

2M11.2822.12

Université de Montréal

Structure d'un intermédiaire réactionnel covalent de la 2-kéto-3-déoxy-6-phosphogluconate aldolase d'*E.coli* à une résolution de 1.95 Å.

par

Julie Allard

Département de biochimie

Faculté de médecine

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

Juillet, 2000

©Julie Allard, 2000



Structure et un intérêt, une théorème est que de la 1-1-10-3-
degré-é-physique équilibre admissible d'écart à une résolution de

1958

W
4
N58
2000
N. 102

1958

1958

Department de chimie

Faculté de sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en chimie

1958

1958



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Structure d'un intermédiaire réactionnel covalent de la 2-kéto-3-
désoxy-6-phosphogluconate aldolase d'*E.coli* à une résolution de
1.95 Å.

présenté par:

Julie Allard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Aubin, Yves, Président
Sygusch, Jürgen, Directeur de
Reichler, Jeffrey Wayne, membre
Recherche

Mémoire accepté le: 00-11-07

Sommaire

La 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase est une enzyme de la voie métabolique Entner-Doudoroff, dans laquelle elle catalyse la scission réversible du KDPG en pyruvate et en glycéraldéhyde-3-phosphate. Elle est aussi impliquée dans le catabolisme des hydroxyprolines et dans la régulation du niveau de glyoxylate dans la cellule. La KDPG aldolase fait partie du groupe des aldolases de classe I, c'est-à-dire qu'elle procède via la formation d'une base de Schiff entre une lysine et le substrat. La KDPG aldolase d'*Escherichia coli* est une enzyme permettant un contrôle de la stéréochimie lors de la formation de liens carbone-carbone, d'où l'intérêt pour cette enzyme en synthèse organique.

La structure de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* a été publiée. Cependant, cette structure présente de nombreuses failles et elle ne permet pas l'étude du site actif de l'enzyme. Cette étude a toutefois permis de démontrer que la KDPG aldolase se replie selon un motif de baril α/β parallèle.

Ce travail présente le clonage, la surexpression, la purification, la cristallisation et l'étude cristallographique de la KDPG aldolase d'*Escherichia coli*.

Le clonage du gène de la KDPG aldolase d'*Escherichia coli* dans un vecteur de surexpression permet d'obtenir environ 100 milligrammes de l'enzyme pure par litre de culture. Un protocole de purification rapide et efficace a été mis au point, seule une étape de chromatographie par échange d'anions sur une Sepharose-Q est nécessaire. Des cristaux de qualité ont été obtenus dans des conditions de cristallisation à pH acide. Les cristaux

diffractaient les rayons X jusqu'à une résolution de 1.95 Å. La structure a été déterminée par la méthode de diffraction de dérivés contenant la séléno-méthionine à des longueurs d'ondes multiples (multiple wavelength anomalous dispersion, MAD) avec des cristaux de l'enzyme contenant des séléno-méthiones incubés avec le pyruvate. Les structures subséquentes (enzyme native et enzyme native incubée avec le pyruvate) ont été déterminées par remplacement moléculaire à partir des coordonnées de cette première structure.

L'incubation en milieu acide des cristaux avec le pyruvate a permis la stabilisation d'un intermédiaire carbinolamine covalent entre la lysine du site actif et le pyruvate. Cet intermédiaire est observé dans le site actif de chacune des trois sous-unités. L'observation de cet intermédiaire amène de nouvelles connaissances sur le site actif de la KDPG aldolase. Ceci nous permet de proposer un mécanisme réactionnel probable de la KDPG aldolase lorsqu'elle se trouve en milieu acide.

Ce travail amène donc la première structure valide d'une KDPG aldolase et la première structure d'un intermédiaire carbinolamine liant de façon covalente le substrat à l'enzyme.

Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et des abréviations	ix
Remerciements	xi
Chapitre 1: Introduction	1
1.1 La 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase	2
1.2 Les classes d'aldolases	3
1.3 Voies métaboliques.....	4
1.4 Propriétés de la 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase.....	7
1.4.1 Propriétés générales	7
1.4.2 Structure primaire, secondaire et tertiaire	8
1.4.3. Structure tridimensionnelle	11
1.5 Mécanisme catalytique de la KDPG aldolase	15
1.5.1 Mécanisme global.....	15
1.5.1.1 Formation de la carbinolamine	16
1.5.2 Réaction catalysée par un seul résidu basique.....	19
1.5.3 Stéréochimie de la réaction	19
1.6 Principes de cristallographie.....	21
1.7 Hypothèses et moyens expérimentaux proposés.....	23
Chapitre 2: Article	25
Abstract.....	27
Introduction	27
Results and discussion	28

Methods	34
Acknowledgements.....	37
References.....	39
Chapitre 3: Discussion et conclusion	41
3.1 Clonage, surexpression et purification.....	42
3.2 Cristallisation.....	42
3.3 Détermination de la structure	44
3.3.1 Détermination de la structure du dérivé semet contenant le pyruvate.....	44
3.3.2 Détermination de la structure de la structure de la protéine native	45
3.3.3 Détermination de la structure de la protéine native contenant le pyruvate ...	45
3.4 Analyse de la structure	46
3.4.1 Analyse de la structure du dérivé semet contenant le pyruvate	46
3.4.2 Analyse de la structure de la structure de la protéine native	47
3.4.2.1 Etat de protonation de la lysine 133.....	49
3.4.2.2 Etat de protonation du glutamate 45	49
3.4.3 Analyse de la structure de la protéine native contenant le pyruvate.....	50
3.4.3.1 Structure de la carbinolamine.....	50
3.4.3.2 Comparaison avec la structure de la protéine native.....	51
3.4.4 Comparaison avec la structure de la KDPG aldolase de <i>P. putida</i>	54
3.5 Acides aminés conservés et structure	55
3.6 Proposition d'un mécanisme réactionnel basé sur l'analyse des structures.....	58
3.7 Conclusion.....	63
Bibliographie	65

Liste des tableaux

Article

Table I. Data reduction and refinement statistics for KDPG aldolase.....	38
--	----

Liste des figures

Figure 1.	Voie métabolique d'Entner-Doudoroff.....	5
Figure 2.	Comparaison des séquences des KDPG/KHG aldolases provenant de différents organismes.....	10
Figure 3.	Structure tridimensionnelle de la KDPG aldolase de <i>Pseudomonas putida</i> . Vue d'ensemble de l'arrangement trimérique (a) et représentation schématique de la structure d'un monomère (b).....	12
Figure 4.	Site actif présumé de la KDPG aldolase de <i>Pseudomonas putida</i>	13
Figure 5.	Mécanisme catalytique général d'une aldolase de classe I : exemple de la fructose-bisphosphate aldolase de muscle de lapin.....	17
Figure 6.	Mécanisme de la formation d'une carbinolamine. Mécanisme concerté (a) et mécanisme séquentiel (b).....	18
Figure 7.	Photo de cristaux de KDPG aldolase native (a) et patron de diffraction d'un cristal de KDPG aldolase (b).	43
Figure 8.	Structure de la KDPG aldolase native (a), superposition avec la structure du dérivé se-met (b) et structure d'un monomère de la KDPG aldolase native (c).....	48
Figure 9.	Superposition des sites actifs de la native en absence (en vert) et en présence de pyruvate.....	53
Figure 10.	Mécanisme proposé pour la formation de la carbinolamine.....	62
 <u>Article</u>		
Figure 1.	Stereoview of the active site in a native KDPG aldolase protomer.....	30
Figure 2.	Stereoview of the active site of a KDPG aldolase protomer corresponding to native crystals soaked with 10mM pyruvate.....	31
Figure 3.	Stereoview of the reaction model proposed describing carbinolamine formation between Lys-133 and pyruvate.....	35

Liste des sigles et abréviations

Å : Angstrom

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine triphosphate

ATP : adénosine triphosphate

Da: Dalton

DHAP : dihydroxyacétone phosphate

DNFB : dinitrofluorobenzène

DTT: 1,4-dithiothréitol

E.coli: Escherichia coli

EDTA: acide éthylènediamine tétraacétique

G3P: Glycéraldéhyde-3-phosphate

KDPG : 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate

KHG: 2-kéto-4-hydroxyglutarate

MAD: Multiple wavelength Anomalous Dispersion

MIR: Multiple Isomorphous Replacement

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

NCS : non-crystallographic symmetry

NSLS : National Synchrotron Light Source

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne

PEG: Polyéthylène glycol

rmsd : root mean square deviation

Semet : séléno-méthionine

Tris: 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propane-diol

UV : ultra-violet

Remerciements

Merci à mon directeur de recherche, le Dr Jurgen Sygusch, pour m'avoir confié ce projet, pour son soutien et son aide lors de l'interprétation des structures.

Merci à l'équipe du laboratoire, particulièrement à Pawel Grochulski pour sa patience et sa générosité lors de l'apprentissage des techniques de résolution de structure, à Christine Munger qui a fait tourner le labo cette dernière année, à Louis-David Boudrias et à Tae-Sung Yoon. Merci aux anciens qui m'ont donné toutes mes bases pour travailler en labo : Steve Tétreault, Jean-Pascal Viola, Véronique Sauvé, Vivian Saridakis, Christian Houde et Hérick Moniz. A tous, merci pour les conseils, les discussions (surtout pour celles autres que biochimiques), la présence et le support.

Finalement merci à mes proches, particulièrement à Luc, pour leur support, leurs encouragements et leur patience.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase

La 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase (E.C. 4.1.2.14) catalyse de nombreuses réactions, principalement la condensation réversible du pyruvate et du glycéraldéhyde-3-phosphate en 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate de même que l'échange d'atomes d'hydrogènes du groupement méthyle du pyruvate avec des protons du solvant¹. Le séquençage des gènes a montré que la KDPG aldolase était identique à la 2-kéto-4-hydroxyglutarate aldolase, une enzyme importante dans le métabolisme des hydroxyprolines chez les mammifères. Elle catalyse donc la condensation du pyruvate avec le glyoxylate en 2-kéto-4-hydroxyglutarate². L'enzyme intervient donc dans deux voies métaboliques distinctes. Elle est KDPG aldolase dans la voie métabolique Entner-Doudoroff et KHG aldolase dans la voie du catabolisme des hydroxyprolines et dans la régulation du niveau de glyoxylate dans la cellule.

Elle possède aussi une activité β -décarboxylase plus ou moins prononcée selon son organisme d'origine. Chez *Escherichia coli*, le ratio des activités KHG-aldolase et β -décarboxylase est de 1.0³. Cette caractéristique particulière peut s'avérer intéressante pour la poursuite d'études phylogénétiques, l'hypothèse ayant été émise que les aldolases pourraient dériver de β -décarboxylases.

De nombreuses études ont été effectuées dans les années 1970 afin d'approfondir la connaissance du mécanisme des KDPG aldolases^{4,5,6,7,8}. La KDPG aldolase est membre de la famille des phosphoénol/pyruvate aldolases qui sont reconnues pour

produire des produits stéréochimiquement purs⁹. Pour cette raison, les KDPG aldolases peuvent être de puissants outils en synthèse organique pour la formation de liens carbone-carbone avec une stéréochimie contrôlée.

De plus, il a été démontré que des mutations de la KDPG aldolase la rendant inactive inhibe la croissance de *Escherichia coli* sur différents milieux lorsqu'il y a présence de D-gluconate, D-glucuronate ou D-galacturonate. L'arrêt de la croissance est dû à une accumulation de KDPG dans les cellules^{10,11}. La connaissance du mécanisme réactionnel de la KDPG aldolase pourrait conduire à la synthèse d'inhibiteurs pouvant être utilisés contre des pathogènes utilisant la voie d'Entner-Doudoroff, tel que *Helicobacter pylori*¹².

1.2 Les classes d'aldolases

Les aldolases sont réparties en deux classes selon leur mécanisme catalytique¹³. Ce classement a d'abord été établi par la comparaison des mécanismes réactionnels des fructose-bisphosphate aldolases. La classe I comprend les aldolases qui ne requièrent aucun cofacteur pour leur activité catalytique. Elles procèdent plutôt par la formation d'une base de Schiff entre l'enzyme et son substrat par l'intermédiaire d'une lysine du site actif¹⁴. L'intermédiaire sous forme de base de Schiff est réduit par le borohydrure de sodium qui inactive complètement l'enzyme.

Les aldolases de classe II, quant à elles, nécessitent la présence d'un ion divalent. Elles sont donc inhibées par la présence d'agents chélateurs des métaux tel l'EDTA, contrairement aux aldolases de classe I. Par contre, elles ne sont pas affectées par le borohydrure de sodium, ce qui permet de déterminer facilement à quelle classe appartient une aldolase.

La KDPG aldolase est une aldolase de classe I, il a été démontré qu'elle était inhibée par le borohydrure de sodium mais non-affectée par des agents chélateurs^{1,4}.

1.3 Voies métaboliques

La voie métabolique d'Entner-Doudoroff chez *Escherichia coli*, telle que décrite par Egan et al², est composée de deux enzymes, la 6-phosphogluconate déshydratase, encodée par le gène *edd* et la 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase, encodée par le gène *eda*. C'est une voie alternative du métabolisme du glucose utilisée chez certaines bactéries (figure 1).

L'activité déshydratase est pratiquement absente dans les cellules cultivées sur un milieu de glucose, son expression est induite lorsque la cellule se trouve dans un milieu contenant le gluconate. Par contre, l'activité basale de la KDPG aldolase est très élevée, indépendamment de la source de carbone contenue dans le milieu. On observe tout de même une induction triplant cette activité en présence de gluconate.

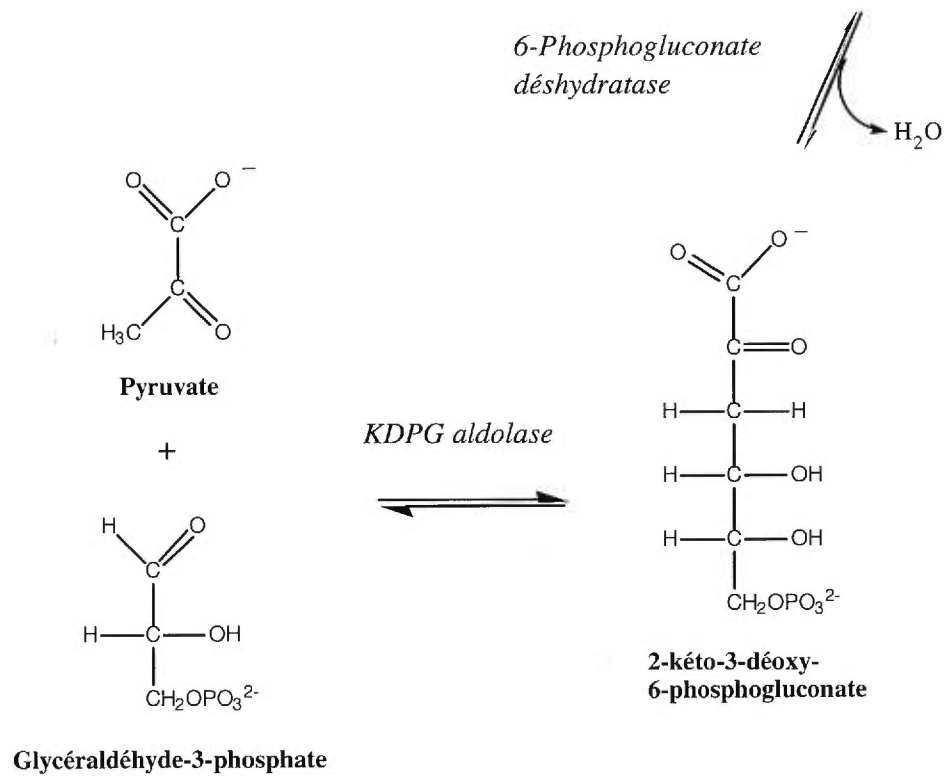
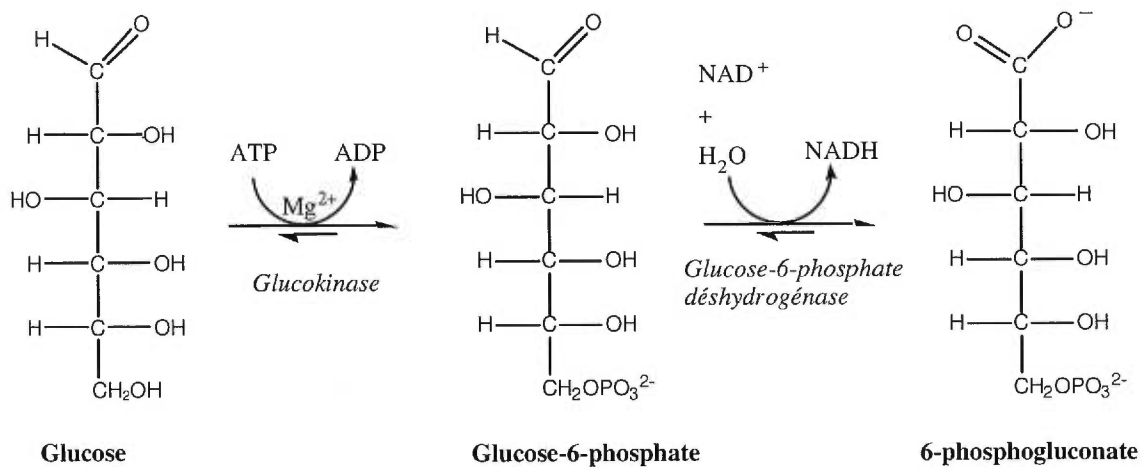


Figure 1. Voie métabolique d'Entner-Doudoroff²⁷.

L'opéron *edd-eda* est composé des gènes *edd* et *eda* ainsi que de quatre promoteurs différents. L'activité basale élevée de la KDPG aldolase est expliquée par la transcription constitutive à partir des promoteurs P₂, P₃ et/ou P₄. Le promoteur P₁ serait le promoteur sensible à la présence de gluconate, donc celui qui serait responsable de l'induction de la voie d'Entner-Doudoroff. Son action serait contrôlée par un répresseur produit par le gène *gntR*.

La KDPG/KHG aldolase, par son activité KHG aldolase, est impliquée dans une voie métabolique alternative au cycle de Krebs lorsque la bactérie se trouve dans un milieu fournissant l'acétate comme source de carbone. Au moyen de cette voie, elle est responsable de la régulation du niveau de glyoxylate dans la cellule. Ceci lui confère un rôle majeur dans le retour de la respiration suivant une réponse de réparation de l'ADN (la réponse SOS) suite à une exposition à des agents dommageables pour l'ADN. En effet, un mutant inactif de la KHG aldolase est incapable de recouvrer ses fonctions respiratoires après une exposition à des rayons UV induisant la réponse de réparation SOS. La KHG aldolase est induite lors d'une exposition aux rayons UV, multipliant son niveau cellulaire par un facteur 200. Cette induction se fait au niveau traductionnel, alors que l'induction de la voie Entner-Doudoroff se fait au niveau transcriptionnel¹⁵.

