

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Multifonctionnalité de l'aldolase glycolytique :
mécanisme catalytique et interaction avec un peptide de
la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich**

par

Miguel St-Jean

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

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

Avril, 2008

© Miguel St-Jean, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Multifonctionnalité de l'aldolase glycolytique : mécanisme catalytique et interaction
avec un peptide de la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich**

présentée par :
Miguel St-Jean

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Boileau, président-rapporteur
Jurgen Sygusch, directeur de recherche
Claude Lazure, membre du jury
Miroslaw Cygler, examinateur externe
Tony Antakly, représentant du doyen de la FESP

Résumé

L'aldolase glycolytique des mammifères clive le fructose-1,6-bisphosphate en dihydroxyacétone-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate. L'étude exhaustive de son mécanisme catalytique a permis d'identifier la majorité des résidus du site actif impliqué dans la catalyse. Cependant, à l'exception de la lysine nucléophile formant le lien covalent avec le substrat, le rôle précis exercé par chacun d'eux demeure obscur. Plus spécifiquement, deux étapes cruciales du mécanisme sont mal comprises au niveau structural : l'abstraction d'un proton du fructose-1,6-bisphosphate menant à son clivage et le transfert stéréospécifique d'un proton du dihydroxyacétone-phosphate. Pour élucider les détails moléculaires du mécanisme catalytique, nous avons déterminé des structures cristallographiques à haute résolution de l'aldolase de muscle de lapin, native et mutante, en complexe avec des substrats et des inhibiteurs. Entre autres, en présence du substrat fructose-1,6-bisphosphate, un authentique intermédiaire covalent iminium a été piégé au site actif de l'enzyme, lié à Lys-229. Cette structure permet d'identifier indubitablement Glu-187 comme étant le résidu responsable de l'abstraction du proton du O4 du fructose-1,6-bisphosphate menant à son clivage. Par ailleurs, en présence de dihydroxyacétone-phosphate, nous avons piégé d'authentiques intermédiaires covalents énamine et iminium avec l'enzyme native et le mutant Lys-146→Met, respectivement. Étonnamment, près de l'iminium d'une des sous-unités du mutant, nous avons identifié le C-terminus de l'enzyme au site actif. Le mode de liaison du C-terminus place l'hydroxyle de la chaîne latérale de la tyrosine terminale Tyr-363 à proximité du C3 du dihydroxyacétone-phosphate, c'est-à-dire le carbone où le transfert stéréospécifique du proton pro(*S*) s'effectue. Ainsi, en accord avec de nombreuses données expérimentales inexplicées montrant l'importance catalytique du C-terminus, nos résultats démontrent que Tyr-363 serait le résidu responsable du transfert stéréospécifique du proton chez l'aldolase glycolytique. Basés sur l'ensemble de nos résultats et les données de la littérature, nous proposons un mécanisme décrivant un cycle catalytique complet de condensation aldolique.

En plus de son activité enzymatique, l'aldolase glycolytique est impliquée dans diverses interactions dans la cellule. En effet, une multitude de partenaires ont été rapportés, la majorité semblant interagir avec le site actif de l'aldolase car le fructose-1,6-bisphosphate est un compétiteur des interactions. Cependant, les modes de liaison sont inconnus. Chez un certain nombre de partenaires, dont la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich impliquée dans la dynamique de l'actine, l'étonnante importance d'un résidu tryptophane a été observée. Pour investiguer les détails de cette interaction, nous avons déterminé la structure cristallographique d'un complexe entre l'aldolase et un peptide du C-terminus de la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich. La structure révèle que le tryptophane du peptide interagit avec une poche hydrophobe du site actif de l'aldolase, créée par les carbones aliphatiques des chaînes latérales de Arg-303 et Arg-42, conservées chez l'aldolase glycolytique. Notre structure explique les bases moléculaires de la compétition entre les substrats de l'enzyme et ce partenaire par leur liaison mutuellement exclusive au site actif.

En somme, la détermination de structures macromoléculaires par cristallographie et diffraction des rayons X s'est avérée un outil essentiel dans l'élucidation des détails moléculaires de fonctions distinctes de l'aldolase glycolytique, soient son activité enzymatique et ses interactions avec un partenaire protéique.

Mots-clés : aldolase glycolytique, mécanisme catalytique, clivage du substrat, condensation aldolique, transfert de proton stéréospécifique, interaction protéine-protéine, protéine du syndrome Wiskott-Aldrich, dynamique de l'actine, cristallographie, diffraction macromoléculaire des rayons X.

Abstract

Mammalian glycolytic aldolase promotes the cleavage of fructose-1,6-bisphosphate to dihydroxyacetone-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate. Numerous studies of its catalytic mechanism identify active site residues implicated in catalysis. However, with the exception of the nucleophilic lysine that forms the covalent bond with the substrate, their precise roles are not well understood. More specifically, two crucial steps in the mechanism remain elusive at the structural level: the proton abstraction from the fructose-1,6-bisphosphate substrate leading to its cleavage and the stereospecific proton transfer from the dihydroxyacetone-phosphate. To elucidate the molecular details of the aldolase catalytic mechanism, we solved high resolution crystallographic structures of native and mutant rabbit muscle aldolases in complex with substrates and inhibitors. Among others, fructose-1,6-bisphosphate substrate was trapped in the active site as a genuine iminium intermediate, covalently bound to Lys-229. This structure unambiguously allowed the identification of Glu-187 as the residue that abstracts the O4 proton of fructose-1,6-bisphosphate leading to its cleavage. Moreover, dihydroxyacetone-phosphate was trapped in the active site as genuine enamine and iminium intermediates in native and Lys-146→Met mutant aldolases, respectively. Surprisingly, in one subunit of the mutant, we identified the enzyme C-terminus in the active site, near the iminium. The C-terminus attachment places the side chain hydroxyl of the terminal tyrosine Tyr-363 close to the dihydroxyacetone-phosphate C3 carbon, at which the stereospecific pro(*S*) proton transfer occurs during catalysis. Our results suggest that Tyr-363 is the residue that catalyzes the proton transfer reaction in glycolytic aldolase. This model reconciles longstanding data implicating the C-terminus in glycolytic aldolase catalysis. Taken together, and with other data from the literature, our results were used to propose a mechanism describing a complete catalytic cycle of aldol condensation in rabbit muscle aldolase.

Glycolytic aldolase displays more than just an enzymatic activity. Indeed, aldolase is involved in numerous interactions within the cell. Diverse aldolase partners were reported, which mostly seem to interact with the aldolase active site since fructose-1,6-

bisphosphate abrogates the interaction. However, the binding modes are unknown. Among aldolase partners, some comprise a tryptophan residue that is absolutely necessary to the interaction with aldolase, as observed in the Wiskott-Aldrich syndrome protein implicated in actin dynamics. To investigate the details of this interaction, we solved the crystallographic structure of rabbit muscle aldolase in complex with a C-terminal peptide of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. The structural analysis reveals that the subterminal tryptophan from the peptide interacts with a hydrophobic pocket in the active site of the aldolase. This pocket comprises the aliphatic side chain carbons of Arg-303 and Arg-42, two conserved residues in glycolytic aldolase. Our structure accounts for the competition between the Wiskott-Aldrich syndrome protein and the aldolase substrates since their binding to aldolase active site would be mutually exclusive.

In short, the determination of macromolecular structures by crystallography and X-ray diffraction proved to be an essential tool to elucidate the molecular details of distinct glycolytic aldolase functions, are its enzymatic activity and its interaction with a protein partner.

Keywords : glycolytic aldolase, catalytic mechanism, substrate cleavage, aldol condensation, stereospecific proton transfer, protein-protein interaction, Wiskott-Aldrich syndrome protein, actin dynamics, crystallography, macromolecular X-ray diffraction.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xvii
CHAPITRE 1.....	1
Introduction	1
1.1 La découverte des enzymes.....	2
1.2 Fructose-1,6-bisphosphate aldolases.....	3
1.2.1 Historique.....	3
1.2.2 Classification et mécanismes d'action	6
1.2.3 Distribution	9
1.2.4 Structure tridimensionnelle : un aperçu	12
1.2.5 FBP aldolases des vertébrés	15
1.3 Investigation des FBP aldolases de classe I de mammifères	16
1.3.1 Régulation de l'expression génique	16
1.3.2 Aldolase de muscle de lapin : enzyme modèle de l'aldolase A	21
1.3.3 Mécanisme catalytique détaillé.....	21
1.3.4 Substrats	27
1.3.5 Organisation du site actif	28
1.3.5.1 Lysines	31
1.3.5.2 Arginines	31
1.3.5.3 Acide aspartique.....	32
1.3.5.4 Acides glutamiques	32
1.3.5.5 Sérines	33
1.3.5.6 C-terminus.....	34

1.3.6	Interactions avec des partenaires cellulaires	35
1.3.6.1	Actine	35
1.3.6.2	Tubuline et microtubules.....	37
1.3.6.3	GLUT4	37
1.3.6.4	Échangeur d'anions « Band 3 » de l'érythrocyte	38
1.3.6.5	Phospholipase D2.....	39
1.3.6.6	WASP.....	39
1.3.6.7	SNX9.....	40
1.3.6.8	H ⁺ -ATPase vacuolaire.....	41
1.3.6.9	Autres enzymes glycolytiques.....	42
1.3.6.10	Protéines S100.....	42
1.3.6.11	ADN et ARNm.....	43
1.3.6.12	Inositols-phosphates.....	44
1.3.6.13	Importances des interactions	44
1.4	Description du projet de recherche	47
1.4.1	Objectif général	47
1.4.2	Objectifs spécifiques	48
1.4.2.1	Résidu responsable du clivage et de la condensation aldolique.....	48
1.4.2.2	Résidu responsable du transfert stéréospécifique du proton	49
1.4.2.3	Détails structuraux de l'interaction avec WASP.....	49
1.4.3	Méthodologie	50
1.4.3.1	Purification et cristallisation de l'aldolase de muscle de lapin	50
1.4.3.2	Résolution de structures par cristallographie et diffraction des rayons X	
	51	
1.4.3.3	Cinétiques de marquage isotopique	64
CHAPITRE 2	65
	Des structures cristallographiques d'intermédiaires catalytiques de l'aldolase de muscle de lapin révèlent des implications pour le clivage du substrat et la complémentarité induite.....	65
	Mise en contexte	66

Article 1. High Resolution Reaction Intermediates of Rabbit Muscle Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase: Substrate Cleavage and Induced Fit.....	67
CHAPITRE 3.....	99
Transfert de proton stéréospécifique par un catalyseur mobile chez la fructose-1,6-bisphosphate aldolase de mammifères.....	99
Mise en contexte	100
Article 2. Stereospecific Proton Transfer by a Mobile Catalyst in Mammalian Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase.....	101
CHAPITRE 4.....	129
La structure cristallographique du complexe WASP-aldolase révèle qu'une poche hydrophobe dans le site actif de l'aldolase glycolytique est responsable de l'interaction avec la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich	129
Mise en contexte	130
Article 3. A Hydrophobic Pocket in the Active Site of Glycolytic Aldolase Mediates Interactions with Wiskott-Aldrich Syndrome Protein	131
CHAPITRE 5.....	153
Discussion	153
5.1 Mécanisme de la FBP aldolase de mammifères.....	154
5.2 Rôle cellulaire potentiel de l'interaction WASP-aldolase	159
5.3 Inhibition de l'aldolase par le composé NASEP.....	163
CHAPITRE 6.....	164
Perspectives et conclusion.....	164
6.1 Perspectives.....	165
6.1.1 Mécanisme catalytique.....	165
6.1.2 Interactions avec des partenaires cellulaires	168
6.2 Conclusion	170
Bibliographie	171

Liste des tableaux

Table 1.1 Répartition des aldolases de classes I et II dans divers organismes.....	10
Table 1.2 Paramètres cinétiques de divers mutants de l'aldolase de muscle de lapin.	30
Table 2.1 Data collection and refinement statistics (article 1).....	88
Table 2.2 Conformational changes induced by ligand binding.....	89
Table 3.1 Data collection and refinement statistics (article 2).....	121
Table 3.2 Stereospecific pro(<i>S</i>) proton exchange at C3 of DHAP.	122
Table 3.3 Conformational changes induced by DHAP binding.....	122
Table 4.1 Data collection and refinement statistics (article 3).....	147

Liste des figures

Figure 1.1 Clivage du FBP par l'aldolase.....	4
Figure 1.2 La glycolyse.....	5
Figure 1.3 Mécanismes distincts de clivage du FBP par les aldolases de classes I et II.....	8
Figure 1.4 Distribution des FBP aldolases de classes I et II dans certains organismes (tirée de Thomson et al., 1998).....	11
Figure 1.5 Structure tétramérique et du site actif d'une aldolase de classe I en complexe avec son substrat FBP.....	13
Figure 1.6 Structure dimérique et du site actif d'une aldolase de classe II en complexe avec du zinc et un inhibiteur.....	14
Figure 1.7 Régulation de l'expression des isoformes de la FBP aldolase de mammifères.	20
Figure 1.8 Intermédiaires réactionnels de la condensation aldolique du DHAP et G3P par l'aldolase produisant du FBP.....	26
Figure 1.9 Site actif de l'aldolase de muscle de lapin.....	29
Figure 1.10 Interactions de l'aldolase glycolytique avec divers partenaires.....	46
Figure 1.11 Cartes de densité électronique à différentes résolutions.....	58
Figure 1.12 Méthodologie : de la cristallisation aux données finales de diffraction.....	59
Figure 1.13 Évolution du processus de cristallisation.....	60
Figure 1.14 Méthodologie : de la résolution à la déposition d'une structure cristallographique dans la <i>Protein Data Bank</i>	61
Figure 2.1 Stereo view of the active site of rabbit muscle aldolase.....	90
Figure 2.2 Electron density showing the Schiff base intermediate trapped in the active site of rabbit muscle aldolase.....	91
Figure 2.3 MBP bound in the rabbit muscle aldolase active site.....	92
Figure 2.4 Acyclic form of FBP docked in the active site and superposition with MBP bound structure.....	93
Figure 2.5 Binding by (4S)-TBP in the rabbit muscle aldolase active site.....	94
Figure 2.6 Conformational changes induced upon substrate binding.....	95
Figure 2.7 Active site changes induced by ligand binding in rabbit muscle aldolase.....	96

Figure 2.8 Superposition of Schiff base intermediates from diverse class I aldolases.	97
Figure 3.1 Electron density showing the enamine intermediate trapped in the active site of rabbit muscle aldolase.	123
Figure 3.2 Discrimination of enzymatic intermediates formed with DHAP in aldolase active site.	124
Figure 3.3 Active site attachment by the phosphate anion at the DHAP P1 binding locus recruits its proper C-terminal region.	125
Figure 3.4 C terminus binding upon iminium formation in the active site of a subunit of the K146M mutant aldolase.	126
Figure 3.5 Interactions made by the C-terminal region in the active site of muscle aldolase.	127
Figure 3.6 Proposed mechanism for stereospecific proton transfer with conservation of reaction chirality.	128
Figure 4.1 WASP peptide bound to the rabbit muscle aldolase active site.	148
Figure 4.2 Naphthol AS-E phosphate inhibitor bound to the active site of aldolase.	149
Figure 4.3 WASP and the naphthol AS-E phosphate aldolase inhibitor utilize a unique hydrophobic binding site.	150
Figure 4.4 WASP competes with the aldolase substrate and C terminus in binding to aldolase active site vicinity.	151
Figure 4.5 The WASP binding mode is compatible with the interaction of WASP homologues with aldolase.	152
Figure 5.1 Mécanisme catalytique proposé de la condensation aldolique chez la FBP aldolase de mammifères.	158
Figure 5.2 Rôle cellulaire potentiel de l'interaction WASP-aldolase.	162

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
Ala	Alanine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Arp2/3	<i>Actin related protein 2 and 3</i>
Asp	Acide aspartique (Aspartate)
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BD3	Échangeur d'anions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de l'érythrocyte (« <i>Band 3</i> »)
C	Cytosine
C-terminal	Carboxy-terminal
Cys	Cystéine
DHAP	Dihydroxyacétone-phosphate
Dyn2	<i>Dynamine-2</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
F-actine	Filaments d'actine
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
F1P	Fructose-1-phosphate
G	Guanine
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G-actine	Actine monomérique
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBP	Glucitol-1,6-bisphosphate
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique (Glutamate)
GLUT4	Transporteur de glucose 4

HBP	Hexitol-1,6-bisphosphate
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
I-P	Inositol-phosphate
K	Kelvin
k_{cat}	Constante catalytique (cycles catalytiques/unité de temps)
kDa	kilo Dalton
K_i	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis
Lys	Lysine
MAD	<i>Multiple-wavelength Anomalous Dispersion</i>
MBP	Mannitol-1,6-bisphosphate
Met	Méthionine
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
mg	Milligramme
MG	Méthylglyoxal
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
μ M	Micromolaire
NASEP	Naphthol AS-E phosphate
N-terminal	Amino-terminal (NH ₂ -terminal)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P_i	Phosphate inorganique (HPO ₄ ²⁻)
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate
PLD2	Phospholipase D2
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Ser	Sérine
SNX9	<i>Sorting nexin 9</i>
T	Thymine
TBP	Tagatose-1,6-bisphosphate
TIM	Triose-phosphate isomérase

Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
U	Unité d'activité enzymatique (μmol substrat transformé/min)
V-ATPase	H ⁺ -ATPase vacuolaire
WASP	Protéine du syndrome Wiskott-Aldrich

À ma Famille et mon Ange gardien .

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Dr Jurgen Sygusch pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, en 2001. Il a toujours été très disponible pour prendre le temps nécessaire et discuter de mes recherches. Il m'a appris que pour qu'un raisonnement scientifique soit valable, il doit pouvoir répondre à toutes les questions (ou presque!). Il est facile d'énoncer les grandes lignes d'une idée; mais il m'a montré que les détails sont tout aussi importants, et c'est souvent grâce à eux qu'on peut progresser.

J'ai côtoyé plusieurs personnes que j'aimerais remercier pour leur passage dans ma vie de doctorant. En premier lieu, mon mentor, Christine Munger, celle qui m'a tout appris de l'aldolase à mes débuts au laboratoire. Aussi présents à mes débuts, ceux qui m'ont initié aux mythiques voyages au synchrotron de Brookhaven : Julie Allard (finalement, c'est quoi l'explication du film *Swordfish*?), Louis-David Boudrias (BNL road song : *Diggin' A Hole - Big Sugar*) et Tae-Sung (« how do you pronounce *farfadet* in French? »). Ces personnes ont quitté le laboratoire après mon arrivée, et plusieurs autres leur ont succédé. En ordre que je vous ai connus et côtoyés au laboratoire: Brigitte L., Julien L.-V. (Où ça? Haa, là? Los Alamos!), Katia A., Laurent C., Darrel D., Maxime P., Philippe R., Charles D. (un p'tit badminton?), Shadi S., Angie R. (Das Blau von Coomassie befleckt!), Mélanie B., Clotilde «sans H» L. K., Mathieu C. (merci pour la découverte de PyMOL et tes opinions flamboyantes!), JF M., Guillaume A.-C., Annie D., Philippe D. À toutes ces personnes que j'ai connues dans le cadre professionnel, merci; si je suis rendu où je suis, vous y avez nécessairement contribué. Je voudrais aussi spécialement remercier mes deux amis du bac, et colocataires de la rue Kent, Jean-François M. et Pierre-Luc T. Ces nombreuses discussions sur le présent, le futur, et le passé, m'ont été nécessaires pour passer au travers de ces années parfois difficiles. PL, finalement, nous avons eu tort tous les deux à propos de qui va faire ou ne pas faire un Ph.D.! Et il en est où ce projet d'ordre des biochimistes? JF, là où tu es présentement, il n'y a pas personne en arrière de toi (ouf!), ils sont tous devant! Et prends garde aux goûts des *jolis bûcherons* pour les jeunes gens de la ville, on ne sait jamais! Merci les boys. Un remerciement spécial à Nicolas C. pour sa

camaraderie et ses bonnes recettes, ce toulousain maintenant au Québec, que j'ai connu lors d'un voyage à l'Université Paul Sabatier (en espérant que tu mangeras longtemps des sushis *made in Québec* et du *smoke meat!*). Merci aussi au Dr Casimir Blonski et son équipe de l'Université Paul Sabatier pour m'avoir accueilli lors d'un échange.

Finalement, le plus important, je ne peux passer sous le silence les gens de mon entourage familial, qui m'ont soutenu, remonté le moral et montré qu'on devait savoir décrocher de temps à autre (bien que difficile!). Mes parents, Monique et André, qui m'ont toujours aidé dans mes études, félicité pour mes efforts et encouragé à poursuivre. Merci aussi pour votre hospitalité au Baskatong; que de ressourcements en ces lieux coupés du monde! Bien que j'aie dû délaissier à regrets ma région natale lauriermontoise depuis plusieurs années déjà, l'esprit de la Montagne du Diable ne m'a jamais vraiment quitté. Mes soeurs, Amélie et Catherine, ces deux professionnelles de la santé, avec qui j'ai souvent discuté du fossé, heureusement pas sans fond, existant entre les sciences fondamentales et l'état de santé d'un patient. Ce faisant, j'ai pu garder en tête que la science, paraissant souvent diffuse et abstraite, est une nécessité à laquelle j'ai contribué de mon mieux. Enfin, ma compagne, Julie, d'une compréhension inimaginable, avec son moral positif à toutes épreuves, son sourire communicatif, grâce à qui ces années de dur labeur ont été d'autant plus agréables et qui m'a permis de persévérer. L'accueil chaleureux de sa famille fut également très apprécié, particulièrement la grande générosité de Lise, en ces années de vache maigre estudiantine! Merci à tous.

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 La découverte des enzymes

Dans le processus de la démarche scientifique, l'observation fait souvent office de première étape. Le domaine de l'enzymologie n'échappe pas à ce constat. Au XVIII^e siècle, René Antoine Ferchault de Réaumur observa que les sécrétions d'estomacs d'oiseaux pouvaient digérer les viandes (de Réaumur, 1752). Cette étude parmi d'autres sur l'investigation de la digestion des aliments permit de noter à maintes reprises l'action des enzymes, sans pour autant qu'on sache à cette époque quelle en était la nature réelle (Williams, 1904). Ensuite, au XIX^e siècle, les recherches ont montré que les principes actifs capables de modifier certains composés pouvaient être isolés, de la levure par exemple, et conserver leurs propriétés. D'importantes avancées en ce sens proviennent de travaux de chercheurs comme Louis Pasteur, Wilhelm Kühne, Theodor Schwann et Eduard Buchner. En 1878, Kühne proposa d'utiliser le terme « enzyme », venant du grecque « ενζυμον » signifiant « dans le levain ». En 1897, Buchner démontra clairement que l'activité de fermentation alcoolique des levures pouvait être isolée des levures vivantes (Buchner, 1897). Il nomma cette enzyme « zymase ». Évidemment, nous savons aujourd'hui qu'il s'agissait en fait d'un mélange de plusieurs enzymes différentes que Buchner observait dans ses expériences de fermentation de divers sucres. À cette époque, on ignorait encore que les enzymes étaient des protéines, même si on savait qu'une activité enzymatique était toujours associée à une protéine. En 1894, Emil Fischer apporta une contribution majeure à l'enzymologie avec son travail sur la spécificité de l'activité enzymatique envers les sucres (Fischer, 1894). Ceci donna naissance au concept novateur de « serrure et clé » en parlant d'une enzyme et son substrat, une métaphore utilisée par Fischer à l'époque et qui est encore enseignée aujourd'hui comme élément de base en enzymologie. En 1926, James Sumner isola et cristallisa la première enzyme pure, l'uréase, en plus de mettre en évidence qu'il s'agissait d'une protéine (Sumner, 1926). Les décennies qui suivirent furent très riches en isolation et caractérisation d'enzymes; l'enzymologie était née.

1.2 Fructose-1,6-bisphosphate aldolases

1.2.1 Historique

Au début du XXe siècle, de nombreuses études portaient sur la transformation de divers sucres par des enzymes. Entre autres, Otto Meyerhof, un pionnier du métabolisme intermédiaire, travaillait sur des enzymes ayant comme substrats des sucres phosphorylés. En 1934, il nomma « zymohehexase » l'enzyme ayant la propriété de cliver certains hexoses-bisphosphates (Meyerhof et Lohmann, 1934). Il découvrit plus tard que l'activité de cette zymohehexase pouvait être divisée en deux activités distinctes; l'aldolase et l'isomérase étaient identifiées pour la première fois (Meyerhof et al., 1936). La fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolase (EC 4.1.2.13) clive le FBP en deux trioses, soient le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) (Figure 1.1). L'aldolase peut également catalyser la formation du FBP à partir du DHAP et G3P. La triose-phosphate isomérase (TIM) catalyse l'interconversion entre le DHAP et le G3P. La capacité de l'aldolase à catalyser le clivage où la formation d'un lien carbone-carbone allait créer un intérêt marqué pour cette enzyme, située à la jonction des branches hexose et triose de la glycolyse (Figure 1.2). Durant les décennies qui suivirent, les études se multiplièrent sur l'investigation du mécanisme de cette enzyme, son isolation à partir de différentes sources, sa composition en acides aminés et sa structure tridimensionnelle.

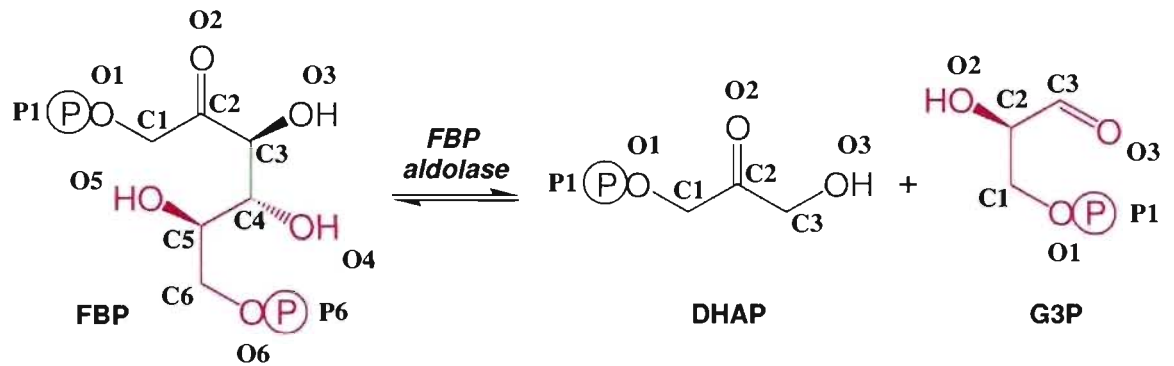


Figure 1.1 Clivage du FBP par l'aldolase.

La numérotation des atomes utilisée dans le texte a été incluse. Notons le changement de numérotation des atomes du G3P lorsqu'il fait partie du FBP. Le «P» encerclé représente un groupement phosphate ($-\text{PO}_3^{2-}$).

