). The thermal stability of secondary and tertiary structure elements of both cTEM-19m and TEM-1(M68L-M69T) was determined by thermal scanning fluorometry (Figure 4C, D). The T_m for cTEM-19m ($48.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$) and for TEM-1(M68L-M69T) ($49.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$) are in the same range as those reported using the same method for parental TEM-1 ($49.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$) and PSE-4 ($47.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$), as well as chimera cTEM-17m ($49.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$) (Clouthier, Morin et al. 2012). These experiments confirm that cTEM-19m and TEM-1(M68L-M69T) conserve a characteristic β -lactamase-like fold, with cTEM-19m exhibiting a pattern of NMR line broadening similar to cTEM-17m.

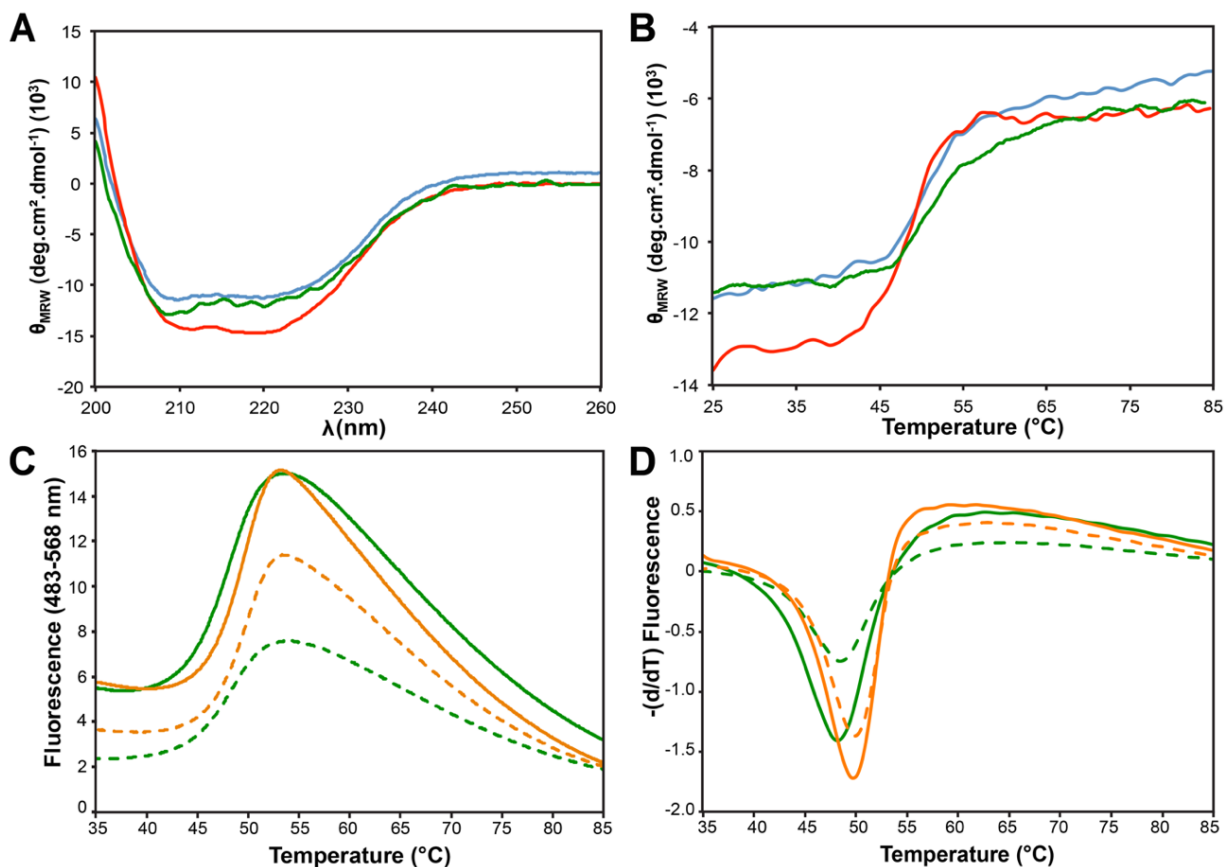


Figure 3.4. Thermal denaturation of the chimera cTEM-19m and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T).

(A) Far-UV CD spectrum at 25°C and (B) Mean molar residual ellipticity measured at 222 nm during thermal denaturation for cTEM-19m (green). TEM-1 (blue), PSE-4 (red) data taken from (Clouthier, Morin et al. 2012) are shown for comparison. (B) Mean molar residual ellipticity measured at 222 nm during thermal denaturation TEM-1a (blue), PSE-4a (red) and cTEM-19m (green). (C) Thermal denaturation monitored by scanning fluorimetry of cTEM-19m (green) and TEM-1(M68L-M69T) (orange) observed by fluorescence of SYPRO Orange. Melting curves are shown for a ratio of 3.33× SYPRO Orange to 1 mM (dashed line) or 2 mM (full line) protein. (D) First derivative analysis of the thermal melting curves.

To confirm that cTEM-19m and TEM-1(M68L-M69T) were functional, we characterized their hydrolysis of the chromogenic substrate CENTA (Table 3.I). Small reductions in turnover rates (k_{cat}), accompanied by a 4- to 12-fold loss of productive binding (K_M), resulted in catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M) one order of magnitude lower than TEM-1, PSE-4 and cTEM-17m. Despite a modest reduction in activity, these results confirm that

cTEM-19m and TEM-1(M68L-M69T) are well-folded, functional β -lactamase variants. Further investigations are underway to better understand the effects of these sequence substitutions on protein structure, function and dynamics.

Tableau 3.I. Kinetic constants for the hydrolysis of the chromogenic substrate CENTA by chimera cTEM-19m and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T)^a

| | k_{cat} (s ⁻¹) | K_M (μ M) | k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹) |
|------------------------------|------------------------------|------------------|--|
| TEM-1 ^b | 33 \pm 1 | 36 \pm 5 | 9.2 $\times 10^5$ |
| PSE-4 ^b | 19 \pm 1 | 46 \pm 9 | 4.1 $\times 10^5$ |
| cTEM-17m ^b | 48 \pm 3 | 160 \pm 35 | 3.1 $\times 10^5$ |
| cTEM-19m | 11 \pm 1 | 290 \pm 43 | 3.8 $\times 10^4$ |
| TEM-1 (M68L-M69T) | 14 \pm 1 | 480 \pm 51 | 3.0 $\times 10^4$ |

^a All values are reported as the average of triplicates \pm standard deviation on the mean as analyzed using the Michaelis-Menten fitting in GraphPad Prism.

^b Values taken from (Clouthier, Morin et al. 2012).

CONCLUSION.

¹⁵N, ¹³C and ¹H backbone resonance assignments for cTEM-19m and the deconvoluted variant TEM-1(M68L-M69T) were achieved using double- and triple-resonance experiments. These assignments will provide the means to investigate their dynamics on a slow time scale relevant to protein function, providing insight into the effect of sequence substitutions on structure and function in β -lactamases.

REFERENCES.

- Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger and P. H. Zwart (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 2): 213-221.
- Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby and S. G. Waley (1991). "A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases." Biochem J **276** (Pt 1): 269-270.
- Bakan, A. and I. Bahar (2009). "The intrinsic dynamics of enzymes plays a dominant role in determining the structural changes induced upon inhibitor binding." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14349-14354.
- Bhabha, G., J. Lee, D. C. Ekiert, J. Gam, I. A. Wilson, H. J. Dyson, S. J. Benkovic and P. E. Wright (2011). "A dynamic knockout reveals that conformational fluctuations influence the chemical step of enzyme catalysis." Science **332**(6026): 234-238.
- Boehr, D. D., D. McElheny, H. J. Dyson and P. E. Wright (2010). "Millisecond timescale fluctuations in dihydrofolate reductase are exquisitely sensitive to the bound ligands." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1373-1378.
- Boehr, D. D., R. Nussinov and P. E. Wright (2009). "The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition " Nature Chemical Biology **5**(12): 954-954.
- Bos, F. and J. Pleiss (2009). "Multiple molecular dynamics simulations of TEM beta-lactamase: dynamics and water binding of the omega-loop." Biophys J **97**(9): 2550-2558.
- Bush, K. (2013). "Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases." Annals of the New York Academy of Sciences **1277**(1): 84-90.
- Carroll, M. J., R. V. Mauldin, A. V. Gromova, S. F. Singleton, E. J. Collins and A. L. Lee (2012). "Evidence for dynamics in proteins as a mechanism for ligand dissociation." Nature Chemical Biology **8**(3): 246-252.
- Cavanagh, J., W. Fairbrother, Palmer, III, M. Rance and N. Skelton (2007). Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice.
- Chen, Y., B. Shoichet and R. Bonnet (2005). "Structure, Function, and Inhibition along the Reaction Coordinate of CTX-M β -Lactamases." J Am Chem Soc **127**(15): 5423-5434.
- Clouthier, C. M., S. Morin, S. M. Gobeil, N. Doucet, J. Blanchet, E. Nguyen, S. M. Gagne and J. N. Pelletier (2012). "Chimeric beta-lactamases: global conservation of parental function and fast time-scale dynamics with increased slow motions." PLoS One **7**(12): e52283.
- Clouthier, C. M., S. Morin, S. M. C. Gobeil, N. Doucet, J. Blanchet, E. Nguyen, S. M. Gagné and J. N. Pelletier (2012). "Chimeric β -Lactamases: Global Conservation of Parental Function and Fast Time-Scale Dynamics with Increased Slow Motions." PLoS ONE **7**(12): e52283.
- De Wals, P. Y., N. Doucet and J. N. Pelletier (2009). "High tolerance to simultaneous active-site mutations in TEM-1 beta-lactamase: Distinct mutational paths provide more generalized beta-lactam recognition." Protein Sci **18**(1): 147-160.

- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer and A. Bax (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." Journal of Biomolecular NMR **6**(3): 277-293.
- Delmas, J., Y. Chen, F. Prati, F. Robin, B. K. Shoichet and R. Bonnet (2008). "Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases." Journal of Molecular Biology **375**(1): 192-201.
- Deng, Z., W. Huang, E. Bakalbasi, N. G. Brown, C. J. Adamski, K. Rice, D. Muzny, R. A. Gibbs and T. Palzkill (2012). "Deep sequencing of systematic combinatorial libraries reveals beta-lactamase sequence constraints at high resolution." Journal of Molecular Biology **424**(3-4): 150-167.
- Diaz, N., T. L. Sordo, K. M. Merz Jr and D. Suarez (2003). "Insights into the acylation mechanism of class A beta-lactamases from molecular dynamics simulations of the TEM-1 enzyme complexed with benzylpenicillin." J Am Chem Soc **125**(3): 672-684.
- Doucet, N., P. Y. De Wals and J. N. Pelletier (2004). "Site-saturation mutagenesis of Tyr-105 reveals its importance in substrate stabilization and discrimination in TEM-1 beta-lactamase." J Biol Chem **279**(44): 46295-46303.
- Doucet, N. and J. N. Pelletier (2007). "Simulated annealing exploration of an active-site tyrosine in TEM-1 beta-lactamase suggests the existence of alternate conformations." Proteins **69**(2): 340-348.
- Doucet, N. and J. N. Pelletier (2009). Gaining Insight into Enzyme Function through Correlation with Protein Motions. Protein Engineering Handbook, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 187-211.
- Doucet, N., P. Y. Savard, J. N. Pelletier and S. M. Gagné (2007). "NMR investigation of Tyr105 mutants in TEM-1 beta-lactamase: dynamics are correlated with function." J Biol Chem **282**(29): 21448-21459.
- Doucet, N., E. D. Watt and J. P. Loria (2009). "The Flexibility of a Distant Loop Modulates Active Site Motion and Product Release in Ribonuclease A." Biochemistry **48**(30): 7160-7168.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
- Fisette, O., S. Morin, P. Y. Savard, P. Lague and S. M. Gagné (2010). "TEM-1 backbone dynamics-insights from combined molecular dynamics and nuclear magnetic resonance." Biophys J **98**(4): 637-645.
- Fraser, J. S., M. W. Clarkson, S. C. Degnan, R. Erion, D. Kern and T. Alber (2009). "Hidden alternative structures of proline isomerase essential for catalysis." Nature **462**(7273): 669-673.
- Gagné, D., L.-A. Charest, S. Morin, E. L. Kovrigin and N. Doucet (2012). "Conservation of Flexible Residue Clusters among Structural and Functional Enzyme Homologues." J Biol Chem **287**(53): 44289-44300.
- Gagné, D. and N. Doucet (2013). "Structural and functional importance of local and global conformational fluctuations in the RNase A superfamily." Febs Journal: n/a-n/a.
- Glebo, T. J., D. W. Farrell, Z. N. Gerek, M. F. Thorpe and S. B. Ozkan (2012). "Collective Dynamics Differentiates Functional Divergence in Protein Evolution." PLoS Comput Biol **8**(3): e1002428.

- Gobeil, S. M., C. M. Clouthier, J. Park, D. Gagne, A. M. Berghuis, N. Doucet and J. N. Pelletier (2014). "Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins." Chem Biol.
- Grzesiek, S., S. J. Stahl, P. T. Wingfield and A. Bax (1996). "The CD4 Determinant for Downregulation by HIV-1 Nef Directly Binds to Nef. Mapping of the Nef Binding Surface by NMR." Biochemistry **35**(32): 10256-10261.
- Hammes, G. G., S. J. Benkovic and S. Hammes-Schiffer (2011). "Flexibility, Diversity, and Cooperativity: Pillars of Enzyme Catalysis." Biochemistry **50**(48): 10422-10430.
- Henzler-Wildman, K. A., M. Lei, V. Thai, S. J. Kerns, M. Karplus and D. Kern (2007). "A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis." Nature **450**(7171): 913-916.
- Huang, W., J. Petrosino, M. Hirsch, P. S. Shenkin and T. Palzkill (1996). "Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity." J Mol Biol **258**(4): 688-703.
- John Cavanagh, W. J. F., Arthur G. Palmer, III, Nicholas J. Skelton, Mark Rance (2006). Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice.
- Johnson, B. A. and R. A. Blevins (1994). "NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data." Journal of Biomolecular NMR **4**(5): 603-614.
- Kabsch, W. (2010). "Xds." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **66**: 125-132.
- Kamerlin, S. C. L. and A. Warshel (2010). "At the dawn of the 21st century: Is dynamics the missing link for understanding enzyme catalysis?" Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **78**(6): 1339-1375.
- Kempf, J. and J. P. Loria (2004). Measurement of Intermediate Exchange Phenomena. Protein NMR Techniques. A. K. Downing, Humana Press. **278**: 185-231.
- Klinman, J. P. and A. Kohen (2013). "Hydrogen Tunneling Links Protein Dynamics to Enzyme Catalysis." Annu Rev Biochem **82**(1): 471-496.
- Kneller, T. D. G. a. D. G. SPARKY 3. University of California, San Francisco.
- Lim, D., F. Sanschagrín, L. Passmore, L. De Castro, R. C. Levesque and N. C. Strynadka (2001). "Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies." Biochemistry **40**(2): 395-402.
- Lim, D., F. Sanschagrín, L. Passmore, L. De Castro, R. C. Levesque and N. C. J. Strynadka (2001). "Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies." Biochemistry **40**(2): 395-402.
- Liu, C. T., R. J. Stewart and S. J. Benkovic (2013). "Too fast for catalysis." Biocatalysis and Biotransformation **31**(5): 269-271.
- Loria, J. P., M. Rance and A. G. Palmer, 3rd (1999). "A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins." Journal of Biomolecular Nmr **15**(2): 151-155.
- Manley, G. and J. P. Loria (2012). "NMR insights into protein allostery." Arch Biochem Biophys **519**(2): 223-231.
- Marciano, D. C., N. G. Brown and T. Palzkill (2009). "Analysis of the plasticity of location of the Arg244 positive charge within the active site of the TEM-1 β -lactamase." Protein Science **18**(10): 2080-2089.

- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read (2007). "Phaser crystallographic software." J Appl Crystallogr **40**(Pt 4): 658-674.
- Meyer, M. M., L. Hochrein and F. H. Arnold (2006). "Structure-guided SCHEMA recombination of distantly related beta-lactamases." Protein Eng Des Sel **19**(12): 563-570.
- Meyer, M. M., L. Hochrein and F. H. Arnold (2006). "Structure-guided SCHEMA recombination of distantly related beta-lactamases." Protein Engineering Design & Selection **19**(12): 563-570.
- Meyer, M. M., J. J. Silberg, C. A. Voigt, J. B. Endelman, S. L. Mayo, Z. G. Wang and F. H. Arnold (2003). "Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination." Protein Sci **12**(8): 1686-1693.
- Meyer, M. M., J. J. Silberg, C. A. Voigt, J. B. Endelman, S. L. Mayo, Z. G. Wang and F. H. Arnold (2003). "Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination." Protein Science **12**(8): 1686-1693.
- Minasov, G., X. Wang and B. K. Shoichet (2002). "An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation." J Am Chem Soc **124**(19): 5333-5340.
- Morin, S., C. M. Clouthier, S. Gobeil, J. N. Pelletier and S. M. Gagné "Backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 Class A beta-lactamase chimera." Biomol NMR Assign **4**(2): 127-130.
- Morin, S., C. M. Clouthier, S. Gobeil, J. N. Pelletier and S. M. Gagné (2010). "Backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 Class A -lactamase chimera." Biomolecular NMR assignments **4**(2): 127-130.
- Morin, S. and S. M. Gagné (2009). "NMR dynamics of PSE-4 beta-lactamase: an interplay of ps-ns order and mus-ms motions in the active site." Biophys J **96**(11): 4681-4691.
- Morin, S. and S. M. Gagné (2009). "NMR Dynamics of PSE-4 β -Lactamase: An Interplay of ps-ns Order and μ s-ms Motions in the Active Site." Biophys J **96**(11): 4681-4691.
- Morin, S., R. C. Levesque and S. M. Gagne (2006). "¹H, ¹³C, and ¹⁵N backbone resonance assignments for PSE-4, a 29.5 kDa class A beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa." J Biomol NMR **36 Suppl 1**: 11.
- Morin, S., R. C. Levesque and S. M. Gagné (2006). "¹H, ¹³C, and ¹⁵N backbone resonance assignments for PSE-4, a 29.5 kDa class A beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa." J Biomol NMR **36** 11.
- Pimenta, A. C., R. Fernandes and I. S. Moreira (2014). "Evolution of drug resistance: insight on TEM beta-lactamases structure and activity and beta-lactam antibiotics." Mini Rev Med Chem **14**(2): 111-122.
- Ramanathan, A. and P. K. Agarwal (2011). "Evolutionarily Conserved Linkage between Enzyme Fold, Flexibility, and Catalysis." Plos Biology **9**(11): e1001193.
- Risso, V. A., J. A. Gavira, D. F. Mejia-Carmona, E. A. Gaucher and J. M. Sanchez-Ruiz (2013). "Hyperstability and Substrate Promiscuity in Laboratory Resurrections of Precambrian β -Lactamases." Journal of the American Chemical Society **135**(8): 2899-2902.
- Sabbagh, Y., E. Theriault, F. Sanschagrín, N. Voyer, T. Palzkill and R. C. Levesque (1998). "Characterization of a PSE-4 mutant with different properties in relation to penicillanic acid sulfones: Importance of residues 216 to 218 in class A beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **42**(9): 2319-2325.

- Savard, P. Y. and S. M. Gagné (2006). "Backbone dynamics of TEM-1 determined by NMR: evidence for a highly ordered protein." Biochemistry **45**(38): 11414-11424.
- Savard, P. Y., A. Sosa-Peinado, R. C. Levesque, M. W. Makinen and S. M. Gagné (2004). "¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone resonance assignments for TEM-1, a 28.9 kDa beta-lactamase from *E. coli*." J Biomol NMR **29**(3): 433-434.
- Saves, I., O. Burlet-Schiltz, L. Maveyraud, J. P. Samama, J. C. Prome and J. M. Masson (1995). "Mass spectral kinetic study of acylation and deacylation during the hydrolysis of penicillins and cefotaxime by beta-lactamase TEM-1 and the G238S mutant." Biochemistry **34**(37): 11660-11667.
- Soskine, M. and D. S. Tawfik (2010). "Mutational effects and the evolution of new protein functions." Nat Rev Genet **11**(8): 572-582.
- Stec, B., K. M. Holtz, C. L. Wojciechowski and E. R. Kantrowitz (2005). "Structure of the wild-type TEM-1 [beta]-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme." Acta Crystallographica Section D **61**(8): 1072-1079.
- Studier, F. W. (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." Protein Expr Purif **41**(1): 207-234.
- Tokuriki, N. and D. S. Tawfik (2009). "Protein Dynamism and Evolvability." Science **324**(5924): 203-207.
- Vagin, A. A., R. A. Steiner, A. A. Lebedev, L. Potterton, S. McNicholas, F. Long and G. N. Murshudov (2004). "REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **60**: 2184-2195.
- Voigt, C. A., C. Martinez, Z. G. Wang, S. L. Mayo and F. H. Arnold (2002). "Protein building blocks preserved by recombination." Nature Structural Biology **9**(7): 553-558.
- Voigt, C. A., C. Martinez, Z. G. Wang, S. L. Mayo and F. H. Arnold (2002). "Protein building blocks preserved by recombination." Nat Struct Biol **9**(7): 553-558.
- Voss, N. R. and M. Gerstein (2010). "3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor." Nucleic Acids Research **38**(Web Server issue): W555-562.
- Wang, X., G. Minasov and B. K. Shoichet (2002). "The Structural Bases of Antibiotic Resistance in the Clinically Derived Mutant β -Lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34." Journal of Biological Chemistry **277**(35): 32149-32156.
- Wang, Z., T. Abeysinghe, J. S. Finer-Moore, R. M. Stroud and A. Kohen (2012). "A Remote Mutation Affects the Hydride Transfer by Disrupting Concerted Protein Motions in Thymidylate Synthase." J Am Chem Soc **134**(42): 17722-17730.
- Whittier, S. K., A. C. Hengge and J. P. Loria (2013). "Conformational motions regulate phosphoryl transfer in related protein tyrosine phosphatases." Science **341**(6148): 899-903.
- Zafaralla, G., E. K. Manavathu, S. A. Lerner and S. Mobashery (1992). "Elucidation of the role of arginine-244 in the turnover processes of class A beta-lactamases." Biochemistry **31**(15): 3847-3852.

Préface au chapitre 4.

Les protéines subissent des mouvements allant des fluctuations rapides des chaînes latérales aux déplacements lents du squelette peptidique. Un nombre grandissant d'évidences démontrant la contribution des mouvements présents dans des protéines envers leurs fonctions, nous pousse à vérifier la contribution évolutive de ces mouvements. Par l'utilisation de méthodologies expérimentales en RMN et *in silico*, la dynamique couvrant les échelles de temps allant des picosecondes aux millisecondes a été investiguée dans un modèle d'hypothétique chemin évolutif recombinaut deux β -lactamases naturellement évoluées. Il a été observé que les intermédiaires évolutifs maintiennent une efficacité catalytique et une structure native. La dynamique sur les échelles de temps rapides était maintenue chez ces chimères, alors qu'étonnamment, la dynamique lente, ayant lieu sur l'échelle de temps coïncidant avec la vitesse de roulement des enzymes, était grandement augmentée. La fréquence de ces nouveaux mouvements distribués sur l'entièreté des protéines a été quantifiée. Alors que certains de ces mouvements maintenaient la fréquence des enzymes natives, d'autres régions subissent un ralentissement de la fréquence. Nos résultats supportent un modèle où la maintenance des mouvements rapides est associée à la conservation de la réactivité hydrolytique alors que la modification de dynamique lente est tolérée par ces enzymes de résistance bactérienne possédant une grande adaptabilité évolutionnaire.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un article scientifique qui a été soumis à la revue « Cell Chemical Biology » en septembre 2016. Ma contribution à cet article a été au niveau de la préparation des échantillons, de la conception et réalisation des différentes expériences de biologie moléculaire, de cinétique enzymatique, de RMN et de cristallisation, le tout sous la direction de Dre J. Pelletier. De plus, j'ai coordonné les efforts des coauteurs et travaillé en étroite collaboration avec Dre. J. Pelletier et M. Ebert pour la rédaction et la confection des figures. M. Ebert a aussi contribué à cet article par l'exécution et l'analyse de simulations de dynamique moléculaire sous la supervision de Dr J. Pleiss (Université de Stuttgart). Dr J. Park, sous la direction de Dr A. Berghuis (Université McGill), a conceptualisé et réalisé avec ma collaboration des essais de cristallisation des protéines à l'étude. Finalement, Dr D. Gagné, étudiant sous la supervision de Dr N. Doucet (INRS-Armand Frappier), a contribué à cet article par son aide pour l'analyse des données de RMN.

Chapitre 4

Conservation de la dynamique rapide accompagnée par des modifications de la dynamique lente dans des β -lactamases évolutivement apparentées.

4.1. Article 3. Conserved Fast Dynamics Accompanied by Altered Slow Conformational Dynamics in Evolutionarily Related β -Lactamases.

Sophie M.C. Gobeil^{a,b}, Maximillian C.C.J.C. Ebert^{a,b}, Jaeok Park^{b,c,d}, Donald Gagné^{b,d,e,†}, Nicolas Doucet^{b,d,e}, Albert M. Berghuis^{b,c,d}, Jürgen Pleiss^f and Joelle N. Pelletier^{a,b,g}.

^a Département de biochimie and ^g Département de chimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H3T 1J4

^b PROTEO, the Québec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications, G1V 0A6

^c Department of Biochemistry, McGill University, Montréal, QC, Canada, H3G 1Y6

^d GRASP, Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines, H3G 0B1

^e INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

^f Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Stuttgart, Germany, 70569

[†]Present address: Structural Biology Initiative, CUNY Advanced Science Research Center, New York, NY, USA

Soumis à *Cell Chemical Biology* (Septembre 2016).

SUMMARY

Protein motions range from rapid side-chain fluctuations to slower backbone displacements. Increasing evidence that protein motions contribute to function compels us to examine the evolutionary significance of protein dynamics. Using experimental and *in silico* methodologies, dynamics on the entire picosecond-to-millisecond regime were determined over a model evolutionary path recombining naturally-evolved β -lactamases. The evolutionary intermediates displayed native-like structure. Catalytic efficiency was unaltered for hydrolysis of penicillins, while k_{cat} varied up to 75-fold for bulkier cephalosporins. Fast dynamics were conserved yet we observed strikingly increased slow dynamics, coinciding with the timescale of turnover. The proliferation of dynamic residues extending outward from the active site was characterized by frequencies ranging from native-like to slower-than-observable. Our results support a model where maintenance of fast motions is associated with conservation of the hydrolytic reactivity, while modified slow dynamics are functionally tolerated to varying extents according to substrate identity, in this highly evolvable antibiotic resistance system.

HIGHLIGHTS

- We examine pico- to millisecond dynamics by NMR and MD simulations
- Several recombination schemes conserve fast motions yet alter slow motions
- Distinct patterns of widespread slow dynamics are compatible with function
- Tolerance to new motions may contribute to evolvability of these resistance enzymes

eTOC BLURB

Protein motions range from fast side-chain rotations to slow loop rearrangements. Gobeil *et al.* use NMR and simulations to determine that fast motions are conserved in native and recombined β -lactamases, consistent with a functional role. However, slow motions vary dramatically.

INTRODUCTION

Protein motions occur on various timescales. Rapid bond vibrations and rotations (femto- to nanosecond motions) associated with low energy barrier crossing events allow proteins to explore sub-conformations of a state *via* local conformational changes. Slower motions (nano- to millisecond or second) including loop and domain rearrangements favor the exploration of conformational states separated by high energy barriers (Agarwal, 2006; Henzler-Wildman and Kern, 2007; Ramanathan et al., 2014). Interconversion of protein conformers over different timescales is thought to underlie functional diversity (Frauenfelder and McMahon, 1998; Gibbs, 2014). While the exact role of enzyme motions in transition state chemistry is debated, correlation between the dynamics (*i.e.* conformational exchange over time) on fast to slow timescales and function have been put forward for various proteins (Bhabha et al., 2011; Boehr et al., 2010; Eisenmesser et al., 2005; Gagné et al., 2015; Klinman, 2015).

Where specific motions are linked to enzyme function, one can reasonably expect an evolutionary conservation of those motions in homologs with similar function. Indeed, studies on widely differing systems indicate evolutionary conservation of dynamics (Francis et al., 2013; Gagné et al., 2012; Gagné and Doucet, 2013; Gobeil et al., 2014; Keskin et al., 2000; Liu and Bahar, 2012; Maguid et al., 2008; Ramanathan and Agarwal, 2011), although there is also evidence of dynamic variation throughout evolution (Bhabha et al., 2013; Keskin et al., 2000). While being highly informative, none of those studies included the assessment of dynamics on a breadth of continuous timescales.

Here, we investigate protein dynamics over the entire span of fast (ps) to slow (ms) timescales along an engineered evolutionary path linking the evolutionary sub-branches of TEM-1 β -lactamase, a penicillinase and early-generation cephalosporinase, to PSE-4 β -lactamase, a carbenicillinase (Bush and Jacoby, 2009; Choury et al., 2000). We have assembled a system of inter-related β -lactamase chimeras originating exclusively from segments of TEM-1 and PSE-4 (which share 40% sequence identity). Those chimeras were previously produced using the SCHEMA algorithm for laboratory recombination and were chosen among the 20% of recombinants that allowed bacterial survival against ampicillin

(Meyer et al., 2006; Packer and Liu, 2015; Voigt et al., 2002). SCHEMA computationally predicts favorable cross-over points in proteins to minimize the disruption of favorable interactions and mimics the natural process of homologous recombination (Packer and Liu, 2015). As a virtue of being catalytically active, these chimeras constitute a relevant system to probe the role of dynamics over a potential evolutionary path from TEM-1 to PSE-4 (**Figure 4.1 A**).

One such chimeric β -lactamase, harboring a recombined active-site wall, was previously examined in regards to its fast (ps-ns) and slow (μ s-ms) dynamics, leaving a knowledge gap relative to the intermediary ns- μ s motions (Gobeil et al., 2014). A core challenge in understanding the dynamics/structure/function relationship throughout evolution is acquiring broad dynamic datasets describing continuous timescales for all proteins within an evolutionary system (van den Bedem and Fraser, 2015). X-ray diffraction data can reveal alternative residue conformations (Fraser et al., 2009), yet generally provide little insight into timescales at which motions occur. NMR is powerful for probing motions on timescales ranging from the picosecond to seconds. However, the NMR residual dipolar coupling method reporting on the nano- to microsecond timescale suffers from inherent technical challenges, precluding its application to large protein systems (Kleckner and Foster, 2011; Marion, 2013). Knowledge of ns- μ s motions will provide further insight into the dynamics/function relationship, as suggested for an inhibitor-resistant clinical variant of TEM-1 β -lactamase (Meroueh et al., 2002). For this reason, we include computational methodologies to compare the ns- μ s motions of TEM-1 and PSE-4 β -lactamases and the evolutionary intermediates, and to consider these in relation to steady-state kinetic parameters that broadly characterize catalytic function. Penicillins and cephalosporins are investigated since the rate-limiting step differs for these two subclasses of β -lactam antibiotics (**Table 4.I**).

Our investigation of related β -lactamases over the entire span of fast (ps) to slow (ms) motion regime unveils striking differences in dynamic conservation throughout the timescales investigated for this evolutionary model system.

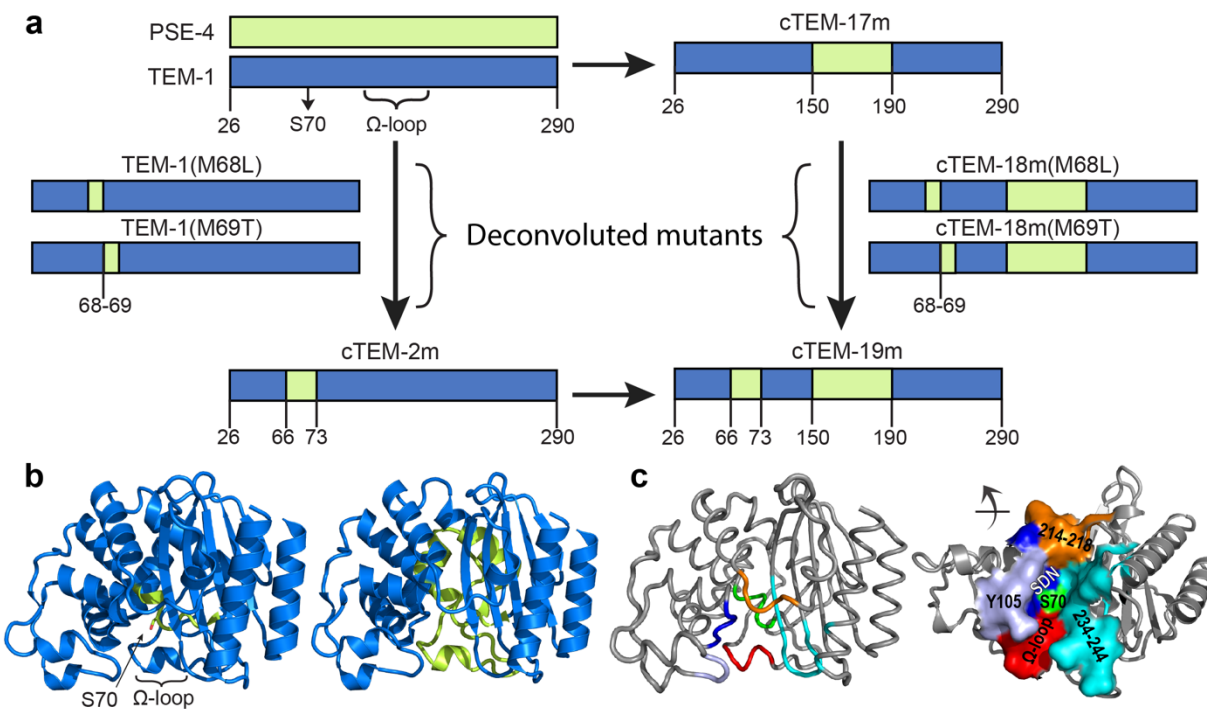


Figure 4.1. Relation of chimeras and the deconvoluted mutants to the parental class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4.

A. Numbering of the sequence blocks originating from TEM-1 (blue) and PSE-4 (green) in cTEM-2m, cTEM-17m, cTEM-19m and the deconvoluted mutants cTEM-18m(M68L), cTEM-18m(M69T), TEM-1(M68L) and TEM-1(M69T). Numbering according to Ambler (Ambler et al., 1991). The chimeras are named as follows: ‘c’ indicates chimera, ‘m’ the number of substitutions (or mutations) in a chimera relative to TEM-1. The catalytic nucleophile, Ser70, and the catalytic Ω -loop are indicated in the TEM-1 sequence. **B.** Structural representation of the parental origin in chimeras cTEM-2m (PDB 4MEZ) and cTEM-19m (PDB 4R4S), colored as in panel A. The catalytic nucleophile, Ser70 (in sticks) and the Ω -loop are indicated on cTEM-2m to highlight the hybrid composition of the active-site region at the interface of the all- α (left) and the α/β (right) domains. **C.** The active-site walls, set in TEM-1 (PDB 1XPB). Green: S70 wall (Met69-Lys73); lilac, Y105 wall (Val 103-Ser106); dark blue, SDN wall (Met129-Asn132); red, Ω -loop wall (Glu166-Asn170); orange, 214-218 wall (Val214-Gly218); and cyan, 234-244 wall (Lys234-Arg244 + Met272 and Asn276). (Right) The structure is reoriented as indicated by the arrow and the active-site walls are represented by their solvent-accessible surface.

RESULTS

The system of interrelated, functional β -lactamases is based on the ‘parental’ homologs, **TEM-1** and **PSE-4** (**Figure 4.1**). These were previously recombined block-wise with the SCHEMA algorithm to yield chimeric β -lactamases (Meyer et al., 2006; Voigt et al., 2002). Chimera **cTEM-2m** is based on TEM-1 and includes residues 66-73 from PSE-4 (**Figures 4.1 B and A3.1**). This introduces Met68Leu and Met69Thr relative to TEM-1, at the core of the active site: they are immediate neighbors to the catalytic nucleophile Ser70. Chimera **cTEM-17m** (Clouthier et al., 2012; Gobeil et al., 2014) adopts residues 150-190 from PSE-4, resulting in 17 substitutions in the catalytically relevant Ω -loop (161-179) and its adjacent helices. This active-site wall contains Glu166, proposed to serve as a general base in the catalytic acylation and deacylation steps (Minasov et al., 2002). Chimera **cTEM-19m** combines the two sets of recombinations, resulting in 19 substitutions on two active-site walls, relative to TEM-1.

Crystal structure of the chimeras cTEM-2m and cTEM-19m. To add to the X-ray structures of TEM-1 (Fonze et al., 1995), PSE-4 (Lim et al., 2001) and cTEM17m (Gobeil et al., 2014), those of cTEM-2m (PDB 4MEZ, resolution 2.05 Å) and cTEM-19m (PDB 4R4S, 1.1 Å and 4R4R, 1.2 Å) were determined (**Figure 4.2; Table A3.I**). Because β -lactamases turn over their natural substrates in the absence of any co-factor at turnover rates approaching the diffusion limit, structural and NMR dynamics studies with intact substrate or inhibitors are not readily feasible. Here, although the classical β -lactamase inhibitor tazobactam (turnover rate of 1.4 s^{-1}) (Swaren et al., 1999) was included during crystallization for cTEM-19m, no corresponding electron density was observed in 4R4S. A crystal of cTEM-19m grown in the absence of tazobactam (4R4R, **Table A3.I**) provided a nearly identical structure ($C\alpha$ -RMSD 0.04 Å).

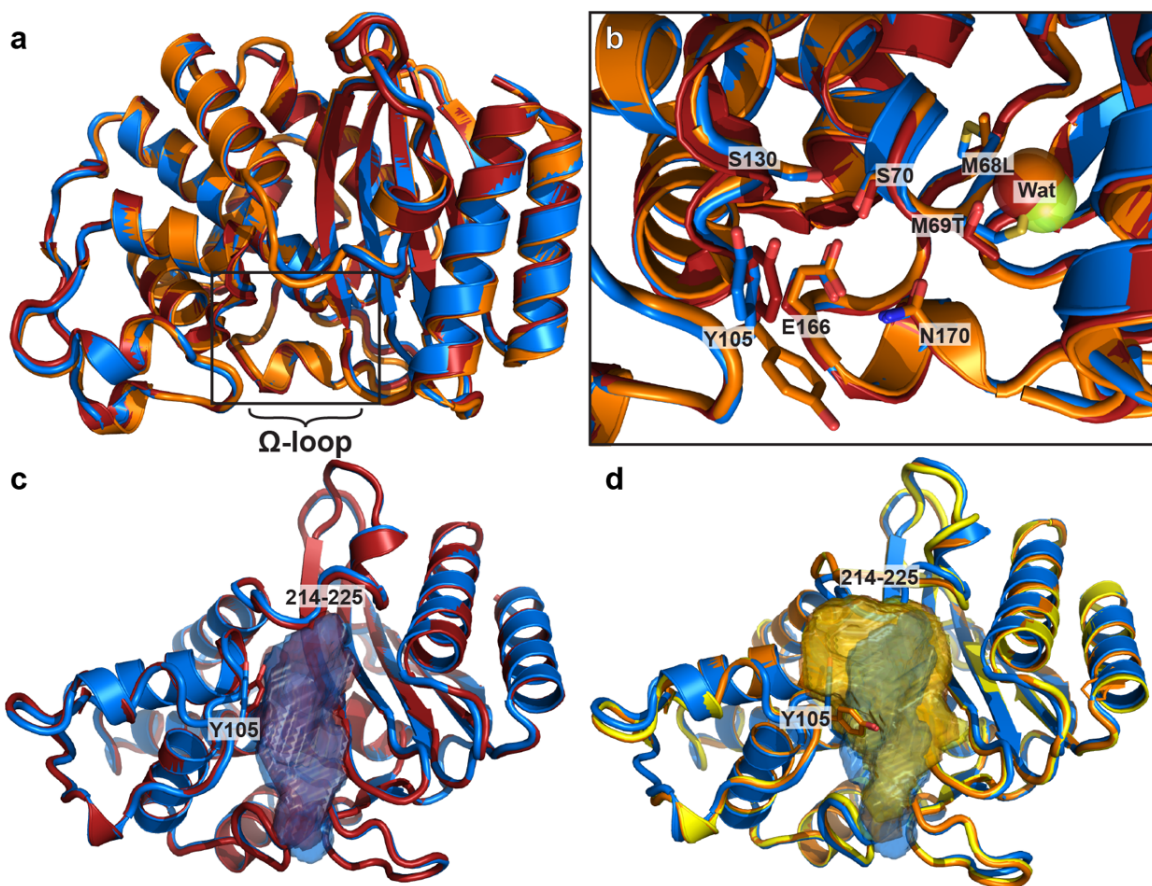


Figure 4.2. Crystal structures of cTEM-2m and cTEM-19m.

A. Backbone overlay of the crystal structures of chimeras cTEM-2m (red; PDB 4MEZ) and cTEM-19m (orange; PDB 4R4S) over TEM-1 (blue; PDB 1XPB). **B.** Active-site view of the overlay of cTEM-2m and cTEM-19m with TEM-1. Wat represents the new water molecule in cTEM-2m (red; Wat519) and cTEM-19m (orange; Wat478) relative to PSE-4 (green; Wat483). Tyr105 of cTEM-19m was modeled to the m -30° conformation according to the “penultimate rotamer library” contrasting with the t 80° conformation observed in TEM-1 and cTEM-2m. **C.** Overlay of the active-site volume of TEM-1 (blue; PDB 1XPB) and cTEM-2m (red; PDB 4MEZ). Orientation as in Figure 1C. **D.** Overlay of the active-site volume of TEM-1 (blue; PDB 1XPB), cTEM-17m (yellow; PDB 4ID4) and cTEM-19m (orange; PDB 4R4S). For residues with alternate conformations in the crystal structure, the conformer with the highest occupancy was illustrated. The active-site volume was calculated using 3V and probes of 1.5 Å and 8 Å radius. See **Table A3.I** for data collection and refinement statistics.

Comparison of cTEM-2m and TEM-1 structures confirmed maintenance of the native fold in the chimera (**Figure 4.2 A**). Its active-site cavity held no major modifications relative to TEM-1. In contrast, cTEM-19m showed significant differences. The SDN wall (containing Ser130, which stabilizes the active site and transition state), the Ω -loop (containing the catalytic Glu166) and the 234-244 wall (which coordinates the catalytic deacylating water jointly with Asn170 (Jelsch et al., 1993) and where Arg244 coordinates the substrate carboxylate (Swaren et al., 1999)) are all native-like (**Figures 4.1 C and 4.2 B**). However, the Y105 gate-keeper wall revealed Tyr105 adopting the *m*-30° conformation (Lovell et al., 2000). This was previously observed in cTEM-17m, contrasting with the *t*80° conformation found in all other native and mutant apoenzyme structures of TEM-1 and PSE-4. Our previous simulations and NMR relaxation experiments are consistent with interconversion of Tyr105 between the two conformations (Doucet and Pelletier, 2007; Gobeil et al., 2014). This side-chain rearrangement resulted in a small increase in the active-site volume (**Figure 4.2 C, D**). Furthermore, the active-site wall 214-218, which belongs to the 214-225 connector linking the all- α domain to the α/β domain, has adopted an open conformation in cTEM-19m. This contributed to a greater extent to increase the active-site volume to 741 Å³, comparable to that for cTEM-17m (746 Å³) and contrasting with those for TEM-1 (384 Å³), PSE-4 (427 Å³) and cTEM-2m (393 Å³). This difference is attributed to the recombined segment 150-190 and its 17 substitutions. A new water molecule in cTEM-2m and cTEM-19m, also present in PSE-4 (Wat483), fills the space occupied by Met69 in TEM-1 and cTEM-17m (**Figure 4.2 B**) and becomes part of the active-site architecture.

We did not attempt to interpret crystallographic B-factors with respect to the protein dynamics, because the relevant crystal structures were diffracted at significantly different resolutions (1.05 – 2.05 Å) and in different space groups (P 4₁2₁2; P 2₁2₁2₁; P 1); furthermore, analysis of B-factors does not directly inform on the time-scale of motions. To obtain insight into the dynamics of this interrelated model of β -lactamase evolution and the timescales at which motions occur, we performed MD simulations and NMR relaxation experiments.

Validation of MD simulation methodology. The crystal structures were energy minimized and subjected to unconstrained MD simulations. We validated our capacity to simulate the S^2 order parameter previously determined by NMR for TEM-1 (Savard and Gagné, 2006), PSE-4 (Morin and Gagné, 2009) and cTEM-17m (Clouthier et al., 2012) (**Table**

A3.II to IV). The S^2 verifies if the peptide N-H bonds remain rigid (S^2 near 1) or exhibit fast motions (S^2 tending toward 0.5). The mean S^2 calculated by NMR and MD simulations compared favorably for all three proteins (S^2 values within 0.03) (**Table A3.II**). The per residue S^2 value in all proteins was between the average ± 1 S.D. (*i.e.* 0.81 to 0.94) for 87% of residues, and 73% of all residues were in excellent MD-NMR agreement (difference between the NMR and MD S^2 values ≤ 0.05). For the most dynamic residues ($S^2 < 0.81$) the average MD-NMR difference (or Δ) was 0.10. The S^2 values of these residues agree well in most cases, as exemplified by region 192-200 ($\Delta = 0.02$ -0.05). We note greater S^2 divergence for some more dynamic, surface-exposed residues: Asp115, Gly143, Asp157, Val159, Asp176 and Trp229 (**Figure A3.1**). Despite these isolated variations, our results allow us to confidently extract S^2 order parameters from the MD simulations of cTEM-2m and cTEM-19m.

MD S^2 datasets are more complete than NMR S^2 datasets as a result of incomplete NMR assignment as well as overlapping N-H resonances that render model-free S^2 calculations imprecise. While the active-site walls are of particular interest, NMR S^2 data are the weakest for this area. NMR S^2 values are missing for the S70, SDN, Ω -loop, 214-218 and 234-244 walls in one or more proteins (**Table A3.IV**), most likely resulting from significant resonance broadening. For this reason, the MD S^2 datasets were used for comparisons.

Dynamics of the β -lactamase system on the fast (ps-ns) timescale. Computationally-determined S^2 were compared for the five interrelated β -lactamases. As previously observed with NMR-derived S^2 for TEM-1 and PSE-4, and for the chimera cTEM-17m, the core of each β -lactamase was rigid while most residues experiencing fast dynamics were on surface loops, including active-site loops (**Figure 4.3**). The hinge leading into the Ω -loop (residues 155-160) showed average S^2 ranging from 0.79 to 0.81 in all proteins, indicating fast dynamics (**Table A3.VII**). The tip of the Ω -loop (residues 171-178), outside the active site, also showed below-average S^2 (0.78 – 0.80). Elevated standard deviations were observed in certain regions, particularly for the three chimeras (**Figure A3.1**). As the S^2 calculation was performed on multiple 10 ns segments over the total 6 μ s simulated trajectories, the standard deviation reflects conformational changes that may occur on slower timescales. While the simulated and NMR-derived S^2 values were comparable, we note that the standard deviation derived from

simulations and from NMR S^2 data do not have the same significance. In the case of the simulations, high standard deviation for residues reveals that the residue explored states with high and low S^2 over the course of the simulated trajectories, while in NMR it reflects standard deviation on the model free fitting for the S^2 . Indeed, increased motions were confirmed on slower timescales for the regions discussed below. S^2 in these regions generally could not be characterized by NMR as a result of overlapped peaks. The active site wall 214-218 was more dynamic in TEM-1 ($S^2 = 0.80 \pm 0.04$) and in the three chimeras ($S^2 = 0.76$ to 0.78) than in the more distantly related PSE-4 ($S^2 = 0.85 \pm 0.01$). Finally, the active-site wall 234-244 was rigid in all proteins ($S^2 = 0.86$ - 0.88), though somewhat higher per residue standard deviation in cTEM-19m suggests motions occurring on a slower timescale.

Dynamics on the intermediate (ns- μ s) timescale. Three 2 μ s MD simulations, probing a total of 6 μ s per protein, were run using independent starting conformations to minimize the impact of local energy minima and to broadly explore the energy landscape. We extracted the C α root mean square fluctuation (RMSF), as C α is the atom that best captures residue motion (**Figure A3.2 and Table A3.V**).

As observed for fast motions, the core of each β -lactamase was rigid while the ns- μ s motions were generally located on surface loops (**Figure 4.3**). TEM-1 and the chimeras were significantly more dynamic than PSE-4, indicating that the greater homology of the chimeras to TEM-1 determines their intermediate timescale motions. The pattern of active-site wall dynamics was essentially the same for both timescales, where loop motions involved similar active-site walls (**Table A3.VII**). All proteins exhibited above-average dynamics in the leading hinge and tip of the Ω -loop (RMSF = 0.12 – 0.23 nm, relative to protein averages of 0.07 – 0.10 nm). All but PSE-4 were dynamic in the 214-218 wall (RMSF = 0.15 – 0.25 nm; 0.07 nm for PSE-4). Further instances of active-site dynamics were noted. Chimeras cTEM-17m and cTEM-19m showed above-average RMSF for the entire Ω -loop (RMSF = 0.14 and 0.17 nm, respectively; 0.07 – 0.10 nm for the others). Finally, the Y105 active-site wall of cTEM-2m had an RMSF of 0.14 ± 0.05 nm (0.8-0.11 nm for the others), indicating ns- μ s motions unique to this chimera.