1.4 Propriétés de la 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase

1.4.1 Propriétés générales

La KDPG aldolase d'*Escherichia coli* est une enzyme composée de trois sous-unités identiques de 22 283 Da. Chaque sous-unité contient 213 acides aminés. Son activité enzymatique est conservée dans des conditions acides inactivant la fructose-bisphosphate aldolase en dissociant ses sous-unités¹⁶. Son activité est optimale à pH 7.2 et plus de 50 % de son activité est conservée entre pH 5 et pH 10⁹.

L'activité catalytique est inhibée par le bromopyruvate, un analogue du substrat pyruvate. Le bromopyruvate est à la fois substrat et inhibiteur. Il est substrat puisqu'il y a formation de la base de Schiff et échange de protons. Ceci est prouvé par l'observation d'un échange d'hydrogènes tritiés du bromopyruvate tritié au solvant¹⁷. Le bromopyruvate est aussi inhibiteur puisqu'il inhibe la réaction de clivage du KDPG, procédant par l'estérification d'un groupement carboxyle et de cystéines. Cette inhibition est protégée par une pré-incubation avec le pyruvate. La présence du pyruvate empêche l'estérification du glutamate-45 mais n'empêche pas celle des deux cystéines. Ceci suggère que ce glutamate tient le rôle de donneur/accepteur de protons nécessaire dans le mécanisme réactionnel¹⁸.

L'inhibition par le bromopyruvate se fait via la formation d'un ester carboxylate entre le bromopyruvate et le glutamate. La réduction par le borohydrure de sodium de

l'enzyme inhibée produit l'amine secondaire résultant de la formation d'une base de Schiff entre la lysine et le bromopyruvate déjà fixé au glutamate 45. La réduction stabilise le pont formé par le bromopyruvate entre la lysine et un carboxylate adjacent. Ceci prouve la présence du groupement carboxylate adjacent à la lysine; l'isolation du peptide contenant l'intermédiaire réduit permet l'identification de ce glutamate^{19,20,21}.

L'activité est aussi inhibée par le dinitrofluorobenzène qui réagit avec quatre lysines par sous-unité de KDPG aldolase dont trois près du site actif. En effet, l'arylation de ces trois lysines est protégée par une incubation avec le KDPG et le phosphate inorganique mais pas par le pyruvate. Ceci aurait pu démontrer la présence de sites de liaison du phosphate et permettre d'identifier les résidus impliqués. Cependant, les études de cinétique enzymatique ont démontré que l'inhibition par le DNFB était due à un changement conformationnel après la liaison de la première molécule de DNFB plutôt qu'à un blocage des sites de liaison du phosphate^{22,23}. Il est tout de même possible que les lysines soient impliquées dans la liaison du phosphate. Les lysines protonées stabiliseraient les charges négatives du groupement phosphate.

1.4.2 Structure primaire, secondaire et tertiaire

La structure primaire entière de la protéine a été déterminée pour la KHG aldolase en 1988 par Vlahos et al¹⁸. La séquence nucléotidique a ensuite été déterminée pour la KDPG aldolase en 1992² permettant ainsi de prouver que les présumées deux enzymes n'étaient en fait qu'une seule.

Les résidus du site actif ont été identifiés. Il s'agit de la lysine-133 qui forme la base de Schiff, du glutamate-45 et de l'arginine-49. Ces résidus sont essentiels à l'activité catalytique²⁴. L'alignement des séquences de KDPG/KHG aldolases connues permet de constater que la séquence de la KDPG/KHG aldolase est bien conservée d'une espèce à l'autre (figure 2). Les trois résidus connus du site actif sont hautement conservés chez toutes les KDPG/KHG aldolases dont la séquence est connue.

On observe aussi huit autres résidus qui sont identiques dans toutes les KHG/KDPG aldolases. Ces résidus ont probablement un rôle important à jouer dans la catalyse ou dans le maintien de la structure, il serait probablement possible d'éclaircir le rôle de chacun en examinant la structure tridimensionnelle de la protéine.

La KDPG aldolase d'*Escherichia coli* est trimérique, elle contient donc trois sites actifs. Les enzymes trimériques sont très rares, ce qui confère à la KDPG aldolase une particularité fort intéressante. Les KHG aldolases des mammifères, soit du rat et du bœuf, sont quant à elles tétramériques.

	1				45	49
<i>E. coli</i>	MKNWKTS	AESILTTGPV	VPVIVVKKLE	HAVPMKALV	AGGVRVLEVT	LRTECAVDAI
<i>S. coelicolor</i>	MSSPLPSSP	AASVLDLAPV	VPVVVVDDLA	DAVPLARALV	AGGLPAIEVT	LRTVPVALDAI
<i>H. pylori</i>	MQDK	IIIEVLQISPI	VPVVVIENIK	DAVPLAQSLI	EGGIPIIEVT	LRSSCALEAI
<i>Z. mobilis</i>	MQDK	IIIEILQISPI	VPVVVVENIK	DAVPLAQSLI	EGGIPIIEVT	LRSNCALEAI
<i>T. pallidum</i>	MIT	IFEALERVRV	IPVVTLEERVE	DAVPLARALI	TGGIRCMEVT	FRTLVAEAI
<i>B. subtilis</i>	MESKV	VENRLKEAKL	IHAVIRSKDKQ	EACQQIESLL	DKGIRAVEVT	YTTPGASDII
<i>H. influenzae</i>	MSYTTQQ	IIIEKLRELKI	VPVIALDNAD	DILPLADTLA	KNGLSVAEIT	FRSEAAADAI
<i>E. chrysanthemi</i>	MKNWKTS	AEQILTAGPV	VPVIVINKLE	HAVPMKALV	AGGVRVLELT	LRTECAVEAI
<i>P. aeruginosa</i>	MHNLEQKTAR	IDTLCREARI	LPVITIDREA	DILPMADALA	AGGLTALEIT	LRTAHGLTAI
<i>P. putida</i> [6aa]	-KLSMADKAAR	IDAICEKARI	LPVITIAREE	DILPLADALA	AGGIRTLLEV	LRSQHGLKAI
<i>H. alicantei</i>	MSHHP	ARRIRETG-L	IAIIRGTDAD	TAIETVEALT	RGGVSTVEIT	ANTDGVLGML
<i>N. meningitidis</i>	MSKLT	PREILTAGAV	VPVMAIDDL	TAIDLHALV	EGGIPTLEIT	LRTVPVGLDAI

<i>E. coli</i>	RAIAKE--VP	EAIVGAGTVL	NPQQLAEVTE	AGAQFAISPG	LTEPLLKAAT	EGTIPLIPGI
<i>S. coelicolor</i>	RAIAGE--VP	DAVVGAGTVV	TAEQVGEVVA	AGARFLVSPG	WTDTLVEAMR	GSQVPLPGV
<i>H. pylori</i>	ELTAKN--MP	KMRVGAGTIL	NPTQLEQAQN	RGAEFLISPG	LTIKLLEHAK	KKDMPLIPGV
<i>Z. mobilis</i>	ELTAKN--VP	KMRVGAGTIL	NLTQLEQAQN	RGAEFLISPG	LTIKLLEHAK	KKDMPLIPGV
<i>T. pallidum</i>	AAIRQE--CA	DVLLGAGTVL	TVEQAQQAQA	AGAQFVSPG	FNPRVVAHCL	GHGVPILPGI
<i>B. subtilis</i>	ESFRN--RE	DILIGAGTVI	SAQQAGEAAK	AGAQFIVSPG	FSADLAEHLS	FVKTHYIPGV
<i>H. influenzae</i>	RLLRAN--RP	DFLIAAGTVL	TAEQVVLAKS	SGADFVVTPG	LNPKIVKLCQ	DLNFPITPGV
<i>E. chrysanthemi</i>	RLLIAQE--VP	DAIVGAGTVT	NPQQLAEVTA	AGAQFAISPG	LTEPLLKAAT	EGTIPLIPGI
<i>P. aeruginosa</i>	RRLSEE--RP	HLRIGAGTVL	DPRTFAAAEK	AGASFVVTPG	CTDELLRFAL	DSEVPLPGV
<i>P. putida</i>	QVLREQ--RP	ELCVGAGTVL	DRSMFAAVEA	AGAQFVVTPG	ITEDILEAGV	DSEIPLPGI
<i>H. alicantei</i>	RDVSASFAD	EVTIGAGTVL	DGETARAALL	AGAEYLVTP	FDEGVIRTGN	RYGAPSMVGI
<i>N. meningitidis</i>	RLLIAKE--VP	NAIVGAGTVT	NPEQLKAVED	AGAVFAISPG	LHESLAKAGH	NSGIPLIPGV

133

<i>E. coli</i>	STVSELMLGM	DYGLKEFKFF	PAEANGGVKA	LQAIAGPFSQ	VRFCPTGGIS	PANYRDYLAL
<i>S. coelicolor</i>	STASEVVALL	ERGVREMKFF	PAEAAGGTAY	LKALAAPLPQ	ARFCPTGGIT	PASAPEYLAL
<i>H. pylori</i>	SSSSEVMQAL	ELGYSALKFF	PAEYCGGVKL	LNAFNGPFRG	VKFCPTGGIS	ADNMRSYLN
<i>Z. mobilis</i>	SSSSEVMQAL	ELGYNALKFF	PAEYCGGVKL	LNAFNGPFRG	VKFCPTGGIS	ADNMRSYAL
<i>T. pallidum</i>	ASATIERAL	EPGISVVKFF	PAELLGGTAM	MSALARPYTA	VRFPVTPGGIH	LNNLAEYVAH
<i>B. subtilis</i>	LTPSEIMEAL	TFGFTTLKLF	PSGV-FGIPF	MKNLAGPFPQ	VTFIPTGGIH	PSEVPDWLRA
<i>H. influenzae</i>	NNPMAIEIAL	EMGISAVKFF	PAEASGGVKM	IKALLGPYAQ	LQIMPTGGIG	LHNIRDYLAI
<i>E. chrysanthemi</i>	STVSELMLGM	DYGLREFKFF	PAEANGGVKA	LQAIAGPFGK	IRFCPTGGIS	LKNYRDYLAL
<i>P. aeruginosa</i>	ASASEIMLAY	RHGYYRFFKL	PAEVSGGPAA	LKAFSGPFPD	IRFCPTGGVS	LNNLADYLAV
<i>P. putida</i>	STPSEIMMGY	ALGYRFFKL	PAEISGGVAA	IKAFGGPFGD	IRFCPTGGVN	PANVRNYMAL
<i>H. alicantei</i>	ASPTAEVNAY	EAGAEMVKVF	PA-GTTLGPEF	VSALGGPLGH	IPTVPTGGVA	LDTVDEFFDA
<i>N. meningitidis</i>	ATPGEIQLAL	EHGIDTLKLF	PAEYVGGKAM	LKALYGPYAD	VRFCPTGGIS	LATAPEYLAL

213

<i>E. coli</i>	KSVLCIGGSW	LVPADALEAG	DYDRITKLAR	EAVEGAKL	
<i>S. coelicolor</i>	PNVGCVGGSW	MLPKDAIAGR	DWARVEALAR	EAAALSAGGT	SR
<i>H. pylori</i>	ENVLCVGGSW	LTPKNLIQNK	EWDKITEICK	RALALR	
<i>Z. mobilis</i>	ENVVCVGGSW	LTPKDLIQNK	EWDKITEICK	RALALR	
<i>T. pallidum</i>	PRVLACGGSW	MVPAQSIAAG	DFSQVTALSQ	QTLQIVGVM	
<i>B. subtilis</i>	GAGAVGVGSQ	LGSCSKEDLQ	AVFQV		
<i>H. influenzae</i>	PNIVACGGSW	FVEKKLIQSN	NWDEIGRLVR	EVIDIIK	
<i>E. chrysanthemi</i>	KSVLCVGGSW	LVPADALESG	DYDRITALAR	EAVAGATA	
<i>P. aeruginosa</i>	PNVMCVGGTW	MLPKAVVDRG	DWAQVERLSR	EALERFAEHR	RH
<i>P. putida</i>	PNVMCVGTGW	MLDSSWIKNG	DWARIEACSA	EAIALLDAN	
<i>H. alicantei</i>	GATAVGVGSA	IVDNDAVFAR	DFATIETNAR	SFVEAVERAR	RD
<i>N. meningitidis</i>	PNVLCVGGSW	LTPKEAVKKN	DWDITTRLAK	EAAALKPKA	

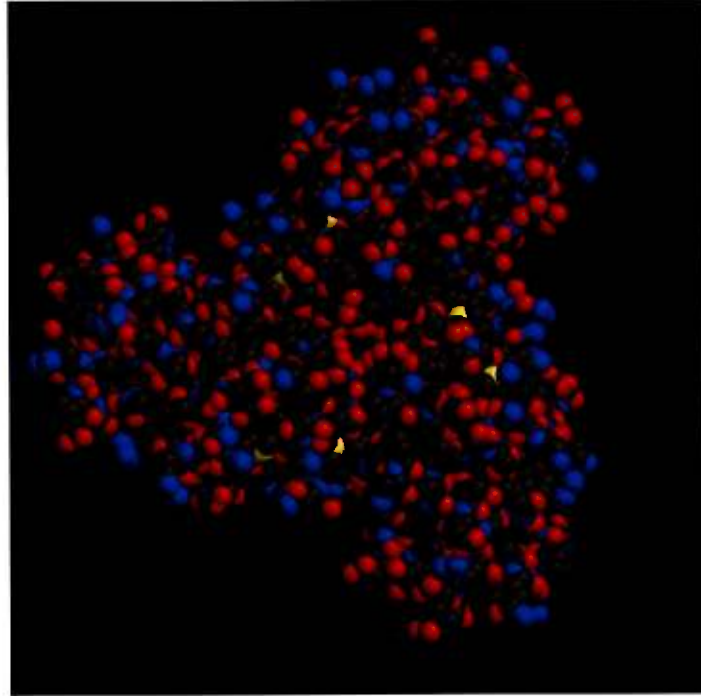
Figure 2. Comparaison des séquences des KDPG/KHG aldolases provenant de différents organismes. Les résidus en rouge sont identiques à ceux de la protéine de *E. coli* et les résidus en bleu sont conservés chez toutes les espèces. Les trois résidus connus du site actif (Glu-45, Arg-49 et Lys-133) sont en caractères gras.

1.4.3 Structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* a été déterminée à une résolution de 2.8 Å par Mavridis et al²⁵. Cette structure est la seule structure ayant été déterminée pour une KDPG aldolase jusqu'à maintenant. Les trois sous-unités présentent une forme elliptique et sont organisées de telle sorte que le tout ressemble à une hélice de bateau (figure 3a). Chaque sous-unité est repliée sous forme de baril beta parallèle, composé de huit unités α/β , de façon similaire à la structure de la triose-phosphate isomérase (figure 3b). Il y a une hélice α supplémentaire à l'extrémité amino terminale qui couvre une extrémité du baril.

La position du site actif a été établie à partir de la position de la lysine 144 qui avait été déterminée comme étant la lysine active par réduction de la base de Schiff. Cependant, aucun des tests effectués n'a permis de confirmer la position de cette lysine et des acides aminés voisins. En effet, l'analyse de cristaux incubés avec les substrats ne permettait pas l'observation de ces substrats dans le site actif à l'aide du calcul de différence de densité électronique (densité observée - densité modèle). Cependant, des zones de densité différentielle étaient observées ailleurs et inexplicées. Il en a été de même pour l'analyse de la base de Schiff réduite par le borohydrure de sodium. Aussi, il y a très peu ou même aucune densité électronique, selon les sous-unités, correspondant à la chaîne latérale de cette lysine.

a)



b)

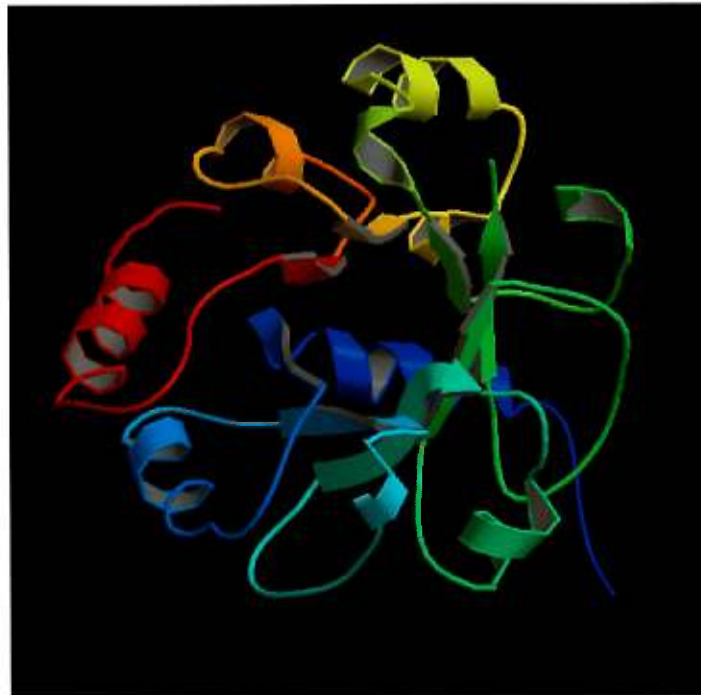


Figure 3. Structure tridimensionnelle de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida*.

Vue d'ensemble de l'arrangement trimérique (a) et représentation schématique de la structure d'un monomère (b) d'après la structure fournie par Dr Tulinsky.