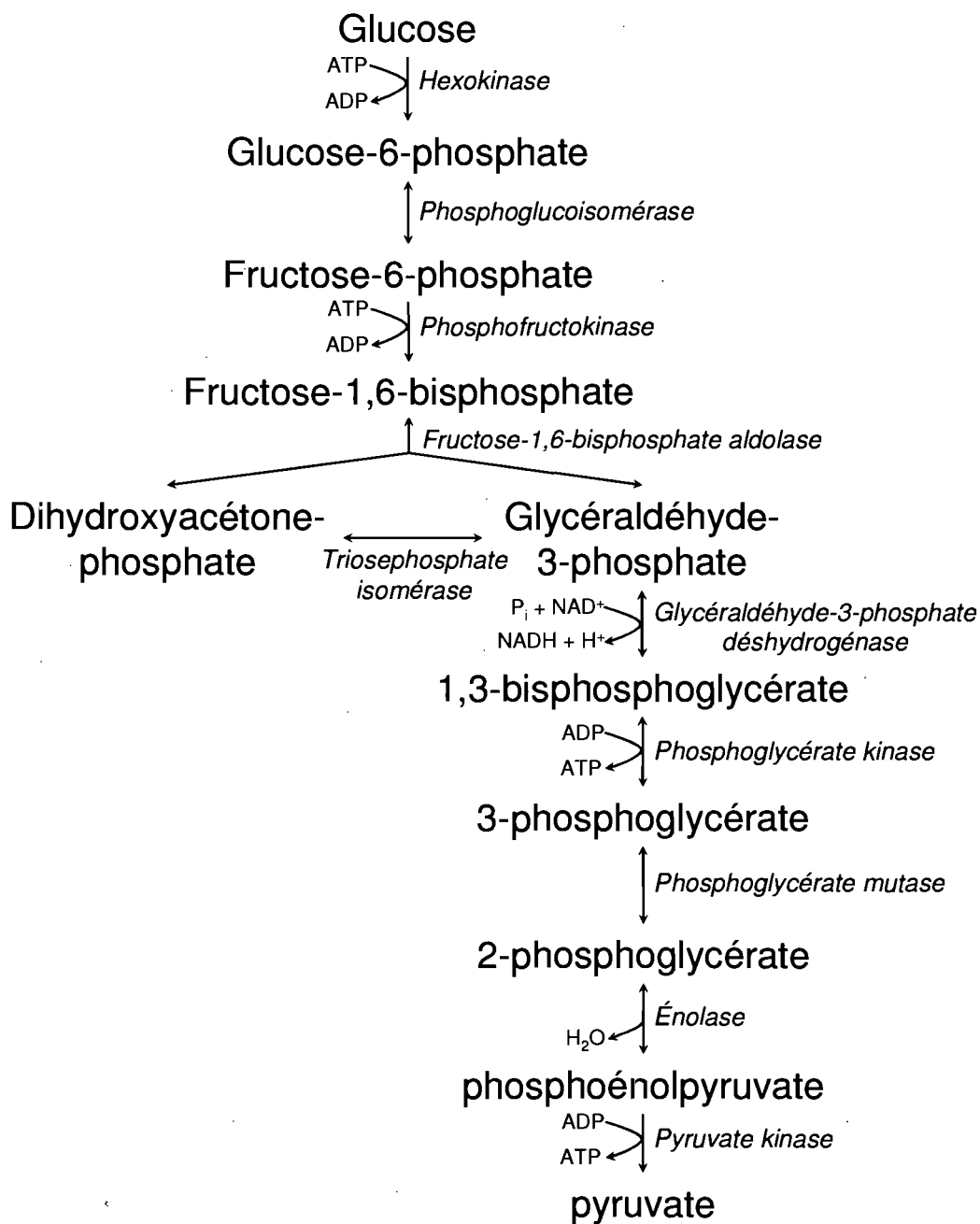


Figure 1.2 La glycolyse.

Schéma illustrant les réactions enzymatiques de la glycolyse ainsi que les substrats et produits utilisés et générés. Notons le bilan net de la glycolyse pour chaque molécule de glucose utilisée: 2 NADH, 2 pyruvates et 2 ATP.

1.2.2 Classification et mécanismes d'action

Suite aux travaux de Meyerhof et ses collègues, et avec les techniques d'isolation et de purification qui se raffinaient, l'étude de FBP aldolases provenant de différentes sources allait rapidement mener à la classification de ces enzymes. En effet, on a constaté que les FBP aldolases pouvaient être divisées en deux classes (Rutter, 1964). Le critère à la base de cette classification est la distinction marquée de leur mécanisme catalytique respectif. D'une part, les FBP aldolases de classe I utilisent la formation d'intermédiaires covalents avec leurs substrats pour catalyser la réaction. Ce mécanisme implique la formation d'un intermédiaire de type iminium, souvent nommé base de Schiff dans la littérature (protonée ou non), qui peut être réduit en présence de NaBH_4 . D'autre part, les FBP aldolases de classe II ne créent pas de lien covalent avec leurs substrats; elles utilisent plutôt un cation métallique divalent comme cofacteur. Cette particularité leur confère souvent l'appellation de métallo-aldolases. Cette classe d'aldolases est donc fortement inhibée par la présence d'un agent chélateur (Rutter, 1964), comme l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), ce qui n'est pas observé chez les aldolases de classe I. En revanche, elles sont insensibles à l'inactivation par la réduction au NaBH_4 . Ainsi, lorsqu'une nouvelle FBP aldolase est isolée, la vérification de l'effet d'un agent chélateur et du NaBH_4 permet de déterminer s'il s'agit d'une aldolase de classe I ou II.

Le clivage du FBP par les deux classes d'aldolases s'effectue selon des mécanismes distincts, faisant intervenir des intermédiaires réactionnels différents (Figure 1.3). Néanmoins, un point commun existe dans leur mécanisme : l'accroissement du caractère électrophile du C2 du FBP (carbone du groupement cétone du FBP acyclique ou du DHAP). Le but de cette stratégie enzymatique est de faciliter l'abstraction du proton du FBP O4, menant au clivage du lien carbone-carbone C3-C4 du FBP, ou comme nous le verrons plus loin, pour faciliter le transfert du proton pro(S) du DHAP C3. Un C2 plus électrophile favorisera la formation de la double liaison C2-C3 de l'énamine et l'énédiolate, créés lors du clivage du lien C3-C4 du FBP. Chez les aldolases de classe I, suite à une

attaque nucléophile initiale, la fonction ϵ -amine d'une lysine du site actif forme un intermédiaire covalent de type iminium avec le substrat, soit le FBP acyclique ou le DHAP (Grazi et al., 1962a). Chez les aldolases de classe II, un cation métallique divalent, souvent un atome de zinc, polarise le groupement carbonyle du FBP ou du DHAP (Creighton, 1990). Dans les deux classes d'aldolases, le C2 voit son caractère électrophile augmenté.

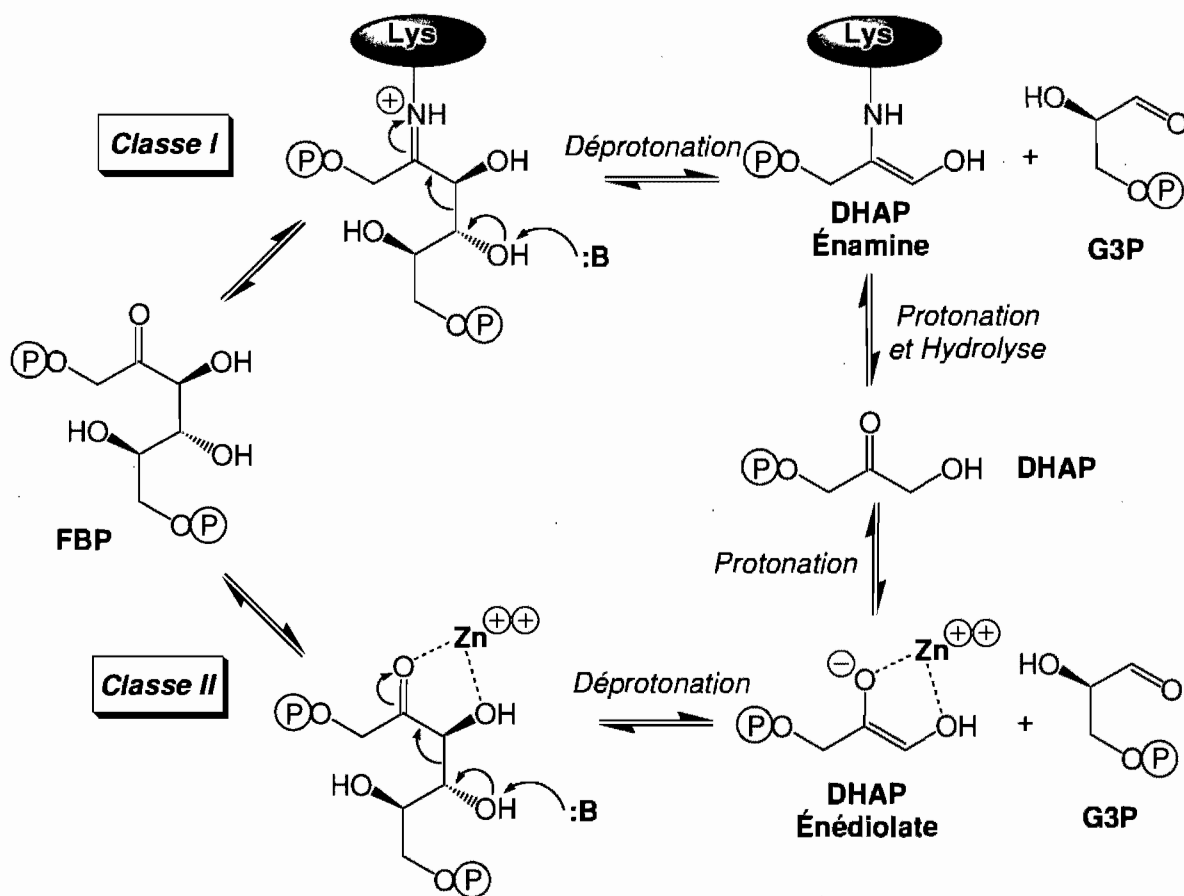


Figure 1.3 Mécanismes distincts de clivage du FBP par les aldolases de classes I et II.

1.2.3 Distribution

Malgré la différence marquée dans leur mécanisme d'action, les deux classes de FBP aldolases catalysent une réaction identique. Ceci supporte donc l'idée que leur séparation s'est effectuée tôt dans l'évolution et qu'elles ont évolué indépendamment (Marsh et Lebherz, 1992). La FBP aldolase est une enzyme ubiquitaire, présente chez tous les organismes vivants. En général, les organismes n'expriment qu'une seule des deux classes d'aldolases. Les aldolases de classes I et II sont retrouvées principalement chez les eucaryotes et les procaryotes, respectivement. Cependant, la découverte d'aldolases de classe I chez des organismes plus primitifs a forcé la communauté scientifique à repenser la phylogénie *a priori* plutôt simple qu'on imaginait chez les FBP aldolases. Ainsi, d'importantes nuances ont été apportées. Des exemples de distribution dans divers organismes sont illustrés au Table 1.1 et à la Figure 1.4 (tirée de Thomson et al., 1998). Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez *Escherichia coli*, un des rares organismes possédant les deux classes, les aldolases de classes I et II sont simultanément exprimées quand la bactérie croît dans un milieu contenant du pyruvate ou du lactate comme source de carbone, tandis qu'en présence de glucose, seulement la classe II est exprimée. Il apparaît donc que la classe I est exprimée dans des conditions nécessitant l'emploi de la gluconéogenèse pour assurer la survie de la bactérie (Stribling et Perham, 1973).

Table 1.1 Répartition des aldolases de classes I et II dans divers organismes.

	Aldolases	Organismes	Références
Archéobactéries	Classe I	<i>Halobacterium saccharovorum</i> , R-113, <i>vallismortis</i> et <i>CH-1</i> <i>Thermoproteus tenax</i> <i>Pyrococcus furiosus</i>	Siebers et al., 2001
	Classe II	<i>Halobacterium halobium</i> , <i>salinarium</i> , <i>cutirubrum</i> , <i>mediterranei</i> et <i>volcanii</i>	Altekar et Dhar, 1988
Eubactéries	Classe I	<i>Micrococcus aerogenes</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	Lebherz et Rutter, 1973 Bai et al., 1975 Götz et al., 1980 Witke et Götz, 1993
	Classe II	Majorité des bactéries	Marsh et Lebherz, 1992
	Classes I et II	<i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Stribling et Perham, 1973
			London, 1974
Eucaryotes	Classe I	Animaux, plantes supérieures <i>Galdieria sulphuraria</i> <i>Chara foetida</i> <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Trypanosoma brucei</i>	Schnarrenberger et al., 1983 Gross et al., 1999 Jacobshagen et Schnarrenberger, 1988 Certa et al., 1988 Misset et Opperdoes, 1984
		Classe II	Levures, mycètes <i>Giardia lamblia</i>
	Classes I et II	<i>Euglena gracilis</i>	Plaumann et al., 1997

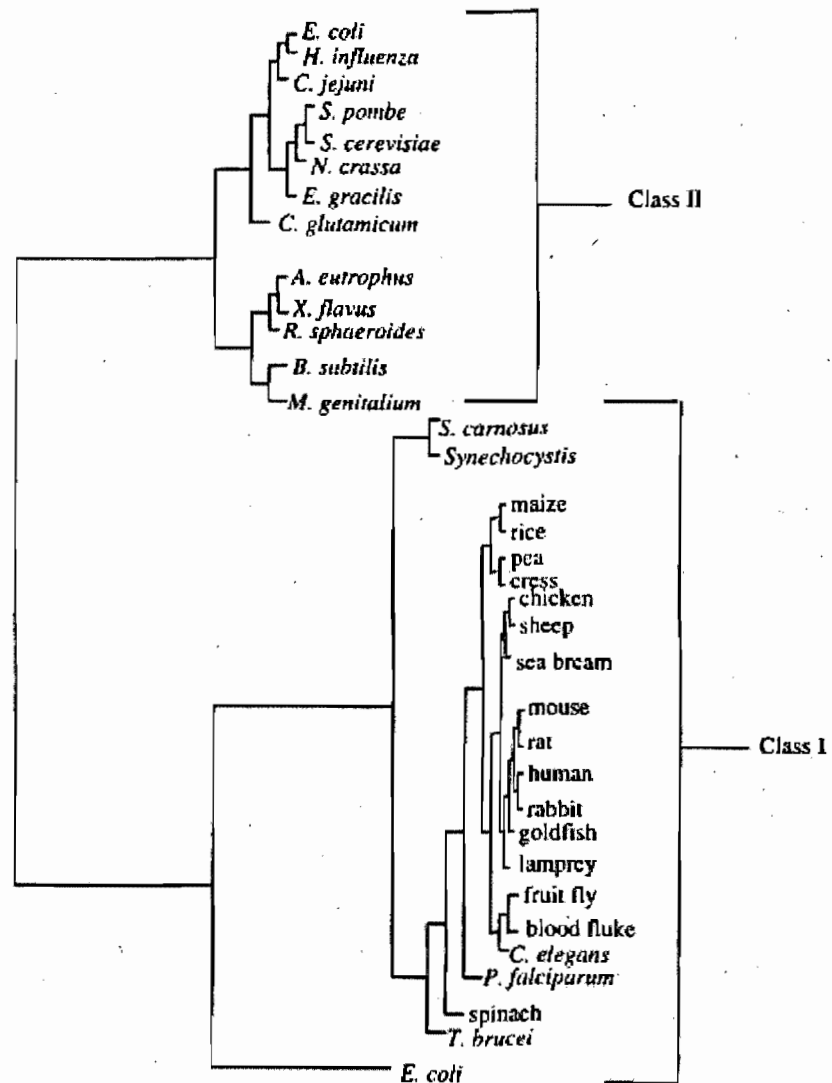


Figure 1.4 Distribution des FBP aldolases de classes I et II dans certains organismes (tirée de Thomson et al., 1998).

1.2.4 Structure tridimensionnelle : un aperçu

Bien que les aldolases de classes I et II catalysent la même réaction, leurs structures sont différentes (Figure 1.5 et Figure 1.6) et leurs séquences primaires n'ont qu'entre 17 et 20% de similitude (Marsh et Lebherz, 1992). Généralement, les aldolases de classe I sont des homotétramères d'environ 158 kDa tandis que les aldolases de classe II sont des homodimères d'environ 78 kDa, de sorte que le poids comparatif des sous-unités est relativement le même chez les deux classes (~39 kDa). Cependant, chez certaines espèces de procaryotes, les aldolases de classe I possèdent des sous-unités de poids variant entre 27 et 40 kDa et montrent un état oligomérique allant du monomère au décimère (Thomson et al., 1998). Malgré les distinctions biochimiques et phylogéniques significatives entre les aldolases de classes I et II, le repliement de type tonneau (α/β)₈, grandement répandu dans les protéines de structures connues (Wierenga, 2001), est la plateforme de base des sous-unités des deux classes. Dans tous les cas, chaque sous-unité formant un tonneau (α/β)₈ possède un site actif. Cependant, l'architecture des sites actifs des deux classes est bien distincte. En effet, le site actif des aldolases de classe I est enfoui au centre du tonneau, qui est recouvert à l'une de ses extrémités par une hélice α (Sygusch et al., 1987) (Figure 1.5). Chez les aldolases de classe II, le site actif se trouve à l'ouverture du tonneau, à l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) des brins β (Blom et al., 1996; Cooper et al., 1996) (Figure 1.6).

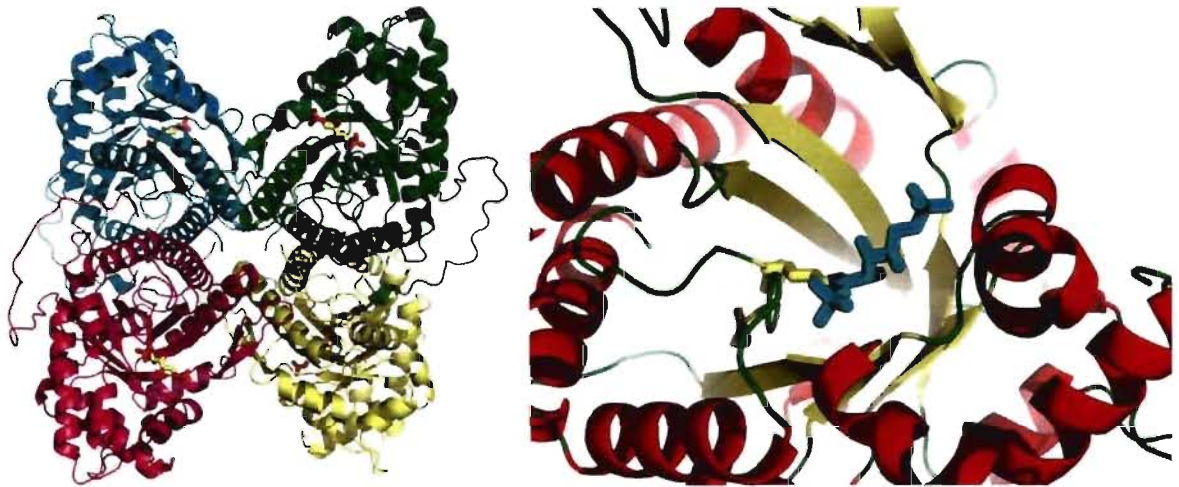


Figure 1.5 Structure tétramérique et du site actif d'une aldolase de classe I en complexe avec son substrat FBP.

La structure représentée est celle de la FBP aldolase de muscle de lapin en complexe covalent avec le FBP (PDB # 1ZAI) (St-Jean et al., 2005). À gauche, les 4 sous-unités sont disposées avec une symétrie 222, formant l'homotétramère. À droite, le site actif coïncide avec la localisation du FBP (*cyan*) lié de façon covalente à une lysine et se situe au centre vertical du tonneau (α/β)₈, dans chaque sous-unité.

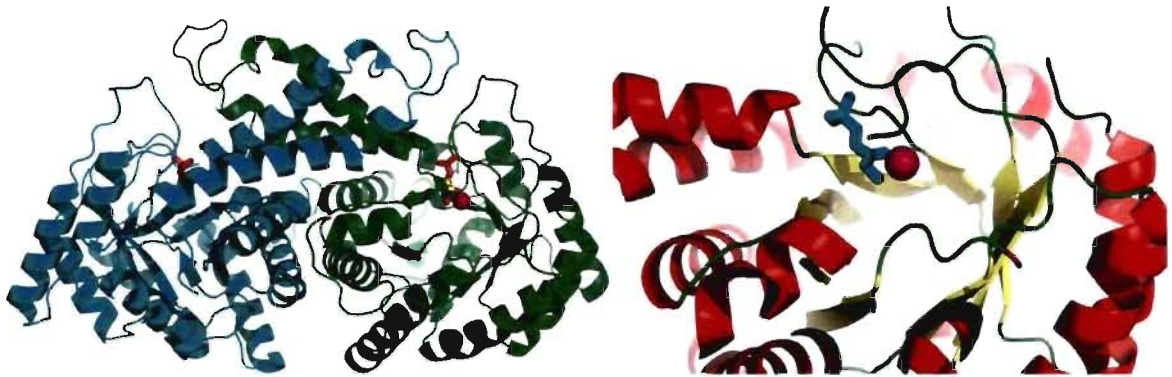


Figure 1.6 Structure dimérique et du site actif d'une aldolase de classe II en complexe avec du zinc et un inhibiteur.

La structure représentée est celle de la FBP aldolase de classe II de *Escherichia coli* en complexe avec du zinc et un inhibiteur, le phosphoglycolohydroxamate, un analogue du DHAP (PDB # 1B57) (Hall et al., 1999). À gauche, l'organisation des 2 sous-unités formant l'homodimère. À droite, l'inhibiteur (*cyan*) et l'atome de zinc (*magenta*) dans le site actif, localisé à l'extrémité C-terminale des brins β du tonneau $(\alpha/\beta)_8$, dans chaque sous-unité.

1.2.5 FBP aldolases des vertébrés

Les FBP aldolases de classe I des vertébrés sont subdivisées en trois isoformes : A, B et C. Chaque isoforme est exprimée dans différents tissus (Penhoet et al., 1966; Baron et al., 1995). On parle alors d'isoformes tissus-spécifiques. La majorité des premières recherches portant sur les FBP aldolases de vertébrés ont été effectuées sur les aldolases isolées de lapin. L'aldolase A est exprimée majoritairement dans les muscles squelettiques et les globules rouges, l'aldolase B dans le foie, les reins et le petit intestin, et l'aldolase C dans le tissu neuronal et les muscles lisses. Ces différents patrons d'expression tissulaire s'accompagnent également de différences au niveau de la réactivité immunologique et des propriétés enzymatiques des trois isoformes. En effet, il est possible de préparer des anticorps spécifiques pour chacune des trois isoformes, ne montrant aucune immunoréactivité croisée (Penhoet et al., 1969). Par ailleurs, en plus du FBP, les FBP aldolases peuvent utiliser le fructose-1-phosphate (F1P) comme substrat (Kaletta-Gmünder et al., 1957). Les propriétés cinétiques des trois isoformes envers le FBP et le F1P révèlent des différences qui permettent de les distinguer (Penhoet et al., 1969; Penhoet et Rutter, 1971). L'aldolase A possède une activité spécifique de clivage du FBP de 18 U/mg et un K_M de 3 μ M, un ratio de vitesse de clivage FBP/F1P de 50 et un K_M de 5 mM pour le F1P. L'aldolase B possède une activité spécifique de clivage du FBP de 2 U/mg et un K_M de 1 μ M, un ratio de clivage FBP/F1P de 1 et un K_M de 0.3 mM pour le F1P. L'aldolase C possède une activité spécifique de clivage du FBP de 6 U/mg et un K_M de 2 μ M, un ratio de clivage FBP/F1P de 10 et un K_M de 4 mM pour le F1P. Donc on constate qu'il existe une différence marquée dans le ratio de clivage FBP/F1P entre les trois isoformes, surtout entre les aldolases A et B. Ceci pourrait être associé au fait que dans le métabolisme du fructose dans le foie, l'aldolase B joue un rôle central (Heinz et al., 1968). En effet, afin que le fructose accède au métabolisme du glucose, il doit obligatoirement être clivé par l'aldolase B, après avoir été préalablement phosphorylé par la kétohexokinase. De plus, si on compare les séquences primaires des trois isoformes du lapin avec BLAST (matrice BLOSUM62), on obtient 71% d'identité entre A et B, 67% entre C et B, et 93% entre A et C. Cette démonstration d'identité est cohérente avec les similitudes et différences des paramètres

cinétiques, c'est-à-dire que l'aldolase B se distingue de A et C, qui se ressemblent davantage. La variabilité la plus marquée entre les trois isoformes est localisée dans la partie C-terminale des aldolases, correspondant approximativement aux 20 derniers acides aminés. Il a été montré que la création d'aldolases chimériques, résultant de l'échange des C-termini entre les isoformes, module les paramètres cinétiques des aldolases (Berthiaume et al., 1993). Quant aux résidus du site actif, ils sont totalement conservés dans les trois isoformes.

1.3 Investigation des FBP aldolases de classe I de mammifères

1.3.1 Régulation de l'expression génique

L'expression de l'aldolase A humaine est sous le contrôle de trois promoteurs en tandem : P_H (« *Housekeeping* », proximal), P_M (« *Muscle* », médian) et P_N (« *Non specific* », distal), (Maire et al., 1987) (Figure 1.7). La séquence codante des transcrits est la même, mais la séquence de l'extrémité 5' non codante est distincte et spécifique à chaque promoteur, résultant en des transcrits qui sont différents (Izzo et al., 1988). Les trois promoteurs sont regroupés dans une courte région de 1600 paires de bases en amont du gène, suggérant qu'ils pourraient partager des éléments de régulation transcriptionnelle. Contrairement aux promoteurs P_H et P_N qui semblent être ubiquitaires, le promoteur P_M est hautement spécifique aux muscles squelettiques. Aussi, le promoteur P_N serait constitué de deux régions distinctes, N1 et N2. Il est intéressant de noter que le promoteur P_N n'a cependant pas été détecté chez l'aldolase A de souris (Stauffer et al., 1990). Une étude sur l'activité des deux promoteurs ubiquitaires P_H et P_N a révélé qu'elle dépendait d'un élément activateur *cis* fort et ubiquitaire, situé immédiatement en amont de P_H, mais en aval de P_N et P_M (Concordet et al., 1991). Par ailleurs, une analyse d'empreintes (« *footprint* ») a permis de conclure que cet élément activateur contiendrait entre autres des motifs de types Sp1 et AP1. Aussi, un second élément activateur a été découvert, uniquement dans le muscle

squelettique rapide, qui permettrait la transcription à partir spécifiquement des promoteurs P_N et P_M (Concordet et al., 1993). Il existe également une régulation répressive de la transcription de l'aldolase A humaine, causée par l'action d'un facteur de type Krüppel à doigt de zinc, ZNF224, qui lie une région située en amont du promoteur P_N nommée l'élément de régulation négative (Costanzo et al., 1993; Medugno et al., 2003). La liaison de ZNF224 est diminuée lorsqu'il est phosphorylé par la protéine kinase C (Costanzo et al., 1999) et son activité de répression dépend de son interaction avec un co-répresseur, KAP-1 (« KRAB (*Krüppel associated box*) *associated protein 1* ») (Medugno et al., 2005). Notons que dans les années 1990s, l'appellation des promoteurs P_H et P_N s'est modifiée pour devenir F et L, respectivement. Finalement, il a été découvert que l'expression de l'aldolase A pouvait être induite par le facteur de transcription *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) (Semenza et al., 1994). En effet, dans un milieu pauvre en oxygène, il y a induction par HIF-1 α de l'expression de l'aldolase A. Le site de liaison de HIF-1 α serait situé dans le promoteur P_H (Semenza et al., 1996). Cette régulation est importante, car généralement les cellules cancéreuses démontrent des niveaux de glycolyse aérobie anormalement élevés et ceci serait dû à l'action de HIF-1 α , même à un niveau normal d'oxygène. L'accumulation de HIF-1 α serait soutenue par l'action du pyruvate et du lactate sur le métabolisme de HIF-1 α (Lu et al., 2002). Il existe donc un lien entre HIF-1 α et la glycolyse, même en normoxie. Ces événements ne sont pas étrangers à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse, phénomène décrit par l'hypothèse de Warburg stipulant que le ratio glycolyse/respiration s'accroît dans les cellules cancéreuses (Warburg, 1956). Aussi, dans le cas des tumeurs cancéreuses solides, un environnement hypoxique est créé, propice donc à l'augmentation de l'expression de l'aldolase A par l'action de HIF-1 α .