As observed for the ps-ns timescale, increased per-residue standard deviation of several active-site walls was observed, often linked to above-average RMSF (**Figure A3.2**). This was

the case for the cTEM-17m and cTEM-19m Ω -loop wall and the 214-218 wall of the three chimeras. The Y105 wall of cTEM-2m showed elevated RMSF and standard deviation, whereas only the standard deviation was elevated in cTEM-19m. Residues 238-242 of the 234-244 wall showed increased RMSF in cTEM-19m and moderately increased standard deviation in cTEM-17m. The regions exhibiting increased standard deviations may undergo conformational changes at the same timescale or slower than probed.

Dynamics on the slow (μ s-ms) timescale probed by ^{15}N CPMG NMR. Comparison of NMR assignments (Gobeil et al., 2015; Morin et al., 2010; Morin et al., 2006; Savard et al., 2004) revealed minimal backbone chemical shift (σ) differences between all pairs except where there are sequence differences (**Figure A3.3**). Above-average σ differences were observed for residues 236-246 of cTEM-2m relative to TEM-1 ($\Delta\sigma = 0.12$ ppm; overall $\Delta\sigma = 0.05$ ppm). They belong to active-site wall 234-244 and were unassigned in chimeras cTEM-17m and cTEM-19m. This likely results from NMR resonance broadening, preventing assignment of residues that exhibit motions on a timescale slower than that probed, thus consistent with motions slower than ms (Kleckner and Foster, 2011; Marion, 2013; Mittermaier and Kay, 2009). Indeed, backbone resonance assignments were significantly less complete for cTEM-17m (91%) and cTEM-19m (92%) than TEM-1, PSE-4 and cTEM-2m (98-99%), likely resulting from NMR resonance broadening, thus providing further evidence of increased slow timescale dynamics in cTEM-17m and cTEM-19m.

Previously, the μ s-ms backbone amide dynamics of TEM-1, PSE-4 and the chimera cTEM-17m were probed by ^{15}N -CPMG relaxation dispersion NMR (Gobeil et al., 2014). TEM-1 and PSE-4 exhibited a conserved pattern of restricted slow dynamics in 11 and 5 residues, respectively, including core and active-site residues. In contrast, cTEM-17m exhibited slow motions in 60 residues spanning the protein. Here, ^{15}N -CPMG relaxation dispersion revealed 26 residues in cTEM-2m and 60 residues in cTEM-19m undergoing conformational exchange (ΔR_2 values $\geq 7\text{s}^{-1}$) on the timescale monitored by this experiment ($\approx 50 - 3,000\text{ s}^{-1}$) (**Figures 4.3 and A3.4, Table A3.VI**). These results illustrate that various well-folded, functional β -lactamases can tolerate altered dynamics on this timescale.

Among the 26 dynamic residues in cTEM-2m, we find 7 of the 11 dynamic residues of TEM-1. This indicates that the slow dynamic properties of TEM-1 were generally maintained

while additional residues acquired ms conformational exchange. In cTEM-2m, most residues exhibiting slow dynamics were located in the α/β domain; the substitutions in cTEM-2m (residues 68-69) are located at the interface between the α/β and the all- α domains, so it is surprising that the new dynamics should extend into only one of the domains (**Figure 4.3**).

Interestingly, this chimera includes a stretch of dynamic residues bordering the active-site wall 234-244 (Ile231, Lys234, Gly238 and residues 241-246), where TEM-1 showed a single dynamic residue (Arg241). The exchange rate constant (k_{ex}) is a metric for flexibility. It informs on the sampling rate of interconverting conformations. The per residue k_{ex} was calculated when ^{15}N -CPMG relaxation curves were observed at both NMR fields (**Table A3.VI**). The per residue k_{ex} were also globally fitted for stretches of residues defining each active site wall, where the per residue k_{ex} values overlapped (**Table A3.VII**). Even though an increased number of dynamic residues in the cTEM-2m 214-225 connector and 234-244 wall was observed, the k_{ex} of these regions were maintained as for TEM-1 (**Figure 4.4**, **Table A3.VII**).

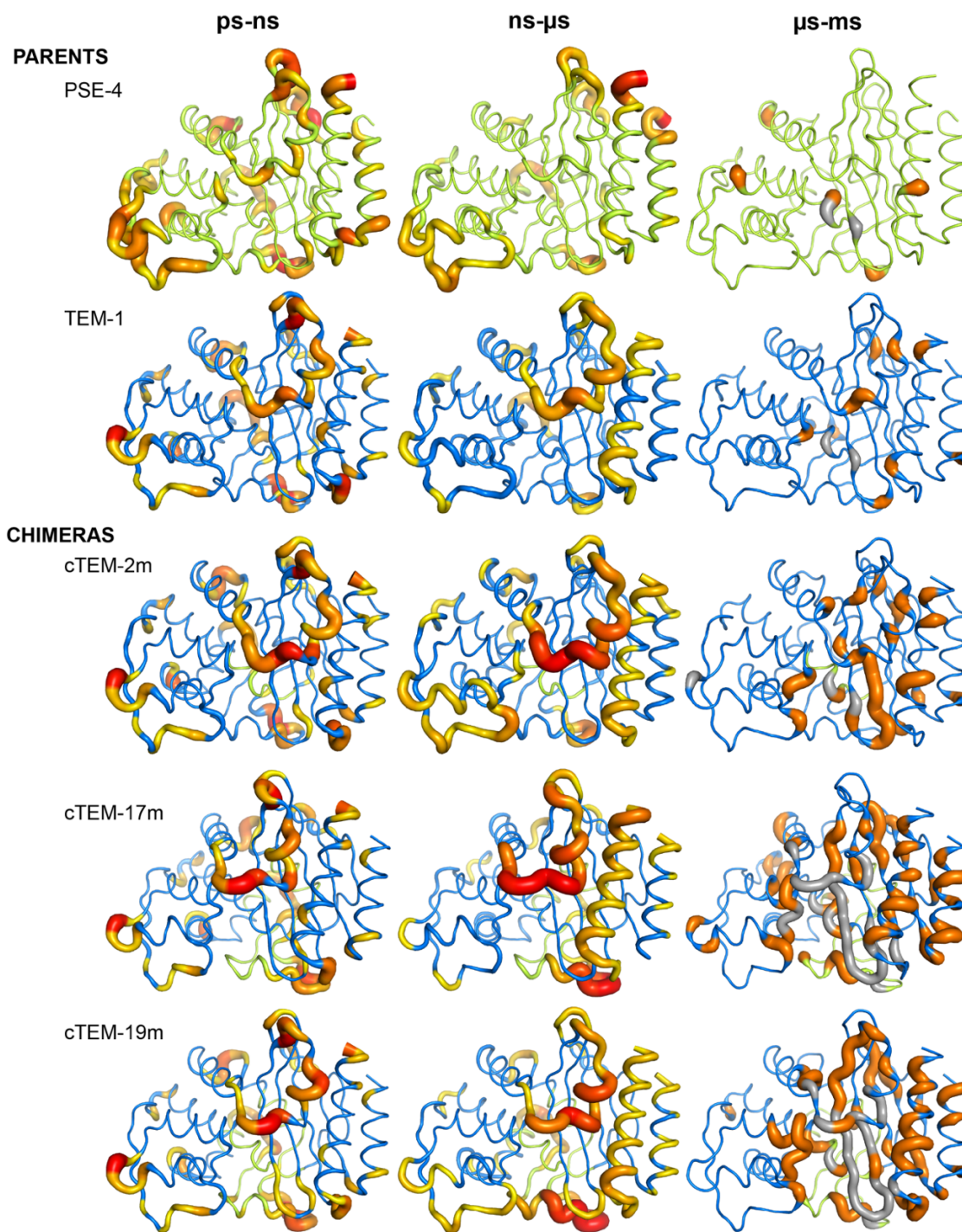


Figure 4.3. β -Lactamase dynamics on the ps to ms timescales.

Dynamics of the parents TEM-1 (blue, PDB 1XPB), PSE-4 (green, PDB 1G68) and the laboratory-evolved chimeras cTEM-2m (PDB 4MEZ), cTEM-17m (PDB 4ID4) and cTEM-19m (PDB 4R4S) (colored on a blue/green scheme according to the parental origin of the sequence block as in Figure 1). **Left:** Dynamic residues on the ps-ns are represented by the MD-derived order parameter S^2 on the amide NH bonds. Residues

with S^2 lower than protein average S^2 are colored on a yellow (<0.85) to bright red scale (≤ 0.7) with thickness also varying according to the value. **Middle:** Dynamics on the ns- μ s timescale are represented by the $C\alpha$ -RMSF derived from triplicate 2 μ s MD simulations. Residues with $C\alpha$ -RMSF higher than the protein average $C\alpha$ -RMSF are colored on a yellow (>0.10 nm) to bright red scale (≥ 0.25 nm) with thickness also varying according to the value. **Right:** Dynamics on the μ s-ms timescale were monitored by CPMG-NMR on the 1H - ^{15}N vector. Residues showing dispersion curves with $\Delta R_2 \geq 7.0$ s^{-1} at 800 MHz are colored orange. NMR unassigned residues are colored gray. See **Tables A3.II to A3.VII** and **Figures A3.1 to A3.4** for the raw data.

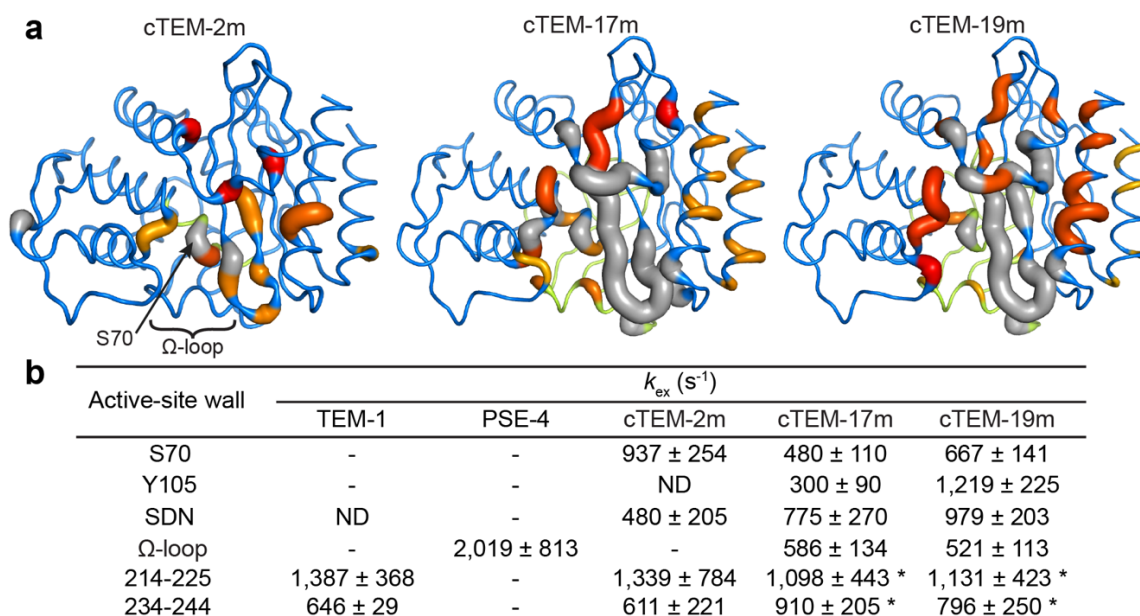


Figure 4.4. Global exchange rates (k_{ex}) of cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m.

The k_{ex} of the fitted regions are colored on a yellow (300 s^{-1}) to red (1500 s^{-1}) gradient on the crystal structure coordinates of cTEM-2m (PDB 4MEZ), cTEM-17m (PDB 4ID4) and cTEM-19m (PDB 4R4S). NMR unassigned residues are colored dark gray. The fitted regions were the N-terminal helix (H1, residues 28-41), S70 wall (residue 69-72), Y105 wall (residue 105-106), SDN wall (residue 128-132), Ω -loop wall (residue 166-170), domains connector (214-225), 234-244 wall (234-244) and the C-terminal helix (H11, 272-288). **B.** Active-site wall calculated global exchange rates (k_{ex}). The * indicates that the region includes multiple unassigned residues. ND: k_{ex} was not determined as a result of large error on the calculated fit. See **Table A3.VII**.

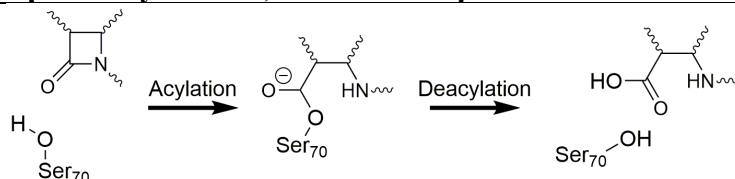
Among the 60 assigned dynamic residues in cTEM-19m, 35 were identical to cTEM-17m while 12 in cTEM-17m and 18 in cTEM-19m were also dynamic in cTEM-2m. The remaining dynamic residues mostly clustered nearby. In addition to those assigned, dynamic residues, the majority of residues constituting both active-site walls belonging to the α/β domain (*i.e.* 214-218 and 234-244) of cTEM-17m and cTEM-19m were unassigned. This is consistent with residues experiencing motions on a slower rate of exchange that broaden the NMR resonances. Interestingly, the dynamic residues also extend beyond those two active-site walls. The extension of the dynamic stretches in cTEM-17m and cTEM-19m is such that only four residues (including a Pro) interrupt the now near-continuous 214-244 dynamic region. These results demonstrate that the increased number of dynamic residues in these walls results from either recombination of region 66-73 or 150-190. Interestingly, the exchange rate k_{ex} for the assigned, dynamic residues in the 214-244 region of cTEM-17m and cTEM-19m are comparable to their homologs TEM-1 and cTEM-2m (**Figure 4.4**). However, the frequency of motions is not fully conserved since unassigned residues are indicative of an exchange rate slower than the millisecond. These contiguous walls of the α/β domain are therefore highly tolerant to modifications in the number and rate of the dynamic residues.

In the all- α domain active-site walls (S70, Y105, SDN and Ω -loop), cTEM-17m and cTEM-19m showed extensive ms dynamics, where limited or no dynamics were found in the parents. A new stretch of dynamic residues with a similar k_{ex} was observed in the Ω -loop wall of cTEM-17m and cTEM-19m. Similarly, an increased number of dynamic residues in the S70 and S130 active-site walls of the chimeras differed by less than 2-fold in k_{ex} . Thus, recombination of region 150-190 in cTEM-17m and cTEM-19m and to a lesser extent region 66-73 in cTEM-2m increased the number of dynamic residues on the all- α domain side of the active site, yet maintained a similar k_{ex} regardless of the recombination. In contrast, while a comparable number of dynamic residues was observed in the chimeras' Y105 wall, the k_{ex} of cTEM-17m ($300 \pm 90 \text{ s}^{-1}$) and cTEM-19m ($1,219 \pm 225 \text{ s}^{-1}$) differ by 4-fold. This difference may have a functional implication as Tyr105 is a gatekeeping residue involved in substrate stabilization (Díaz et al., 2003; Doucet et al., 2004).

Kinetic characterization of cTEM-2m and cTEM-19m. In order to establish any correlation between the dynamics mapped for each member of this β -lactamase system and

function, *i.e.* hydrolysis of β -lactams, we characterized variations of the macroscopic constants K_M and k_{cat} for hydrolysis of two penicillins (benzylpenicillin and carbenicillin), two first-generation cephalosporins (cephalothin and cefazolin) and a third-generation cephalosporin (cefotaxime). The catalytic mechanism of class A β -lactamases is initiated by formation of a Michaelis complex that proceeds to the acyl-enzyme intermediate and thereafter deacylation (**Table 4.I**). Deacylation is rate-limiting for penicillin hydrolysis (Christensen et al., 1990) while for cephalosporins, the hydrolysis mechanism appears to be non-linear and acylation is thought to be rate-limiting (Page, 2008; Saves et al., 1995).

Tableau 4.I. Reaction scheme and turnover rate constants for the hydrolysis of cephalosporins by TEM-1, the chimeric β -lactamases and PSE-4^a.



| | | k_{cat} (s ⁻¹) | k_{cat} fold variation relative to TEM-1 |
|--------------------|-----------------------|------------------------------|--|
| Cephalothin | TEM-1 ^a | 84 ± 12 | 1.0 |
| | cTEM-17m ^a | 120 ± 8.0 | 1.4 (↑) |
| | TEM-1(M69T) | 7.0 ± 4.0 | 12 (↓) |
| | cTEM-18m(M69T) | 1.4 ± 0.3 | 60 (↓) |
| | cTEM-2m | 2.8 ± 0.8 | 30 (↓) |
| | cTEM-19m [*] | 6.0 ± 0.5 | 14 (↓) |
| | PSE-4 ^a | 0.80 ± 0.01 | 105 (↓) |
| Cefazolin | TEM-1 ^a | 55 ± 8.0 | 1.0 |
| | cTEM-17m ^a | 75 ± 21 | 1.4 (↑) |
| | TEM-1(M69T) | 9.0 ± 2.0 | 6.1 (↓) |
| | cTEM-18m(M69T) | 4.0 ± 0.6 | 14 (↓) |
| | cTEM-2m | 3.3 ± 0.1 | 17 (↓) |
| | cTEM-19m [*] | 6.0 ± 0.3 | 9.2 (↓) |
| PSE-4 ^a | 1.9 ± 0.3 | 29 (↓) | |
| Cefotaxime | TEM-1 ^a | 0.74 ± 0.10 | 1.0 |
| | cTEM-17m ^a | 0.14 ± 0.04 | 5.3 (↓) |
| | TEM-1(M69T) | 0.03 ± 0.02 | 25 (↓) |
| | cTEM-18m(M69T) | 0.06 ± 0.02 | 12 (↓) |
| | cTEM-2m | 0.02 ± 0.01 | 37 (↓) |
| | cTEM-19m [*] | 0.01 ± 0.002 | 74 (↓) |
| PSE-4 ^a | 0.03 ± 0.01 | 25 (↓) | |

^a The Met68Leu variants k_{cat} are presented in **Table A3.VIII**.

^b Data from Clouthier *et al.* (Clouthier et al., 2012)

^c k_{cat} (apparent) due to saturation at a substrate concentration $\geq 5 \mu\text{M}$.

While TEM-1 is considered as a penicillinase and early-generation cephalosporinase, and PSE-4 as a carbenicillinase (Bush and Jacoby, 2009), they differ minimally for kinetics of penicillin hydrolysis. Their distinction comes mostly from a 5-fold greater k_{cat} for carbenicillin hydrolysis by PSE-4 accompanied by a 25- to 105-fold lower k_{cat} for cephalosporin hydrolysis (**Table 4.I**: k_{cat} values). Overall, substitutions Met68Leu, Met69Thr and Met68Leu/Met69Thr (cTEM-2m) had little impact on hydrolysis of penicillins. This confirms that all members of this β -lactamase system are catalytically competent and that these mutations do not influence the carbenicillinase activity of PSE-4. However, Met68Leu/Met69Thr progressively decreased the k_{cat} of cephalosporin hydrolysis (9- to 75-fold) from a TEM-1-like to a PSE-4-like k_{cat} , with a small decrease in K_M (2- to 7-fold), regardless of the identity of residues 150-190 (**Table A3.VIII** : Complete kinetic dataset). Thus, the substitutions Met68Leu/Met69Thr influence cephalosporin hydrolysis and procure PSE-4-like kinetic properties to TEM-1.

Met69Thr was the main contributor to those kinetic changes. By deconvolution (**Figure 4.1**), we observed that this substitution reduced k_{cat} up to 80-fold whether in TEM-1 or in cTEM-17m while also reducing K_M up to 40-fold (**Table A3.VIII**). Because k_{cat} and K_M were generally both reduced, catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) changed little. The Met68Leu substitution had little effect on the kinetics of TEM-1 or cTEM-17m (< 6-fold variation, with the exception of a 12-fold decrease in k_{cat}^{CTX}).

DISCUSSION

The evolution of clinical variants of β -lactamases as well as their laboratory evolution, have demonstrated a high tolerance to isolated (Deng et al., 2012; Stiffler et al., 2015) and simultaneous substitutions (Clouthier et al., 2012; De Wals et al., 2009; Meyer et al., 2003) particularly during acquisition of new function, *i.e.* hydrolysis of non-native substrates such as third-generation cephalosporins (Dellus-Gur et al., 2015; Miton and Tokuriki, 2016; Weinreich et al., 2006). Those studies have revealed epistatic effects between substitutions that may rely on long-range interactions within the protein, or where alterations in protein dynamics may influence function.

The continuum of fast-to-slow dynamics in the β -lactamase system. We investigated the function/structure/dynamics relation on the entire ps to ms timescale in a model of β -lactamase evolution. The interrelated system of chimeric β -lactamases stems from the recombination of the PSE-4 carbenicillinase and its more recently evolved homolog, TEM-1 penicillinase (Choury et al., 2000). At the fastest timescale of motions (ps-ns), the native TEM-1 and PSE-4 and the three chimeras exhibited a conservation of core rigidity with modest surface loop dynamics (**Figure 4.3**) (Clouthier et al., 2012; Doucet et al., 2004; Gobeil et al., 2014). The intermediate timescale of motions (ns- μ s) held less dynamic residues yet included a “dynamic personality”: the mildly dynamic surface loops in TEM-1 were less so in the three chimeras and were virtually rigid in PSE-4. Thus, the chimeras adopted dynamics that are intermediate between those of TEM-1 and PSE-4, and mostly resemble the closer homolog, TEM-1. On the slowest timescale (μ s to ms), the two native homologs once again exhibited very few dynamic residues (Gobeil et al., 2014), while dramatic changes were observed in the chimeras. First, extensive dynamics appeared within the protein core. Second, the substitution of residues 68-69 and/or substitution of 17 residues in the 150-190 region resulted in blatant and widespread increases in slow dynamics. Finally, the high standard deviations observed on the faster timescales, suggestive of slower motions, were validated by observation of motions on the slower timescales such that a continuum of motions was observed.

In the first recombined region 66-73, the catalytic Ser70 was not assigned by NMR in any of the proteins due to resonance broadening. This is consistent with conserved dynamics slower than the ms at this key residue in all proteins under study (Kleckner and Foster, 2011; Marion, 2013; Mittermaier and Kay, 2009). In cTEM-2m and PSE-4, slow dynamics observed on the neighboring substituted Met69Thr and Thr71 corroborate this slow motion. In cTEM-17m and cTEM-19m, the slow dynamics extended from residue 69 through 73, demonstrating that substitutions between residues 150-190 modulated dynamics near Ser70. Similarly, the second recombined region 150-190 was mostly rigid on the ps to μ s timescales. Nonetheless the leading hinge and tip of the Ω -loop were dynamic, as previously predicted (Bos and Pleiss, 2009; Fiset et al., 2010; Morin and Gagné, 2009), while procuring rigidity to the catalytic Glu166. Only on the slow timescale were motions of catalytic residues observed in cTEM-

17m and cTEM-19m, including that of Glu166. Overall, variations in slow motions in both recombined regions were functionally tolerated.

The most striking instance of variations in dynamics was in active-site wall 234-244. Although rigid on the fast and intermediate timescales in all proteins under study, its moderately elevated RMSF or above-average standard deviation in cTEM-19m and cTEM-17m, respectively, hinted at new slow dynamics. Consequently, this entire wall was unassigned and slow dynamics were observed in flanking residues. Thus, the 17 substitutions in the Ω -loop region modified motions on this wall. Interestingly, substitutions 68-69 also modified slow dynamics of that wall. Residues 234-244 were assigned in cTEM-2m, yet dynamic on the μ s-ms timescale. Since the spatial relation between wall 234-244 and both sets of substitutions is different (**Figure 4.1 C**), we demonstrate that different events near this active-site wall trigger different, new slow motions consistent with native-like function. We note that the main cluster of dynamic residues in cTEM-2m is near a crystallographic water molecule (wat519) located at the tip of Thr69, filling the space created by the Met69Thr substitution. This water bridge between Thr69 and Arg244 may contribute to transmitting information from the site of mutation to the site of new dynamics in cTEM-2m.

Within the domain connector region (residues 214-225), ps to μ s dynamics characterized wall 214-218 of TEM-1, contrary to PSE-4. In the chimeras, that wall has conserved TEM-1-like dynamics. As above, both the substitution of 68-69 and of 17 residues in the 150-190 region increased the intermediate timescale motions. However, the combination of the 19 substitutions attenuated those motions, suggesting a compensatory impact of the recombined regions on this active-site wall. Modest slow dynamics in TEM-1 were extended to neighboring residues in cTEM-2m, and were greatly amplified in cTEM-17m and cTEM-19m with many residues unassignable. Similarly, Tyr105 of the gatekeeper wall exhibited slow dynamics only in the three chimeras, again indicating that new dynamics resulted from either of the substitutions. The SDN wall showed slightly increased slow dynamics in cTEM-2m, higher dynamics in cTEM-17m and more yet in cTEM-19m. Overall, a variety of slow dynamic patterns were observed throughout all faces of the active site as a result of the recombinations.

Two further observations came to light upon aligning the motions over the 3 observed timescales (**Figure 4.5**). First, the greatest dynamic changes occurred outside of the substituted

regions. Second, the dynamics on each timescale varied significantly for any given residue. We thus directly observe that one cannot extrapolate residue dynamics to timescales that have not been probed.

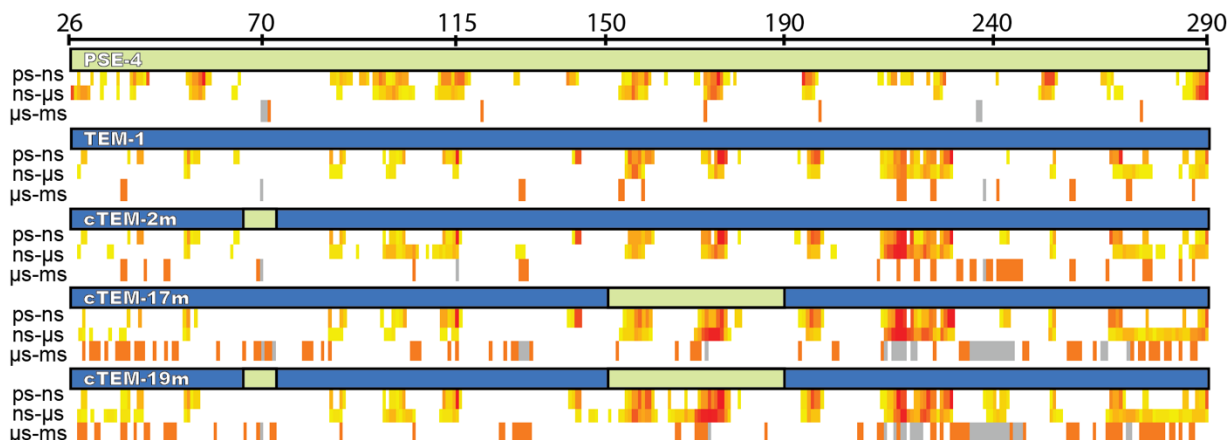


Figure 4.5. Distribution of motions in the β -lactamases over the 3 observed timescales in relation to the linear sequence.

The sequence blocks originating from TEM-1 (blue) and PSE-4 (green) are colored in cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m on a blue/green scheme according to their parental origin (as in **Figure 1**). The ps to ms motions are colored as in **Figure 3**.

Intriguingly, in all but one case where residue assignment and NMR observables allowed, the global exchange rate (k_{ex}) was conserved in each of the active-site walls, regardless of the recombinations. We were surprised that the frequency of slow motions did not vary more in the different sequence contexts, in particular in cTEM-17m and cTEM-19m where neighboring unassigned residues were indicative of new motions slower than the millisecond. The exception was a 4-fold difference in the global k_{ex} observed between Y105 walls of cTEM-17m and cTEM-19m, which may be functionally significant (*vide infra*). We emphasize that, while the slow motions observed by CPMG NMR (all between 300 s^{-1} and $2,000\text{ s}^{-1}$) occurred at a rate comparable to turnover of the natural substrate benzylpenicillin (TEM-1 $k_{cat}^{BZ} = 450\text{ s}^{-1}$), catalytic efficiency was largely conserved and slow dynamic variations were tolerated; fast dynamics, however, were essentially conserved throughout this evolutionary path. The rate-limiting step for penicillin hydrolysis is the deacylation step (Christensen et al., 1990). Because hydrolytic efficiency was similar for all enzymes while

slow dynamic differs, the late steps of catalysis are independent of slow dynamics. In contrast, the rate-limiting step for hydrolysis of the bulkier cephalosporins is the acylating step (Page, 2008; Saves et al., 1995), therefore we conclude that the slow dynamics may have a functional impact on the rate-limiting acylating step in the catalytic mechanism (**Table 4.I**). Rather than negating the relevance of dynamics to enzyme function (Warshel and Bora, 2016), this underscores the importance of probing motions over multiple timescales to fully comprehend their effects on enzyme function and eventually permit engineering of motions. Ideally, all timescales should be treated as a continuum of motions: as previously observed for adenylate kinase, ps to ns motions may facilitate larger-scale, slower motions occurring on the timescale of function (Henzler-Wildman et al., 2007).

Protein motions in a model of evolution. Mapping the dynamics of these interrelated β -lactamases provides a unique insight into patterns of dynamic conservation and tolerance to changes in dynamics, in a model of evolution. We demonstrate that variations in dynamics can be functionally tolerated in class A β -lactamases: all observed slow dynamic variations are compatible with native-like catalytic function toward penicillins yet may be linked to the altered catalytic turnover of the bulkier cephalosporins. Specifically, the new slow motions observed near Y105 of the chimeras may modulate cephalosporin hydrolysis. In contrast to the native TEM-1, where the minor *m* conformer of Tyr105 is thought to stabilize binding of the penicillin substrate BZ but not of the cephalosporin substrate CF (Díaz et al., 2003; Díaz et al., 2005), the atypical *m-30*^o conformation was observed in the structures of cTEM-17m and cTEM-19m. They differ significantly in their frequency of motions (k_{ex}) in that region. These structural and dynamic changes in the gate-keeping Tyr105 region may underlie altered cephalosporin hydrolysis.

As previously asked, does tolerance to changes in dynamics at a rate comparable to turnover provide evolvability? (Tokuriki and Tawfik, 2009) Our system of artificially evolved chimeric enzymes mimics natural recombination, representing potential intermediates over an evolutionary path from TEM-1 to PSE-4. The chimeras displayed native-like rigidity accompanied by a pattern of specific motions on the fast and intermediate timescales, consistent with their importance toward reactivity. In parallel, we speculate that the observed tolerance to a variety of slow active-site dynamics may facilitate evolution and promote

functional diversity, particularly substrate promiscuity in the case of this class of highly evolvable antibiotic resistance enzymes. It is striking that all three chimeras inspected exhibited important, different patterns of slow dynamics, which may constitute a mechanism of natural evolution in β -lactamases. Our results are strikingly similar to a recent report of point mutations in *Bacillus cereus* metallo- β -lactamase II: in that model of evolution, fast dynamics were conserved and important variations in slow active-site dynamics were observed (Gonzalez et al., 2016). As in natural evolution, features that favor evolvability may be transient. In another model, evolution of a bacterial phosphotriesterase into an arylesterase revealed links between changing protein dynamics and specialization toward one function to the detriment of the other. Crystallographic B-factors and short MD-simulations of variants over the evolutionary path demonstrated that some regions adopted new dynamics to test out conformations, later stabilizing the most productive conformations with further evolution, while other regions became more rigid (Campbell et al., 2016). Similarly, the new, slow dynamics observed in the chimeras could potentially become attenuated upon further evolution with the introduction of stabilizing mutations, locking in beneficial mutations while regaining a native-like rigidity. Indeed, the modern-day TEM-1 is thought to have a more rigid catalytic pocket than ancestral β -lactamases as a consequence of TEM-1 evolving to become more of a ‘specialist’ than the more ‘generalist’ ancient β -lactamases (Zou et al., 2015). We do not yet understand the underlying mechanism relating those motions to function. While this system is advantageous by being functionally promiscuous and diverse in homologs, current methodologies preclude ready inclusion of substrates in crystal structures and in NMR, limiting the depth of our mechanistic comprehension. Our robust MD simulations pave the way to inclusion of substrates in simulations that will eventually reach the timescale of turnover. Because evolution depends on function, the observation of conserved fast dynamics supports the importance of dynamics in function. The slow dynamic variation we have observed may serve to promote functional diversity: β -lactamases are specialized (and secondary) metabolic enzymes that respond to environmental stress to ensure bacterial survival. In contrast to enzymes of primary metabolism that have a lower requirement for constant evolution (Mukherjee et al., 2016), bacterial resistance enzymes require greater adaptability to the consequences of sequence variation.

SIGNIFICANCE

Proteins are life-sustaining, flexible molecules, yet the impact of their motions on their function is still poorly understood. A barrier to our understanding is characterizing motions that occur over a wide variety of timescales, generally ranging from the picosecond to the second.

Here, we have quantified the function and the motions of a close family of β -lactamase enzymes that was built to resemble an evolutionary path. By comparing those properties among the similar β -lactamases, we revealed linkages between motions and function. Importantly, distinct methodologies allowed us to examine a continuum of timescales ranging from the fast picosecond to the slower millisecond. The slow timescale coincides with the rate of the overall β -lactamase reaction while the faster timescales encompass each of the catalytic steps. Two naturally-occurring β -lactamases show similar rigidity at all timescales examined. Their recombination yielded three ‘chimeric’ β -lactamases where fast motions (ps to μ s timescale) were conserved in each of these functional enzymes, consistent with a functional importance. On the contrary, they exhibited diverse motions at the slowest timescale (μ s to ms timescale). Interestingly, the slow motions in the three chimeras were different yet all chimeras exhibited native-like turnover of the natural substrate benzylpenicillin. Hydrolysis of the bulkier cephalosporins was altered, suggesting that slow dynamics may have a functional impact on the rate-limiting acylation. Our work highlights the importance of specifically addressing different timescales when observing protein motions and describes methodology that is applicable to observing the function/dynamics relationship in numerous protein systems.

METHODS

Protein expression and purification was performed as previously reported (Clouthier et al., 2012; Gobeil et al., 2014; Gobeil et al., 2015; Morin et al., 2010; Morin et al., 2006). Crystals were grown at 22°C in hanging drops with a 1:1 ratio of the protein and reservoir solutions. Diffraction data were collected at the Canadian Macromolecular Crystallography Facility Beamline 08ID-1 or with a Rigaku MicroMax 007 HF X-ray generator and a Rigaku

Saturn 944 HG CCD detector. Initial phases were calculated by molecular replacement, with PDB 1ZG4 (Stec et al., 2005). Iterative rounds of manual model building were performed. **Table A3.I** summarizes the data collection and refinement statistics. The active-site volume was estimated using 3V: Voss Volume Voxelator (Voss and Gerstein, 2010). For energy minimization, MD simulations and analysis, GROMACS 5.0.1 was used with the AMBER99SB-ILDN force field (Abraham et al., 2015; Lindorff-Larsen et al., 2010). Three 2 μ s simulations with 1 ps compressed and 100 ps full precision trajectories for each of the five proteins was acquired. S^2 order parameters were calculated applying the model-free approach (Lipari and Szabo, 1982a; Lipari and Szabo, 1982b). The $C\alpha$ -RMSF was calculated for each residue and converted into B-factors. NMR experiments were performed as previously reported (Gobeil et al., 2014; Gobeil et al., 2015). [^{15}N] and [$^2\text{H}, ^{15}\text{N}$]-labeled samples were characterized using ^{15}N TROSY relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill (rcCPMG) experiments (Loria et al., 1999) on Agilent 800 MHz, 600 MHz and 500 MHz NMR spectrometers calibrated to 31.5°C. Residue fits and model analyses were performed using the full single-quantum ^{15}N -CPMG equation (Manley and Loria, 2012). Substrate hydrolysis was monitored according to initial steady-state velocities. More experimental details can be found in **Annexe 3**.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Meyer and F. Arnold for the original cTEM-19m construct; T. Sprules and S. Al-Abdul-Wahid (Québec/Eastern Canada High Field NMR Facility) and M. Osborne (IRIC Biophysics Research Facilities). Computational resources were provided by Calcul Québec and Compute Canada. This work was supported by NSERC Discovery Grants 227853 (J.N.P) and 2016-07555 (N.D.), and NIH award R01GM105978 (N.D.). S.G. is a FRQ-NT Graduate Scholar, M.E. a NSERC Vanier Canada Graduate Scholar and D.G. a NSERC Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholar. N.D. holds a FRQ-S Research Scholar Junior 2 Career Award.

DATA DEPOSITION

The atomic coordinates have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org, under the accession codes 4MEZ (cTEM-2m), 4R4R and 4R4S (cTEM-19m).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.G., M.E, J. Pleiss, N.D. and J.N.P. designed research; S.G., M.E. and J. Park performed research; S.G., M.E. J. Park, D.G and A. B. analyzed data; S.G. and J.N.P wrote the paper assisted by all other authors.

REFERENCES

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1-2, 19-25.
- Agarwal, P.K. (2006). Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microb Cell Fact* 5, 2.
- Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., and Waley, S.G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 276 (Pt 1), 269-270.
- Bhabha, G., Ekiert, D.C., Jennewein, M., Zmasek, C.M., Tuttle, L.M., Kroon, G., Dyson, H.J., Godzik, A., Wilson, I.A., and Wright, P.E. (2013). Divergent evolution of protein conformational dynamics in dihydrofolate reductase. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1243-1249.
- Bhabha, G., Lee, J., Ekiert, D.C., Gam, J., Wilson, I.A., Dyson, H.J., Benkovic, S.J., and Wright, P.E. (2011). A dynamic knockout reveals that conformational fluctuations influence the chemical step of enzyme catalysis. *Science* 332, 234-238.
- Boehr, D.D., McElheny, D., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2010). Millisecond timescale fluctuations in dihydrofolate reductase are exquisitely sensitive to the bound ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1373-1378.
- Bos, F., and Pleiss, J. (2009). Multiple molecular dynamics simulations of TEM beta-lactamase: dynamics and water binding of the omega-loop. *Biophys J* 97, 2550-2558.
- Bush, K., and Jacoby, G.A. (2009). Updated Functional Classification of -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 969-976.
- Campbell, E., Kaltenbach, M., Correy, G.J., Carr, P.D., Porebski, B.T., Livingstone, E.K., Afriat-Jurnou, L., Buckle, A.M., Weik, M., Hollfelder, F., *et al.* (2016). The role of protein dynamics in the evolution of new enzyme function. *Nature Chemical Biology*.
- Choury, D., Szajnert, M.F., Joly-Guillou, M.L., Azibi, K., Delpech, M., and Paul, G. (2000). Nucleotide Sequence of the blaRTG-2 (CARB-5) Gene and Phylogeny of a New Group of Carbenicillinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1070-1074.

- Christensen, H., Martin, M.T., and Waley, S.G. (1990). Beta-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl-enzyme mechanism. *Biochem J* 266, 853-861.
- Clouthier, C.M., Morin, S., Gobeil, S.M., Doucet, N., Blanchet, J., Nguyen, E., Gagné, S.M., and Pelletier, J.N. (2012). Chimeric beta-lactamases: global conservation of parental function and fast time-scale dynamics with increased slow motions. *PLoS one* 7, e52283.
- De Wals, P.Y., Doucet, N., and Pelletier, J.N. (2009). High tolerance to simultaneous active-site mutations in TEM-1 beta-lactamase: Distinct mutational paths provide more generalized beta-lactam recognition. *Protein Sci* 18, 147-160.
- Dellus-Gur, E., Elias, M., Caselli, E., Prati, F., Salverda, M.L., de Visser, J.A., Fraser, J.S., and Tawfik, D.S. (2015). Negative Epistasis and Evolvability in TEM-1 beta-Lactamase-The Thin Line between an Enzyme's Conformational Freedom and Disorder. *J Mol Biol* 427, 2396-2409.
- Deng, Z., Huang, W., Bakalbasi, E., Brown, N.G., Adamski, C.J., Rice, K., Muzny, D., Gibbs, R.A., and Palzkill, T. (2012). Deep sequencing of systematic combinatorial libraries reveals beta-lactamase sequence constraints at high resolution. *J Mol Biol* 424, 150-167.
- Díaz, N., Sordo, T.L., Merz, K.M., and Suárez, D. (2003). Insights into the Acylation Mechanism of Class A β -Lactamases from Molecular Dynamics Simulations of the TEM-1 Enzyme Complexed with Benzylpenicillin. *Journal of the American Chemical Society* 125, 672-684.
- Díaz, N., Suárez, D., Merz, K.M., and Sordo, T.L. (2005). Molecular Dynamics Simulations of the TEM-1 β -Lactamase Complexed with Cephalothin. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 780-791.
- Doucet, N., De Wals, P.Y., and Pelletier, J.N. (2004). Site-saturation mutagenesis of Tyr-105 reveals its importance in substrate stabilization and discrimination in TEM-1 beta-lactamase. *J Biol Chem* 279, 46295-46303.
- Doucet, N., and Pelletier, J.N. (2007). Simulated annealing exploration of an active-site tyrosine in TEM-1 beta-lactamase suggests the existence of alternate conformations. *Proteins* 69, 340-348.
- Eisenmesser, E.Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D.M., Wolf-Watz, M., Bosco, D.A., Skalicky, J.J., Kay, L.E., and Kern, D. (2005). Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature* 438, 117-121.
- Fisette, O., Morin, S., Savard, P.Y., Lagüe, P., and Gagné, S.M. (2010). TEM-1 backbone dynamics-insights from combined molecular dynamics and nuclear magnetic resonance. *Biophys J* 98, 637-645.
- Fonze, E., Charlier, P., To'th, Y., Vermeire, M., Raquet, X., Dubus, A., and Frere, J.M. (1995). TEM1 beta-lactamase structure solved by molecular replacement and refined structure of the S235A mutant. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 51, 682-694.
- Francis, K., Stojkovic, V., and Kohen, A. (2013). Preservation of protein dynamics in dihydrofolate reductase evolution. *J Biol Chem* 288, 35961-35968.
- Fraser, J.S., Clarkson, M.W., Degnan, S.C., Erion, R., Kern, D., and Alber, T. (2009). Hidden alternative structures of proline isomerase essential for catalysis. *Nature* 462, 669-673.
- Frauenfelder, H., and McMahon, B. (1998). Dynamics and function of proteins: the search for general concepts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4795-4797.

- Gagné, D., Charest, L.A., Morin, S., Kovrigin, E.L., and Doucet, N. (2012). Conservation of flexible residue clusters among structural and functional enzyme homologues. *J Biol Chem* 287, 44289-44300.
- Gagné, D., and Doucet, N. (2013). Structural and functional importance of local and global conformational fluctuations in the RNase A superfamily. *FEBS J* 280, 5596-5607.
- Gagné, D., French, R.L., Narayanan, C., Simonovic, M., Agarwal, P.K., and Doucet, N. (2015). Perturbation of the Conformational Dynamics of an Active-Site Loop Alters Enzyme Activity. *Structure* 23, 2256-2266.
- Gibbs, A.C. (2014). Elements and modulation of functional dynamics. *J Med Chem* 57, 7819-7837.
- Gobeil, S.M., Clouthier, C.M., Park, J., Gagné, D., Berghuis, A.M., Doucet, N., and Pelletier, J.N. (2014). Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins. *Chemistry & biology*.
- Gobeil, S.M., Gagné, D., Doucet, N., and Pelletier, J.N. (2015). N, C and H backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 class A beta-lactamase chimera and its deconvoluted mutant. *Biomol NMR Assign*.
- Gonzalez, M.M., Abriata, L.A., Tomatis, P.E., and Vila, A.J. (2016). Optimization of Conformational Dynamics in an Epistatic Evolutionary Trajectory. *Mol Biol Evol*.
- Henzler-Wildman, K., and Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature* 450, 964-972.
- Henzler-Wildman, K.A., Lei, M., Thai, V., Kerns, S.J., Karplus, M., and Kern, D. (2007). A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* 450, 913-916.
- Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J.M., and Samama, J.P. (1993). Crystal structure of Escherichia coli TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins* 16, 364-383.
- Keskin, O., Jernigan, R.L., and Bahar, I. (2000). Proteins with similar architecture exhibit similar large-scale dynamic behavior. *Biophys J* 78, 2093-2106.
- Kleckner, I.R., and Foster, M.P. (2011). An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1814, 942-968.
- Klinman, J.P. (2015). Dynamically Achieved Active Site Precision in Enzyme Catalysis. *Accounts of Chemical Research* 48, 449-456.
- Lim, D., Sanschagrin, F., Passmore, L., De Castro, L., Levesque, R.C., and Strynadka, N.C.J. (2001). Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies. *Biochemistry* 40, 395-402.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., and Shaw, D.E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78, 1950-1958.
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982a). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *Journal of the American Chemical Society* 104, 4559-4570.
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982b). Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity. *Journal of the American Chemical Society* 104, 4546-4559.
- Liu, Y., and Bahar, I. (2012). Sequence evolution correlates with structural dynamics. *Mol Biol Evol* 29, 2253-2263.

- Loria, J.P., Rance, M., and Palmer, A.G., 3rd (1999). A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins. *Journal of biomolecular NMR* *15*, 151-155.
- Lovell, S.C., Word, J.M., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2000). The penultimate rotamer library. *Proteins* *40*, 389-408.
- Maguid, S., Fernandez-Alberti, S., and Echave, J. (2008). Evolutionary conservation of protein vibrational dynamics. *Gene* *422*, 7-13.
- Manley, G., and Loria, J.P. (2012). NMR insights into protein allostery. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *519*, 223-231.
- Marion, D. (2013). An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol Cell Proteomics* *12*, 3006-3025.
- Meroueh, S.O., Roblin, P., Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S.B., Zhang, Y., Samama, J.P., and Mobashery, S. (2002). Molecular dynamics at the root of expansion of function in the M69L inhibitor-resistant TEM beta-lactamase from *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* *124*, 9422-9430.
- Meyer, M.M., Hochrein, L., and Arnold, F.H. (2006). Structure-guided SCHEMA recombination of distantly related beta-lactamases. *Protein Eng Des Sel* *19*, 563-570.
- Meyer, M.M., Silberg, J.J., Voigt, C.A., Endelman, J.B., Mayo, S.L., Wang, Z.G., and Arnold, F.H. (2003). Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination. *Protein Sci* *12*, 1686-1693.
- Minasov, G., Wang, X., and Shoichet, B.K. (2002). An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J Am Chem Soc* *124*, 5333-5340.
- Miton, C.M., and Tokuriki, N. (2016). How mutational epistasis impairs predictability in protein evolution and design. *Protein Sci*.
- Mittermaier, A.K., and Kay, L.E. (2009). Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. *Trends Biochem Sci* *34*, 601-611.
- Morin, S., Clouthier, C.M., Gobeil, S., Pelletier, J.N., and Gagné, S.M. (2010). Backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 Class A beta-lactamase chimera. *Biomol NMR Assign* *4*, 127-130.
- Morin, S., and Gagné, S.M. (2009). NMR dynamics of PSE-4 beta-lactamase: an interplay of ps-ns order and mus-ms motions in the active site. *Biophys J* *96*, 4681-4691.
- Morin, S., Levesque, R.C., and Gagné, S.M. (2006). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N backbone resonance assignments for PSE-4, a 29.5 kDa class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of biomolecular NMR* *36 Suppl 1*, 11.
- Mukherjee, D., Mukherjee, A., and Ghosh, T.C. (2016). Evolutionary Rate Heterogeneity of Primary and Secondary Metabolic Pathway Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology and Evolution* *8*, 17-28.
- Packer, M.S., and Liu, D.R. (2015). Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics* *16*, 379-394.
- Page, M.G.P. (2008). Extended-spectrum β -lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clinical Microbiology and Infection* *14*, 63-74.
- Ramanathan, A., and Agarwal, P.K. (2011). Evolutionarily conserved linkage between enzyme fold, flexibility, and catalysis. *PLoS Biol* *9*, e1001193.