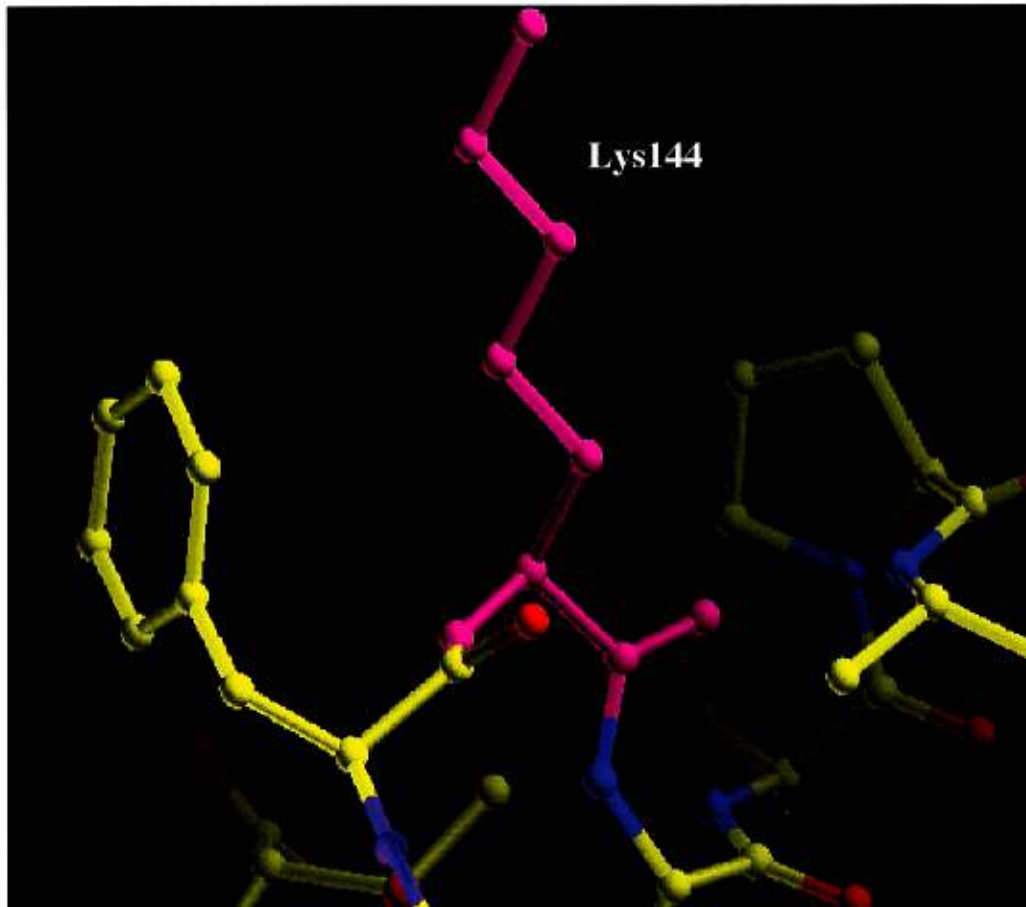


Figure 4. Site actif présumé de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* d'après la structure fournie par Dr Tulinsky.

De plus, le résidu glutamate 56, qui avait été identifié comme le glutamate adjacent à la lysine 144 par la réduction de la base de Schiff formée avec le bromopyruvate, se retrouve à 25 Å de celle-ci. L'incubation avec le bromopyruvate, agent liant la lysine avec le carboxylate du glutamate 56, a fait apparaître une zone de différence dans la densité électronique près de la lysine 144, mais aucune près du glutamate 56. Par ailleurs, la lysine est située à la surface de la molécule et pointe vers le solvant, là où aucun résidu ne pourrait intervenir dans le mécanisme réactionnel (figure 4).

De plus, seulement quatre des huit brins du feuillet β avaient une densité électronique forte et continue, parmi ceux de faible densité se trouve le brin leucine 138-arginine 142 qui précède la boucle dans laquelle se trouve la lysine 144. Tout ceci suggère que, malgré une structure globale correcte, des erreurs se soient glissées dans l'identification des chaînes latérales à l'aide de la densité électronique, amenant des difficultés d'interprétation de la structure et l'impossibilité d'étudier les relations structure-fonctions.

Des études structurales de la KDPG aldolase d'*Escherichia coli* ont été initiées par Buchanan et al²⁶. La protéine a été cristallisée et des données ont été récoltées jusqu'à une résolution de 2.26 Å. Le groupe spatial est $P2_12_12_1$. Le remplacement moléculaire avec les coordonnées de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* affinées à 2.2 Å a échoué. La protéine a ensuite été exprimée en incorporant des séléno-méthionines et des données ont été récoltées. Les cristaux de la protéine contenant la séléno-méthionine

n'étaient pas isomorphes avec ceux de la protéine native. La prochaine étape de leur recherche consiste donc à résoudre la structure par la méthode MAD (multiple wavelength anomalous dispersion), ce qui n'a pas encore été publié.

1.5 Mécanisme catalytique de la KDPG aldolase

1.5.1 Mécanisme global

Le mécanisme des aldolases utilisant comme intermédiaire une base de Schiff a été largement étudié. Il s'agit d'un mécanisme uni-bi concerté s'effectuant en cinq étapes²⁷. La première étape est une attaque nucléophile par l'amine d'une lysine sur le carbone 2 du substrat. La neutralisation de l'amine et la protonation de l'oxygène chargé négativement produisent la carbinolamine. Une déshydratation permet ensuite la formation de la base de Schiff. La déshydratation est suivie du clivage du lien C3-C4 du substrat libérant un des deux produits et produisant un intermédiaire carbanion. La base de Schiff est reformée par l'hydratation de ce carbanion et son hydratation permet de libérer le second produit et la lysine (voir la figure 5).

Ce mécanisme est bi-directionnel, l'enzyme procède donc à travers les mêmes réactions pour effectuer la réaction de condensation. La KDPG aldolase ne montre pas de spécificité pour la formation de la base de Schiff avec des composés carbonyles. Par contre, la réaction de clivage est très spécifique ; elle exige la présence d'une position 3-

désoxy, d'un groupement hydroxyle sur le carbone 4 dans une conformation érythro et d'un groupement phosphate sur le carbone 6²⁵.

1.5.1.1 Formation de la carbinolamine

Des études sur les mécanismes de formation d'une carbinolamine²⁸, la première étape du mécanisme des aldolases de classe I, ont permis de conclure que cette réaction procède via deux mécanismes séparés et concurrents. Soit, (I) une catalyse acide de l'attaque nucléophile par l'amine sur le carbonyle d'une façon plus ou moins concertée, cette catalyse acide consiste en la protonation de l'oxygène du carbonyle de façon plus ou moins simultanée avec l'attaque sur le carbone par la lysine nucléophile, et (II) un mécanisme par étapes impliquant un intermédiaire zwitterionique instable, qui est soit dégradé rapidement en ses produits d'origine ou stabilisé par un transfert de proton produisant la carbinolamine protonée, non-réactive (figure 6). Dans cette seconde voie, la protonation suit l'attaque nucléophile, ce qui implique la présence de l'intermédiaire zwitterionique. La concentration d'intermédiaire zwitterionique diminue lorsqu'on abaisse le pH, la voie plus ou moins concertée est donc plus utilisée et elle mène à la formation de la carbinolamine protonée. Le pKa de l'oxygène de la carbinolamine étant d'environ 9, celui-ci est protoné lorsque le pH est plus acide, produisant l'intermédiaire stabilisé T⁺. À ce moment, le clivage de la carbinolamine devient l'étape limitant la réaction.

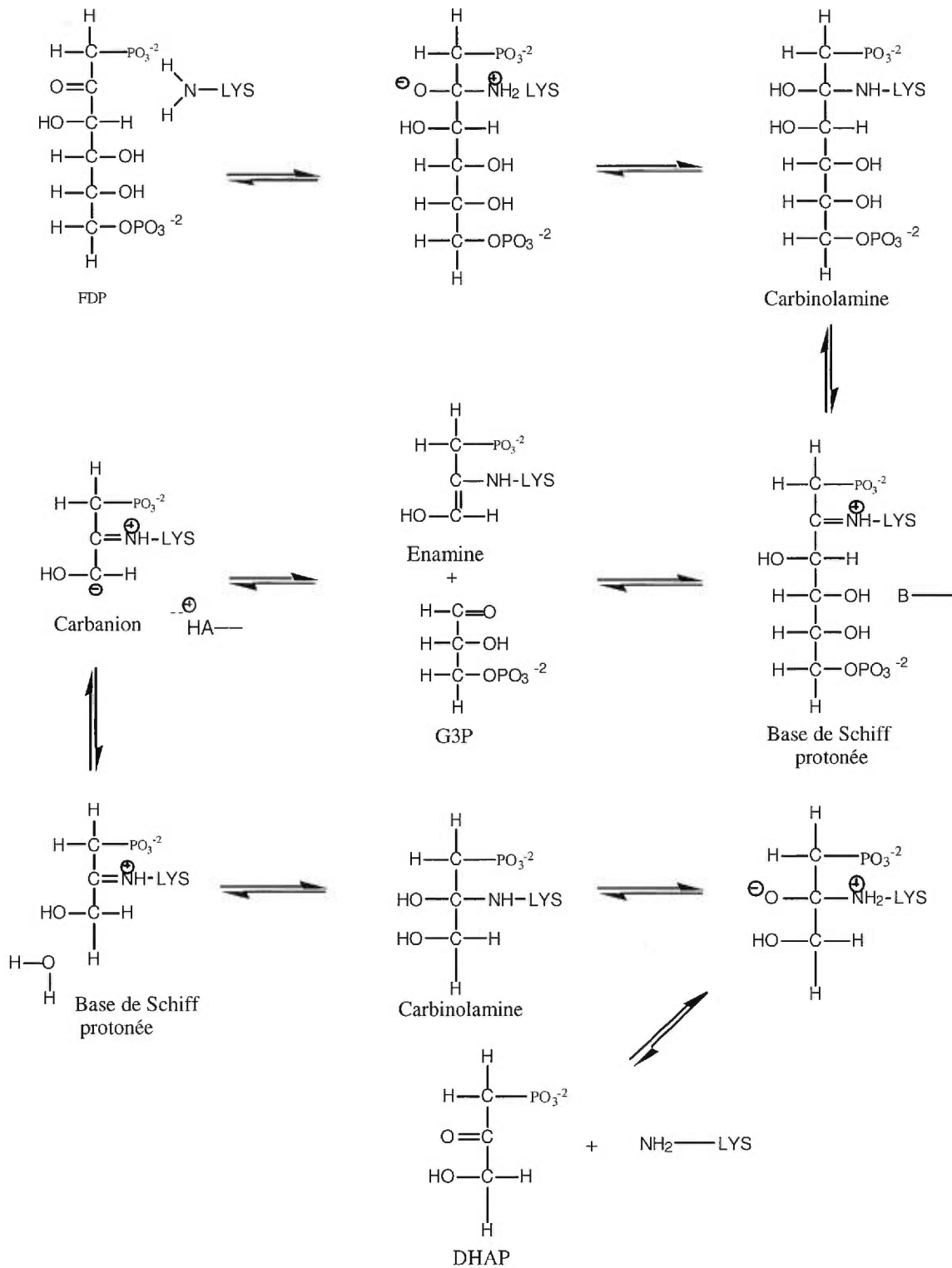


Figure 5. Mécanisme catalytique général d'une aldolase de classe I : exemple de la fructose-bisphosphate aldolase de muscle de lapin^{6,27}.

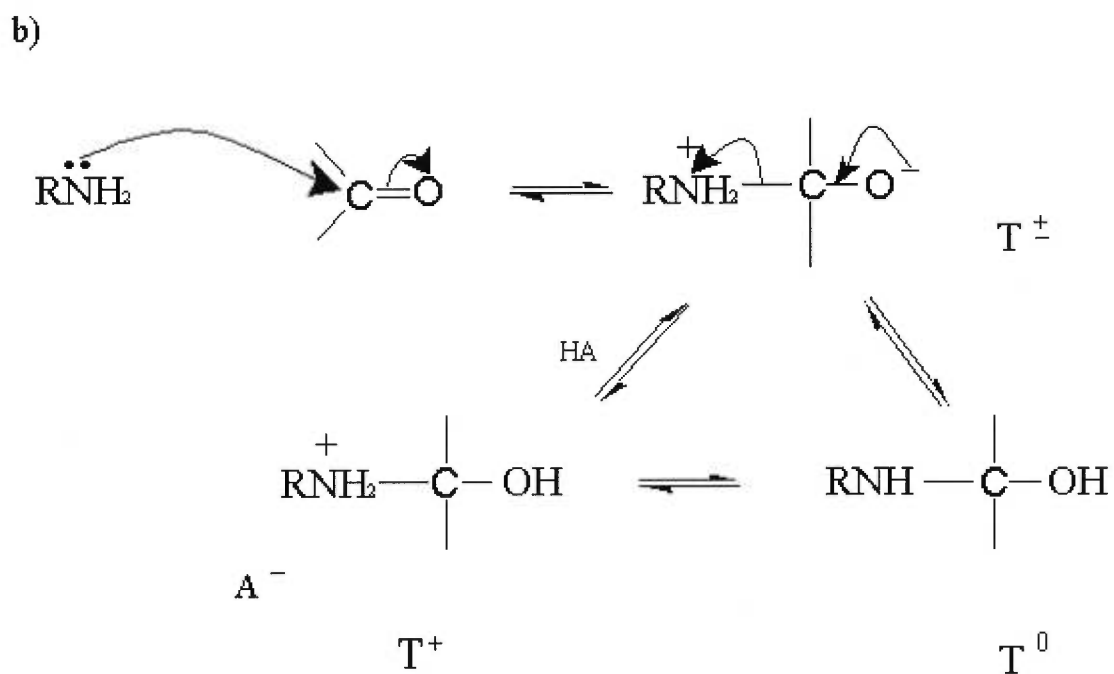
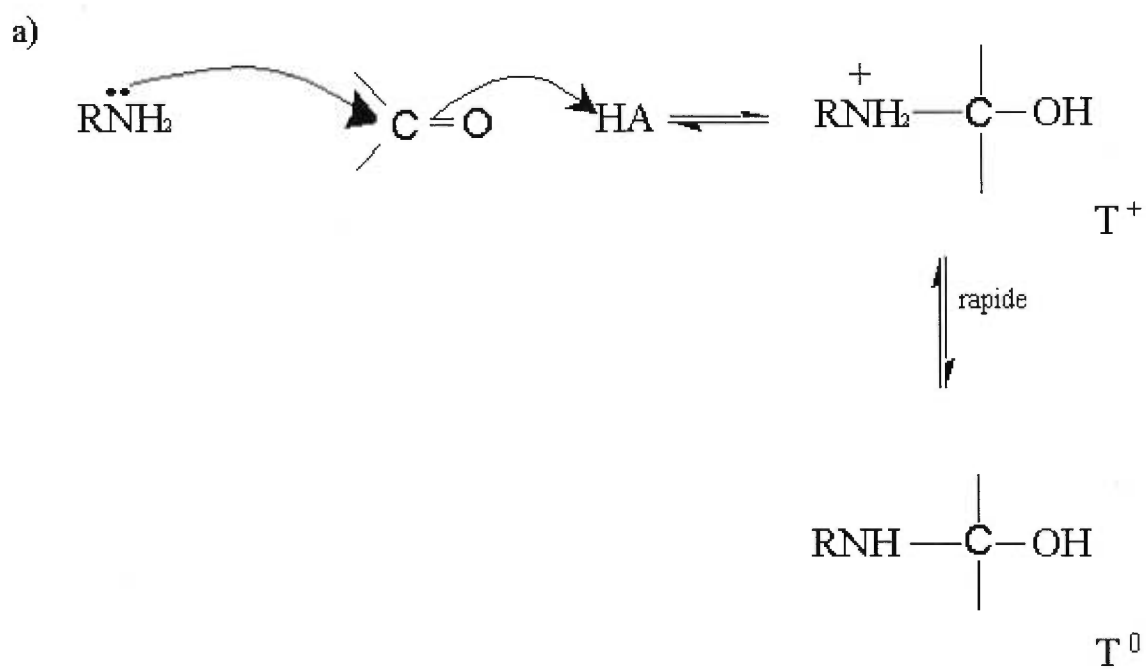


Figure 6. Mécanisme de formation d'une carbinolamine.
 a) Mécanisme concerté et b) mécanisme par étapes.

1.5.2 Réaction catalysée par un seul résidu basique

La catalyse du clivage du KDPG par la KDPG aldolase comporte deux étapes dans lesquelles l'intervention d'une base est requise, soit la déprotonation du pyruvate et l'activation de l'hydroxyle du carbone 4. La réduction de la base de Schiff formée avec le bromopyruvate a permis de démontrer que cette base était en réalité un carboxylate²¹. Ce carboxylate est la seule base présente dans le site actif. Les deux étapes doivent donc être expliquées par un mécanisme faisant intervenir une seule base.

Un premier mécanisme appuyé sur une modélisation en trois dimensions est proposé par Meloche et Glusker en 1973⁷. Dans ce modèle, le glutamate peut assumer deux conformations différentes en passant par la rotation autour d'un de ses liens C-C lui permettant ainsi d'intervenir dans les deux étapes en maintenant la configuration au carbone 3.

1.5.3 Stéréochimie de la réaction

L'étude de la stéréochimie de la réduction par le borohydrure de sodium de la base de Schiff formée avec le pyruvate a montré que cette réaction est stéréosélective. Elle produit 44.27% de l'intermédiaire (1S) et 55.73% de l'intermédiaire (1R)-carboxyéthyl-lysine, soit un ratio de 1.26 : 1²⁹. L'hypothèse émise pour expliquer la stéréosélectivité de la réaction est la suivante : un site liant le carboxylate du pyruvate doit exister à l'intérieur même du site actif. Si tel est le cas, la torsion autour du lien C-N

de la lysine deviendrait impossible permettant ainsi au solvant l'accès à une seule face, ce qui expliquerait la réduction stéréosélective préférant la face *si* du carbone kétimine²⁹.

Il avait par ailleurs été démontré cinq ans plus tôt que le site actif de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* est asymétrique. C'est-à-dire que d'un côté du plan formé par la base de Schiff, on retrouve la protéine et de l'autre coté le solvant³⁰.

Une étude de stéréosélectivité dans laquelle les quantités de chaque isomère dans le milieu réactionnel étaient dosées a démontré que : i) dans un premier temps l'isomère (4S)-kétohydroxyglutarate était prédominant dans un ratio 10 :1, ii) au cours de la réaction, le ratio diminue au fur et à mesure que la production des produits augmente, et iii) à l'équilibre, le ratio des deux isomères approche 1 :1. La KDPG-KHG aldolase présente une stéréosélectivité pour l'isomère (4S) pour la réaction de clivage et la réaction de condensation³⁰.

Par contre, la stéréospécificité observée n'est valable que pour les enzymes bactériennes. En effet, il a été démontré que les KHG aldolases de foie et de rein de bœuf produisent et clivent indifféremment les deux isomères du KHG³¹.

1.6 Principes de cristallographie³²

La cristallographie permet la détermination de la structure d'une protéine par la diffraction des rayons X. Afin de résoudre une structure, quelques étapes sont incontournables. Tout d'abord, la protéine purifiée doit être cristallisée. Les cristaux sont ensuite exposés aux rayons X et plusieurs patrons de diffraction sont récoltés. Une rotation du cristal est effectuée entre chaque récolte d'un patron de diffraction. La résolution de la diffraction doit être suffisamment élevée. Plus les taches sont éloignées du centre, meilleure est la résolution. Une résolution d'au moins 3,5 Å est nécessaire pour résoudre une structure de protéine.

Après la collecte des données de diffraction, le groupe d'espace et les paramètres de maille doivent être déterminés. Les cristaux de protéines sont le résultat d'un arrangement ordonné des molécules. Cet arrangement correspond à une répétition périodique d'un patron dans l'espace tridimensionnel. La régularité dans cette répétition est très importante, c'est elle qui détermine la résolution de la diffraction.

L'unité répétée périodiquement est un parallélépipède défini par les paramètres de maille, soit les longueurs a , b et c et les angles α , β et γ , qui ensemble décrivent ses dimensions et sa forme. Il existe un nombre fini de manière d'organiser des objets symétriquement dans un cristal, chacun se nomme un groupe d'espace. Il existe 230 groupes d'espace, mais ce nombre est réduit à 65 pour les molécules biologiques en raison de leur chiralité. La détermination des paramètres de maille et du groupe d'espace

est maintenant informatisée, ce qui rend ces paramètres faciles à obtenir à partir de quelques patrons de diffraction.