Dans le cas de l'aldolase B, spécifiquement exprimée dans le foie, les reins et le petit intestin, la majorité du travail a été effectuée sur l'aldolase B de rat. En amont du gène, on retrouve un promoteur proximal faible et un élément activateur (Gregori et al., 1991) (Figure 1.7). Le promoteur, spécifique à l'aldolase B, est composé de cinq régions distinctes, responsables de la régulation, positive ou négative, de son activité (Gregori et al., 1993). La région la plus distale du promoteur agirait comme un élément négatif lié par des effecteurs inconnus jusqu'à maintenant. Une boîte CCAAT constituerait un second élément

négatif du promoteur, lié par le répresseur CBF (« *CCAAT box binding factor* »). Comme éléments positifs composants le promoteur, on retrouve des sites de liaison pour C/EBD (« *CAAT/enhancer binding protein* ») et DBP (« *alumin D-element binding protein* ») et également une région composée de deux sites mutuellement exclusifs pour HNF-1 et HNF-3 (« *hepatic nuclear factor* »). En fait, il a été montré que HNF-3 agirait plutôt comme un répresseur de la transcription, capable de bloquer l'action positive de HNF-1 sur la transcription. Pour ce qui est de l'élément activateur intronique distal situé en aval du promoteur, très spécifique pour l'aldolase B, il s'étend sur 400 paires de bases et est composé de deux domaines principaux (Gregori et al., 1998). Chacun des domaines comportent plusieurs régions distinctes, deux de ces régions liant chacune un facteur HNF-1 et une autre liant le facteur HNF-4 (Gregori et al., 2002). La perturbation de ces régions abolit la transcription de l'aldolase B. La délétion de la région liant C/EBD du promoteur abolit également l'action de l'élément activateur. D'un point de vue plus physiologique, la transcription de l'aldolase B dans le foie est inhibée par le jeûne et induite par une diète riche en glucides seulement en présence de cortisone et d'hormones thyroïdiennes. En présence de glucagon et d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), une diminution importante de la transcription est observée. Dans les reins, seule la présence des glucides induit la transcription, les hormones n'ayant pas d'effet. La transcription de l'aldolase B dans le petit intestin montre une réponse intermédiaire à la présence d'hormones (Munnich et al., 1985).

Dans le cas de l'aldolase C, les études ont été effectuées en majorité chez l'humain et le rat. Le promoteur du gène de l'aldolase C humaine comporte quatre régions importantes: A, B et C qui sont proximales et D qui est distale (Buono et al., 1993) (Figure 1.7). Les régions proximales sont hautement homologues entre le rat et l'humain, ce qui n'est pas le cas pour la région D distale du promoteur (Thomas et al., 1993; Skala et al., 1998). La région D peut être liée par un effecteur transcriptionnel, NGFI-B (« *nerve growth factor-induced B-factor* »), un membre de la famille des récepteurs nucléaires de types thyroïde/stéroïde/rétinoïde (Buono et al., 1997). Par ailleurs, l'expression de NGFI-B augmente de façon importante en présence d'AMPc, ce qui indirectement fait également augmenter l'expression de l'aldolase C par l'intermédiaire de l'interaction de NGFI-B avec

la région D du promoteur (Buono et al., 2002). Il a ensuite été découvert que la région D du promoteur s'étendait davantage en amont, sur environ 1000 paires de bases. Le promoteur complet de l'aldolase C humaine s'étend donc sur environ 1200 paires de bases (Buono et al., 2004). Trois sites potentiels de liaison par des effecteurs ont été identifiés dans la région D, en plus de celui ciblé par NGFI-B. Ces sites sont un motif CAAT, une région riche en AT et une région riche en GC. Cependant, bien qu'on en connaisse davantage sur la région promotrice de l'aldolase C humaine, les facteurs de transcription qui sont responsables de la spécificité tissulaire de son expression demeurent inconnus. Finalement, il a été observé que HIF-1 α , et non HIF-1 β , peut induire l'expression de l'aldolase C en milieu hypoxique (Hu et al., 2003). L'élément reconnu par HIF-1 α dans le promoteur de l'aldolase C chevaucherait en partie la région proximale du promoteur (Jean et al., 2006).

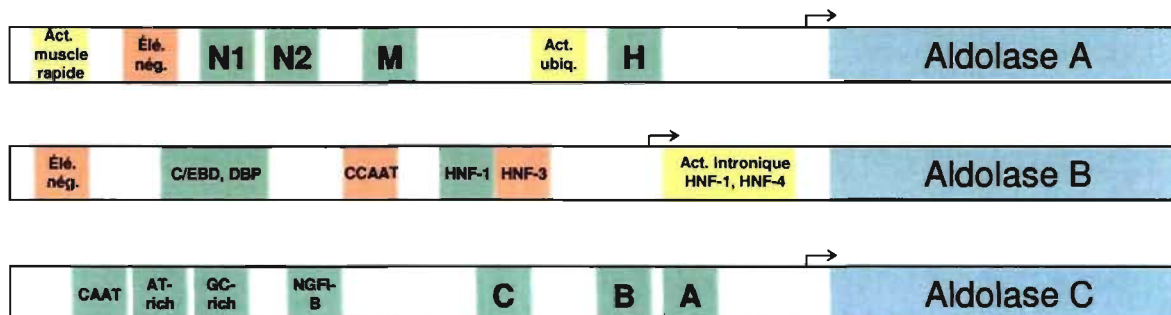


Figure 1.7 Régulation de l'expression des isoformes de la FBP aldolase de mammifères.

Cette représentation schématique illustre que l'expression génique tissu-spécifique des isoformes A, B et C de la FBP aldolase de mammifères est sous le contrôle de différentes régions promotrices (*vert*), activatrices (*jaune*) et inhibitrices (*beige*). Voir le texte pour la description détaillée de chacune des régions.

1.3.2 Aldolase de muscle de lapin : enzyme modèle de l'aldolase A

L'étude des FBP aldolases de classe I a débuté avec les travaux de Meyerhof lorsqu'il identifia cette enzyme pour la première fois en 1936. À cette époque, étudier une enzyme signifiait être capable d'obtenir à partir de l'organisme source une quantité importante de la protéine. En effet, les techniques d'analyse moins raffinées qu'aujourd'hui forçaient l'utilisation d'une quantité beaucoup plus grande d'enzyme. L'aldolase de muscle de lapin, celle isolée par Meyerhof initialement, s'avéra un excellent choix car cette enzyme constitue environ 5% de l'ensemble des protéines solubles du muscle de lapin (Taylor et al., 1948; Maughan et al., 2005). Aussi, on n'avait pas à craindre une pénurie de la ressource, facilement accessible. Ainsi, cette enzyme sera utilisée durant des décennies comme modèle des FBP aldolases de classe I. Évidemment, de nos jours, les méthodes de surexpression de protéines recombinantes dans des systèmes bactériens ont été appliquées à l'étude de l'aldolase de muscle de lapin (Morris et Tolan, 1993). Cette enzyme a donc été grandement étudiée pour caractériser le mécanisme des FBP aldolases de mammifères et de classe I en général. Par ailleurs, l'aldolase A de lapin est identique à 98% à celle de l'humain, justifiant qu'on l'utilise encore aujourd'hui comme modèle des aldolases de mammifères.

1.3.3 Mécanisme catalytique détaillé

Dans la glycolyse, l'aldolase procède au clivage du FBP (rétro-aldolisation). Dans la gluconéogenèse, l'aldolase catalyse la synthèse du FBP à partir de DHAP et G3P (condensation aldolique). Les deux directions impliquent naturellement les mêmes intermédiaires réactionnels, illustrés à la Figure 1.8 dans la direction de la condensation aldolique. À noter, la réaction réversible catalysée par l'aldolase possède une constante d'équilibre d'environ 10^4 à 10^5 M^{-1} , selon les conditions utilisées, en faveur de la formation du FBP (Lehninger et al., 1955; Boyer, 1972; Connett, 1985). Aussi, une étude d'allostérie et de coopérativité entre les sous-unités de l'homotétramère de l'aldolase a montré que ces

dernières peuvent communiquer entre elles lorsque inactivées par la modification covalente de Cys-72 par du glutathion oxydé, loin du site actif (Sygusch et Beaudry, 1997). La modification d'une seule sous-unité entraîne l'inactivation complète de l'enzyme, au même titre qu'une enzyme dont les quatre sous-unités ont été modifiées. Il existe donc vraisemblablement un mécanisme par lequel les sous-unités communiquent entre elles. Cependant, le phénomène de coopérativité des sous-unités n'a jamais été détecté par des cinétiques en vitesse initiale, en absence de modification inhibitrice.

Pour ce qui est du mécanisme catalytique de l'aldolase, il comporte plusieurs étapes. L'enzyme doit tout d'abord former un complexe non covalent de type Michaelis avec le DHAP. Une structure cristallographique de l'aldolase de muscle de lapin en complexe non covalent avec le DHAP a été rapportée (Blom et Sygusch, 1997). Elle montre le DHAP dans le site actif de l'enzyme, adoptant trois conformations différentes et mutuellement exclusives. Dans l'une d'elles, le groupement carbonyle du DHAP est à proximité de la lysine nucléophile Lys-229 qui doit réagir avec le DHAP. Cette lysine du site actif procède alors à une attaque nucléophile sur le C2 du DHAP, formant ainsi le premier intermédiaire covalent, la carbinolamine. L'existence de cet intermédiaire est appuyée par des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) montrant son apparition lorsque l'aldolase est mise en présence d'un analogue du DHAP, le glycoaldehyde-phosphate (Ray et al., 1983). La carbinolamine est ensuite protonée au niveau de l'hydroxyle créé sur le C2 et une molécule d'eau est expulsée, menant à la formation d'un intermédiaire iminium, couramment appelé base de Schiff (protonée ou non) dans la littérature. L'existence de cet intermédiaire est facilement démontrée par l'inactivation de l'aldolase en présence de DHAP et d'un agent réducteur, comme le NaBH_4 . Lorsque l'enzyme inactivée est complètement dégradée, on retrouve un composé, la β -glycéryl-lysine, témoignant de l'iminium réduit avec un résidu lysine (Grazi et al., 1962a; Grazi et al., 1962b). Une fois l'iminium généré, la prochaine étape consiste en l'abstraction stéréospécifique du proton pro(S) du DHAP C3 pour former l'énamine. En fait, suite à l'abstraction du proton, un état carbanionique est créé entre l'iminium et l'énamine, portant à la fois la charge positive de l'iminium sur l'atome $\text{N}\zeta$ de la lysine et une charge négative sur le C3 du DHAP. Cet état est stabilisé en formant l'intermédiaire énamine, une espèce neutre, plus stable

chimiquement. L'énamine et l'état carbanionique sont en fait des mésomères, des formes en résonance auxquelles on fait souvent appel pour expliquer des réactions chimiques. Le caractère nucléophile du DHAP C3, créé suite à l'abstraction du proton, est mis en évidence par l'oxydation du carbanion en présence de divers agents oxydants, comme l'hexacyanoferrate(III) (Healy et Christen, 1973). Cette oxydation de l'énamine/carbanion produit de l'hydroxypyruvaldéhyde-phosphate. Par ailleurs, la formation de l'énamine pourrait être associée à l'absorbance observée par spectrophotométrie, autour de 240 nm, lorsque l'aldolase est en présence de DHAP (Melher et Bloom, 1963; Topper et al., 1957). À l'équilibre, l'iminium et l'énamine représentent 20 et 60% respectivement du DHAP lié à l'aldolase de muscle de lapin (Rose et al., 1987). Une fois le DHAP lié sous forme d'énamine, l'enzyme doit attendre l'arrivée du second substrat, le G3P, avant de poursuivre la réaction de condensation aldolique. Lorsque le G3P pénètre dans le site actif, le C3 de l'énamine/carbanion va réagir avec le C3 du groupement aldéhyde du G3P. Cette attaque est favorisée par la protonation de l'oxygène de ce même groupement aldéhyde par l'enzyme. Il en résulte la formation d'un lien carbone-carbone (FBP C3-C4), générant ainsi le FBP sous forme d'un intermédiaire iminium lié à l'enzyme. Comme pour le DHAP, l'iminium formé entre l'enzyme et le FBP est réduit en présence de NaBH_4 , et la dégradation complète de l'enzyme permet d'identifier un composé, la glucitol-lysine (Avigad et England, 1972). Seule la glucitol-lysine est récupérée et non pas la mannitol-lysine, qui sont en fait deux diastéréoisomères au niveau du C2. Ainsi, la réduction par le NaBH_4 ne doit se produire que sur la face *re* du FBP, indiquant que la face *si* doit être inaccessible et donc que le FBP possède une orientation bien définie dans le site actif de l'enzyme (Trombetta et al., 1977; di Iasio et al., 1977). Pour libérer le FBP formé, une molécule d'eau viendra former une carbinolamine en attaquant le C2 de l'iminium, puis le FBP sera relâché. Par ailleurs, la carbinolamine formée aura la configuration *2R* puisque l'enzyme lie le FBP par la face *si* (di Iasio et al., 1977).

Il est intéressant de noter que lorsque l'enzyme catalyse le clivage du FBP, elle ne peut attaquer que la forme acyclique (cétone) du FBP. Or, cette forme est minoritaire en solution puisqu'elle représente à peine 2% des espèces trouvées. En effet, la grande majorité du FBP se retrouve en solution sous forme cyclique, en un mélange à l'équilibre

des anomères β -furanose (~90%) et α -furanose (~10%) (Gray, 1971). Une étude par cinétique pré-stationnaire a évalué que le clivage du FBP par l'aldolase s'effectue plus rapidement que l'ouverture du cycle furanose du FBP en solution et que l'enzyme n'utilise que l'anomère β -furanose (Choi et Tolan, 2004). Il a donc été suggéré que l'aldolase catalyse l'ouverture du cycle du β -FBP pour ensuite réagir avec la forme cétone acyclique du FBP. Cette hypothèse avait déjà été avancée sur la base d'expériences d'échange de l'oxygène du groupement carbonyle du FBP avec le solvant en présence d'aldolase (Model et al., 1968). Par ailleurs, la structure cristallographique d'une FBP aldolase mutante de l'archéobactérie *Thermoproteus tenax* a été résolue en présence de FBP (Lorentzen et al., 2005). Étonnamment, dans le site actif de l'enzyme, on retrouve le β -FBP cyclique. C'est la première structure cristallographique d'une FBP aldolase en complexe avec son substrat cyclique. Il est proposé qu'une molécule d'eau structurale interagissant avec un phosphate du FBP et à proximité de l'oxygène ester O5 du β -FBP soit responsable de la protonation de cet oxygène, menant à l'ouverture du cycle β -furanose. Cette molécule d'eau est maintenue en place par des interactions avec le phosphate, une sérine et le squelette polypeptidique.

Le mécanisme d'action de l'aldolase, tel que décrit précédemment, est de type séquentiel ordonné. Effectivement, une étude utilisant une aldolase digérée à la carboxypeptidase A permet de rendre l'étape de transfert du proton du DHAP C3 limitante et ainsi d'analyser en détail la séquence des événements catalytiques (Rose et al., 1965). Il a été constaté que le lien carbone-carbone entre le DHAP et le G3P ne peut se former que si le proton du DHAP C3 a été préalablement abstrait. Ceci implique donc que le DHAP doit absolument réagir avec l'enzyme en premier, et le G3P en second.

Lors de la formation de l'intermédiaire énamine, une réaction secondaire peut survenir et générer du méthylglyoxal (MG), un métabolite toxique et hautement réactif (Thornalley, 1993), aussi appelé pyruvaldéhyde ou 2-oxopropanal. En effet, cette réaction de production de MG à partir de DHAP par l'aldolase de muscle de lapin fut identifiée initialement comme étant un nouvel intermédiaire existant sur l'enzyme, un complexe pyruvaldéhyde-aldolase-orthophosphate, en équilibre avec l'énamine. Ce complexe se

décompose ensuite lentement pour libérer le MG et du phosphate inorganique (P_i) (Grazi et Trombetta, 1978). La réaction est suivie par l'apparition de MG et de P_i . Le profil pH de la réaction montre une libération de MG accrue en pH acide (4.5 à 6.0) et maximale à pH 5.5. Il a été proposé que la libération de MG et de P_i à partir de l'énamine résulte d'une réaction de type élimination β -1,4 initiée par l'abstraction du proton du DHAP O3. Ceci mène au clivage irréversible du lien ester C1-O1 du DHAP, libérant ainsi le P_i et, après hydrolyse, le MG (Iyengar et Rose, 1981). Néanmoins, la production considérable de MG par l'aldolase a été remise en question puisque des conditions très acides avaient été utilisées pour précipiter l'enzyme avant d'analyser les quantités de MG et P_i libérées (Kuo et Rose, 1985). Enfin, dans une étude utilisant des conditions d'analyse non acides, il a été rapporté qu'un certain mutant de l'aldolase de muscle de lapin, Ser-271→Ala, libère considérablement plus de P_i en présence de DHAP que l'enzyme native (Munger, 2002). Ceci peut s'expliquer par le fait que normalement Ser-271 est impliquée dans la liaison du phosphate du DHAP (Choi et al., 2001). Ainsi, la mutation en Ala doit diminuer la stabilisation du phosphate du DHAP, faisant de lui un meilleur groupement partant. La littérature ne rapporte pas d'autres études sur la production de MG par l'aldolase glycolytique. Enfin, il est intéressant de noter que la production de MG par l'aldolase est accrue dans un milieu légèrement acide, une situation qui peut se créer dans les cellules musculaires soumises à un exercice intense (anaérobique), lesquelles utilisent grandement la glycolyse (Green, 1997). Cependant, l'importance de l'aldolase et de l'acidose musculaire de la production de MG durant un exercice intense n'est pas connue.

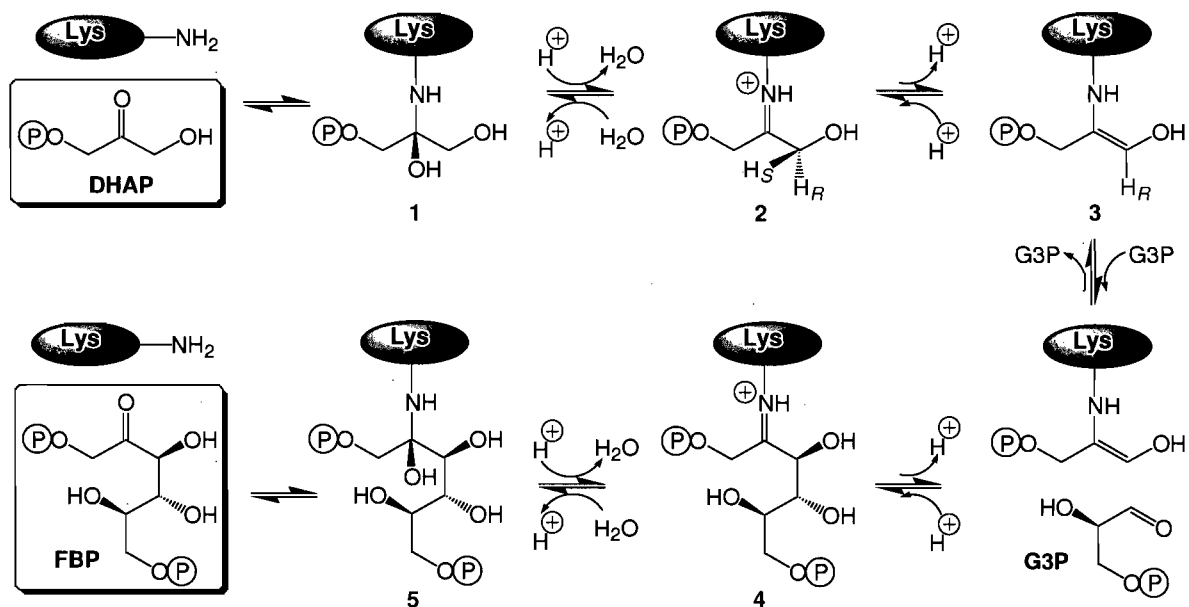


Figure 1.8 Intermédiaires réactionnels de la condensation aldolique du DHAP et G3P par l'aldolase produisant du FBP.

Après avoir formé un complexe Michaelis avec le substrat, l'enzyme réagit avec le DHAP pour former la carbinolamine-1. La déshydratation de la carbinolamine crée le second intermédiaire, l'iminium-2 (base de Schiff protonée). À noter, la chiralité au C3 du DHAP (*magenta*). L'enzyme procède ensuite à l'abstraction stéréospécifique du proton pro(*S*) du DHAP C3, menant à la formation de l'énamine-3. Le G3P, second substrat, entre alors dans le site actif. L'enzyme catalyse la formation du lien C3-C4 du FBP (*rouge*) en protonant le groupement carbonyle du G3P, générant ainsi l'iminium-4. Finalement, via une hydrolyse créant transitoirement la carbinolamine-5, l'enzyme libère le FBP acyclique.

1.3.4 Substrats

Dans la réaction de condensation aldolique, l'aldolase est très spécifique pour le DHAP, mais beaucoup moins pour le G3P (Bednarski et al., 1989). En effet, de légères modifications à la molécule de DHAP diminuent drastiquement la vitesse catalytique. Seulement deux analogues du DHAP peuvent être utilisés en guise de cétone. Cependant, l'enzyme est moins sélective pour le G3P, car une cinquantaine d'aldéhydes ont pu être utilisés pour la condensation aldolique avec le DHAP catalysée par l'aldolase de muscle de lapin. Évidemment, cette caractéristique de l'aldolase et sa capacité à former un lien carbone-carbone lui confèrent un intérêt marqué en synthèse organique.

La FBP aldolase de classe I est un exemple d'enzyme stéréospécifique. En effet, bien que la condensation du DHAP et du G3P puisse chimiquement donner 4 hexoses-bisphosphates distincts, l'enzyme ne produit que du FBP. L'architecture de l'enzyme lui permet de contrôler précisément la spécificité de la réaction catalysée. Sachant que l'enzyme peut utiliser d'autres substrats que le G3P lors de la condensation aldolique, on peut donc s'attendre à ce que durant la réaction de clivage, l'enzyme puisse utiliser d'autres sucres que le FBP. De fait, d'autres substrats analogues au FBP peuvent être clivés efficacement par l'aldolase, dont le D-xylulose-1,5-bisphosphate (Mehler et Cusic, 1967), le L-sorbose-1,6-bisphosphate (Richards et Rutter, 1961) et le D-sédoheptulose-1,7-bisphosphate (Horecker et al., 1955). À noter, ces autres substrats ont tous la même configuration (3*S*,4*R*), comme le FBP. Par ailleurs, d'autres analogues du FBP de configurations différentes sont des inhibiteurs de l'aldolase, comme le (3*R*,4*R*)-D-ribulose-1,5-bisphosphate (Rose et Warms, 1985) et le (3*S*,4*S*)-tagatose-1,6-bisphosphate (TBP) (Hartman et Barker, 1965). Il semble donc que la configuration en C3 et C4 soit un facteur déterminant pour qu'un sucre bisphosphorylé soit un substrat ou un inhibiteur de la FBP aldolase.

Plusieurs molécules ont été identifiées comme étant des inhibiteurs faibles ou moyennement forts de l'aldolase, la plupart étant des composés mono ou polyphosphorylés. Une liste exhaustive de ces composés retrouvés dans la littérature a été rapportée par

Gefflaut et al. (1995). Les constantes d'inhibition (K_i) varient beaucoup, allant de 10^{-6} M à 10^{-2} M. Des différences sont également observées pour un même composé selon la technique et la force ionique utilisées. L'activité de l'aldolase peut aussi être partiellement inhibée par une trop grande force ionique (Sanchez de Jimenez et al., 1964), comme une concentration trop élevée en sels.

1.3.5 Organisation du site actif

L'aldolase de muscle de lapin est la première FBP aldolase de classe I pour laquelle une structure cristallographique a été obtenue à moyenne résolution ($< 3 \text{ \AA}$) (Sygusch et al., 1987). Cette structure a permis de mieux comprendre l'organisation du site actif de cette enzyme. Naturellement, plusieurs structures à haute et moyenne résolutions ont par la suite été publiées, rendant accessibles certains détails importants dans la compréhension de la catalyse enzymatique. Par ailleurs, d'autres études biochimiques ont permis de cibler certains résidus du site actif pour mettre en évidence leur importance. L'effet de diverses mutations sur l'activité catalytique est répertorié au L'architecture du site actif est présentée à la Figure 1.9, montrant la disposition des acides aminés le composant. Une particularité du site actif est qu'il est à la fois localisé à l'intérieur du tonneau $(\alpha/\beta)_8$ et constitué majoritairement de résidus chargés. En effet, bien qu'enfoui dans la structure, le site actif comporte peu d'acides aminés hydrophobes.

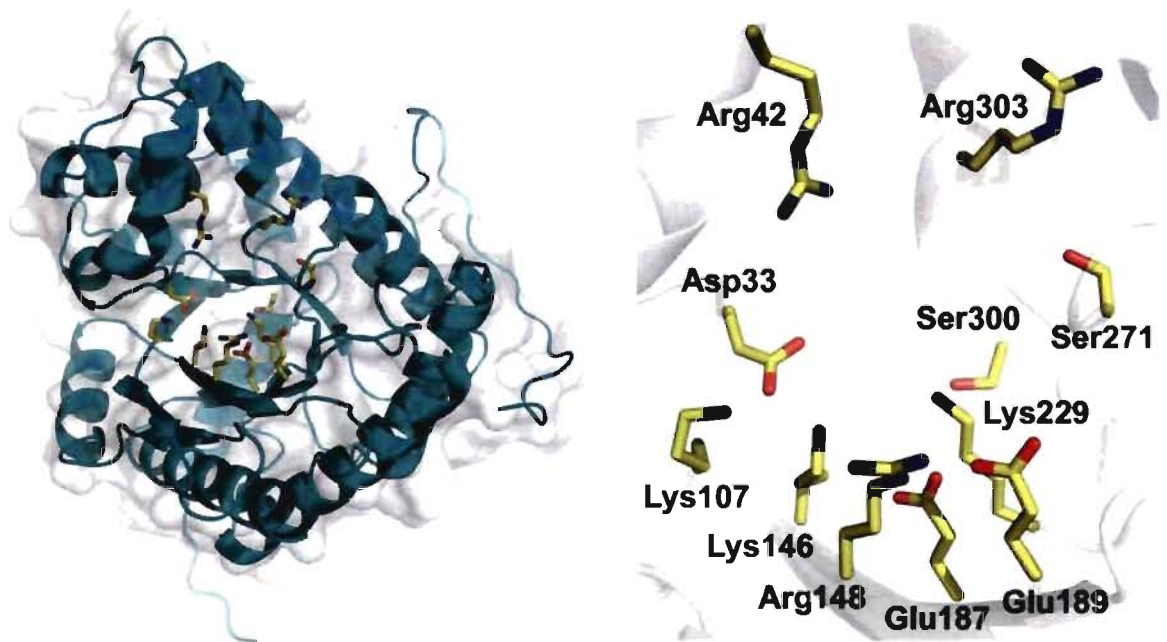


Figure 1.9 Site actif de l'aldolase de muscle de lapin.