- Ramanathan, A., Savol, A., Burger, V., Chennubhotla, C.S., and Agarwal, P.K. (2014). Protein conformational populations and functionally relevant substates. *Acc Chem Res* *47*, 149-156.
- Savard, P.Y., and Gagné, S.M. (2006). Backbone dynamics of TEM-1 determined by NMR: evidence for a highly ordered protein. *Biochemistry* *45*, 11414-11424.
- Savard, P.Y., Sosa-Peinado, A., Levesque, R.C., Makinen, M.W., and Gagné, S.M. (2004). ¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone resonance assignments for TEM-1, a 28.9 kDa beta-lactamase from *E. coli*. *Journal of biomolecular NMR* *29*, 433-434.
- Saves, I., Burlet-Schiltz, O., Maveyraud, L., Samama, J.-P., Prome, J.-C., and Masson, J.-M. (1995). Mass Spectral Kinetic Study of Acylation and Deacylation During the Hydrolysis of Penicillins and Cefotaxime by .beta.-Lactamase TEM-1 and the G238S Mutant. *Biochemistry* *34*, 11660-11667.
- Stec, B., Holtz, K.M., Wojciechowski, C.L., and Kantrowitz, E.R. (2005). Structure of the wild-type TEM-1 beta-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *61*, 1072-1079.
- Stiffler, M.A., Hekstra, D.R., and Ranganathan, R. (2015). Evolvability as a function of purifying selection in TEM-1 beta-lactamase. *Cell* *160*, 882-892.
- Swarn, P., Golemi, D., Cabantous, S., Bulychev, A., Maveyraud, L., Mobashery, S., and Samama, J.P. (1999). X-ray structure of the Asn276Asp variant of the *Escherichia coli* TEM-1 beta-lactamase: direct observation of electrostatic modulation in resistance to inactivation by clavulanic acid. *Biochemistry* *38*, 9570-9576.
- Tokuriki, N., and Tawfik, D.S. (2009). Protein dynamism and evolvability. *Science* *324*, 203-207.
- van den Bedem, H., and Fraser, J.S. (2015). Integrative, dynamic structural biology at atomic resolution--it's about time. *Nat Methods* *12*, 307-318.
- Voigt, C.A., Martinez, C., Wang, Z.G., Mayo, S.L., and Arnold, F.H. (2002). Protein building blocks preserved by recombination. *Nat Struct Biol* *9*, 553-558.
- Voss, N.R., and Gerstein, M. (2010). 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acids Research* *38*, W555-W562.
- Warshel, A., and Bora, R.P. (2016). Perspective: Defining and quantifying the role of dynamics in enzyme catalysis. *J Chem Phys* *144*, 180901.
- Weinreich, D.M., Delaney, N.F., Depristo, M.A., and Hartl, D.L. (2006). Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science* *312*, 111-114.
- Zou, T., Risso, V.A., Gavira, J.A., Sanchez-Ruiz, J.M., and Ozkan, S.B. (2015). Evolution of conformational dynamics determines the conversion of a promiscuous generalist into a specialist enzyme. *Mol Biol Evol* *32*, 132-143.

Préface au chapitre 5.

Le prochain chapitre présente un manuscrit qui est actuellement en préparation pour soumission prochaine à la revue « Cell Biophysical Journal ». Cet article présente deux nouvelles structures cristallines de la protéine cTEM-19m qui ont été obtenues en présence du ligand benzylpénicilline. Néanmoins, aucune densité électronique correspondant à ce substrat n'a été observée au niveau du site actif de la protéine. Toutefois, les deux structures cristallines obtenues dans des conditions cristallographiques similaires montrent des variations structurales importantes au niveau des conformères adoptés par les chaînes latérales de plusieurs résidus impliqués dans la catalyse et la stabilisation du substrat.

Afin de vérifier si ces conformères sont « réels » ou plutôt liés à des artefacts induits par la cristallisation, nous avons analysé les données de dynamique moléculaire, présentée au Chapitre 4, afin de vérifier si ces conformères sont observables au cours des 6 μ s de simulation. Nous avons généré une analyse des ensembles structuraux adoptés par la chimère cTEM-19m et comparé ceux-ci aux enzymes natives TEM-1 et PSE-4 ainsi qu'aux chimères cTEM-2m et cTEM-17m. Nos résultats montrent que cTEM-19m, contrairement aux autres chimères, a adopté plusieurs conformations uniquement observées chez PSE-4. Les résultats présentés ici démontrent l'importance de considérer l'utilisation de courte simulation de dynamique moléculaire permettant de générer des ensembles structuraux, plutôt que d'interpréter directement une structure cristallographique lorsqu'il s'agit de déterminer l'importance de conformères envers la fonction d'une protéine.

Ce manuscrit en préparation sera à contribution égale entre moi et M. Ebert. Les travaux constituant ce manuscrit ont été effectués sous la direction de professeur J. Pelletier. Ma contribution à cet article a, dans un premier temps, été au niveau de l'obtention des structures cristallines. J'ai de plus contribué à l'analyse des données, la rédaction du manuscrit et à la préparation des figures constituant le manuscrit préliminaire actuel. Mon rôle pour cet article est aussi au de cibler les différents aspects expérimentaux à traiter afin de lier entre elles les expériences de biologie structurale (cristallographie) aux expériences de dynamique moléculaire. Mon collègue M. Ebert a quant à lui contribué par la réalisation des simulations de dynamique moléculaire, sous la direction de J. Pleiss et J. Pelletier, puis en la réalisation d'analyses permettant de répondre aux questions soulevées par l'analyse des structures

cristallographiques de la protéine cTEM-19m. M. Ebert a aussi contribué à l'analyse des données, à la rédaction de l'article et à la préparation des figures constituant le manuscrit actuel. Finalement, Dr. J. Park, sous la direction de professeur A.M. Berghuis, a contribué à cet article par la création des modèles structuraux de la protéine cTEM-19m. Il a aussi été de conseil afin de me permettre de réaliser les essais de cristallisation.

Le manuscrit actuel présente les données de structure cristalline, des analyses des simulations de dynamique moléculaire révélant les angles ϕ et ψ par résidu (graphique de Ramachandran), les orientations adoptées par la boucle 214-220 ainsi que les ensembles de conformères adoptés au cours des 6 μ s de simulation et ce, pour chacune des protéines du système composé des β -lactamases TEM-1 et PSE-4 natives et chimériques. Des analyses des corrélations entre les mouvements des différentes régions de ces protéines, des 5 premières composantes principales (PCA) des mouvements et de molécules d'eau impliquées au niveau de la catalyse, seront prochainement incluses par la contribution de M. Ebert à ce manuscrit.

Chapitre 5

Évidences cristallographiques du dynamisme conformationnel des β -lactamases.

5.1. Manuscrit en préparation – Article 4. Crystallographic evidence for dynamic conformational exchange in β - lactamases.

Sophie M.C. Gobeil^{a,b,*}, Maximillian C.C.J.C. Ebert^{a,b,*}, Jaeok Park^{b,c,d}, Albert M. Berghuis^{b,c,d},
Jürgen Pleiss^e and Joelle N. Pelletier^{a,b,f}.

^a Département de biochimie and ^f Département de chimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H3T 1J4

^b PROTEO, the Québec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications, G1V 0A6

^c Department of Biochemistry, McGill University, Montréal, QC, Canada, H3G 1Y6

^d GRASP, Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines, H3G 0B1

^e Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Stuttgart, Germany, 70569

* These authors contributed equally to this work

Article en préparation pour soumission à *Cell Biophysical Journal*.

INTRODUCTION.

β -Lactamase production is the predominant mechanism among many used by Gram-negative bacteria to confer resistance toward the most clinically prescribed class of antimicrobial agents, the β -lactams [1, 2]. More than 1800 unique and naturally occurring β -lactamases, possessing different selectivity toward the recognized β -lactams, have been to this day reported [3]. The Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) and Inhibitor Resistant TEM-like (IRT) β -lactamases incorporate single or few amino acid variations relative to the native enzyme, resulting in hundreds of variants with broader recognition of β -lactams and inhibitors, thereby providing increased resistance against these compounds [4]. This highlights the importance to better understand the subtle effects produced by mutations in these bacterial resistance enzymes.

The class A is the most prevalent of the four subgroups of β -lactamases, which includes over 550 members [5]. The TEM-1 penicillinase was the first identified plasmid-mediated β -lactamase (1963). It is one of the best known members of this family [6, 7] and shares 40% sequence identity with the class A β -lactamase PSE-4, the first carbenicillinase enzyme, isolated from *Pseudomonas aeruginosa* (1969) [8]. Class A β -lactamases share a similar fold constituted of two domains (one all- α and one α/β) with the active site cavity located at their interface (**Figure 5.1**). The active site cavity is defined by several highly conserved structural and functional motifs. They form the active site walls which orient the substrate and promote catalytic activity. These walls are: the S70 wall (residues S⁷⁰xxK⁷³), the SDN wall (residues S¹³⁰D¹³¹N¹³²), the Ω -loop wall (residues E¹⁶⁶xxL¹⁶⁹N¹⁷⁰), the 214-218 wall (residues 214-218) and the 234-244 wall (residues K²³⁴T²³⁵G²³⁶) (**Figure 5.1**) [9]. Residues that constitute those walls but are not directly implicated in the catalytic mechanism tolerate variability towards mutations (**Figure 5.1 C**).

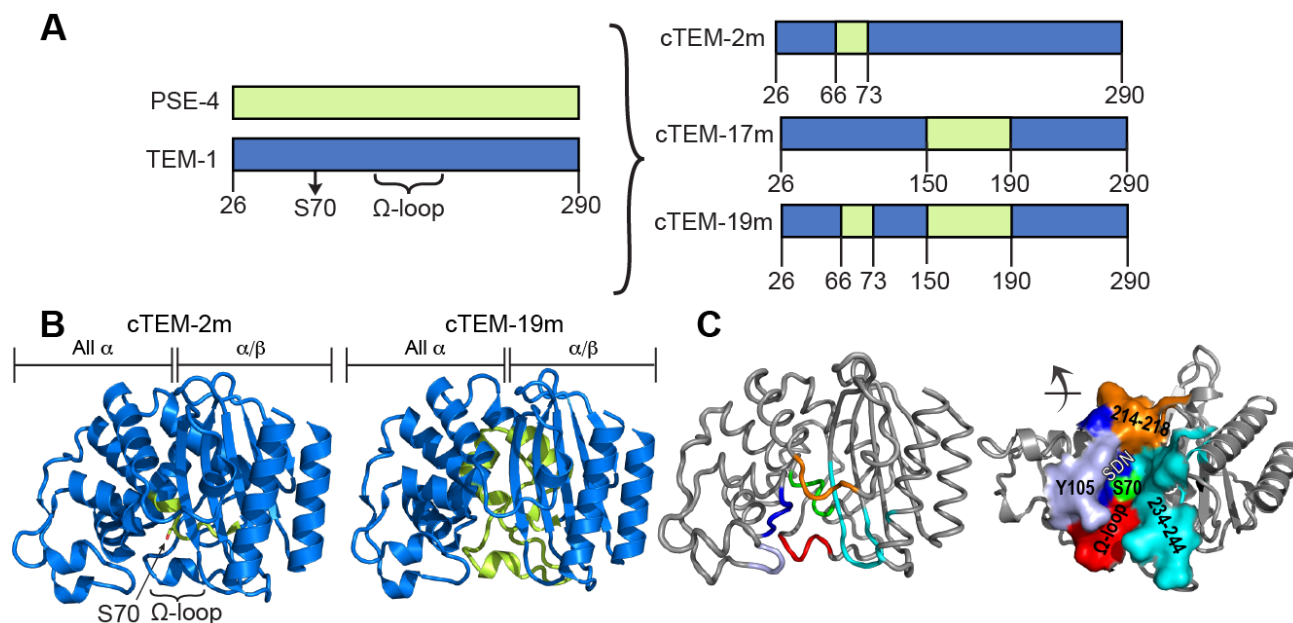


Figure 5.1. Relation of chimeras to the parental class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4.

A. Numbering of the sequence blocks originating from TEM-1 (blue) and PSE-4 (green) in cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m. Numbering according to Ambler [58]. The nomenclature of the chimeras is as follows: ‘c’ indicates chimera, followed by the number of substitutions (or mutations: ‘m’) in each chimera relative to the TEM-1 parental sequence, which shares 40% sequence identity with PSE-4. The catalytic nucleophile, Ser70, and the catalytically relevant Ω -loop, are indicated in the TEM-1 sequence. **B.** Structural representation of the parental origin in chimeras cTEM-2m (PDB 4MEZ) and cTEM-19m (PDB 4QY5), colored as in panel A. The catalytic nucleophile, Ser70 (in sticks) and the catalytically relevant Ω -loop are indicated on the cTEM-2m structure to highlight the hybrid composition of the active-site region located at the interface of the all- α domain (left) and the α/β domain (right). **C.** The active-site walls, set in TEM-1 (PDB 1XPB). Green: S70 wall (Met69-Lys73); lilac, Y105 wall (Val 103-Ser106); dark blue, SDN wall (Met129-Asn132); red, Ω -loop wall (Glu166-Asn170); orange, 214-218 wall (Val214-Gly218); and cyan, 234-244 wall (Lys234-Arg244 + Met272 and Asn276). (Right) The structure is reoriented as indicated by the arrow and the active-site walls are represented by their solvent-accessible surface.

The two-step acylation-deacylation catalytic mechanism is performed by five residues located on different active site walls, and a water molecule (**Figure A4.1**). These are Ser70, the catalytic nucleophile [10], Lys73, proposed to act as a general base to activate Ser70 [11], Ser130, the proton donor in the β -lactam ring opening [12, 13], Glu166, proposed to act as the general base during the acylation and deacylation steps [13, 14], Arg234 (Lys in TEM-1) important for the carbenicillinase specificity of PSE-4 [15] and the deacylating water molecule

coordinated by Glu166 and Asn170 [13, 16, 17]. In addition, the Y105 wall appears to be implicated in a gate-keeping mechanism using Tyr105 side chain [9, 18].

Rearrangements affecting these active site walls as well as shifting water molecules have been reported [19-25]. Among these, Stojanoski *et al.* have shown that a triple mutant of the TEM-1 in the Ω -loop, procuring altered substrate specificity and increased activity toward the bulkier cephalosporin substrate, displayed important structural rearrangements of the active site side-chains and water molecules in the X-ray crystal structure [19]. Furthermore, Stec *et al.* observed residual activity in a TEM-1 variant where the catalytic nucleophile, Ser70, was mutated to Gly, which cannot serve as a nucleophile [20]. Residual activity was explained by the introduction of a new water molecule in the crystallographic structure of the protein, substituting for the missing nucleophilic hydroxyl group.

X-ray crystallography [14, 25-30], NMR [9, 31-33] and theoretical studies [11, 34-42] have characterized the catalytic mechanism of TEM-1, PSE-4 and variants. However, all these reports have considered the proteins in a conformation similar to the crystal structures. Proteins experience a wide range of motions occurring over multiple timescales, both on the backbone and the side-chains. It is thought that the consensus, or lowest energy conformation, is generally frozen in the crystal state of the protein [43]. Previous work using NMR and *in silico* methodologies performed by us and others has shown that the naturally evolved β -lactamases TEM-1 and PSE-4 generally maintain a rigid backbone over the entire ps to ms timescale regime [9, 31, 32, 44-46]. These were previously recombined using the SCHEMA algorithm mimicking the natural process of homologous recombination [47, 48]. To investigate if protein dynamics are modified during evolution, we studied a model system simulating a possible evolutionary path between the β -lactamases TEM-1 and PSE-4. The chimeras under study were selected on the basis of their recombined active-site cavity (**Figure 5.1**) [49]. We have previously characterized the structure, function and backbone dynamics over the entire picosecond to millisecond timescales of three chimeras. A chimera incorporating 17 mutations (cTEM-17m) remained functionally TEM-1-like while two other chimeras, incorporating 2 mutations (cTEM-2m) or 19 mutations (the same 17+2 mutations: cTEM-19m), exhibited an important decrease in the turnover rate of cephalosporins, making them functionally more PSE-4-like (**Figure 5.1 A**) [49, 50]. Using NMR and long *in silico* dynamics simulations on those chimeras, backbone motions over the ps to μ s timescale were

found to be maintained as in the native proteins. However, striking modifications on the μ s-ms timescale of backbone motions, coinciding with the turnover rate of benzylpenicillin, were observed.

In the process of elucidating the structural implication in the shift of dynamics and function of the chimera cTEM-19m, we attempted to crystalize this protein in different catalytic states. We obtained two new crystal structures with strikingly different side-chain conformations in the aforementioned catalytic walls. The crystallization conditions were almost identical, which raises the question as to whether the analysis of a single crystal structure of a variant in this particular system is sufficient to fully comprehend and interpret the functional results.

We hypothesized that crystal structures do not always represent the consensus conformation, but rather contain an undefinable crystallographic bias. Using μ s-long MD trajectories, we generated a large conformational ensemble allowing the determination of a conformational consensus. This ensemble better reconciles the geometric and dynamic implications observed by kinetic data than does the set of crystal structures we have obtained. By these means, we demonstrate that computational methodologies constitute a powerful tool to extract the most information from crystallographic data.

RESULTS AND DISCUSSION.

The ‘parental’ homologous β -lactamases **TEM-1** and **PSE-4** were previously recombined block-wise to yield chimeric β -lactamases [51, 52]. In chimera cTEM-2m, residues 66 to 73 from TEM-1 was exchanged for those of PSE-4. This region constitutes the active-site wall S70 and is one of the two connectors between the all- α and the α/β -domains (**Figure 5.1**). As a result of their high sequence identity, this resulted in two substitutions to the TEM-1 sequence, Met68Leu and Met69Thr, which are the immediate neighbours of the catalytic nucleophile Ser70. Chimera cTEM-17m incorporates residues 150 to 190 from PSE-4. This introduced 17 substitutions relative to the TEM-1 sequence. Region 150-190 forms the Ω -loop active-site wall and its adjacent helices. This active-site wall contains the catalytically relevant Glu166, proposed to serve as a general base in the catalytic acylation and deacylation

steps [53] (**Figure A4.1**). Finally, chimera cTEM-19m combines both of these exchanged regions, resulting in 19 substitutions and a more highly blended active-site cavity.

Analysis of the Backbone Conformations in a Crystallographic Environment.

Based on previous crystallographic attempts revealing that cTEM-19m crystal formation is rapid (within hours), we attempted to crystallize this protein at different stages of the catalytic mechanism. Among many conditions tested, the presence of the native substrate benzylpenicillin gave rise to two new high-resolution structures (PDB 4QY5, resolution of 1.50 Å and PDB 4QY6, resolution of 1.15 Å) (**Table A4.I**). Although no electron density revealing the presence of this ligand was detected, striking structural variations were observed in one of these models (PDB 4QY5) relative to the three other structures of this chimera (4QY6 and the previously reported PDB 4R4R and 4R4S [49]).

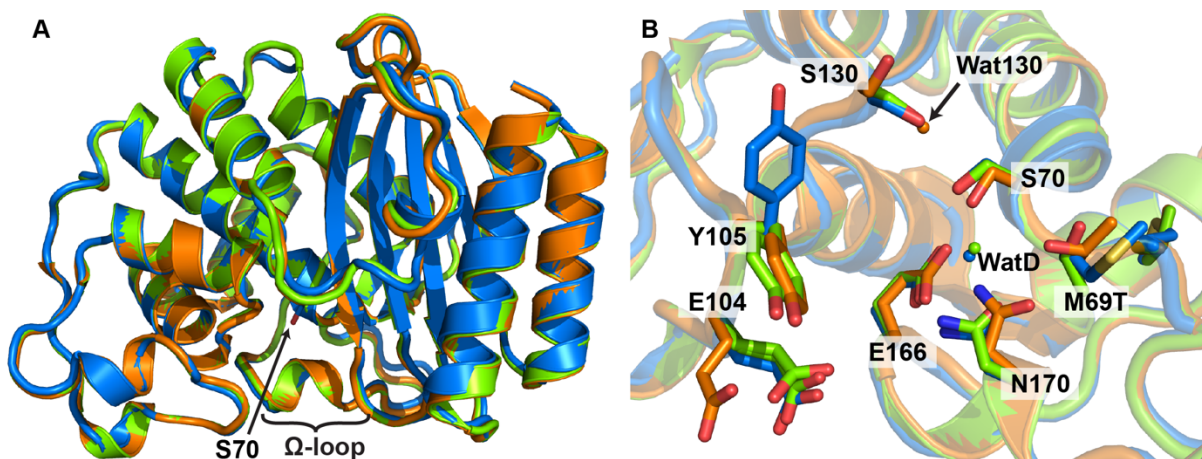


Figure 5.2. Crystal structures of cTEM-19m.

A. Backbone overlay of the crystal structures of TEM-1 (blue, PDB 1XPB) and the chimera cTEM-19m (green; PDB 4QY6 and orange PDB 4QY5) **B.** Active-site view of the overlay of cTEM-19m with TEM-1. Wat130 represents the new water molecule in cTEM-19m at the position of Ser130 hydroxyl moiety and WatD show the deacylating water molecule in TEM-1 (Wat292 in PDB 1XPB) and cTEM-19m (Wat439 in PDB 4QY6). This is also present in the other crystal structures of the protein constituting this system: Wat1046 in TEM-1 PDB 1ZG4, Wat411 in PSE-4 PDB 1G68, Wat454 in cTEM-2m PDB 4MEZ, Wat427 in cTEM-17m PDB 4ID4; Wat430 in cTEM-19m PDB 4R4R and Wat411 in cTEM-19m PDB 4R4S.

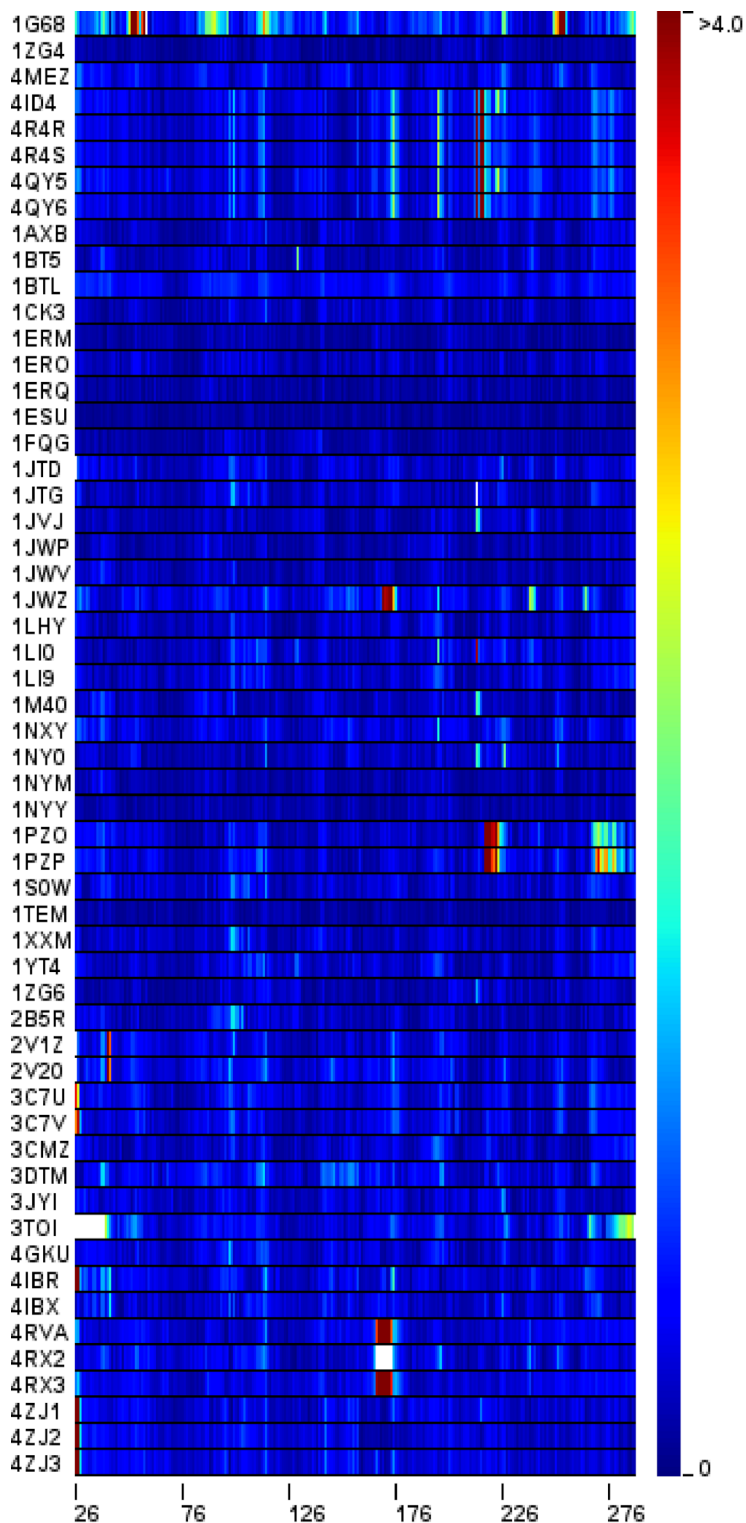


Figure 5.3. C α -RMSD to TEM-1 (PDB 1XPB) of all TEM-1 and PSE-4 variants available in the PDB based on Uniprot entries P62593 and P16897. The RMSD values of each residue are shown from 0 Å, in blue, to 4 Å or above, in red.

The four crystallographic structures of cTEM-19m showed maintenance of the native protein fold (**Figure 5.2 A**). Comparison of the C α -RMSD of TEM-1 (PDB 1XPB) to all TEM-1 and PSE-4 variants reported in the PDB, including the chimeras studied here, revealed that the more highly blended chimeras *i.e.* cTEM-17m and cTEM-19m contrast with the other structures as a result of their elevated C α -RMSD (greater than 1.2 Å) in three main regions: 174-176, 196-197 and 214-227 (**Figure 5.3**). Residues 174-176 form the tip of the catalytically important Ω -loop, Gly196 and Glu197 are surface-exposed residues and residues 214-227 constitute the 214-218 active-site wall and part of the second domain connector (**Figure 5.1**). This latter loop was not mutated by recombination, yet adopted a different conformation in the crystal structures of the chimeras cTEM-17m and cTEM-19m relative to the native TEM-1 and PSE-4. This is consistent with its reorientation resulting from the recombination of the Ω loop (residues 150 to 190) present in both these chimeras. Based on the C α -RMSD profile of this loop, the structures of the chimeras can be divided into two groups. The first comprises cTEM-19m PDB 4R4R, 4R4S and 4QY6, which diverge from TEM-1 in the 214-220 segment, and the second comprises cTEM-17m PDB 4ID4 and cTEM-19m PDB 4QY5, exhibiting a higher C α -RMSD in the 214-227 segment. We note that the PDB structures diverging the most from TEM-1 *i.e.* 1PZO, 1PZP, 1JWZ, 4RVA and 4RX3, are either bound to a core-disrupting allosteric inhibitor (1PZO, 1PZP – affected in the 218-224 region), to a boronate analog (1JWZ – affected in the 174-176 region) or have mutations in the Ω -loop region (4RVA and 4RX3) that introduce large conformational changes altering the substrate profile. It is interesting to note that the same regions show elevated C α -RMSD to TEM-1 in the chimeras cTEM-17m and cTEM-19m (**Figure 5.3**).

In a first attempt to understand the differences between the four cTEM-19m structures, we analyzed the B-factors of the C α -atoms to rule out experimental uncertainties regarding backbone atoms being at the root of the elevated C α -RMSD profile of 4QY5 in the 214-227 segment. The crystal structure displays elevated B-factors across all residues compared to the other structures of cTEM-19m, but remaining within the TEM-1 (PDB 1ZG4) and PSE-4 (PDB 1G68) native protein boundaries (**Figure 5.4 A**). After normalization of the per residue B-factor to the level of the other structures of cTEM-19m, surface-exposed residues Asn100, Gly156 and Glu197, and active site residue Glu104 and Ser130 exhibited higher B-factors

(**Figure 5.4 B**). When compared to TEM-1, only Glu197 had an elevated $C\alpha$ B-factor. This demonstrates that there is no gross alteration in structure 4QY5 of cTEM-19m. We also analyzed the number alternate states for each residue in all structures reported in the PDB for TEM-1, PSE-4 and variants (**Figure A4.2**). As expected, we find a strong correlation between the resolution and the number of alternate states *i.e.* better resolution results in a higher number of alternate states. No correlation was found between the degree of conformational dynamics previously reported for TEM-1, PSE-4 and the chimeras [49, 50] and the number of crystallographic alternate conformations of side chains (**Figure A4.2**).

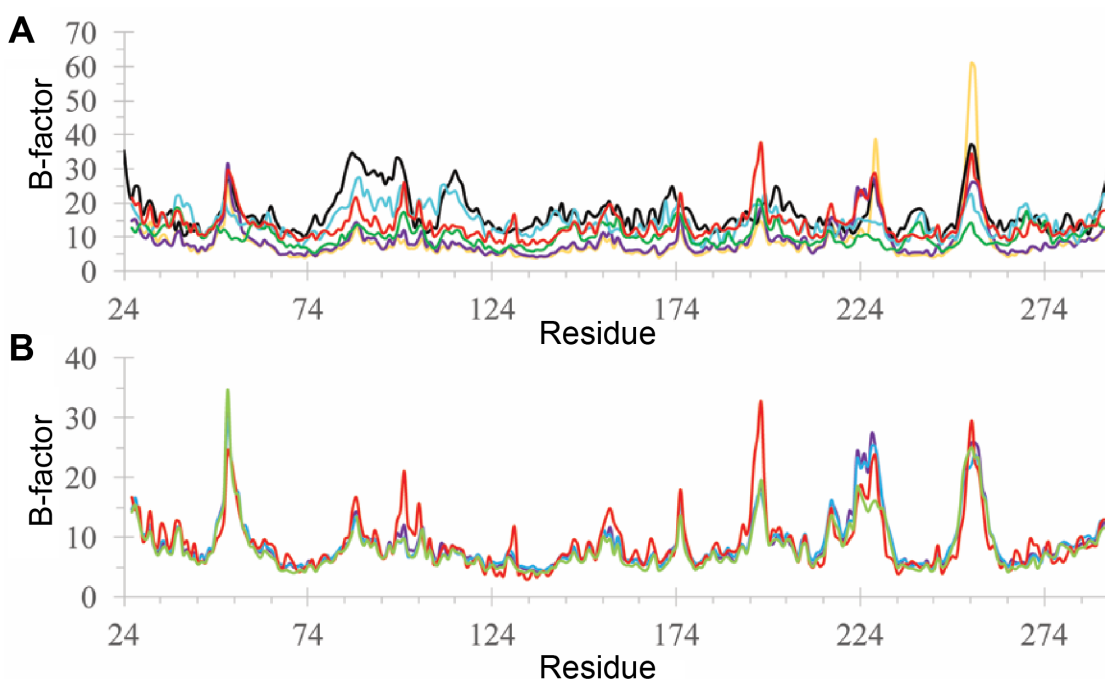


Figure 5.4. $C\alpha$ B-factors for PSE-4, TEM-1 and chimeras extracted from their respective PDB structures.

A. PSE4 (PDB 1G68) black, TEM-1 (PDB 1XPB) cyan, cTEM-2m (PDB 4MEZ.A) green, cTEM-17m (PDB 4ID4) yellow, cTEM-19m (PDB 4R4R) purple, (PDB 4QY5) red. **B.** Normalized B-factors for cTEM-19m (PDB 4QY5). The four cTEM-19m crystal structures are colored: 4R4R – purple, 4R4S – green, 4QY5 – red and 4QY6 blue.

Backbone Structural Ensembles Derived from Long Molecular Dynamic Simulations.

We could not find any rationale for the observed differences in B-factors and $C\alpha$ -RMSD profile of 4QY5 in the 214-227 segment based solely on the crystal structure. To verify

whether the observations of the crystallographic analysis are an essential part of the structural ensemble of the respective proteins or if we are observing crystallographic artefacts, we revisited our previously published unconstrained MD simulations [49].

The ϕ and ψ angles, characterizing the Ramachandran plot, were extracted over the course of the entire trajectories for every residue of TEM-1, PSE-4 and the three chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m, thus revealing the ensemble of possible backbone conformations within 6 μ s (**Figure 5.5**). Upon comparing the crystal structure of the two native proteins to the three chimeras, only loop 214-227 showed significant variation of the ϕ and ψ angles, coherent with the B-factor analysis described above. Using a clustering algorithm, we analyzed the conformation of this loop over the course of the 6 μ s trajectories to verify whether the structural ensemble of cTEM-19m contains evidence of elevated C α -RMSD profile of 4QY5 in region 214-227. In PSE-4, this loop remained in its starting conformation, while showing small fluctuations around the crystallographic orientation in TEM-1 and the chimera cTEM-2m. This is coherent with the previously reported S^2 values and the RMSF calculated from the MD trajectories where this wall was rigid in PSE-4 and moderately mobile in the other proteins. Strikingly, in the chimeras cTEM-17m and cTEM-19m the loop also explored a conformation similar to that crystallized, yet with a larger degree of freedom to explore greater structural diversity than for the other proteins (**Figure 5.6**). Within the structural clusters for this loop from the cTEM-19m ensemble, both orientations observed in the two aforementioned groups of C α -RMSD profile are represented. The different backbone conformations found in cTEM-19m crystals are hence a real indicator for the extensive dynamics observed experimentally on a slow time scale [49]. The high mobility observed in cTEM-17m and cTEM-19m also correlates with the previous failure to assign this loop using NMR methodologies, consistent slow dynamism of this region in these chimeras [49, 50].

Residues of the active-site walls S70, SDN, Ω -loop and 234-244 showed maintenance of the ϕ and ψ angles between the crystallized conformation and the ensemble, with the significant exception of residue 69. All crystal structures of class A β -lactamases show the residue at position 69 as adopting a high-energy conformation outside of the boundaries of the favourable Ramachandran areas [26, 54, 55]. This was accordingly observed in the crystal

structures of the chimeras. However, after rapidly, cTEM-19m Thr69 adopted and remained in a favoured, low-energy conformation (**Figure 5.5**). This resulted in an extensive water influx behind the active site wall.

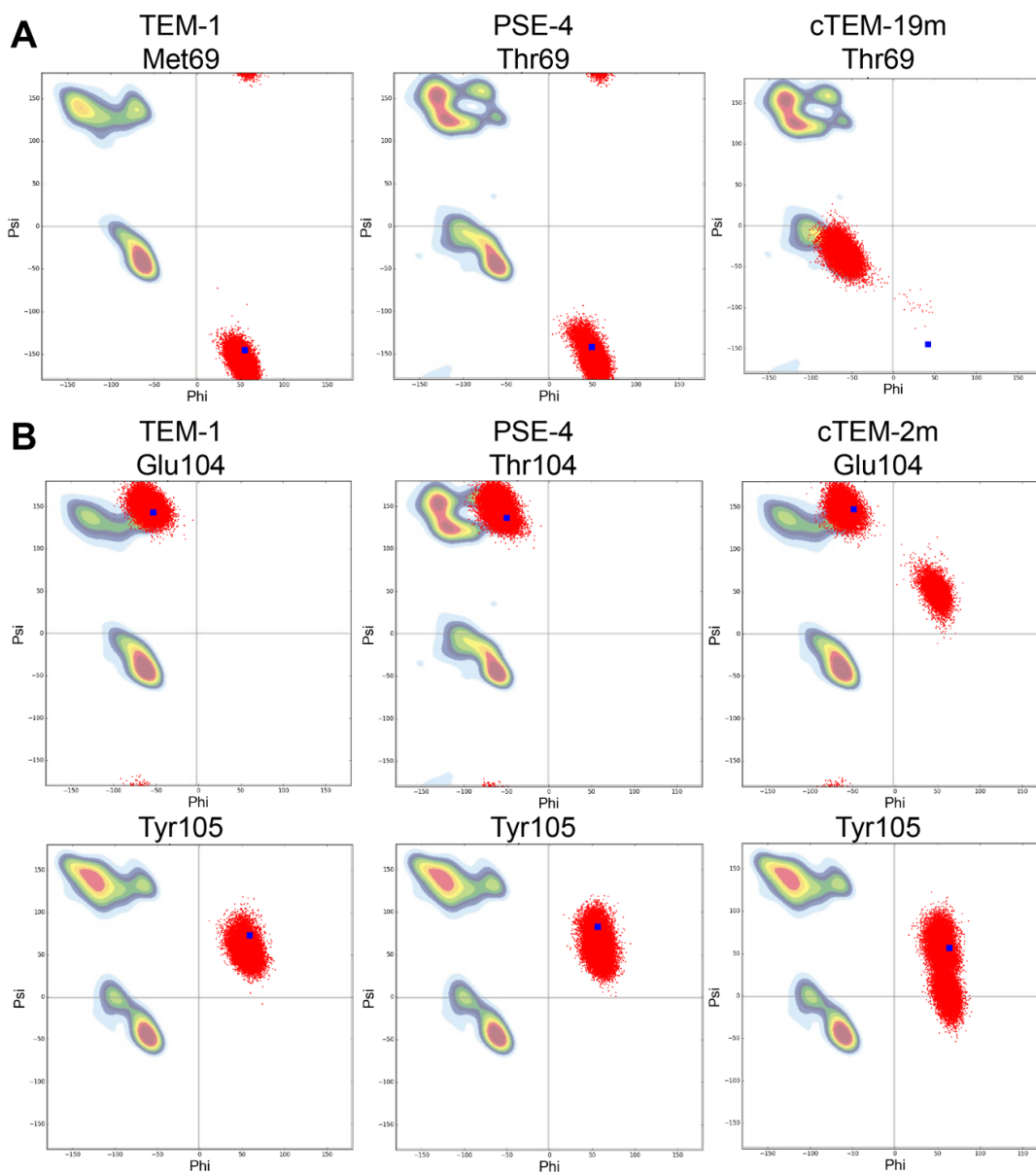


Figure 5.5. Ramachandran plot of the ϕ and ψ angles of TEM-1, PSE-4 and the chimeras cTEM-19m or cTEM-2m for residues A. Met/Thr69 and B. Glu/Thr104 and Tyr105 over the 6 μ s of simulation.

The orientation observed in the crystal structures of TEM-1 (PDB 1XPB), PSE-4 (PDB 1G68), cTEM-19m (PDB 4R4R) and cTEM-2m (PDB 4MEZ.A) are indicated by a blue square. The optimal conformation per residue type are indicated according to [59].

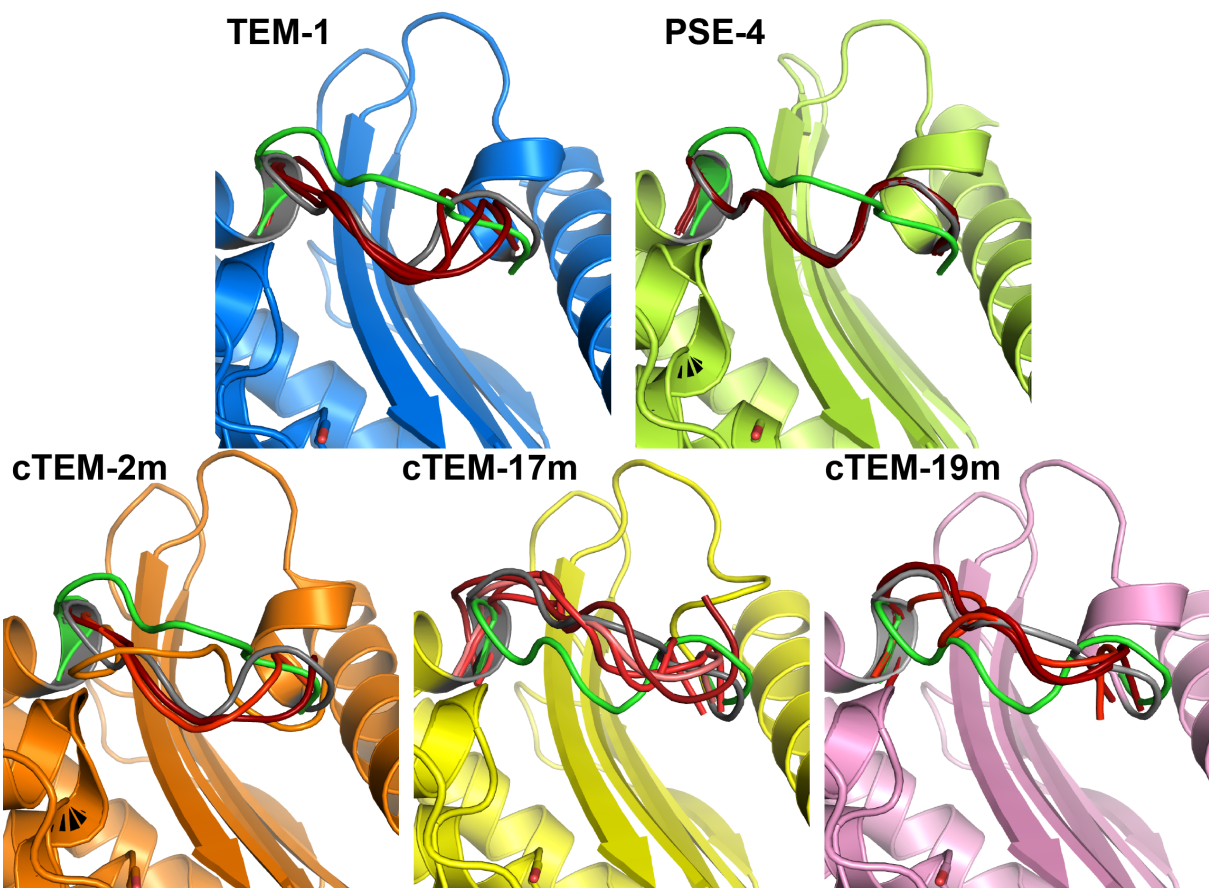


Figure 5.6. Cluster analysis of the loop 214-218 for TEM-1, PSE-4, and the chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m.

The conformation adopted by the 214-218 loop in the crystal structure is shown for reference in grey. The contrasting orientation either to TEM-1 (shown in cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m frames) or to cTEM-17m (shown in TEM-1 and PSE-4 frames) is indicated in green.

On the active-site wall Y105, gate-keeper to the active-site cavity, Glu104 and Tyr105 were observed in cTEM-2m to explore additional high energy conformations not explored by the other proteins [18, 56]. This suggests motions specific to this chimera, therefore resulting from the Met68Leu and Met69Thr substitution and compensated for in chimera cTEM-19m by its 17 further substitutions. Despite the potential for this difference to affect gate-keeping, there was no change in productive binding as reflected by K_M maintenance [49]. This is also consistent with the previously determined elevated RMSF of this wall in cTEM-2m (0.14 relative to 0.08-0.10 in the native proteins).

A Crystal Structure Showing Rearrangement of Catalytically Important Side-Chains

Within the active-site region, the crystal structure main-chain conformations were in general agreement with the findings from the conformational ensemble. This is consistent with previous NMR studies, which showed no large domain motions or structural changes [31, 32, 44, 46]. However, the active-site side-chains and water molecules of cTEM-19m PDB 4QY5 revealed striking differences relative to the three other crystal structures of cTEM-19m. The electron density map of 4QY5 showed no indications for the presence of side-chain conformations observed in all other structures.

On the SDN active-site wall, the Ser130 hydroxyl moiety, which is the proton donor during the β -lactam ring opening, was rotated by 95° around its C β displacing the hydroxyl moiety 3 Å farther from the active-site center (**Figure 5.2 B**). This corresponds to the adoption of the ['g-'] conformer (nomenclature based on the Dymameomics rotamer library [57]) rather than the ['t'] orientation found in TEM-1, in the chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and the three other structures of cTEM-19m; in PSE-4, both ['t'] and ['g-'] orientations were observed with equal occupancy. Interestingly, this rearrangement of Ser130 has been suggested, in concert with Arg234, to be essential for the carbenicillinase activity of PSE-4 as they prevent steric clashes [28]. However, it was previously shown that cTEM-19m has no increased activity towards this substrate [49]. This further supports the synergetic effect of the PSE-4 Ser130/Arg234 residue pair for its carbenicillinase activity. The adoption of the ['g-'] conformer in cTEM-19m introduced a new water molecule (PDB 4QY5: wat418) where the hydroxyl moiety of the ['t'] conformer would otherwise be located (**Figure 5.2 B**). Interestingly, only the structures of the TEM-1 Ser70Gly (PDB 1ZG6), TEM-32 (TEM-1 Met69Ile/Met182Thr; PDB 1LI0) and TEM-76 (TEM-1 Ser130Gly; PDB 1YT4) showed a water molecule at this position (**Figure 5.7**). The TEM-1 Ser70Gly variant, depleted of a catalytic nucleophile, displayed residual activity toward ampicillin (10^5 -fold reduction of efficiency) [20]. This water molecule was proposed to act as a replacement for the missing hydroxyl moiety of Ser70, procuring the residual activity of this variant. Interestingly, TEM-32 and TEM76 are known to be inhibitor-resistant enzymes. Crystallographic structures of these variants have shown distortion of Ser70 or Lys234 resulting in the displacement of Ser130 and introduction of this new water molecule [23, 24]. Because cTEM-19m is fully catalytic and the orientation of Ser70 and Lys234 are maintained as in the native proteins, we

propose that the placement of this new water molecule results from the dynamism of both Ser70 and Lys234 on a timescale slower than the ms (resulting in their non-assignment by NMR methodologies).

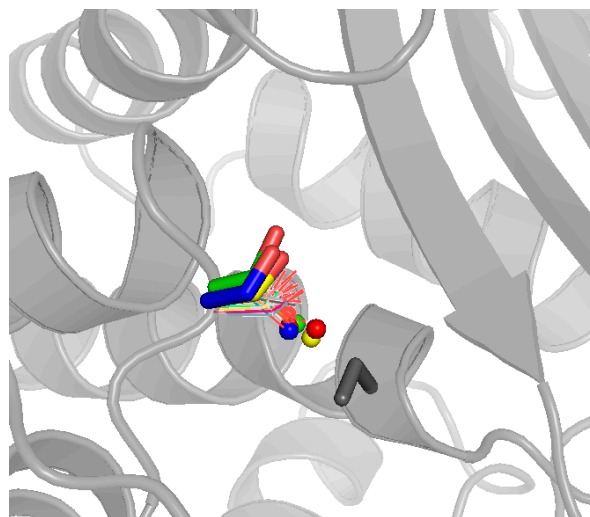


Figure 5.7. Superposition of all structures of TEM-1, PSE-4 and variants found in the PDB.

Residue S130 is shown in sticks for 4QY5 – green, 1LI0 – blue and 1ZG6 – yellow. The newly introduced water molecules are shown as spheres in their respective color with the addition of the water molecule found in the Ser130Gly mutant (PDB 1YT4) represented in red. All other structures are shown in a line representation. The cartoon representation is based on 1BTL.

The advantage of studying the ensemble of side-chain orientations instead of being limited to the static image obtained from crystallography is that one can observe the distribution of rotameric states over time. Consequently, we can rank all possible rotameric states for further analysis. The rotameric conformations of each side-chain were extracted over the course of the MD trajectories and compared to the respective crystal structure and expected rotameric states (Tables S2 and S3) [57]. This analysis shows that all proteins converged towards an approximate ratio of 80% ['g'] and 20% ['t'] for Ser130. This shows that the ['t'] conformation observed in 4QY5 can be explored by all proteins and not only by the chimeras. This also highlights how any single crystal structure should be interpreted with precaution. On the S70 active-site wall, the catalytic nucleophile Ser70 hydroxyl moiety in 4QY5, compared to the other structures of cTEM-19m, was rotated by 35° around its C β and displaced outward from the active-site center by approximately 1 Å while maintaining the

same rotameric conformer. The structural ensemble showed for TEM-1 and the chimeras cTEM-2m and cTEM-17m, that the catalytic nucleophile Ser70 remained in the crystallized conformation ([*'g-'*]). However, in PSE-4 and cTEM-19m, this residue adopted the [*'g-'*] and [*'g+'*] conformations with an approximate ratio of 60:40 for PSE-4 and 50:50 for cTEM-19m. This suggests that the catalytic nucleophile is more mobile in these latter two proteins. It is interesting to note that in all proteins under study, Ser70 was not assigned by NMR methodologies, consistent with slow dynamism. The neighboring Thr69 side-chain was also rotated by 95° around its C β displacing the side-chain hydroxyl moiety by 1.9 Å (**Figure 5.2 B**). This led to the adoption of the [*'t'*] conformer while the [*'g+'*] was observed in the all other structures containing Thr69: cTEM-19m (apart from 4QY5), PSE-4 and cTEM-2m. Interestingly, the structural ensemble did not reveal the [*'t'*] conformer for cTEM-19m that was crystallised in 4QY5. Thr69 remained in the crystallized conformation of 4R4R (*i.e.* [*'g+'*]). It appears that the [*'t'*] rotameric conformation is a rare event on a time-scale not covered in our simulation. The slow dynamics observed for Ser70 might influence the dynamic exchange between the two rotamers of Thr69. Interestingly, the Lys73 side-chain of the same active-site wall remained in the crystallized conformation ([*'g-'*, '*t*', '*t*', '*t*']). NMR analysis previously showed strong dynamics for this residue in cTEM-19m [49]. The structural ensemble appears to support this finding. For all proteins except cTEM-19m the conformation [*'g-'*, '*t*', '*t*', '*t*'] was adopted at least 70% of the time. However, for cTEM-19m, this conformer was observed only 33% of the time, while a second conformation, [*'g-'*, '*t*', '*t*', '*g+'*'], was observed 57% of the time. On the Ω -loop active-site wall, Asn170, coordinating the deacylating water molecule, was rotated by 30° around its C β in cTEM-19m PDB 4QY5. This displaced the side-chain nitrogen and carbonyl by respectively 2.1 and 1.5 Å toward the exterior of the active site but remained in the rotameric conformer ([*'g-'*, '*Og-'*']). Surprisingly, the deacylating water molecule was not observed in the PDB 4QY5 of cTEM-19m (**Figure 5.2**). The absence of this catalytically important water molecule from the crystal structure may reflect a less efficient coordination resulting from the increased dynamism of cTEM-19m relative to the native enzymes. This might also be reflected by the important decrease of k_{cat} for cephalosporin hydrolysis (9 to 75-fold) observed for this chimera [49]. Accordingly, motions were previously observed in this chimera on the ns-ms timescales on an extended stretch of residues

including the catalytically relevant Glu166 and Asn170. When analyzing the ensemble, we observed the rotamer ['g-', 'Og-'] at least 60% of the time for all proteins except cTEM-19m. Here the rotamer ['g-', 'Ng-'] was found 50% of the time and the rotamer ['g-', 'Og-'] only 6% of the time. The rotamer ['g-', 'Ng-'] represents a conformation that cannot stabilize the water network with Glu166 and Asn170. This might explain the absence of the water molecule in one of the four crystal structures of cTEM-19m. The crystallization of water in a protein structure requires a strong coordination of the dynamic water molecules. The shift away from the favorable rotamer ['g-', 'Og-'] may destabilize this important water molecule and hence rationalize its absence in the electron density of 4QY5.