Les deux étapes limitantes de la résolution d'une structure sont l'obtention de cristaux et la détermination des phases. Chaque maximum de diffraction possède une amplitude et une phase. La phase n'est pas directement mesurable et doit donc être estimée par des moyens indirects. Si la structure d'une protéine hautement similaire a déjà été résolue, on peut utiliser la phase de cette protéine pour résoudre notre structure, c'est la technique de remplacement moléculaire. Sinon, on doit utiliser la technique de remplacement multiple isomorphe (MIR) ou de diffraction à longueurs d'onde multiples de dérivés (multiple-wavelength anomalous dispersion ou MAD). La méthode la plus efficace est l'obtention de la phase par la technique MAD avec des dérivés contenant la séléno-méthionine. À partir des patrons de diffraction récoltés à trois longueurs d'onde différentes, il est possible de trouver la position des atomes de sélénium et ainsi d'estimer la phase. Une fois que la phase est estimée, on peut calculer les cartes de densité électronique. La structure chimique de la macromolécule est ensuite introduite dans la densité électronique et la meilleure structure est trouvée par affinement à l'aide de calculs informatisés de minimisation d'énergie et de dynamique moléculaire.

1.7 Hypothèses et moyens expérimentaux proposés

La KDPG aldolase présente plusieurs particularités intéressantes. Elle est trimérique, sa réaction catalytique est stéréosélective et sa structure est peu connue. La résolution de sa structure présenterait de nombreux avantages et une avancée réelle dans la compréhension de son mécanisme.

L'étude présente vise donc à résoudre la structure tridimensionnelle de la KDPG aldolase d'*Escherichia coli*. Afin de pouvoir mieux comprendre le mécanisme de cet enzyme, la résolution de la structure de la protéine incubée avec son substrat est aussi envisagée.

Pour atteindre ces objectifs, le gène *eda* devra être cloné dans un vecteur de surexpression. Un protocole de purification devra être mis au point afin d'obtenir une grande quantité de protéine avec un degré de pureté assez élevé (>95%) pour procéder à des études de cristallisation. Il faudra ensuite trouver des conditions de cristallisation produisant des cristaux de qualité et de taille suffisante pour l'obtention de données à haute résolution lors de la diffraction des rayons X. Afin de résoudre le problème de phase, il sera nécessaire de produire soit des dérivés d'atomes lourds ou des protéines contenant des séléno-méthionines. Il sera ensuite possible de récolter des données de diffraction et de procéder aux calculs permettant l'observation de la densité électronique. À partir des cartes de densité électronique, la structure tridimensionnelle pourra être construite.

Sachant qu'il est possible de stabiliser l'intermédiaire carbinolamine à pH acide, des conditions de cristallisation en milieu acide seraient idéales permettant ainsi l'incubation des cristaux avec le pyruvate ou le KDPG en milieu acide. Ceci pourrait donc permettre la stabilisation de l'intermédiaire dans la protéine cristallisée et par conséquent la possibilité de résoudre la structure de la protéine liée de façon covalente à son substrat. L'observation du substrat dans le site actif permettrait d'obtenir une meilleure connaissance du site actif et de faire une avancée considérable dans la compréhension du mécanisme réactionnel des KDPG aldolases.

Chapitre 2 : Article

**Covalent intermediate trapped in KDPG aldolase structure
at 1.95Å resolution**

Julie Allard, Pawel Grochulski, Jurgen Sygusch [§]

**Département de biochimie
Université de Montréal
Montréal, Québec
Canada**

[§] Correspondence should be addressed to:

Dr. J. Sygusch
Biochimie/Médecine
Université de Montréal
CP 6128, Station Centre ville
Montréal, Québec
H3C 3J7 Canada

Tel: 1-514-343-2389
Fax: 1-514-343-6463
E-mail: Jurgen.Sygusch@Umontreal.ca

Abstract

A covalent adduct was trapped by flash freezing 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase crystals soaked with pyruvate in acidic conditions. Structure determination showed that pyruvate had undergone nucleophilic attack by Lys-133 forming a protonated carbinolamine intermediate stabilized through hydrogen bonding with active site residues. Carbinolamine interaction with Glu-45 indicates general base catalysis of various rate steps. Stereospecific addition is ensured by aromatic interaction of Phe-135 with pyruvate methyl group. Protonation of Lys-133 in native structure suggests Lys-133 acts as a general acid catalyst in carbinolamine formation, which upon proton transfer to the incoming pyruvate carbonyl oxygen, creates a reactive electrophile for subsequent nucleophilic attack by Lys-133.

Introduction

Aldolases have been subject of continuous interest because such enzymes provide a mechanism for carbon-carbon bond formation in living organisms. 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase (E.C. 4.1.2.14), is best known for its role in the Entner-Doudoroff pathway of bacteria where it catalyses the reversible cleavage of KDPG to pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate¹. Inactivation of the KDPG aldolase gene in *E. coli* bacteria inhibits their growth in presence of gluconate². Gene sequencing showed KDPG aldolase to be identical to 2-keto-4-hydroxyglutarate (KHG) aldolase³, which has enzymatic specificity towards glyoxylate, forming KHG in presence of pyruvate⁴ and capable of regulating glyoxylate levels in the glyoxylate bypass, an alternate pathway when bacteria are grown on acetate carbon sources⁵. In mammals, KHG aldolase catalyzes a central reaction in hydroxyproline catabolism⁶. The enzyme also efficiently catalyzes β -decarboxylation of oxaloacetate regardless of source⁷. The reaction mechanism of KDPG aldolase involves Schiff base formation between a substrate carbonyl and lysine residue in the active site⁸ making it a class I aldolase. In bacteria, the enzyme operates under kinetic control⁹ to provide stereochemically pure products¹⁰. The considerable substrate tolerance displayed by KDPG aldolase is useful in catalysis of stereospecific aldol addition of pyruvate to a range of unnatural electrophilic substrates at rates practical for large-scale preparative organic synthesis¹¹.

The structure of KDPG aldolase trimer from *Pseudomonas putida* was determined to 2.8Å resolution¹² and the trace of polypeptide folding of each subunit correspond to that of a β barrel¹³. The *P. putida* enzyme is closely related to the *E. coli* KDPG aldolase and shares 45% sequence identity. Structure determination of *P. putida* KDPG aldolase however presented interpretative difficulties such that location of the essential active site residues could be not assigned unambiguously.

To investigate the reaction mechanism in pyruvate aldolases and the role of active site residues, a crystallographic study of the *E. coli* KDPG aldolase in complex with pyruvate was undertaken. Naturally occurring Schiff base intermediates however have not been observed in crystal structure determinations of class I aldolases at physiological pH even in presence of excess substrate. Schiff base intermediates appear to be only transiently stable and can be trapped by acid quenching^{14, 15} or by sodium borohydride reduction. Neither approach is very satisfactory in terms of resultant structural information. Trapping by quenching with acid destroys the active site geometry while sodium borohydride reduction results in formation of a covalent analogue that sterically does not resemble the Schiff base. Our approach exploited flash freezing techniques used in cryocrystallographic data collection to trap Schiff base intermediates. *E. coli* KDPG aldolase, contrary to *P. putida* KDPG aldolase, lends itself well to this technique as it is active over a wide pH range¹⁰ allowing screening of a large number of crystallization conditions. From model studies, Schiff base formation at acidic pH is kinetically a very slow process¹⁶ making it feasible to trap intermediates on a time scale compatible with crystallographic flash freezing techniques.

We have succeeded in trapping a carbinolamine intermediate at acidic pH and show here the structure of the active site of the KDPG aldolase containing this intermediate. To our knowledge, this is the first structure containing a covalent carbinolamine intermediate and that is directly implicated in a reaction pathway. The interpretation of this structure leads to a novel chemical mechanism for catalyzing Schiff base formation.

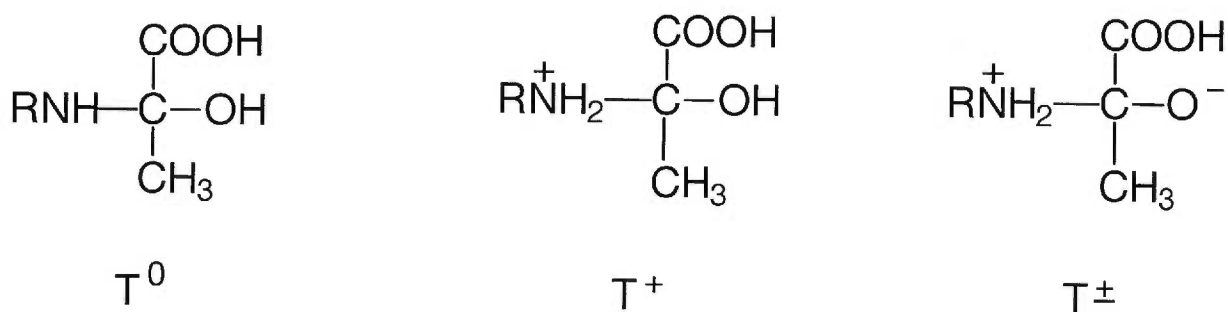
Results and discussion

KDPG aldolase protomer displays an $(\alpha/\beta)_8$ fold (subunit molecular weight of 22 kDa). The subunit assembly mimics KDPG aldolase from *P. putida*¹² (rmsd C α coordinates 1.5Å) and resembles a ship's propeller with protomer structures approximating elongated ellipsoids. The N-terminal α -helix in each protomer caps the N-terminal end of the barrel. As in other $(\alpha/\beta)_8$ barrel structures, the active site was located in the depression of the C-terminal end of the barrel. The active site is freely accessible to solvent consistent with sulfate ions present in each protomer in pyruvate free KDPG aldolase crystals, one of which is bound in the active site cavity while a second binds at the active site periphery, $\sim 8\text{\AA}$ away. The active site sulfate interacts through hydrogen bonding with conserved active site residues, Glu-45, Arg-49, Thr-73 and Lys-133, shown in figure 1. Spatial proximity of Glu-45, Arg-49 and Lys-133, which forms the Schiff base with substrate, corroborates previous identification of essential active site residues^{17, 18, 19, 20}. A water molecule, Wat93, stabilizes the arrangement of active site residues, Glu-45 and Lys-133, through hydrogen bonding with both residues. Hydrogen bonding by the sulfate oxyanion, O₁, with Glu-45 carboxylate oxygen requires Glu-45 to be protonated in the crystal structure. Other than a change in Val-118 rotamer conformation which may be a consequence of Pro-94 pyrrolidine ring isomerisation upon pyruvate binding, superposition of native and native:pyruvate structures showed no evidence for subunit conformational changes (rmsd C α < 0.2Å).

Continuous electron density extending beyond Lys-133 Nz in the native:pyruvate structure of each protomer, shown in figure 2, indicates formation of a stable covalent adduct. The electron density is inconsistent with Schiff base or enamine adducts, as these intermediates imply a trigonal bonding geometry about the pyruvate C₂, which was not observed. Refinement of native:pyruvate structure showed tetrahedral bonding geometry about the pyruvate C₂ carbon, seen in figure 2, consistent with a carbinolamine intermediate covalently bound in each aldolase subunit.

The tetrahedral adduct observed can represent either one of three carbinolamine species or a combination of these. Shown in schema I are: a neutral carbinolamine species (T⁰), a protonated species (T⁺) wherein the Lys-133 Nz (R) is positively charged, or a zwitterionic form (T[±]) where Lys-133 Nz and carbinolamine hydroxyl group O₃ are charged, positive and negative, respectively.

(I)



Carbinolamine formation at neutral or acidic pH values on model compounds indicate a pKa of 8-9 in T⁺ and 13-14 in T[±]²¹ hence the dipolar ion cannot be present at acidic pH. Perturbation of the O₃ oxygen pKa by the active site microenvironment is unlikely given hydrogen bonding of water molecules with O₃. Model studies in aqueous solutions suggest a pKa for the protonated amine in T⁺ of ~ 8¹⁶ and solvent effects on the protonated amine are small amounting to a reduction by ~ 1 pKa unit in 50% aqueous dioxane²². T⁺ representing the protonated carbinolamine species should thus be the tetrahedral adduct observed in the active site of KDPG aldolase crystals. Although cationic Schiff base intermediates are stabilized in acidic media, Schiff base species were not observed coherent with the mechanism of Schiff base formation based upon carbinolamine precursors whose stability are pH dependent²³. In acidic media, formation of the neutral carbinolamine T⁰ species, requisite Schiff base precursor, from the T⁺ species is kinetically disfavored.

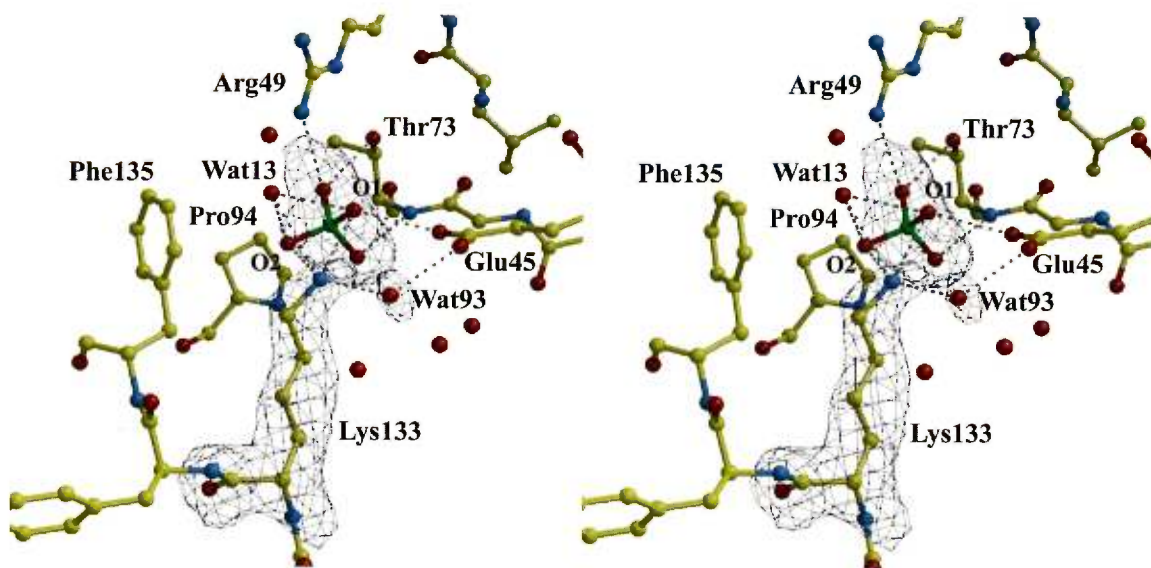


Figure 1. Stereoview of the active site in a native KDPG aldolase protomer showing electron density from a 2 Å annealed omit map contoured at 3σ and encompassing Lys-133 and sulfate ion. Sulfate binding and associated water molecule positions are identical in all subunits. Contacts between non-bonded atoms within hydrogen bonding distance are shown by dotted lines. The sulfate oxyanions make extensive contacts with active site residues Glu-45, Arg-49, Thr-73 and Lys-133 as well as a water molecule, Wat13. Lys-133 Nz amine participates in hydrogen bonds with sulfate oxyanions, O₁ and O₂, as well as water molecules Wat13 and Wat93; O₁, O₂ and Wat13 accept hydrogen bonds consistent with Lys-133 protonated. The protonated amine has only three protons, which can act as donors, sharing of hydrogen bond functionality among four hydrogen-bonding partners necessitates Lys-133 participating in three center or bifurcated hydrogen bonds. Hydrogen bonding of Glu-45 with sulfate oxyanion O₁ requires Glu-45 to be protonated. The view is looking into the active site from the carboxyl end of the β strands comprising the β -barrel. Drawing was made with the program BOBSCRIPT³⁹ and presented using RASTER3D⁴⁰.

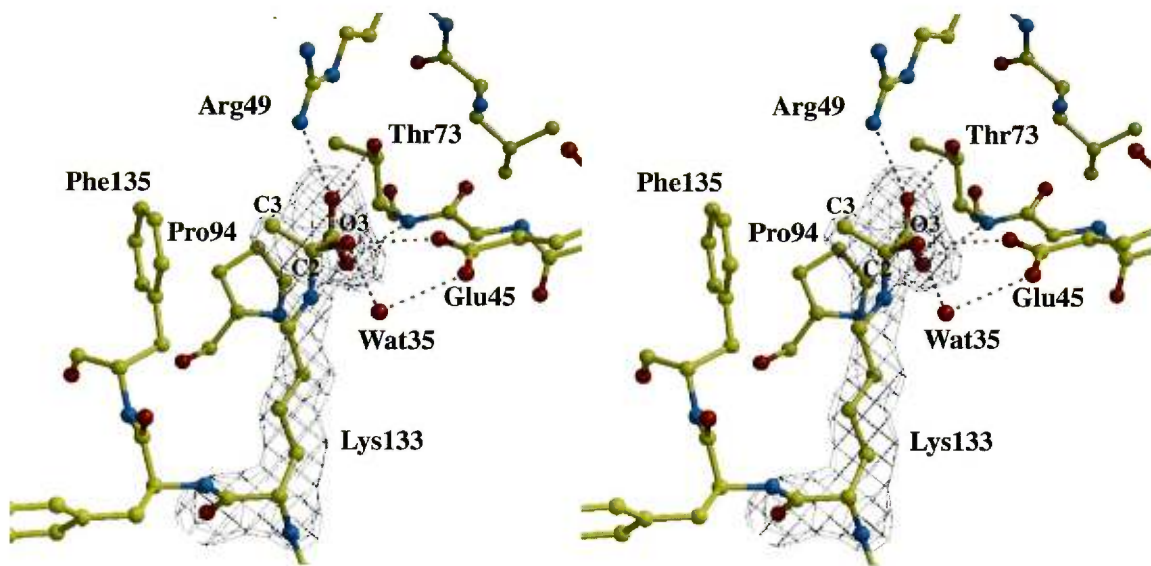


Figure 2. Stereoview of the active site of a KDPG aldolase protomer corresponding to native crystals soaked with 10mM pyruvate and showing electron density from a 1.95 Å annealed omit map contoured at 5.0σ . The electron density extending from Lys-133 Nz was interpreted as a pyruvate molecule covalently bound to Lys-133. The conformation of the carbinolamine intermediate is identical in all subunits. Hydrogen bond contacts are shown as dotted lines. Active site residues Arg-49 and Thr-73 align the incoming pyruvate through hydrogen bonds to the pyruvate carboxylate while Phe-135 ensures stereospecific addition through hydrophobic interaction with pyruvate C₃ methyl group. Hydrogen bonding of Glu-45 with pyruvate O₃ stabilizes the carbinolamine intermediate and assists in substrate alignment. Wat35 is favorably oriented, making hydrogen bonds with both Glu-45 and O₃, to catalyze proton transfers at the level of the carbinolamine intermediate. View as in figure 1.