Une sous-unité du tétramère de l'aldolase de muscle de lapin native est représentée (PDB # 1ZAH). Les résidus du site actif considérés comme étant impliqués dans l'activité de l'enzyme sont mis en évidence (*bâtonnets jaunes*).

Table 1.2 Paramètres cinétiques de divers mutants de l'aldolase de muscle de lapin.

Aldolase de muscle de lapin	Activité spécifique (U/mg)	K _M FBP (μM)	Référence
Native recombinante	16.1 ± 0.3	5.1 ± 1.9	Maurady et al., 2002
K229A	< 0.0002	non déterminé	Morris et Tolan, 1994
K146A	< 0.0002	non déterminé	Morris et Tolan, 1994
K146M	0.0018 ± 1*10 ⁻⁵	20.36 ± 1.9	de Moissac, 1995
K107M	0.61 ± 1*10 ⁻⁴	41.76 ± 3.13	de Moissac, 1995
R148A	0.31 ± 7*10 ⁻⁵	141 ± 7	Wang et al., 1996
R42A	10.2 ± 0.4	45 ± 5	Wang et al., 1996
R303A	0.23 ± 0.02	250 ± 21	Choi et al., 1999
D33A	0.0036 ± 1.8*10 ⁻⁶	80.0 ± 0.074	Morris et Tolan, 1993
D33N	0.0032 ± 1*10 ⁻⁵	4.21 ± 0.61	de Moissac, 1995
D33S	0.0020 ± 1*10 ⁻⁵	8.35 ± 0.38	de Moissac, 1995
E187A	0.046 ± 0.006	6.2 ± 0.6	Maurady et al., 2002
E187Q	0.011 ± 0.001	13.4 ± 1.1	Maurady et al., 2002
E189A	14.1 ± 0.6	5.7 ± 1.1	Maurady et al., 2002
E189Q	0.65 ± 0.03	10.9 ± 1.5	Maurady et al., 2002
E34A	0.84 ± 0.04	32 ± 3	Choi et al., 1999
S271A	0.070 ± 0.008	63 ± 5	Munger, 2002
S300A	0.980 ± 0.002	33 ± 1	Munger, 2002
Y363S (humain)	0.45	3.0	Takahashi et al., 1989

1.3.5.1 *Lysines*

Le mécanisme catalytique implique la formation d'intermédiaires covalents entre une lysine du site actif, Lys-229, et les substrats. Cette lysine est située sur le brin β_6 , avec sa chaîne latérale pointant vers l'extrémité ouverte du tonneau (α/β)₈, l'autre extrémité étant fermée par une hélice α . Lys-146 sur le brin β_4 est également très importante dans la catalyse de l'enzyme puisque des mutations ponctuelles diminuent drastiquement l'activité enzymatique (Morris et Tolan, 1994). Lys-107 sur le brin β_3 serait impliquée dans la liaison du phosphate P6 du FBP, tel que montré par des expériences de protection et de réactivité avec le pyridoxal-5-phosphate (Anai et al., 1973). Aussi, la mutation Lys-107→Met diminue la vitesse de clivage du FBP par un facteur 26 (de Moissac, 1995). Il est intéressant de remarquer l'alignement spatial des trois lysines dans le site actif, avec Lys-146 entre Lys-229 et Lys-107. On peut donc s'attendre à ce que cette proximité affecte leur état d'ionisation (pK_a). Effectivement, une étude de réactivité avec le *N*-bromoéthanolamine-phosphate a montré que Lys-146 possède un pK_a inférieur ou égal à 8.5, mais supérieur à 6.5 (Hartman et Brown, 1976). Aussi, le titrage de la réaction de Lys-107 envers le pyridoxal-5-phosphate a montré que cette lysine possède un pK_a de 8.0 (Dax et al., 2005). Pour ce qui est de Lys-229, elle doit être nucléophile même dans un milieu légèrement acide car l'aldolase de muscle de lapin est active sur une large gamme de pH allant de 4 à 11, mais optimale entre 6.5 et 8.5. Ainsi, il a été proposé que le caractère nucléophile de Lys-229 soit assuré par une activation par Glu-187 à proximité plutôt que par un pK_a très acide (Maurady et al., 2002).

1.3.5.2 *Arginines*

L'inactivation de l'aldolase par des composés α -dicarbonylés réagissant spécifiquement avec les arginines a permis de postuler qu'une ou plusieurs Arg étaient importantes dans la catalyse (Yankeelov et al., 1968). En effet, on note trois Arg dans le site actif de l'aldolase de muscle de lapin. Située au début de l'hélice α suivant le brin β_8 , un rôle significatif pour Arg-303 a été suspecté puisqu'une mutation en Ala diminue la vitesse de clivage du FBP par un facteur 70 et, fait important, augmente le K_M par un

facteur 49 (Choi et al., 1999). Une structure de l'aldolase liée de façon covalente au DHAP a par la suite corroboré l'implication de Arg-303 dans la liaison au substrat car elle adopte une conformation recourbée interagissant avec le phosphate du DHAP (Choi et al., 2001). Aussi, la mutation Arg-148→Ala a montré que ce résidu est impliqué dans la catalyse de l'enzyme car la mutation diminue la vitesse de clivage du FBP par un facteur 52 (Wang et al., 1996). Cette mutation affecte cependant moins la liaison du substrat (facteur 28) que la mutation de Arg-303. Finalement, la mutation Arg-42→Ala a des effets moindres, diminuant la vitesse par un facteur 2 et la liaison du substrat par un facteur 9 (Wang et al., 1996). Ceci porte donc à croire que Arg-42 joue un rôle plus secondaire que Arg-148 et Arg-303 dans le mécanisme de l'enzyme.

1.3.5.3 *Acide aspartique*

L'importance du résidu Asp-33 dans la catalyse de l'aldolase de muscle de lapin a clairement été montrée par mutagenèse dirigée (Morris et Tolan, 1993). Effectivement, des mutations ponctuelles introduites à cette position, située entre le brin β 4 et l'hélice α suivante, diminuent drastiquement l'activité de l'enzyme. Par ailleurs, Asp-33 est bien situé dans le site actif pour influencer les charges de Lys-107 et Lys-146 puisque dans la structure native, Asp-33 interagit simultanément avec ces deux lysines. La présence de la charge négative de Asp-33 dans l'environnement des deux lysines doit sensiblement contribuer à leur coexistence rapprochée dans le site actif. Aussi, dans la structure cristalline de l'aldolase de muscle de lapin en complexe covalent avec le DHAP sous forme d'iminium réduit au NaBH_4 , Asp-33 est situé à 3.5 Å du DHAP C3 (Choi et al., 2001). Il a donc été suggéré que Asp-33 soit responsable du transfert du proton en C3. Par modelage du FBP dans cette même structure, il a également été proposé que Asp-33 soit en position pour catalyser l'abstraction du proton de FBP O4, menant au clivage du lien C3-C4 du FBP. Cependant, nos recherches montreront que ces hypothèses sur le rôle catalytique de Asp-33 s'avèrent inexactes.

1.3.5.4 *Acides glutamiques*

Deux acides glutamiques, Glu-187 et Glu-189, sont situés sur le brin $\beta 5$, pointant vers le centre du site actif. L'implication de ces deux résidus dans la catalyse a été mise en évidence par mutagenèse dirigée. Dans le cas de Glu-187, son importance dans la balance électrostatique du site actif a également été révélée par cristallographie (Maurady et al., 2002). La diminution de la vitesse de clivage du FBP lors d'une mutation en Gln ou Ala est beaucoup plus marquée pour Glu-187 que Glu-189. Cette observation n'est pas incohérente avec le fait que Glu-187 est adjacent à Lys-229 et serait responsable de l'activation de cette dernière durant le cycle catalytique pour rendre Lys-229 nucléophile. Un pK_a macroscopique acide de 5.1 est observé dans le profil pH d'activité de l'enzyme native, lequel pourrait être attribuable au résidu Glu-187 (Maurady et al., 2002). Les structures cristallographiques de deux mutants de Glu-187 (Gln et Ala) ont par ailleurs révélé des modifications locales dans la chaîne latérale de Glu-189 et Arg-148. Spécifiquement chez le mutant Glu-187→Ala, ces modifications sont également accompagnées de perturbations structurales mineures distribuées dans le squelette polypeptidique. Il est intéressant de noter que les mutants de Glu-187 et Glu-189 en Ala sont plus actifs que la mutation en Gln par un facteur 4 et 22, respectivement. En fait, la mutation Glu-189→Ala est pratiquement sans effet sur la vitesse de clivage du FBP. Dans la structure du mutant Glu-187→Ala, Ala-187 est accompagnée d'une molécule d'eau qui remplace la longue la chaîne latérale de Glu-187. Ce remplacement d'un Glu par une Ala accompagnée d'une molécule d'eau peut expliquer la plus grande activité de ce mutant comparativement à Gln, isostructurale à Glu, mais n'ayant pas les mêmes propriétés. Dans ce cas, il semble donc qu'une molécule d'eau puisse mieux remplacer les fonctionnalités d'un Glu.

1.3.5.5 *Sérines*

Le site actif de l'aldolase de muscle de lapin comporte quatre sérines, mais jusqu'à ce jour, seulement deux ont été considérées dans la catalyse de l'enzyme: Ser-271 et Ser-300 (Munger, 2002). Localisée à la fin du brin $\beta 7$, Ser-271 est impliquée dans la liaison du phosphate du DHAP, comme observé dans la structure de l'aldolase lié au DHAP (Choi et al., 2001). Pour sa part, Ser-300, sur le brin $\beta 8$, établit un pont hydrogène avec Lys-229 dans la structure de l'aldolase native. Cependant, dans la structure de l'aldolase liée au

DHAP, ce pont hydrogène devient un contact faible ($> 3.5 \text{ \AA}$). Il est toutefois important de rappeler que cette structure ne constitue pas un réel intermédiaire réactionnel, mais bien une forme réduite au NaBH_4 de l'iminium. Il est donc raisonnable de penser que Ser-300 pourrait être impliquée, par son interaction avec Lys-229, dans la stabilisation de différents intermédiaires durant la catalyse.

1.3.5.6 C-terminus

La comparaison des séquences primaires des trois isoformes de l'aldolase de mammifères montre clairement que le C-terminus (~20 résidus) est la région où on observe la plus grande variabilité, à l'exception de la tyrosine terminale qui est totalement conservée. Un rôle dans le mécanisme catalytique est depuis longtemps suspecté pour Tyr-363, non illustrée à la Figure 1.9 car elle ne constitue pas un résidu localisé au site actif. Effectivement, son élimination par digestion à la carboxypeptidase A diminue la vitesse de clivage du FBP par un facteur 20 (Drechsler et al., 1959) et le transfert du proton du DHAP par un facteur 500 (Rutter et al., 1961). Cet effet plus marqué sur le transfert du proton amena l'idée que Tyr-363 était intimement liée à cette étape du mécanisme. Néanmoins, le manque d'information structurale impliquant Tyr-363 et le fait que le C-terminus ne fasse pas partie du site actif rendent difficile l'élaboration rationnelle d'un mécanisme impliquant Tyr-363. Par ailleurs, les autres résidus du C-terminus seraient responsables de moduler l'activité catalytique. En effet, une étude exhaustive par mutagenèse dirigée sur les neuf résidus C-terminaux de l'aldolase de maïs a permis d'observer que les mutations introduites affectaient légèrement la vitesse de l'enzyme et le K_M , mais que l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) n'était pas significativement modifiée (Berthiaume et al., 1991). Aussi, une étude utilisant des aldolases chimériques a établi que les propriétés catalytiques associées au C-terminus d'une aldolase pouvaient être transposées à une autre aldolase lors de l'échange de résidus spécifiques de leur C-terminus (Berthiaume et al., 1993). Cette observation supporte l'idée que le rôle du C-terminus, excluant la tyrosine terminale conservée pour laquelle un rôle catalytique est pressenti, est de moduler les propriétés catalytiques de l'aldolase, comme la liaison/expulsion des substrats/produits. Cette modulation pourrait être affectée par la mobilité du C-terminus.

1.3.6 Interactions avec des partenaires cellulaires

Parallèlement à ses activités glycolytique et gluconéogénique, la FBP aldolase semble posséder d'autres fonctions relevant davantage d'interactions qu'elle établit avec divers partenaires cellulaires (Figure 1.10). Le fait que l'aldolase soit une protéine très abondante dans la cellule, jusqu'à 5% des protéines solubles totales (Taylor et al., 1948; Maughan et al., 2005), suggère que ses interactions rapportées dans la littérature doivent jouer un rôle considérable au niveau de la dynamique cellulaire. Il est aussi naturel de penser que les diverses interactions de l'aldolase vont influencer sa localisation cellulaire : nucléaire, périnucléaire, associée au cytosquelette, libre, complexes multienzymatiques (Kao et al., 1999; Minaschek et al., 1992; Mamczur et al., 2007). Par ailleurs, l'état homotétramérique de l'aldolase pourrait lui permettre d'interagir avec plus d'un partenaire à la fois et même d'être catalytiquement active tout en faisant partie d'un complexe.

1.3.6.1 Actine

Une des premières interactions de l'aldolase à avoir été rapportées est sa liaison avec des structures du cytosquelette, et plus spécifiquement l'actine. En effet, lors de l'homogénéisation de muscles de lapin ou de rat, on observa que les rendements d'extraction d'aldolase étaient dépendants de la force ionique utilisée. Une plus grande force ionique libérait des fractions d'aldolase non accessibles autrement (Arnold et Pette, 1968). Par ailleurs, l'analyse *in vitro* de la liaison de l'aldolase à des filaments d'actine (F-actine) montra que l'aldolase possède plus d'un site de liaison pour la F-actine et/ou qu'un phénomène de coopérativité existe puisqu'un profil de désorption sigmoïdal est obtenu en présence de concentration croissante de sel. À 80 mM KCl, 50% de l'aldolase liée à la F-actine est relâchée, et à 150 mM KCl, la totalité de l'aldolase est libérée. Le ratio calculé serait d'environ une molécule d'aldolase pour deux monomères d'actine de la F-actine. De plus, la liaison n'est pas affectée dans la gamme des pH physiologiques, tandis qu'un pH plus alcalin (>8.0) affaiblit la liaison. Ceci n'est peut-être pas étranger au fait que l'aldolase

de muscle de lapin possède un point isoélectrique relativement élevé (~8.5). L'aldolase lie également la myosine, mais à un degré moindre que la F-actine. La même étude a aussi observé la liaison d'autres enzymes glycolytiques à la F-actine, comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la lactate déshydrogénase, la pyruvate kinase et la phosphoglycérate kinase. Cette observation et d'autres montrant que différentes enzymes glycolytiques sont en partie liées à la F-actine donnèrent naissance à l'idée que des complexes glycolytiques sont présents dans la cellule et associés à des éléments du cytosquelette. La localisation de ces enzymes ne serait donc pas uniforme dans le cytoplasme. L'effet de divers métabolites de la glycolyse sur la liaison de l'aldolase à la F-actine a aussi été évalué (Arnold et Pette, 1970). Une inhibition marquée de la liaison par le FBP et le DHAP est observée et, à une moindre importance, le P_i , l'ATP (adénosine-5'-triphosphate), l'ADP (adénosine-5'-diphosphate), le phosphoénolpyruvate, le 3-phosphoglycérate et le 2,3-phospho-glycérate. Par ailleurs, l'aldolase peut former un complexe avec l'actine monomérique (G-actine) et amorcer le processus de gélification de cette dernière, comme le ferait l' α -actinine (Arnold et al., 1971). Des analyses subséquentes ont montré que l'aldolase peut provoquer l'interconnexion (« *cross-link* ») de filaments d'actine préexistants pour former des paquets serrés (« *bundles* ») (Clarke et Morton, 1976). Le site de liaison de la F-actine serait entre autres constitué des résidus 32-52 de l'aldolase, qui forment une région en hélice α bordant le site actif (O'Reilley et Clarke, 1993). Une étude plus détaillée de l'effet de l'aldolase sur l'état filamenteux de la F-actine a révélé qu'à faible concentration (<1.5 μ M), l'aldolase induit la formation de réseaux serrés et hautement interconnectés de F-actine (Wang et al., 1996). À plus de 1.5 μ M d'aldolase, les réseaux serrés sont plus épais mais moins interconnectés entre eux, diminuant ainsi la viscosité apparente de la solution. Ces effets sont abolis par certaines mutations ponctuelles à des résidus conservés de l'aldolase (Arg-42, Lys-107, Arg-148). La mutagenèse dirigée a aussi identifié les résidus Glu-34 et Lys-41 comme étant importants pour la liaison de l'aldolase à la F-actine. En somme, la liaison de l'aldolase à la F-actine semble impliquer certains résidus situés dans l'environnement du site actif. La dynamique des filaments d'actine dans la cellule pourrait donc être influencée par l'aldolase et la disponibilité de ses substrats.

1.3.6.2 Tubuline et microtubules

L'interaction de l'aldolase avec le cytosquelette ne se limite pas à l'actine. En effet, l'aldolase peut également interagir avec la tubuline (Karkhoff-Schweizer et Knull, 1987) et les microtubules (Walsh et al., 1989). L' α -tubuline interagit davantage avec l'aldolase que la β -tubuline et le C-terminus de la tubuline serait impliqué dans l'interaction car sa digestion limitée par la subtilisine diminue l'interaction (Carr et Knull, 1993; Volker et Knull, 1993). L'aldolase aurait également la propriété d'interconnecter entre eux des microtubules, formant ainsi des réseaux dans plusieurs directions (Balaban et Goldman, 1990; Volker et al., 1995). Cette propriété a également été observée chez la GAPDH et la pyruvate kinase. Par ailleurs, une étude plus détaillée par digestion peptidique a permis de découvrir que le site d'interaction de l'aldolase se situerait au niveau des 43 derniers acides aminés de la partie C-terminale de l' α -tubuline (Volker et Knull, 1997). Ce peptide, fortement chargé négativement puisque comportant 19 résidus acides (Asp/Glu), inhibe l'aldolase même à de faibles concentrations ($<1 \mu\text{M}$). De fait, bien que très peu d'études portent sur le site de l'aldolase impliqué dans l'interaction, on peut suspecter que le site de liaison soit le site actif ou sa périphérie. L'interaction de l'aldolase avec la tubuline et les microtubules pourrait, comme pour l'actine, influencer la localisation cellulaire de l'aldolase qui serait associée à ces éléments du cytosquelette. En lien avec les microtubules, notons également que l'aldolase a été identifiée, par une approche protéomique, comme l'une des protéines pouvant lier la chaîne légère 8 de la dynéine, une protéine motrice déplaçant des cargos vers l'extrémité moins (« *minus-end* ») des microtubules (Navarro-Lerida et al., 2004).

1.3.6.3 GLUT4

Le transporteur de glucose 4 (GLUT4) est l'une des protéines transmembranaires responsables de l'entrée de glucose dans certaines cellules et il interagit avec l'aldolase via sa partie cytosolique C-terminale (Kao et al., 1999). Cette interaction, inhibée par le substrat de l'aldolase, est critique pour l'exocytose insulino-dépendante des vésicules portant des GLUT4 latents. Des expériences de colocalisation cellulaire ont également

appuyé l'idée de l'existence du complexe GLUT4-aldolase dans la cellule. Aussi, par coprécipitation d'affinité (« *Glutathione-S-Transferase pull-down* »), il a été montré que l'aldolase forme un pont entre GLUT4 et la F-actine. Ceci suggère un rôle important pour l'aldolase dans la régulation de l'entrée de glucose dépendante de l'insuline, comme dans le muscle squelettique et le tissu adipeux. Cependant, d'autres études sont requises pour confirmer et documenter ce rôle de régulateur de l'aldolase.

1.3.6.4 *Échangeur d'anions « Band 3 » de l'érythrocyte*

L'aldolase est également en mesure de former un complexe avec l'échangeur transmembranaire d'anions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de l'érythrocyte, aussi appelé « *Band 3* » (BD3) (Strapazon et Steck, 1976). L'aldolase interagit avec la région N-terminale cytosolique de BD3 (Murthy et al., 1981), et plus spécifiquement avec maximalelement les 58 résidus N-terminaux, comportant plusieurs résidus acides (Low et al., 1987). La phosphorylation d'une ou deux tyrosines de cette région de BD3, possiblement Tyr-8 et Tyr-21, et la présence de FBP inhibent l'interaction. La structure d'un peptide composé des 15 résidus N-terminaux de BD3 en complexe avec l'aldolase a été résolue par RMN (Schneider et Post, 1995). Seule la structure du peptide est résolue et elle montre qu'il adopte une conformation en boucle, avec Tyr-8 pointant vers le centre de la boucle. Cependant, les détails structuraux de l'interaction demeurent inconnus. Par la suite, la structure cristallographique du domaine cytosolique de BD3 a été résolue, mais les résidus 1-54 N-terminaux impliqués dans l'interaction avec l'aldolase n'étaient pas visibles dans la densité électronique, suggérant une grande flexibilité conformationnelle (Zhang et al., 2000). Aussi, BD3 pourrait représenter un site de nucléation pour la formation de complexes multienzymatiques puisque l'aldolase et la GAPDH peuvent former un complexe ternaire avec BD3 (von Ruckmann et Schubert, 2002). La liaison de la phosphofructokinase à BD3 a également été observée, et l'interaction de ces trois enzymes glycolytiques avec BD3 est abolie dans des érythrocytes exposés à un milieu pauvre en oxygène (Campanella et al., 2005). Ceci est cohérent avec le fait que la désoxyhémoglobine lie le N-terminus de BD3, déplaçant probablement les enzymes glycolytiques, alors que l'oxyhémoglobine ne lie pas BD3. Finalement, l'importance des résidus N-terminaux de BD3 dans la liaison à l'aldolase

est corroborée par une étude de cas sur un patient portant une mutation qui produit un BD3 tronqué capable de s'insérer normalement dans les globules rouges, mais auquel il manque les 11 résidus N-terminaux (Perrotta et al., 2005). En purifiant des membranes d'érythrocytes de ce patient, il a été observé que l'aldolase n'était plus associé aux membranes. Indirectement, ceci suggère que cette forme tronquée de BD3 est incapable de lier l'aldolase. Le patient en question souffre d'une anémie hémolytique, ses globules rouges montrant des morphologies anormales, et possède un foie surdimensionné.

1.3.6.5 *Phospholipase D2*

La phospholipase D2 (PLD2), enzyme clivant la phosphatidylcholine en choline et acide phosphatidique après différentes stimulations cellulaires, est également en mesure de former un complexe avec l'aldolase (Kim et al., 2002). Le domaine d'homologie à la pleckstrine serait le site de liaison de l'aldolase sur PLD2. L'interaction inhibe PLD2 et étonnamment est renforcée en présence de FBP et G3P, alors que le DHAP et le F1P n'ont pas d'effet. Cette caractéristique est très particulière dans le cas de l'aldolase car habituellement les interactions sont abolies par le FBP. Ceci implique donc que le site de liaison de PLD2 sur l'aldolase doit probablement se trouver ailleurs qu'au site actif. L'activité de l'aldolase n'a pas été mesurée en présence de PLD2.

1.3.6.6 *WASP*

Récemment, il a été montré que l'aldolase interagit avec le C-terminus de la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich (WASP) (Buscaglia et al., 2006). Ce syndrome est dû à un désordre récessif lié au chromosome X, dont les premières manifestations cliniques répertoriées ont été une combinaison d'eczéma, de thrombocytopenie et une immunodéficience sévère. Les plaquettes sanguines et les lymphocytes sont les cellules les plus durement affectées (Kirchhausen, 1998). Plusieurs mutations de WASP ont été identifiées et tenues responsables du syndrome (Derry et al., 1994). WASP est normalement impliquée dans les événements de polymérisation de l'actine dépendants du complexe Arp2/3 («*Actin related protein 2 and 3*»), comme dans la formation des podosomes et la motilité cellulaire (Machesky et Insall, 1998; Linder et al., 1999). Dans son

état inactif (latent), WASP est maintenue auto-inhibée dans la cellule par son C-terminus qui établit des interactions intramoléculaires avec le corps de la protéine (Miki et al., 1998). Le C-terminus est ainsi indisponible au recrutement de Arp2/3 et interfère avec les sites de recrutement à la membrane de WASP, lesquels peuvent lier le phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) et Cdc42 prénylé localisé à la membrane. L'activation de WASP provoque son recrutement à la membrane et libère son C-terminus, lequel peut alors recruter Arp2/3, qui est un site de nucléation pour la polymérisation de filaments d'actine. Néanmoins, les événements menant de l'activation de WASP au recrutement de Arp2/3 ne sont pas bien compris. Dans ce contexte, la découverte de l'interaction entre WASP et l'aldolase est importante. En effet, l'aldolase interagit avec le C-terminus de WASP, tout comme Arp2/3, et via entre autres le même résidu subterminal Trp-500, critique aux deux interactions (Buscaglia et al., 2006; Marchand et al., 2001). Le complexe entre le C-terminus de WASP et l'aldolase est dissocié par les substrats de cette dernière, suggérant que le site actif de l'aldolase soit la région impliquée dans la liaison. Toutefois, la force, les détails structuraux et le rôle physiologique de l'interaction entre WASP et l'aldolase demeurent inconnus. Des études chez les parasites *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* ont montré que des adhésines transmembranaires impliquées dans l'infection de l'hôte interagissent avec l'aldolase du parasite via leur région C-terminale, homologue à celle de WASP (Jewett et Sibley, 2003; Buscaglia et al., 2003). La présence de nombreux résidus acides dans leur C-terminus serait importante pour l'interaction avec l'aldolase. Dans ces cas-ci, l'aldolase formerait un pont entre l'adhésine et la F-actine des parasites.

1.3.6.7 SNX9

Deux études portant sur le complexe SNX9/Dyn2 (« *sorting nexin 9* », « *dynamain-2* »), impliqué dans l'endocytose dépendante de la clathrine, ont montré que SNX9 interagit avec l'aldolase et que cette interaction maintient le complexe SNX9/Dyn2 dans un état inactif dans la cellule (Lundmark et Carlsson, 2003; Lundmark et Carlsson, 2004). Cette interaction dépend d'une courte séquence acide de SNX9 contenant deux tryptophanes, dont la mutation abolit l'interaction. La phosphorylation de résidus de cette même région, un processus cellulaire requis pour l'activation du complexe SNX9/Dyn2 et fait par une

kinase inconnue, abolit également l'interaction SNX9-aldolase. Comme dans la plupart des interactions de l'aldolase, le FBP est un compétiteur. L'interaction semble bloquer à la fois le domaine de liaison à la membrane de SNX9 et sa région de recrutement de AP-2 (« *Adaptor protein 2 complex* »), un intervenant nécessaire dans l'endocytose par des cages de clathrines. Enfin, des études récentes établissent un lien direct entre SNX9 et N-WASP, la forme neuronale de WASP (Yarar et al., 2007; Shin et al., 2007). SNX9 participerait à l'activation et au recrutement de N-WASP à la membrane, couplant ainsi le remodelage de la membrane et la dynamique de l'actine avec l'endocytose. Puisque l'aldolase peut interagir avec SNX9 et WASP, il est possible que la relation entre SNX9 et N-WASP s'inscrive dans un contexte où leur interaction respective avec l'aldolase soit à considérer comme mécanisme de régulation.