The general base during the deacylation step and possibly the acylation step, Glu166, within the Ω -loop active-site wall, adopted two conformers equally over the course of the 6 μ s trajectories in TEM-1 and cTEM-2m *i.e.* the crystallized conformer (['g-', 'g-', 't']) and a second one (['g-', 'g-', 'g+']). PSE-4 and cTEM-17m adopted two further conformations (['g-', 't', 'g+'] and (['g-', 't', 'g-']), each at an approximate ratio of 25%, suggesting more flexibility of this side-chain in these proteins. Interestingly in cTEM-19m, the crystallized conformation (['g-', 'g-', 't']) represented only 3.5% over the MDs. Instead, the ['g-', 't', 'g-'] conformer dominated 60 % of the time though it was almost absent in the other proteins' trajectories, while the ['g-', 't', 'g+'] conformer was observed over 30% of the MD simulation. This further supports the hypothesis that the coordination of the deacylating water molecule is destabilized in cTEM-19m

Finally, Tyr105, on the Y105 gate-keeping active site wall was crystallized in the “closed” ['t', 'g'] conformation in TEM-1, PSE-4 and cTEM-2m. In cTEM-17m and cTEM-19m, the contrasting “open” ['g-', 'g'] conformation was crystallized. This conformation was only observed within the PDB for TEM-1 and PSE-4 crystal structures bound to either β -lactamase inhibitory proteins or inhibitors. The flexibility of this important side-chain has been previously proposed (**Figure 5.2 B**) [9, 18, 56]. The ensemble of all proteins revealed that, for all proteins under study here, the “open” ['g-', 'g'] conformation was predominantly populated during the simulations. This confirms the dynamic exchange of this residue between the two conformations, showing that the “open” state is also present in the absence of ligands.

CONCLUSION

Altogether, these results demonstrate the importance of cautiously analyzing the functional importance of structural variations gleaned from crystal structures. As demonstrated here, protein motions should also be considered when developing this causal relation. Having obtained four structures of cTEM-19m, where three exhibit similar conformations and one shows striking structural rearrangements, we demonstrate how dynamics can influence the resulting structure not necessarily captured by the B-factors. These results are of prime interest as they exemplify the importance of interpreting crystallographic data with precaution. In the case of β -lactamases where side-chain orientation is important for function, misinterpretation or over-interpretation of crystallographic artefacts can be detrimental. Where sufficiently long, MD simulations have the particular advantage of covering most of the conformational space explored by side-chains without the necessity of resolving numerous crystal structures of the same protein. Since structural interpretations are usually mainly based on a single structural model, MD simulations revealing conformers ensemble should be considered as a requisite to correlate the importance of structural rearrangement to function.

DATA DEPOSITION

The atomic coordinates have been deposited in the PDB under the codes 4QY5 and 4QY6.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.G., M.E, J. Pleiss and J.N.P. designed research; M.E., S.G., and J. Park performed research; M.E., S.G., and J. Park analyzed data; S.G. M.E, and J.N.P wrote the paper assisted by all other authors.

ACKNOWLEDGMENTS.

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grants RGPIN 227853. M.E. is the recipient of an NSERC Vanier Canada Graduate Scholarship and S.G. is the recipient of a FRQ-NT Graduate Scholarship. Computational resources were provided by Calcul Québec and Compute Canada, funded by the Canada Foundation for Innovation (CFI), NanoQuébec, RMGA and the FRQ-NT.

REFERENCES

1. Babic, M., A. Hujer, and R. Bonomo, *What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases*. Drug Resistance Updates, 2006. **9**(3): p. 142-156.
2. Bush, K. and P.A. Bradford, *β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016: p. a025247.
3. Bush, K., *A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2015. **46**(5): p. 483-493.
4. Brölund, A. and L. Sandegren, *Characterization of ESBL disseminating plasmids*. Infectious Diseases, 2015. **48**(1): p. 18-25.
5. Philippon, A., et al., *A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes*. Clinical Microbiology Reviews, 2015. **29**(1): p. 29-57.
6. Bradford, P.A., *Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 933-51, table of contents.
7. Datta, N. and P. Kontomichalou, *Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae*. Nature, 1965. **208**(5007): p. 239-41.
8. Newsom, S.W.B., *Carbenicillin-Resistant Pseudomonas*. The Lancet, 1969. **294**(7630): p. 1141.
9. Doucet, N., et al., *NMR Investigation of Tyr105 Mutants in TEM-1 beta-Lactamase: DYNAMICS ARE CORRELATED WITH FUNCTION*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(29): p. 21448-21459.
10. Waley, S.G., *β -Lactamase: mechanism of action*. 1992: p. 198-228.
11. Meroueh, S.O., et al., *Ab Initio QM/MM Study of Class A β -Lactamase Acylation: Dual Participation of Glu166 and Lys73 in a Concerted Base Promotion of Ser70*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(44): p. 15397-15407.
12. Wladkowski, B.D., et al., *Acylation of β -Lactams by Class A β -Lactamase: Anab Initio Theoretical Study on the Effects of the Oxy-Anion Hole*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(27): p. 6423-6431.
13. Strynadka, N.C.J., et al., *Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 700-705.
14. Minasov, G., X. Wang, and B.K. Shoichet, *An Ultrahigh Resolution Structure of TEM-1 β -Lactamase Suggests a Role for Glu166 as the General Base in Acylation*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(19): p. 5333-5340.
15. Lim, D., et al., *Insights into the Molecular Basis for the Carbenicillinase Activity of PSE-4 β -Lactamase from Crystallographic and Kinetic Studies*. Biochemistry, 2001. **40**(2): p. 395-402.
16. Herzberg, O. and J. Moult, *Penicillin-binding and degrading enzymes*. Current Opinion in Structural Biology, 1991. **1**(6): p. 946-953.
17. Herzberg, O. and J. Moult, *Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.5 Å resolution*. Science, 1987. **236**(4802): p. 694-701.

18. Doucet, N., *Site-saturation Mutagenesis of Tyr-105 Reveals Its Importance in Substrate Stabilization and Discrimination in TEM-1 β -Lactamase*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(44): p. 46295-46303.
19. Stojanoski, V., et al., *A Triple Mutant in the Ω -loop of TEM-1 β -Lactamase Changes the Substrate Profile via a Large Conformational Change and an Altered General Base for Catalysis*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(16): p. 10382-10394.
20. Stec, B., et al., *Structure of the wild-type TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2005. **61**(8): p. 1072-1079.
21. Swarén, P., et al., *X-ray Structure of the Asn276Asp Variant of the Escherichia coli TEM-1 β -Lactamase: Direct Observation of Electrostatic Modulation in Resistance to Inactivation by Clavulanic Acid^{†,‡}*. Biochemistry, 1999. **38**(30): p. 9570-9576.
22. Orenca, M.C., et al., Nature Structural Biology, 2001. **8**(3): p. 238-242.
23. Thomas, V.L., et al., *Structural Consequences of the Inhibitor-Resistant Ser130Gly Substitution in TEM β -Lactamase^{†,‡}*. Biochemistry, 2005. **44**(26): p. 9330-9338.
24. Wang, X., *The Structural Bases of Antibiotic Resistance in the Clinically Derived Mutant beta β -Lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(35): p. 32149-32156.
25. Brown, N.G., et al., *Structural and Biochemical Evidence That a TEM-1 β -Lactamase N170G Active Site Mutant Acts via Substrate-assisted Catalysis*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(48): p. 33703-33712.
26. Jelsch, C., et al., *Crystal structure of Escherichia coli TEM1 β -lactamase at 1.8 Å resolution*. Proteins: Structure, Function, and Genetics, 1993. **16**(4): p. 364-383.
27. Jelsch, C., et al., *Beta-lactamase TEM1 of E. coli. Crystal structure determination at 2.5 Å resolution*. FEBS Lett, 1992. **299**(2): p. 135-42.
28. Lim, D., et al., *Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies*. Biochemistry, 2001. **40**(2): p. 395-402.
29. Fonzé, E., et al., *TEM1 β -lactamase structure solved by molecular replacement and refined structure of the S235A mutant*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 1995. **51**(5): p. 682-694.
30. Strynadka, N.C., et al., *Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 700-5.
31. Savard, P.-Y. and S.M. Gagné, *Backbone Dynamics of TEM-1 Determined by NMR: Evidence for a Highly Ordered Protein[†]*. Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11414-11424.
32. Morin, S. and S.M. Gagné, *NMR Dynamics of PSE-4 β -Lactamase: An Interplay of ps-ns Order and μ s-ms Motions in the Active Site*. Biophysical Journal, 2009. **96**(11): p. 4681-4691.
33. Damblon, C., et al., *The catalytic mechanism of beta-lactamases: NMR titration of an active-site lysine residue of the TEM-1 enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 1747-52.

34. Hermann, J.C., et al., *Mechanisms of Antibiotic Resistance: QM/MM Modeling of the Acylation Reaction of a Class A β -Lactamase with Benzylpenicillin*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(12): p. 4454-4465.
35. Meroueh, S.O., et al., *Molecular Dynamics at the Root of Expansion of Function in the M69L Inhibitor-Resistant TEM β -Lactamase from Escherichiacoli*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(32): p. 9422-9430.
36. Roccatano, D., et al., *Dynamical Aspects of TEM-1 β -Lactamase Probed by Molecular Dynamics*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2005. **19**(5): p. 329-340.
37. Díaz, N., et al., *Molecular Dynamics Simulations of the TEM-1 β -Lactamase Complexed with Cephalothin*. Journal of Medicinal Chemistry, 2005. **48**(3): p. 780-791.
38. Díaz, N., et al., *Acylation of Class A β -lactamases by Penicillins: A Theoretical Examination of the Role of Serine 130 and the β -lactam Carboxylate Group*. The Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**(45): p. 11302-11313.
39. Lamotte-Brasseur, J., et al., *pKa Calculations for class A β -lactamases: Influence of substrate binding*. Protein Science, 2008. **8**(2): p. 404-409.
40. Díaz, N., et al., *Insights into the Acylation Mechanism of Class A β -Lactamases from Molecular Dynamics Simulations of the TEM-1 Enzyme Complexed with Benzylpenicillin*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(3): p. 672-684.
41. Golemi-Kotra, D., et al., *The Importance of a Critical Protonation State and the Fate of the Catalytic Steps in Class A β -Lactamases and Penicillin-binding Proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(33): p. 34665-34673.
42. Hermann, J.C., et al., *Identification of Glu166 as the General Base in the Acylation Reaction of Class A β -Lactamases through QM/MM Modeling*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(32): p. 9590-9591.
43. Fraser, J.S., et al., *Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(39): p. 16247-16252.
44. Clouthier, C.M., et al., *Chimeric beta-lactamases: global conservation of parental function and fast time-scale dynamics with increased slow motions*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52283.
45. Gobeil, S.M., et al., *Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins*. Chem Biol, 2014.
46. Fisette, O., et al., *TEM-1 Backbone Dynamics—Insights from Combined Molecular Dynamics and Nuclear Magnetic Resonance*. Biophysical Journal, 2010. **98**(4): p. 637-645.
47. Meyer, M.M., L. Hochrein, and F.H. Arnold, *Structure-guided SCHEMA recombination of distantly related β -lactamases*. Protein Engineering Design and Selection, 2006. **19**(12): p. 563-570.
48. Voigt, C.A., et al., *Protein building blocks preserved by recombination*. Nature Structural Biology, 2002.
49. Gobeil, S.M., Ebert, M.C.C.J.C., Park, J., Gagné, D., Doucet, N., Berghuis, A.M., Pleiss, J., Pelletier, J.N., *Conserved Fast Dynamics Accompanied by Altered Slow Conformational Dynamics in Evolutionarily Related β -Lactamases*. Cell Chemical Biology, 2016.

50. Gobeil, Sophie M.C., et al., *Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins*. Chemistry & Biology, 2014. **21**(10): p. 1330-1340.
51. Voigt, C.A., et al., *Protein building blocks preserved by recombination*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(7): p. 553-8.
52. Meyer, M.M., L. Hochrein, and F.H. Arnold, *Structure-guided SCHEMA recombination of distantly related beta-lactamases*. Protein Eng Des Sel, 2006. **19**(12): p. 563-70.
53. Minasov, G., X. Wang, and B.K. Shoichet, *An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(19): p. 5333-40.
54. Herzberg, O., *Refined crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.0 Å resolution*. J Mol Biol, 1991. **217**(4): p. 701-19.
55. Knox, J.R. and P.C. Moews, *β-Lactamase of Bacillus licheniformis 749/C*. Journal of Molecular Biology, 1991. **220**(2): p. 435-455.
56. Doucet, N. and J.N. Pelletier, *Simulated annealing exploration of an active-site tyrosine in TEM-1β-lactamase suggests the existence of alternate conformations*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2007. **69**(2): p. 340-348.
57. Scouras, A.D. and V. Daggett, *The dynamomics rotamer library: Amino acid side chain conformations and dynamics from comprehensive molecular dynamics simulations in water*. Protein Science, 2011. **20**(2): p. 341-352.
58. Ambler, R.P., et al., *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases*. Biochem J, 1991. **276** (Pt 1): p. 269-70.
59. Hovmoller, S., T. Zhou, and T. Ohlson, *Conformations of amino acids in proteins*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002. **58**(Pt 5): p. 768-76.

Chapitre 6 – Discussion et conclusion

Au cours des chapitres précédents, il a été démontré que les β -lactamases homologues, TEM-1 et PSE-4, structurellement et fonctionnellement similaires, maintiennent entre elles des patrons de dynamiques similaires. De petites variations fonctionnelles, structurales et dynamiques ont été observées, mais celles-ci semblent plutôt être liées à la spécialisation des enzymes homologues qu'à des changements globaux des propriétés de ces enzymes. Ces résultats suggèrent donc que le maintien évolutif de la dynamique et de la structure sont importants pour la fonction enzymatique et que des variations légères de celles-ci peuvent permettre la spécialisation d'homologues.

La caractérisation des chimères de TEM-1 et PSE-4, étant des intermédiaires d'un chemin évolutif hypothétique entre ces deux enzymes, a montré un maintien global de la fonction hydrolytique, de la structure et de la dynamique rapide (ps- μ s) avec des variations légères. Toutefois, des variations majeures de la dynamique, ayant lieu sur l'échelle de temps (μ s-ms), coïncidant avec la vitesse catalytique (k_{cat}), ont été observées. Cette dernière observation, prise en considération avec des travaux de la littérature scientifique, nous permet ici de soulever différents questionnements quant au rôle de la dynamique des protéines envers la fonction, l'évolution et les facteurs influençant celle-ci.

6.1. Ligands et caractérisation de la dynamique

Il a précédemment été montré que la présence d'un ligand pouvait influencer les patrons de dynamique observés entre une apoenzyme et l'état lié de celle-ci. Des travaux caractérisant la dynamique lente des intermédiaires liés au cours du cycle catalytique de la dihydrofolate réductase d'*E. coli* (*ecDHFR*), ont montré que chacun de ceux-ci possédait des motions différentes (151). Toutefois, il a aussi été observé qu'un nombre restreint de résidus maintenaient leur dynamisme observé dans l'état intermédiaire précédent. Les constantes de relaxation obtenues pour les différentes régions dynamiques corrélaient aussi avec les vitesses réactionnelles des étapes intermédiaires. Ceci démontre donc que la dynamique est directement impliquée dans la fonction enzymatique et que le ligand peut influencer celle-ci. D'autres travaux sur cette même enzyme ont aussi montré que les patrons de dynamique lente

différents en fonction de la liaison de différents ligands non naturels. Un nombre restreint de résidus maintiennent par contre leur dynamisme, peu importe le ligand lié (152).

La cyclophilline A catalyse la réaction d'isomérisation *cis-trans* des prolines. Le rôle du dynamisme envers la fonction a été vérifié chez cette enzyme puisqu'au cours de la catalyse, aucun lien chimique n'est créé ou détruit. Ceci permet l'étude des changements conformationnels subis par l'enzyme et le substrat au cours de la réaction suivie par RMN. En présence de substrat, des mouvements ayant lieu sur l'échelle de temps lente sont observés. Certains de ces mouvements sont aussi présents dans l'apoenzyme, démontrant donc la préexistence de certains mouvements impliqués dans la fonction avant même la liaison du substrat. Ces motions ont été suggérées comme étant strictement maintenues afin de faciliter la réactivité de l'enzyme (41).

Les travaux présentés ici, caractérisant la dynamique des β -lactamases, ont été effectués sur l'état apoenzyme. L'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) de ces enzymes approche la limite de diffusion du substrat (pénicillines : $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), justifiant la non-inclusion de celui-ci au cours des études de dynamique qui durent de plusieurs jours (153). Des essais de titration par RMN effectués plus rapidement auraient permis de vérifier l'effet d'un ligand sur la protéine. Un effet de stabilisation des grandes régions du site actif non assignées, et donc dynamiques, dans les chimères cTEM-17m et cTEM-19m (résidus 214 à 218 et 234 à 244), aurait possiblement pu être observé. Toutefois, la caractérisation des variations de déplacement chimique aux concentrations faibles de substrat aurait été problématique à réaliser puisque le substrat est trop rapidement hydrolysé. Cette expérience permettrait d'observer la liaison du substrat à l'enzyme, mais ne fournirait pas d'informations sur la dynamique de l'enzyme au cours de fonction enzymatique. L'hydrolyse des β -lactames par les β -lactamases ne dépend pas de l'ajout d'un cofacteur qui aurait permis de bloquer l'enzyme dans un état lié intermédiaire. Ces caractéristiques du système constituent donc un défi pour la caractérisation par RMN de l'effet d'un substrat sur la dynamique de la protéine. Différentes possibilités telles l'ajout d'inhibiteurs, d'analogues et de protéines inhibitrices ont toutefois été explorées. Toutefois, aucune de ces approches ne permettait de caractériser de façon appropriée la relation entre la fonction et la dynamique comme il sera présenté au cours des prochains paragraphes.

Trois inhibiteurs des β -lactamases, soit le tazobactame, le sulbactame et le clavulanate

(**Figure 6.1**), sont utilisés cliniquement pour traiter les infections aux β -lactamases résistantes. Ces composés constituent une alternative intéressante pour caractériser la dynamique en présence d'un ligand et de corrélérer celle-ci à la fonction qui ici est représentée par l'inhibition de l'activité d'hydrolyse d'un β -lactame. Toutefois, ces inhibiteurs sont, tout comme les substrats, hydrolysés par les β -lactamases dans un ratio d'une molécule liée au site actif de TEM-1 pour 160 molécules hydrolysées dans le cas du clavulanate ou d'une molécule liée pour 13 000 hydrolysées dans le cas du sulbactam ([86](#), [154](#), [155](#)). Les concentrations d'inhibiteur nécessaires pour observer les mouvements au cours de la réaction seraient encore ici élevées. De plus, différents mécanismes suivant la formation de l'acyle-enzyme peuvent être utilisés, entraînant ou non la formation de différents complexes enzyme-inhibiteur ce qui complique l'analyse des données (**Figure 6.2**).

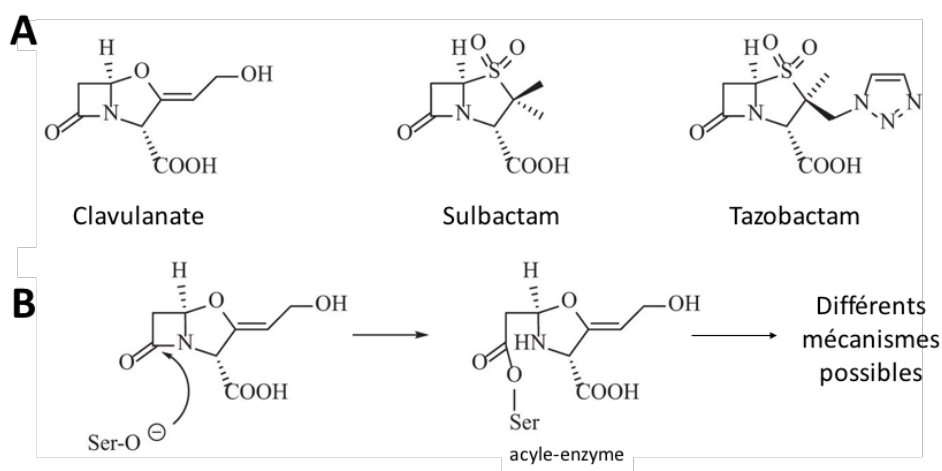


Figure 6.1. Inhibiteurs des β -lactamases utilisés en clinique (A) et formation du complexe enzyme-inhibiteur (B).

Figure adaptée de Drawz & Bonomo (2010) ([86](#)).

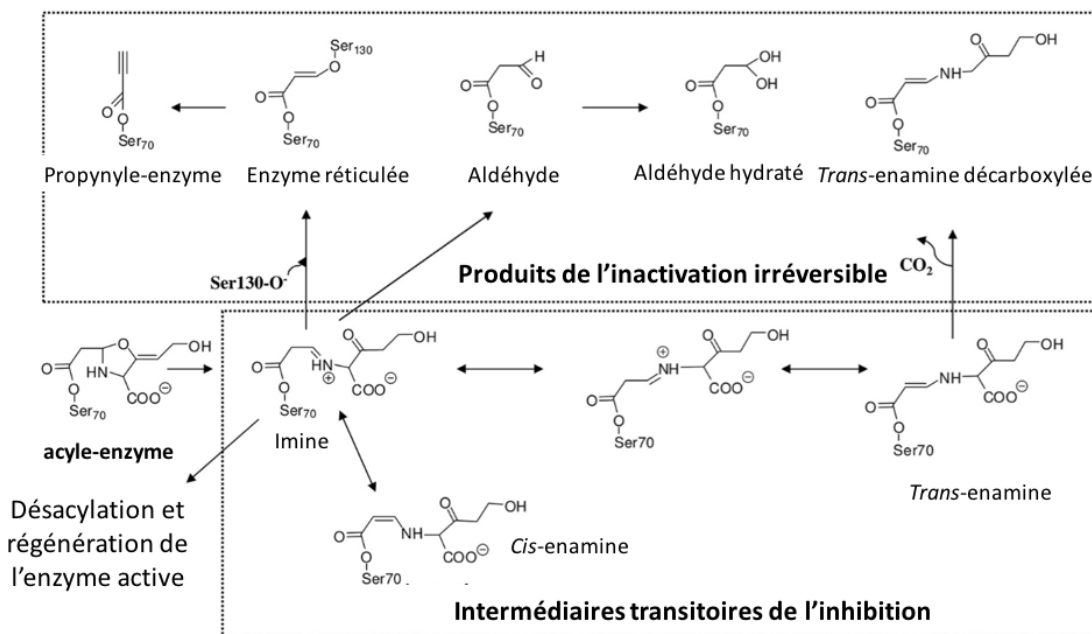


Figure 6.2. Mécanisme de l'inhibition par le clavulanate montrant les différents sous-produits possibles au cours de la réaction.

Figure adaptée de Drawz & Bonomo (2010) (86).

L'utilisation d'analogues boronates des β -lactames est intéressante pour des études structurales puisque ceux-ci comportent un atome de bore (mimant le β -lactame), permettant la liaison de l'enzyme sans l'hydrolyse du composé (**Figure 6.3**) (156, 157). Lorsque ces composés sont liés à l'enzyme, ils reproduisent une conformation similaire à l'état de transition entre le β -lactame et l'enzyme, permettant donc de développer un lien structure/fonction dans un état figé (**Figure 6.4**) (86). L'interprétation de leur effet envers la dynamique peut toutefois poser certaines difficultés conceptuelles puisque ces molécules se lient et miment le complexe de Michaelis, mais ne sont pas par la suite hydrolysées. Le lien à la fonction enzymatique n'est donc pas idéal puisqu'une seule étape du mécanisme peut être capturée par ces analogues artificiels. De plus, leur affinité est généralement plus faible que les substrats β -lactames étant donné leur structure significativement différente des β -lactames qu'ils imitent. Leur liaison à l'enzyme est aussi réversible, contrairement aux β -lactames.

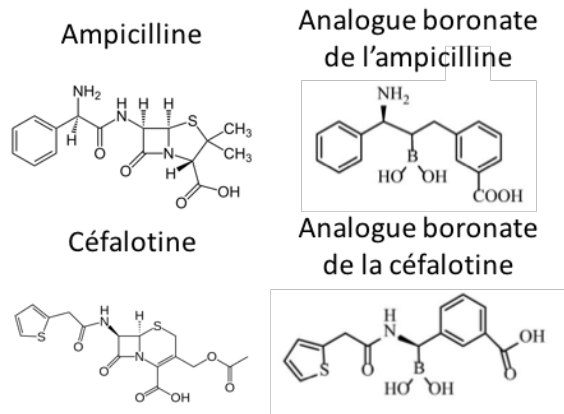


Figure 6.3. Analogues boronate des substrats des β -lactamases.

Figure adaptée de Drawz et al. (2013) (158).

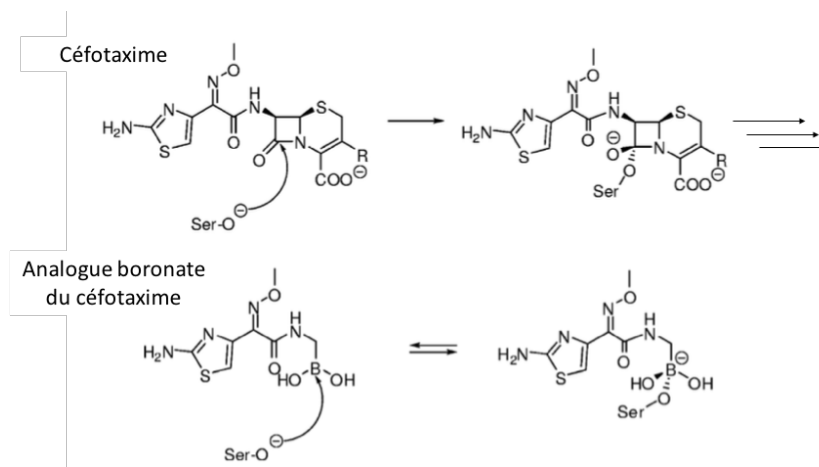


Figure 6.4. Comparaison de l'état de transition lors de la liaison au céfotaxime ou à un analogue boronate du céfotaxime.

Figure adaptée de Drawz & Bonomo (2010) (86).

Les BLIPs (β -lactamases inhibitory protein) sont une famille de petites protéines inhibant certaines β -lactamases de classe A. La première protéine de cette famille, BLIP, fut identifiée chez *Streptomyces clavuligerus* (159). Les autres membres, BLIP-I et BLIP-II, ont subséquemment été identifiés chez *Streptomyces exfoliatus* SMF19 (160, 161). BLIP et BLIP-I possèdent 38% d'identité de séquence alors que BLIP-II diffère complètement de ces deux protéines (162). Puisque les β -lactamases sont des enzymes périplasmiques et donc inaccessibles à des protéines extracellulaires telles les BLIPs, des études se sont intéressées au rôle naturel de celles-ci. Ces protéines jouent un rôle dans les mécanismes de sporulation. Il a

été proposé que la cible naturelle des BLIPs, bien que toujours inconnue, doit être structurellement similaire à TEM-1, d'où leur forte affinité pour cette β -lactamase (K_i TEM-1/BLIP = 0,11 nM; K_i TEM-1/BLIP-II = 0,0272 nM) ([159](#), [162](#)).

Ces protéines inhibitrices auraient procuré un bon moyen de vérifier l'effet de la dynamique sur les interactions protéine-protéine. Serait-il possible que la dynamique augmentée des chimères influence la liaison des BLIPs (**Figure 6.5**) ? Toutefois, ces protéines ne permettent pas de faire un lien à la fonction enzymatique d'hydrolyse des β -lactamases. De plus, BLIP liant très fortement l'enzyme ne permettrait pas de mesurer le rôle du dynamisme envers l'inhibition au cours d'étude de CPMG. Ainsi, le développement de la corrélation structure/fonction/dynamique utilisant cette approche ne serait toujours pas idéal par cette approche. Des travaux ont toutefois été réalisés afin de vérifier l'effet des recombinaisons homologues (les chimères) sur la liaison avec BLIP (**Annexe 5**). Ces études n'ont pas été poursuivies à cause de difficultés techniques et conceptuelles entourant l'obtention des paramètres caractérisant l'inhibition par ces protéines.

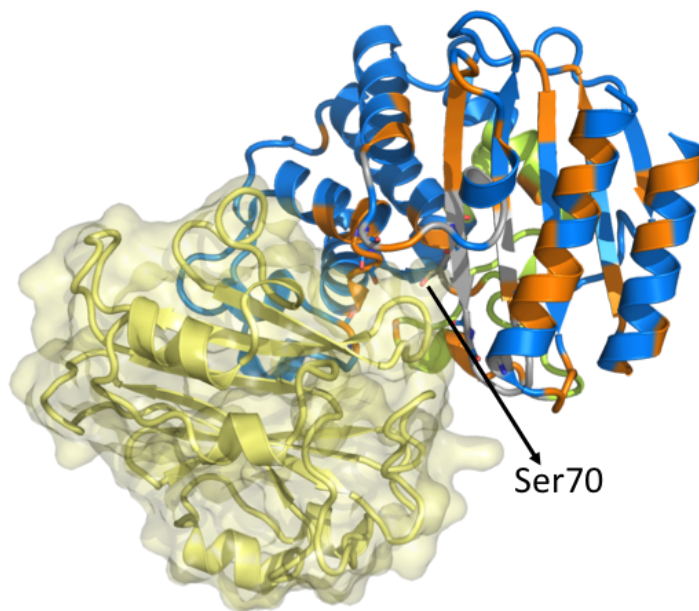


Figure 6.5. Modèle de l'interaction entre BLIP et cTEM-19m.

La structure cristalline de cTEM-19m (PDB 4R4R) est colorée en fonction de la provenance des résidus de cette chimère (TEM-1 résidus colorés en bleu ; résidus 66 à 73 et 150 à 190 provenant de PSE-4 colorés vert). Les résidus dynamiques observés par RMN-CPMG sont colorés orange alors que les résidus non assignés par RMN sont gris. La structure de BLIP (jaune) a été extraite de la structure co-cristallisée de TEM-1 et BLIP (PDB 1JTG ([162](#))) où TEM-1 a été aligné avec cTEM-19m.

La cinétique enzymatique est la seule méthodologie présentée qui nous permet de révéler des variations de la fonction d'hydrolyse des β -lactames de ces enzymes. Le lien direct entre les variations de dynamique observées sur l'échelle de temps coïncidant avec la vitesse catalytique et la fonction enzymatique reste toutefois complexe à développer, puisqu'ici, il n'est qu'uniquement possible de relever des corrélations et non, une causalité entre ces deux paramètres.

Les simulations de dynamique moléculaire *in silico* permettent l'inclusion de substrat. Par contre, cette approche ne permet pas de vérifier la contribution de ces mouvements à la catalyse. La caractérisation de la dynamique en présence des différents états intermédiaires du mécanisme catalytique (le substrat libre dans le site actif, le complexe de Michaelis, l'acyl-enzyme, le produit hydrolysé) pourrait être une approche permettant de vérifier la contribution du substrat face aux mouvements de l'enzyme. Est-ce que la liaison de substrat, par la formation de contact avec l'enzyme, stabilise les mouvements présents dans celle-ci ? Il faut aussi préciser que le mécanisme catalytique précis et le rôle des résidus impliqués dans l'étape d'acylation de ces enzymes n'est pas complètement compris ce qui rendrait l'interprétation complexe. La difficulté de simuler jusqu'à l'atteinte de l'échelle de temps de la catalyse (selon k_{cat} de TEM-1 pour BZ = 2 ms) est une contrainte importante. Grâce à l'augmentation constante de la puissance informatique cette problématique pourra toutefois fort probablement être résolue dans les années à venir permettant ainsi l'exploration de ces échelles de temps *in silico*.

6.2. Importance évolutive de la dynamique

Suite à la démonstration de la grande tolérance des β -lactamases TEM-1 et PSE-4 à des changements de dynamique coïncidant avec l'échelle de temps de la catalyse, il est ici intéressant de s'attarder à la signification évolutive de cette observation.

Des travaux portant sur la caractérisation de la dynamique lente de différents homologues de la famille des RNases ont montré que ces enzymes conservaient entre elles des patrons de dynamiques similaires ([54](#), [163](#)). Toutefois, l'élimination d'un seul groupement méthyle d'une chaîne latérale distale au site actif de la RNaseA, malgré le maintien de la

structure et de la stabilité de l'enzyme, modifie drastiquement la dynamique résultant en des variations importantes du positionnement du ligand réduisant l'efficacité catalytique (43). Mutée au niveau d'un seul résidu, la boucle catalytique Met20 de la ecDHFR a été montrée comme modifiant la dynamique sur l'échelle de la ms, affectant du même coup l'efficacité de transition entre les états catalytiques et donc, réduisant l'activité de l'enzyme (55). Chez la cyclophiline A, la mutation Ser99Thr entraîne elle aussi une réduction drastique de la dynamique sur l'échelle de temps μ s-ms, réduisant ainsi la vitesse de la catalyse (164). Ces travaux nous mènent donc à nous questionner sur le rôle de la tolérance des β -lactamases à des changements de dynamique.

Dans un premier temps, rappelons que les β -lactamases sont des enzymes de résistance bactérienne qui sont connues pour leur grande adaptabilité évolutive. À ce jour, plus de 170 variants cliniques de TEM-1, comportant généralement de 1 à 5 variations, possèdent différentes sélectivités envers les β -lactames (82). Ces antibiotiques sont actuellement parmi les plus prescrits en clinique et sont utilisés à grande échelle pour des applications vétérinaires. Ceci entraîne donc une haute pression sélective dans l'environnement des bactéries (68). Revenons au principe de sélection naturelle proposé par Charles Darwin : au sein d'une population, une modification offrant un avantage sera maintenue. Tel que proposé par Tokuriki et Tawfik (165), serait-il possible que des modifications de dynamique permettant la reconnaissance de nouveaux substrats puissent favoriser l'adaptabilité évolutive ? En contrepartie, des grandes variations de dynamiques pourraient-elles être globalement désavantageuses à long terme pour le « *fitness* » de l'enzyme où le « *fitness* » se définit comme étant la performance de l'enzyme envers une fonction définie ? Tel que proposé par Degrado et collaborateurs (166), est-ce que l'excès de dynamique doit être réduit par un processus de stabilisation évolutive, tout en maintenant l'avantage fonctionnel que la nouvelle mutation (augmentant la dynamique) a permis d'atteindre, afin de maximiser le « *fitness* » ? La **figure 6.6** présente un modèle explorant cette idée de la contribution de la dynamique envers l'évolution de la fonction chez les β -lactamases.

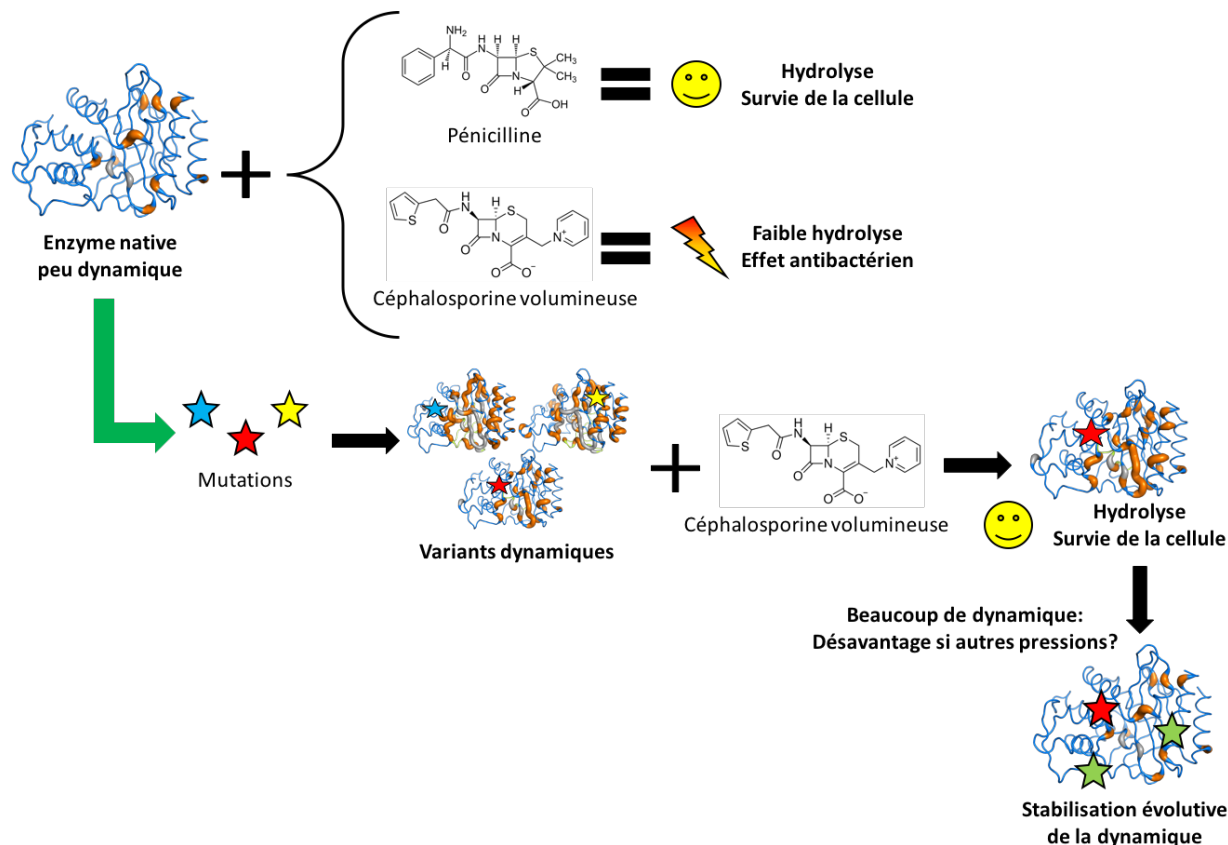


Figure 6.6. Modèle hypothétique du rôle évolutif de la dynamique envers la fonction enzymatique.

Initialement, l'enzyme native possède une dynamique restreinte. Cette enzyme hydrolyse efficacement certains substrats (pénicilline) permettant la survie cellulaire (☺). L'introduction de substrats plus complexes et moins bien reconnus par l'enzyme résulte en une pression sélective. Des mutations dans l'enzyme (étoiles jaune, rouge et bleue) affecteront la dynamique de celle-ci, facilitant l'atteinte d'une solution au problème et permettant ainsi la survie cellulaire (étoile rouge). L'excès de dynamique pourrait par contre modifier le « fitness » (ou la performance) général de l'enzyme, d'où l'introduction de mutations compensatoires (étoiles vertes) stabilisant cette nouvelle dynamique tout en maintenant l'avantage offert par la mutation (étoile rouge).

Afin d'explorer ce modèle, différentes approches peuvent être proposées. Dans un premier temps, il pourrait être intéressant d'évaluer la présence d'un tel mécanisme au cours d'un chemin évolutif cliniquement connu, conférant à TEM-1 une meilleure efficacité d'hydrolyse des céphalosporines plus volumineuses. Un tel chemin est connu pour les mutations A42G, E104K, M182T et G238S permettant l'hydrolyse plus efficace du

céfotaxime (**Tableau 6.I**) ([167](#), [168](#)). L'étude de ce modèle permettrait de vérifier si la dynamique des variants est modifiée simultanément avec la fonction.

Tableau 6.I. Concentration minimale inhibitrice (CMI) en présence du céfotaxime pour TEM-1 et les variants du chemin évolutif impliquant les mutations A42G, E104K, M182T et G238S.

Données provenant de Hall (2002) ([168](#)).

| | CMI céfotaxime ($\mu\text{g/mL}$) | Amélioration relative à TEM-1 |
|-------------------------------------|---|--|
| TEM-1 | 0,012 | - |
| A42G | 0,0625 | 5 × |
| E104K | 0,25 | 21 × |
| M182T | 0,0625 | 5 × |
| G238S | 0,5 | 42 × |
| E104K + G238S | 8 | 667 × |
| A42G + E104K + G238S | 64 | 5 333 × |
| A42G + E104K + M182T + G238S | 1024 | 85 333 × |

Il pourrait aussi être intéressant de tenter l'évolution en laboratoire des chimères cTEM-2m, cTEM-17m et cTEM-19m afin de vérifier si la dynamique retournerait à un patron similaire à l'enzyme TEM-1 native par l'incorporation de mutations compensatrices. Une alternative pourrait aussi être de vérifier si une enzyme possédant une plus grande dynamique initiale (telles les chimères) explore les mêmes chemins évolutifs que des enzymes moins dynamiques tels TEM-1 et PSE-4 au cours de l'évolution vers une nouvelle fonction (c.-à-d. hydrolyse de β -lactames plus volumineux). Est-ce que la dynamique pourrait permettre d'ouvrir des accès à des chemins évolutifs qui autrement ne seraient pas atteints ? Si la dynamique ne procure pas d'avantage évolutif, et qu'elle n'est pas essentielle à la fonction, serait-elle simplement stabilisée et éliminée au cours de l'évolution ?

6.3. Conclusion

Les sections précédentes exposent les limitations du système enzymatique étudié ici. Toutefois, rappelons que celui-ci a été sélectionné en fonction de différents avantages qu'il possède, soient la connaissance des structures, du mécanisme catalytique, la grande variété d'homologues et de variants et la possibilité d'étudier la dynamique de ces protéines par RMN. Le développement d'une corrélation plus complète entre la structure, la fonction et la dynamique des protéines reste un défi de taille qui devra continuer d'être développé par l'utilisation de différentes approches et de différents systèmes protéiques. Afin de pouvoir éventuellement généraliser sur le rôle de la dynamique envers la fonction enzymatique, la caractérisation d'une multitude de systèmes sera nécessaire et l'inclusion de substrats mettra en évidence le lien dynamique-fonction. Tel que décrit par D. Hilvert et D. Baker ([169](#)), la caractérisation des mouvements et des paysages énergétiques d'enzymes issues de l'ingénierie est d'un intérêt particulier puisque ces informations pourraient être utilisées dans la conception en laboratoire de protéines et éventuellement permettre le rêve de créer des catalyseurs *de novo* pour toutes les réactions désirées.

Bibliographie

1. Mulder GJ. Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen. Journal für Praktische Chemie. 1839;16(1):129-52.
2. Platt D. Memoire sur la fermentation appelee lactique (Louis Pasteur). Del Med J. 1988;60(1):23-4.
3. AB NM. Eduard Buchner - Nobel Lecture: Cell-Free Fermentation 2014 [Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1907/buchner-lecture.html].
4. Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 1894;27(3):2985-93.
5. Sumner JB. THE ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF THE ENZYME UREASE: PRELIMINARY PAPER. Journal of Biological Chemistry. 1926;69(2):435-41.
6. Northrop JH. Crystalline Pepsin. Science. 1929;69(1796):580.
7. Northrop JH. Crystalline Pepsin : I. Isolation and Tests of Purity. J Gen Physiol. 1930;13(6):739-66.
8. Stanley WM. Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus. Science. 1935;81(2113):644-5.
9. Nobelprize.org. The Nobel Prize in Chemistry 1946 [Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1946/].
10. Pauling L, Corey RB. Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. Proc Natl Acad Sci U S A. 1951;37(11):729-40.
11. Koshland DE. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1958;44(2):98-104.
12. Mannige R. Dynamic New World: Refining Our View of Protein Structure, Function and Evolution. Proteomes. 2014;2(1):128-53.
13. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. Nature. 1958;181(4610):662-6.
14. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North AC. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. Nature. 1960;185(4711):416-22.
15. Blake CC, Koenig DF, Mair GA, North AC, Phillips DC, Sarma VR. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. Nature. 1965;206(4986):757-61.
16. Matthews BW, Sigler PB, Henderson R, Blow DM. Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin. Nature. 1967;214(5089):652-6.
17. Wyckoff HW, Hardman KD, Allewell NM, Inagami T, Johnson LN, Richards FM. The structure of ribonuclease-S at 3.5 Å resolution. J Biol Chem. 1967;242(17):3984-8.
18. Lipscomb WN, Hartsuck JA, Quioco FA, Reeke GN, Jr. The structure of carboxypeptidase A. IX. The x-ray diffraction results in the light of the chemical sequence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969;64(1):28-35.

19. Arnone A, Bier CJ, Cotton FA, Day VW, Hazen EE, Jr., Richardson DC, et al. A high resolution structure of an inhibitor complex of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. I. Experimental procedures and chain tracing. *J Biol Chem.* 1971;246(7):2302-16.
20. Mirsky AE, Pauling L. On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1936;22(7):439-47.
21. Anfinsen CB, Redfield RR, Choate WL, Page J, Carroll WR. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem.* 1954;207(1):201-10.
22. Karush F. Heterogeneity of the Binding Sites of Bovine Serum Albumin. *Journal of the American Chemical Society.* 1950;72(6):2705-13.
23. Perutz MF, Mathews FS. An x-ray study of azide methaemoglobin. *J Mol Biol.* 1966;21(1):199-202.
24. Hvidt A, Linderstrom-Lang K. Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions. *Biochim Biophys Acta.* 1954;14(4):574-5.
25. Schellman JA, Schellman CG. Kaj Ulrik Linderstrom-Lang (1896-1959). *Protein Sci.* 1997;6(5):1092-100.
26. Hammes GG. Mechanism of Enzyme Catalysis. *Nature.* 1964;204:342-3.
27. Straub FB SGO. O dinamicsezskij aspektah szstrukturü fermentov. (On the dynamic aspects of protein structure). Braunstein AE R, editors, editor. Nauka, Moscow 1964.
28. Závodszky P AL, Varshavsky YM. Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its alteration by coenzyme binding. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung.* 1966;1:389-403.
29. Austin RH, Beeson KW, Eisenstein L, Frauenfelder H, Gunsalus IC. Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry.* 1975;14(24):5355-73.
30. Frauenfelder H, Sligar SG, Wolynes PG. The energy landscapes and motions of proteins. *Science.* 1991;254(5038):1598-603.
31. Onuchic JN, Luthey-Schulten Z, Wolynes PG. THEORY OF PROTEIN FOLDING: The Energy Landscape Perspective. *Annual Review of Physical Chemistry.* 1997;48(1):545-600.
32. Bryngelson JD, Onuchic JN, Succi ND, Wolynes PG. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins: Structure, Function, and Genetics.* 1995;21(3):167-95.
33. Wolynes P, Onuchic J, Thirumalai D. Navigating the folding routes. *Science.* 1995;267(5204):1619-20.
34. Frauenfelder H, Petsko GA, Tsernoglou D. Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature.* 1979;280(5723):558-63.
35. Radford S. Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends in Biochemical Sciences.* 2000;25(12):611-8.
36. Snyder GH, Rowan R, Karplus S, Sykes BD. Complete tyrosine assignments in the high field proton nuclear magnetic resonance spectrum of the bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry.* 1975;14(17):3765-77.
37. Campbell ID, Dobson CM, Williams RJP. Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Structure of Lysozyme in Solution. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* 1975;345(1640):41-59.