Active site residues

Carbinolamine adduct formation implies negligible conformational changes in the molecular architecture of KDPG aldolase active site. The carbinolamine intermediate is stabilized by numerous hydrogen bonds, shown in figure 2, and implicating the same residues used to bind the sulfate ion in the active site. Glu-45 carboxylate interacts with the carbinolamine hydroxyl group O₃, directly as well as indirectly through a water molecule, Wat35, while the pyruvate carboxylate moiety interacts with Thr-73 backbone amide as well as Arg-49 and Thr-73 side chains. Substrate hydrogen bonding to the backbone amide, arginine and threonine side chains orients the incoming pyruvate in the active site to allow nucleophilic attack by Lys-133. The van der Waals contact between the pyruvate C₃ methyl group and aromatic ring of Phe-135 contributes not only to stability of the intermediate through hydrophobic interactions but also to stereospecific alignment of the incoming pyruvate for nucleophilic attack.

The only residue capable of acting as a general base and that is proximal to the carbinolamine complex is Glu-45 suggesting a multi-functional role by this residue in the KDPG aldolase reaction mechanism. The Glu-45 carboxylate stabilizes a hydrogen bonding arrangement with Wat35 and O₃ in the T⁺ complex that results in hydrogen bonding between Wat35 and O₃, shown in figure 2. This arrangement would permit Glu-45 to facilitate proton exchange with O₃ either directly and/or indirectly and thereby catalyze dehydration of the T⁰ complex to the cationic Schiff base. Microscopic reversibility would dictate a similar role for Glu-45 in Schiff base hydrolysis.

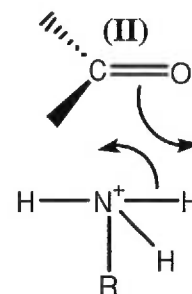
As general base and because of its proximity to Lys-133, Glu-45 would also catalyze proton abstraction of a methyl proton during enamine formation, however to do so, prior rotation must occur to orient the methyl group in the Schiff base complex vicinal to Glu-45. Such a rotation is very likely since cationic Schiff base formation necessitates a planar geometry about the pyruvate C₂ and orientation of the methyl group in direction of Phe-135 in the Schiff base would result in an unfavorable eclipsed configuration by the C₂-C₃ bond with respect to the pyruvate carboxylate orientation seen in the T⁺ complex. Enzyme inactivation, a consequence of 3-bromopyruvate esterifying the Glu-45 carboxylate¹⁷, is also consistent with substrate rotation placing the 3-bromomethyl in spatial proximity of Glu-45. Substrate rotation differs from a previously proposed model to explain KDPG aldolase catalysis where single base-mediated proton activation involved side chain rotation of an active site glutamate residue²⁶. Wat35 location in the T⁺ complex placing it within hydrogen bonding distance of Glu-45 suggests a potential binding site for the O₄ hydroxyl in KDPG/KHG substrates that would allow proton abstraction of the O₄ hydroxyl for C₃-C₄ bond cleavage. A multi-functional role for a carboxylate ion acting as a general base is supported by model studies on Schiff base formation and hydrolysis²². Protonation of Glu-45

at acidic pH would inhibit its function, as a general base, in catalyzing T^0 carbinolamine dehydration thereby trapping the T^+ carbinolamine intermediate.

Dibasic sulfate ion binding in each subunit active site of native KDPG aldolase at acidic pH is coherent with both Arg-49 and Lys-133 being positively charged. Structural evidence for Lys-133 being protonated is deduced from contacts made with sulfate oxyanions, O_1 and O_2 , and water molecules, Wat13 and Wat93, that are all within hydrogen bonding distance of Lys-133, as seen in figure 1. The two sulfate oxyanions are hydrogen bond acceptors while Wat13 by hydrogen bonding to both oxyanions must accept a hydrogen bond from Lys-133 indicating a fully protonated lysine residue. As the protonated amine has only three protons, which can act as donors, sharing of hydrogen bond functionality by participating in three center or bifurcated hydrogen bonds among hydrogen-bonding partners allows hydrogen bonding interaction with the additional partner, Wat93. In majority of small biological structures, three center or bifurcated bonds are indeed the preferred mode of hydrogen bonding by protonated amines ²⁷.

Formation of the T^+ carbinolamine complex in KDPG aldolase structure requires that Lys-133 be uncharged to be competent as a nucleophile although structural evidence implies an unreactive protonated form. Enzymes have evolved strategies to modify the reactivity of a lysine residue in the active site microenvironment and include presence of an adjacent positively charged residue ²⁸, a highly hydrophobic environment about the lysine residue ²⁹ and activation through proton transfer to water or a base such as a glutamate residue ³⁰. In case of KDPG aldolase, such considerations do not seem to be applicable. Arg-79 is distant from Lys-133 and is neutralized through interaction with the incoming pyruvate, active site accessibility to water and sulfate molecules suggests that the active site microenvironment is solvent accessible rather than hydrophobic while activation by proton transfer via Glu-45 although possible is highly unlikely at low pH. These arguments would reinforce our interpretation that Lys-133 exists in protonated form in the native structure.

Then if Lys-133 is protonated, how does it promote carbinolamine formation? Studies on carbinolamine formation indicate existence of two separate pathways ²³. The usual step-wise process involves amine attack on the substrate carbonyl group resulting in formation of the T^+ intermediate that is then kinetically trapped by significant proton transfer processes. A less well-known pathway involves a “more-or-less” concerted mechanism that makes use of general acid catalysis of amine attack on the substrate carbonyl group to directly yield the T^+ intermediate. This latter pathway can explain T^+ formation in KDPG aldolase provided Lys-133 has a dual catalytic role: that of a general acid catalyst in the protonated state which upon proton transfer becomes a transient nucleophile attacking the protonated substrate, represented in Schema II. In this schema, the electronegative carbonyl oxygen of the incoming substrate plays the critical role of a proton acceptor to create a much more



reactive electrophile.

A structural model based upon this hypothesis is proposed in figure 3 to explain carbinolamine formation in KDPG aldolase. Pyruvate binds as a Michaelis complex in the KDPG aldolase active site and shown in figure 3; Arg-49, Thr-73, and backbone amide of Thr-73 make similar interactions with the pyruvate carboxylate moiety as seen in the sulfate oxyanion and T^+ complexes. Hydrophobic interaction of the C_3 methyl with the Phe-135 aromatic ring aligns the incoming carbonyl oxygen O_3 to interact with protonated Lys-133 by hydrogen bonding. The side chain conformation of Lys-133 is as observed in the native structure. Proton transfer to the incoming carbonyl by Lys-133 not only renders the latter nucleophilic but also converts the protonated carbonyl group into a more reactive electrophile. Protonation of the carbonyl allows hydrogen bond formation with Glu-45 that shifts the pyruvate carbonyl carbon C_2 laterally by $\sim 0.5 \text{ \AA}$ and positioning the electrophilic C_2 carbon for nucleophilic attack by Lys-133, shown in figure 3. Equivalent and opposite displacement by Lys-133 side chain conformation, as observed in the T^+ complex and sterically not hindered, optimizes nucleophilic attack.

The mechanism proposed for carbinolamine formation is novel and may represent an evolutionary paradigm for Schiff base mediated catalysis in all class I aldolases. The proposed mechanism affords a different interpretation into the role of active site microenvironments and lysine reactivity. Hydrophobic interaction between the pyruvate methyl group and Phe-135, used to align the incoming carbonyl for proton transfer in KDPG aldolase, may be a paradigm for antibody aldolases where hydrophobic interactions between substrate and active site dominate enzymatic specificity and catalysis ²⁹. Furthermore the presence of a neighboring positive charge may also enhance substrate alignment, as in case of Arg-49, thus allowing efficient proton transfer to the carbonyl oxygen by the attacking lysine residue ²⁸. Acid catalysis by a protonated lysine residue would imply pH sensitive rate steps elsewhere in the reaction mechanism.

Methods

Purification and crystallization

The coding region for the KDPG aldolase gene from *E. coli* ³¹ was amplified by PCR and cloned into the overexpression plasmid pKK-223 ³². Transformed *E. coli* cells were selected, grown in DYT medium and harvested in stationary phase. Lysate was cleared by centrifugation, delipidated, and further purified by anion exchange Q-Sepharose chromatography. The active fraction was concentrated to 10 mg/ml for crystallization. Crystals were obtained using the hanging drop method, after equilibration of the protein against 10 mM Tris-HCl pH 8, in 18.5% PEG 3500, 0.2 M ammonium sulfate and 0.1 M sodium acetate at pH 4.6.

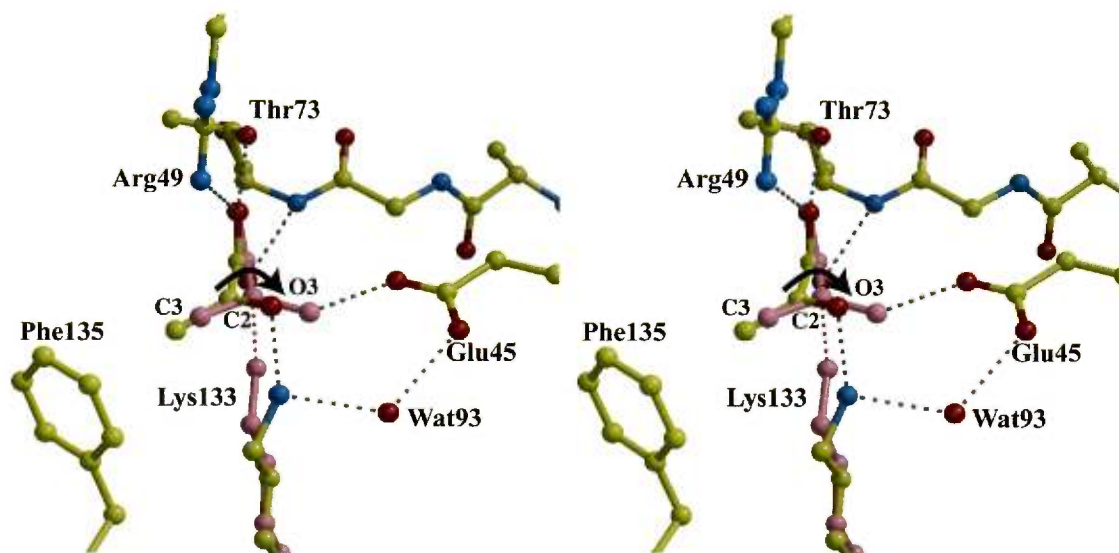


Figure 3. Stereoview of the reaction model proposed describing carbinolamine formation between Lys-133 and pyruvate. Hydrogen bond distances are shown as dotted lines. In the Michaelis complex, pyruvate carboxylate attachment mimics binding seen for the sulfate ion and in the carbinolamine intermediate and is shown in yellow. The carboxylate moiety hydrogen bonds to Arg-49 and Thr-73 as well as to Thr-73 backbone amide thereby aligning the incoming substrate. Hydrophobic interaction by C₃ methyl group with Phe-135 ensures stereospecificity and orients pyruvate O₃ for proton transfer by Lys-133. Wat93 hydrogen bonding to both Glu-45 and Lys-133 sets up Lys-133 Nz for efficient proton transfer to the incoming O₃. Protonation of the pyruvate carbonyl O₃ produces a reactive electrophile and renders Lys-133 competent for nucleophilic attack. Hydrogen bond formation by protonated O₃ with Glu-45 displaces the electrophilic C₂ carbon position through a hinge-like motion by $\sim 0.5\text{\AA}$, shown by arrow, that leaves the carboxylate oxygen positions invariant. The resultant pyruvate orientation is shown in pink. Slight reciprocal displacement of Lys-133 side chain to position observed in the carbinolamine complex, also shown in pink, optimizes the trajectory for subsequent *re* face nucleophilic attack, indicated by the pink dotted line.

Seleno-L-methionine (SeMet) isoform of KDPG aldolase was produced in *E. coli* strain BL21³³ in presence of high concentrations of isoleucine, lysine and threonine to inhibit methionine biosynthesis³⁴. SeMet KDPG aldolase was purified and crystallized under identical conditions as the native enzyme except for the presence of 1 mM DTT in purification buffers.

Data collection

Prior to data collection, crystals were cryoprotected by transfer to mother liquor made up with 20 % glycerol as well as 10mM pyruvate in case of pyruvate soaked crystals. Crystals were soaked for 15 minutes and then flash frozen at -170°C. A Quantum4 CCD detector was used to collect data from a single crystal at NSLS beam line X8-C. KDPG aldolase crystals have space group P2₁2₁2₁ with unit cell dimensions a=54.95 Å, b=85.21 Å, c=133.69 Å and a trimer in the asymmetric unit cell. Unit cell dimensions (a=54.67Å, b=96.42Å, c=120.12Å) but not space group differed for the SeMet derivative with respect to native crystals and these were similar in presence or absence of pyruvate. The asymmetric unit cell contents were nevertheless consistent with a trimeric quaternary structure for the SeMet derivative. Anomalous pairs for the SeMet:pyruvate derivative were collected in a single pass using inverse-normal beam geometry at three different wavelengths. All data sets were processed independently using the programs DENZO and SCALEPACK 35. Data statistics are shown in table 1.

Structure solution and refinement

The MAD data (table 1) were scaled by the program SOLVE³⁶ and eleven of twelve selenium sites including the N-terminus substituted methionines were obtained for the SeMet:pyruvate derivative using 15.0 - 3.0 Å resolution data. Three-fold non-crystallographic symmetry (NCS) was deduced from SeMet positions. Initial phases were improved by the DM program³⁷ and included NCS averaging. Model building was initiated by manual fitting of a 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase model (kindly provided by Professor Tulinsky, Michigan State) into the MAD density using O³⁸. The KDPG aldolase trimer was then subjected to iterative rounds of model building and refinement using CNS³⁹ for all data extending to 2.0Å.

The structure of the native crystal was determined by molecular replacement using the SeMet:pyruvate trimer as a model. The program CNS was used to find the rotation and translation solution. Combination of model rebuilding and molecular dynamics using CNS refined the native structure to 2.0Å resolution. Isomorphism of native:pyruvate soaked crystals with native crystals allowed coordinates of the native trimer to be used directly in refinement and to determine the native:pyruvate structure. Protomer polypeptide folding of SeMet:pyruvate, native and native:pyruvate crystals were identical however protomer assembly into trimers differed slightly between SeMet and native quaternary structures (rms Ca < 0.8 Å). The observed unit cell differences between SeMet and native structures may be

ascribed to N-terminus conformational differences due to seleno-methionine substitution that perturbed trimer packing. Conformational stability of the penultimate N-terminal residues involves hydrophobic interaction between Met-1 and Trp-4. Substitution of SeMet modifies this interaction geometry and destabilized the packing interaction existing in the native structure between Met-1 of subunit B in one trimer and Leu-213, the C-terminal residue, of the same subunit in an adjacent trimer.

Electron density was contiguous for all residues in both native and native:pyruvate structures. Table 1 shows the overall crystallographic R-factor and the free R-factor for all models and all observed reflections within the indicated resolution range. A Ramachandran plot analysis by the program PROCHECK⁴⁰ indicates for native and native:pyruvate structures 92.3% of all residues lie in most favorable regions and 7.5% in additional allowable regions. The analysis showed that for native and native:pyruvate structures all stereochemical parameters are better than expected at their given resolution.

Coordinates

The atomic coordinates for both native and covalent intermediate *E. coli* KDPG aldolases have been deposited with the Protein Data Bank (accession codes 1EUN and 1EUA respectively).

Acknowledgements

Research was supported by funding from MRC (Canada). The assistance of Dr. Tae-Sung Yoon in data collection and reduction is gratefully acknowledged. Gratitude is expressed to Dr. D. Gravel (Univ. de Montréal) for critical review of the manuscript. Work was carried out in part at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, which is supported by the U.S. Department of Energy, Division of Materials Sciences and Division of Chemical Sciences under contract number DE-AC02-98CH10886. Assistance by X8-C beam line personnel, Dr. L. Flaks, was appreciated.

Table 1: Data reduction and refinement statistics for KDPG aldolase

<i>Data set</i>		Wavelength (Å)	Resolution (Å)	Completeness (%)	R_{sym}^* (%)	Redun- dancy	Figure of merit
<i>Native:pyruvate</i>		1.00	1.95	99.4	8.7	11.1	-
<i>Native</i>		0.9787	2.00	94.8	7.5	4.97	-
<i>SeMet: pyruvate</i>	<i>Remote</i>	0.9400	2.00	85.9	9.8	3.76	0.82 §
	<i>Inflexion</i>	0.9790	2.00	84.4	10.9	3.78	
	<i>Peak</i>	0.9788	2.00	84.6	10.5	3.81	
Refinement statistics	No. of reflections	No. of protein atoms	No. of water molecules	R_{cryst}^{**} (%)	R_{free}^{***} (%)	R.m.s. bond length (Å)	R.m.s. bond angle (°)
<i>Native:pyruvate</i>	44409	4698	615	20.1	24.3	0.006	1.30
<i>Native</i>	39315	4698	749	20.2	25.9	0.006	1.30
<i>SeMet:pyruvate remote</i>	37390	4698	825	19.4	25.4	0.006	1.40

§ Figure of merit calculated for 2.8Å resolution data by program SOLVE.

* $R_{\text{sym}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |F_i(\text{hkl})| - |\bar{F}_i(\text{hkl})| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i |F_i(\text{hkl})|$, with i running over the number of independent observations of reflection hkl .