1.3.6.8 *H⁺-ATPase vacuolaire*

Pour contrôler l'acidification de certaines organelles et la balance du pH dans les reins, les cellules utilisent entre autres une pompe H^+ -ATPase vacuolaire (V-ATPase). Cette pompe composée de plusieurs sous-unités couple l'hydrolyse de l'ATP avec le transfert d'un proton de part et d'autre d'une membrane. Une étude a montré que la V-ATPase interagit via sa sous-unité E avec les isoformes A, B et C de l'aldolase (Lu et al., 2001). Il est intéressant de noter que cette interaction n'est pas affectée par la présence des substrats de l'aldolase, suggérant que son site de liaison à la V-ATPase et son site actif soient distincts. Des expériences dans des cellules de tubules proximaux du rein et des ostéoclastes ont également permis d'observer la colocalisation de l'aldolase et la V-ATPase. Par la suite, il a été montré que l'aldolase B peut interagir avec les sous-unités a et B de la V-ATPase (Lu et al., 2004). Chez la levure, le bon assemblage des sous-unités de la V-ATPase dépend de la présence de l'aldolase, tel qu'observé chez une levure mutante n'ayant plus l'aldolase. L'expression d'un vecteur contenant l'aldolase permet de restaurer par complémentation un assemblage normal de la V-ATPase. Étonnamment, l'aldolase humaine (classe I) et l'aldolase de levure (classe II) peuvent se substituer dans cette fonction chez la levure. Cette même étude a révélé que la GAPDH, tout comme l'aldolase, peut interagir avec la V-ATPase. Récemment, il a été montré qu'un certain mutant de

l'aldolase B humaine, Ala-318→Glu, tout aussi actif que l'enzyme native, perd sa capacité à lier la sous-unité B de la V-ATPase de levure (Lu et al., 2007). Lorsqu'exprimée chez la levure, cette aldolase mutante provoque le désassemblage de la V-ATPase et la rend disfonctionnelle. Il est intéressant de noter qu'un résidu Ala en position 318 semble conservé uniquement chez l'aldolase B de mammifères, alors qu'un Glu est présent chez la majorité des aldolases de classe I (Hannaert et al., 2003). Les interactions entre l'aldolase et la V-ATPase établissent un couplage possible entre le métabolisme intermédiaire glycolytique, qui produit deux moles d'ATP par mole de glucose, avec la pompe V-ATPase, qui utilise l'hydrolyse de l'ATP pour effectuer le transport transmembranaire de protons.

1.3.6.9 *Autres enzymes glycolytiques*

Des expériences *in vitro* ont montré que l'aldolase peut former un complexe avec différentes enzymes glycolytiques (Batke, 1989), comme la phosphofruktokinase (Orosz et al., 1988), la GAPDH (Ovadi et Keleti, 1978), la TIM (Keleti et al., 1989) et la pyruvate kinase (Walsh et Knull, 1988). Ces complexes ont des constantes de dissociation de l'ordre de quelques μM , en dessous de la concentration cellulaire de ces enzymes qui est d'environ 100 μM et plus en moyenne (Srivastava et Bernhard, 1986; Misset et al., 1986). Néanmoins, le rôle physiologique précis de ces interactions est peu documenté. Évidemment, on pourrait supposer que ces interactions servent à créer des complexes multienzymatiques rassemblant des enzymes d'une même voie métabolique. Un rôle hypothétique pour l'interaction de l'aldolase avec la GAPDH pourrait être l'effet de canalisation du substrat (« *substrate channeling* ») (Chumachenko, 1994; Ouporov et al., 2001). Cette notion propose que deux enzymes consécutives dans une voie métabolique interagissent ensemble de sorte que le produit de l'une, qui est le substrat de l'autre, ne diffuse pas librement dans le milieu, mais passe plutôt directement du site actif de l'une à l'autre grâce à leur proximité. Ainsi, le G3P produit par l'aldolase passerait directement vers le site actif de la GAPDH.

1.3.6.10 *Protéines S100*

Les protéines S100 sont de petites protéines acides de faibles poids moléculaires dont la principale fonction est de réguler l'activité de leur partenaire d'interaction de façon calcium-dépendante ou non (Zimmer et al., 2003). Dans le cas présent, des membres de cette famille lient l'aldolase et certains parmi eux activent l'aldolase par un facteur 2 environ, ce qui n'est pas négligeable (Zimmer et Van Eldik, 1986). Dans le cas particulier de S100A1, il a été montré que cette protéine pouvait agir à titre de chaperone et protéger l'aldolase et d'autres enzymes de l'agrégation causée par la chaleur (Okada et al., 2004).

1.3.6.11 ADN et ARNm

Des études rapportent que l'aldolase peut interagir avec certains acides nucléiques. En effet, il a été montré par chromatographie d'affinité que l'aldolase peut former un complexe avec la région contenant des répétitions terminales longues (« *long terminal repeat* ») du gène de la particule de type A intracisternale (Ronai et al., 1992). Cette observation soulève un questionnement sur le rôle potentiel de l'aldolase dans le noyau. Les éléments de séquence et/ou de structure responsables de cette interaction n'ont pas été identifiés. Aussi, l'aldolase et la GAPDH ont démontré une interaction spécifique avec la région 3' non traduite de l'ARNm de la chaîne lourde de la myosine (Kiri et Goldspink, 2002). Une hypothèse est avancée sur le fait que les enzymes glycolytiques, de par leur interaction avec cet ARNm et avec des éléments du cytosquelette, joueraient un rôle dans sa localisation cellulaire. Par ailleurs, les aldolases A et C, mais pas l'aldolase B, ont montré une interaction par Northwestern et modification de migration électrophorétique avec une séquence de 68 nucléotides chevauchant la région codante et 3' non traduite de l'ARNm du neurofilament léger (Canete-Soler et al., 2005). Étonnamment, cette interaction est compétitive avec celle de la protéine de liaison aux poly-A et elle agirait sur la stabilité de l'ARNm en augmentant sa dégradation par clivage endonucléolitique. Cette interaction pourrait être impliquée dans le maintien de l'importante asymétrie présente dans les neurones. Par la suite, il a été montré que l'aldolase C peut en fait agir comme une ribonucléase clivant cet ARNm à divers sites en aval et en amont du codon de terminaison (Stefanizzi et Canete-Soler, 2007). À noter, la présence de zinc accentue la dégradation de

cet ARNm par un mécanisme inconnu, qui pourrait être une action directe sur l'ARNm lui-même et/ou sur l'activité ribonucléolotique de l'aldolase C.

1.3.6.12 *Inositols-phosphates*

L'aldolase est également en mesure d'interagir avec des inositols-phosphates (I-P), à divers degrés, selon la distribution des phosphates sur le cycle inositol (Koppitz et al., 1986). Considérant la concentration importante d'aldolase dans la cellule, cette observation n'est pas négligeable puisque les I-P jouent des rôles physiologiques importants dans plusieurs réponses cellulaires et leur métabolisme est très dynamique (Irvine et Schell, 2001; Abel et al., 2001). L'aldolase interagit avec divers I-P : I-1-P, I-4-P, I-1,4-P₂, I-2,4-P₂, I-4,5-P₂, I-1,4,5-P₃, I-1,3,4-P₃, I-2,4,5-P₃, I-1,3,4,5-P₄, I-1,3,4,5,6-P₅, I-1,2,3,4,5,6-P₆ (acide phytique). Le plus connu d'entre eux et le plus caractérisé est probablement le I-1,4,5-P₃, qui agit à titre de second messenger dans la cellule. Les constantes d'inhibition de ces I-P pour l'aldolase varient du μM (ex : I-1,4,5-P₃) au mM (ex : I-4-P). Des études de liaison du I-1,4,5-P₃ et de mutagenèse dirigée sur l'aldolase C ont été effectuées pour déterminer le site d'interaction et les propriétés de la liaison (Baron et al., 1995; Baron et al., 1998; Baron et al., 1999). Ceci permet de confirmer que le I-1,4,5-P₃ inhibe compétitivement l'aldolase C. Le site de liaison doit vraisemblablement être le site actif ou à proximité car des mutants de Arg-42, Lys-107 et Arg-148 lient moins efficacement le I-1,4,5-P₃. Enfin, l'interaction de l'aldolase C avec le I-1,4,5-P₃ s'avère significative dans des conditions plus physiologiques, c'est-à-dire en tenant compte de la concentration libre de I-1,4,5-P₃ avant et après une stimulation cellulaire, la température et la force ionique. Un modèle propose que l'aldolase agirait comme un réservoir de I-1,4,5-P₃ cellulaire pouvant être relâché rapidement. Ce dernier serait libéré par des compétiteurs, venant par exemple de voies métaboliques ou de signalisation, et dont la concentration croissante déplacerait le I-1,4,5-P₃ lié à l'aldolase. Le I-1,4,5-P₃ ainsi libéré pourrait alors jouer son rôle de second messenger.

1.3.6.13 *Importances des interactions*

On constate donc que l'aldolase est bien plus qu'une enzyme impliquée uniquement dans le métabolisme glycolytique de la cellule. Les interactions multiples découvertes pour cette enzyme doivent vraisemblablement permettre la modulation de la voie glycolytique dans divers contextes cellulaires. Les partenaires de l'aldolase seront également affectés par leur liaison avec cette dernière et l'effet d'activation ou d'inhibition sera transmis à leur voie ou métabolisme respectif. Néanmoins, aucune de ces interactions n'a été documentée au point de vue structural et les bases moléculaires du mode de liaison de l'aldolase à ses partenaires demeurent inconnues.

Les interactions de l'aldolase avec plusieurs partenaires ayant un lien direct ou indirect avec l'organisation du cytosquelette suggèrent un rôle important pour l'aldolase dans la régulation de cette structure cellulaire complexe et dynamique. Le cytosquelette est abondant dans la cellule et constitue le siège de nombreux processus cellulaires. Ainsi, au fur et à mesure que les recherches portant sur les interactions aldolase-cytosquelette progresseront, il ne faudra pas s'étonner de découvrir que l'aldolase constitue un joueur important dans la coordination et la régulation d'évènements dépendants du cytosquelette. Aussi, tel qu'observé pour le complexe ternaire Glut4-aldolase-F-actine, la fonction de « pont » de l'aldolase entre le cytosquelette et d'autres partenaires doit vraisemblablement être cruciale dans la localisation d'évènements cellulaires.

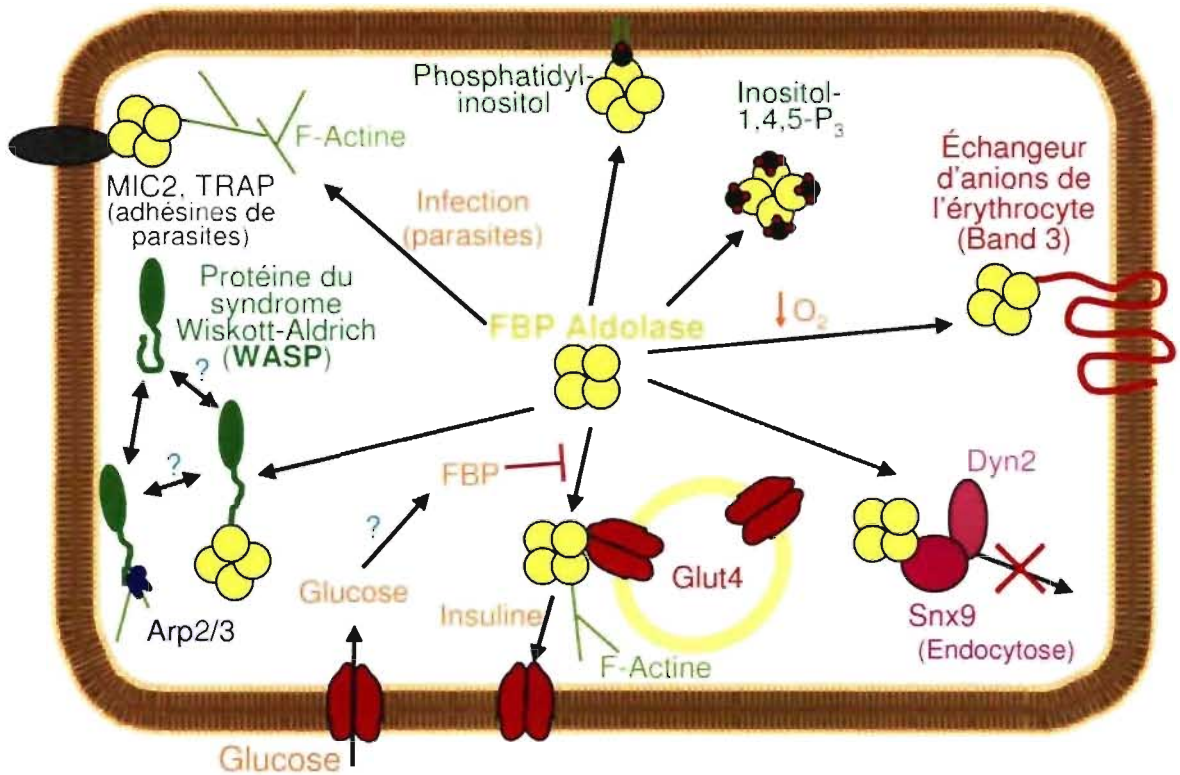


Figure 1.10 Interactions de l'aldolase glycolytique avec divers partenaires.

L'aldolase glycolytique peut former des complexes avec plusieurs partenaires cellulaires. Quelques exemples de ces complexes sont illustrés (se référer au texte pour une liste plus exhaustive).

1.4 Description du projet de recherche

1.4.1 Objectif général

Le présent projet de recherche vise à mieux comprendre, d'un point de vue structural, les fonctionnalités de catalyse et d'interaction de la FBP aldolase de mammifères. Une compréhension plus approfondie des activités de cette enzyme est nécessaire pour entre autres développer de façon rationnelle des inhibiteurs spécifiques potentiellement utiles dans une thérapie anti-cancéreuse, les cellules cancéreuses étant fortement dépendantes de l'ATP glycolytique pour répondre à leurs besoins accrus en énergie (Warburg, 1930). De plus, afin de créer rationnellement des inhibiteurs spécifiques d'aldolases de classe I de bactéries ou de parasites pouvant infecter l'humain, il est nécessaire d'exploiter les différences mécanistiques ou structurales qui existent entre ces enzymes et celle des mammifères. Dans cette optique, notre étude structurale apportera de précieuses informations relatives aux aldolases de mammifères. Aussi, la capacité de l'aldolase à former un lien carbone-carbone suscite un intérêt certain pour son mécanisme catalytique en synthèse organique. De surcroît, il serait très intéressant de découvrir le site de liaison d'un partenaire protéique de l'aldolase puisque ceci nous aiderait à mieux comprendre l'étendu du rôle de cette enzyme dans la dynamique cellulaire. Nous allons donc tenter de répondre à des questions fondamentales concernant la FBP aldolase qui sont encore aujourd'hui sans réponse, bien que cette enzyme ait été l'une des premières à être étudiées, il y a de ça 70 ans. Ceci ajoute un défi supplémentaire aux recherches que nous allons mener. En effet, un bagage impressionnant de littérature a été publié sur le sujet. Ainsi, lorsque nous proposons une explication à un phénomène donné, nous devons la confronter à bon nombre de recherches précédentes, dont une grande partie datent des années 1950 à 1990. Nous nous sommes fait un devoir de méticuleusement passer en revue les résultats expérimentaux obtenus par nos prédécesseurs. L'avantage majeur de travailler sur un sujet très documenté par plusieurs techniques différentes est qu'une hypothèse pouvant expliquer la majorité des faits observés jusqu'à présent acquiert une grande crédibilité. À plusieurs reprises durant ce projet, ce fût de nous convaincre nous-mêmes que

nous avons une explication satisfaisante et valable qui s'avéra le plus difficile. Confronter ses propres hypothèses est souvent la meilleure stratégie à adopter pour les valider ou les infirmer.

Chacun des trois objectifs spécifiques présentés ci-après répond à une question non résolue concernant l'aldolase; deux de ces questions portent sur la catalyse enzymatique, tandis que la troisième s'intéresse au site d'interaction de l'aldolase avec d'autres partenaires. Dans le mécanisme catalytique de l'aldolase de muscle de lapin, la formation des intermédiaires réactionnels implique plusieurs étapes, dont deux importantes pour lesquelles les résidus impliqués demeurent incertains. Nous proposons de découvrir ces deux entités, preuves structurales à l'appui. Aussi, bien que plusieurs études rapportent l'interaction de l'aldolase avec divers partenaires protéiques, le mode de liaison demeure inconnu. Nous tenterons donc de localiser le site de liaison d'un de ces partenaires.

1.4.2 Objectifs spécifiques

1.4.2.1 *Résidu responsable du clivage et de la condensation aldolique*

Dans le mécanisme de l'aldolase, pour passer de la DHAP-énamine au FBP-iminium ou inversement (Figure 1.8, intermédiaires 3 et 4), la protonation du G3P O3 (condensation aldolique) ou l'abstraction du proton du FBP O4 (clivage) doit avoir lieu. Cette étape engendre la formation ou le clivage du lien carbone-carbone C3-C4 du FBP, propre à la FBP aldolase. Le résidu responsable n'a pas été clairement identifié chez les FBP aldolases de classe I de mammifères. Des études de mutagenèse dirigée ont été effectuées pour le trouver (Morris et Tolan, 1993; Morris et Tolan, 1994; Choi et al., 2001; Maurady et al., 2002). Cependant, l'analyse des cinétiques de mutants peut habituellement nous indiquer seulement si le résidu est impliqué ou non dans le mécanisme de l'enzyme, et difficilement nous révéler l'identité d'un résidu impliqué dans une étape précise. Pour identifier directement le résidu responsable de cette étape du mécanisme de la FBP

aldolase, nous avons utilisé la résolution de structures par cristallographie et diffraction des rayons X. Les résultats de cette étude sont présentés au chapitre 2.

1.4.2.2 *Résidu responsable du transfert stéréospécifique du proton*

Dans le mécanisme catalytique, un proton doit être stéréospécifiquement abstrait (condensation aldolique) ou ajouté (clivage) au niveau du DHAP C3. Cette réaction permet l'interconversion entre l'iminium et l'énamine formés avec le DHAP (Figure 1.8, intermédiaires 2 et 3). Le proton transféré est invariablement le pro(*S*), qui est en fait dans la même orientation que le C4 du FBP, assurant ainsi la conservation de la chiralité de la réaction au C3. Sans cette protonation de l'énamine suite au clivage du FBP, l'aldolase resterait prise avec le DHAP et ne pourrait libérer ce produit. À ce jour, le résidu responsable n'a pas été identifié de façon convaincante (Rutter et al., 1961; Morris et Tolan, 1993; Choi et al., 2001). Pour élucider cette question, dans notre étude rapportée au chapitre 3, nous avons utilisé principalement la résolution de structures par cristallographie et diffraction des rayons X et des cinétiques de marquage isotopique.

1.4.2.3 *Détails structuraux de l'interaction avec WASP*

Le nombre important d'interactions impliquant l'aldolase montre que cette enzyme joue bien plus qu'un rôle purement enzymatique dans la cellule. Plusieurs de ces interactions semblent avoir lieu au site actif de l'enzyme car elles inhibent l'enzyme et le substrat FBP peut abolir l'interaction. Néanmoins, le site précis d'interaction et les détails du mode de liaison demeurent inconnus. Pour être en mesure d'apprécier le rôle de l'aldolase glycolytique dans la dynamique cellulaire, il est primordial d'explorer cette facette mal comprise de l'enzyme. Dans notre étude décrite au chapitre 4, nous ciblons l'interaction de l'aldolase avec la protéine WASP, impliquée dans la dynamique de l'actine dépendante de Arp2/3. Nous avons résolu la structure cristallographique d'un complexe obtenu par co-cristallisation entre l'aldolase et un peptide de WASP, dont l'interaction avec l'aldolase avait été préalablement détectée (Buscaglia et al., 2006). Nous avons aussi déterminé la structure de l'aldolase liée à un nouvel inhibiteur utilisant le même site de liaison que WASP.

1.4.3 Méthodologie

1.4.3.1 Purification et cristallisation de l'aldolase de muscle de lapin

Pour obtenir facilement les grandes quantités d'aldolase nécessaires à ce projet de recherche, l'emploi d'un système recombinant de surexpression bactérienne est nécessaire. Le plasmide utilisé contenant l'aldolase de muscle de lapin est pPB14, dont l'expression est sous le contrôle du promoteur *trc*, construit par l'équipe du Dr Dean R. Tolan de *Boston University* (Beernink et Tolan, 1992; Morris et Tolan, 1993). Les bactéries *Escherichia coli* compétentes commerciales utilisées sont des BL21-SI (Invitrogen). Un litre de culture bactérienne peut produire environ 100 mg d'aldolase recombinante.

La purification de l'aldolase de muscle de lapin s'effectue par trois étapes chromatographiques. Tout d'abord, le culot bactérien est broyé avec de l'oxyde d'alumine, à l'aide d'un mortier/pilon, sur glace. Après récupération et centrifugation du lysat cellulaire, le surnageant est passé à travers un échangeur anionique de type DEAE (diéthylaminoéthane). Compte tenu du pI élevé de l'aldolase de muscle de lapin (pI ~ 8.5), elle n'adhère pas à la résine DEAE à pH neutre, contrairement à la majorité des protéines de *Escherichia coli*. Ensuite, la solution est passée à travers un échangeur cationique de type CM (carboxyméthyl). L'aldolase adhère bien à cette résine à pH neutre. Pour éluer l'enzyme, une solution de FBP est appliquée sur la colonne. L'aldolase pure ainsi obtenue est mise à précipiter par dialyse dans une solution saturée à 70% en sulfate d'ammonium. La protéine est ensuite solubilisée et passée à travers un tamis moléculaire de type Superdex200 pour s'assurer de l'homogénéité de la solution protéique. Souvent, une très faible population de haut poids moléculaire est détectée et peut être facilement éliminée. L'enzyme pure finalement obtenue est utilisée pour la cristallisation ou mise à précipiter pour la conservation.

Afin d'obtenir des cristaux, l'aldolase est d'abord dialysée dans un tampon de faible force ionique (Tris 20 mM pH 7.0) puis concentrée jusqu'à 10 mg/mL. La concentration de

la protéine est déterminée par spectrophotométrie, en utilisant un coefficient d'extinction de $0.91 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 280 nm (Baranowski et Niederland, 1949). L'enzyme est ensuite mélangée en proportion égale avec un tampon de cristallisation, contenant un agent précipitant (0.1 M Na-HEPES, 15% à 20% polyéthylène glycol 4000), et placée dans une chambre étanche pour la cristallisation par la méthode de la goutte suspendue (décrite ci-après). Des cristaux de bonnes dimensions en forme de minces plaquettes croissent en environ une semaine.

1.4.3.2 *Résolution de structures par cristallographie et diffraction des rayons X*

L'analyse de structures tridimensionnelles est un outil important dans l'obtention d'informations sur la catalyse enzymatique et les interactions protéiques. Deux techniques s'imposent dans ces études : la RMN et la cristallographie. Dans les deux cas, l'échantillon doit être actif, soluble à haute concentration et idéalement monodispersé (une seule population homogène de molécules existe). Les deux techniques comportent des avantages et des inconvénients. Le principal avantage de la RMN est le fait qu'on étudie la protéine sous sa forme soluble, permettant ainsi un passage rapide de la production de la protéine à son analyse structurale, laquelle nous informe sur la dynamique de la protéine en temps réel. L'inconvénient majeur avec cette technique est lié à la taille des macromolécules étudiées qui ne peut dépasser environ 50 kDa, dans le cas où les détails des chaînes latérales sont nécessaires (Xu et al, 2006). Pour ce qui est de la détermination de structures par cristallographie des protéines et diffraction des rayons X, une limitation technique majeure est l'obtention de cristaux qui diffractent à haute résolution. La finesse des détails structuraux accessibles est directement dépendante de la résolution atteinte. Évidemment, la question à laquelle on veut répondre par cette technique dicte le niveau de résolution minimale nécessaire (Figure 1.11). Par exemple, une structure résolue à 3.0 Å de l'aldolase en complexe avec le DHAP serait suffisante pour identifier Lys-229 comme étant le résidu formant le lien covalent avec le substrat. Cependant, lorsque l'on veut discuter de la stéréospécificité de la réaction, une résolution en dessous d'environ 2.5 Å est grandement souhaitable. À partir de cette résolution, on peut déterminer avec une bonne précision l'orientation des groupements fonctionnels et la position des molécules d'eau. En dessous

de 2.0 Å, l'état d'hybridation des atomes devient aussi de plus en plus évident. Ces détails structuraux sont bien souvent accessibles uniquement par cristallographie et diffraction des rayons X. Naturellement, la qualité des données de diffraction collectées (« *mosaicity* » et facteur de corrélation des symétries) et les statistiques d'affinement de la structure détermineront également si la structure est de qualité, fiable et si elle a été résolue avec minutie. Toutefois, même si elles sont excellentes et constituent un bon indicateur, il faut demeurer critique face à des statistiques d'affinement. En effet, elles ne garantissent pas nécessairement la qualité de l'interprétation de la densité électronique de détails locaux pertinents à la discussion. Par exemple, le modelage d'un intermédiaire réactionnel au site actif implique l'utilisation de contraintes chimiques et géométriques, pouvant être spécifiées par le cristallographe, et qui peuvent varier très légèrement d'un intermédiaire à l'autre. Ceci rend donc l'appréciation d'autant plus difficile par les statistiques globales de la structure. À cet égard, les auteurs ont donc intérêt à générer des figures montrant clairement que leur interprétation de la densité électronique est de qualité et valide en ce qui concerne les détails structuraux discutés. Par ailleurs, un autre inconvénient de la résolution de structure par diffraction des rayons X est le besoin d'accéder à un faisceau de rayons X très puissant, lequel est habituellement requis pour obtenir des informations structurales à haute résolution pour des cristaux de protéines. Les synchrotrons sont les installations qui génèrent de tels faisceaux et leur accès est très restreint et dispendieux compte tenu de la technologie de pointe qu'on y retrouve.

La cristallographie, brièvement, est la science qui permet d'obtenir à partir d'une solution homogène de macromolécules des cristaux de cette macromolécule. Au contact de certains agents précipitants, comme des sels concentrés et/ou des polyéthylènes glycols, une protéine peut amorcer un processus d'association avec elle-même et former un précipité. Ce précipité peut être désordonné, formant un agrégat blanchâtre habituellement, ou ordonné, donnant ainsi naissance à des cristaux. Ce qu'on appelle cristal de protéine est donc un agencement tridimensionnel ordonné et répétitif des protéines de la solution initiale. Cette organisation est appelée maille cristalline et contient habituellement des éléments internes de symétrie. Selon la technique de cristallisation choisie, les conditions et la protéine, le processus de cristallisation peut prendre quelques heures à plusieurs

semaines, voire des mois. Dans notre cas, nous avons utilisé la technique de la goutte suspendue, qui utilise le principe de diffusion vapeur-vapeur pour favoriser la cristallisation (Figure 1.12). La protéine est mélangée à une solution de précipitant et placée au-dessus d'un réservoir de précipitant dans une chambre étanche. La diffusion de la vapeur d'eau de la goutte vers le réservoir de précipitant concentrera le précipitant et la protéine dans la goutte, favorisant la cristallisation. En fait, durant ce processus, le contenu de la goutte peut évoluer à travers quatre zones distinctes (Figure 1.13) (Ducruix et Giegé, 1992). La cristallisation dépend de la solubilité de la protéine en présence de l'agent précipitant. L'évaporation de la goutte doit augmenter suffisamment la concentration de la protéine et de l'agent précipitant pour atteindre une zone de nucléation, où des agrégats ordonnés de protéines (noyaux) se forment et agissent comme centres de nucléation pour amorcer le processus de cristallisation. La nucléation est souvent l'étape limitante dans la cristallisation. Une fois le processus débuté, la concentration de protéine soluble diminue pour tranquillement revenir à une zone métastable, où la croissance des cristaux se poursuit. Outre la goutte suspendue, il existe également d'autres techniques courantes de cristallisation. La technique de la goutte assise s'apparente beaucoup à la goutte suspendue au point de vue de la dynamique de la cristallisation, mais la goutte est déposée dans un léger creux à même la chambre étanche. Cette technique est plus rapide à réaliser, mais il est plus difficile d'observer les cristaux au microscope à cause de la réfraction du plastique sur lequel est déposée la goutte et les cristaux peuvent adhérer au plastique. Une autre technique est la cristallisation par « batch ». Cette dernière diffère de la goutte suspendue ou assise puisque la diffusion de vapeur n'intervient pas. La solution protéique et l'agent précipitant sont placés ensemble, non mélangés, dans un tube étanche. Les deux solutions se mélangent uniquement par diffusion, ce qui implique qu'il existe initialement une interface où la protéine et l'agent précipitant se rencontrent. Habituellement, c'est à l'interface où la nucléation se produit. Par ailleurs, au moment de la cristallisation, on peut également mettre dans la goutte un ligand d'intérêt pour que le complexe protéine-ligand cristallise; on parlera alors de co-cristallisation.