38. Wüthrich K, Wagner G. Internal motion in globular proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1978;3(4):227-30.
39. Henzler-Wildman K, Kern D. Dynamic personalities of proteins. *Nature*. 2007;450(7172):964-72.
40. Wolfenden R, Snider MJ. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Accounts of Chemical Research*. 2001;34(12):938-45.
41. Eisenmesser EZ, Millet O, Labeikovsky W, Korzhnev DM, Wolf-Watz M, Bosco DA, et al. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*. 2005;438(7064):117-21.
42. Boehr DD, McElheny D, Dyson HJ, Wright PE. Millisecond timescale fluctuations in dihydrofolate reductase are exquisitely sensitive to the bound ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(4):1373-8.
43. Gagné D, French Rachel L, Narayanan C, Simonović M, Agarwal Pratul K, Doucet N. Perturbation of the Conformational Dynamics of an Active-Site Loop Alters Enzyme Activity. *Structure*. 2015;23(12):2256-66.
44. Cole R, Loria JP. Evidence for Flexibility in the Function of Ribonuclease A†. *Biochemistry*. 2002;41(19):6072-81.
45. Osborne MJ, Schnell J, Benkovic SJ, Dyson HJ, Wright PE. Backbone Dynamics in Dihydrofolate Reductase Complexes: Role of Loop Flexibility in the Catalytic Mechanism†. *Biochemistry*. 2001;40(33):9846-59.
46. Klinman JP, Kohen A, Cannio R, Bartolucci S, Klinman JP. *Nature*. 1999;399(6735):496-9.
47. Pisljakov AV, Cao J, Kamerlin SCL, Warshel A. Enzyme millisecond conformational dynamics do not catalyze the chemical step. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(41):17359-64.
48. Benkovic SJ. A Perspective on Enzyme Catalysis. *Science*. 2003;301(5637):1196-202.
49. Kohen A. Role of Dynamics in Enzyme Catalysis: Substantial versus Semantic Controversies. *Accounts of Chemical Research*. 2015;48(2):466-73.
50. Karplus M. Role of conformation transitions in adenylate kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(17):E71-E.
51. Kamerlin SCL, Warshel A. Reply to Karplus: Conformational dynamics have no role in the chemical step. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(17):E72-E.
52. Warshel A, Bora RP. Perspective: Defining and quantifying the role of dynamics in enzyme catalysis. *The Journal of Chemical Physics*. 2016;144(18):180901.
53. Kamerlin SCL, Warshel A. At the dawn of the 21st century: Is dynamics the missing link for understanding enzyme catalysis? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2010:NA-NA.
54. Gagné D, Doucet N. Structural and functional importance of local and global conformational fluctuations in the RNase A superfamily. *FEBS Journal*. 2013;280(22):5596-607.
55. Bhabha G, Lee J, Ekiert DC, Gam J, Wilson IA, Dyson HJ, et al. A Dynamic Knockout Reveals That Conformational Fluctuations Influence the Chemical Step of Enzyme Catalysis. *Science*. 2011;332(6026):234-8.
56. Henzler-Wildman KA, Lei M, Thai V, Kerns SJ, Karplus M, Kern D. A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature*. 2007;450(7171):913-6.

57. Abraham EP, Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*. 1940;146(3713):837-.
58. Darwin C. On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray, Albemarle Street; 1859. ix, 1, 502, 32 p. p.
59. Organization WH. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 20142014. 257 p.
60. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8(5):525-33.
61. Fevre C, Jbel M, Passet V, Weill FX, Grimont PA, Brisse S. Six groups of the OXY beta-Lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3453-62.
62. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4):e34953.
63. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477(7365):457-61.
64. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*. 1997;24 Suppl 1:S19-45.
65. Bush K. The evolution of beta-lactamases. *Ciba Found Symp*. 1997;207:152-63; discussion 63-6.
66. Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PAI, Graham DW. Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. *Environmental Science & Technology*. 2010;44(2):580-7.
67. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1277(1):84-90.
68. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016:a025247.
69. Babic M, Hujer A, Bonomo R. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*. 2006;9(3):142-56.
70. Bush K. A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;46(5):483-93.
71. Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):933-51.
72. Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Caniãa MM, Vedel Gr, NÃ©vot P, Krishnamoorthy R, et al. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Letters*. 1994;120(1-2):75-80.
73. Ambler RP. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 1980;289(1036):321-31.
74. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(6):1211-33.

75. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;54(3):969-76.
76. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;29(1):29-57.
77. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965;208(5007):239-41.
78. Newsom SWB. Carbenicillin-Resistant Pseudomonas. *The Lancet*. 1969;294(7630):1141.
79. Newsom SW, Sykes RB, Richmond MH. Detection of a beta-lactamase markedly active against carbenicillin in a strain of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*. 1970;101(3):1079-80.
80. Fonzé E, Charlier P, To'th Y, Vermeire M, Raquet X, Dubus A, et al. TEM1 β -lactamase structure solved by molecular replacement and refined structure of the S235A mutant. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 1995;51(5):682-94.
81. Lim D, Sanschagrin F, Passmore L, De Castro L, Levesque RC, Strynadka NC. Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies. *Biochemistry*. 2001;40(2):395-402.
82. Salverda MLM, De Visser JAGM, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2010;34(6):1015-36.
83. Savard P-Y, Gagné SM. Backbone Dynamics of TEM-1 Determined by NMR: Evidence for a Highly Ordered Protein†. *Biochemistry*. 2006;45(38):11414-24.
84. Morin S, Gagné SM. NMR Dynamics of PSE-4 β -Lactamase: An Interplay of ps-ns Order and μ s-ms Motions in the Active Site. *Biophysical Journal*. 2009;96(11):4681-91.
85. Jelsch C, Mourey L, Masson JM, Samama JP. Crystal structure of Escherichia coli TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins*. 1993;16(4):364-83.
86. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(1):160-201.
87. Strynadka NCJ, Adachi H, Jensen SE, Johns K, Sielecki A, Betzel C, et al. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature*. 1992;359(6397):700-5.
88. Herzberg O, Moulton J. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.5 Å resolution. *Science*. 1987;236(4802):694-701.
89. Swarén P, Maveyraud L, Guillet V, Masson J-M, Mourey L, Samama J-P. Electrostatic analysis of TEM1 β -lactamase: effect of substrate binding, steep potential gradients and consequences of site-directed mutations. *Structure*. 1995;3(6):603-13.
90. Meroueh SO, Fisher JF, Schlegel HB, Mobashery S. Ab Initio QM/MM Study of Class A β -Lactamase Acylation: Dual Participation of Glu166 and Lys73 in a Concerted Base Promotion of Ser70. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(44):15397-407.
91. Minasov G, Wang X, Shoichet BK. An Ultrahigh Resolution Structure of TEM-1 β -Lactamase Suggests a Role for Glu166 as the General Base in Acylation. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(19):5333-40.

92. Hermann JC, Hensen C, Ridder L, Mulholland AJ, Höltje H-D. Mechanisms of Antibiotic Resistance: QM/MM Modeling of the Acylation Reaction of a Class A β -Lactamase with Benzylpenicillin. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(12):4454-65.
93. Knox JR, Moews PC, Escobar WA, Fink AL. A catalytically-impaired class A beta-lactamase: 2 A crystal structure and kinetics of the *Bacillus licheniformis* E166A mutant. *Protein Eng.* 1993;6(1):11-8.
94. Guillaume G, Vanhove M, Lamotte-Brasseur J, Ledent P, Jamin M, Joris B, et al. Site-directed Mutagenesis of Glutamate 166 in Two β -Lactamases: KINETIC AND MOLECULAR MODELING STUDIES. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(9):5438-44.
95. Gibson RM, Christensen H, Waley SG. Site-directed mutagenesis of β -lactamase I. Single and double mutants of Glu-166 and Lys-73. *Biochemical Journal*. 1990;272(3):613-9.
96. Doucet N, Pelletier JN. Simulated annealing exploration of an active-site tyrosine in TEM-1 β -lactamase suggests the existence of alternate conformations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007;69(2):340-8.
97. Doucet N, Savard PY, Pelletier JN, Gagne SM. NMR Investigation of Tyr105 Mutants in TEM-1 beta-Lactamase: DYNAMICS ARE CORRELATED WITH FUNCTION. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(29):21448-59.
98. Doucet N. Site-saturation Mutagenesis of Tyr-105 Reveals Its Importance in Substrate Stabilization and Discrimination in TEM-1 β -Lactamase. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(44):46295-303.
99. Osuna J, Viadiu H, Fink AL, Soberon X. Substitution of Asp for Asn at Position 132 in the Active Site of TEM β -Lactamase: ACTIVITY TOWARD DIFFERENT SUBSTRATES AND EFFECTS OF NEIGHBORING RESIDUES. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(2):775-80.
100. Jacob F, Joris B, Lepage S, Dusart J, Frère JM. Role of the conserved amino acids of the 'SDN' loop (Ser130, Asp131 and Asn132) in a class A β -lactamase studied by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*. 1990;271(2):399-406.
101. Brown NG, Shanker S, Prasad BVV, Palzkill T. Structural and Biochemical Evidence That a TEM-1 β -Lactamase N170G Active Site Mutant Acts via Substrate-assisted Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(48):33703-12.
102. Wang X. The Structural Bases of Antibiotic Resistance in the Clinically Derived Mutant beta β -Lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(35):32149-56.
103. Zafaralla G, Manavathu EK, Lerner SA, Mobashery S. Elucidation of the role of arginine-224 in the turnover processes of class A β -lactamases. *Biochemistry*. 1992;31(15):3847-52.
104. Imtiaz U, Billings E, Knox JR, Manavathu EK, Lerner SA, Mobashery S. Inactivation of class A β -lactamases by clavulanic acid: the role of arginine-244 in a proposed nonconcerted sequence of events. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(11):4435-42.
105. Meier RTMaMAR. *Green Polymerization Methods: Renewable Starting Materials, Catalysis and Waste Reduction*: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2011. 349 p.
106. Hüge-Jensen IB, Gormsen E. Enzymatic detergent additive. Google Patents; 1994.

107. Schimper CB, Ibanescu C, Bechtold T. Surface activation of dyed fabric for cellulase treatment. *Biotechnology Journal*. 2011;6(10):1280-5.
108. Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. Transglutaminase: Its Utilization in the Food Industry. *Food Reviews International*. 2001;17(2):221-46.
109. Aswathy US, Sukumaran RK, Devi GL, Rajasree KP, Singhanian RR, Pandey A. Bioethanol from water hyacinth biomass: An evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresource Technology*. 2010;101(3):925-30.
110. Hiraishi T, Taguchi S. *Protein Engineering of Enzymes Involved in Bioplastic Metabolism*. 2013.
111. Gerday C, Aittaleb M, Arpigny JL, Baise E, Chessa J-P, Garsoux G, et al. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1997;1342(2):119-31.
112. Jurado E, García-Román M, Luzón G, Altmajer-Vaz D, Jiménez-Pérez JL. Optimization of Lipase Performance in Detergent Formulations for Hard Surfaces. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2011;50(20):11502-10.
113. Tracewell CA, Arnold FH. Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2009;13(1):3-9.
114. Lutz S. Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010;21(6):734-43.
115. Brannigan JA, Wilkinson AJ. Protein engineering 20 years on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(12):964-70.
116. Kazlauskas RJ, Bornscheuer UT. Finding better protein engineering strategies. *Nature Chemical Biology*. 2009;5(8):526-9.
117. You L, Arnold FH. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. "Protein Engineering, Design and Selection". 1996;9(1):77-83.
118. Ostermeier M, Benkovic SJ. Evolution of protein function by domain swapping. *Adv Protein Chem*. 2000;55:29-77.
119. Trani M, Lutz S. Chimeragenesis in Protein Engineering. 2011:493-514.
120. Voigt CA, Martinez C, Wang Z-G, Mayo SL, Arnold FH. Protein building blocks preserved by recombination. *Nature Structural Biology*. 2002.
121. Meyer MM, Silberg JJ, Voigt CA, Endelman JB, Mayo SL, Wang Z-G, et al. Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination. *Protein Science*. 2003;12(8):1686-93.
122. Saves I, Burlet-Schiltz O, Maveyraud L, Samama J-P, Prome J-C, Masson J-M. Mass Spectral Kinetic Study of Acylation and Deacylation During the Hydrolysis of Penicillins and Cefotaxime by β -Lactamase TEM-1 and the G238S Mutant. *Biochemistry*. 1995;34(37):11660-7.
123. Rhodes G. An Overview of Protein Crystallography. 2006:7-30.
124. Fraser JS, van den Bedem H, Samelson AJ, Lang PT, Holton JM, Echols N, et al. Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(39):16247-52.
125. Rabi II, Zacharias JR, Millman S, Kusch P. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Physical Review*. 1938;53(4):318-.

126. Bloch F, Hansen WW, Packard M. The Nuclear Induction Experiment. *Physical Review*. 1946;70(7-8):474-85.
127. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review*. 1946;69(1-2):37-8.
128. H VR. Method and means for correlating nuclear properties of atoms and magnetic fields. Google Patents; 1951.
129. Dickinson WC. Dependence of the $\{\mathrm{F}\}^{\{19\}}$ Nuclear Resonance Position on Chemical Compound. *Physical Review*. 1950;77(5):736-7.
130. Proctor WG, Yu FC. The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound. *Physical Review*. 1950;77(5):717-.
131. Saunders M, Wishnia A, Kirkwood JG. THE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTRUM OF RIBONUCLEASE1. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79(12):3289-90.
132. Ernst RR, Anderson WA. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Review of Scientific Instruments*. 1966;37(1):93-102.
133. Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics*. 1976;64(5):2229-46.
134. Williamson MP, Havel TF, Wuthrich K. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J Mol Biol*. 1985;182(2):295-315.
135. Bolognesi M, Gatti G, Menegatti E, Guarneri M, Marquart M, Papamokos E, et al. Three-dimensional structure of the complex between pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal type) and trypsinogen at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1982;162(4):839-68.
136. Kline AD, Braun W, Wuthrich K. Determination of the complete three-dimensional structure of the alpha-amylase inhibitor tendamistat in aqueous solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J Mol Biol*. 1988;204(3):675-724.
137. Doucleff M, Hatcher-Skeers M, Crane NJ. *Atomic Bells and Frequency Finders*. 2011:1-18.
138. Gardner KH, Kay LE. The Use Of ²h,¹³c,¹⁵n Multidimensional Nmr Gto Study the Structure and Dynamics of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1998;27(1):357-406.
139. Kwan AH, Mobli M, Gooley PR, King GF, Mackay JP. Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. *FEBS Journal*. 2011;278(5):687-703.
140. Higman VA. Visualising 3D Spectra 2012 [updated 31 octbre 2012. Available from: <http://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/assignment-theory/visualising-3d-spectra/>.
141. Higman VA. Spectrum Descriptions [updated 24 octbre 2012.
142. Mittermaier A. New Tools Provide New Insights in NMR Studies of Protein Dynamics. *Science*. 2006;312(5771):224-8.
143. Doucet N, Pelletier JN. Gaining Insight into Enzyme Function through Correlation with Protein Motions. 2011:187-211.
144. Kleckner IR, Foster MP. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2011;1814(8):942-68.
145. Adcock SA, McCammon JA. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chemical Reviews*. 2006;106(5):1589-615.

146. Alder BJ, Wainwright TE. Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics*. 1957;27(5):1208.
147. Rahman A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. *Physical Review*. 1964;136(2A):A405-A11.
148. McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. Dynamics of folded proteins. *Nature*. 1977;267(5612):585-90.
149. Duan Y, Kollman PA. Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. *Science*. 1998;282(5389):740-4.
150. Shaw DE, Bowers KJ, Chow E, Eastwood MP, Ierardi DJ, Klepeis JL, et al. Millisecond-scale molecular dynamics simulations on Anton. 2009:1.
151. Boehr DD, McElheny D, Dyson HJ, Wright PE. The Dynamic Energy Landscape of Dihydrofolate Reductase Catalysis. *Science*. 2006;313(5793):1638-42.
152. Carroll MJ, Mauldin RV, Gromova AV, Singleton SF, Collins EJ, Lee AL. Evidence for dynamics in proteins as a mechanism for ligand dissociation. *Nature Chemical Biology*. 2012;8(3):246-52.
153. Christensen H, Martin MT, Waley SG. Beta-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl-enzyme mechanism. *Biochem J*. 1990;266(3):853-61.
154. Fisher J, Charnas RL, Knowles JR. Kinetic studies on the inactivation of Escherichia coli RTEM beta-lactamase by clavulanic acid. *Biochemistry*. 1978;17(11):2180-4.
155. Imtiaz U, Billings EM, Knox JR, Mobashery S. A structure-based analysis of the inhibition of class A beta-lactamases by sulbactam. *Biochemistry*. 1994;33(19):5728-38.
156. Bone R, Shenvi AB, Kettner CA, Agard DA. Serine protease mechanism: structure of an inhibitory complex of alpha-lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid. *Biochemistry*. 1987;26(24):7609-14.
157. Crompton IE, Cuthbert BK, Lowe G, Waley SG. Beta-lactamase inhibitors. The inhibition of serine beta-lactamases by specific boronic acids. *Biochem J*. 1988;251(2):453-9.
158. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;58(4):1835-46.
159. Doran JL, Leskiw BK, Aippersbach S, Jensen SE. Isolation and characterization of a beta-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J Bacteriol*. 1990;172(9):4909-18.
160. Gyun Kang S. New beta β -Lactamase Inhibitory Protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and Its Roles on the Morphological Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(22):16851-6.
161. Park HU, Lee KJ. Cloning and heterologous expression of the gene for BLIP-II, a β -lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces exfoliatus* SMF19. *Microbiology*. 1998;144(8):2161-7.
162. Lim D, Park HU, De Castro L, Kang SG, Lee HS, Jensen S, et al. *Nature Structural Biology*. 2001;8(10):848-52.
163. Gagné D, Charest L-A, Morin S, Kovrigin EL, Doucet N. Conservation of Flexible Residue Clusters among Structural and Functional Enzyme Homologues. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(53):44289-300.

164. McGowan Lauren C, Hamelberg D. Conformational Plasticity of an Enzyme during Catalysis: Intricate Coupling between Cyclophilin A Dynamics and Substrate Turnover. *Biophysical Journal*. 2013;104(1):216-26.
165. Tokuriki N, Tawfik DS. Protein dynamism and evolvability. *Science*. 2009;324(5924):203-7.
166. Korendovych IV, DeGrado WF. Catalytic efficiency of designed catalytic proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014;27:113-21.
167. Dellus-Gur E, Elias M, Caselli E, Prati F, Salverda MLM, de Visser JAGM, et al. Negative Epistasis and Evolvability in TEM-1 β -Lactamase—The Thin Line between an Enzyme's Conformational Freedom and Disorder. *Journal of Molecular Biology*. 2015;427(14):2396-409.
168. Hall BG. Predicting evolution by in vitro evolution requires determining evolutionary pathways. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(9):3035-8.
169. Preiswerk N, Beck T, Schulz JD, Milovnik P, Mayer C, Siegel JB, et al. Impact of scaffold rigidity on the design and evolution of an artificial Diels-Alderase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(22):8013-8.

Annexe 1 – Matériel supplémentaire du chapitre 2

Table A1.I, related to Figure 2.2: ΔR_2 values $\geq 7 \text{ s}^{-1}$, derived from TROSY-based CPMG experiments, and unassigned residues (NA) in TEM-1, PSE-4 and cTEM-17m.

| Residue | R_2 (800MHz) | | k_{ex} | | pop | α | exchange |
|-----------------|----------------|------------|-----------------|-----------|------|----------|----------|
| TEM-1 | | | | | | | |
| Asp38 | 8.9 | \pm 2.3 | | | | | |
| Ser70 | NA | | | | | | |
| Ser130 | 9.7 | \pm 3.9 | | | | | |
| His153 | 14.2 | \pm 2.7 | | | | | |
| His158 | 9.6 | \pm 3.6 | 1029 | \pm 350 | 0.5 | | |
| Ala217 | 10.4 | \pm 5.2 | | | | | |
| Gly218 | 24.9 | \pm 12.0 | | | | | |
| Leu225 | 16.2 | \pm 2.3 | 1387 | \pm 368 | 0.97 | 1.3 | fast |
| Ala237 | NA | | | | | | |
| Arg241 | 8.2 | \pm 1.5 | 646 | \pm 229 | 0.97 | 1.4 | fast |
| Arg259 | 18.9 | \pm 4.2 | | | | | |
| Met272 | 16.1 | \pm 6.1 | | | | | |
| Ile287 | 11.8 | \pm 2.4 | 1186 | \pm 335 | 0.98 | 1.2 | fast |
| PSE-4 | | | | | | | |
| Ser70 | NA | | | | | | |
| Thr71 | 7.3 | \pm 3.0 | | | | | |
| Asp121 | 7.3 | \pm 2.0 | | | | | |
| Lys173 | 9.3 | \pm 1.3 | 2019 | \pm 813 | 0.5 | | |
| Ser200 | 10.9 | \pm 2.9 | | | | | |
| Ala237 | NA | | | | | | |
| Asp277 | 7.4 | \pm 1.3 | | | | | |
| cTEM-17m | | | | | | | |
| Thr29 | 45.0 | \pm 2.8 | 332 | \pm 85 | 0.5 | | |
| Val31 | 7.4 | \pm 0.5 | | | | | |
| Lys32 | 38.3 | \pm 2.1 | 393 | \pm 90 | 0.86 | 0.9 | slow |
| Lys34 | 38.2 | \pm 1.9 | | | | | |
| Glu37 | 12.5 | \pm 0.6 | 433 | \pm 171 | 0.5 | | |
| Asp38 | 22.8 | \pm 1.7 | 199 | \pm 96 | 0.5 | 2.1 | fast |
| Gln39 | 25.7 | \pm 1.8 | 249 | \pm 102 | 0.5 | | |
| Gly41 | 31.8 | \pm 3.2 | 572 | \pm 121 | 0.88 | 1 | inter |
| Ala42 | 14.6 | \pm 0.6 | | | | | |
| Arg43 | 13.4 | \pm 2.7 | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---------------------|------|---|------|------|---|-----|------|-----|------|
| Gly45 | 44.7 | ± | 3.4 | | | | | | |
| Glu48 | 36.9 | ± | 1.8 | 612 | ± | 119 | 0.86 | 0.6 | slow |
| Asp50 | 23.3 | ± | 1.6 | 483 | ± | 182 | 0.55 | | |
| Phe60 | 16.9 | ± | 0.6 | | | | | | |
| Phe66 | 17.9 | ± | 1.8 | 464 | ± | 99 | 0.89 | 0.3 | slow |
| Met69 | 18.2 | ± | 5.5 | 446 | ± | 132 | 0.91 | 1.5 | fast |
| Ser70 | NA | | | | | | | | |
| Thr71 | 8.7 | ± | 2.5 | | | | | | |
| Phe72 | 18.6 | ± | 3.2 | 507 | ± | 130 | 0.87 | 0.3 | slow |
| Lys73 | NA | | | | | | | | |
| Val80 | 65.4 | ± | 3.8 | | | | | | |
| Leu81 | 30.7 | ± | 2.5 | | | | | | |
| Val84 | 17.4 | ± | 0.6 | | | | | | |
| Ala86 | 32.7 | ± | 0.5 | 344 | ± | 157 | 0.5 | | |
| Tyr105 | 53.8 | ± | 1.4 | 239 | ± | 84 | 0.5 | | |
| Ser106 | 11.8 | ± | 0.7 | 318 | ± | 145 | 0.5 | | |
| Leu113 | 20.5 | ± | 3.3 | 1481 | ± | 314 | 0.96 | 0.4 | slow |
| Asp115 | 15.5 | ± | 1.8 | | | | | | |
| Cys123 ^a | 60.5 | ± | 4.5 | | | | | | |
| Ala126 | 11.8 | ± | 2.2 | | | | | | |
| Thr128 | 23.1 | ± | 3.4 | 470 | ± | 133 | 0.88 | 1.2 | fast |
| Met129 | 68.6 | ± | 13.2 | 673 | ± | 130 | 0.5 | | |
| Asp131 | NA | | | | | | | | |
| Asn132 | 25.4 | ± | 2.9 | | | | | | |
| Leu152 | 33.4 | ± | 2.7 | | | | | | |
| Glu166 | 38.7 | ± | 1.9 | 331 | ± | 89 | 0.5 | | |
| Leu169 | 27.5 | ± | 2.8 | | | | | | |
| Asn170 | 21.3 | ± | 2.1 | 1390 | ± | 390 | 0.5 | | |
| Glu171 | 18.1 | ± | 1.6 | | | | | | |
| Gly172 | 22.7 | ± | 3,0 | | | | | | |
| Lys173 | NA | | | | | | | | |
| Leu194 | 8.7 | ± | 2.5 | | | | | | |
| Ala202 | 30.7 | ± | 2.5 | | | | | | |
| Ser203 | 16.1 | ± | 0.6 | 580 | ± | 117 | 0.5 | | |
| Ala213 | 7.7 | ± | 2,0 | | | | | | |
| Asp214 | NA | | | | | | | | |
| 216-218 | NA | | | | | | | | |
| 220-221 | NA | | | | | | | | |
| Leu225 | 15.4 | ± | 1.8 | 1098 | ± | 443 | 0.5 | | |

| | | | | | | | | | |
|---------------------|------|---|-----|------|---|-----|------|-----|------|
| Ile231 | 31.7 | ± | 1.8 | 1049 | ± | 478 | 0.5 | | |
| Ala232 | 32.1 | ± | 2.8 | 1147 | ± | 447 | 0.96 | 0.7 | slow |
| Asp233 | 50.0 | ± | 2.9 | 681 | ± | 148 | 0.5 | | |
| 234-244 | NA | | | | | | | | |
| Ile247 | 35.8 | ± | 3.7 | 959 | ± | 211 | 0.5 | | |
| Ala248 | 35.9 | ± | 1.5 | | | | | | |
| Ser258 | 27.5 | ± | 3.6 | 589 | ± | 182 | 0.87 | 0.7 | slow |
| Arg259 | 18.7 | ± | 1.9 | | | | | | |
| Ile260 | 20.5 | ± | 1.5 | 546 | ± | 191 | 0.5 | | |
| Val261 | 46.5 | ± | 1.9 | | | | | | |
| Tyr264 | 29.5 | ± | 3.5 | | | | | | |
| 266-267 | NA | | | | | | | | |
| Met272 | NA | | | | | | | | |
| Asp273 | 12.8 | ± | 0.9 | 455 | ± | 138 | 0.5 | | |
| Arg275 ^a | 60.5 | ± | 4.5 | | | | | | |
| Arg277 | 39.2 | ± | 2.1 | 358 | ± | 160 | 0.5 | | |
| Gln278 | 24.1 | ± | 2.6 | 390 | ± | 94 | 0.86 | 0.9 | slow |
| Ile279 | 33.8 | ± | 3.4 | 473 | ± | 63 | 0.5 | 2 | fast |
| Glu281 | 20.7 | ± | 0.3 | 396 | ± | 158 | 0.5 | | |
| Ala284 | 19.2 | ± | 3.0 | 560 | ± | 132 | 0.9 | 0.9 | slow |
| Ile287 | 34.5 | ± | 3.8 | 613 | ± | 190 | 0.91 | 0.2 | slow |

^a Residue pair Cys123/Arg275 has overlapping backbone NH assignments. Their resulting CPMG NMR spectra cannot be deconvoluted, yet demonstrate that at least one of the two residues undergoes conformational exchange.

Table A1.II, related to Figure 2.3: Data collection and refinement statistics for the crystal structure of the cTEM-17m chimera (PDB 4ID4).

| Data collection | |
|--------------------------|---------------|
| Space group | P212121 |
| Unit-cell parameters (Å) | |
| a | 36.73 |
| b | 58.72 |
| c | 109.3 |
| Resolution (Å) | 1.05 |
| Completeness (%) | 95.8 (92.6) |
| Redundancy | 7.3 (7.4) |
| I/σ(I) | 27.3 (3.9) |
| R-merge | 0.046 (0.461) |
| Refinement | |
| No. reflections | 101069 |
| R-work/R-free | 11.5/13.8 |
| No. of water | 412 |
| r.m.s. deviations | |
| Bond lengths (Å) | 0.023 |
| Bond angles (°) | 2.1 |

Table A1.III, related to Figure 2.3: Dihedral angles χ_1 and χ_2 of residue 105 in apoTEM-1, TEM-1 acyl-enzyme intermediate, PSE-4 and cTEM-17m.

| | χ_1 (N-C ^α -C ^β -C ^γ) | χ_2 (C ^α -C ^β -C ^γ -C ^δ) | Rotamer ^a |
|------------------------|---|---|----------------------|
| apoTEM-1 (1ZG4) | 191° | 69° | <i>t</i> 80° |
| apoTEM-1 (1BTL) | 194° | 70° | <i>t</i> 80° |
| acyl-TEM-1 (1FQG) | 192° | 71° | <i>t</i> 80° |
| apoPSE-4 (1G68) | 191° | 76° | <i>t</i> 80° |
| apo cTEM-17m (4ID4) | 305° | 124° | <i>m</i> -30° |

^a Nomenclature according to the ‘Penultimate rotamer library’ (Lovell, et al., 2000). The *t*80° conformation has been assigned in all native and mutant apoenzymes of TEM-1 and PSE-4 and in their ligand-bound structures, with the exception of structures with bound boronate inhibitor or β-lactamase inhibitor protein (BLIP) where the *m*-30° conformer has been assigned.

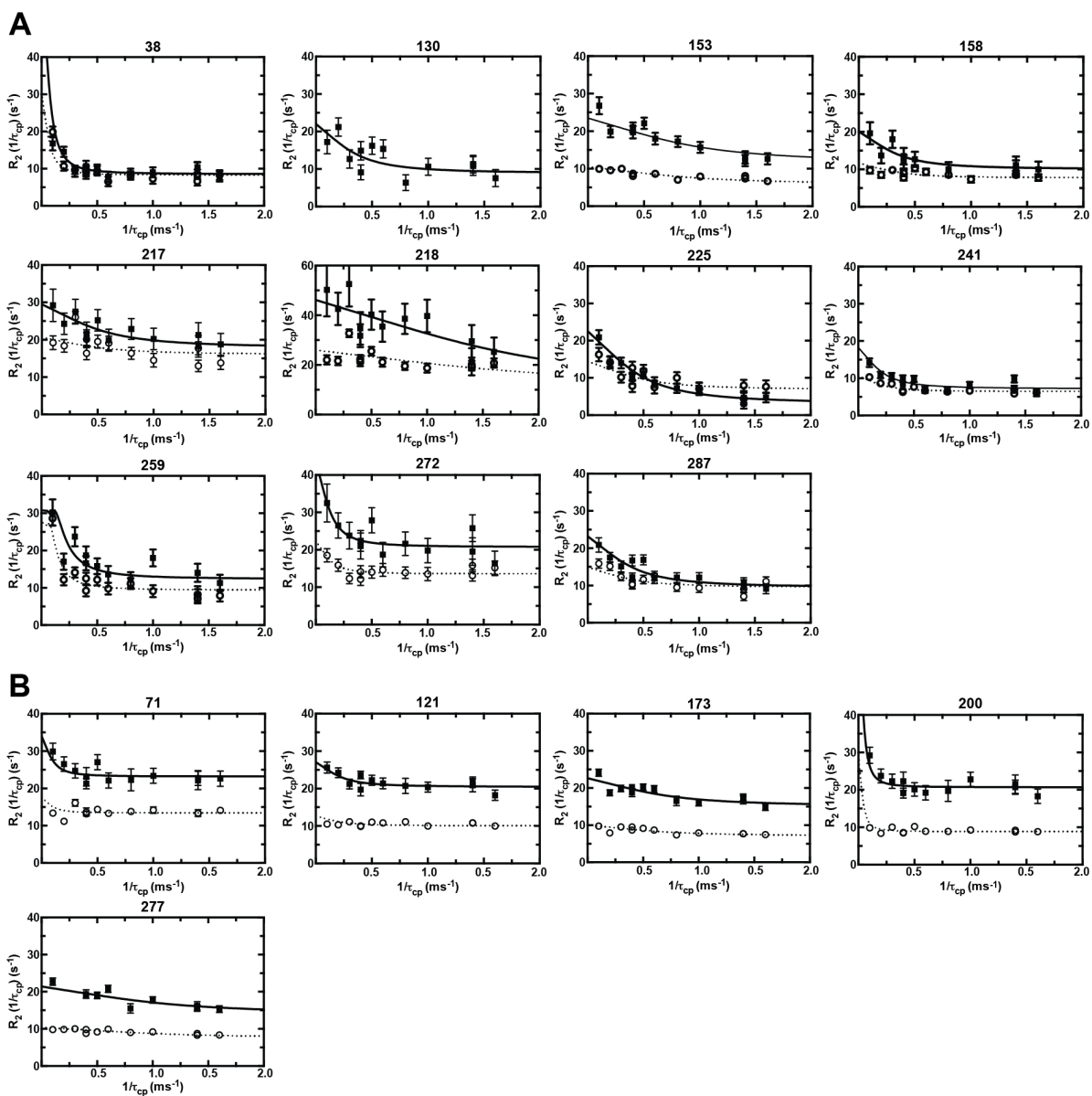


Figure A1.1: CPMG-NMR relaxation curves for TEM-1 (A) and PSE-4 (B) at 800MHz (full line) and 500MHz (dashed line). The residue number appears above each plot.

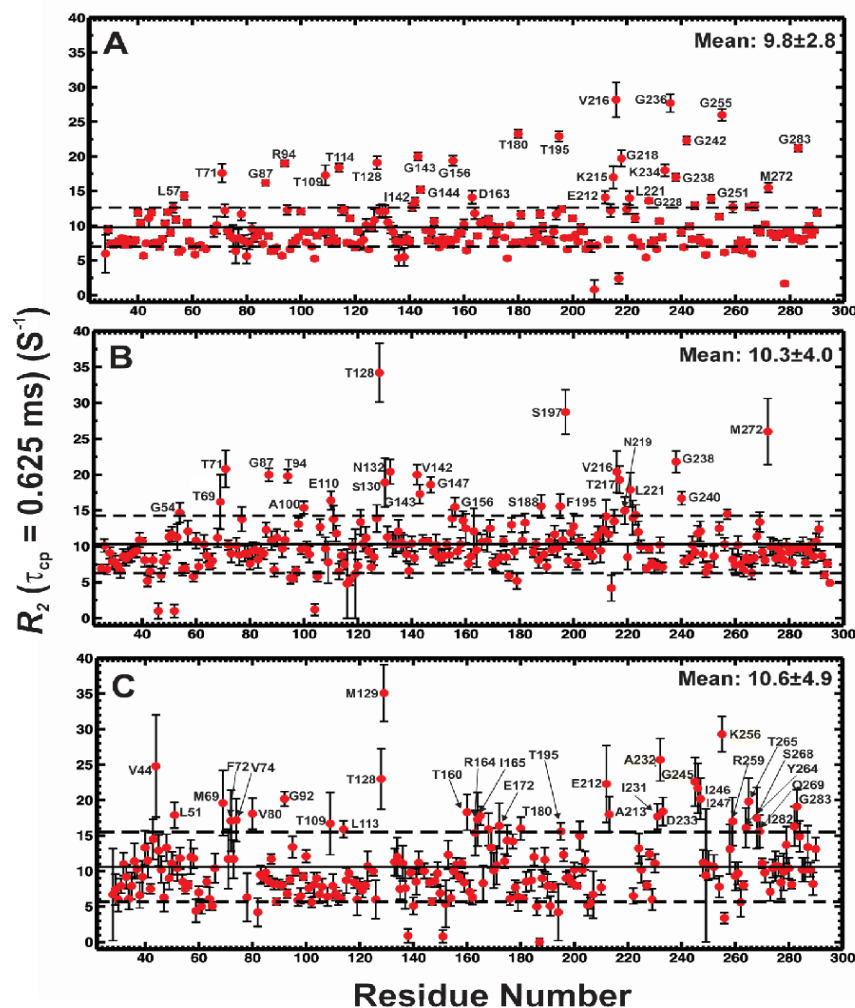


Figure A1.2: Residue-specific transverse relaxation rates (R_2 for $\tau_{cp} = 0.625$ ms) for TEM-1 (A), PSE-4 (B), and cTEM-17m (C).

R_2 values were determined using a 20 ms constant relaxation time version of the TROSY ^{15}N -CPMG experiment where the delay between CPMG 180° refocusing pulses was set to 0.625 ms. Experiments were performed at 18.8 T and 298 K, pH 6.8. Residues with R_2 values > 1 standard deviation above the mean R_2 value (dashed lines) are labeled. Relaxation rates above the overall mean value have been proposed to indicate μs -ms motions that are not suppressed even at the fast CPMG pulsing rates used in the relaxation dispersion experiment (Doucet, et al., 2011). While the specific residues with elevated relaxation rates generally differed, 10 possessed elevated relaxation rates in both TEM-1 and PSE-4 but not cTEM-17m, including Thr71, Val216 and Gly238. Residue 71 is next to the catalytic Ser70, Val216 influences substrate binding and Gly238 modulates the size of the active-site cavity (Huletsky, et al., 1993). In cTEM-17m, Met69, which precedes Ser70, shows an elevated relaxation rate. As Val216 and Gly238 were unassigned in cTEM-17m, those R_2 values cannot be compared.

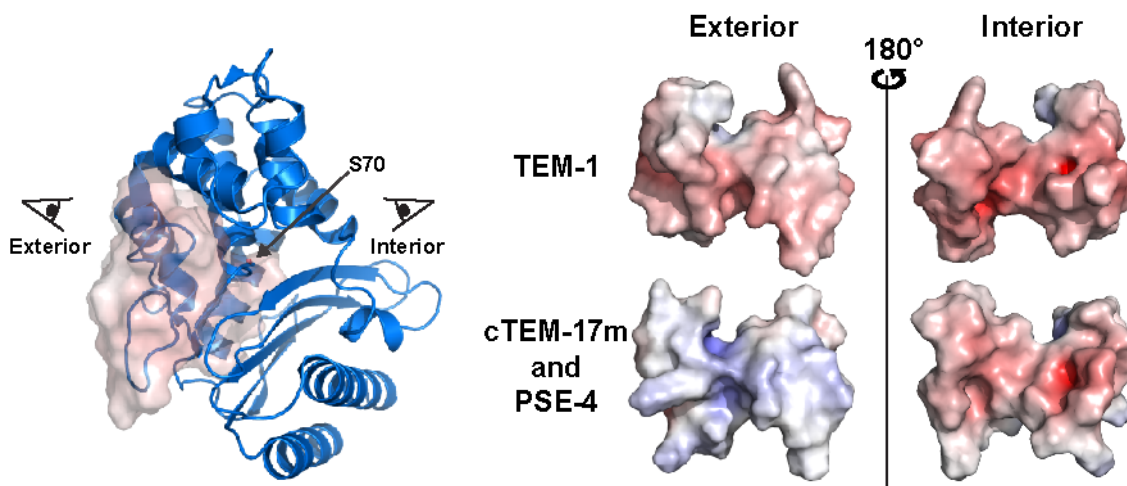


Figure A1.3, related to figure 2.2: Surface charges of the 150-190 region in TEM-1 (top), or cTEM-17 and PSE-4.

The interior surface forms one of the active-site walls. Surface charge was generated using the APBS tool in PyMOL and colored according to a red (negatively charged) to blue (positively charged) scale. The charge difference was most significant on the exterior face, which is more positively charged for PSE-4 and cTEM-17m than TEM-1, while the interior face – forming one of the active-site walls – remained generally negatively charged as in TEM-1.

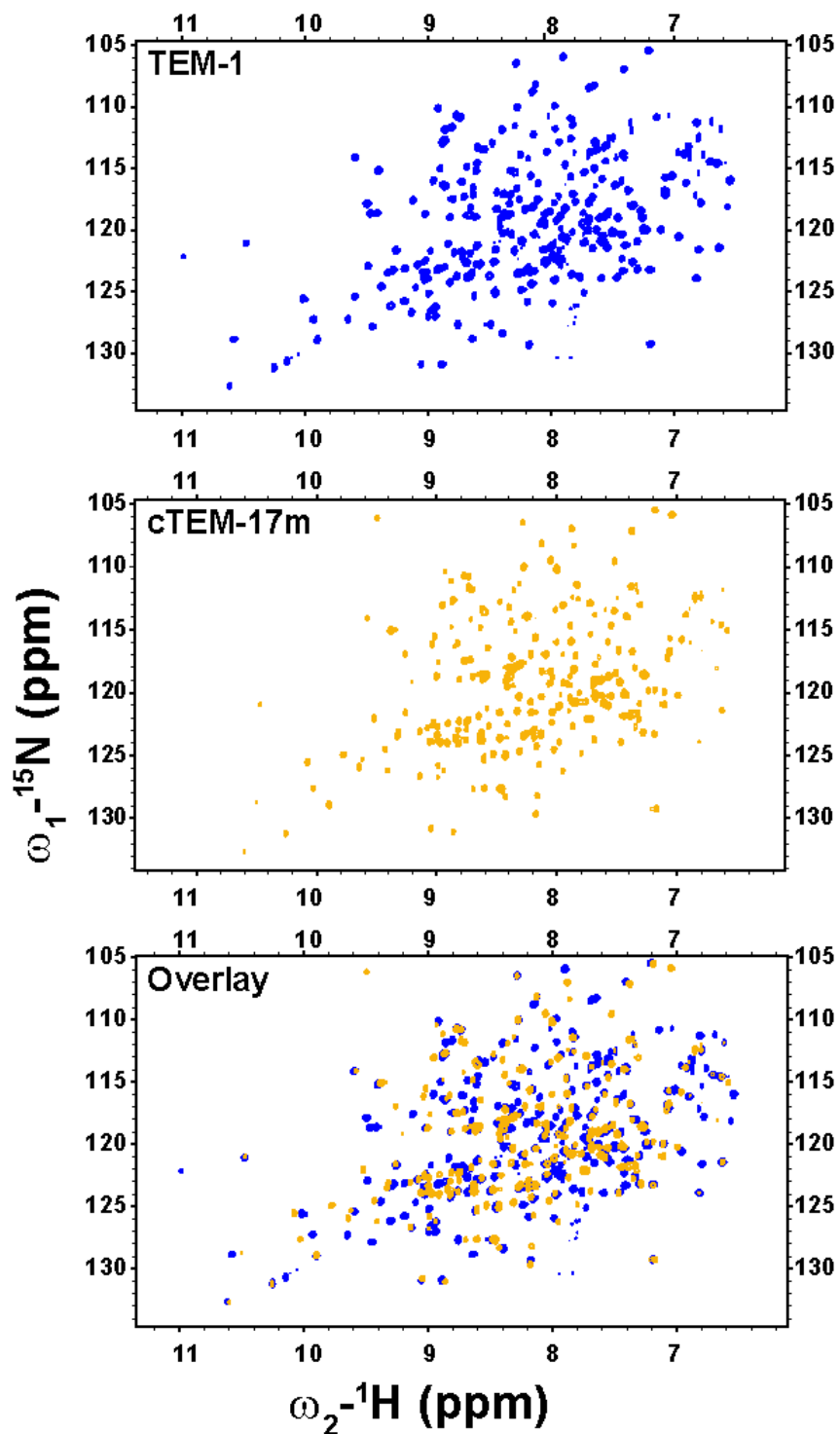


Figure A1.4, related to figure 2.3: ^1H - ^{15}N HSQC spectra for TEM-1 (Savard and Gagné, 2006), cTEM-17m (Morin, et al., 2010) and an overlay of TEM-1/cTEM-17m.

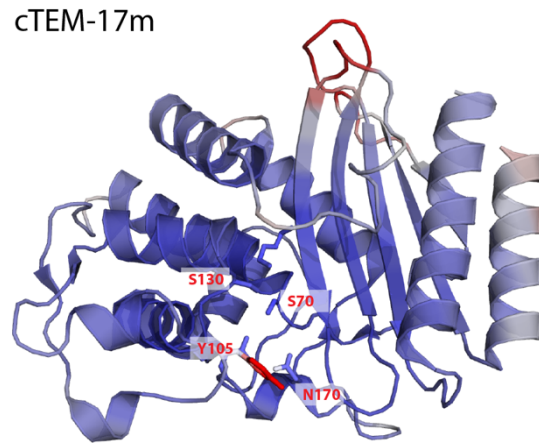
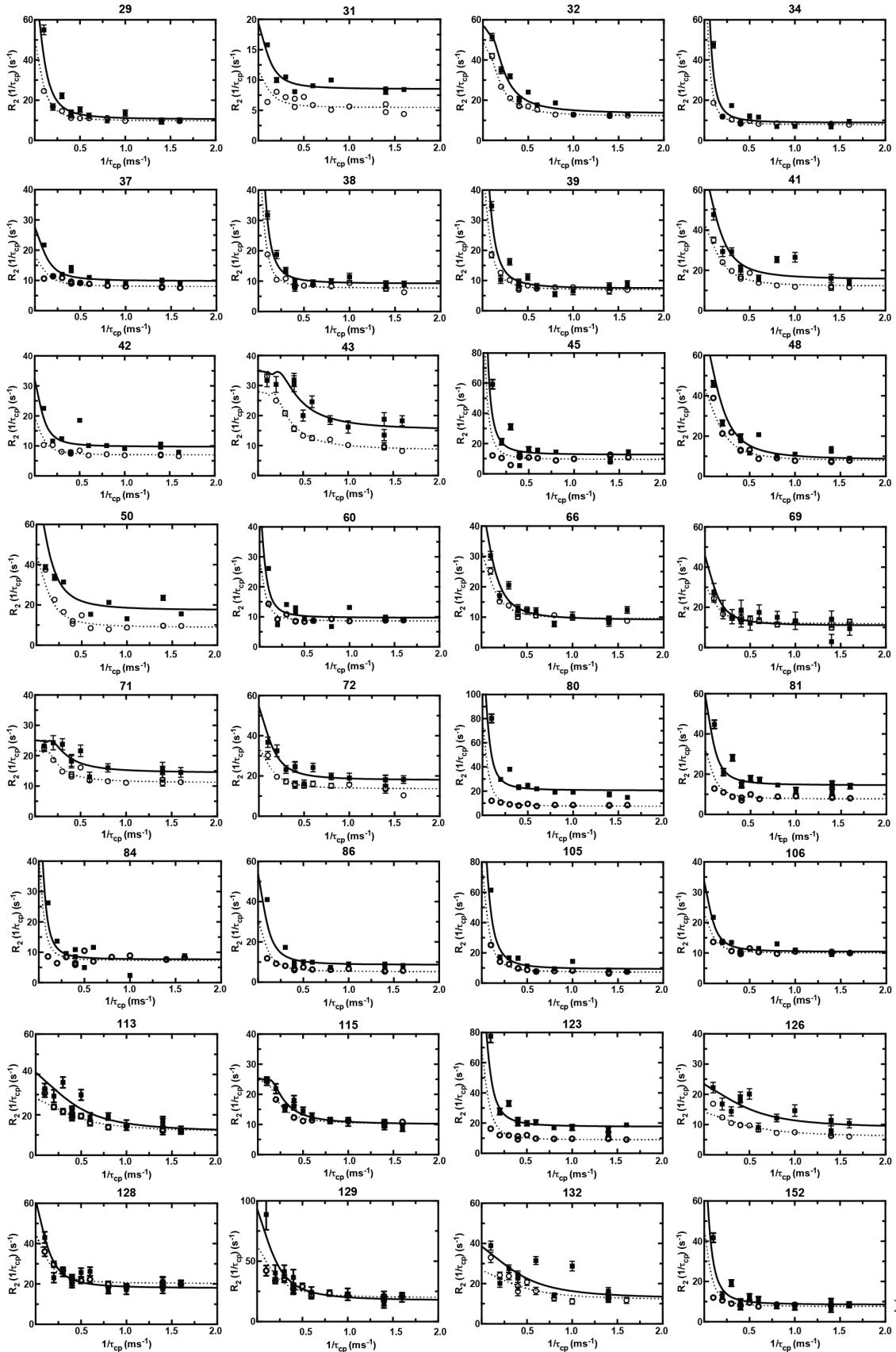


Figure A1.5, related to figure 2.2: Crystallographic B-factors for cTEM-17m.

The deviation from the overall B-factor is colored in a blue to red scheme, where blue is smaller than the mean - 2SD and red is greater than the mean + 2SD of the overall B-factor



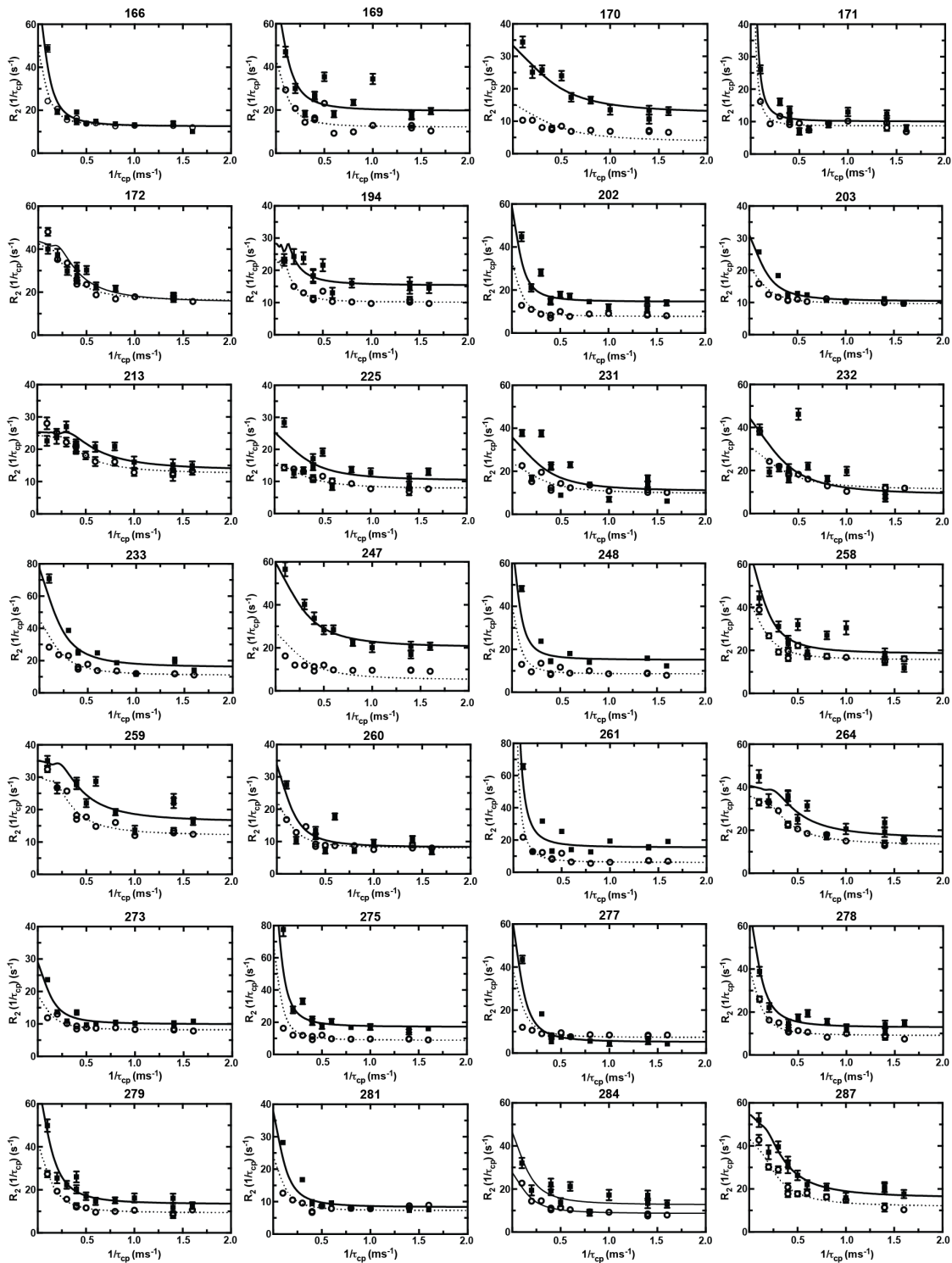


Figure A1.6: CPMG-NMR relaxation curves for cTEM-17m at 800MHz (full line) and/or 600MHz (dashed line). The residue appears above each plot.