** $R_{\text{cryst}} = \sum_{\text{hkl}} ||F_o(\text{hkl})| - |F_c(\text{hkl})|| / \sum_{\text{hkl}} |F_o(\text{hkl})|$.

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

References:

- ¹ Conway T., The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev.* **9**, 1-27 (1992).
- ² Fuhrman LK, Wanken A, Nickerson KW, Conway T, Rapid accumulation of intracellular 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate in an Entner-Doudoroff aldolase mutant results in bacteriostasis. *FEMS Microbiol Lett.* **159**, 261-6 (1998).
- ³ Egan,SE, Fliege,R, Tong,S, Shibata,A, Wolf,RE, Conway,T. Molecular Characterization of the Entner-Doudoroff Pathway in *Escherichia coli*: Sequence Analysis and Localization of Promoters for the *edd-eda* Operon. *J. Bacteriol.* **174**, 4638-4646 (1992).
- ⁴ Wang, J.K., EE. Dekker, ND. Lewinski, and H.C. Winter, Physical and chemical evidence for the trimeric structure of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase from *Escherichia coli* K-12, *J.Biol.Chem.*, **256**, 1793-1800 (1981).
- ⁵ Gupta, SC, Dekker, EE, Maly-CoA formation in the NAD⁺-, CoASH-, and α -ketoglutarate dehydrogenase-dependent oxidation of 2-keto-4-hydroxyglutarate. *J. Biol. Chem.* **259**, 10012-10019 (1984).
- ⁶ Maitra, U, Dekker, EE, Enzymatic steps in the conversion of γ -hydroxyglutamate to glyoxal and alanine. *J. Biol. Chem.* **238**, 3660-3669 (1963).
- ⁷ Nishihara, H, Dekker, EE, Purification, substrate specificity, binding, β -decarboxylase activity, and other properties of *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. *J. Biol. Chem.* **247**, 5079-5087 (1972).
- ⁸ Meloche HP, Bromopyruvate inactivation of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase. I. Kinetic evidence for active site specificity, *Biochemistry.* **6**, 2273-80 (1967).
- ⁹ Meloche, HP, Monti, CT, Dekker, EE. Enzyme Stereoselectivity : The Reversible Reaction Catalyzed By 2-Keto-4-Hydroxyglutarate Aldolase of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Comm.* **65**, 1033-1039 (1975).
- ¹⁰ Shelton, MC, Cotterill, IC, Novak, STA, Poonawala, RM, Sudarshan, S, Toone, EC. 2-Keto-4-deoxy-6-phosphogluconate Aldolases as Catalysts for Stereocontrolled Carbon-Carbon Bond Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2117-2125 (1996).
- ¹¹ Fessner, WD, Walter, C. Enzymatic C-C Bond Formation in Asymmetric Synthesis. *Topics Curr. Chem.* **184**, 98-194 (1998).
- ¹² Mavridis, IM, Hatada, MH, Tulinsky, A, Lebodia, L. Structure of 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate Aldolase at 2.8Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **162**, 419-444 (1982).
- ¹³ Mavridis, I.M. and Tulinsky, A, *Biochemistry*, The folding and quaternary structure of trimeric 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase at 3.5-Å resolution, **15**, 20, 4410-7 (1976)
- ¹⁴ Kuo DJ, Rose IA. Chemical trapping of complexes of dihydroxyacetone phosphate with muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* **24**, 3947-52 (1985).
- ¹⁵ Rose IA, Warms JV. Complexes of muscle aldolase in equilibrium with fructose 1,6-bisphosphate. *Biochemistry* **24**, 3952-7 (1985).
- ¹⁶ Kayser, R.H. and Pollack, R.M., Intramolecular general base catalysis of Schiff base hydrolysis by carboxylate ions. *J. Amer. Chem. Soc.* **99**, 3379-3386 (1977).
- ¹⁷ Vlahos, C.J. and E.E. Dekker, Active-site residues of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase from *Escherichia coli*, *J.Biol.Chem.*, **265**, 33, 20384-20389 (1990)
- ¹⁸ Vlahos, CJ, Ghalebabor, MA, Dekker, EE. Evidence for an essential arginine residue in the active site of *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. Modification with 1,2-cyclohexanedione. *J. Biol. Chem.* **260**, 5480-5485 (1985).
- ¹⁹ Vhalos, CJ, Dekker, EE. Amino acid sequence of the pyruvate and the glyoxylate active-site lysine peptide of *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. *J. Biol. Chem.* **261**, 11049-11055 (1986).
- ²⁰ Vhalos, CJ, Dekker, EE. The complete amino acid sequence and identification of the active site peptide of *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. *J. Biol. Chem.* **263**, 11683-11691 (1988).
- ²¹ Jencks, WP. "Catalysis in Chemistry and Enzymology". McGraw-Hill, New York, NY pp.463, (1969).
- ²² Pollack, R.M., Kayser, R.H., Damewood J.R., The effect of solvent on intramolecular general base catalysis in the hydrolysis of α,β -unsaturated Schiff bases, *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 8232-7 (1977).
- ²³ Sayer, J.M., Pinsky, B., Schonbrunn, A., Washtien W., Mechanism of carbinolamine formation, *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 7998-8009 (1974).
- ²⁴ Esnouf, R.M., Bobscrip: An extensively modified version of MOLSCRIPT that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J.Mol.Graph.* **15**, 133-138 (1997).
- ²⁵ Merritt, E.A., Murphy, M.E.P. Raster3D version 2.0 - a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **50**, 869-873 (1994).

-
- ²⁶ Meloche, H.P. and Glusker J.P., Aldolase catalysis: Single base-mediated proton activation, *Science*, **181**, 350-2 (1973)
- ²⁷ Jeffrey, G.A., Saenger, W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*. Study Ed. Springer-Verlag, New York NY, pp. 142 (1994).
- ²⁸ Highbarger LA, Gerlt JA, Kenyon GL Mechanism of the reaction catalyzed by acetoacetate decarboxylase. Importance of lysine 116 in determining the pKa of active-site lysine 115. *Biochemistry*, **35**, 41-6 (1996).
- ²⁹ Barbas CF 3rd, Heine A, Zhong G, Hoffmann T, Gramatikova S, Bjornestedt R, List B, Anderson J, Stura EA, Wilson IA, Lerner RA. Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. *Science*. **278**, 2085-92 (1997).
- ³⁰ Dickopf S, Mielke T, Heyn MP. Kinetics of the light-induced proton translocation associated with the pH-dependent formation of the metarhodopsin I/II equilibrium of bovine rhodopsin. *Biochemistry*, **37**, 16888-97 (1998).
- ³¹ Egan SE, Fliege R, Tong S, Shibata A Wolf RE and Conway T, Molecular Characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon, *J.Bacteriol.*, **174**, **14**, 4638-46 (1992).
- ³² Brosius J, Holy A, Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81**(22), 6929-33 (1984).
- ³³ Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. **189**, 113-30 (1986).
- ³⁴ Doublé S., Preparation of Selenomethionyl Proteins for Phase determination, *Methods Enzymol.*, **276**, 523 (1997).
- ³⁵ Otwinowski Z. and Minor W. *Methods Enzymol.*, **276**, 307 (1997).
- ³⁶ Terwilliger, T.C. and J. Berendzen. "Automated structure solution for MIR and MAD". *Acta Cryst.* **D55**, 849-861(1999).
- ³⁷ Cowtan K, Main P. Miscellaneous algorithms for density modification. *Acta Cryst. D Biol Crystallogr.* **54**, 487-93 (1998).
- ³⁸ Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard, Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-9 (1991).
- ³⁹ Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL, Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D Biol Crystallogr.* **54**, 905-21 (1998).
- ⁴⁰ Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS & Thornton JM, *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291 (1993).

Chapitre 3 : Discussion et conclusion

3.1 Clonage, surexpression et purification

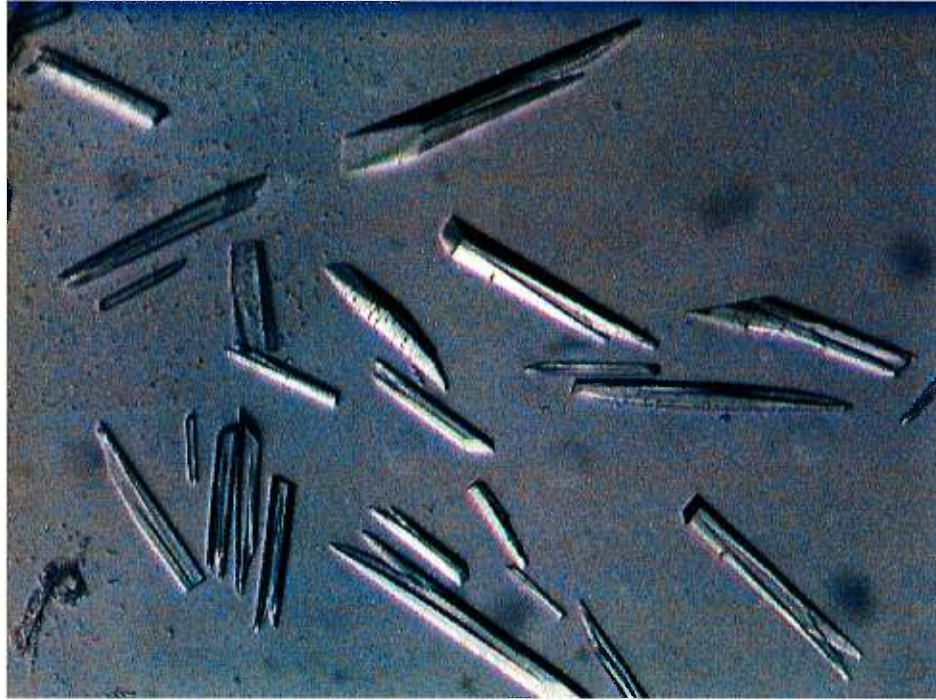
Le clonage a été effectué par amplification du gène par PCR sur le génome d'*Escherichia coli* et insertion du gène obtenu dans le vecteur de surexpression pKK223-3³³. La KDPG aldolase était surexprimée et un protocole de purification en une étape a été mis au point. Ce protocole permet d'obtenir la KDPG aldolase purifiée à homogénéité en grande quantité (environ 100 milligrammes) en une journée à partir d'un litre de culture bactérienne. Des dérivés séléno-méthioninés ont été produits selon la méthode décrite dans l'article et purifiés suivant le protocole mis au point pour la native.

3.2 Cristallisation

Les conditions de cristallisation devaient permettre d'obtenir des cristaux de taille raisonnable et de bonne qualité et, idéalement, dans un milieu acide. Des cristaux ont été obtenus à l'aide de la méthode de la diffusion de vapeur par goutte suspendue dans une solution mère de 18,5% de polyéthylèneglycol-3350, 0,2M ammonium sulfate et 0.1M acétate de sodium à pH 4,6 (figure 7a).

La qualité des cristaux a été démontrée par leur capacité à diffracter les rayons X. Il a été possible d'obtenir des données jusqu'à une résolution de 1,95 Å pour la KDPG aldolase incubée avec le pyruvate. Les cristaux étaient donc de bonne qualité puisqu'ils ont démontré être ordonnés lors de la diffraction aux rayons X et qu'ils étaient de taille suffisante pour la collecte des données (figure 7b).

a)



b)

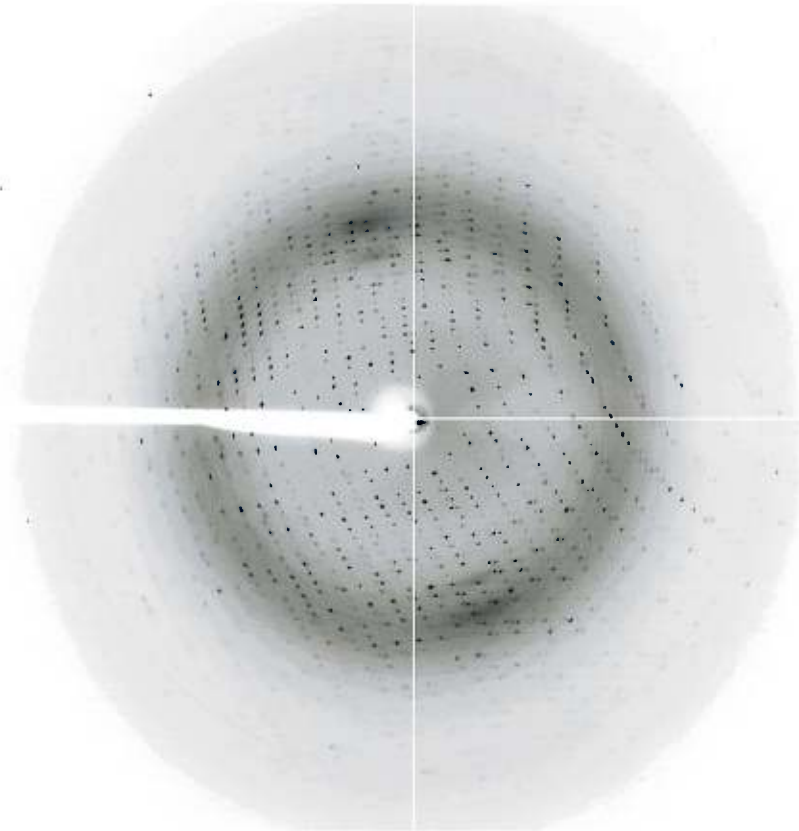


Figure 7. Photo de cristaux de KDPG aldolase native (a) et patron de diffraction d'un cristal de KDPG aldolase (b).

3.3 Détermination de la structure

3.3.1 Détermination de la structure du dérivé semet contenant le pyruvate

Il a été décidé d'utiliser la technique MAD pour la résolution du problème de phase à l'aide de protéines contenant des séléno-méthionines. Par soucis d'obtenir la structure pouvant nous fournir le plus d'informations possibles, les cristaux de la protéine contenant la séléno-méthionine ont été mis en présence de pyruvate lors de la première récolte de données. Les paramètres de maille pour les cristaux de protéine contenant des séléno-méthionines sont les suivants : $a=54.67$, $b=96.42$ et $c=120.12$. Le groupe d'espace est $P2_12_12_1$.

Ces données ont permis de trouver la position des séléno-méthionines et ainsi de résoudre le problème de la phase. Une première carte de densité électronique a pu être calculée dans laquelle on voyait bien le squelette de la protéine. La technique de remplacement moléculaire à l'aide de la structure de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* s'est révélée inefficace. Cette structure a tout de même été utilisée comme premier modèle afin d'économiser du temps lors de la construction de la molécule.

3.3.2 Détermination de la structure de la protéine native

Des données ont ensuite été récoltées pour des cristaux de protéine native en absence de pyruvate. Les paramètres de maille des cristaux pour la protéine native sont $a=54.95 \text{ \AA}$, $b=85.21 \text{ \AA}$, $c=133.69 \text{ \AA}$. Ils sont par conséquent différents de ceux des cristaux de la protéine contenant la séléno-méthionine en présence de pyruvate. Il a été possible de résoudre la structure de cette protéine native par remplacement moléculaire (MIR) à partir de la structure précédemment résolue. La résolution est de 2 \AA .

3.3.3 Détermination de la structure de la protéine native contenant le pyruvate

Afin d'améliorer la qualité de la structure de la KDPG aldolase en présence de pyruvate, un autre ensemble de données a été récolté, mais celui-ci avec les cristaux de protéine native afin d'éliminer l'influence de la présence de séléno-méthionine sur la structure de la protéine. Il a ainsi été possible d'améliorer la résolution jusqu'à $1,95 \text{ \AA}$ avec des données de très bonne qualité.

3.4 Analyse de la structure

3.4.1 Analyse de la structure du dérivé semet contenant le pyruvate

La structure de la KDPG aldolase d'*Escherichia coli* forme, comme chez *Pseudomonas putida* un baril β composés de huit hélices α et huit brins β ainsi que d'une hélice α à l'extrémité amino terminale qui recouvre l'extrémité du baril (figure 8c). L'arrangement des trois sous-unités est tel que décrit pour la protéine de *Pseudomonas putida*, le coté d'un baril vient donc s'appuyer en angle sur le dessus d'un second de manière à former une hélice de bateau (figure 8a).

Une densité électronique continue avec la densité de la lysine 133 est observée. Le pyruvate est donc entré dans le site actif et forme probablement un lien covalent avec la lysine, mais il n'est, à ce moment, pas possible d'établir avec certitude l'identité de l'intermédiaire en question.

On observe aussi un ion sulfate à l'entrée de chacun des barils interagissant avec l'azote de la chaîne principale entre les résidus glycine 162 et glycine 163. Ces ions sulfates ont été observés dans chacune des structures déterminées lors de cette étude. La liaison des ions sulfates pourrait témoigner de la présence de sites de liaisons du phosphate, la distance entre le sulfate et le site actif pouvant concorder avec la longueur du KDPG. La conservation des résidus glycine à cet endroit vient appuyer cette hypothèse.

3.4.2 Analyse de la structure de la protéine native

La structure globale d'un monomère de la protéine native est identique à celle de la protéine contenant la séléno-méthionine. Cependant, la disposition des sous-unités en trimère est différente. Un léger décalage est observé lorsque les deux trimères sont superposés (figure 8b). La structure d'un monomère étant globalement identique et les séléno-méthionines se trouvant aux interfaces entre les monomères, cette différence est due à la présence du sélénium plutôt qu'à un changement conformationnel induit par l'interaction avec le pyruvate, comme il avait été conclu lors de la comparaison des paramètres de maille.

Une densité électronique est observée dans le site actif. Contrairement à la précédente, elle n'est pas continue avec la densité de la lysine 133. Comme les cristaux n'ont pas été incubés avec la solution de pyruvate, le composé du site actif doit être soit un ion sulfate ou un acétate provenant de la solution de cristallisation. L'acétate a d'abord été placé dans la densité électronique, mais les premiers calculs d'affinement ont montré que l'acétate ne pouvait expliquer toute la densité électronique du site actif. L'acétate a donc été remplacé par l'ion sulfate qui lui arrivait à expliquer la densité électronique. La présence de l'ion sulfate a été confirmée ensuite par le calcul d'une carte de différence omettant le sulfate. La densité électronique de cette carte concorde parfaitement avec la position du sulfate.

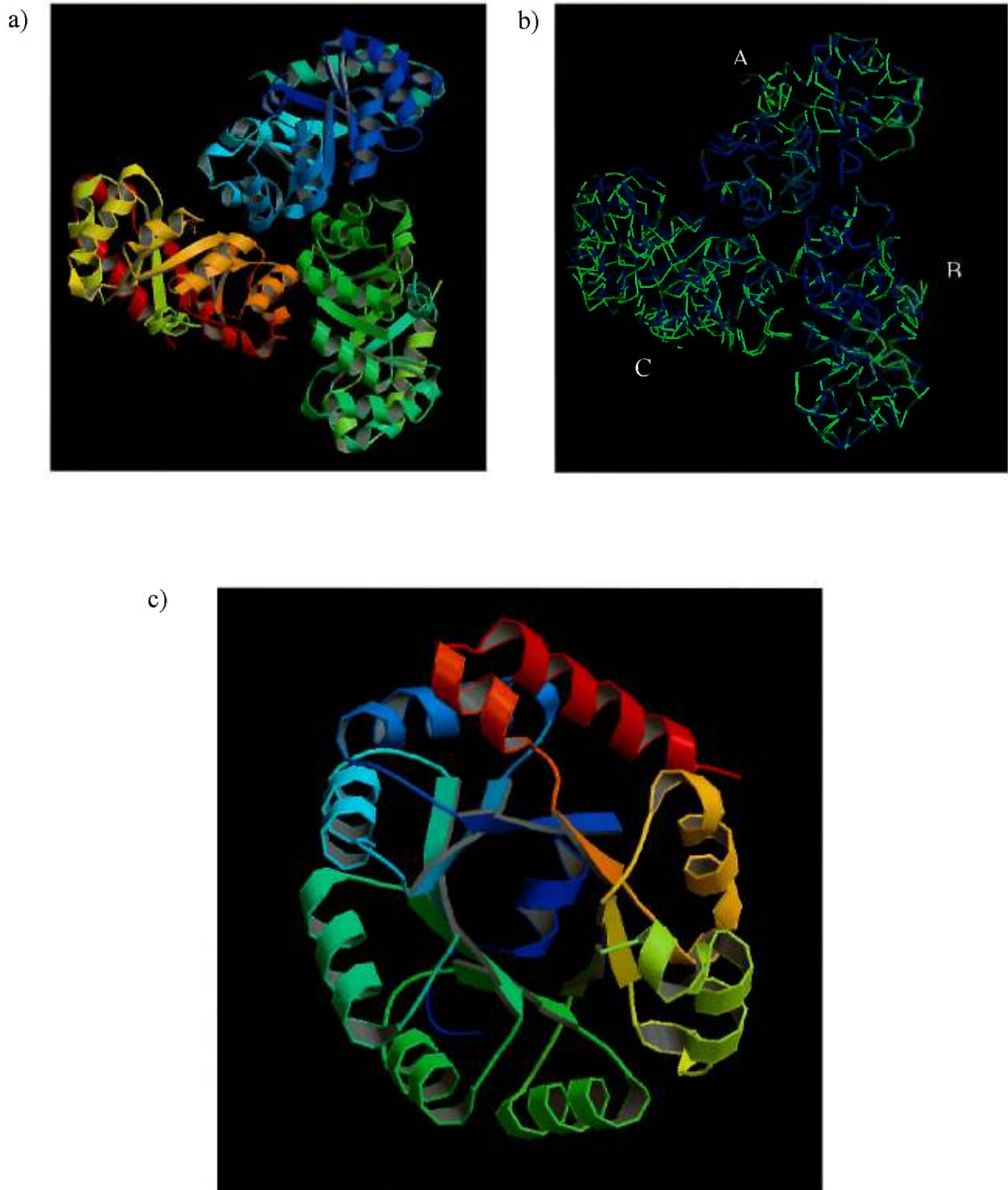


Figure 8. Structure de la KDPG aldolase native (a), superposition avec la structure du dérivé semet (la native est bleue et le dérivé semet vert)(b) et structure d'un monomère de la KDPG aldolase native (c).