Dans le cas de l'aldolase de muscle de lapin, après une semaine de croissance, des cristaux de bonnes dimensions auront poussé (0.30 mm x 0.10 mm x 0.05 mm). On procède

alors à la sélection des meilleurs cristaux, homogènes et sans fissure apparente, et à leur prélèvement à partir de la goutte (Figure 1.12). Il est à noter que la manipulation et le taillage des cristaux demandent une certaine dextérité et qu'un léger faux mouvement peut réduire à néant plusieurs semaines de travail, par la perte de cristaux de grande qualité et difficilement obtenus. Avant de passer à la diffraction des rayons X, on peut procéder au trempage (« *soaking* ») d'un cristal dans une solution contenant un ligand d'intérêt, lequel diffusera alors dans le cristal. Cette technique est préférable à la co-cristallisation si on suspecte que le ligand puisse se dégrader si laissé trop longtemps en solution. Cependant, les conditions de cristallisation peuvent nuire à la solubilité de certains ligands; dans ce cas, de nouvelles conditions de cristallisation doivent être trouvées ou la co-cristallisation tentée. Le cristal est ensuite trempé dans une solution contenant un agent cryoprotecteur, comme du glycérol, pour éviter la formation de glace lors de la congélation subséquente. En effet, pour protéger le cristal de la dégradation par les rayons X, le cristal est rapidement placé sous un jet d'azote, à 100 K. Cette congélation permet aussi d'arrêter la catalyse d'une enzyme en restreignant grandement les mouvements moléculaires, permettant ainsi l'étude des intermédiaires réactionnels. Le cristal congelé est ensuite exposé à un puissant faisceau de rayons X durant de courts intervalles de temps pour obtenir des patrons de diffraction. La source de rayons X utilisée pour des études à haute résolution provient généralement d'un synchrotron, comme le *National Synchrotron Light Source* du *Brookhaven National Laboratory* à Upton (New York), ou l'*Advanced Photon Source* de l'*Argonne National Laboratory* à Argonne (Illinois). Pour ce qui est du phénomène de diffraction des rayons X par un cristal, il est associé à cette propriété intrinsèque que possèdent les électrons de pouvoir dévier/diffracter un faisceau de rayons X. Les photons du faisceau sont diffractés dans toutes les directions par les électrons, donnant lieu majoritairement à des interférences destructives entre les photons diffractés. Cependant, quand les électrons appartenant à des plans imaginaires régulièrement espacés dans le cristal diffractent des photons en phase, c'est-à-dire de façon constructive, un évènement de diffraction, appelé réflexion, devient visible sur le patron de diffraction (taches, « *spots* »). Autrement dit, tous les électrons du cristal diffractent/dévient dans toutes les directions des photons, lesquels interfèrent les uns avec les autres. Cependant, dans certaines

circonstances, les photons déviés sont en phase; ils s'additionnent donc ensembles, nous permettant de les mesurer sur un détecteur. Chacune des réflexions observées dépend de la disposition tridimensionnelle d'un des nombreux jeux de plans parallèles uniques auxquels appartiennent de près ou de loin les électrons du cristal. Puisque les électrons sont responsables du phénomène de diffraction, on parlera de carte de « densité électronique » dans les articles de structures cristallographiques. Durant la collecte de données, les réflexions sont observées sur un détecteur qui en mesure l'intensité durant un temps d'exposition, variant de quelques secondes à quelques minutes selon la puissance du faisceau de rayons X utilisé. La collecte se poursuit en faisant tourner le cristal sur 180° à l'aide d'un goniomètre, en enregistrant un patron de diffraction à tous les 0.5° environ. La position et l'intensité des réflexions sur chaque patron de diffraction sont dépendantes de la maille cristalline et de la disposition des électrons dans le cristal, respectivement, et constituent les informations utiles dont nous avons besoin. Des programmes informatiques, comme HKL2000 (Otwinowski et Minor, 1997), permettent ensuite la réduction de l'ensemble des données récoltées (réflexions), pour finalement obtenir un jeu de données uniques provenant de la sommation des réflexions de tous les patrons de diffraction. Ces données uniques sont par la suite utilisées pour résoudre la structure cristallographique (Figure 1.14). Différentes méthodes permettent la construction d'un modèle initial. L'objectif premier visé par toutes ces méthodes est cependant toujours le même, c'est-à-dire fournir aux programmes informatiques une piste de solution pour résoudre le problème de phase (« *phase problem* »). Ce problème tient son origine du fait que durant la collecte des rayons diffractés par le cristal, uniquement l'intensité des réflexions est mesurée; on perd leur phase, qui est intrinsèquement liée à la nature vectorielle des facteurs de structure que l'on mesure. Un facteur de structure, associé à chaque réflexion mesurée, est un nombre complexe (vecteur) constitué d'une amplitude (proportionnelle à la racine carrée de l'intensité mesurée) et d'une phase, information perdue durant l'expérience de diffraction. Ceci constitue le problème de phase qu'on va ensuite devoir solutionner pour obtenir un modèle initial et une densité électronique de notre structure cristallographique. Les méthodes couramment utilisées pour résoudre le problème de phase sont le remplacement moléculaire, le MAD (« *Multiple-wavelength Anomalous Dispersion* ») et le MIR

(« *Multiple Isomorphous Replacement* ») (Drenth, 1999). Le remplacement moléculaire utilise une structure déjà connue comme modèle de départ. Par exemple, il peut s'agir de la structure d'une protéine homologue. Le MAD utilise le fait que le pouvoir diffractant des atomes peut varier en fonction de la longueur d'ondes du faisceau de rayons X. En effet, selon le type d'atome, les caractéristiques de la diffraction peuvent se modifier brusquement autour d'une ou plusieurs longueurs d'onde données, correspondantes à l'énergie de certaines transitions électroniques. On parle alors de diffraction anormale ou de signal anomal. Cependant, dû à des limitations techniques, seuls les atomes lourds (ex : Se, Hg, Au, Pt, Zn, W, Os, Br) nous offrent la possibilité d'exploiter ce phénomène. Le sélénium est l'un des métaux lourds les plus utilisés de nos jours, puisqu'il est relativement facile d'obtenir un dérivé de notre protéine contenant de la séléno-méthionine. Typiquement, une expérience MAD comporte trois collectes de données cristallographiques, à des longueurs d'onde légèrement différentes, pour exploiter au maximum la variation du signal anomal de l'atome lourd. Il incombe donc d'utiliser une source de rayons X suffisamment puissante et des monochromateurs précis et performants. Les programmes informatiques peuvent ensuite analyser les collectes de données et le signal anomal, ce qui permet de calculer la localisation grossière des atomes lourds et d'ainsi obtenir des phases initiales. Pour sa part, le MIR utilise également des métaux lourds, mais cette fois davantage pour leur fort pouvoir diffractant que pour leur signal anomal, bien que ce dernier puisse également être considéré dans une expérience MIR. En pratique, un cristal natif est trempé dans une solution contenant un métal lourd. Dans le meilleur des cas, quelques atomes lourds lient uniformément les protéines du cristal, sans affecter l'organisation de la maille cristalline. On obtient alors un cristal dérivé isomorphe au cristal natif. Puisqu'ils diffractent intensément les rayons X, les atomes lourds sont plus faciles à localiser dans la maille cristalline par les programmes informatiques, permettant ainsi de calculer leur position et d'obtenir des phases initiales utilisables pour résoudre la structure. Suite à la résolution du problème de phase par remplacement moléculaire, MAD ou MIR, un modèle de la protéine est généré, sous la forme de coordonnées atomiques (x, y, z), lequel tente d'expliquer le mieux possible les réflexions observées. Ceci nous permet de calculer une carte de densité électronique, obtenue en utilisant les informations contenues à

la fois dans le modèle lui-même (phases) et les données cristallographiques (intensité mesurée de chaque réflexion). Notons que l'ajout de molécules d'eau dans un modèle cristallographique peut considérablement améliorer sa qualité et que les molécules d'eau peuvent jouer un rôle dans la catalyse enzymatique; elles ne doivent donc pas être négligées. Ensuite, nous allons inspecter le modèle et la densité électronique puis visuellement détecter la présence du ligand (si un trempage a été effectué) et bâtir sa structure moléculaire. Enfin, on procède à l'affinement du modèle et à sa validation, en fonction de divers critères : explication des données cristallographiques (facteurs R : R_{cryst} et R_{free}), base de données géométriques (liens, angles, graphique Ramachandran), facteur d'agitation thermique (facteur B). Les facteurs R sont importants car ils témoignent de la différence relative entre les données expérimentales et le modèle atomique proposé. Plus les facteurs R sont bas, plus le modèle proposé explique les données expérimentales. Pour la description mathématique de ces facteurs, consulter le Table 2.1. Par ailleurs, plus l'écart entre R_{cryst} et R_{free} est petit, meilleur est le modèle. En effet, le R_{free} évalue la différence relative entre le modèle proposé et des données expérimentales non utilisées par le programme lors de l'affinement, représentant environ 5 à 10% de l'ensemble des données uniques (Brünger, 1992). La comparaison entre R_{cryst} et R_{free} permet donc d'évaluer le biais introduit dans une structure lors de l'affinement. Un écart d'au plus 5 à 7% entre R_{cryst} et R_{free} est considéré acceptable habituellement. Lorsque la validation est jugée satisfaisante, le modèle est terminé et déposé dans la *Protein Data Bank* (PDB). Pour confirmer objectivement la présence d'un ligand suite à l'affinement de la structure, on calcule une carte d'omission par recuit simulé (« *simulated annealing omit map* ») (Hodel et al., 1992). Cette carte de densité électronique est calculée sans que le ligand ne soit considéré dans le modèle; on parle alors d'une carte non biaisée. C'est la façon courante dans les articles de structures cristallographiques de montrer qu'un ligand, ou tout autre partie de la structure qui nous intéresse, est bel et bien présent et correctement placé dans la densité électronique.

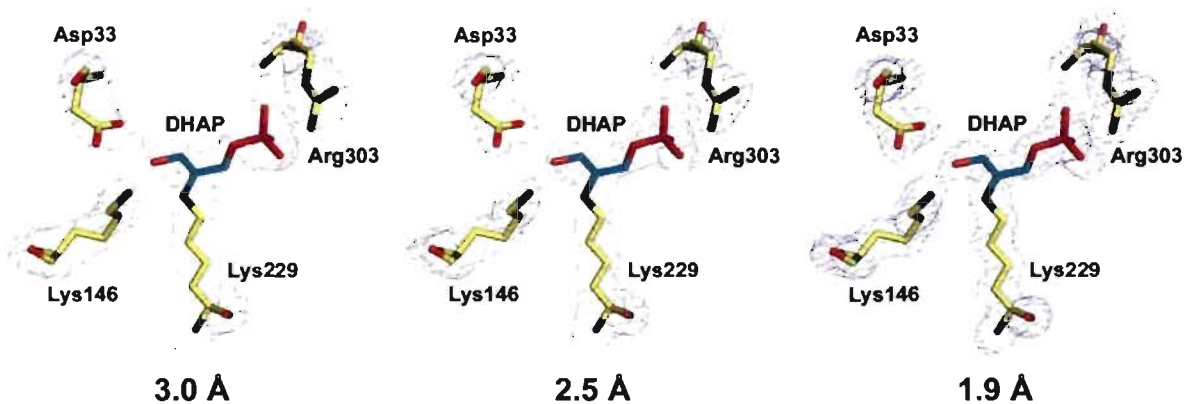


Figure 1.11 Cartes de densité électronique à différentes résolutions.

Les détails structuraux sont plus distincts lorsque la résolution diminue. Cependant, on parlera couramment de structures résolues à faible (3.0 Å), moyenne (2.5 Å) et haute (1.9 Å) résolutions. Dans l'exemple présent, la structure de l'aldolase liée au DHAP (PDB # 2QUT) a été utilisée pour calculer une carte de densité électronique à différentes résolutions. Même à faible résolution (3.0 Å), on voit la continuité de la densité entre Lys-229 et le DHAP. Pour observer des détails structuraux comme la disposition précise des atomes, une carte à haute résolution (1.9 Å) est néanmoins nécessaire.

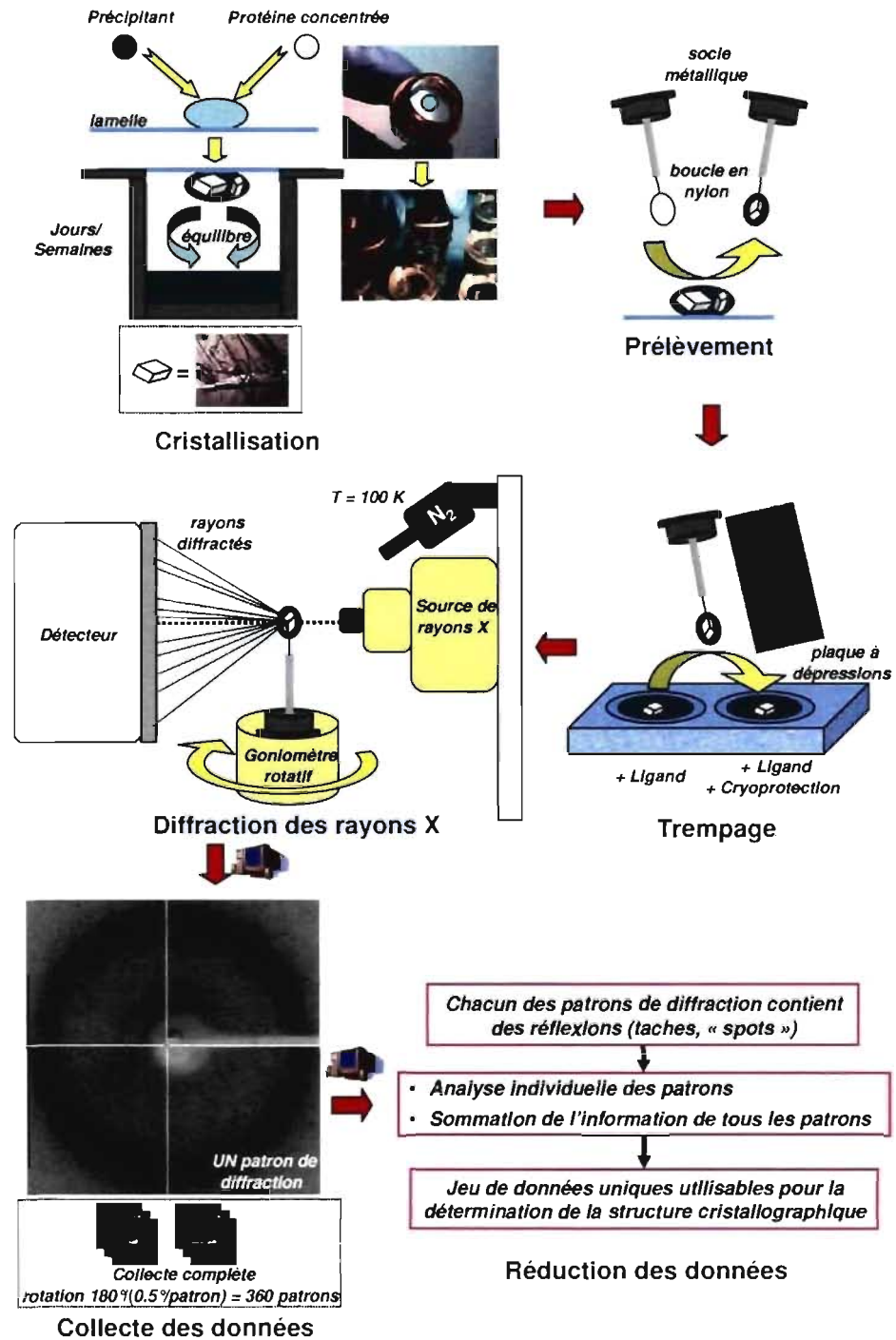


Figure 1.12 Méthodologie : de la cristallisation aux données finales de diffraction.

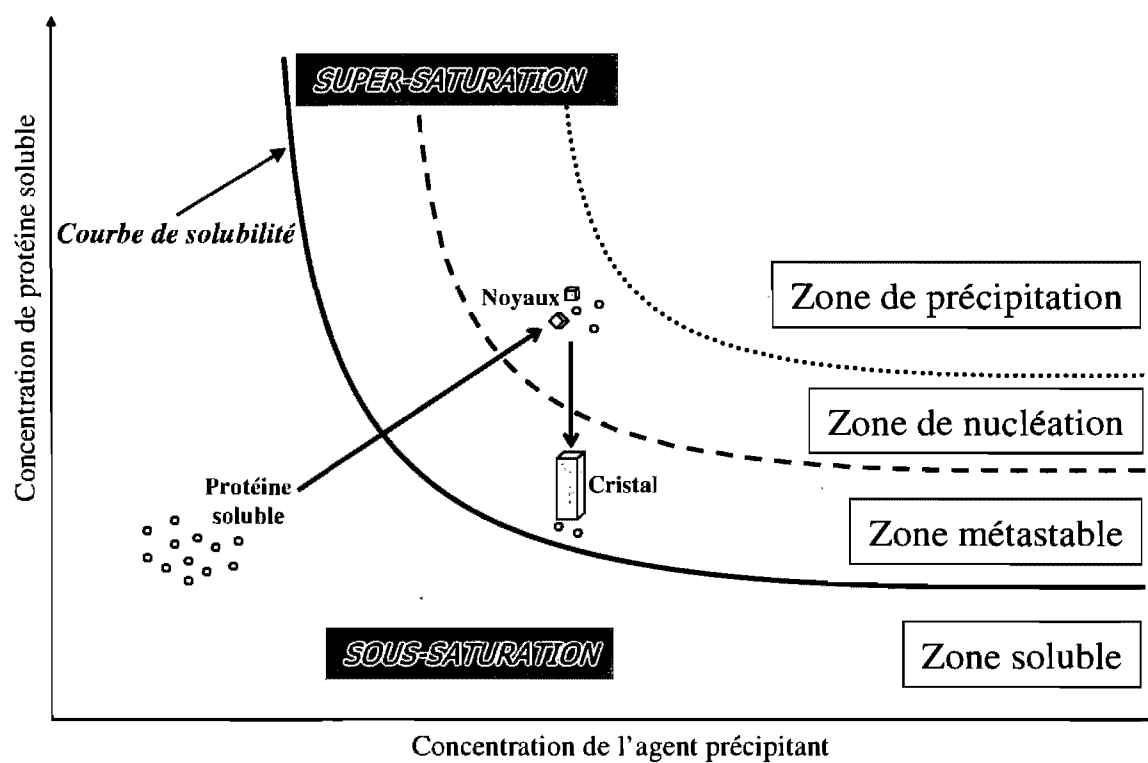


Figure 1.13 Évolution du processus de cristallisation.

Durant la cristallisation par goutte suspendue, la protéine et le précipitant se concentrent jusqu'à atteindre la zone de nucléation où des noyaux se forment. Ainsi, la concentration de protéine soluble diminue pour revenir vers la zone métastable, où les cristaux peuvent croître.

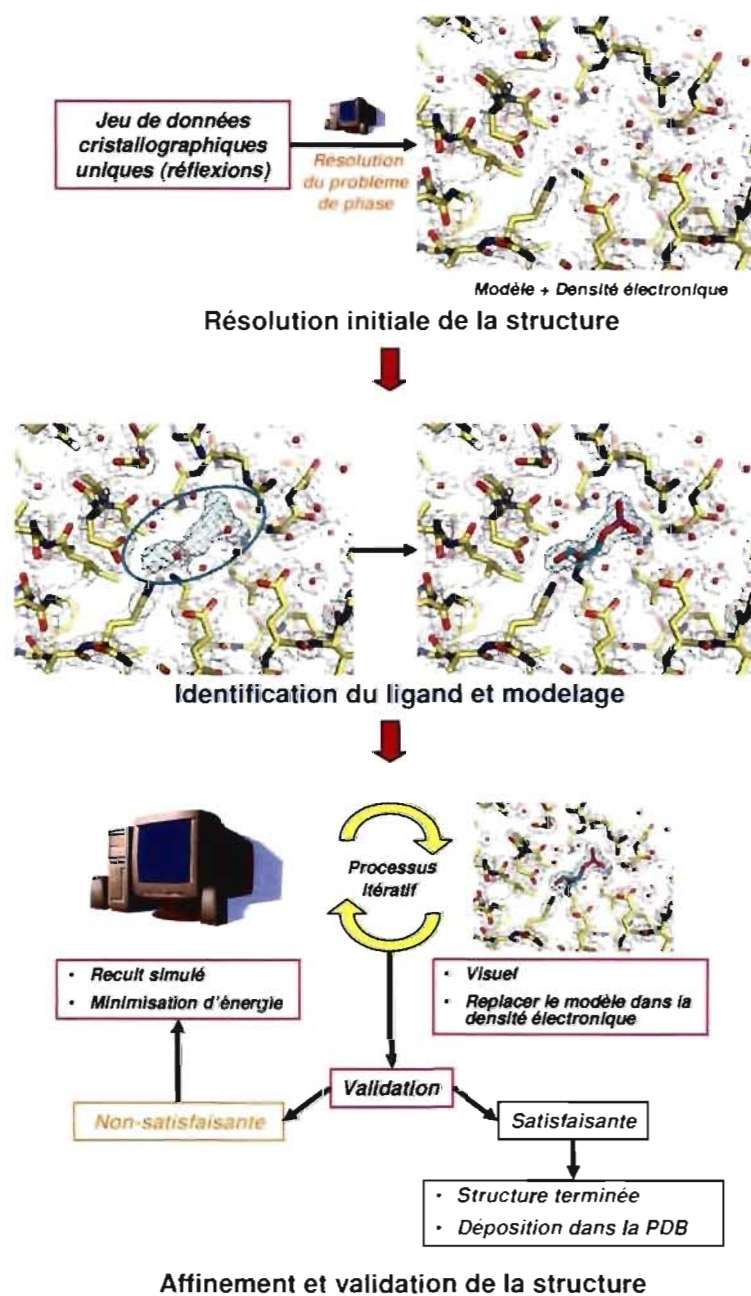


Figure 1.14 Méthodologie : de la résolution à la déposition d'une structure cristallographique dans la *Protein Data Bank*.

Quelques mots maintenant sur la validité *in vivo* des résultats obtenus par cristallographie. Il n'est pas rare que l'on reproche aux structures cristallographiques d'être statiques et que l'état cristallin n'est pas physiologique. Cependant, d'importantes nuances doivent être apportées à ces observations simplistes. En effet, bien qu'une structure cristallographique soit représentée par des coordonnées atomiques fixes, d'autres considérations permettent de juger de l'aspect dynamique d'une structure. Il faut savoir qu'une structure cristallographique de la PDB représente un modèle qui explique le mieux la densité électronique utilisée pour bâtir ce modèle. Or, cette densité résulte en fait de la sommation de l'ensemble du nuage d'électrons composant le cristal de protéine. Une région moins intense de la densité électronique suggère que cette portion de la protéine peut adopter plusieurs conformations, toutes coexistantes dans le cristal. Ainsi, par l'observation de la densité électronique d'une structure, on peut avoir une idée de la mobilité de diverses régions de la protéine dans le cristal. Si une région est trouvée mobile dans le cristal, il est probable qu'elle le soit en solution; le contraire n'est cependant pas nécessairement vrai. De concert avec l'intensité de la densité électronique, l'analyse des facteurs *B* atomiques (agitation thermique) révèle également des indices sur la mobilité relative de certaines régions. Il revient au cristallographe de tenir compte de ces critères lors de ses conclusions. Pour ce qui est de l'état cristallin qui semble très loin d'une protéine soluble, il convient de remettre en perspective le contexte cellulaire. On oublie trop souvent que la cellule n'est pas un milieu dilué où les intervenants se déplacent librement. Au contraire, la cellule est comme un gel très concentré où les macromolécules sont contraintes dans leurs mouvements (Luby-Phelps, 2000). En fait, la concentration des macromolécules cellulaires peut atteindre jusqu'à 400 g/L, représentant environ 30% du volume total occupable, ce qui est énorme (Ellis, 2001a; Ellis, 2001b). Ce phénomène important, souvent négligé, est appelé encombrement moléculaire (« *molecular crowding* »). Il est étonnant de constater que bon nombre d'expériences *in vitro* classiques en biochimie, comme des co-immunoprécipitations, sont effectuées dans des conditions diluées autour de 1 g/L (communication personnelle, P.-L. Tanguay), un milieu donc très loin du cytoplasme. Par

contre, dans la plupart des cristaux de protéine, la répartition du volume occupé solvant:protéine est d'environ 45:65. Dans le cas des cristaux d'aldolase de muscle de lapin utilisés dans ce projet, ceci correspond à une concentration cristalline en aldolase d'environ 700 g/L. Ainsi, il n'est pas impensable que certains contacts cristallographiques puissent interférer dans la dynamique de l'enzyme. Cependant, cette concentration est plus représentative de l'encombrement moléculaire retrouvé dans une cellule que dans beaucoup d'expériences dites en solution.

Dans les trois articles qui constituent le corps de ce projet de recherche, la résolution de structure par cristallographie et diffraction des rayons X représente la pierre angulaire ; elle est à la base de la majorité de nos résultats et conclusions. Sous la supervision du Dr Jurgen Sygusch, un pionnier dans le domaine de l'enzymologie structurale, une application rigoureuse de cette technique a permis d'obtenir des structures cristallographiques de qualité, et une attention toute particulière a été portée aux détails des sites actifs. Deux approches cristallographiques ont été utilisées dans nos travaux : le trempage et la co-cristallisation avec des ligands. Pour les articles présentés aux chapitres 2 et 3, portant sur l'étude du mécanisme de l'enzyme, la technique de trempage a été utilisée. Des cristaux d'aldolase de muscle de lapin, native ou mutante, ont été trempés dans des solutions contenant divers substrats et inhibiteurs. Pour l'article du chapitre 2, portant sur le résidu responsable de l'étape de clivage et de condensation aldolique, trois trempages distincts avec l'enzyme native ont été effectués, soient avec du FBP, de l'hexitol-1,6-bisphosphate (HBP), et du TBP, les deux derniers étant des inhibiteurs compétitifs. Pour l'article du chapitre 3, portant sur le transfert du proton, trois trempages ont également été effectués, soient deux avec l'enzyme native (DHAP et P_i) et un avec le mutant Lys-146→Met (DHAP). Pour ce qui est de l'article du chapitre 4, portant sur le complexe WASP-aldolase, nous avons co-cristallisé, en collaboration avec Dr Tina Izard, l'aldolase de muscle de lapin en présence d'un peptide représentant les 15 acides aminés C-terminaux de WASP, région connue pour interagir avec l'aldolase (Buscaglia et al., 2006). Aussi, à partir de la structure de ce complexe, nous avons découvert un nouvel inhibiteur de l'aldolase. Nous avons donc effectué un trempage avec cet inhibiteur pour déterminer son site de liaison.