ANNEXE 1 SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Doucet, N., Khirich, G., Kovrigin, E.L., and Loria, J.P. (2011). Alteration of Hydrogen Bonding in the Vicinity of Histidine 48 Disrupts Millisecond Motions in RNase A. *Biochemistry* 50, 1723-1730.
- Huletsky, A., Knox, J.R., and Levesque, R.C. (1993). Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J Biol Chem* 268, 3690-3697.
- Lovell, S.C., Word, J.M., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2000). The penultimate rotamer library. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 40, 389-408.
- Morin, S., Clouthier, C.M., Gobeil, S., Pelletier, J.N., and Gagné, S.M. (2010). Backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 Class A - lactamase chimera. *Biomolecular NMR assignments* 4, 127-130.
- Savard, P.Y., and Gagné, S.M. (2006). Backbone dynamics of TEM-1 determined by NMR: evidence for a highly ordered protein. *Biochemistry* 45, 11414-11424.

Annexe 2 – Matériel supplémentaire du chapitre 3

Missing Backbone Assignments

cTEM-19m.

H_N-H²⁶, N-H²⁶, C_α-H²⁶, C_β-H²⁶, C_β-R⁴³, C_β-V⁴⁴, C_α-F⁶⁶, C_β-F⁶⁶, C_β-P⁶⁷, C_β-L⁶⁸, C_α-M⁶⁹, C_β-T⁶⁹, H_N-S⁷⁰, N-S⁷⁰, C_β-S⁷⁰, C_β-T⁷¹, C_β-S⁸², C_β-P¹⁰⁷, C_β-I¹²⁷, C_β-T¹²⁸, C_β-M¹²⁹, C_β-S¹³⁰, C_β-T¹³³, C_β-T¹⁴⁹, C_α-E¹⁶⁶, C_β-L¹⁶⁹, C_β-E¹⁷¹, H_N-K¹⁷³, N-K¹⁷³, C_α-K¹⁷³, C_β-T¹⁸², C_β-T¹⁸⁹, C_β-E²¹², C_β-A²¹³, H_N-D²¹⁴, N-D²¹⁴, C_α-D²¹⁴, C_β-D²¹⁴, C_α-K²¹⁵, C_β-K²¹⁵, H_N-V²¹⁶, N-V²¹⁶, C_β-V²¹⁶, C_β-A²¹⁷, H_N-G²¹⁸, N-G²¹⁸, C_α-G²¹⁸, C_α-P²¹⁹, C_β-P²¹⁹, H_N-L²²⁰, N-L²²⁰, C_α-L²²⁰, C_β-L²²⁰, H_N-L²²¹, N-L²²¹, C_α-L²²¹, C_β-L²²¹, H_N-R²²², N-R²²², C_β-R²²², C_β-F²³⁰, C_β-I²³¹, C_β-A²³², C_β-D²³³, C_α-K²³⁴, C_β-K²³⁴, H_N-S²³⁵, N-S²³⁵, C_α-S²³⁵, C_β-S²³⁵, H_N-G²³⁶, N-G²³⁶, C_α-G²³⁶, H_N-A²³⁷, N-A²³⁷, C_α-A²³⁷, C_β-A²³⁷, H_N-G²³⁸, N-G²³⁸, C_α-G²³⁸, H_N-E²⁴⁰, N-E²⁴⁰, C_α-E²⁴⁰, C_β-E²⁴⁰, H_N-R²⁴¹, N-R²⁴¹, C_α-R²⁴¹, C_β-R²⁴¹, H_N-G²⁴², N-G²⁴², C_α-G²⁴², H_N-S²⁴³, N-S²⁴³, C_α-S²⁴³, C_β-S²⁴³, C_α-R²⁴⁴, C_β-R²⁴⁴, H_N-G²⁴⁵, N-G²⁴⁵, C_α-G²⁴⁵, H_N-I²⁴⁶, N-I²⁴⁶, C_α-I²⁴⁶, C_β-I²⁴⁶, C_β-S²⁵⁸, C_β-Y²⁶⁴, C_β-T²⁶⁵, C_α-T²⁶⁶, C_β-T²⁶⁶, C_α-G²⁶⁷, C_α-S²⁶⁸, C_β-S²⁶⁸, C_α-Q²⁶⁹, C_β-Q²⁶⁹, H_N-M²⁷², N-M²⁷², C_α-M²⁷², C_β-R²⁷⁵, C_β-N²⁷⁶, C_β-I²⁷⁹.

TEM-1(M68L-M69T).

H_N-H²⁶, N-H²⁶, C_α-P²⁷, C_β-E²⁸, C_β-V³³, C_β-L⁵¹, C_β-N⁵², C_α-S⁵⁹, C_β-S⁵⁹, C_α-F⁶⁰, C_β-F⁶⁰, C_α-R⁶¹, C_β-R⁶¹, C_β-R⁶⁵, C_α-F⁶⁶, C_β-P⁶⁷, H_N-S⁷⁰, N-S⁷⁰, C_β-S⁷⁰, C_β-T⁷¹, C_β-K⁷³, C_β-Q⁹⁰, C_β-L⁹¹, C_α-L¹¹³, C_β-L¹¹³, C_α-T¹¹⁴, C_β-T¹¹⁴, H_N-D¹¹⁵, N-D¹¹⁵, C_α-D¹¹⁵, C_β-D¹¹⁵, C_β-S¹²⁴, C_β-A¹²⁶, C_β-T¹⁴⁰, C_α-G¹⁴⁴, C_β-K¹⁴⁶, C_α-H¹⁵³, C_β-N¹⁷⁰, C_β-T¹⁸¹, C_α-M¹⁸², C_β-M¹⁸², C_β-K¹⁹², C_β-S²⁰³, C_α-S²³⁵, C_β-S²³⁵, C_α-G²³⁶, H_N-A²³⁷, N-A²³⁷, C_α-G²³⁸, C_β-R²⁴¹, C_α-P²⁵², C_β-P²⁵², C_β-V²⁶¹, C_α-R²⁷⁵, C_α-S²⁸⁵.

Annexe 3 – Matériel supplémentaire du chapitre 4

Table A3.I. Refers to Figure 4.2; (a) Data collection and refinement statistics and (b) C α RMSD and secondary structure matching RMSD (in parentheses) comparison for crystal structures of the chimeras cTEM-2m (PDB 4MEZ) and cTEM-19m (PDB 4R4R and 4R4S).

(a)

| | cTEM-19m | | cTEM-2m |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | PDB 4R4R | PDB 4R4S | PDB 4MEZ |
| Data collection | | | |
| Space group | P 21 21 21 | P 21 21 21 | P1 |
| Unit-cell parameters (Å) | | | |
| a | 36.69 | 36.71 | 34.33 |
| b | 58.79 | 58.71 | 55.07 |
| c | 109.83 | 109.77 | 77.68 |
| Resolution (Å) | 1.20 | 1.10 | 2.05 |
| Completeness (%) | 98.3 (91.6) | 98.3 (84.5) | 99.2 (97.2) |
| Average redundancy | 3.0 (2.6) | 5.6 (3.2) | 7.9 (5.9) |
| I/ σ (I) | 16.3 (4.3) | 21.3 (3.4) | 11.8 (3.5) |
| R-merge (%) | 3.6 (23.6) | 4.1 (28.6) | 15.2 (39.2) |
| Refinement | | | |
| R-work (%) | 10.5 | 10.4 | 19.2 |
| R-free (%) | 13.8 | 12.8 | 24.8 |
| No. of water | 408 | 464 | 346 |
| r.m.s. deviations | | | |
| Bond lengths (Å) | 0.021 | 0.021 | 0.020 |
| Bond angles (°) | 2.0 | 2.0 | 2.0 |

(b)

| | TEM-1 (1XPB - 1.9 Å) | cTEM-2m (4ID4 - 1.05 Å) | cTEM-19m (4R4S - 1.12 Å) |
|------------------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| TEM-1 (1XPB - 1.9 Å) | -- | 0.71 (0.42) | 0.93 (0.51) |
| PSE-4 (1G68 - 1.95 Å) | 1.35 (1.01) | 1.42 (1.12) | 1.44 (1.11) |
| cTEM-17m (4MEZ - 2.05 Å) | 0.93 (0.55) | 0.80 (0.59) | 0.14 (0.28) |

*Crystal structure resolution indicated next to PDB code.

Table A3.II. Refers to Figure 4.3; Dynamics of the naturally evolved class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4 and chimeric β -lactamases cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m.

Protein-averaged, squared generalized order parameters (S^2) obtained by MD simulations and NMR relaxation for the amide NH bonds and $C\alpha$ -RMSF extracted from the MD simulations.

| | NMR S^2 | MD simulation S^2 | RMSF (nm) |
|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| TEM-1 | 0.90 ± 0.05 | 0.87 ± 0.05 | 0.07 ± 0.03 |
| PSE-4 | 0.87 ± 0.05 | 0.86 ± 0.05 | 0.08 ± 0.04 |
| cTEM-2m | N.D. | 0.87 ± 0.05 | 0.09 ± 0.04 |
| cTEM-17m | 0.89 ± 0.05 | 0.87 ± 0.05 | 0.09 ± 0.05 |
| cTEM-19m | N.D. | 0.86 ± 0.05 | 0.10 ± 0.04 |

N.D.: not determined.

Table A3.III. Refers to Figure 4.3; $C\alpha$ -RMSD between the average structure from each 2 μ s simulation and the crystal structure used for that simulation TEM-1 (PDB 1XPB), PSE-4 (PDB 1G68), cTEM-2m (PDB 4MEZ), cTEM-17m (PDB 4ID4) and cTEM-19m (PDB 4R4S).

| | Repetition 1 | Repetition 2 | Repetition 3 | Average |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| PSE-4 | 1.21 | 1.11 | 1.40 | 1.24 ± 0.12 |
| TEM-1 | 1.18 | 0.84 | 0.82 | 0.95 ± 0.20 |
| cTEM-2m | 1.14 | 1.03 | 1.18 | 1.12 ± 0.06 |
| cTEM-17m | 1.67 | 0.915 | 1.01 | 1.20 ± 0.34 |
| cTEM-19m | 1.69 | 1.624 | 1.52 | 1.61 ± 0.07 |

Table A3.IV. Refers to Figure 4.3; Per residue S^2 extracted from MD simulations for TEM-1, PSE-4, cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m compared to the NMR-determined S^2 for TEM-1, PSE-4 and cTEM-17m.

Excel spreadsheet submitted with the manuscript

Table A3.V. Refers to Figure 4.3; Per residue $C\alpha$ -RMSF extracted from triplicate MD simulations

of 2 μ s each for TEM-1, PSE-4, cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m.

Excel spreadsheet submitted with the manuscript

Table A3.VI. Refers to Figure 4.3; Differences in measured R_2 ($1/\tau_{cp}$) at fast ($\tau_{cp} = 0.625$ ms) and slow ($\tau_{cp} = 10$ ms) pulsing rates

(ΔR_2 values $\geq 7s^{-1}$), derived from TROSY-based ^{15}N -CPMG relaxation dispersion experiments, and unassigned residues (NA) for the chimeras cTEM-2m and cTEM-19m.

Excel spreadsheet submitted with the manuscript

Supplementary Table 7. Comparison of the dynamism of the active-site walls using the S2 (ps-ns), C α RMSF (ns- μ s) and k_{ex} (ns- μ s) on the different timescales.

| | TEM-1 | | | PSE-4 | | | cTEM-2m | | | cTEM-17m | | | cTEM-19m | | |
|---|--------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------|--|--------------------|---------------------------|---|--------------------|---------------------------|--|
| | S ² | RMSF (nm) | k _{ex} (s ⁻¹) | S ² | RMSF (nm) | k _{ex} (s ⁻¹) | S ² | RMSF (nm) | k _{ex} (s ⁻¹) | S ² | RMSF (nm) | k _{ex} (s ⁻¹) | S ² | RMSF (nm) | k _{ex} (s ⁻¹) |
| Protein average | | | | | | | | | | | | | | | |
| S70 (69-73) | 0.87 ± 0.05 | 0.07 ± 0.02 | - | 0.86 ± 0.05 | 0.08 ± 0.04 | - | 0.87 ± 0.05 | 0.09 ± 0.04 | - | 0.87 ± 0.05 | 0.09 ± 0.05 | - | 0.86 ± 0.05 | 0.10 ± 0.04 | - |
| Y105 (103-106) | 0.91 ± 0.01 | 0.05 ± 0.01 | - | 0.90 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | - | 0.89 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 937 ± 254 (69) | 0.90 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | 480 ± 110 (69, 72) | 0.89 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 667 ± 141 (66, 72, 73) |
| SDN (129-132) | 0.86 ± 0.01 | 0.08 ± 0.02 | - | 0.85 ± 0.01 | 0.10 ± 0.03 | - | 0.85 ± 0.01 | 0.14 ± 0.05 | - | 0.86 ± 0.01 | 0.08 ± 0.01 | 300 ± 90 (105, 106) | 0.85 ± 0.01 | 0.11 ± 0.04 | 1,219 ± 225 (105) |
| Ω -loop (162-179) | 0.89 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | - | 0.87 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | - | 0.88 ± 0.01 | 0.09 ± 0.02 | 480 ± 205 (130, 131) | 0.88 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | 775 ± 270 (128, 129) | 0.87 ± 0.02 | 0.07 ± 0.02 | 979 ± 203 (128, 129, 130, 131) |
| Hinge leading in Ω -loop (155-160) | 0.85 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | - | 0.85 ± 0.02 | 0.09 ± 0.02 | 2,019 ± 813 (173) | 0.85 ± 0.02 | 0.10 ± 0.03 | - | 0.85 ± 0.03 | 0.14 ± 0.09 | 586 ± 134 (166, 170) | 0.82 ± 0.03 | 0.17 ± 0.09 | 333 ± 100 (166, 170); Gly172: 2105 ± 842 |
| Tip of the Ω -loop (171-178) | 0.79 ± 0.02 | 0.13 ± 0.01 | - | 0.80 ± 0.03 | 0.14 ± 0.07 | - | 0.81 ± 0.03 | 0.12 ± 0.02 | - | 0.80 ± 0.03 | 0.12 ± 0.04 | - | 0.79 ± 0.03 | 0.15 ± 0.02 | - |
| 214-218 | 0.79 ± 0.01 | 0.10 ± 0.01 | - | 0.80 ± 0.03 | 0.13 ± 0.02 | 2,019 ± 813 (173) | 0.78 ± 0.04 | 0.13 ± 0.03 | - | 0.80 ± 0.04 | <u>0.21 ± 0.15</u> | - | 0.78 ± 0.03 | <u>0.23 ± 0.12</u> | - |
| connector (214-225) | 0.80 ± 0.04 | 0.15 ± 0.05 | - | 0.85 ± 0.01 | 0.07 ± 0.02 | - | 0.76 ± 0.04 | <u>0.25 ± 0.10</u> | 1,316 ± 868 (212, 217, 221) | 0.77 ± 0.02 | <u>0.24 ± 0.08</u> | - | 0.78 ± 0.03 | 0.17 ± 0.04 | 1,131 ± 423 (213, 217) |
| 234-244 | 0.81 ± 0.04 | 0.14 ± 0.05 | 1,387 ± 368 (225) | 0.85 ± 0.01 | 0.07 ± 0.02 | - | 0.78 ± 0.04 | <u>0.21 ± 0.06</u> | 1,339 ± 784 (212, 217, 221) | 0.78 ± 0.02 | <u>0.21 ± 0.07</u> | 1,098 ± 443 (225) | 0.78 ± 0.03 | 0.17 ± 0.04 | 816 ± 208 (213, 217, 225) |
| β -strand 3 (230-237) | 0.88 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 646 ± 29 (241) | 0.89 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | - | 0.88 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | 611 ± 221 (238, 241, 243, 245, 246) | 0.88 ± 0.01 | 0.07 ± 0.02 | - | 0.86 ± 0.02 | 0.09 ± 0.01 | - |
| Turn β -strand 3/ β -strand 4 (238-242) | 0.88 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 646 ± 29 (241) | 0.90 ± 0.01 | 0.05 ± 0.01 | - | 0.88 ± 0.01 | 0.08 ± 0.01 | 600 ± 271 (238, 241, 243) | 0.89 ± 0.01 | 0.07 ± 0.02 | 910 ± 205 (231, 232, 233) | 0.88 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 796 ± 250 (230, 231, 233) |
| HI (26-41) | 0.88 ± 0.01 | 0.08 ± 0.01 | - | 0.85 ± 0.01 | 0.10 ± 0.01 | - | 0.88 ± 0.01 | 0.09 ± 0.01 | 467 ± 214 (38) | 0.87 ± 0.01 | 0.08 ± 0.03 | - | 0.84 ± 0.02 | 0.12 ± 0.02 | - |
| HI1 (272-288) | 0.88 ± 0.01 | 0.10 ± 0.04 | 1,186 ± 335 (287) | 0.86 ± 0.02 | 0.09 ± 0.02 | - | 0.87 ± 0.02 | 0.11 ± 0.02 | 800 ± 140 (276-277) | 0.87 ± 0.01 | 0.13 ± 0.04 | 450 ± 60 (29, 32, 37, 38, 39, 41) 440 ± 50 | 0.87 ± 0.01 | 0.10 ± 0.02 | 289 ± 53 (28, 29, 32, 38, 41) |
| | | | | | | | | | | | | 276, 277, 278, 279, 280, 284, 287) | 0.87 ± 0.01 | 0.12 ± 0.03 | 843 ± 61 (275, 276, 277, 278, 279, 280, 284, 287) |

k_{ex} : residues used for the fitting are indicated between bracket

Table A3.VIII. Refers to Table 4.I; Kinetic parameters for hydrolysis of the cephalosporins cephalothin (CF), cefazolin (CZ) and cefotaxime (CTX) and penicillins benzylpenicillin (BZ) and carbenicillin (CB) by the parental β -lactamases TEM-1 and PSE-4, the chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m and the deconvoluted mutants in the cTEM-17m context (cTEM-18m(M68L) and cTEM-18m(M69T)) and the TEM-1 context (TEM-1(M68L) and TEM-1(M69T)).

| | Variant | k_{cat} (s^{-1}) | K_M (μM) | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) |
|-----|-----------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| CF | TEM-1 ^a | 84 ± 12 | 180 ± 28 | 4.3 × 10 ⁵ |
| | cTEM-17m ^a | 120 ± 8 | 470 ± 80 | 2.4 × 10 ⁵ |
| | TEM-1(M68L) | 31 ± 7 | 100 ± 30 | 3.0 × 10 ⁵ |
| | cTEM-18m(M68L) | 34 ± 5 | 80 ± 38 | 5.0 × 10 ⁵ |
| | TEM-1(M69T) | 7 ± 4 | 130 ± 11 | 5.2 × 10 ⁴ |
| | cTEM-18m(M69T) | 1.4 ± 0.3 | 12 ± 3 | 1.2 × 10 ⁵ |
| | cTEM-2m | 2.8 ± 0.8 | 46 ± 19 | 6.1 × 10 ⁴ |
| | cTEM-19m | 6 ± 0.5 | 68 ± 14 | 8.8 × 10 ⁵ |
| | PSE-4 ^a | 0.80 ± 0.01 | 64 ± 34 | 1.3 × 10 ⁴ |
| CZ | TEM-1 ^a | 55 ± 8 | 130 ± 9 | 4.2 × 10 ⁵ |
| | cTEM-17m ^a | 75 ± 21 | 600 ± 90 | 1.2 × 10 ⁵ |
| | TEM-1(M68L) | 59 ± 21 | 500 ± 178 | 1.2 × 10 ⁵ |
| | cTEM-18m(M68L) | 23 ± 5 | 170 ± 43 | 1.4 × 10 ⁵ |
| | TEM-1(M69T) | 9 ± 2 | 300 ± 121 | 3.0 × 10 ⁴ |
| | cTEM-18m(M69T) | 4 ± 0.6 | 83 ± 18 | 5.0 × 10 ⁴ |
| | cTEM-2m | 3.3 ± 0.1 | 75 ± 1 | 4.4 × 10 ⁴ |
| | cTEM-19m | 6 ± 0.3 | 120 ± 5 | 5.0 × 10 ⁴ |
| | PSE-4 ^a | 1.9 ± 0.3 | 140 ± 39 | 1.3 × 10 ⁴ |
| CTX | TEM-1 ^a | 0.74 ± 0.1 | 840 ± 160 | 8.8 × 10 ² |
| | cTEM-17m ^a | 0.14 ± 0.04 | 260 ± 100 | 5.6 × 10 ² |
| | TEM-1(M68L) | 0.06 ± 0.02 | 170 ± 72 | 3.6 × 10 ² |
| | cTEM-18m(M68L) | 0.07 ± 0.03 | 260 ± 73 | 2.5 × 10 ² |
| | TEM-1(M69T) | 0.03 ± 0.02 | 280 ± 151 | 1.1 × 10 ² |
| | cTEM-18m(M69T) | 0.06 ± 0.02 | 430 ± 78 | 1.4 × 10 ² |
| | cTEM-2m | 0.02 ± 0.01 | 240 ± 40 | 8.2 × 10 ¹ |
| | cTEM-19m | 0.008 ± 0.002 | 110 ± 37 | 7.0 × 10 ¹ |
| | PSE-4 ^a | 0.03 ± 0.01 | 200 ± 30 | 1.5 × 10 ² |
| BZ | TEM-1 ^a | 450 ± 100 | 20 ± 3 | 2.3 × 10 ⁷ |
| | cTEM-17m ^a | 480 ± 46 | 28 ± 8 | 1.7 × 10 ⁷ |
| | TEM-1(M68L) | 310 ± 19 | 11 ± 3 | 2.8 × 10 ⁷ |
| | cTEM-18m(M68L) | 400 ± 50 | 31 ± 17 | 1.3 × 10 ⁷ |
| | TEM-1(M69T) | 120 ± 3 | 7 ± 1 | 1.7 × 10 ⁷ |
| | cTEM-18m(M69T) | 20 ± 5 | 6 ± 4 | 3.3 × 10 ⁶ |

| | | | | |
|----|-----------------------|----------------|-------------|-------------------|
| | cTEM-2m | 83 ± 2 | 7 ± 1 | 1.2×10^7 |
| | cTEM-19m* | $230 \pm 19^*$ | $< 1^*$ | - |
| | PSE-4 ^a | 630 ± 110 | 16 ± 2 | 3.9×10^7 |
| | TEM-1 ^a | 92 ± 4 | 49 ± 12 | 1.9×10^6 |
| | cTEM-17m ^a | 37 ± 2 | 22 ± 4 | 1.7×10^6 |
| | TEM-1(M68L) | 51 ± 3 | 28 ± 5 | 1.8×10^6 |
| | cTEM-18m(M68L) | 65 ± 13 | 37 ± 14 | 1.8×10^6 |
| CB | TEM-1(M69T) | 31 ± 3 | 12 ± 5 | 2.6×10^6 |
| | cTEM-18m(M69T) | 10 ± 5 | 26 ± 21 | 3.9×10^6 |
| | cTEM-2m | 24 ± 1 | 16 ± 3 | 1.5×10^6 |
| | cTEM-19m | 25 ± 6 | 27 ± 10 | 9.3×10^5 |
| | PSE-4 ^a | 500 ± 92 | 64 ± 5 | 7.8×10^6 |

^a Data from Clouthier *et al.* (Clouthier et al., 2012)

* k_{cat} (apparent) and estimated K_M due to saturation at a substrate concentration $\geq 5 \mu\text{M}$.

| Residue | 68 | 69 | 150 | 153 | 154 | 155 | 158 | 159 | 165 | 168 | 172 | 173 | 174 | 175 | 177 | 182 | 184 | 186 | 188 |
|----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TEM-1 | M | M | A | H | N | M | H | V | W | E | A | I | P | N | E | M | A | M | T |
| cTEM-2m | L | T | A | H | N | M | H | V | W | E | A | I | P | N | E | M | A | M | T |
| cTEM-17m | M | M | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cTEM-19m | L | T | D | R | Q | I | K | E | I | D | G | K | L | G | L | T | K | I | S |
| PSE-4 | L | T | | | | | | | | | | | | | | | | | |

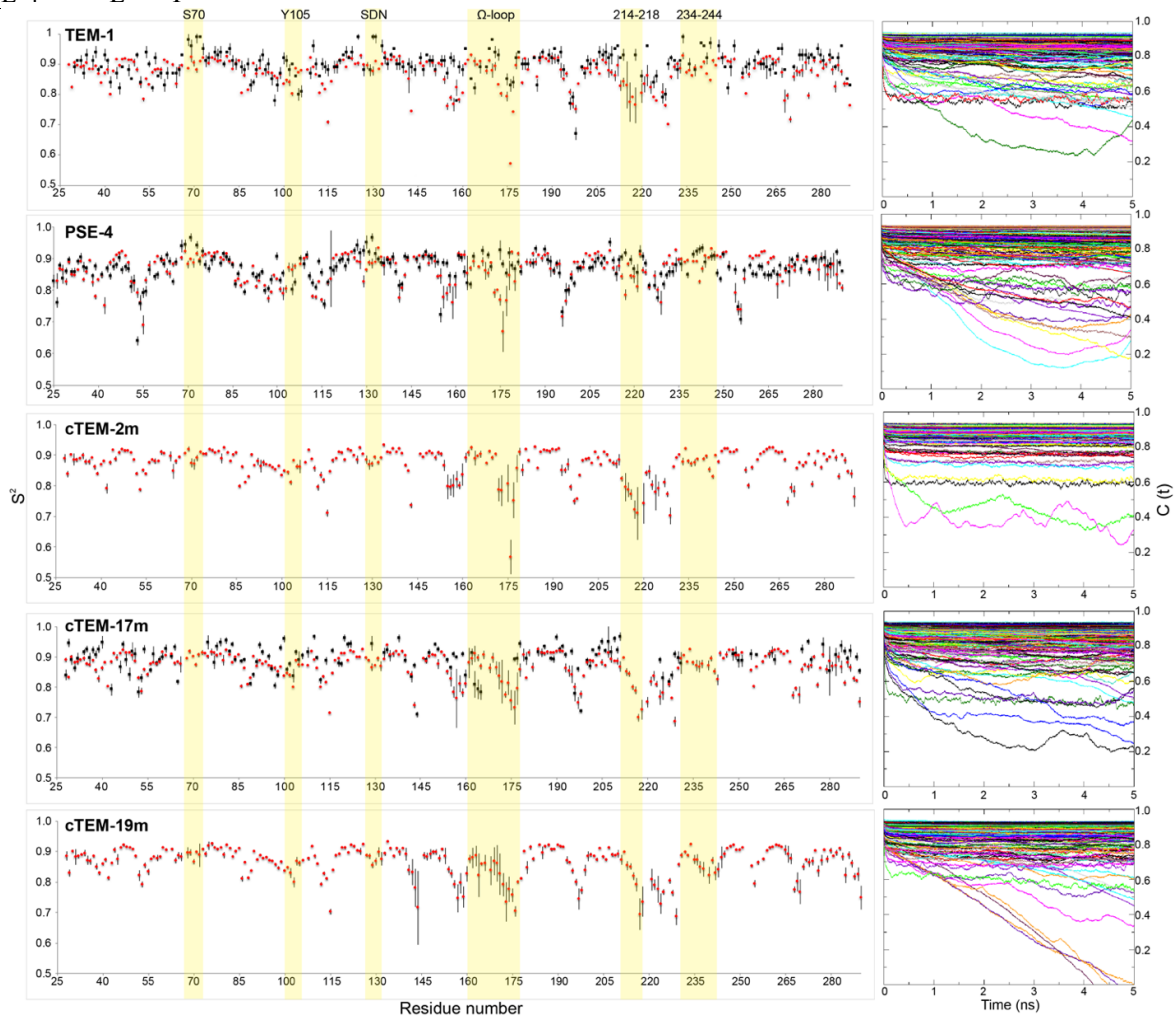


Figure A3.1. Refers to Figure 4.3; Sequence relation in the exchanged regions of the chimeras (residues 66-73 and 150-190) to the parental TEM-1 and PSE-4 class A β -lactamases and generalized squared order parameters (S^2) along the protein sequence for the amide NH bonds.

MD-derived (red) and NMR relaxation (black) S^2 are compared for TEM-1 and PSE-4 and the chimera cTEM-17m. MD-derived S^2 (red) are shown for cTEM-2m and cTEM-19m. The mean MD-NMR S^2 difference (or Δ) was the highest for Asp176 ($\Delta = 0.22$ in TEM-1, 0.21 in PSE-4 and 0.16 in cTEM-17m), Asp115 ($\Delta = 0.17$ in TEM-1; no value in cTEM-17m), Gly143 ($\Delta = 0.16$ in TEM-1 and 0.13 in cTEM-17m) and Trp229 ($\Delta = 0.21$ in TEM-1 and 0.22 in cTEM-17m). Examples of the autocorrelation functions for all residues for one among the 100 analyzed 10 ns segments is shown on the right.

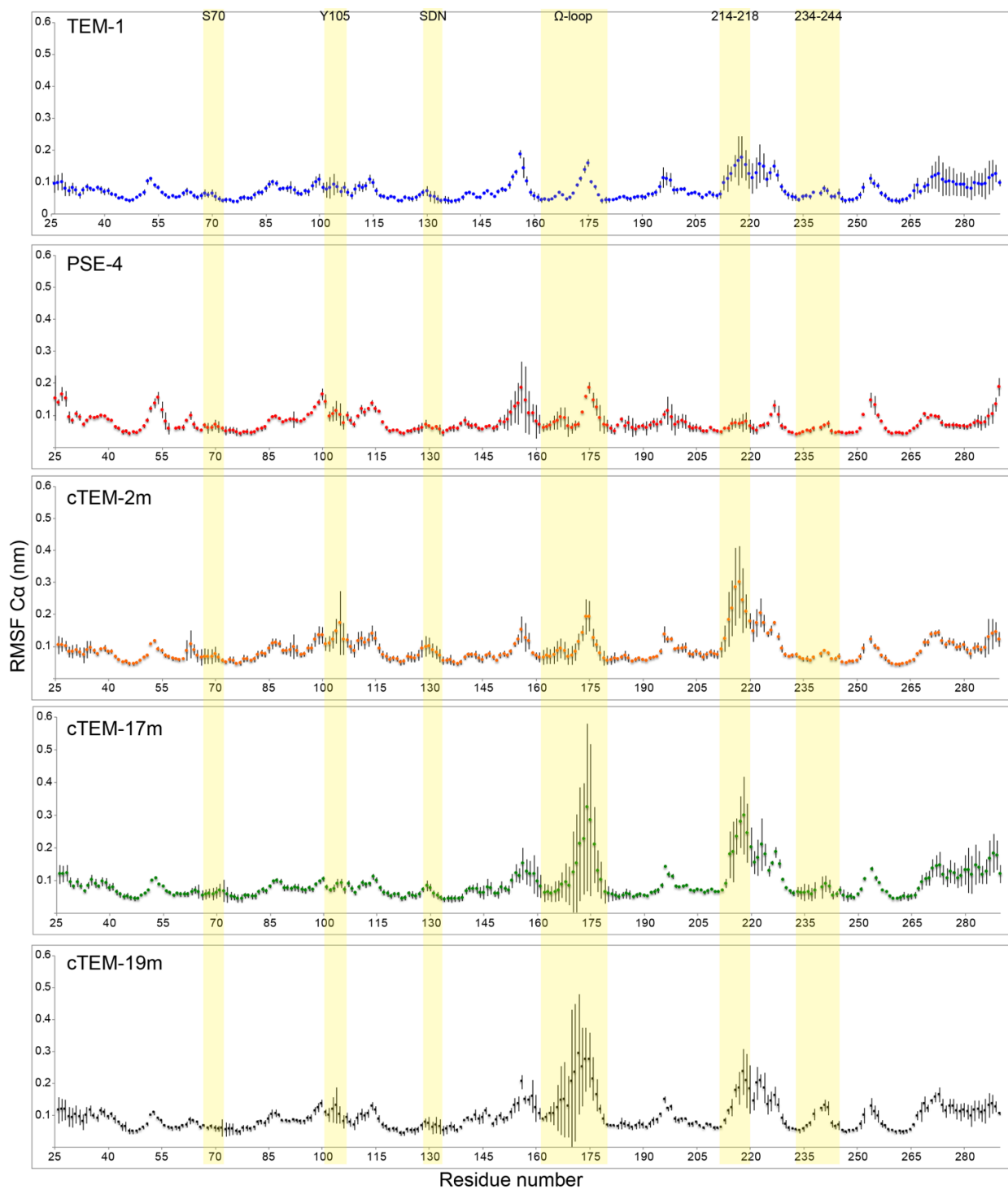


Figure A3.2. Refers to Figure 4.3; C α RMSF derived from triplicate 2 μ s MD simulations for the parental class A β -lactamases TEM-1 and PSE-4 and the chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m.

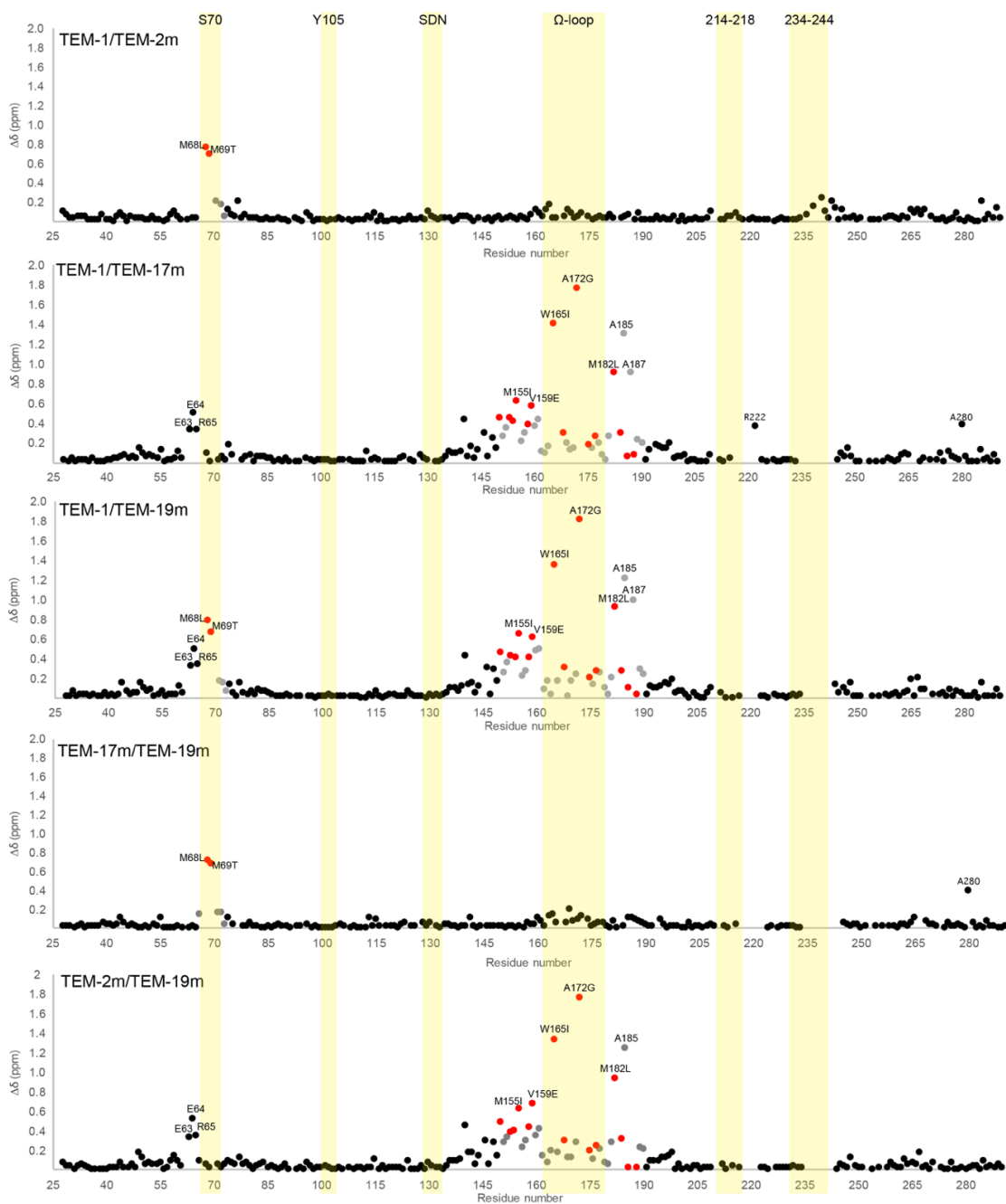


Figure A3.3. Refers to Figure 4.3 and 4.4; Effect of the recombination of regions 66-73 and 150-190 on the backbone chemical shifts.

Comparison of the chimeras cTEM-2m, cTEM-17m and cTEM-19m to the parental TEM-1 class A β -lactamases and comparisons of cTEM-2m and cTEM-17m to cTEM-19m. Exchanged residues relative to TEM-1 sequence are colored red while residues in the exchanged regions (66 to 73 and 150 to 190) are colored grey.

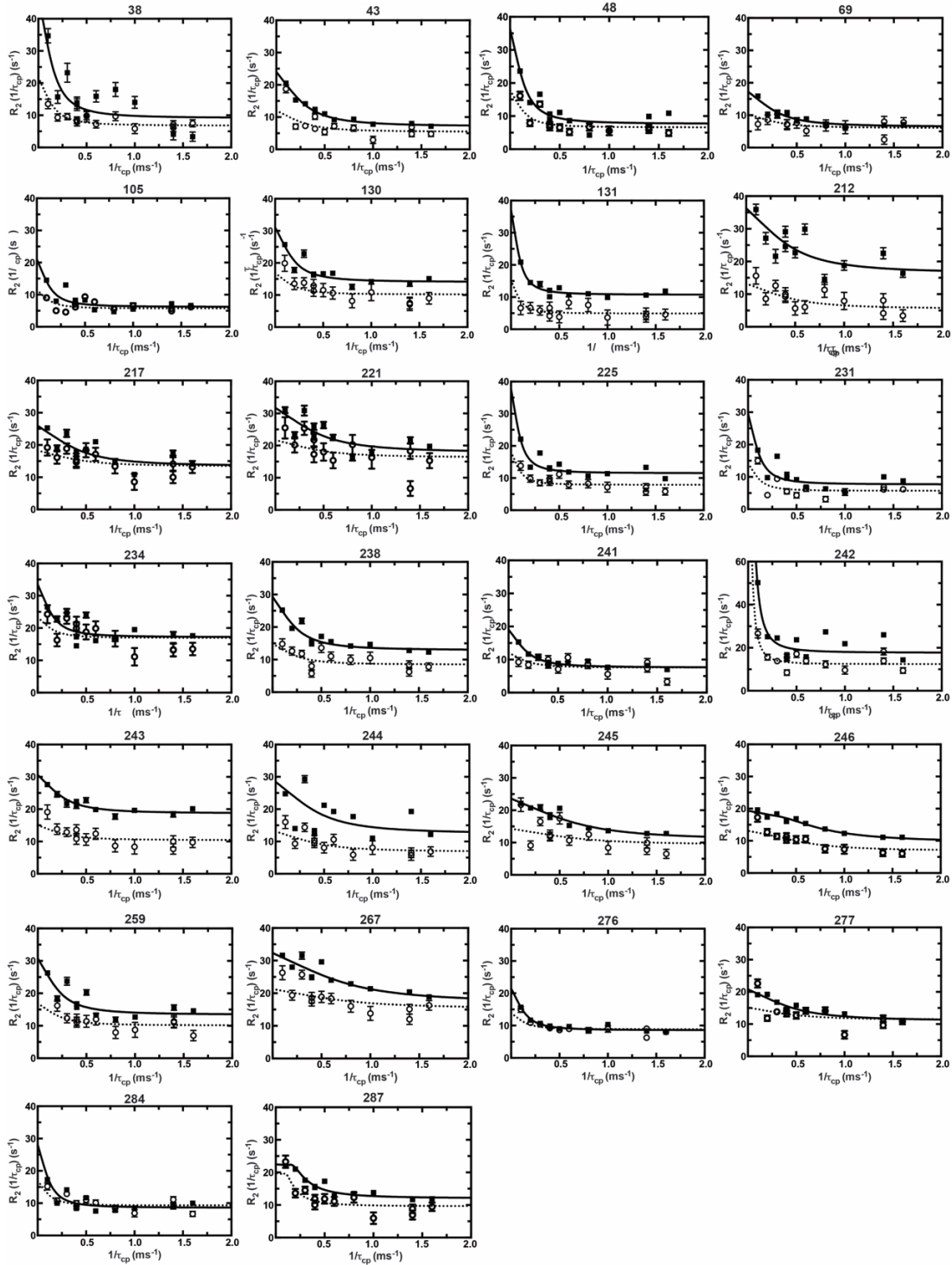
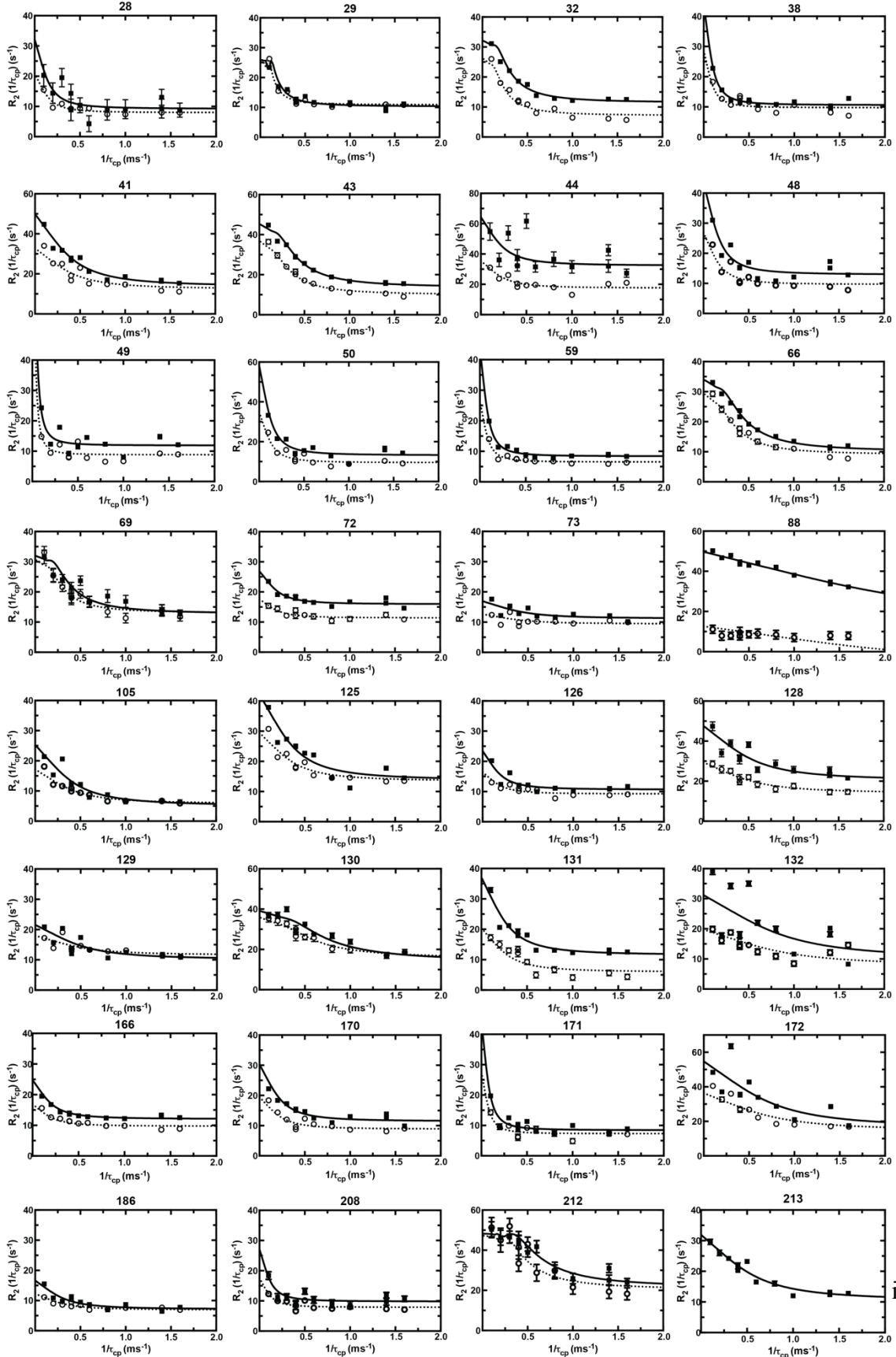


Figure A3.4a. Refers to Figure 4.3; ^{15}N -CPMG relaxation dispersion curves for cTEM-2m at 800 MHz (full line) and 500 MHz (dashed line). The residue number appears above each plot.



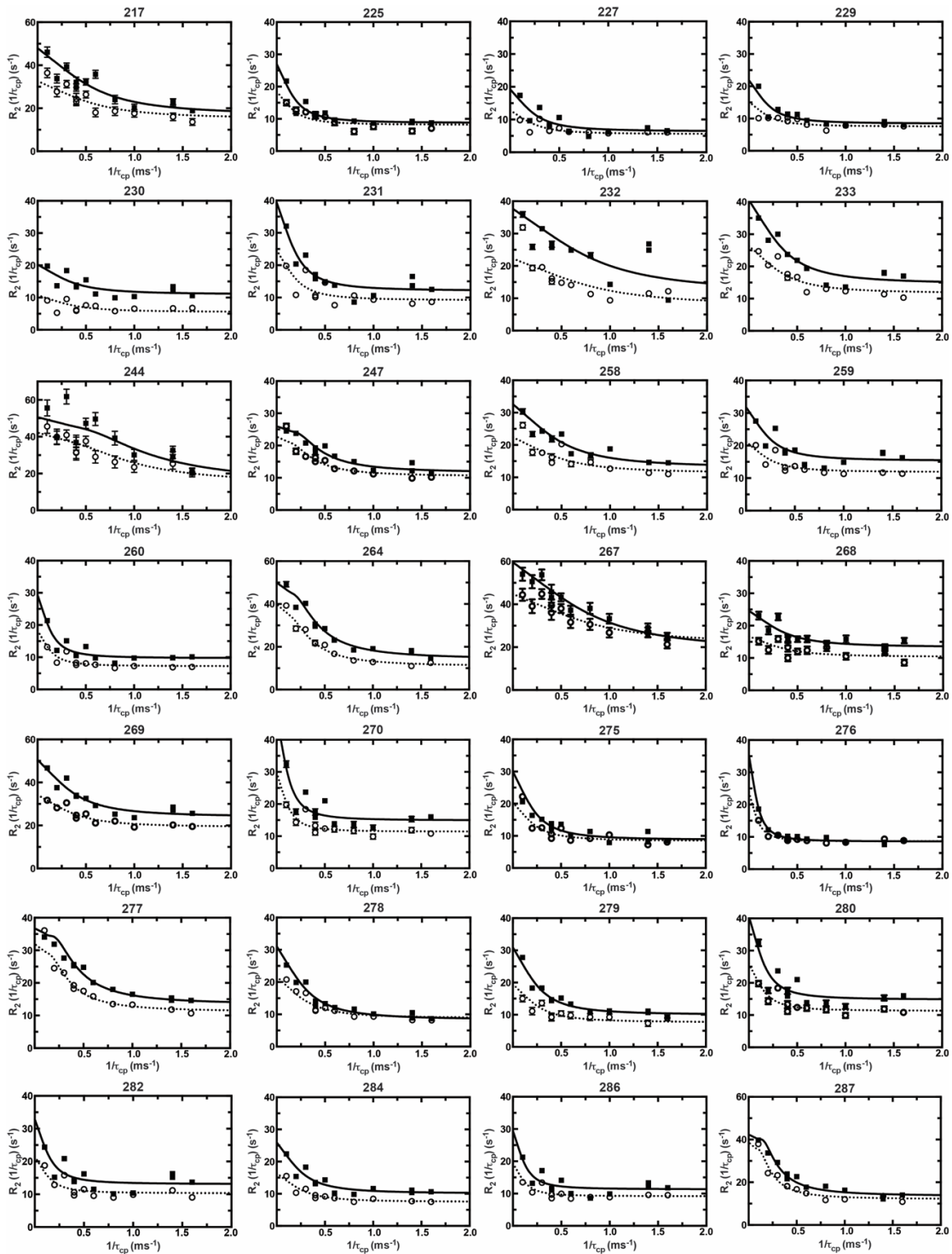


Figure A3.4b. Refers to Figure 4.3; ^{15}N -CPMG relaxation dispersion curves for cTEM-19m at 800 MHz (full line) and 600 MHz (dashed line). The residue number appears above each plot.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. All DNA-modifying enzymes were purchased from New England Biolabs (Mississauga, ON) or Bio-Rad (Mississauga, ON). Nitrocefin was purchased from Calbiochem (Mississauga, ON). Kanamycin (Kan), isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), components for growth media and purification materials were from Bioshop Canada (Burlington, ON). 99% Ammonium chloride ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) and 99% deuterium oxide (D_2O) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA). 99% D-glucose- ^{13}C , benzylpenicillin (BZ), carbenicillin (CB), cephalotin (CF), cefazolin (CZ), cefotaxime (CTX), DEAE-Sepharose Fast Flow, Tris-HCl, PEG 4000, HEPES, ammonium sulfate and MgCl_2 used for protein crystallization were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Tazobactam was purchased from Molekula (Dorset, UK).