3.4.2.1 État de protonation de la lysine 133

La présence de l'ion sulfate à l'intérieur du site actif pose un problème quant à l'état de protonation de la lysine 133. En effet, la lysine pour former la base de Schiff doit procéder par une attaque nucléophile, elle doit par conséquent être neutre. Comme il est expliqué dans l'article, l'observation des ponts hydrogènes avec la lysine permet de conclure à la protonation de la lysine 133. Ceci est logique pour une lysine se retrouvant dans un milieu à pH 4,6, la lysine ayant un pKa de 10,54 lorsqu'elle est libre²⁷.

3.4.2.2 État de protonation du glutamate 45

Pour les mêmes raisons, le résidu glutamate 45 doit être protoné. S'il n'était pas protoné, il serait chargé négativement. L'anion sulfate ne pourrait pas alors se trouver si près de cette charge négative sans qu'il n'y ait répulsion. De plus, le glutamate fait un pont hydrogène avec un oxygène du sulfate qui ne peut être qu'accepteur de proton. Il n'y a donc aucun doute que le glutamate soit protoné. Le pKa du glutamate libre est de 4,07²⁷. Le pKa est légèrement inférieur au pH, mais l'environnement d'un acide aminé peut facilement expliquer un changement de pKa de quelques unités.

3.4.3 Analyse de la structure de la protéine native contenant le pyruvate

3.4.3.1 Structure de la carbinolamine

L'obtention de données de meilleure qualité permet d'observer de façon très claire la présence d'un intermédiaire réactionnel covalent dans le site actif. La structure de cet intermédiaire a été déterminée par étapes. Le premier intermédiaire testé a été la base de Schiff. Cependant, la carte de différence entre cette structure et la carte expérimentale a montré une densité électronique inexplicée adjacente au carbone 2 du pyruvate et une géométrie tétraédrique au carbone 2.

L'intermédiaire carbinolamine a alors été construit dans le site actif et une nouvelle carte de différence a été calculée. Cette fois, toute la densité électronique était expliquée, seul un léger décalage était observable. Ce décalage semblait être dû à la géométrie à l'azote, qui à ce moment n'était pas protoné. Un nouveau calcul avec une géométrie tétraédrique à l'atome d'azote a permis un placement exact de la carbinolamine dans la densité électronique.

L'arginine 49, la thréonine 73 et le squelette interagissent via des ponts hydrogènes avec le groupement carboxylate du pyruvate et permettent un alignement spécifique de celui-ci dans le site actif. La phénylalanine 135 interagit au moyen d'interactions hydrophobes avec le groupement méthyle du pyruvate pour orienter et stabiliser le pyruvate.

L'incubation des cristaux de KDPG aldolase avec le pyruvate en milieu acide mène donc à la formation d'une carbinolamine protonée observable par diffraction des rayons X. Cette observation était attendue. En effet, il a été démontré qu'à pH acide, le clivage de la carbinolamine devient l'étape limitante et qu'il est possible de capturer la carbinolamine³⁴. De plus, puisqu'il a pu être démontré à partir de la structure native que le glutamate 45 est protoné, celui-ci ne peut plus tenir son rôle de base permettant la déshydratation. En réalité, l'observation d'un autre intermédiaire réactionnel n'aurait pu être possible à ce pH, mais l'analyse de la structure doit se faire indépendamment de ces principes afin d'analyser toutes les possibilités et d'obtenir une structure réelle, non-biaisée.

Finalement, afin de prouver que l'intermédiaire est la carbinolamine, une carte de différence omettant la lysine et le pyruvate a été calculée. La carte d'omission concorde parfaitement avec la structure finale de la carbinolamine prouvant que celle-ci est bien réelle.

3.4.3.2 Comparaison avec la structure de la protéine native

La structure de la protéine native en présence de pyruvate est presque parfaitement identique à celle de la protéine native. En effet, la superposition des deux structures montre que seules des différences au niveau du site actif sont présentes.

L'arrangement trimérique est exactement le même, prouvant que l'arrangement différent de la protéine contenant la séléno-méthionine est du à la présence de sélénium.

La liaison du pyruvate à la lysine provoque quelques changements conformationnels mineurs. Tout d'abord, la lysine possède évidemment une conformation légèrement différente. Ensuite, le carbone γ de la proline 94 est plus près du site actif lorsque le pyruvate remplace le sulfate. Cette nouvelle conformation de la proline entraîne une modification de conformation de la valine 118 de la sous-unité adjacente qui présente un rotamère différent de celui de la protéine native sans pyruvate (figure 9). Ces différences de conformations sont observées dans les trois sous-unités dont les structures ont été déterminées de façon indépendante. Ces différences sont donc réelles. Un changement de conformation dans la sous-unité voisine lors de l'interaction avec le substrat pourrait témoigner d'une communication entre les sous-unités d'un même trimère. Il pourrait donc y avoir une coopérativité entre les sous-unités, tel qu'il a déjà été suggéré par des études d'inhibition²².

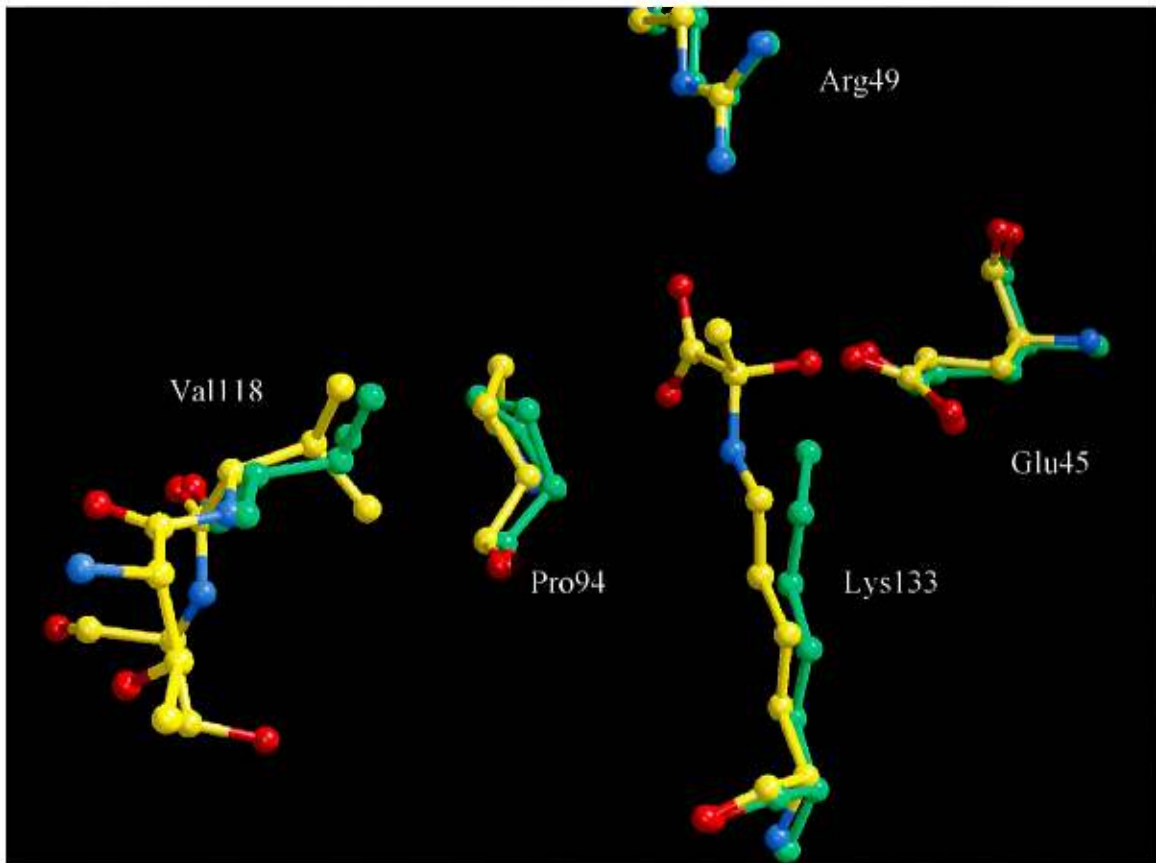


Figure 9. Superposition des sites actifs de la native en absence (en vert) et en présence de pyruvate. L'ion sulfate présent en absence de pyruvate a été omis pour plus de clarté.

3.4.4 Comparaison avec la structure de la KDPG aldolase de *P. putida*

La structure globale de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* est hautement similaire à celle d'*Escherichia coli*. Lorsqu'on superpose les monomères provenant des deux espèces, on obtient un rmsd de 1.5 Å . Cependant, si on observe les structures de plus près, il devient évident que des erreurs se sont glissées dans l'assignation des chaînes latérales à l'aide de la densité électronique. Puisque la structure de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* a été originellement placée dans la densité électronique pour construire la structure de la protéine provenant d'*Escherichia coli*, les erreurs sont devenues évidentes.

Lors de la détermination de la structure de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida*, l'assignation des chaînes latérales s'est fait à l'aide de deux résidus aromatiques situés à l'extrémité carboxy terminale qui possédaient des densités électroniques facilement reconnaissables. La séquence a ensuite été placée en se dirigeant vers l'extrémité amino terminale. Les deux structures sont identiques et conforme à l'alignement de leurs séquences entre l'extrémité C-terminale et le résidu 175 de la protéine de *P.putida*. Un décalage de trois acides aminés est ensuite introduit. La lysine 144, qui devrait se retrouver à la même position que la lysine 133 d'*E.coli*, se retrouve plutôt à la position de l'acide aminé 136. Ceci place la lysine formant la base de Schiff dans une boucle plutôt qu'à l'intérieur du baril beta comme il a été observé plus tôt.

Il n'y a aucune coordonnées pour les acides aminés 125 à 128 qui forment la boucle entre le cinquième brin et la sixième hélice ce qui laisse un plus grand degré de liberté pour l'introduction de décalages. Un décalage s'est produit dans le cinquième brin du à la proximité de deux prolines, la proline 124 a été placée dans la densité de la proline 121. Au niveau du glutamate 56 impliqué dans l'activité, il y a aussi un décalage de trois acides aminés plaçant ce résidus à l'extérieur du baril plutôt qu'à l'intérieur. Ces erreurs d'assignation des chaînes latérales expliquent l'observation d'une distance de 25 Å entre la lysine 144 et glutamate 56 et l'incapacité d'observer des complexes avec des substrats ou analogues de substrats.

3.5 Acides aminés conservés et structure

En comparant les séquences primaires des KDPG aldolases connues, on a observé que 19 résidus étaient conservés dans les protéines provenant de douze organismes. En observant la structure, il est possible de proposer un rôle pour chacun de ces acides aminés.

Le premier résidu est la leucine 36. Cette leucine fait partie de la première hélice du baril α/β . Elle est située sur la face hydrophobe de l'hélice. Une distance de 3,42 Å sépare cette leucine de la leucine 44 qui précède le glutamate 45 du site actif et qui fait partie du second brin β . Cette distance entre les deux leucines témoigne de la présence d'interactions hydrophobes. Il est probable que cette leucine 36 soit essentielle pour maintenir la configuration du site actif. Le glutamate 45 est aussi conservé chez toutes les

espèces puisqu'il est essentiel à l'activité. La thréonine 47 est aussi conservée, elle joue probablement aussi un rôle structurel dans le maintien de la structure du site actif. Elle effectue via son groupement hydroxyle un pont hydrogène avec le carbonyle de l'isoleucine 21 du brin β adjacent.

Un trio de résidus, soit l'alanine 71, la glycine 72 et la thréonine 73, est ensuite conservé. Parmi eux, la thréonine 73 est la thréonine du site actif. Elle effectue des ponts hydrogènes avec le pyruvate via son groupement hydroxyle et son azote. La thréonine joue un rôle dans l'alignement du pyruvate dans le site actif de même que dans la stabilisation des intermédiaires. La chaîne principale au niveau de l'alanine 71 et de la glycine 72 est parallèle au glutamate 45. Si on essaie de remplacer la glycine dans la structure par un résidu possédant une chaîne latérale, la chaîne latérale vient obligatoirement se superposer au glutamate 45 et encombrer le site actif. La mutation de cet acide aminé entraînerait des modifications importantes du site actif et probablement une inactivation de l'enzyme. Ces résidus pourraient aussi être impliqués dans le maintien de la conformation du site actif. En effet, la thréonine 73 possède des angles phi et psi qui, dans chaque sous-unité, dans chacune des structures, sont dans une région du diagramme de Ramachandran qui n'est pas hautement favorable.

La glycine 87, l'alanine 88, la glycine 128 et la glycine 142 sont probablement essentiels au maintien de la structure globale. En effet, ces résidus se retrouvent dans les boucles reliant hélices et feuillettes et doivent être importants pour permettre le repliement de la protéine sous forme de baril α/β .

La proline 94 qui fait partie du site actif est aussi conservée. Elle compose avec les autres résidus la cavité formant le site actif. Cette proline pourrait être impliquée dans une communication entre les sous-unités. Elle est en effet à des distances permettant des interactions hydrophobes avec la valine 118, la proline 152 et la phénylalanine 153 de la sous-unité adjacente. La proline est intercalée entre la phénylalanine 153 et la proline 152 de l'autre sous-unité, donnant lieu à un empilement qui joue probablement un rôle dans l'assemblage des sous-unités en trimère. Cette proline 152 est aussi conservée chez toutes les espèces. Il a par ailleurs été observé que lors de l'interaction avec le pyruvate, la conformation de la proline 94 est modifiée ce qui entraîne un changement de rotamère pour la valine 118 de la sous-unité voisine.

La glycine 114, située dans un brin β adjacent à celui contenant la lysine qui forme la base de Schiff, est aussi conservée. Il est essentiel que ce résidu soit une glycine car, comme pour la glycine 72, la présence d'une chaîne latérale causerait des modifications importantes du site actif. En effet, lorsqu'on remplace la glycine dans la structure, la chaîne latérale du nouvel acide aminé se trouve à la même position que la lysine 133.

La lysine 133 qui forme la base de Schiff est évidemment conservée. De même que la phénylalanine 135, qui joue un rôle dans l'alignement du substrat dans le site actif au moyen d'interactions hydrophobes.

Finalement, une séquence de quatre résidus est aussi conservée, soit les résidus proline 160, thréonine 161, glycine 162 et glycine 163. Les résidus proline et thréonine sont voisins de la lysine 133. Ils pourraient eux aussi jouer un rôle dans le maintien de la configuration du site actif ou dans l'interaction avec le KDPG. Les deux glycines, quant à elles, sont situées à l'entrée du site actif, là où se lient les ions sulfates. Le fait qu'elles soient conservées est un argument supplémentaire permettant d'affirmer qu'elles forment le site de la liaison du groupement phosphate du KDPG.

L'observation de la structure permet de montrer une importance structurale ou enzymatique pour chacun des résidus conservés. Ceci vient confirmer que la structure déterminée est réelle et qu'elle ne comporte pas d'erreurs d'identification des résidus.

3.6 Proposition d'un mécanisme réactionnel basé sur l'analyse des structures

L'étude de la structure du site actif d'une protéine apporte généralement de nombreux éclaircissements à propos de son mécanisme réactionnel. L'étude du site actif de la KDPG aldolase montre deux particularités de cet enzyme. Tout d'abord, un seul résidu basique est présent à l'intérieur du site actif. Ceci présente l'avantage de ne laisser aucun doute quant à l'identité des résidus impliqués dans la catalyse. Le glutamate est le seul résidu impliqué, il est multi-fonctionnel et le mécanisme proposé doit tenir compte du fait que le glutamate doit intervenir à différentes étapes du mécanisme. La seconde

particularité est la protonation de la lysine du site actif. Comment expliquer qu'une lysine protonée puisse effectuer une attaque nucléophile sur le pyruvate?

De précédentes études sur les lysines nucléophiles ont proposé quelques moyens par lesquels une lysine pouvait être rendue nucléophile, soit : i) par la présence d'un résidu chargé positivement avoisinant la lysine³⁵, ii) par un environnement hydrophobe entourant la lysine³⁶ ou iii) par une activation de la lysine au moyen d'un transfert de proton à une base ou une molécule d'eau³⁷. Pour la lysine 133 de la KDPG aldolase, il n'y a aucun résidu chargé positivement dans le site actif, l'environnement n'est pas suffisamment hydrophobe pour empêcher la protonation de la lysine et l'activation par le transfert du proton est trop difficile à pH acide. La lysine, comme il a été observé par la formation des ponts hydrogènes, est donc réellement protonée.