1.4.3.3 Cinétiques de marquage isotopique

Dans l'article portant sur le transfert du proton du DHAP, nous rapportons, en plus des structures cristallines, des vitesses d'échange $^3\text{H}/^1\text{H}$ au C3 du DHAP. L'expérience est relativement simple et utilise un protocole décrit dans la littérature (Rose, 1958). En incubant l'aldolase en présence de DHAP et d'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$), on peut mesurer la vitesse de marquage du DHAP, qui correspond à la vitesse à laquelle l'aldolase peut échanger le ^1H pro(*S*) en C3 du DHAP pour un ^3H . Par cette technique, nous montrons que même dans l'état cristallin, l'aldolase demeure active, bien que ralentie par un facteur d'environ 200 par rapport à l'enzyme soluble. Cette information corrobore l'idée que l'entassement cristallin puisse interférer, à divers degrés, avec l'activité catalytique d'une enzyme. Nous avons par ailleurs vérifié, bien que ces résultats n'ont pas été inclus dans l'article, que l'enzyme cristalline ne perdait pas sa stéréospécificité pour le proton pro(*S*) du C3. Pour ce faire, le DHAP marqué au tritium par l'aldolase cristalline est simplement récupéré et incubé avec de l'aldolase ou de la TIM de muscle de lapin solubles, cette dernière échangeant stéréospécifiquement le proton pro(*R*) du DHAP C3. Nous avons donc été en mesure de montrer que le DHAP marqué en C3 par l'aldolase cristalline perdait la totalité de sa radioactivité en présence d'aldolase soluble, mais que la TIM n'était pas en mesure d'éliminer ce tritium. Nos cristaux d'aldolase conservent donc leur stéréospécificité pour le proton pro(*S*) du DHAP C3.

CHAPITRE 2

Des structures cristallographiques d'intermédiaires catalytiques de l'aldolase de muscle de lapin révèlent des implications pour le clivage du substrat et la complémentarité induite

Mise en contexte

L'aldolase occupe une place charnière dans la glycolyse, en ce sens où elle assure le passage de la portion hexose-bisphosphate à la portion triose-phosphate. La capacité de l'aldolase à cliver un lien carbone-carbone est donc capitale. Néanmoins, l'identité du résidu catalysant l'abstraction du proton du FBP O4 (Figure 1.3), menant au clivage du FBP, demeure incertaine.

Nous avons donc entrepris de déterminer à haute résolution la structure de l'aldolase de muscle de lapin en complexe avec le FBP et deux inhibiteurs compétitifs analogues au FBP, le HBP et le TBP. Le piégeage de l'intermédiaire FBP-iminium avec l'enzyme permet d'observer les résidus impliqués dans la liaison du substrat et les changements structuraux qui l'accompagnent. Aussi, on observe que Glu-187 interagit avec FBP O4, ce qui suggère très fortement que ce résidu soit responsable de l'abstraction du proton menant du clivage du FBP.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans un article intitulé « *High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit* » dans *The Journal of Biological Chemistry* en 2005. Dans cette étude, j'ai effectué trois collectes de données cristallographiques et Julien Lafrance-Vanasse la quatrième. J'ai résolu les quatre structures et Julien Lafrance-Vanasse et Brigitte Liotard ont participé à l'affinement de deux d'entre elles avec moi-même. J'ai procédé à l'analyse finale des structures et à leur déposition dans la PDB, ainsi que produit la majorité des figures et participé à la rédaction du manuscrit avec Dr Jurgen Sygusch.

Article 1.
**High Resolution Reaction Intermediates of Rabbit Muscle
Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase: Substrate Cleavage and
Induced Fit**

Miguel St-Jean, Julien Lafrance-Vanasse, Brigitte Liotard and Jurgen Sygusch

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

Address correspondence to: Jurgen Sygusch, Biochimie/Médecine, Université de Montréal,
CP 6128, Station Centre Ville, Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada, Tel: 1-514-343-2389, Fax:
1-514-343-6463, E-mail: XXXXXXXXXX

J. Biol. Chem., 2005, **280** (29), 27262-27270

“Reprinted with permission from: Miguel St-Jean, Julien Lafrance-Vanasse, Brigitte Liotard and Jurgen Sygusch. “High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit.” *J. Biol. Chem.*, 280 (29), 27262-27270 (2005). ©2005, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* Reprinted with permission from *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*”

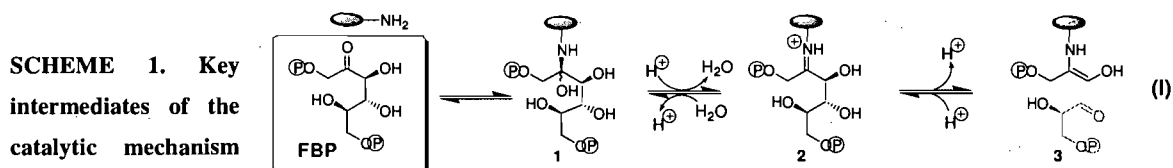
ABSTRACT

Crystal structures were determined to 1.8 Å resolution of the glycolytic enzyme fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase trapped in complex with its substrate and a competitive inhibitor, mannitol-1,6-bis(phosphate). The enzyme substrate complex corresponded to the postulated Schiff base intermediate and has reaction geometry consistent with incipient C₃-C₄ bond cleavage catalyzed by Glu-187, which is adjacent to the Schiff base forming Lys-229. Atom arrangement about the cleaved bond in the reaction intermediate mimics a pericyclic transition state occurring in nonenzymatic aldol condensations. Lys-146 hydrogen-bonds the substrate C₄ hydroxyl and assists substrate cleavage by stabilizing the developing negative charge on the C₄ hydroxyl during proton abstraction. Mannitol-1,6-bis(phosphate) forms a noncovalent complex in the active site whose binding geometry mimics the covalent carbinolamine precursor. Glu-187 hydrogen-bonds the C₂ hydroxyl of the inhibitor in the enzyme complex, substantiating a proton transfer role by Glu-187 in catalyzing the conversion of the carbinolamine intermediate to Schiff base. Modeling of the acyclic substrate configuration into the active site shows Glu-187, in acid form, hydrogen-bonding both substrate C₂ carbonyl and C₄ hydroxyl, thereby aligning the substrate ketose for nucleophilic attack by Lys-229. The multifunctional role by Glu-187 epitomizes a canonical mechanistic feature conserved in Schiff base forming aldolases catalyzing carbohydrate metabolism. Trapping of tagatose-1,6-bis(phosphate), a diastereoisomer of fructose-1,6-bis(phosphate), displayed stereospecific discrimination and reduced ketohexose binding specificity. Each ligand induces homologous conformational changes in two adjacent α -helical regions that promote phosphate binding in the active site.

INTRODUCTION

Aldolases are ubiquitous enzymes and have been subject of continuous interest because of their ability to catalyze carbon-carbon bond formation in living organisms. Their role is best known in glycolysis where fructose-1,6-bis(phosphate) (FBP) aldolases (EC 4.1.2.13) promote the reversible cleavage of FBP to triose phosphates, D-glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone-phosphate (DHAP). The class I enzyme uses covalent

catalysis implicating a Schiff base formed between a lysine residue on the enzyme and a ketose substrate. In vertebrates, there are three tissue-specific class I aldolases (aldolase A (found in skeletal muscle and red blood cells), aldolase B (found in liver, kidney, and small intestine), and aldolase C (found in neuronal tissues and smooth muscle)), and they are distinguishable on the basis of immunological and kinetic properties (1). The catalytic mechanism has been extensively studied using class I aldolase A from rabbit muscle, and key intermediates are depicted in reaction Scheme 1.



In the forward reaction, a reactive lysine residue in the active site attacks the ketose (2) of the acyclic FBP substrate (3, 4). Transient formation of a dipolar tetrahedral carbinolamine with the keto function yields a neutral carbinolamine species **1**, which is then dehydrated to the protonated imine form of the trigonal Schiff base **2** (5, 6). Proton abstraction of the C₄ hydroxyl initiates a rearrangement resulting in cleavage of the substrate C₃-C₄ bond and enamine formation, shown as species **3**, in the active site (7). Following D-glyceraldehyde-3-phosphate release, the enamine upon stereospecific protonation (8) forms a Schiff base and is released as DHAP by the inverse reaction sequence shown in Scheme 1.

From crystallographic structure determination (9), the active site in rabbit muscle aldolase, shown in Fig. 2.1, contains a number of charged residues, vicinal to the Schiff base forming Lys-229 (10), that can potentially participate in catalysis. These residues can mediate proton transfers as general acid/base catalysts and stabilize or destabilize charges, and because of their proximity to each other, they are susceptible to electrostatic modification of their pK_a values, making role assignment of active site residues exceedingly complex. Residues such as Glu-187, adjacent to Lys-229, have, on the basis of mutagenic, kinetic, and structural data, more than one mechanistic role that includes substrate cleavage, charge stabilization, and mediating proton transfers at the level of the ketimine intermediate (11). Other residues, such as Asp-33 and Lys-146, also have

consequential roles in catalysis, since their catalytic activity is significantly compromised upon mutagenesis (12, 13, 14); the mutation Lys-146→Arg was shown to perturb substrate cleavage and Schiff base formation (13, 15). Asp-33 and Glu-187 are within hydrogen bonding distance of Lys-146 in the native structure, and these three residues, from their spatial disposition in the active site relative to Lys-229, must make separate and distinct interactions with bound substrate. Insight into how these and other active site residues participate in catalysis and, in particular, substrate cleavage, has been hampered by an absence of structures of reaction intermediates shown in Scheme 1.

To examine the reaction mechanism in class I aldolases and the role of active site residues, a crystallographic study was undertaken of rabbit muscle class I FBP aldolase in complex with its substrate. Acid quenching experiments using excess rabbit muscle aldolase had previously identified a covalent complex formed at room temperature in the presence of FBP that at pH 7.5 represented ~50% of substrate bound at equilibrium (3). The nature of the covalent linkage was not resolved. In the same study, total FBP bound to enzyme returned to free solution ~9 times for each net cleavage reaction, suggesting that steps after formation of the Schiff base **2** were limiting and that reaction intermediates **1** and/or **2** are most likely the preponderant equilibrium populations. However, naturally occurring covalent intermediates with FBP have not been observed to date in crystal structure determinations of class I FBP aldolases, even in presence of excess FBP (16, 17) or by sodium borohydride reduction (18). In bacterial class I aldolases of different substrate specificities, flash freezing of recombinant native aldolase crystals to ~100 K trapped at acid pH carbinolamine reaction intermediates (19, 20) as well as a Schiff base intermediate in a mutant enzyme form (20).

To investigate the nature of the covalent equilibrium complex in native rabbit muscle aldolase, aldolase crystals were incubated in presence of saturating FBP concentrations in nonacidic buffer (pH 7.5), similar to those used in the kinetic studies. Flash freezing of rabbit muscle crystals briefly soaked in a saturating FBP solution trapped authentic Schiff base intermediate. Two stereoisomer analogues of FBP, (2*R*)-mannitol-1,6-bis(phosphate) (MBP) and (4*S*)-tagatose-1,6-bis(phosphate) (TBP), which form noncovalent adducts, were also trapped in the aldolase active site and provided further insight into the reaction pathway and substrate recognition. The structural analysis indicates a canonical reaction

mechanism by which class I aldolases cleave a C-C bond and form Schiff base intermediates and that in the case of mammalian FBP aldolase involves a conformational change induced by active site binding.

MATERIALS AND METHODS

TBP cyclohexylammonium salt was a gift of Dr W. D. Fessner (University of Darmstadt). Prior to use, the cyclohexylammonium ion was exchanged for the sodium ion using a strong cationic exchanger and neutralized with NaOH. TBP sodium salt was used in all experiments described. Hexitol-1,6-bis(phosphate) (HBP) was prepared by NaBH₄ reduction of FBP as described previously and yields a mixture of two diastereoisomers: (2*R*)-MBP and (2*S*)-glucitol-1,6-bis(phosphate) (GBP) (21). The amount of P_i in TBP using ³¹P NMR was estimated at 9% and was negligible in case of FBP and HBP. All figures in the present paper were prepared using the program PyMOL (22).

Purification and Crystallization - Plasmid pPB14 coding for rabbit muscle aldolase (12) was transformed and overexpressed in *Escherichia coli* strain BL21-SI (Invitrogen). Recombinant rabbit muscle aldolase was purified by a combination of anion and cation exchange chromatography and size exclusion chromatography. Aldolase concentration was determined by BCA protein assay reagent (Pierce) with bovine serum albumin serving as a standard. Enzymatic activity was monitored by spectrophotometry using a coupled assay and following NADH oxidation at 340 nm (23). Aldolase crystals were grown by vapour diffusion from a 1:1 mixture of protein solution (10 mg/ml initial protein concentration made up in 20 mM Tris-HCl, pH 7.0) and precipitant buffer (17.5% polyethylene glycol 4000 in 0.1 M Na-HEPES, pH 7.5) that was equilibrated against a reservoir of precipitant.

Data Collection and Processing - Aldolase crystals were soaked for 3 min in FBP buffer (mother liquor plus 10 mM FBP) or for 10 min in HBP buffer (mother liquor plus 1 mM HBP) or for 7 min in TBP buffer (mother liquor plus 2 mM TBP). Prior to data collection, crystals were cryoprotected by transfer through a cryobuffer solution (FBP or HBP or TBP buffer plus 20% glycerol) and immediately flash frozen in a stream of gaseous N₂ cooled to 100 K. Diffraction data were collected from single crystals at beamline X8-C

of the National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, NY) using a Quantum 4 charge-coupled device (Area Detector Systems, Poway, CA). As control, a native data set was also collected. All data sets were processed with HKL2000 (24), and the results are summarized in Table 2.1.

Structure Solution and Refinement - Initial phases used for model building of native and liganded structures were obtained by molecular replacement using a previously determined structure for the rabbit muscle aldolase tetramer (25) (Protein Data Bank entry 1ADO). All crystal structures belong to the monoclinic space group $P2_1$ and have one aldolase homotetramer in the asymmetric unit. All reflections having $I/\sigma(I) > 1$ were used in refinement; however, electron density maps were calculated to the resolution shown in Table 2.1 and corresponded to completeness of ~80% in the highest resolution shell. The structures were subjected to iterative rounds of refinement (simulated annealing and minimization) with CNS (26) and model building using O (27). Water molecules were automatically added by CNS in initial rounds and manually near the end of refinement. C-terminal regions (residues 344-363) were traced in all subunits with exception of residues 352-357 in three subunits and the C-terminal residue Tyr-363 in the remaining subunit that were associated with regions of weak electron density.

Ligand modeling was based on interpretation of electron density shapes of $2F_o-F_c$ and F_o-F_c annealed omit maps and using PRODRG for topology and parameter generation (28). Binding by FBP and HBP, as the MBP stereoisomer, were readily discernable and were associated with clearly defined electron densities in the active site. Difference electron density (F_o-F_c) annealed omit maps calculated in the final round of refinement confirmed identical binding of ligands in all four subunits. Electron density associated with TBP was not clearly defined, and only phosphate groups that were visible in the active sites were refined. Final model statistics, calculated with CNS and PROCHECK (29), are shown in Table 2.1. The coordinates and structure factors of native aldolase, covalently bound FBP, and MBP and TBP as noncovalent complexes have been deposited with the Protein Data Bank (entry codes 1ZAH, 1ZAI, 1ZAJ and 1ZAL, respectively). The final structure models of native aldolase and covalently bound FBP, MBP, and TBP noncovalent complexes have an R_{cryst} (R_{free}) of 0.167 (0.205), 0.155 (0.190), 0.167 (0.204), and 0.167 (0.210), respectively. The corresponding Luzzati atomic coordinate error was estimated at 0.18,

0.16, 0.19, and 0.19 Å, respectively. Ramachandran analysis with PROCHECK placed at least 89% of nonglycine and nonproline residues of the four structures in the most favorable region and with the remainder found in allowed and generously allowed regions, attesting to good model geometry in the structures. Errors in hydrogen bond distances, positional differences, and *B*-factors are reported as S.D. values and were estimated based on their value in each aldolase subunit.

Structure Comparisons - Superpositions were performed with the program PyMOL (22) using C_α atom coordinates of identical blocks of amino acid sequences and comparing native with liganded aldolase tetramers. Due to conformational heterogeneity among subunits in N-terminal and C-terminal regions, comparisons were performed using residues 10-343. Root mean square (r.m.s.) deviations based on superposition of equivalent C_α atoms are reported in Table 2.2. Repeated superpositions were performed using stretches of 50 amino acids to detect secondary structure elements that were conformationally invariant to binding events. Lowest r.m.s. deviation corresponded to residues 150-250. This stretch of residues (positions 150-250) represented secondary structure elements: β-strands 5 and 6 as well as α-helices 4-6 of the β-barrel structure. Residues 158-259 encompassing these structural elements were then used in all subsequent structure superpositions to discover regions in the liganded structures that underwent conformational changes upon ligand binding. Intersubunit variability within a tetramer was analyzed by the program Polypose (30) and yielded r.m.s. differences, based on C_α atom coordinates, that were less than the error in the atomic coordinates for each structure.

Comparison among structures of Schiff base intermediates in class I aldolases was made at the level of the covalent intermediate by superposing the Schiff base structure with that of the Schiff base intermediate from rabbit muscle aldolase. Superposition consisted of matching the atomic positions of Lys-229 N_z and FBP carbon atoms C₁, C₂, and C₃ in the Schiff base structure of mammalian FBP aldolase against equivalent atoms in the target aldolase structures. In *E. coli* D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) mutant structure (Protein Data Bank entry 1JCJ) (20), Lys-167 N_z atom and DERA substrate C₁ and C₂ carbon atoms were formally equivalent Lys-229 N_z, FBP C₂, and FBP C₃ atoms, respectively. In *E. coli* transaldolase B, equivalent atoms in the reduced Schiff base dihydroxyacetone analogue (Protein Data Bank entry 1UCW) (31) were Lys-132 N_z and

carbon atoms C₁, C_H, and C₂ of the dihydroxyacetone ligand, respectively. For the carbinolamine precursor formed with pyruvate in *E. coli* KDPG aldolase (Protein Data Bank entry 1EUA) (19), atoms equivalent to Lys-229 N_z, FBP C₁, and FBP C₂ were Lys-133 N_z and pyruvate carbon atoms C₁ and C₂. In the structure of the covalent complex formed by archaeal *Thermoproteus tenax* FBP class I aldolase with DHAP (Protein Data Bank entry 1OK4) (32), equivalent atoms were Lys-177 N_z and carbon atoms C₁, C₂, and C₃ of the DHAP ligand. Superposition of the structure of *S. pyogenes* TBP class I aldolase (B. Liotard and J. Sygusch, unpublished data) used 166 residues homologous with rabbit muscle FBP aldolase and yielded an r.m.s. deviation of 1.64 Å based on C_α atoms, as determined by the program DeepView/Swiss-PdbViewer (33). Moreover, the carbinolamine intermediate of the native DERA (Protein Data Bank entry 1JCL) (20) was structurally identical to the Schiff base intermediate in the DERA mutant structure (r.m.s. deviation = 0.14 Å using all C_α atoms), allowing comparison to be made solely among native liganded structures.

Modeling and Energy Minimization - The acyclic form of FBP was built using topology parameters from PRODRG and manually docked into the active site of rabbit muscle aldolase as a noncovalent complex. The rabbit muscle aldolase-MBP complex served as template and in the initial docking was used to align the noncovalent FBP complex. The FBP complex was then energy-minimized by 2000 steps of conjugated gradient minimization in CNS.

RESULTS AND DISCUSSION

Schiff base - Flash freezing of rabbit muscle aldolase crystals in the presence of the substrate trapped a covalent complex in the active site under equilibrium conditions. Continuous electron density, extending beyond Lys-229 N_z in each subunit, shown in Fig. 2.2A, indicates formation of a stable covalent adduct with FBP. The planar shape of the electron density observed about the FBP C₂ carbon indicates trigonal hybridization and is consistent with trapping of a Schiff base intermediate in each aldolase subunit. Comparison of average *B*-factors between bound FBP and interacting side chains, 25.0 ± 2.8 and 20.0 ±

6.0 Å², respectively, suggests nearly full active site occupancy by FBP. Furthermore, the conformation of the crystallized enzyme is not inconsistent with that of a catalytically active conformer. Within measurement errors, kinetic parameters of soluble rabbit muscle aldolase (not shown) were unaffected by crystallization buffer, precipitant concentration used for crystallization, or glycerol cryoprotectant, and full activity was recovered upon dissolution of the crystalline enzyme.

The Schiff base intermediate, shown in Fig. 2.2B, engages in numerous hydrogen bonding and electrostatic interactions with active site residues. The binding mode by the P₁ phosphate was isomorphous with that reported for the NaBH₄ reduced covalent complex with DHAP (Protein Data Bank entry 1J4E) (18) (r.m.s. deviation = 0.14 Å based on equivalent C_α atoms) wherein Arg-303 curls around and interacts electrostatically with the oxyanion, creating a phosphate oxyanion binding pocket. In addition to the electrostatic interactions, five hydrogen bonding interactions were made with the P₁ phosphate oxyanion in the binding pocket including an unusually short hydrogen bond between Ser-271 side chain and the oxyanion (2.45 ± 0.02 Å) and indicating strong active site attachment by the FBP P₁ phosphate oxyanion. The P₆ phosphate binding site includes active site residue Lys-107 whose participation in P₆ phosphate binding is corroborated from affinity labelling of Lys-107 by pyridoxal-P that abrogated FBP binding but not DHAP (34). Although both P₁ and P₆ phosphate oxyanions make two electrostatic interactions with respective residues, binding by the P₆ phosphate oxyanion is slightly weaker, since it participates in only three additional hydrogen bonding interactions.

Hydrogen bonding by C₃ and C₄ hydroxyls is very strong involving interactions with cationic or anionic active site residues (35). Notable among ketohexose interactions are hydrogen bonds made between the FBP C₄ hydroxyl and residues Lys-146 and Glu-187 shown in Fig. 2.2A and suggests incipient C₃-C₄ bond cleavage. The hydrogen-bonding pattern is consistent with Glu-187 abstracting the C₄ hydroxyl proton as general base thereby initiating cleavage of the C₃-C₄ bond in FBP and corroborating the interpretation of enzymological data (11). Interestingly, the atoms of Lys-229 N_z, FBP C₂, C₃, C₄, and O₄ as well as a Glu-187 carboxylate oxygen forms a near chair-like structure in Fig. 2.2A that mimics the spatial arrangement of reactants in the pericyclic transition state of nonenzymatic aldol condensations with preformed enolates (36, 37, 38). A salient feature is

the observed noncoplanarity of the FBP C₄ atom with respect to the Schiff base demanded in the transition state with respect to atoms about the cleaved bond.

The possibility of Lys-146 acting as general base is unlikely, since aldolase is active at acid pH, and affinity labelling of Lys-146 by *N*-bromoacetyl-ethanolamine-P at pH 8.5 but not at pH 6.5 (39) suggests an alkaline p*K*_a for Lys-146. Rather, Lys-146 in its ammonium form stabilizes by electrostatic interaction the resultant negative charge created on the C₄ hydroxyl ion in the transition state. Loss of the positive charge on Lys-146 would thus be critical and severely compromise activity and is consistent with acidic and neutral Lys-146 mutations that abrogate catalytic activity (13, 14). Asp-33 interaction with both FBP C₃ hydroxyl and Lys-146 stabilizes FBP binding and the positive charge on Lys-146 in the active site. The negative charge on Asp-33 is reciprocally stabilized by Lys-107 at the active site periphery. Charge stabilization by Asp-33 appears to be important for aldolase catalysis, since neutral mutations of Asp-33 result in a significant loss of activity (12, 14).

Carbinolamine Intermediate - The electron density in Fig. 2.3A shows formation of a stable noncovalent hexose-P₂ adduct in the rabbit muscle aldolase active site. The nonplanar shape of the electron density about the C₂ atom of the hexose-P₂ indicates tetrahedral hybridization and is consistent with trapping of (2*R*)-MBP in each aldolase subunit. Binding by the (2*R*)-HBP stereoisomer implies stereospecific active site recognition. The (2*S*)-GBP stereoisomer is discriminated against, since other binding modes were not observed in electron density maps. The quite similar *B*-factors for MBP and interacting active site residues, 23.1 ± 4.8 and $16.1 \pm 5.9 \text{ \AA}^2$, respectively, are consistent with full active site occupancy by MBP. Different from the substrate-bound enzyme, Glu-187 forms a hydrogen bond with the MBP C₂ hydroxyl and lengthens its previous hydrogen bond to make a close contact with the C₄ hydroxyl (3.4 Å). In the MBP complex, Lys-229 N_z atom is positioned perpendicular to the plane defined by MBP atoms C₁, O₂, C₃ and is 3.3 Å from C₂, consistent with face *si* nucleophilic attack on the substrate ketose and predicts formation of the (2*R*)-carbinolamine intermediate obtained upon NaBH₄ reduction of the Schiff base (40). The potent inhibition observed for HBP (*K*_i = 0.45 μM (41)) consequently arises from the bound (2*R*)-MBP configuration mimicking the transient carbinolamine precursor **1** in FBP aldolase and acts as a transition state analogue by maximizing its active site interactions. The presence of a hydrogen bond between the MBP

O₂ and Glu-187, shown in Fig. 2.3A, suggests a role by Glu-187 in mediating proton transfers at the level of the carbinolamine precursor, enabling stabilization of the carbinolamine transition state.

Superposition of FBP and MBP structures (r.m.s. deviation = 0.13 Å for C_α atoms of residues 10-343) indicates identical interactions made by the ligands with active site residues and is shown in Fig. 2.3B. Although binding by the P₁ phosphate oxyanion is virtually indistinguishable in both structures (0.3 ± 0.1 Å) including the same strong hydrogen bond made by Ser-271 with the oxyanion (2.50 ± 0.05 Å in MBP), positioning of the atoms from the C₃ hydroxyl to the P₆ phosphate oxyanion is not. The MBP C₂ carbon, because of its sp³ hybridization geometry, expands the distance between the P₁ and P₆ phosphates to 9.6 Å from 8.9 Å in the Schiff base. As a result, the positions of equivalent atoms in MBP from the C₃ hydroxyl to the P₆ phosphate oxyanion are each shifted by 0.9 ± 0.1 Å with respect to FBP in the direction of the P₆ phosphate binding locus. Active site residues in contact with FBP and MBP exhibit only slight conformational differences (r.m.s. deviation = 0.3 Å, including side chains).

Binding to a rigid active site affords a structural basis for stereoisomer selectivity in rabbit muscle aldolase. Attachment by each stereoisomer to the same binding site would not be identical and would entail differences in binding affinity that are reflected by preferential binding of MBP instead of GBP. Indeed, the reduced affinity for GBP by aldolase ($K_i = 12 \mu\text{M}$ (42)) originates from a binding mode different from MBP, since isostructural binding by GBP would result in steric conflict between its C₂ hydroxyl and Glu-187 and Lys-229 side chains.