Mutagenesis and subcloning. Subcloning of the chimera cTEM-19m into pET-24 with the OmpA signal sequence was performed as previously described (Clouthier et al., 2012). Oligonucleotide primers used for mutagenesis of TEM-1 and cTEM-19m were synthesized by Alpha DNA (Montréal, QC). To generate the mutants, the QuickChange site-directed mutagenesis method (Papworth C, 1996) was used with the I-Proof High Fidelity DNA polymerase (Bio-Rad, Mississauga, ON). The PCR product was *DpnI*-digested for 1 hour at 37°C to eliminate the starting DNA template. The digested product was butanol-precipitated and transformed into *E. coli* XL1 Blue. Cells were propagated for 1h in Luria-Bertani broth (LB) then plated on LB-agar containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan. Colonies were picked and propagated overnight. DNA extraction was performed for confirmation of DNA sequence of the entire coding region and for retransformation into *E. coli* BL21(DE3).

β -Lactamase expression and purification. Protein expression for enzymatic assays and crystallisation was performed as previously reported (Clouthier et al., 2012; Gobeil et al., 2014; Gobeil et al., 2015; Morin et al., 2010). Briefly, cells were propagated in auto-inducing ZYP-5052 medium (Studier, 2005) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan) with agitation at 37°C for two hours, then overnight at 22°C. Induced cells were sedimented by centrifugation (5,000 $\times g$, 30 min, 4°C) and resuspended in 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.0. Lysis was performed using a Constant Systems cell disrupter (Northants, UK). Cellular debris were sedimented by centrifugation (20,000 $\times g$, 30 min, 4°C), the supernatant was filtered through a 0.2 μm filter and the protein was purified. The chromatography was undertaken at 4°C using an ÄKTA FPLC (GE Healthcare). Following sample application, the DEAE-Sepharose Fast Flow column (1.6 cm \times 30 cm) was washed with 3 column volumes (CV) of 10 mM Tris-Cl pH 7.0. A linear gradient to 200 mM Tris-Cl pH 7.0 was achieved over 4 CV, and the column was further washed over 3 CV. Fractions containing β -lactamase were identified first using a qualitative nitrocefin hydrolysis essay and then by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15% (w/v) polyacrylamide gel) with Coomassie Brilliant Blue staining. Analysis of the purity was performed with Image Lab 5.0 (Bio-Rad, Hercules, CA). Enzyme concentration was determined by Bradford assay using the Bio-Rad protein assay solution (Bio-Rad, Hercules, CA), with bovine serum

albumin as the standard. For protein crystallization assay, a second purification step was added. Fractions containing $\geq 75\%$ β -lactamase following the first purification step were concentrated to a volume of 1.5 mL using a 10,000 MWCO Amicon concentrator (Millipore, Billerica, MA) and applied to a Superose 12 column (1.6 cm \times 55 cm) that had been pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.0. Elution was performed at a flow rate of 1 mL/min. Fractions containing β -lactamase were identified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15% (w/v) polyacrylamide gel) with zinc-imidazole staining (Simpson, 2007). Purity and concentration were determined as above. Fractions containing β -lactamase with a purity of $\geq 95\%$ were concentrated to 25 mg/mL (0.8 mM). For NMR assays, uniformly [^{15}N]- and [^2H , ^{15}N]-labeled cTEM-19m and cTEM-2m samples were produced by overexpression in modified M9 minimal media containing $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and deuterium oxide D_2O (99%) (Clouthier et al., 2012; Gobeil et al., 2014; Gobeil et al., 2015; Morin et al., 2010; Morin et al., 2006). For [^2H , ^{15}N]-labeled samples, cells were progressively acclimated to deuterium oxide using M9 media with 30, 60, 75, 85 and 99% D_2O . Purification was performed as described for protein crystallization assay. Samples were dialyzed against distilled, deionized water overnight at 4°C. Purity of the final samples was verified by SDS-PAGE stained by the zinc-imidazole method. Typical yields were 25 mg/L of $> 98\%$ pure protein.

cTEM-19m crystallization and data collection. cTEM-19m was concentrated to 25 mg/mL in 50 mM Tris-Cl (pH 7.0) in the presence and absence of 4 mM tazobactam (5-fold molar excess relative to the protein concentration). Crystals were grown at 22°C in hanging drops prepared by mixing 1 μL of the protein solution and 1 μL of the reservoir solution (100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 26% PEG 4000, and 0.25 M MgCl_2). Two single crystals, one grown in the presence of tazobactam and the other in its absence, were isolated and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected from each crystal at the Canadian Macromolecular Crystallography Facility Beamline 08ID-1 (Canadian Light Source, Saskatoon, SK).

cTEM-2m crystallization and data collection. cTEM-2m was concentrated to 25 mg/mL in 50 mM Tris-Cl (pH 7.0). Crystals were grown at 22°C in hanging drops prepared by mixing 1 μL of the protein solution and 1 μL of the reservoir solution, which contained 100 mM HEPES (pH 7.5) and 1.5 M ammonium sulfate. A rod-shaped crystal was removed from a crystal cluster, transferred to a cryoprotectant solution containing 10% (v/v) glycerol, 100 mM HEPES (pH 7.5) and 1.5 M ammonium sulfate, and flash-cooled in a nitrogen gas cold-stream. Diffraction data were collected at 100K as 0.5° oscillation images, with a Rigaku MicroMax 007 HF X-ray generator and a Rigaku Saturn 944 HG CCD detector.

Crystallization data processing and refinement. The collected diffraction images were indexed, integrated, and scaled either with HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997) or the *xia2* package (Winter et al., 2013). Initial phases were calculated by molecular replacement with the program PHASER (McCoy et al., 2007), with a previously determined TEM-1 structure (PDB code: 1ZG4 (Stec et al., 2005)) as a search model. The structure models were further improved through iterative rounds of manual model building with COOT (Emsley and Cowtan, 2004) and automated refinement with PHENIX (Adams et al., 2010) and REFMAC5 (Vagin et al., 2004). Data collection and

refinement statistics are summarized in **Supplementary Table A3.II**. The refined structures of cTEM-19m (PDB IDs 4R4R and 4R4S) and cTEM-2m (PDB ID: 4MEZ) have been deposited to the Protein Data Bank.

Active-site Volume Estimation. The active-site cavity volume of TEM-1 (PDB 1XPB), PSE-4 (PDB 1G68), cTEM-2m (PDB 4MEZ), cTEM-17m (PDB 4ID4) and cTEM-19m (PDB 4R4S) was estimated using 3V: Voss Volume Voxelator (Voss and Gerstein, 2010). The estimation was made with a small sphere of 1.5 Å radius and a large sphere of 8 Å radius.

Molecular dynamics simulations. Crystal structures with the best ratio of resolution and completeness of the sequence were chosen for the two parents (TEM-1: 1XPB, 1.9 Å resolution and PSE-4: 1G68, 1.95 Å resolution) and the three variants (cTEM-2m: 4MEZ, 2.05 Å resolution, cTEM-17m: 4ID4, 1.05 Å resolution and cTEM-19m: 4R4S, 1.1 Å resolution). These structures were used as a starting point for all molecular dynamics (MD) simulations. Missing side-chains in 4MEZ (LYS32, LYS55, LYS111, ASP115, LYS146, LYS1192 and ARG277), 4ID4 (LYS32, LYS55, LYS111, LYS146, GLN154, LYS158, LYS173, ASP254 and LYS256) and 4R4S (LYS 111, GLN 154, LYS 158, LYS215 and LYS256) were reconstructed using the rotamer explorer in the Structure Preparation plugin of MOE ((MOE)). All following steps were executed using GROMACS 5.0.1. The protonation and orientation of histidines was verified using the high-resolution crystal structure of TEM-1 variant M182T (1M40), MolProbity (Chen et al., 2010) and PROPKA (Olsson et al., 2011; Sondergaard et al., 2011). For each system, crystallographic water molecules were conserved in a truncated dodecahedron periodic water box of SPC/E water molecules with a minimum distance of 10 Å between the box boundary and the protein. The total number of water molecules and net charge for the different systems were: 1XPB: 12,812, -7; 1G68: 12,475, -5; 4MEZ: 9,952, -7; 4ID4: 10,177, -4; 4R4R: 10,703, -4. Each system was neutralized by adding the respective number of sodium counterions. The total size of the systems, in atoms, was: 1XPB: 42,507; 1G68: 41,501; 4MEZ: 33,926, 4ID4: 34,619; 4R4R: 36,196.

For energy minimization and MD simulations, GROMACS 5.0.1 was used with the AMBER99SB-ILDN force field (Abraham et al., 2015; Lindorff-Larsen et al., 2010). The LINear Constraint Solver (LINCS) algorithm was applied to all bonds containing hydrogen atoms. Each 1 ps frame was saved in a compressed XTC trajectory and each 100 ps in a full precision TRR trajectory. The Nose-Hoover thermostat and the Parrinello-Rahman barostat were used to couple the system to a constant temperature of 304.65 K and a pressure of 1 bar. The electrostatic interactions were evaluated by the particle-mesh Ewald method, and Lennard-Jones interactions were evaluated using a 1.2 nm cutoff. Each system was energy minimized using the method of the Steepest Descent to a target F_{\max} of no greater than $1,000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. The time step was chosen to be 2 fs. For equilibration, all systems were subjected to 2 ns NVT ensemble to gradually heat up the system from 10 K to 304.65 K. Next, a 20 ns NPT ensemble was generated and three conformations with the highest, average and lowest root mean-square deviation (RMSD) were chosen as starting conformations for three individual replicates. A further 2 ns NVT ensemble was performed for each repetition to heat up the system and used as

starting point for the 2 μ s production run. This results in a total of three 2 μ s simulations with 1 ps compressed and 100 ps full precision trajectories for each of the five proteins.

Analysis of protein structure and dynamics. Analysis was performed using GROMACS 5.0.1 on 2 μ s for each MD simulation, unless otherwise stated. All protein figures were created using PyMOL (Schrödinger) or MOE (Chemical Computing Group, Montréal, QC). The stability of the system was evaluated after 100 ns and 1,000 ns by calculating the RMSD of the backbone atoms between each frame and the initial conformation. In addition, the radius of gyration was calculated for each replicate over 2 μ s to ensure overall structural integrity. The root mean-square fluctuation (RMSF) was calculated based on the C α atom for each residue and converted into B-factors after removal of the overall translational and rotational motion of the protein by superimposition onto a common reference frame.

S^2 order parameters were calculated applying the model-free approach of Lipari and Szabo (Lipari and Szabo, 1982a; Lipari and Szabo, 1982b). After removal of translational and rotational motion for each 2 μ s run, the trajectory was split into 10 ns segments. For every second segment, the autocorrelation function was calculated for each N-H internuclear vector. The final S^2 value was obtained by averaging all 10 ns segments, thus representing the S^2 value over 2 μ s.

Solution NMR experiments. All NMR experiments were performed as previously reported (Gobeil et al., 2014; Gobeil et al., 2015). Briefly, [^{15}N] and [^2H , ^{15}N]-Labeled samples were concentrated to 0.6 mM using a 10,000 MWCO Amicon concentrator and buffer exchanged to 3 mM imidazole, 0.01% NaN_3 , and 10% D_2O , pH 6.7. The final pH was verified using a pH meter with a microprobe. The temperature was calibrated to 31.5°C with a standard methanol sample (John Cavanagh, 2007) on Agilent 800 MHz (18.8T – cTEM-2m and cTEM-19m), Agilent 600 MHz (14.1T, cTEM-19m) and Agilent 500 MHz (11.7T, cTEM-2m) NMR spectrometers, each equipped with a triple-resonance probe and a pulse-field gradient. Microsecond-millisecond protein dynamics for cTEM-2m and cTEM-19m were characterized using ^{15}N TROSY relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill (rcCPMG) experiments (Loria et al., 1999). Transverse spin-relaxation data using the TROSY rcCPMG experiment were acquired in an interleaved fashion with interpulse delays, τ_{cp} , of 0.0, 0.625, 0.714 ($\times 2$), 1.0, 1.25, 1.67, 2.0, 2.50 ($\times 2$), 3.33, 5.0, and 10.0 ms during the nitrogen relaxation period for a constant, total relaxation time of 20 ms. All heteronuclear NMR data were processed using NMRPipe (Delaglio et al., 1995), in-house scripts and further analyzed with Sparky (T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco). Previously acquired and analysed NMR backbone assignments of cTEM-2m (BMRB 26586) and cTEM-19m (BMRB 26590) were used to identify the N-H resonances (Gobeil et al., 2015). Conformational exchange was considered significant when the difference in measured R_2 (ΔR_2 ($1/\tau_{\text{cp}}$)) at fast ($\tau_{\text{cp}} = 0.625$ ms) and slow ($\tau_{\text{cp}} = 10$ ms) pulsing rates on the 18.8T data set was greater than 7 s^{-1} in relaxation dispersion profiles. This threshold was selected based on relaxation dispersion error estimation, to eliminate false positives resulting from a poor fit and to be consistent with the previously reported dynamics of TEM-1, PSE-4 and cTEM-17m (Gobeil et al., 2014). Global residue fits and model

analyses were performed using the 800 MHz (cTEM-2m and cTEM-19m) in combination with the 500 MHz (cTEM-2m) or 600 MHz (cTEM-19m) relaxation dispersion data and fitting them using GraphPad Prism 5 to the full single-quantum ^{15}N -CPMG equation (Manley and Loria, 2012). The residues were selected for global fitting, first according to structural proximity. Then, residues with statistically overlapping k_{ex} were fitted as a region.

Enzyme kinetics. K_M and k_{cat} parameters were determined at room temperature in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. The following extinction coefficients (and concentration ranges) were used: $\Delta\epsilon_{232\text{ nm}} = 900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for BZ (Bouthors et al., 1998) (5-240 μM), $\Delta\epsilon_{232\text{ nm}} = 1,190\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for CB (Lim et al., 2001) (5-240 μM), $\Delta\epsilon_{262\text{ nm}} = 7,960\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for CF (Bouthors et al., 1998) (5-250 μM), $\Delta\epsilon_{260\text{ nm}} = 7,900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for CZ (Tribuddharat et al., 2003) (5-250 μM), and $\Delta\epsilon_{264\text{ nm}} = 7,250\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for CTX (Cantu and Palzkill, 1998) (10-240 μM). Substrate hydrolysis was monitored according to initial steady-state velocities by using a Cary100 Bio UV-visible spectrophotometer (Agilent Technologies Canada, Montréal, QC) and quartz cuvettes with a path length of either 1 cm (CF, CZ, and CTX) or 10 cm (BZ and CB). Six substrate concentrations were used, generally flanking the K_M values for TEM-1. The enzyme concentrations were maintained within 5 to 30 nM. The kinetic parameters were determined from the hydrolysis rates calculated from the initial linear portion of the curve. Data fitting to the Henri Michaelis-Menten equation for the substrates CB and BZ was carried out with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). For CF, CZ, and CTX a Lineweaver-Burk model ($1/V$ vs $1/[S]$) was used with Microsoft Excel due to inability to saturate the enzyme, a common issue with these substrates.

ANNEXE 3 - REFERENCES

1. Clouthier, C.M. et al. Chimeric beta-lactamases: global conservation of parental function and fast time-scale dynamics with increased slow motions. *PLoS One* **7**, e52283 (2012).
2. Papworth C, B.J., Braman J, Wright DA. Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies* **9**, 3-4 (1996).
3. Gobeil, S.M. et al. Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins. *Chem Biol* (2014).
4. Gobeil, S.M., Gagne, D., Doucet, N. & Pelletier, J.N. N, C and H backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 class A beta-lactamase chimera and its deconvoluted mutant. *Biomol NMR Assign* (2015).
5. Morin, S., Clouthier, C.M., Gobeil, S., Pelletier, J.N. & Gagne, S.M. Backbone resonance assignments of an artificially engineered TEM-1/PSE-4 Class A beta-lactamase chimera. *Biomol NMR Assign* **4**, 127-30.
6. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-34 (2005).

7. Simpson, R.J. Zinc/Imidazole Procedure for Visualization of Proteins in Gels by Negative Staining. *Cold Spring Harbor Protocols* **2007**, pdb.prot4701-pdb.prot4701 (2007).
8. Morin, S., Levesque, R.C. & Gagne, S.M. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N backbone resonance assignments for PSE-4, a 29.5 kDa class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biomol NMR* **36 Suppl 1**, 11 (2006).
9. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A* **276**, 307-326 (1997).
10. Winter, G., Lobley, C.M. & Prince, S.M. Decision making in xia2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1260-73 (2013).
11. McCoy, A.J. et al. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
12. Stec, B., Holtz, K.M., Wojciechowski, C.L. & Kantrowitz, E.R. Structure of the wild-type TEM-1 beta-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1072-9 (2005).
13. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-32 (2004).
14. Adams, P.D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-21 (2010).
15. Vagin, A.A. et al. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**, 2184-2195 (2004).
16. Voss, N.R. & Gerstein, M. 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acids Research* **38**, W555-W562 (2010).
17. (MOE), M.O.E. 2016. (Chemical Computing Group Inc.).
18. Chen, V.B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21 (2010).
19. Sondergaard, C.R., Olsson, M.H., Rostkowski, M. & Jensen, J.H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J Chem Theory Comput* **7**, 2284-95 (2011).
20. Olsson, M.H., Sondergaard, C.R., Rostkowski, M. & Jensen, J.H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J Chem Theory Comput* **7**, 525-37 (2011).
21. Lindorff-Larsen, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* **78**, 1950-8 (2010).
22. Abraham, M.J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1-2**, 19-25 (2015).
23. Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.8 edn.
24. Lipari, G. & Szabo, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 4546-4559 (1982).

25. Lipari, G. & Szabo, A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 4559-4570 (1982).
26. John Cavanagh, W.J.F., Arthur G. Palmer III, Mark Rance and Nicholas J. Skelton. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, ((Burlington, MA: Elsevier Academic Press), 2007).
27. Loria, J.P., Rance, M. & Palmer, A.G., 3rd. A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins. *Journal of Biomolecular Nmr* **15**, 151-5 (1999).
28. Delaglio, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* **6**, 277-93 (1995).
29. Manley, G. & Loria, J.P. NMR insights into protein allostery. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **519**, 223-231 (2012).
30. Bouthors, A.T. et al. Role of residues 104, 164, 166, 238 and 240 in the substrate profile of PER-1 beta-lactamase hydrolysing third-generation cephalosporins. *Biochemical Journal* **330**, 1443-1449 (1998).
31. Lim, D. et al. Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies. *Biochemistry* **40**, 395-402 (2001).
32. Tribuddharat, C., Moore, R.A., Baker, P. & Woods, D.E. Burkholderia pseudomallei class A beta-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 2082-2087 (2003).
33. Cantu, C. & Palzkill, T. The role of residue 238 of TEM-1 beta-lactamase in the hydrolysis of extended-spectrum antibiotics. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 26603-26609 (1998).

Annexe 4 – Matériel supplémentaire du chapitre 5

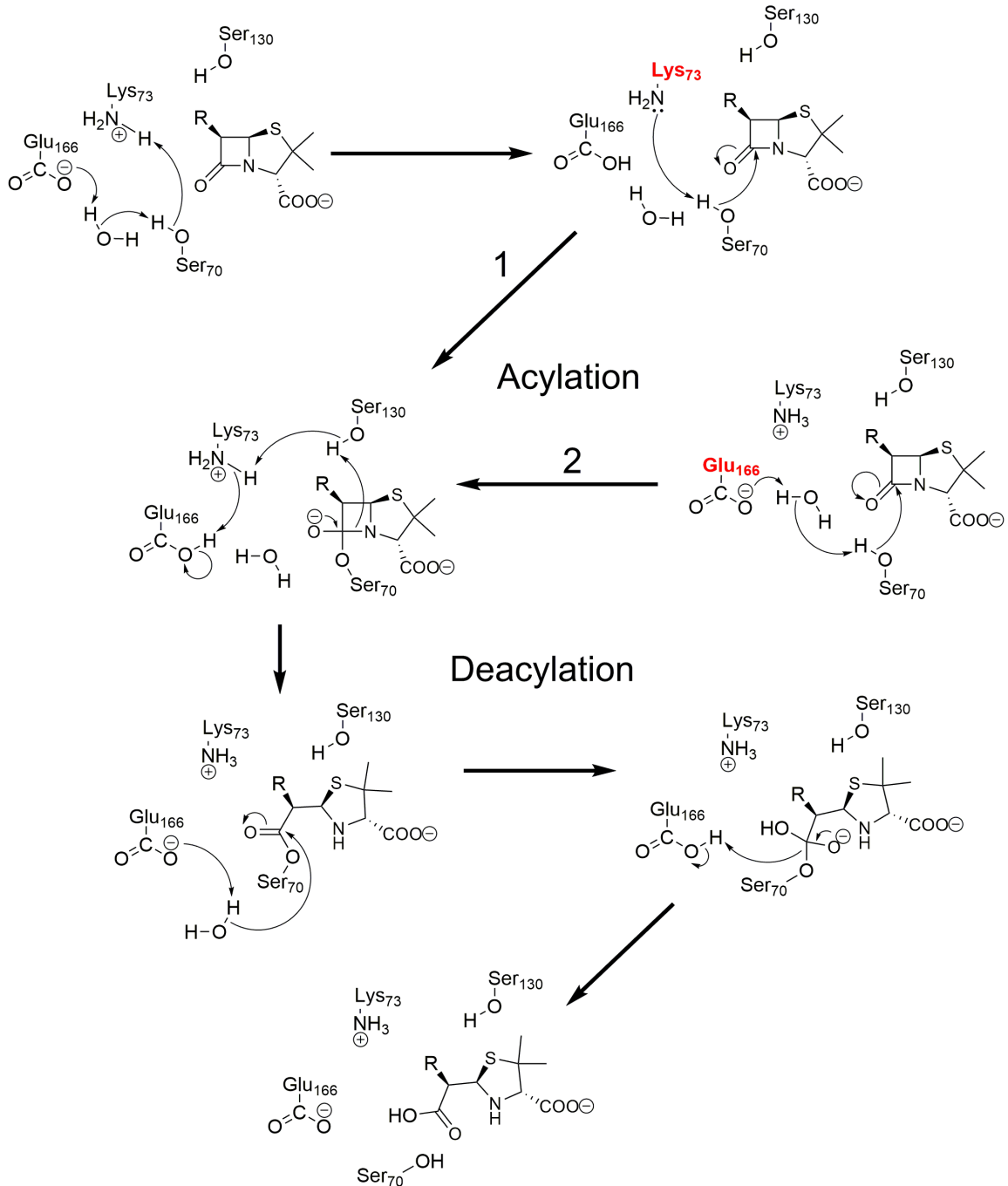


Figure A4.1. Class A β -lactamases catalytic mechanism [1-3].

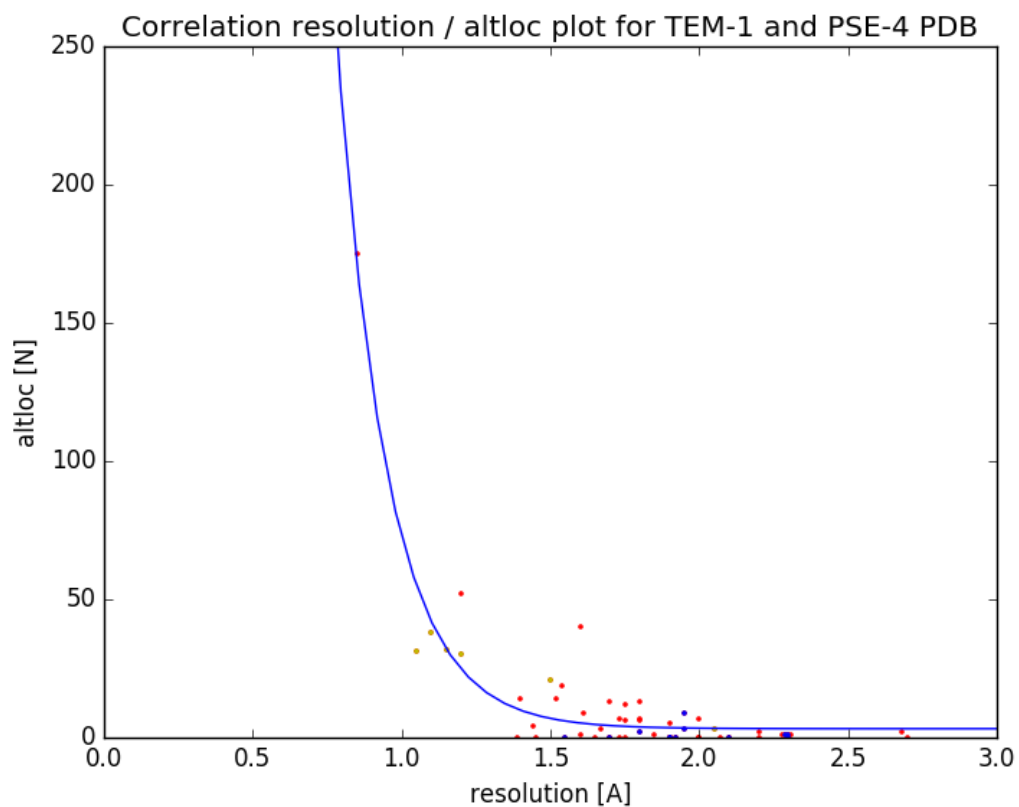


Figure A4.2. Correlation between amount of side chain alternate states and the crystal structure resolution for all PDB entries found for uniprot entry P62593 (TEM-1) and P16897 (PSE-4).

Table A4.I. Data collection and refinement statistics for crystal structures of chimera cTEM-19m showing different conformations.

| cTEM-19m | | |
|--------------------------|------------------|------------------|
| Data collection | Crystal 1 | Crystal 2 |
| Space group | P 21 21 21 | P 21 21 21 |
| Unit-cell parameters (Å) | | |
| a | 36.52 | 36.84 |
| b | 58.21 | 58.76 |
| c | 109.50 | 109.94 |
| Resolution (Å) | 1.50 | 1.15 |
| Completeness (%) | 99.9 (99.3) | 98.0 (81.4) |
| Average redundancy | 7.2 (7.1) | 6.1 (3.9) |
| I/σ(I) | 20.9 (2.2) | 23.6 (2.9) |
| R-merge (%) | 6.2 (84.1) | 4.1 (37.2) |
| Refinement | PDB: 4QY5 | PDB: 4QY6 |
| R-work (%) | 11.0 | 10.5 |
| R-free (%) | 16.1 | 13.9 |
| No. of water | 317 | 470 |
| r.m.s. deviations | | |
| Bond lengths (Å) | 0.018 | 0.021 |
| Bond angles (°) | 1.8 | 2.1 |

Values in the parentheses are for the highest resolution shell.

Table A4.II. Rotamer adopted by TEM-1, PSE-4 and the chimeras cTEM-2, cTEM-17m and cTEM-19m in the crystal structures and over the 6μs of MD simulation.

The conformers of cTEM-19m crystal structure PDB 4QY5 are indicated for reference.

Table A4.II. Rotamer adopted by TEM-1, PSE-4 and the chimeras cTEM-2, cTEM-17m and cTEM-19m in the crystal structures and over the 6 μ s of MD simulation. The conformers of cTEM-19m crystal structure PDB 4QY5 are indicated for reference.

| residue | rotamer | TEM-1 (PDB 1XPB) | | PSE-4 (PDB1G68) | | cTEM-2m (PDB 4MEZ) | | cTEM-17m (PDB 4ID4) | | cTEM-19m (PDB 4R4R) | | cTEM-19m (PDB 4QY5) | |
|--|---|------------------------|---------------------------------------|------------------------|---|------------------------|---|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|---|
| | | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD |
| S70 active site wall | | | | | | | | | | | | | |
| Met68 | [g ⁻ , t ⁺ , g ⁻] [t ⁺ , t ⁺ , g ⁺] | 100 | 20.2 45.61 | - | - | - | - | 100 | 2.26 41.3 | - | - | - | - |
| Leu68 | [g ⁻ , t ⁺] [t ⁺ , g ⁺] | - | - | 100 | 5.87 77.07 | 100 | 24.6 66.77 | - | - | 100 | 23.21 63.76 | 100 | 0 |
| Met69 | [g ⁻ , t ⁺ , g ⁻] [g ⁺ , t ⁺ , t ⁺] | 100 | 62.92 19.29 | 0 | - | - | - | 100 | 81.54 9.52 | 0 | - | - | - |
| Thr69 | [g ⁺] | - | - | 100 | 99.98 | 100 | 100 | - | - | 100 | 97.68 | - | [t ⁺] = 100 |
| Ser70 | [g ⁻] [g ⁺ , t ⁺ , t ⁺ , t ⁺] [g ⁺ , t ⁺ , t ⁺ , g ⁺] [g ⁺ , t ⁺ , g ⁻ , t ⁺] | 100 100 100 0 | 95.8 2.28 72.59 2.6 23.94 | 100 100 100 0 | 57.05 40.85 87.53 5.23 2.49 | 100 100 100 0 | 90.28 5.02 67.88 3.49 19.81 | 100 100 100 0 | 69.41 21.96 89.1 7.87 0.21 | 100 100 100 0 | 51.91 47.87 33.3 54.98 0.9 | 100 0 100 0 | |
| Y105 active site wall | | | | | | | | | | | | | |
| Glu 104 | [g ⁺ , t ⁺ , g ⁺] [g ⁺ , t ⁺ , t ⁺] | 100 | 17.37 | 100 | [g ⁻] = 47.2 [g ⁺] = 47.35 | 100 | 14.01 | 0 | 18.65 | 40 | 9.64 | 0 | [g ⁻ , t ⁺ , t ⁺] = 100 |
| Tyr105 | [t ⁺ , g ⁻] [g ⁻ , g ⁻] | 100 | 3.26 21.82 | 100 | 39.69 | 100 | 2.82 18.83 | 100 | 3.43 16.57 | 60 | 2.79 22.06 | 0 | 0 |
| Ser106 | [g ⁻] | 100 | 74.16 99.99 | 0 | 55.69 97.44 | 100 | 76.35 99.78 | 100 | 79.73 100 | 100 | 70.84 97.9 | 100 | 0 |
| SDN active site wall | | | | | | | | | | | | | |
| Ser130 | [t ⁺] | 100 | 21.46 | 50 | 22.13 | 100 | 6.7 | 100 | 15.84 | 100 | 14.44 | 0 | 0 |
| Asp131 | [t ⁺ , g ⁻] | 0 | 78.49 | 50 | 77.84 | 0 | 93.04 | 0 | 83.98 | 0 | 85.49 | 100 | 0 |
| Asn132 | [g ⁻ , t ⁺] [g ⁻ , t ⁺ , g ⁻] | 100 0 | 99.28 64.4 17.41 | 100 0 | 99.59 45.95 36.11 | 100 0 | 98.2 46.84 27.4 | 100 0 | 99.33 74.51 21.34 | 100 0 | 99.37 29.39 42.42 | 100 0 | 0 |
| Ω-loop active site wall | | | | | | | | | | | | | |
| Glu166 | [g ⁻ , g ⁻ , t ⁺] [g ⁻ , g ⁻ , g ⁺] [g ⁺ , t ⁺ , g ⁺] [g ⁻ , t ⁺ , g ⁻] | 100 0 0 | 57.69 26.68 0.25 | 100 0 | 25.96 11.87 5.26 | 100 0 | 37.58 31.89 34.8 | 100 0 | 43.12 23.56 11.85 | 100 0 | 3.48 1.61 29 | 100 0 | 0 |
| Leu169 | [g ⁺ , g ⁺] [t ⁺ , g ⁺] | 100 0 | 89.99 0.19 | 100 0 | 39.11 48.41 | 100 0 | 67.67 22.58 | 100 0 | 64.49 19.85 | 100 0 | 3.31 78.18 | 100 0 | 0 |
| Asn170 | [g ⁻ , t ⁺ , g ⁻] [g ⁻ , t ⁺ , t ⁺ , g ⁺] | 100 0 | 76.43 21.92 | 100 0 | 64.23 7.14 | 100 0 | 67.27 12.58 | 100 0 | 58.39 18.77 | 100 0 | 6.32 2.08 | 100 0 | 0 |

| residue | rotamer [g ⁻ , 'Ng ⁻] | TEM-1 (PDB 1XPB) | | PSE-4 (PDB1G68) | | cTEM-2m (PDB 4MEZ) | | cTEM-17m (PDB 4ID4) | | cTEM-19m (PDB 4R4R) | | cTEM-19m (PDB 4QY5) | |
|---------------------------------|--|---------------------------|------------------------------------|---|---|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----|
| | | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD | PDB | MD |
| | | 0 | 0.12 | 0 | 2.73 | 0 | 0.69 | 0 | 7.08 | 0 | 43.7 | 0 | |
| 214-218 active site wall | | | | | | | | | | | | | |
| Glu212 | [t', t', g ⁻] [t', t', g ⁺] [t', t', t'] | 100 0 0 | 23.23 15.81 19.8 | [t'] = 100 [g ⁺] = 0 [g ⁻] = 0 | [t'] = 28.15 [g ⁺] = 46.92 [g ⁻] = 24.93 | 0 0 100 | 16.84 16.33 24.26 | 0 0 49 | 14.07 20.64 24.66 | 0 0 55 | 12.25 26.79 24.03 | 0 0 100 | |
| Ala213 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Asp214 | [t', t'] [g ⁻ , g ⁺] [g ⁻ , t'] | 100 0 0 | 3.17 1.66 0.04 | [t', 'Nt'] = 100 [t', 'Og ⁻] = 0 | [t', 'Nt'] = 66.23 [t', 'Og ⁻] = 33.13 | 100 0 | 1.1 2.84 | 0 0 | 1.58 11.25 | 0 0 | 1.47 12.69 | 0 0 | |
| Lys215 | [g ⁻ , t', t', g ⁻] [g ⁻ , t', t', g ⁺] [g ⁻] | 100 0 0 | 2.86 6.15 72.76 | [g ⁻ , g ⁻ , 'Og ⁻] = 100 | [g ⁻ , g ⁻ , 'Og ⁻] = 18.98 | 100 100 | 4.96 7.56 | 0 0 | 13.49 16.64 | 0 0 | 3.75 9.32 | 0 0 | |
| Val216 | [g ⁻] | 0 | 17.43 | [g ⁺] = 100 | 95.98 3.42 | 100 | 78.29 | 0 | 75.05 | 0 | 68.7 | 0 | |
| Ala217 | - | - | - | - | [g ⁺] = 99.75 | - | 12.52 | 100 | 12.77 | 100 | 12 | 100 | |
| Gly218 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Pro219 | [g ⁻] | 100 | 47.58 | [g ⁺ , 'Nt'] = 100 [g ⁺ , 'Og ⁻] = 0 | [g ⁺ , 'Nt'] = 20.36 [g ⁺ , 'Og ⁻] = 35.62 | 100 | 58.18 | 100 | 76.12 | 100 | 77.77 | 100 | |
| | | 0 | 52.42 | | | 0 | 41.82 | 0 | 23.88 | 0 | 22.23 | 0 | |
| 234-244 active site wall | | | | | | | | | | | | | |
| Lys234 | [t', g ⁺ , t', g ⁺] [t', g ⁺ , t', t'] | 100 0 | 6.44 8.64 | [t', g ⁺ , g ⁻ , g ⁻] = 100 [t', t', g ⁻ , g ⁻] = 0 | [t', g ⁺ , g ⁻ , g ⁻] = 49.56 [t', t', g ⁻ , g ⁻] = 10.49 | 100 0 | 13.43 25.84 | 100 0 | 34.03 40.45 | 100 0 | 43.95 49.84 | 100 0 | |
| Ser235 | [g ⁺] [g ⁻] | 100 0 | 73.17 22.6 | 100 | 98.26 1.32 | 100 0 | 51.24 45.05 | 100 0 | 46.37 44.73 | 100 0 | 24.37 61.93 | 100 0 | |
| Gly236 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Ala237 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Gly238 | [g ⁻ , t', t'] [g ⁻ , t', g ⁺] [g ⁻ , g ⁺ , t'] | 100 0 0 | 0.44 0.96 41.15 | Gly | Gly | 0 77.5 22.5 | 0.44 0.42 43.81 | 0 53 0 | 1.31 4.2 22.19 | 32 42 25 | 0.74 2.47 7.26 | 0 54 46 | |
| Arg241 | [g ⁻ , t', t', g ⁻] [g ⁻ , t', t', g ⁺] | 100 0 | 1.96 4.73 | [g ⁻ , g ⁻] = 100 [t', t'] = 0 | 58.94 23.29 | 100 0 | 1.25 1.72 | 0 100 | 1.48 3.69 | 0 100 | 3.09 2.04 | 0 100 | |
| Gly242 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Ser243 | [g ⁻] [g ⁺] [t', g ⁺ , g ⁻ , t'] [t', g ⁺ , t', g ⁺] [t', t', t'] | 100 0 100 0 0 | 98.9 1.06 0 14.72 44.6 | Ala | Ala | 0 100 0 0 0 | 93.31 2.64 0 2.88 21.21 | 55 45 0 100 0 | 98.81 1.13 0 9.21 14.52 | 57 43 0 100 0 | 90.75 4.79 0 1.16 16.67 | 48 52 0 100 0 | |

EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Reagents. Nitrocefin was purchased from Calbiochem (Mississauga, ON). Kanamycin, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), components for growth media and purification materials were from Bioshop Canada (Burlington, ON). DEAE-Sepharose Fast Flow, Tris-Cl, PEG 4000, HEPES, ammonium sulfate and $MgCl_2$ used for protein crystallization were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

β -Lactamase expression and purification. Subcloning of the chimera cTEM-19m into pET-24 with the OmpA signal sequence was performed as previously described [4]. Protein expression and purification for crystallography assay was performed in auto-inducing ZYP-5052 medium as previously described [4, 5]. Briefly, chromatography was undertaken at 4°C using an Äkta FPLC (GE Healthcare). Following sample application, the DEAE-Sepharose Fast Flow column (1.6 cm \times 30 cm) was washed with 3 column volumes (CV) of 10 mM Tris-Cl pH 7.0. A linear gradient to 200 mM Tris-Cl pH 7.0 was achieved over 4 CV, and the column was further washed over 3 CV. Fractions containing β -lactamase were identified first using a qualitative nitrocefin hydrolysis assay and then by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15% (w/v) polyacrylamide gel) with Coomassie Brilliant Blue staining. A second purification step was added. Fractions containing $\geq 75\%$ β -lactamase following the first purification step were concentrated to a volume of 1.5 mL using an Amicon concentrator (MWCO 10000, Millipore, Billerica, MA) and applied to a Superose 12 column (1.6 cm \times 55 cm) that had been pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.0. Elution was performed at a flow rate of 1 mL/min. Fractions containing β -lactamase were identified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15% (w/v) polyacrylamide gel) with zinc-imidazole staining [6]. Purity and concentration were determined as above. Fractions containing β -lactamase with a purity of $\geq 95\%$ were concentrated to 25 mg/mL (0.8 mM).

Crystallization of cTEM-19m and data collection. Two crystal forms of cTEM-19m were identified in this study. Crystals of the first form were obtained from a sitting drop prepared by mixing 1 μ L protein solution (25 mg/mL in 50 mM Tris-Cl (pH 7.0) and 4 mM benzylpenicillin) and 1 μ L reservoir solution (100 mM Tris-Cl (pH 8.5), 30% PEG 4000, and 0.2 M $MgCl_2$) and incubated at 22°C. Crystals of the second form were obtained from a hanging drop prepared by mixing 1 μ L protein solution (20 mg/mL in 50 mM Tris-Cl (pH 7.0) and 3.2 mM benzylpenicillin) and 1 μ L reservoir solution (100 mM Tris-Cl (pH 8.5), 24% PEG 4000, and 0.2 M $MgCl_2$), streak-seeded with the crystals of the first form, and incubated at 22°C. A single crystal from each group was isolated and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected from each crystal at the Canadian Macromolecular Crystallography Facility Beamline 08ID-1 (Canadian Light Source, Saskatoon, SK).

Data processing and refinement. The collected diffraction images were indexed, integrated, and scaled with the *xia2* package [7]. Initial phases were calculated by molecular replacement with the program PHASER [8], with a previously determined TEM-1 structure (PDB 1ZG4) as a search model. The resultant structure models were further improved through iterative

rounds of manual and automated refinement with COOT [9, 10], PHENIX [11], and REFMAC5 [12]. Data collection and refinement statistics are summarized in Table 1. The refined structures of cTEM-19m (PDB IDs 4QY5 and 4QY6) have been deposited to the Protein Data Bank.

Molecular dynamics simulations. Crystal structures with the best ratio of resolution and completeness of the sequence were chosen for the two parents (TEM-1: 1XPB, 1.9 Å resolution and PSE-4: 1G68, 1.95 Å resolution) and the three variants (cTEM-2m: 4MEZ, 2.05 Å resolution, cTEM-17m: 4ID4, 1.05 Å resolution and cTEM-19m: 4R4S, 1.1 Å resolution). These structures were used as a starting point for all molecular dynamics (MD) simulations. Missing side-chains in 4MEZ (LYS32, LYS55, LYS111, ASP115, LYS146, LYS1192 and ARG277), 4ID4 (LYS32, LYS55, LYS111, LYS146, GLN154, LYS158, LYS173, ASP254 and LYS256) and 4R4S (LYS 111, GLN 154, LYS 158, LYS215 and LYS256) were reconstructed using the rotamer explorer in the Structure Preparation plugin of MOE [13]. All following steps were executed using GROMACS 5.0.1. The protonation and orientation of histidines was verified using the high-resolution crystal structure of TEM-1 variant M182T (1M40), MolProbity [14] and PROPKA [15, 16]. For each system, crystallographic water molecules were conserved in a truncated dodecahedron periodic water box of SPC/E water molecules with a minimum distance of 10 Å between the box boundary and the protein. The total number of water molecules and net charge for the different systems were: 1XPB: 12,812, -7; 1G68: 12,475, -5; 4MEZ: 9,952, -7; 4ID4: 10,177, -4; 4R4R: 10,703, -4. Each system was neutralized by adding the respective number of sodium counterions. The total size of the systems, in atoms, was: 1XPB: 42,507; 1G68: 41,501; 4MEZ: 33,926, 4ID4: 34,619; 4R4R: 36,196.

For energy minimization and MD simulations, GROMACS 5.0.1 was used with the AMBER99SB-ILDN force field [17, 18]. The LINear Constraint Solver (LINCS) algorithm was applied to all bonds containing hydrogen atoms. Each 1 ps frame was saved in a compressed XTC trajectory and each 100 ps in a full precision TRR trajectory. The Nose-Hoover thermostat and the Parrinello-Rahman barostat were used to couple the system to a constant temperature of 304.65 K and a pressure of 1 bar. The electrostatic interactions were evaluated by the particle-mesh Ewald method, and Lennard-Jones interactions were evaluated using a 1.2 nm cutoff. Each system was energy minimized using the method of the Steepest Descent to a target F_{\max} of no greater than $1,000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. The time step was chosen to be 2 fs. For equilibration, all systems were subjected to 2 ns NVT ensemble to gradually heat up the system from 10 K to 304.65 K. Next, a 20 ns NPT ensemble was generated and three conformations with the highest, average and lowest root mean-square deviation (RMSD) were chosen as starting conformations for three individual replicates. A further 2 ns NVT ensemble was performed for each repetition to heat up the system and used as starting point for the 2 μ s production run. This results in a total of three 2 μ s simulations with 1 ps compressed and 100 ps full precision trajectories for each of the five proteins.

Analysis of protein structure and dynamics. Analysis was performed using GROMACS 5.0.1 on 2 μ s for each MD simulation, unless otherwise stated. All protein figures were created using PyMOL [19] or MOE (Chemical Computing Group, Montréal, QC). The stability of the system was evaluated after 100 ns and 1,000 ns by calculating the RMSD of the backbone atoms between each frame and the initial conformation. In addition, the radius of gyration was calculated for each replicate over 2 μ s to ensure overall structural integrity. The root mean-

square fluctuation (RMSF) was calculated based on the C α atom for each residue and converted into B-factors after removal of the overall translational and rotational motion of the protein by superimposition onto a common reference frame.

S^2 order parameters were calculated applying the model-free approach of Lipari and Szabo [20, 21]. After removal of translational and rotational motion for each 2 μ s run, the trajectory was split into 10 ns segments. For every second segment, the autocorrelation function was calculated for each N-H internuclear vector. The final S^2 value was obtained by averaging all 10 ns segments, thus representing the S^2 value over 2 μ s.

ANNEXE 4 - REFERENCES

1. Herzberg, O. and J. Moult, *Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.5 Å resolution*. Science, 1987. **236**(4802): p. 694-701.
2. Swarén, P., et al., *Electrostatic analysis of TEM1 β -lactamase: effect of substrate binding, steep potential gradients and consequences of site-directed mutations*. Structure, 1995. **3**(6): p. 603-613.
3. Meroueh, S.O., et al., *Ab Initio QM/MM Study of Class A β -Lactamase Acylation: Dual Participation of Glu166 and Lys73 in a Concerted Base Promotion of Ser70*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(44): p. 15397-15407.
4. Clouthier, C.M., et al., *Chimeric beta-lactamases: global conservation of parental function and fast time-scale dynamics with increased slow motions*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52283.
5. Gobeil, S.M., et al., *Maintenance of Native-like Protein Dynamics May Not Be Required for Engineering Functional Proteins*. Chem Biol, 2014.
6. Fernandezpatron, C., L. Castellanossera, and P. Rodriguez, *Reverse Staining of Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gels by Imidazole-Zinc Salts - Sensitive Detection of Unmodified Proteins*. Biotechniques, 1992. **12**(4): p. 564-&.
7. Winter, G., C.M.C. Lobley, and S.M. Prince, *Decision making in xia2*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2013. **69**(7): p. 1260-1273.
8. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. Journal of Applied Crystallography, 2007. **40**(4): p. 658-674.
9. Stec, B., et al., *Structure of the wild-type TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2005. **61**(8): p. 1072-1079.
10. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2004. **60**(12): p. 2126-2132.
11. Adams, P.D., et al., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2010. **66**(2): p. 213-221.
12. Vagin, A.A., et al., *REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2004. **60**(12): p. 2184-2195.

13. (MOE), M.O.E., 2016. Chemical Computing Group Inc.
14. Chen, V.B., et al., *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 1): p. 12-21.
15. Sondergaard, C.R., et al., *Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values*. J Chem Theory Comput, 2011. **7**(7): p. 2284-95.
16. Olsson, M.H., et al., *PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions*. J Chem Theory Comput, 2011. **7**(2): p. 525-37.
17. Lindorff-Larsen, K., et al., *Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field*. Proteins, 2010. **78**(8): p. 1950-8.
18. Abraham, M.J., et al., *GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers*. SoftwareX, 2015. **1-2**: p. 19-25.
19. Schrödinger, L., *The PyMOL Molecular Graphics System*.
20. Lipari, G. and A. Szabo, *Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity*. Journal of the American Chemical Society, 1982. **104**(17): p. 4546-4559.
21. Lipari, G. and A. Szabo, *Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results*. Journal of the American Chemical Society, 1982. **104**(17): p. 4559-4570.

Annexe 5 – Études d’inhibition des β -lactamases TEM-1 et PSE-4 et de chimères de celles-ci.