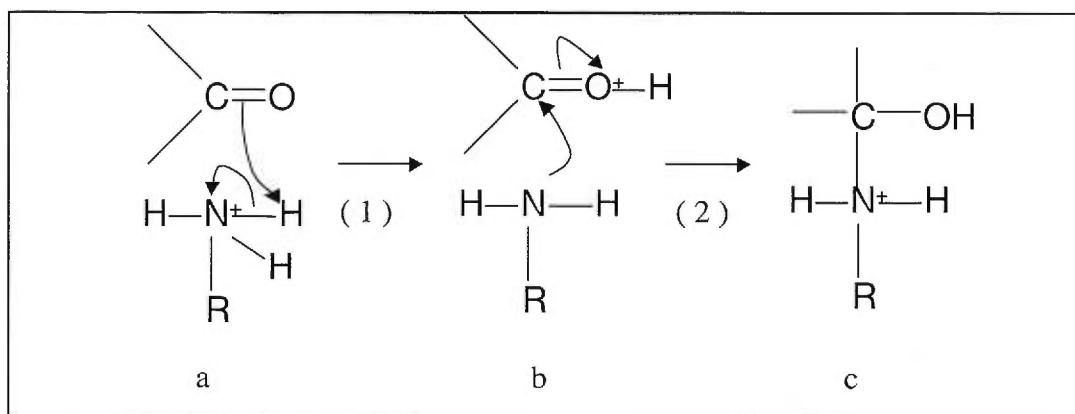
Dans le modèle de formation de la carbinolamine proposé par Sayer²⁸, le transfert de proton sur le carbonyle est plus ou moins concerté avec la formation du lien carbone-azote entre la lysine et le carbone du carbonyle, soit l'attaque nucléophile. Dans le cas présent, la lysine protonée pourrait agir à la fois comme donneur de proton, activant le pyruvate, et comme nucléophile. Ceci nous mène à proposer un modèle séquentiel basé sur l'observation des structures.

La première étape de ce modèle est l'interaction entre l'oxygène du carbonyle du pyruvate et la lysine protonée (figure 9a). Cette configuration est stabilisée par des ponts hydrogènes avec l'arginine 49, la thréonine 73 et le squelette peptidique en plus de l'interaction avec la lysine. Le pyruvate est aussi stabilisé et orienté par des interactions

hydrophobiques avec la phénylalanine 135. La conformation de la lysine est alors exactement la même que celle retrouvée dans la structure de la protéine native en absence de pyruvate, soit lorsqu'elle interagit avec l'ion sulfate.

La seconde étape implique le transfert d'un proton de la lysine à l'oxygène du carbonyle du pyruvate. Ce mécanisme est illustré dans le schéma I à la page suivante (étape 1). La lysine devient alors nucléophile (b). L'addition du proton au carbonyle lui confère la possibilité de former un pont hydrogène en tant que donneur avec le glutamate. Cette nouvelle interaction ajoutée à la perte de l'interaction entre la lysine et le carbonyle provoque un léger déplacement latéral du carbone 2 du pyruvate de 0,5 Å. La lysine est aussi repositionnée et amenée de sa conformation observée dans la native à la conformation observée lorsqu'elle forme la carbinolamine (figure 9b). Le pKa du carbonyle protoné (b) est très bas (<0)³⁸. Cependant, la stabilisation de l'intermédiaire par des ponts hydrogènes permet d'augmenter ce pKa légèrement, entre autres avec le glutamate 45. Cet intermédiaire très réactif permet l'attaque nucléophile subséquente par la lysine, selon le mécanisme classique de catalyse acide de l'addition nucléophile sur un groupement carbonyle³⁹. Ces changements placent le carbone 2 du pyruvate dans une position permettant l'attaque nucléophile par la lysine (étape 2). Ce mécanisme permet donc d'expliquer comment la lysine peut procéder à l'attaque nucléophile par l'intermédiaire d'un transfert de proton.

Le glutamate 45 joue un rôle critique dans le mécanisme réactionnel de la KDPG aldolase. En effet, étant la seule base du site actif, il joue un rôle dans les deux étapes du mécanisme réactionnel impliquant l'intervention d'une base. Après la formation de la



(Schéma I)

base de Schiff avec le pyruvate, il doit y avoir condensation avec le G3P. Pour ce faire, le groupement méthyle du pyruvate doit être à proximité du glutamate, ce qui n'est pas le cas dans la structure de la carbinolamine. Cependant, lorsqu'on modélise la base de Schiff à l'intérieur du site actif, on observe que la conformation la plus probable de celle-ci place le groupement méthyle suffisamment proche du glutamate pour permettre son intervention.

Dans un modèle proposé précédemment, suggérant l'intervention d'une seule base dans le mécanisme réactionnel des KDPG aldolase, le résidu glutamate devait effectuer une rotation autour d'un de ses liens carbone-carbone afin de se positionner pour sa deuxième intervention⁷. Cependant, en observant la structure du site actif, il est évident que cette rotation n'est pas possible, le glutamate ayant des voisins ne lui permettant qu'une seule conformation. Cette constatation, de même que la modélisation de la base

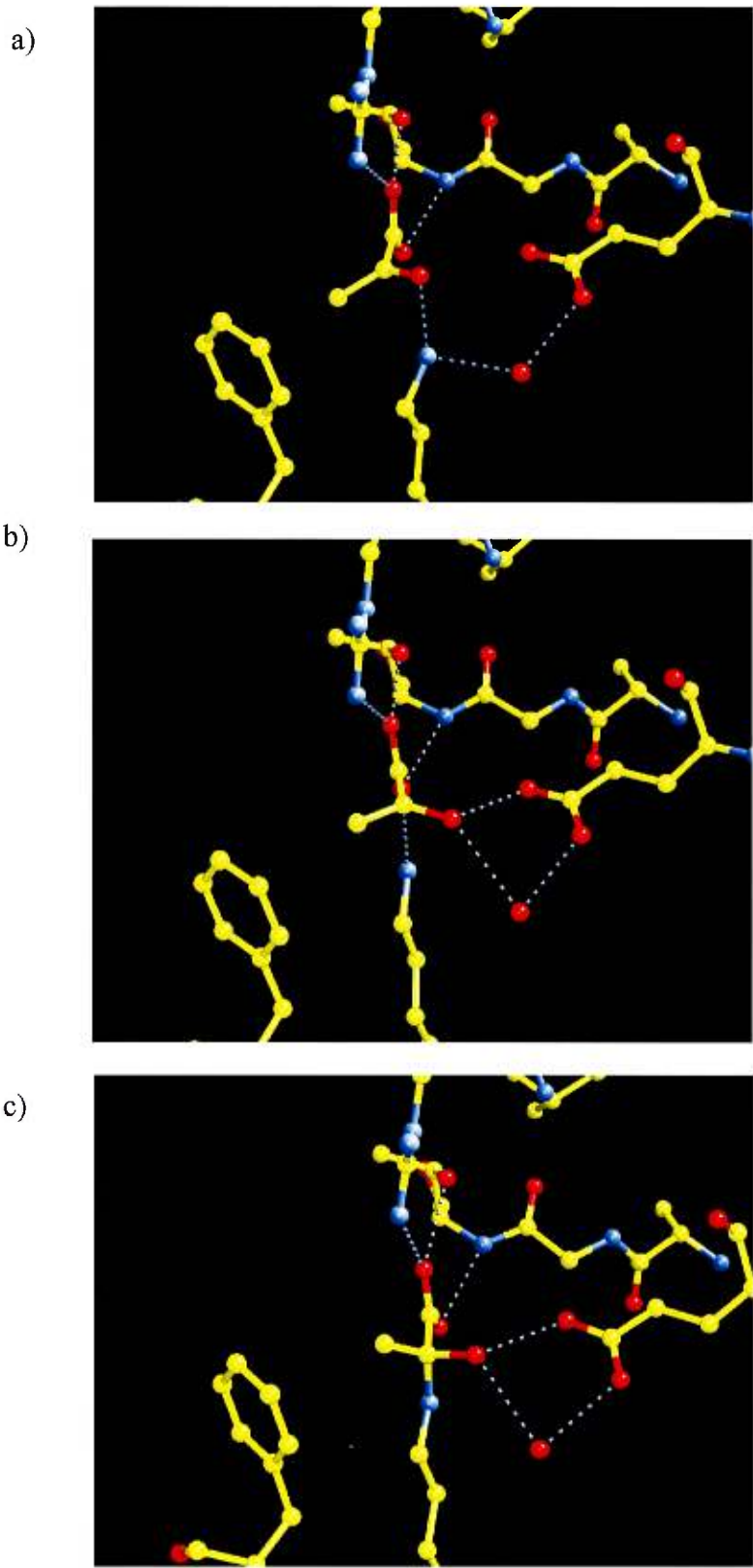


Figure 10. Mécanisme proposé pour la formation de la carbinolamine.

de Schiff, laissent croire qu'il y a plutôt une rotation du complexe autour du lien carbone-azote de la lysine. Cette rotation permet donc d'amener le méthyle près du carboxylate afin de procéder à la réaction de condensation avec le glycéraldéhyde-3-phosphate.

3.7 Conclusion

La 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase est une enzyme réversible multi-fonctionnelle qui catalyse le clivage du KDPG en pyruvate et glycéraldéhyde-3-phosphate. La structure de la KDPG aldolase de *Pseudomonas putida* avait été déterminée à une résolution de 2,8 Å qui ne permettait pas d'obtenir d'informations sur le mécanisme. L'étude effectuée lors de cette maîtrise a permis d'obtenir la structure de la KDPG aldolase d'*Escherichia coli* à une résolution de 1,95 Å. Cette structure est donc la première structure valide d'une KDPG aldolase. Par une incubation des cristaux avec le pyruvate en milieu acide, il a été possible de stabiliser l'intermédiaire réactionnel carbinolamine. La structure de la KDPG aldolase comprenant une carbinolamine a été résolue, c'est aussi la première fois que la structure d'un intermédiaire covalent carbinolamine est résolue. L'observation d'un intermédiaire réactionnel apporte de nombreuses informations sur le site actif d'une protéine et sur son mécanisme réactionnel. Les rôles de certains résidus tels l'arginine 49, la thréonine 73, la phénylalanine 135 et le glutamate 45 ont pu être précisés grâce à cette structure. Cette étude de structure a mené à la proposition d'un mécanisme réactionnel séquentiel par lequel une lysine protonée active le substrat en lui transférant son proton, la rendant neutre et par conséquent apte à procéder à une attaque nucléophile. Ce mécanisme est

innovateur et pourrait bien être un modèle du mécanisme réactionnel de toutes les aldolases de classe I.

Afin d'obtenir de meilleures connaissances sur ce mécanisme et de confirmer notre modèle, de nouvelles études de structure devront être effectuées. L'obtention de données à une résolution très élevée permettrait l'observation directe de la protonation de la lysine 133 et du glutamate 45. Par ailleurs, des études menant à la détermination des structures de la protéine native avec le KDPG ou avec le pyruvate et le glycéraldéhyde-3-phosphate à la fois, dans des conditions acides, sont présentement en cours. Ces études devraient fournir une confirmation de la position du site de liaison du phosphate et fournir une base pour proposer un modèle réactionnel plus complet. La détermination de la structure de mutants des résidus impliqués dans la catalyse et des résidus conservés pourrait nous donner des informations supplémentaires sur leurs rôles respectifs. La détermination de la structure de l'enzyme interagissant avec différents substrats, analogues de substrats et inhibiteurs permettrait aussi l'obtention d'informations menant à une meilleure connaissance du mécanisme. Finalement, la connaissance de la structure du site actif et les connaissances actuelles du mécanisme sont suffisantes pour débiter la mise au point d'inhibiteurs.

Bibliographie

- ¹Meloche, H.P. and Wood, W.A., The Mechanism of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3511 (1964).
- ²Egan, S.E., Fliege, R., Tong, S., Shibata, A., Wolf, R.E. and Conway, T., Molecular Characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon, *J. Bacteriol.*, **174**, 14, 4638 (1992).
- ³Nishihara, H. and Dekker E.E., Purification, substrate specificity and binding, β -decarboxylase activity, and other properties of *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase, *J Biol Chem* **247**,16, 5079 (1972).
- ⁴Grazi, E., Meloche, H., Martinez, G., Wood, W.A. and Horecker, B.L., Evidence for Schiff base formation in enzymatic aldol condensations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 4 (1963).
- ⁵Ingram, J.M. and Wood, W.A., The Mechanism of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase: II. Studies of the partial reactions with substrate analogues, *J. Biol. Chem.*, **241**, 14, 3256, (1966).
- ⁶Rose, I.A. and O'Connell, E.L., Demonstration of the Schiff base mechanism in an aldolase reaction by oxygen exchange, *Arch. Bioch. Biophys.*, **118**, 748 (1967).
- ⁷Meloche, H.P. and Glusker, J.P., Aldolase catalysis: Single base-mediated proton activation, *Science*, **181**, 350 (1973).
- ⁸Meloche, H.P., Mehler, L. and Wurster, J.M., The Stereochemistry at Carbon 3 of Pyruvate Lyase Condensation Products, *J. Biol. Chem.*, **250**, 17, 6870 (1975).
- ⁹Shelton, M.C., Cotterill, I.C., Novak, S.T.A., Poonawala, R.M., Sudarshan, S. and Toone, E.C., 2-Keto-4-deoxy-6-phosphogluconate Aldolases as Catalysts for Stereocontrolled Carbon-Carbon Bond Formation, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2117 (1996).
- ¹⁰Pouyssegur, J.M., Localisation génétique de mutations 2-céto-3-désoxy-6-P-gluconate aldolase négatives chez *E. coli* K 12, *Molec. Gen. Genetics*, **113**, 31 (1971).
- ¹¹Fuhrman, L.K., Wanken, A., Nickerson, K.W. and Conway, T., Rapid accumulation of intracellular 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate in an Entner-Doudoroff aldolase mutant results in bacteriostasis, *FEMS Microbiol Lett.* **159**, 2, 261 (1998).
- ¹²Mendz, G.L., Hazell, S.L. and Burns, B.P., The Entner-Doudoroff pathway in *Helicobacter pylori*, *Arch Biochem Biophys.*, **312**, 2, 349 (1994).
- ¹³Rutter, W.J., Evolution of aldolase, *Fed. Proc.*, **23**, 1248 (1964).

-
- ¹⁴Grazi, E., Rowley, P.T., Cheng, T., Tchola, O. and Horecker, B.L., The mechanism of action of aldolase. III. Schiff base formation with lysine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 38 (1962).
- ¹⁵Cayrol, C., Petit, C., Raynaud, B., Capdevielle, J., Guillemot, J.C. et Defais, M., Recovery of respiration following the SOS response of *Escherichia coli* requires RecA-mediated induction of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 11806 (1995).
- ¹⁶Deal, W.C., Rutter, W.J. and Van Holde K.E., Reversible Dissociation of aldolase into unfolded subunits, *Biochemistry*, **2**, 246 (1963).
- ¹⁷Meloche, H.P., Luczak, M.A., and Wurster, J.M., The Substrate Analog, Bromopyruvate, as Both a Substrate and alkylating agent for 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase, *Journ. Biol. Chem.*, **247**, 13, 4186 (1972).
- ¹⁸ Vlahos, C.J. and Dekker E.E., Active-site residues of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase from *Escherichia coli*, *J.Biol.Chem.*, **265**, 33, 20384 (1990).
- ¹⁹Meloche, H.P., Reaction of the Substrate Analog Bromopyruvate with Two Active Site Conformers of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase, *Biochemistry*, **9**, 26, 5050 (1970).
- ²⁰Meloche, H.P., Bromopyruvate Inactivation of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase. I. Kinetic Evidence for Active Site Specificity, *Biochemistry*, **6**, 8, 2273 (1967).
- ²¹Meloche H.P., The Substrate Analog, Bromopyruvate, as a Bridging Agent for the Active Site of 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase: Chemical evidence for a carboxylate adjacent to the Schiff's base forming Lysine, *J. Biol. Chem.*, **248**, 20, 6945 (1973).
- ²²Barran L.R. and Wood, W.A., The Mechanism of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase: III. Nature of inactivation by fluorodinitrobenzene, *J. Biol. Chem.*, **246**, 12, 4028 (1971).
- ²³Ingram, J.M. and Wood, W.A. , The role of Lysine Residues in the Activity of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate Aldolase, *J. Biol. Chem.*, **240**, 11, 4146 (1965).
- ²⁴Vlahos, C.J. and Dekker E.E., Active-site residues of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase from *Escherichia coli*, *J.Biol.Chem.*, **265**, 33, 20384 (1990).
- ²⁵Mavridis, I.M., Marcos, H.H., Tulinski, A. and Lebioda, L., Structure of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase at 2.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **162**, 419 (1982).

-
- ²⁶Buchanan, L.V., Mehta, N., Pocivavsek, L., Niranjankumari, S., Toone, E.J. and Naismith, J., Initiating a structural study of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase from *Escherichia coli*, *Acta Cryst.*, **D55**, 1946 (1999).
- ²⁷Voet, D. and Voet J.G., *Biochimie*, traduction de la 2^e édition américaine, DeBoeck Université (1998).
- ²⁸Sayer, J.M., Pinsky, B., Schonbrunn, A. and Washtien W., Mechanism of carbinolamine formation, *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 26, 7998 (1974).
- ²⁹Meloche H.P., Sparks G.R., Monti C.T., Waterbor, J.W. and Lademan, T.H., The Conformation of Catalytically Functional Schiff's bases: The Pyruvate-Lysine Ketimine of 2-keto-3-deoxygluconate-6-phosphate Aldolase of *Pseudomonas Putida*, *Arch. Bioch. Biophys.*, **203**, 2, 702 (1980).
- ³⁰Meloche, H.P., Monti, C.T. and Dekker E.E., Enzyme stereoselectivity: the reversible reaction catalyzed by 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase of *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 3, 1033 (1975).
- ³¹Kobes, R.D. and Dekker, E.E., Variant properties of bovine liver 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase; its β -decarboxylase activity, lack of substrate stereospecificity, and structural requirements for binding substrate analogs, *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 238 (1971).
- ³²Humana Press, Methods in molecular Biology, *Crystallographic methods and protocols*, edited by Jones, C., Mulloy, B. and Sanderson, M.R. (1996).
- ³³Brosius, J. and Holy, A., Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**(22), 6929 (1984).
- ³⁴Kayser, R.H. and Pollack, R.M., Intramolecular general base catalysis of Schiff base hydrolysis by carboxylate ions, *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 3379 (1977).
- ³⁵Highbarger, L.A., Gerlt, J.A. and Kenyon, G.L., Mechanism of the reaction catalyzed by acetoacetate decarboxylase. Importance of lysine 116 in determining the pKa of active-site lysine 115, *Biochemistry*, **35**, 41 (1996).
- ³⁶Barbas, C.F. 3rd, Heine, A., Zhong, G., Hoffmann, T., Gramatikova, S., Bjornestedt, R., List, B., Anderson, J., Stura, E.A., Wilson, I.A. and Lerner, R.A., Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope, *Science*, **278**, 2085 (1997).

³⁷ Dickopf S, Mielke T, Heyn MP. Kinetics of the light-induced proton translocation associated with the pH-dependent formation of the metarhodopsin I/II equilibrium of bovine rhodopsin. *Biochemistry*, **37**, 16888-97 (1998).

³⁸ Pine, SH, *Organic Chemistry*, fifth edition, McGraw-Hill Book Company, table 4-2, 99-102, (1987).

³⁹ Pine, SH, *Organic Chemistry*, fifth edition, McGraw-Hill Book Company, Chapter 9, 265-315 (1987).