Afin de remédier à la résistance bactérienne résultant de la production par les bactéries de β -lactamases, différentes approches ont été explorées par les industries pharmaceutiques. Une première approche a été la création d’analogues des antibiotiques de type β -lactame. Ces composés analogues aux substrats lient le site actif de la β -lactamase de façon similaire aux substrats dans l’état intermédiaire acyle-enzyme. Toutefois, certaines interactions stériques sont suffisamment défavorablement modifiées lors de la liaison de ces composés, entraînant un blocage covalent de celui-ci au niveau du site actif de l’enzyme. Ces composés, en phase de développement clinique, sont des membres des classes des monobactames, des ATMO (2-amino-4-thiazolyle méthoxyimino), des penems et des dérivés de sulfones et de boronates. Au cours des travaux entrepris dans le cadre du présent projet, ces composés n’ont pas été étudiés et ne seront donc pas discutés.

Inhibiteurs classiques – sulbactame, tazobactame et acide clavulanique

Une seconde approche utilisée par l’industrie pharmaceutique afin d’inhiber les β -lactamases a consisté au développement d’inhibiteurs basés sur le mécanisme catalytique de celles-ci. Ces inhibiteurs se lient de façon irréversible au site actif de l’enzyme. Ils sont catégorisés en tant qu’inhibiteurs dits : « suicide ». Trois de ces composés sont actuellement utilisés en clinique. Le premier composé introduit pour usage commercial fut l’acide clavulanique (ou clavulanate), isolé de l’organisme *Streptomyces clavuligerus* au cours des années 70 (1). Ce composé est faiblement actif lorsque utilisé seul (puisque’il n’inhibe que la β -lactamase et non la croissance bactérienne), mais grandement efficace contre plusieurs souches bactériennes résistantes, lorsque qu’il est utilisé en combinaison avec divers β -lactames (2).

En 1978 et 1980, le sulbactame et le tazobactame, des inhibiteurs synthétiques similaires à l’acide clavulanique, soit des sulfones de pénicillines, ont été introduits et depuis grandement utilisés en clinique (**Figure A5.1**) (3, 4). Ces trois inhibiteurs (aussi dénommés

inhibiteurs classiques) sont généralement utilisés en combinaison avec divers β -lactames afin de contrevenir aux β -lactamases procurant un large spectre de résistance.

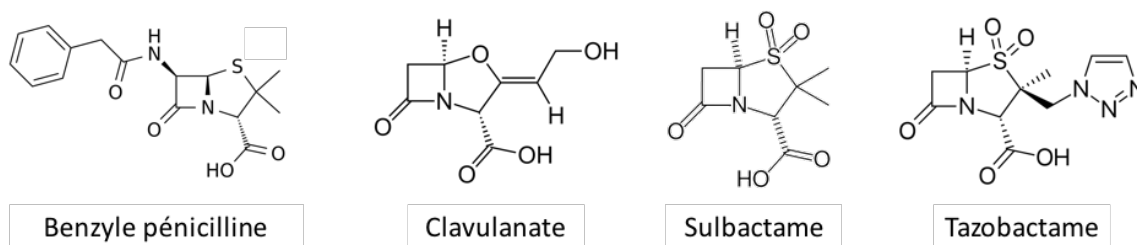


Figure A5.1. Inhibiteurs « classiques » des β -lactamases et comparaison à la structure de la benzylpénicilline.

Figure adaptée de (5).

Le mécanisme catalytique d'inhibition par ces composés a été démontré comme comportant plusieurs états intermédiaires menant ou non à l'inactivation de l'enzyme (**Figure A5.2 et A5.3**).

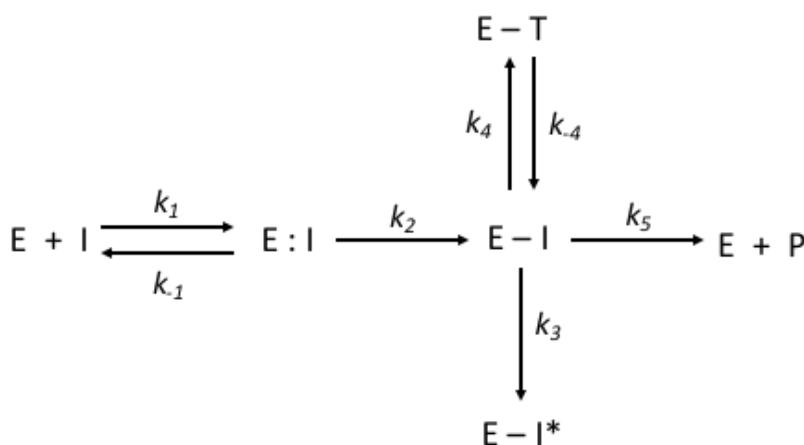


Figure A5.2. Mécanisme simplifié d'inhibition des β -lactamases de classe A par les inhibiteurs classiques.

E représente l'enzyme, I l'inhibiteur, E : I le complexe de Michaelis, E – I l'intermédiaire acyle-enzyme, E – T un état de l'enzyme transitoirement inactivée par un tautomère de l'inhibiteur, E – I* une enzyme inactivée de façon covalente dans un état acyle-enzyme et E + P l'enzyme régénérée suite à l'hydrolyse de l'inhibiteur. Figure adaptée de (5).

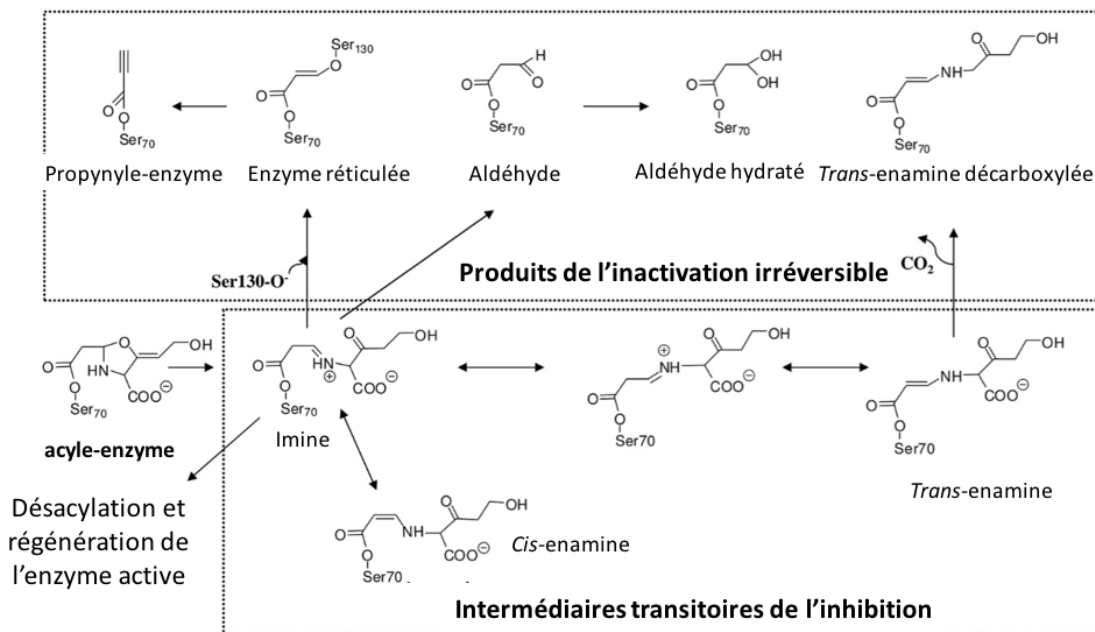


Figure A5.3. Mécanisme de l'inhibition par le clavulanate montrant les différents sous-produits possibles au cours de la réaction.

Figure adaptée de (5).

L'activité inhibitrice de ces composés est définie selon deux principaux paramètres cinétiques. En premier lieu, le K_I soit la constante d'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur, correspond à la concentration d'inhibiteur nécessaire afin que 50% des molécules d'enzymes soient efficacement inactivées. Cette constante est définie selon le ratio k_{-1}/k_1 et fait le parallèle avec la constante K_M lors d'une cinétique en présence d'un substrat. Le second paramètre définissant la cinétique d'inhibition est le k_{inact} , soit le taux d'inactivation en présence d'une concentration saturante d'inhibiteur. Tel que montré dans la **figure A5.2**, ces inhibiteurs peuvent inhiber l'enzyme, mais ils peuvent aussi être hydrolysés, ou encore, former différents intermédiaires inhibant temporairement l'enzyme (**Figure A5.3**). Cette constante (k_{inact}) considère toutes les microconstantes réactionnelles suite à la formation de l'état acyle-enzyme menant à l'inactivation de l'enzyme. Le ratio entre le nombre de molécules d'inhibiteur se liant au site actif de l'enzyme entraînant l'inactivation de celle-ci et le nombre de molécules hydrolysées est défini par t_n , « *inhibitor turnover number* » (ou ratio de partition de l'inhibiteur), calculé selon k_{cat}/k_{inact} (taux d'hydrolyse de l'inhibiteur/taux d'inactivation par l'inhibiteur). Des travaux antérieurs ont montré que pour TEM-1, le ratio t_n est de 160 pour le

clavulanate (160 molécules hydrolysées pour une liée), 10 000 pour le sulbactam et 140 pour le tazobactam (6-9).

Tel que discuté au chapitre 6, afin d'étudier la dynamique des β -lactamases natives TEM-1 et PSE-4, et des chimères de celles-ci en présence d'un ligand, nous avons envisagé l'utilisation des inhibiteurs classiques des β -lactamases. Ces composés sont aussi d'un intérêt particulier puisque différents travaux de la littérature scientifique ont montré que lorsque la Met69 de TEM-1 est mutée pour Ile, Leu ou Val, une résistance aux inhibiteurs est observée (9, 10). Des travaux par Meroueh *et al.* ont montré que la meilleure résistance aux inhibiteurs procurée par le mutant TEM-1(M69L) relativement à l'enzyme TEM-1 native, résulte d'une augmentation de 24 à 130 fois de K_I (la constante d'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur) signifiant une moins bonne liaison de l'inhibiteur à l'enzyme (Tableau A5.I). Ces travaux ont aussi montré que TEM-1(M69L) hydrolyse plus efficacement les inhibiteurs (augmentation de k_{cat}). Toutefois, la constante d'inactivation (k_{inact}) est elle aussi augmentée, résultant en un faible effet net sur le facteur de partition (k_{cat}/k_{inact}) (variation d'environ 2×).

Tableau A5.I. Constantes cinétiques de l'inhibition de TEM-1 et du variant TEM-1(M69L) par les inhibiteurs classiques, sulbactame, tazobactame et clavulanate.

Données provenant de (10) et (11).

| | Inhibiteur | k_{cat} (s^{-1}) | k_{inact} (s^{-1}) $\times 10^2$ | K_I (μM) | k_{cat}/k_{inact} |
|-------------------------|-------------|------------------------|--|-------------------|----------------------|
| | Sulbactame | $2,0 \pm 0,2$ | $0,020 \pm 0,005$ | $1,6 \pm 0,4$ | $10\ 000 \pm 3\ 000$ |
| TEM-1 | Tazobactame | $1,4 \pm 0,9$ | $0,3 \pm 0,2$ | $0,02 \pm 0,01$ | 475 ± 42 |
| | Clavulanate | $0,21 \pm 0,03$ | $0,17 \pm 0,03$ | $0,4 \pm 0,1$ | 125 ± 36 |
| TEM-1 (M69L) | Sulbactame | 56 ± 9 | $1,3 \pm 0,2$ | 50 ± 13 | 4320 ± 193 |
| | Tazobactame | 6 ± 2 | $1,9 \pm 0,1$ | $2,6 \pm 0,8$ | 330 ± 101 |
| | Clavulanate | 15 ± 4 | 5 ± 1 | 10 ± 1 | 300 ± 51 |

Selon l'accessibilité commerciale de ces composés, uniquement le tazobactame et le sulbactame ont été ici étudiés. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'inhibition des enzymes natives ainsi que des chimères les plus recombinées (cTEM-17m et cTEM-19m comportant la substitution Met69Thr) en déterminant les K_I (Tableau A5.II). Pour déterminer ce paramètre, la méthode graphique de Dixon a été utilisée. Elle permet l'analyse de droites ayant une intersection commune dans un graphique où les axes sont l'inverse de la vitesse

initiale et des concentrations d'inhibiteur, (**Figure A5.4**) ([10-12](#)). Brièvement, l'activité de l'enzyme est mesurée en fonction de différentes concentrations d'inhibiteurs, et ce pour trois différentes concentrations de substrat soit l'une sous le K_M du substrat, une seconde à la concentration du K_M et la troisième à une concentration saturante de substrat. L'intersection entre ces trois droites permet de déterminer K_I . Dans la littérature, la benzylpénicilline est généralement utilisée comme substrat afin de caractériser l'inhibition par les inhibiteurs classiques. Toutefois, ce composé possède un coefficient d'absorptivité molaire très faible, d'où l'utilisation de cuvettes ayant un chemin optique de 10 cm dans les travaux de cinétique présentés aux chapitres 2 et 4. Afin d'optimiser et de remédier à cette limitation technique, nous avons opté pour l'utilisation du substrat chromogénique CENTA (paramètres cinétiques présentés au chapitre 3). La figure 4 montre des exemples de graphiques de Dixon obtenus pour l'inhibition des chimères cTEM-17m et cTEM-19m par le sulbactam et le tazobactam. Les constantes d'inhibition K_I obtenues sont présentées au **Tableau A5.II**.

Tableau A5.II. K_I calculé selon la méthode graphique de Dixon pour l'inhibition de TEM-1, PSE-4, cTEM-17m et cTEM-19m par le tazobactame et le sulbactame en présence du substrat CENTA.

| | Tazobactame (μM) | Sulbactame (μM) |
|-----------------|---|--|
| TEM-1 | 0,02 \pm 0,01 | 1,0 \pm 0,2 |
| cTEM-17m | 0,007 \pm 0,001 | 0,14 \pm 0,04 |
| cTEM-19m | 0,013 \pm 0,006 | 0,05 \pm 0,01 |
| PSE-4 | 0,094 \pm 0,003 | 0,94 \pm 0,02 |

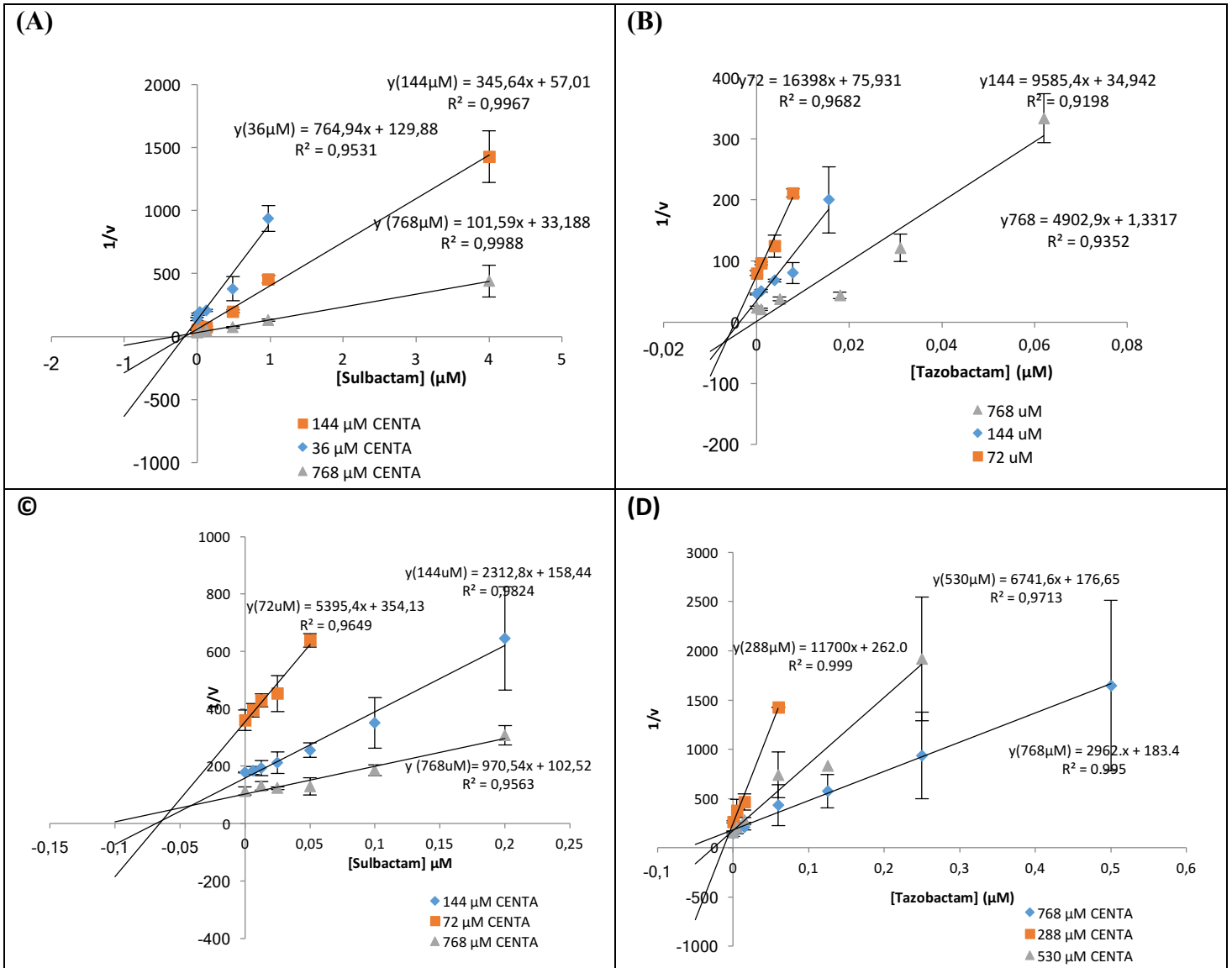


Figure A5.4. Exemple de graphiques de Dixon pour l'inhibition des chimères cTEM-17m (A et B) et cTEM-19m (C et D) par le sulbactame (A et C) et le tazobactame (B et D).

La concentration d'enzyme utilisée au cours de ces essais est de 5 nM et la concentration du substrat CENTA varie de 36 à 768 μM .

Ces résultats montrent que les chimères cTEM-17m et cTEM-19m, de par leurs K_i similaires à celles de TEM-1 pour le tazobactame ou réduite pour le sulbactame (signifiant une meilleure affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme) ne procure pas une meilleure résistance aux inhibiteurs que les enzymes natives. La mutation Met69Thr présente dans cTEM-19m, ne

permet donc pas une meilleure résistance dans le contexte des 18 autres mutations par rapport à TEM-1.

Afin de mieux caractériser l'inhibition par les inhibiteurs classiques, des tentatives de détermination du paramètre cinétique k_{inact} , soit le taux d'inactivation de l'enzyme par l'inhibiteur, ont aussi été effectuées. Pour déterminer ce paramètre, l'enzyme est incubée en présence de différentes concentrations d'inhibiteur, et ce, selon différentes durées d'incubations. Par la suite, une concentration saturante de substrat, généralement la benzylpénicilline, est ajoutée, puis l'activité résiduelle de l'enzyme en fonction du temps d'incubation est mesurée. Il a été rapporté dans la littérature qu'une augmentation initiale de l'activité (un « *burst effect* ») résulte de l'ajout d'une grande concentration de substrat, chassant les espèces intermédiaires entre l'inhibiteur et l'enzyme qui ne procurent pas une inhibition définitive (10). Plusieurs tentatives ont été effectuées en variant les concentrations de substrat, les temps d'incubation, les concentrations d'enzyme et même le substrat lui-même, mais tous ces essais n'ont résulté en aucun essai concluant.

Des échanges avec Professeur D. Golemi-Kotra (Université York) ayant publié ces essais pour le mutant TEM-1(M69L), ont permis de soulever un point technique qui aurait pu influencer les résultats obtenus. Nos essais de détermination du k_{inact} ont été effectués en utilisant un robot pipeteur. Celui-ci nécessite un temps minimum de 5 minutes d'incubation entre les différents points de données afin d'effectuer la mesure de l'activité grâce à la mesure d'hydrolyse du substrat suivie par spectrophotométrie. Selon les travaux antérieurs de Professeur Golemi-Kotra, l'inactivation par le tazobactam et le sulbactam est rapide (moins de 10 minutes). L'utilisation du robot n'est donc peut-être pas appropriée pour effectuer ces essais. Une optimisation de la méthodologie serait nécessaire afin d'obtenir plusieurs points de données entre 0 et 10 minutes d'incubation (Professeur Golemi-Kotra suggère que le premier point de donnée devrait être effectué après 10 secondes d'incubation) en utilisant le robot pipeteur. Ces travaux n'ont pas été poussés plus loin.

Inhibiteur protéique – BLIP

L'utilisation des BLIPs (β -lactamases inhibitory proteins) a été considérée dans l'optique de caractériser l'effet de la liaison d'un ligand sur la dynamique d'une protéine. Tel que présenté au chapitre 6, les BLIPs sont une famille de petites protéines inhibant certaines β -lactamases de classe A. Puisque les chimères de TEM-1 et PSE-4 montrent une augmentation importante de la dynamique sur l'échelle de temps corrélant à la fonction enzymatique, il aurait été intéressant de vérifier si ces changements de dynamique influence (positivement ou négativement) la liaison des BLIPs.

Afin de réaliser ces expériences, nous avons obtenu la construction de la protéine BLIP dans le plasmide pGR32 (nomenclature : pGR32-BLIP) comportant une étiquette poly-His(6) en N-terminal du groupe Palzkill (Baylor College of Medicine, Texas) ([13-15](#)). Le protocole d'expression rapporté dans la littérature a été utilisé et optimisé. Brièvement, les cellules sont propagées dans le milieu d'auto-induction ZYP-5052 utilisant le lactose comme agent d'induction, et ce, durant 3h à 37°C puis 16h à 22°C. La membrane extracellulaire des cellules est ensuite lysée en utilisant 15 mL par g de culot cellulaire de B-PER (1% Triton, 10 mM Tris-Hcl pH 8,0 et 150 mM NaCl) et un temps de contact de 25 minutes. Les cellules sont subséquemment centrifugées (15 000 RPM, 30 minutes, 4°C) afin de clarifier le lysat. Le surnageant est mis en présence de la résine Ni-NTA agarose à raison d'un mL de résine par 50 mL de lysat durant 16h (4°C) afin que BLIP se lie au nickel grâce à son étiquette poly-His. La purification de BLIP est ensuite effectuée sur colonne manuelle où des étapes de lavages au tampon salin Tris (TBS : 50 mM Tris-Cl pH7,5, 150 mM NaCl) et TBS + 5mM imidazole sont effectuées. BLIP est finalement élué de la colonne en utilisant graduellement des tampons TBS contenant 50, 100 et 150 mM d'imidazole. Puisque cette protéine ne fait que 18 kDa, l'analyse de la pureté se fait sur gel SDS-Page-Tricine ([16](#)) et la quantification s'effectue en guanidium•Hcl 8 M permettant de dénaturer la protéine et ainsi de maximiser son absorbance. Le coefficient d'absorption molaire spécifique à 280 nm est calculé selon :

$$E_{280\text{nm}} = (5500 \times n_{\text{Trp}}) + (1490 \times n_{\text{Tyr}}) + (125 \times n_{\text{s-s}}) = 28\,670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

où n_{Trp} et n_{Tyr} sont respectivement les nombres de résidus tryptophane et tyrosine et où $n_{\text{s-s}}$ correspond au nombre de ponts disulfure. Le rendement habituellement obtenu selon ce protocole de purification est de 0,5 mg de protéine pure par litre de culture (**Figure A5.5**).

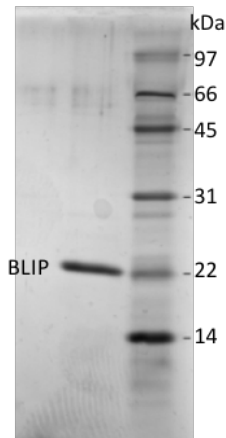


Figure A5.5. Gel SDS-PAGE tricine représentatif de la pureté obtenue suite à la purification de BLIP selon le protocole exposé.

Afin de caractériser l'affinité entre BLIP et les β -lactamases à l'étude, trois différentes approches ont été testées. La première approche consistait en la caractérisation de la cinétique d'inhibition. Pour ce faire, BLIP est incubé avec la β -lactamase pendant deux heures à 25°C dans un tampon de phosphate de sodium (pH 7,0) contenant 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA) augmentant à la stabilité de la β -lactamase. Un test d'activité est ensuite effectué en présence d'un substrat à une concentration correspondant à $2 \times K_M$. Des essais réalisés avec TEM-1 (5 nM), le substrat CENTA (150 μ M) permettant d'automatiser la méthode par l'utilisation d'une lectrice à plaque 96 puits couplée à un robot pipetteur, et des concentrations de BLIP variant de 0 à 150 nM, n'ont toutefois pas été concluants. Le K_I extrait de ces données (26 ± 9 nM) diffère significativement des valeurs disponibles dans la littérature ($0,11 \pm 0,01$ nM) ([17](#)). Le CENTA a donc été considéré comme potentiellement problématique puisque ce substrat n'a pas précédemment été utilisé dans ce type d'essai. Afin d'éliminer cette composante, nous avons tenté une seconde stratégie ne comprenant aucun substrat afin de vérifier l'affinité de BLIP pour les chimères.

La technique de protéolyse par impulsion ou « *pulse proteolysis* » est basée sur la résistance d'une protéine à la digestion par une protéase grâce à son repliement (**Figure A5.6**) ([18](#)). Cette technique peut aussi être utilisée de façon différentielle, c'est-à-dire que la stabilité de la protéine en présence d'un ligand peut être augmentée par rapport à la stabilité en absence

d'un ligand. L'effet du ligand sur la stabilité de la protéine peut donc être déconvolué et analysé en fonction de la constante de dissociation (K_d) (19).

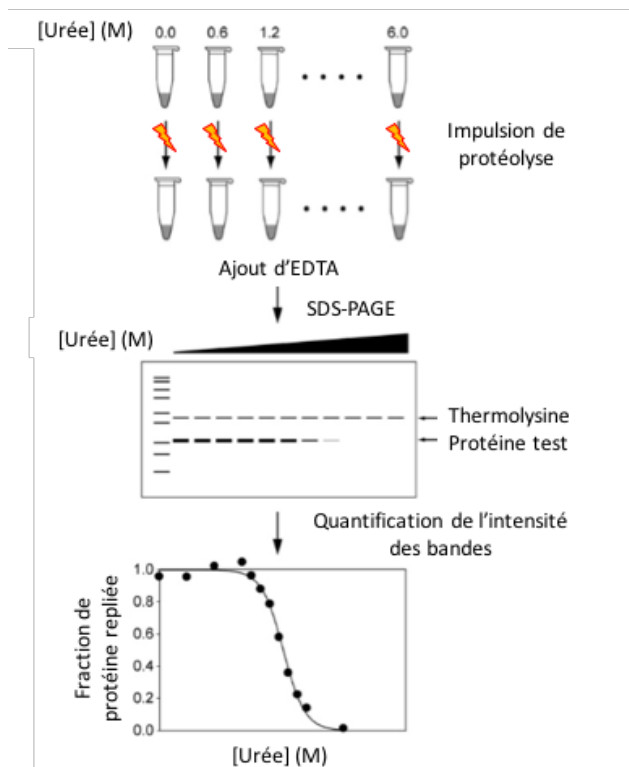


Figure A5.6. Schéma expérimental d'une expérience type de protéolyse par impulsion (« *pulse proteolysis* »). Figure adaptée de (18).

Au cours de cette méthode, la protéine d'intérêt est premièrement incubée en présence de concentration croissante d'urée entraînant une légère déstabilisation de celle-ci jusqu'à une dénaturation complète (6 M). Par la suite, la thermolysine, une protéase nécessitant du zinc et du calcium pour être fonctionnelle, est ajoutée. La protéolyse par cette protéase est effectuée durant impulsion d'une minute, suite à quoi de l'EDTA est ajouté afin d'arrêter la digestion. L'ajout d'EDTA entraîne toutefois une autolyse de la protéase générant des fragments de 8, 24 et 25 kDa visibles sur gel SDS-PAGE. La protéase aura digéré plus ou moins efficacement la protéine à l'étude en fonction du niveau de dénaturation procurée par l'urée. La digestion est ensuite visualisée sur gel SDS-PAGE où les bandes sont quantifiées en fonction de leur intensité relative. En fonction de l'intensité de la bande de la protéine d'intérêt et de la

concentration d'urée présente lors de l'essai, il est ensuite possible de déterminer le paramètre C_m qui correspond à la concentration d'urée où 50% de la protéine est repliée ou dénaturée. L'expérience est ensuite répétée, mais cette fois, en ajoutant un ligand. Il sera ensuite possible de calculer un ΔC_m . Ce paramètre est proportionnel au K_d , la constante de dissociation à l'équilibre pour le complexe protéine-substrat selon :

$$\Delta C_m \propto R T \ln\left(\frac{[ligand]}{K_d}\right)$$

ce qui permet de comparer l'affinité de différentes protéines pour un même substrat ou l'affinité d'une même protéine pour différents substrats (19).

Utilisant cette méthodologie, nous avons déterminé le C_m de TEM-1, PSE-4, cTEM-17m ainsi que de BLIP. Le ΔC_m a été déterminé pour la combinaison TEM-1/BLIP. La **figure A5.7** montre les gels utilisés pour quantifier la fraction de protéine repliée au cours des essais de protéolyse par impulsion pour TEM-1, BLIP et leur combinaison. Les courbes de quantification en fonction de la concentration d'urée sont aussi présentées. Le **tableau A5.III** rapporte les valeurs de C_m et ΔC_m obtenus au cours de ces études.

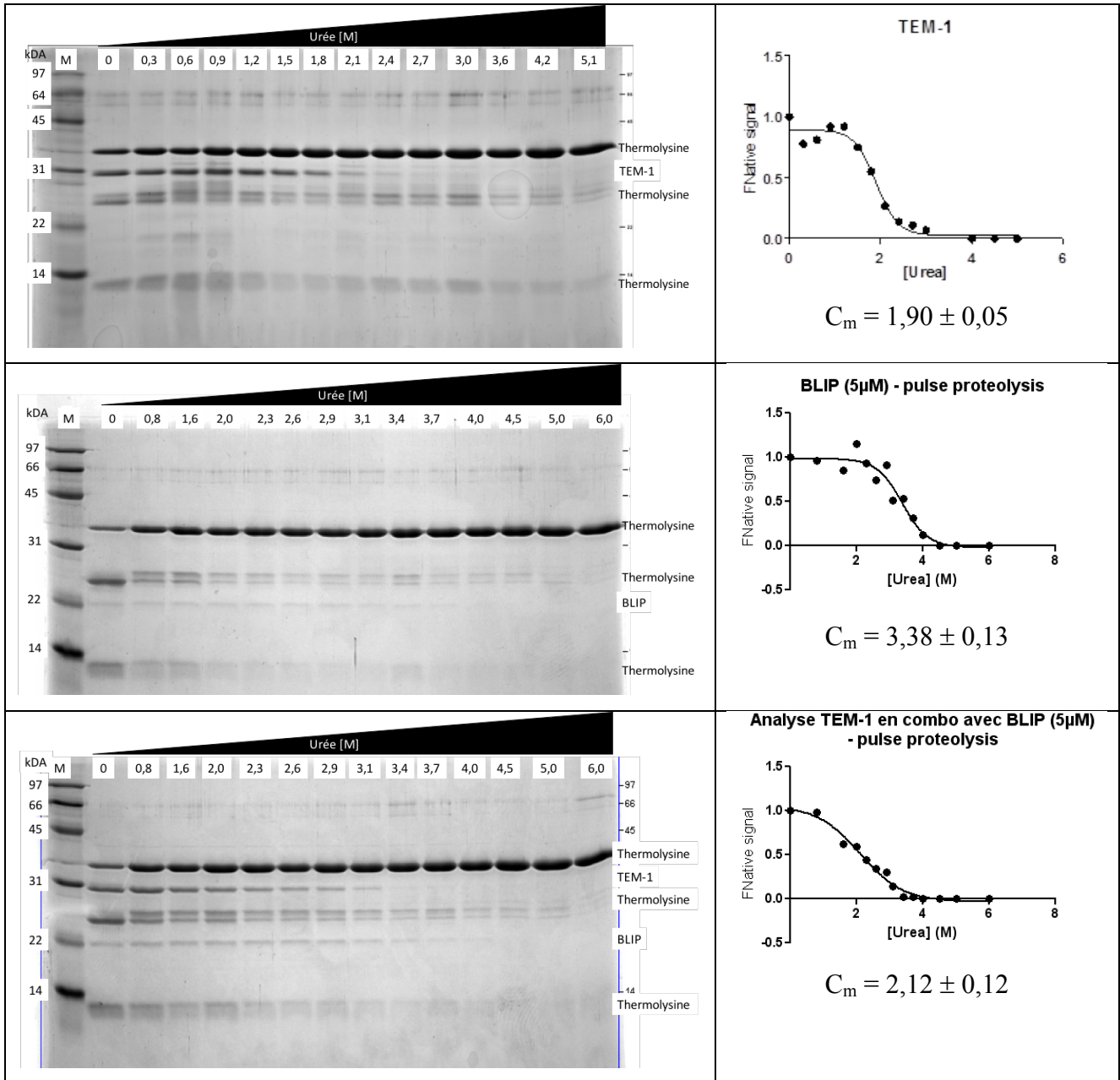


Figure A5.7. Quantification sur gel de la stabilité de TEM-1, BLIP et la combinaison de ces deux protéines selon la méthodologie de protéolyse pulsée.

Tableau A5.III. Concentration d'urée où une dénaturation de 50% de la protéine d'intérêt (C_m) est observée lors de l'expérience de protéolyse pulsée.

Les valeurs de C_m et ΔC_m présentes dans la littérature selon la référence (19) sont indiquées entre parenthèses.

| | C_m (M) | ΔC_m (M) |
|-----------------------|-----------|------------------|
| TEM-1 | 1,9 (2,0) | -- |
| BLIP | 3,4 (4,5) | -- |
| TEM-1 (+BLIP) | 2,1 | 0,2 (1,3) |
| BLIP (+ TEM-1) | 3,4 | 0,0 |
| PSE-4 | 1.5 | -- |
| cTEM-17m | 2.8 | -- |

Ces résultats montrent une différence importante du ΔC_m obtenu pour TEM-1 en présence de BLIP (0,2 M) relativement aux valeurs retrouvées dans la littérature (1,3 M). Ceci suggère une problématique liée à BLIP plutôt que TEM-1, en considérant la C_m obtenue pour chacune de ces protéines en fonction des valeurs de la littérature (19).

Parallèlement à la méthodologie de protéolyse pulsée, la méthodologie de fluorimétrie différentielle présentée dans les chapitres 2 et 3 a aussi été testée. Brièvement, TEM-1 fut dénaturée thermiquement en présence du SYPRO orange. Ce composé, s'intercalant dans les régions hydrophobes de la protéine, ne fluoresce pas lorsque celui-ci est libre. Toutefois, au cours de la dénaturation de la protéine, les régions hydrophobes de la protéine deviennent exposées, permettant au SYPRO orange de s'y lier et ainsi de fluorescer (**Figure A5.8**). La protéine d'intérêt peut être stabilisée par l'ajout d'un ligand, entraînant ainsi une augmentation de la température de dénaturation (ΔT_m) corrélant au K_d (20, 21).

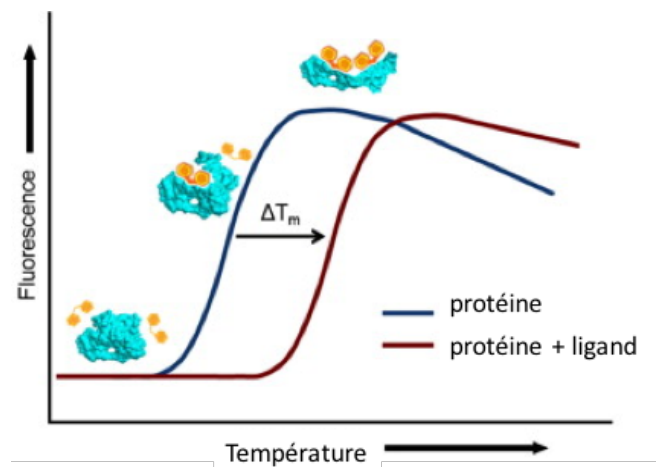
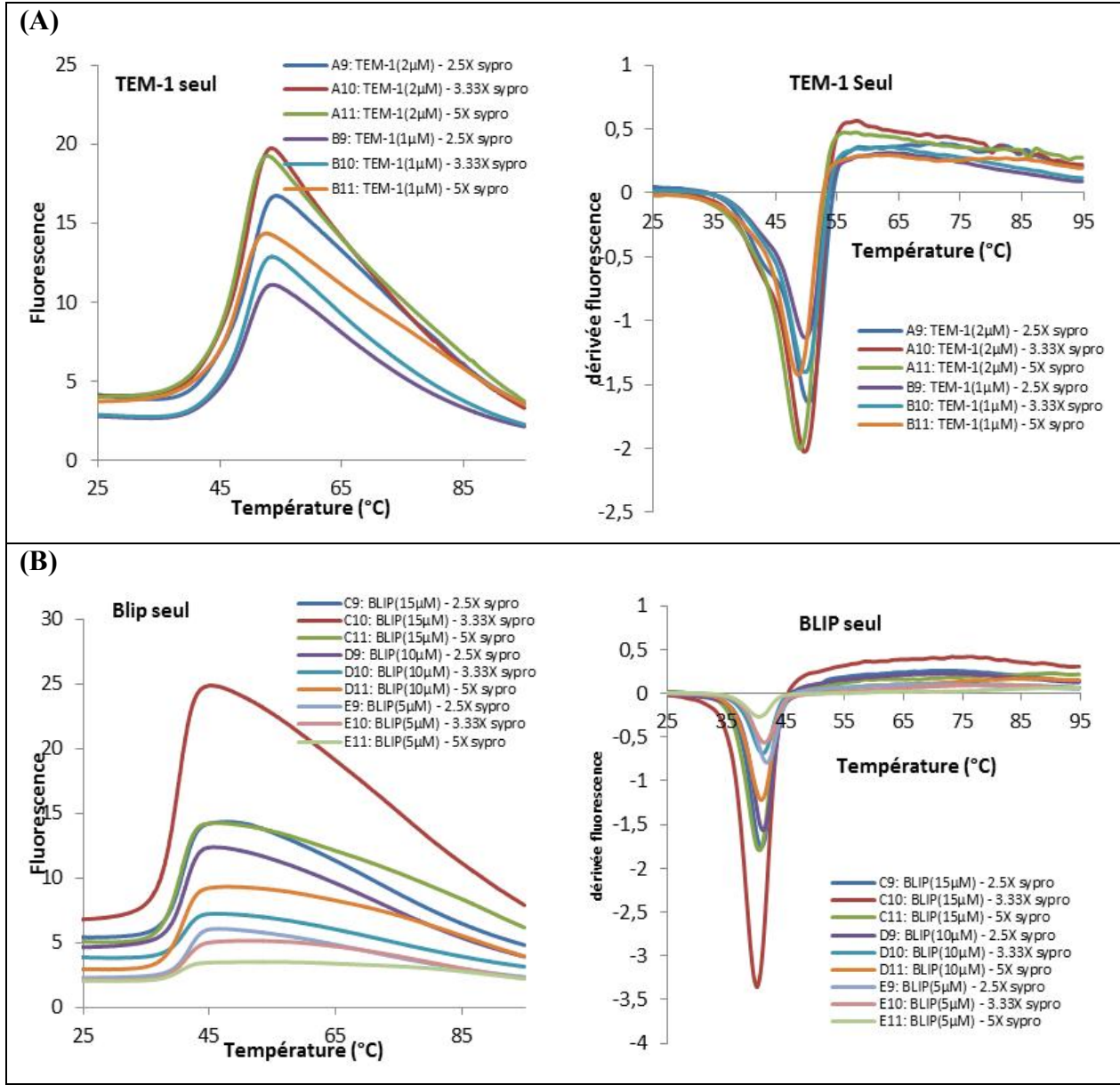


Figure A5.8. Courbe de dénaturation thermique d'une protéine d'intérêt au cours d'une expérience de fluorimétrie différentielle en présence de SYPRO orange.

Image inspirée de (21).

Des résultats préliminaires obtenus pour la dénaturation thermique de TEM-1, BLIP et la combinaison de TEM-1 et BLIP en présence de SYPRO orange sont présentés dans la **figure A5.9** et les valeurs de T_m et ΔT_m dans le **tableau A5.IV**.



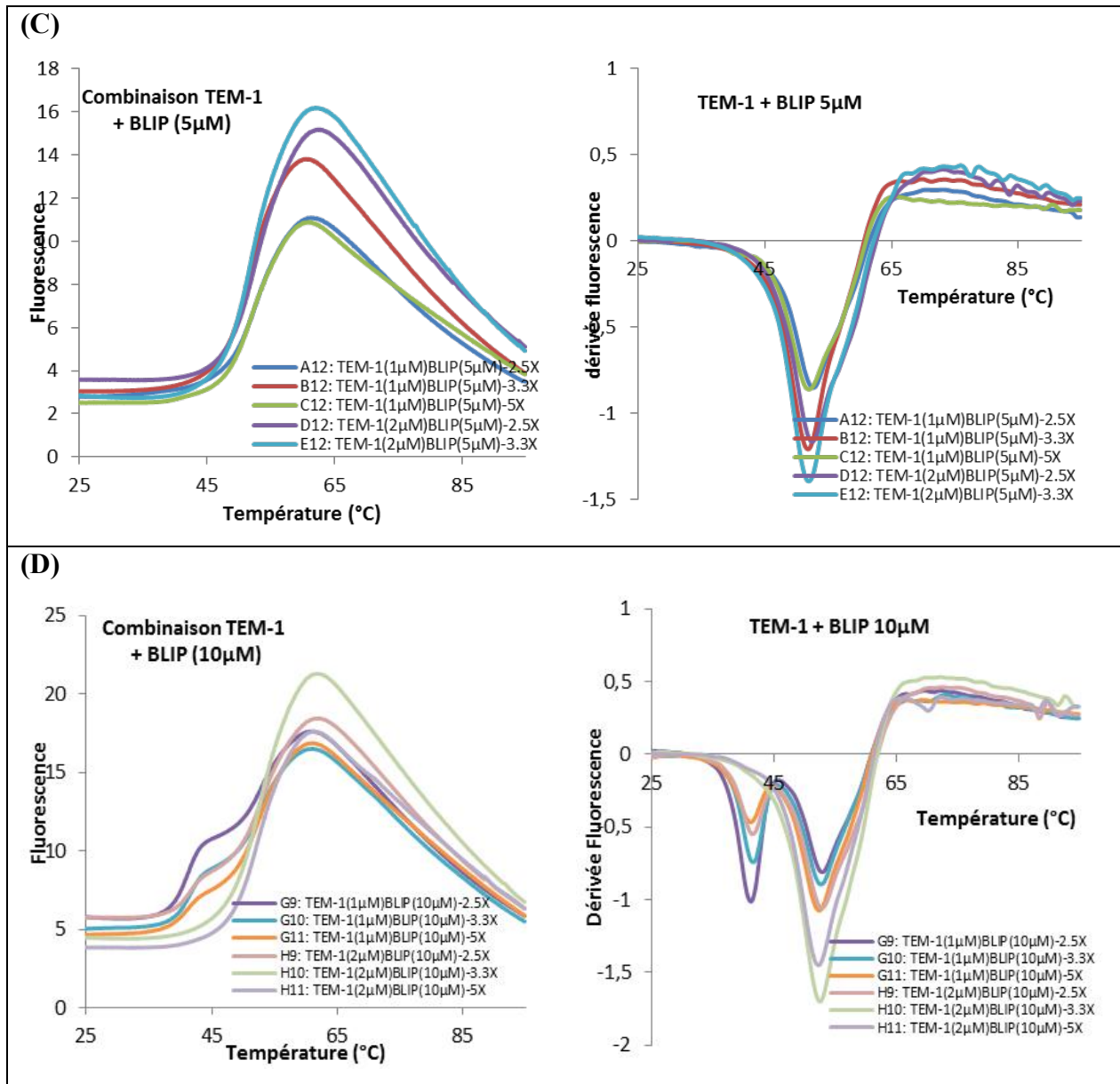


Figure A5.9. Courbe de fluorescence (gauche) et première dérivée de celle-ci (droite) résultant de l'expérience de dénaturation thermique en présence de SYPRO orange de TEM-1 (A), BLIP (B) et de la combinaison des deux protéines (C et D) permettant l'obtention de T_m .

Tableau A5.IV. T_m de TEM-1, BLIP et de la combinaison de ces protéines résultant fluorimétrie différentielle.

| | T_m (°C) | ΔT_m (°C) |
|----------------------|----------------|-------------------|
| TEM-1 | $49,7 \pm 0,3$ | -- |
| BLIP | $40,8 \pm 0,5$ | -- |
| TEM-1 (+BLIP) | $53,0 \pm 0,3$ | 3,31 |

Ces résultats démontrent effectivement une augmentation de la stabilité thermique de TEM-1 ainsi que de BLIP lorsque mis en commun, démontrant l'interaction entre celles-ci. La prochaine étape de ces travaux serait d'effectuer la même analyse, mais en présence des autres protéines du système, soient PSE-4 et les chimères, afin de vérifier si l'effet de BLIP sur le ΔT_m est différent en fonction de l'augmentation de dynamique lente observée chez les chimères. Ces travaux n'ont toutefois pas été poursuivis, faute de temps.

RÉFÉRENCES :

1. Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;11(5):852-7.
2. Brown AG. Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor--a case study in drug discovery and development. *Drug Des Deliv*. 1986;1(1):1-21.
3. English AR, Retsema JA, Girard AE, Lynch JE, Barth WE. CP-45,899, a Beta-Lactamase Inhibitor That Extends the Antibacterial Spectrum of Beta-Lactams: Initial Bacteriological Characterization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1978;14(3):414-9.
4. Fisher J, Belasco JG, Charnas RL, Khosla S, Knowles JR. β -Lactamase Inactivation by Mechanism-Based Reagents. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 1980;289(1036):309-19.
5. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(1):160-201.
6. Imtiaz U, Billings E, Knox JR, Manavathu EK, Lerner SA, Mobashery S. Inactivation of class A β -lactamases by clavulanic acid: the role of arginine-244 in a proposed nonconcerted sequence of events. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(11):4435-42.
7. Imtiaz U, Billings EM, Knox JR, Mobashery S. A Structure-Based Analysis of the Inhibition of Class A β -Lactamases by Sulbactam. *Biochemistry*. 1994;33(19):5728-38.
8. Naumovski L, Quinn JP, Miyashiro D, Patel M, Bush K, Singer SB, et al. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(9):1991-6.
9. Chaïbi EB, Péduzzi J, Farzaneh S, Barthélémy M, Sirot D, Labia R. Clinical inhibitor-resistant mutants of the β -lactamase TEM-1 at amino-acid position 69. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1998;1382(1):38-46.
10. Meroueh SO, Roblin P, Golemi D, Maveyraud L, Vakulenko SB, Zhang Y, et al. Molecular Dynamics at the Root of Expansion of Function in the M69L Inhibitor-Resistant TEM β -Lactamase from *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(32):9422-30.
11. Swarén P, Golemi D, Cabantous S, Bulychev A, Maveyraud L, Mobashery S, et al. X-ray Structure of the Asn276Asp Variant of the *Escherichia coli* TEM-1 β -Lactamase: Direct Observation of Electrostatic Modulation in Resistance to Inactivation by Clavulanic Acid. *Biochemistry*. 1999;38(30):9570-6.
12. Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J*. 1974;137(1):143-4.
13. Wang J, Zhang Z, Palzkill T, Chow DC. Thermodynamic Investigation of the Role of Contact Residues of beta-Lactamase-inhibitory Protein for Binding to TEM-1 beta-Lactamase. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(24):17676-84.
14. Wang J, Palzkill T, Chow DC. Structural Insight into the Kinetics and ΔG of Interactions between TEM-1 β -Lactamase and β -Lactamase Inhibitory Protein (BLIP). *Journal of Biological Chemistry*. 2008;284(1):595-609.

15. Zhang Z, Palzkill T. Determinants of Binding Affinity and Specificity for the Interaction of TEM-1 and SME-1 β -Lactamase with β -Lactamase Inhibitory Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(46):45706-12.
16. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. 2006;1(1):16-22.
17. Petrosino J, Rudgers G, Gilbert H, Palzkill T. Contributions of Aspartate 49 and Phenylalanine 142 Residues of a Tight Binding Inhibitory Protein of β -Lactamases. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(4):2394-400.
18. Park C, Marqusee S. Quantitative Determination of Protein Stability and Ligand Binding by Pulse Proteolysis. 2006:20.11.1-20.11.4.
19. Hanes MS, Ratcliff K, Marqusee S, Handel TM. Protein-protein binding affinities by pulse proteolysis: Application to TEM-1/BLIP protein complexes. *Protein Science*. 2010;19(10):1996-2000.
20. Vivoli M, Novak HR, Littlechild JA, Harmer NJ. Determination of Protein-ligand Interactions Using Differential Scanning Fluorimetry. *Journal of Visualized Experiments*. 2014(91).
21. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*. 2007;2(9):2212-21.