Substrate binding - To further probe the role of Glu-187 in mediating carbinolamine formation, the acyclic form of FBP was modeled into the aldolase active site using the MBP noncovalent complex as template. To mimic incipient Schiff base formation, Lys-229 was modeled as its nucleophilic form. To maximize hydrogen-bonding potential with the attacked carbonyl, the acid form of Glu-187 was used. Slight torsional oscillation of the Glu-187 side chain in the native structure would place the carboxylate within hydrogen bonding distance of Lys-229, allowing it to accept a proton from Lys-229 and thereby making it acidic. Equally, protonation of Glu-187 can occur by a proton relay implicating the adjacent Glu-189 at the active site periphery (11).

Energy minimization of the acyclic form of FBP, docked noncovalently in the active site, is shown in Fig. 2.4 and is consistent with the binding modes observed for both FBP in the Schiff base and for MBP. The FBP C₂ carbonyl is oriented identically to the C₂ hydroxyl of MBP, allowing face *si* attack on the substrate ketose by Lys-229, shown in Fig. 2.4. Glu-187 in its acidic form makes hydrogen bonds to the FBP C₄ hydroxyl as well as to the C₂ carbonyl, not possible as conjugate base, and corroborates Glu-187 participation in proton transfers at the level of carbinolamine precursor formation as well as in aligning the substrate ketose for nucleophilic attack.

Ligand recognition - Surprisingly, TBP was not recognized as a substrate by rabbit muscle aldolase. K_i determined on the basis of competitive inhibition of aldolase by TBP ($125 \pm 16 \mu\text{M}$) is comparatively weaker than K_m for FBP ($5 \pm 1 \mu\text{M}$) and K_i of HBP ($0.45 \mu\text{M}$), determined previously (41). Weaker yet similar TBP binding is reflected in the structural analysis, where partial occupancy of the P₁ and P₆ phosphate binding loci was observed at saturating TBP levels in the electron density maps (see Fig. 2.5). Partial occupancy of both phosphate binding loci nevertheless suggests that the enzyme can interact with the acyclic form of TBP but not apparently in a unique manner with the intervening keto-hexose. Controls showed no evidence for binding by P_i at 500 μM in native crystals, a concentration greater than 180 μM that was present in the TBP soaking solution (data not shown).

Modeling of (4*S*)-TBP bound in the active site using either the noncovalent or covalent FBP complex as template resulted in identical docking by TBP except for the enantiomeric C₄ hydroxyl of TBP that did not interact with any active site residue. The dissimilar binding mode observed for the TBP diastereoisomer in the crystal structure implies stereospecific discrimination by the enzyme at the level of the substrate C₄ hydroxyl. The C₄ hydroxyl makes strong hydrogen bonding interactions with Lys-146 and Glu-187 in case of FBP that are not possible for TBP if TBP was to bind isostructurally. Loss of these strong interactions thus induces a different binding mode.

TBP binding suggests a hierarchical mode of attachment by aldolase ligands, which arises from the constraints imposed by a rigid binding site. Partial binding by TBP phosphates suggests promiscuous attachment by oxyanions of bisphosphorylated structural analogues whenever the interatomic distance between the analogue phosphates matches the

distance between the enzyme's P₁ and P₆ binding sites and without remaining analogue atoms introducing structural clashes. Strong oxyanion binding, particularly charged interactions made with Lys-107 and Arg-303, would assure phosphate binding independent of whether weaker interactions such as hydrogen bonding with hydroxyls have been satisfied. Such reduced ligand binding specificity rationalizes the similar micromolar inhibition constants of diverse bisphosphorylated compounds, many of which are structural analogues of FBP (42), yet on basis of their structures cannot interact identically with the active site.

Induced fit - Active site binding induces identical conformational changes in each aldolase subunit with respect to native enzyme. Backbone displacement due to ligand interaction is localized to two adjacent α -helical structures (residues 34-65 and residues 302-329) not involved in subunit contacts and comprising the wall of the active site cleft distant from subunit contacts, shown in Fig. 2.6. From Table 2.2, conformational displacements of these helical regions are small yet significant when compared to residues 158-259 of the β -barrel, which make up part of the active site and intersubunit contacts and results in the asymmetric narrowing of the active site cleft.

Superposition of the native and the FBP bound structures are shown in Fig. 2.7 and delineates a conserved network of interacting active site residues and water molecules, present in all structures, that is used to bind ligand phosphate moieties as well as C₃, C₄, and C₅ hydroxyls. Only positions of five residues (Ser-35, Ser-38, Arg-42, Gly-302, Arg-303), each participating in phosphate binding, are displaced by the conformational change that narrows the active site cleft. Arg-303, whose side chain projects out of the active site in the native enzyme, reorganizes and curls binding the FBP P₁ phosphate. The Arg-303 side chain conformation is stabilized by a hydrogen bond to a water molecule, shown in Fig. 2.7, in each subunit, which in turn interacts with the Glu-189 side chain on the opposite wall of the active site cleft. The water molecule-mediated interaction is only possible due to the backbone displacement of Arg-303 (~0.8 Å in Table 2.2) with respect to the native enzyme. This water molecule is invariant and is part of three water molecules shown in Fig. 2.7, conserved in native and liganded structures that comprise the P₁ phosphate binding locus. The change in Arg-303 side chain conformation induces a flip in the backbone carbonyl of Gly-272 to avoid steric collision that further stabilizes P₁ phosphate attachment

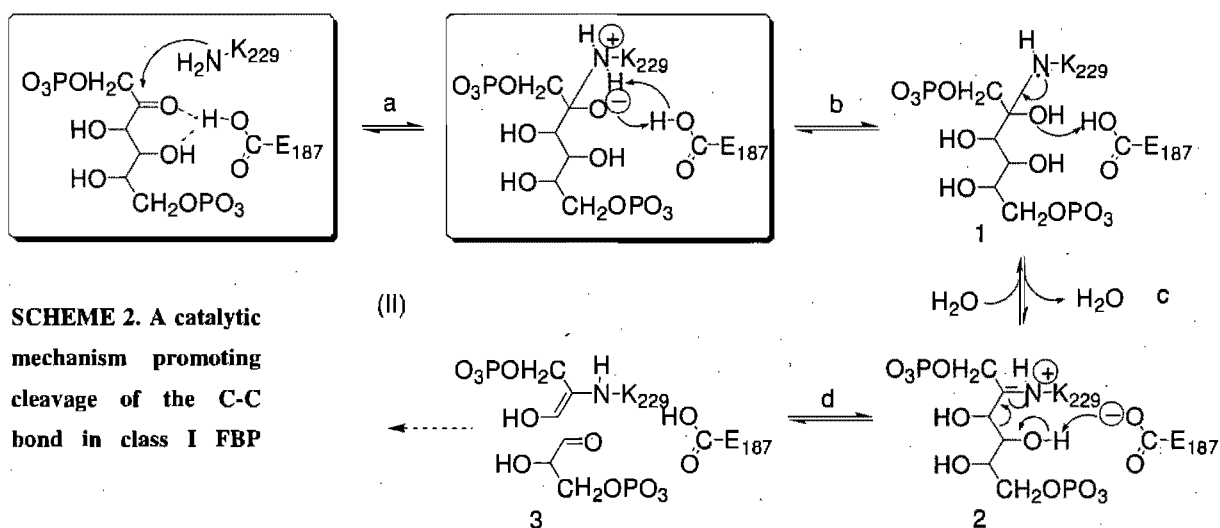
through hydrogen bonding with the Gly-272 backbone nitrogen, shown in Fig. 2.2B. The same backbone displacement further enhances P₁ phosphate attachment by promoting oxyanion hydrogen bonding with Gly-302.

P₆ phosphate binding induces a slightly larger conformational change that involves the α -helix containing residues Ser-35 and Ser-38 (~1 Å in Table 2.2) and enabling these residues to hydrogen bond the P₆ phosphate oxyanion. Arg-42 undergoes a likewise displacement allowing its side chain to interact with a water molecule bound by both C₅ hydroxyl and P₁ phosphate. Homologous conformational changes are observed upon MBP binding, shown in Table 2.2, indicating that substrate binding and not covalent complex formation that induces the conformational changes. Furthermore, TBP binding induces similar conformational changes. From Table 2.2, their extents are smaller and consistent with partial occupancy of the P₁ and P₆ phosphate binding sites by TBP. The absence of significant conformational changes by all other active site residues (r.m.s. change in position of active site atoms contacting FBP or MBP = 0.4 ± 0.1 Å) corroborates the interpretation of a rigid active site that does not adapt to binding events except by large-scale movement of secondary structures.

Water Molecules - MBP binding and Schiff base formation both displace 14 water molecules, shown in Fig. 2.7. The average *B*-factor for the water molecules ejected from the native structure upon FBP and MBP binding was 37 ± 10 Å², and was not significantly different from *B*-factors averaged over all water molecules, 42 ± 15 Å². The absence of significant difference in positional disorder of ejected water molecules precludes entropic gain due to solvent displacement into the nearest solvation shell as a significant factor in promoting ligand binding. Furthermore, no water molecule was observed within a van der Waals distance of the FBP C₂ carbon in the Schiff base. The water molecule closest is 4.3 Å removed (*orange dash* shown in Fig. 2.7) and forms part of the network of water molecules conserved in all structures. This water molecule, which hydrogen-bonds Glu-189 and the P₁ oxyanion in Fig. 2.7, also makes a hydrogen bond to the C₂ hydroxyl in the MBP structure and suggests a candidate binding site for the water molecule expelled upon carbinolamine dehydration. The absence of a water molecule binding site within close contact of the C₂ carbon in the Schiff base is not inconsistent with the stability of the covalent FBP enzyme intermediate in solution (3). Reduction in solvent translational mobility upon flash freezing

(43) could promote further accumulation of the Schiff base population, not inconsistent with the apparent full occupancy by the FBP Schiff base intermediate in aldolase crystals.

Substrate Cleavage - A multiple catalytic role for Glu-187 in FBP aldolase catalysis was advanced from enzymological data that implicated the residue in C₃-C₄ bond cleavage as well as in proton transfers at the level of the ketimine intermediate (11). The structural analysis herein reveals Glu-187 participation in hydrogen bond formation with key reaction intermediates (7, 44). A catalytic mechanism by which to promote cleavage of the C-C bond in class I FBP aldolases integrating enzymology and structure data is outlined in Scheme 2.



The catalytic cycle begins by FBP binding in the active site cleft. Substrate attachment induces a conformational adjustment in two α -helical regions that serves to stabilize attachment of the P₁ and P₆ phosphates and is accompanied by expulsion of water molecules. Glu-187, in its acid form, hydrogen-bonds both FBP C₂ carbonyl and C₄ hydroxyl, thereby aligning the electrophilic C₂ carbon for face *si* attack by Lys-229, outlined in the first panel. As general acid, Glu-187 transiently stabilizes the resultant dipolar carbinolamine shown in the second panel (reaction a), and mediates stereoselective proton transfers (reaction b), that yield the neutral carbinolamine precursor **1**. A second series of proton transfers catalyzed by Glu-187 as general acid dehydrates carbinolamine intermediate **1** and promotes Schiff base formation **2**, reaction c. The Schiff base formed is

particularly stable due to the absence of a water molecule-binding site within van der Waals distance of the FBP C₂ carbon. Proton abstraction from the C₄ hydroxyl is catalyzed by Glu-187, as conjugate base, which induces a rearrangement cleaving the C₃-C₄ bond, reaction **d**. The remaining active site residues are critical for substrate alignment in the active site and afford electrostatic stabilization of charges during proton transfers. The mechanism is consistent with a trajectory of least atomic motion requiring only slight torsional librations by Glu-187 glutamate side chain.

Conserved Reaction Divergent Mechanism - The reaction chemistry underlying substrate turnover has mechanistic features that are common to diverse class I aldolases. Substrate cleaved by mammalian FBP aldolase, DERA, transaldolase B, archaeal FBP aldolase, KDPG aldolase, and TBP aldolase implicates the same C-C bond relative to the ketose moiety, and Schiff base formation necessitates a lysine residue in each enzyme. In addition, substrates recognized by each aldolase have chemical structures similar if not identical to FBP. To examine potential homology among active site residues catalyzing Schiff base formation and substrate cleavage, structures of Schiff base intermediates from bacterial and archaeal aldolases were compared by superposition with mammalian FBP aldolase. In aldolases lacking structures of Schiff base intermediates derived from substrate, the Schiff base formed in mammalian FBP aldolase was used as surrogate substrate for analysis. The structure elements common to all aldolase substrates are FBP atoms starting at C₂ and extending to the P₆ oxyanion. Shown in Fig. 2.8 are superpositions with DERA, transaldolase B, archaeal FBP aldolase, and KDPG aldolase.

The Schiff base intermediate of rabbit muscle aldolase when superposed onto the respective covalent complexes in bacterial and archaeal aldolases positioned the FBP molecule as a Schiff base free of steric encumbrances in the respective active sites. In the active site of archaeal FBP aldolase, slight torsional rotations (<30°) about the FBP C₅-C₆ and C₆ carbon ester bonds alleviated a close contact. In DERA, substrate atoms from C₁ to P₅ oxyanion, including hydroxyls, coincided with equivalent atoms in FBP. In transaldolase B, KDPG aldolase, and archaeal FBP aldolase, the surrogate substrate had as in DERA its P₆ oxyanion facing out of the active site towards the solvent. This orientation is entirely consistent with substrate access to the Schiff base forming lysine from solution and

warrants use of FBP both as template and as surrogate substrate in superposition of the Schiff base intermediates.

Superposition aligned the C₄ hydroxyl of each aldolase substrate facing a possible proton acceptor, namely a glutamate, a tyrosine, or a water molecule that in turn could be activated by a glutamate or lysine residue, shown in Fig. 2.8. In KDPG aldolase, the putative substrate O₄ is predicted to make a hydrogen bonding interaction with Glu-45. For transaldolase B, C₄ hydroxyl hydrogen bonding occurs with a water molecule, which in turn hydrogen-bonds Glu-96 and suggests in both instances that a glutamate residue is ultimately responsible for proton abstraction, hence substrate cleavage. In archaeal FBP aldolase, superposition is consistent with Tyr-146 as the residue mediating proton abstraction at the C₄ hydroxyl, whereas in DERA, it is a water molecule activated by Lys-201.

Available data support the analysis and suggest additional participation in Schiff base formation by the catalytic entity facing the C₄ hydroxyl. In KDPG aldolase, since Glu-45 is the only residue in the active site that is capable of acting as general acid/base catalyst (19), the superposition is entirely consistent with a multifunctional catalytic role by Glu-45 that includes Schiff base formation as well as C-C bond cleavage. In DERA, the water molecule that hydrogen-bonds both its substrate C₃ hydroxyl and Lys-201 has a central role in all aspects of the reaction mechanism, including substrate cleavage and Schiff base formation (20). In transaldolase B, site-directed mutagenesis of Glu-96 perturbed cleavage activity (45), and Glu-96 was proposed on structural grounds to activate the water molecule to catalyze Schiff base formation (31). Substrate cleavage catalyzed by Asp-17, which has been proposed on basis of mutagenesis data in transaldolase B (45), is not supported from Schiff base structures superposed in Fig. 2.8. A direct role in cleavage by the homologous residue, Asp-33 in mammalian aldolase, is inconsistent with the orientation of the C₄ hydroxyl in the FBP Schiff base and would require Phe-135 in KDPG aldolase to catalyze proton transfers. In archaeal FBP aldolase, a role in Schiff base formation was invoked for Tyr-146 from structural considerations (32) and by enzyme trapping of FBP as a carbinolamine intermediate (46). Furthermore, superposition of mammalian aldolase onto TBP aldolase (not shown) positioned FBP, also cleaved by TBP aldolase (47), in the TBP aldolase active site, free of steric clashes with the FBP C₄ hydroxyl within hydrogen-

bonding interaction of Glu-163. This residue is located within hydrogen-bonding distance of Lys-205, which is homologous to Schiff base forming Lys-229 in mammalian aldolase.

The structural comparison has revealed an essential constituent in the aldolase reaction mechanism. A multifunctional role by a single catalytic entity appears to have been conserved across different kingdoms, indicating significant commonality in the reaction chemistry catalyzed by each aldolase. By contrast, the nature of the catalytic entity responsible for promoting Schiff base formation and C-C bond cleavage of phosphorylated substrates by a β -barrel platform appears to have undergone extensive evolution, resulting in divergent solutions to similar if not identical proton transfers. General acid/base catalysis by a glutamate residue in mammalian class I FBP aldolase epitomizes a canonical mechanistic feature in Schiff base forming aldolases in carbohydrate metabolism.

FOOTNOTES

This work was supported by funding from the National Science and Engineering Research Council (Canada) and Canadian Institutes for Health Research. Work was carried out in part at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, which is supported by the United States Dept. of Energy, Division of Materials Sciences and Division of Chemical Sciences under contract DE-AC02-98CH10886. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

ACKNOWLEDGMENTS

Assistance by X8-C beamline personnel, Dr. L. Flaks, was appreciated. We are also grateful for computational resources available at the Automated Structure Determination Platform Web site (asdp.bnl.gov).

ABBREVIATIONS

FBP, fructose-1,6-bis(phosphate); MBP, (2*R*)-mannitol-1,6-bis(phosphate); TBP, tagatose-1,6-bis(phosphate); DHAP, dihydroxyacetone phosphate; HBP, hexitol-1,6-bis(phosphate);

GBP, (2S)-glucitol-1,6-bis(phosphate); DERA, D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase; KDPG, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; r.m.s., root mean square.

DATA DEPOSITION

The atomic coordinates and structure factors (codes IZAH, IZAI, IZAJ, and IZAL) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>)

REFERENCES

1. Penhoet, E. E., and Rutter, W. J. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 318-323.
2. Grazi, E., Rowley, P. T., Chang, T., Tchola, O., and Horecker, B. L. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 38-43.
3. Rose, I. A., and Warms, J. V. B. (1985) *Biochemistry* **24**, 3952-3957.
4. Ray, B.D., Harper, E. T., and Fife, W. K. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3731-3732.
5. Jencks, W. P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology* (McGraw-Hill, New York).
6. Avigad, G., and Englard, S. (1972) *Archiv. Biochem. Biophys.* **158**, 337-346.
7. Kuo, D. J., and Rose, I. A. (1985) *Biochemistry* **24**, 3947-3952.
8. Rose, I. A., and Rieder, S. V. (1958) *J. Biol. Chem.* **231**, 315-329.
9. Sygusch, J., Beaudry, D., and Allaire, M. (1987) *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7846-7850.
10. Lai, C.Y., Tchola, O., Cheng, T., and Horecker, B. L. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1347-1350.
11. Maurady, A., Zdanov, A., de Moissac, D., Beaudry, D., and Sygusch, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 9474-9483.
12. Morris, A. J., and Tolani, D. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1095-1100.
13. Morris, A. J., and Tolani, D. R. (1994) *Biochemistry* **33**, 12291-12297.
14. Blonski, C., de Moissac, D., Perie, J., and Sygusch, J. (1997) *Biochem. J.* **323**, 71-77.

-
15. Morris, A. J., Davenport, R. C., and Tolan, D. R. (1996) *Protein Eng.* **9**, 61-67.
 16. Dalby, A., Dauter, Z., and Littlechild, J. A. (1999) *Protein Sci.* **8**, 291-297.
 17. Choi, K. H., Mazurkie, A. S., Morris, A. J., Utheza, D., Tolan, D. R., and Allen, K. N. (1999) *Biochemistry* **38**, 12655-12664.
 18. Choi, K. H., Shi, J., Hopkins, C. E., Tolan, D. R., and Allen, K. N. (2001) *Biochemistry* **40**, 13868-13875.
 19. Allard, J., Grochulski, P., and Sygusch, J. (2001) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 3679-3684.
 20. Heine A., DeSantis, G., Luz, J. G., Mitchell, M., Wong, C. H., and Wilson, I. A. (2001) *Science* **294**, 369-374.
 21. Ginsburg, A., and Mehler, A. H. (1966) *Biochemistry* **5**, 2623-2634.
 22. DeLano, W. L. (2004) *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org/>.
 23. Racker, E. (1947) *J. Biol. Chem.* **167**, 843-854.
 24. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
 25. Blom, N., and Sygusch, J. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 36-39.
 26. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Gross-Kunstleve, R. W., Jiang, J-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921.
 27. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard (1991) *Acta Crystallogr. A* **47** (Pt 2), 110-119.
 28. Schuttelkopf, A. W., and van Aalten, D. M. (2004) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 1355-1363.
 29. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
 30. Diamond, R. (1992) *Protein Sci.* **1**, 1279-1287.
 31. Jia, J., Schorken, U., Lindqvist, Y., Sprenger, G. A., and Schneider, G. (1997) *Protein*

-
- Sci.* **6**, 119-124.
32. Lorentzen, E., Pohl, E., Zwart, P., Stark, A., Russell, R. B., Knura, T., Hensel, R., and Siebers, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47253-47260.
 33. Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
 34. Anai, M., Lai, C. Y., and Horecker, BL. (1973) *Arch. biochem. Biophys.* **156**, 712-719.
 35. Jeffrey, G. A., and Saenger, W. (1994) *Hydrogen bonding in Biological Structures*, p. 48, Springer-Verlag, New York.
 36. Zimmermann, H. E., and Traxler, M.D. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1920-1923.
 37. Dubois, J. E. and Fort, J. F. (1972) *Tetrahedron*, **28**, 1653-1663, 1665-1675.
 38. Heathcock, C. H., Buse, C. T., Kleschick, W. A., Pirrung, M. C., Sohn, J. E., and Lampe, J. (1980) *J. Org. Chem.* **45**, 1066-1081.
 39. Hartman, F. C., and Brown, J. P. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 3057-3062.
 40. Di Iasio, A., Trombetta, G., and Grazi, E. (1977) *FEBS Lett.* **73**, 244-246.
 41. Midelfort, C. F., Gupta, R. K., and Rose, I. A. (1976) *Biochemistry* **15**, 2178-2185.
 42. Hartman, F. C., and Baker, R. (1965) *Biochemistry* **4**, 1068-1075.
 43. Ringe, D., and Petsko, G. A. (2003) *Biophysical Chemistry* **105**, 667-680.
 44. Sayer, J. M., Pinsky, B., Schonbrunn, A., and Washtien, W. (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7998-8009.
 45. Schorken, U., Thorell, S., Schurmann, M., Jia, J., Sprenger, G. A., and Schneider, G. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 2408-2415.
 46. Lorentzen E., Siebers B., Hensel R., and Pohl E. (2005) *Biochemistry.* **44**, 4222-4229.
 47. Bissett, D. L., and Anderson, R. L. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 8750-8755.

TABLES

Table 2.1 Data collection and refinement statistics (article 1)

	Native	FBP	MBP	TBP
Data collection				
Resolution (Å)	50-1.80 (1.86-1.80) ^a	50-1.76 (1.84-1.76) ^a	20-1.89 (1.97-1.89) ^a	50.0-1.89 (1.99-1.89) ^a
Wavelength (Å)	0.9795	0.9795	0.9795	1.0000
Reflections				
Observed	1681473	955932	2002015	1461622
Unique	127047	134970	104042	110492
Completeness (%)	97.0 (87.1)	96.7 (78.9)	96.9 (77.2)	97.8 (85.8)
Average I/σ(I)	22.5 (2.8)	17.9 (2.0)	12.6 (2.5)	15.0 (2.1)
R _{sym} ^b	0.049 (0.39)	0.068 (0.41)	0.172 (0.78)	0.070 (0.44)
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Unit cell parameters				
a (Å), b (Å), c (Å), β (°)	83.1, 102.9, 84.7, 98.4	83.0, 103.2, 84.3, 98.8	83.0, 103.3, 84.4, 98.9	83.1, 103.2, 84.5, 98.6
Refinement				
Number of atoms				
Protein	11032	11032	11032	11032
Water	2427	2408	2633	2215
Hetero	0	76	80	40
σ cutoff; I / σ(I) >	1	1	1	1
R _{cryst} (%) ^c	16.7	15.5	16.7	16.7
R _{free} (%) ^d	20.5	19.0	20.4	21.0
r.m.s. deviation				
Bond length (Å)	0.005	0.005	0.005	0.005
Bond angle (°)	1.267	1.265	1.253	1.405
< B > (Å ²)	27.8	26.4	24.8	30.9
Ramachandran analysis^e				
(%)				
Most favourable	89.2	90.1	89.7	89.8
Allowed	10.5	9.7	9.4	9.6
Generously allowed	0.3	0.2	0.9	0.6
Luzzati plot (Å)	0.18	0.16	0.19	0.19

^a All values in parentheses are given for the highest resolution shell

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

^c $R_{cryst} = \sum_{hkl} ||I_o(hkl) - I_c(hkl)|| / \sum_{hkl} I_o(hkl)$.

^d $R_{free} = \sum_{hkl \in T} ||I_o(hkl) - I_c(hkl)|| / \sum_{hkl \in T} I_o(hkl)$, where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. Test data set was not used throughout refinement and contained 5, 7, 4, and 3% of the total unique reflections for native, FBP, MBP, and TBP, respectively.

^e Analyzed by PROCHECK (29).

Table 2.2 Conformational changes induced by ligand binding.

Conformational changes were identified on basis of differences in equivalent atomic positions by comparing liganded aldolases with the native enzyme. The comparison consisted of superimposing liganded tetramers onto the native tetramer using the same selected residues in each subunit. Values tabulated are r.m.s. differences between equivalent C_α atoms and are given in Å.

Residues selected	FBP	MBP	TBP
10-343	0.44	0.46	0.28
158-259	0.12	0.14	0.13
34-65 ^a	1.01	0.95	0.61
302-329 ^a	0.80	0.91	0.49
35 ^a	1.25	0.97	0.72
38 ^a	0.64	0.50	0.21
303 ^a	0.75	0.79	0.47

^a Calculation of r.m.s. differences for these residues was based on superpositions of liganded complexes onto native enzyme that used exclusively residues 158-259, as described under "Materials and Methods".

FIGURES

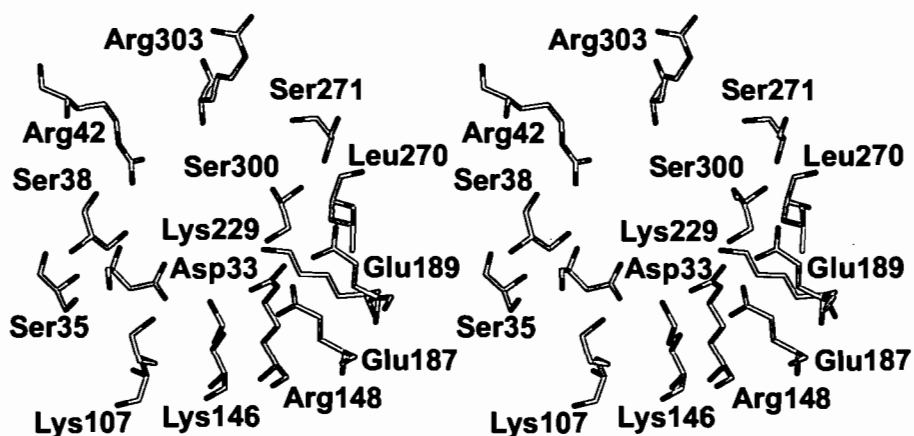


Figure 2.1 Stereo view of the active site of rabbit muscle aldolase.

The active site has a number of acidic and basic amino acids that can participate in proton transfers and because of their mutual close proximity may potentially perturb each other's pKa, thereby making functional assignment complex. The initial nucleophilic attack on the substrate involves Lys-229 and results in Schiff base formation with Lys-229. Site-directed mutagenesis of Asp-33, Lys-146 and Glu-187 greatly diminishes catalytic activity. The orientation corresponds to viewing roughly parallel to the subunit β -barrel axis and looking down into the β -barrel from the carboxy ends of the β -strands.

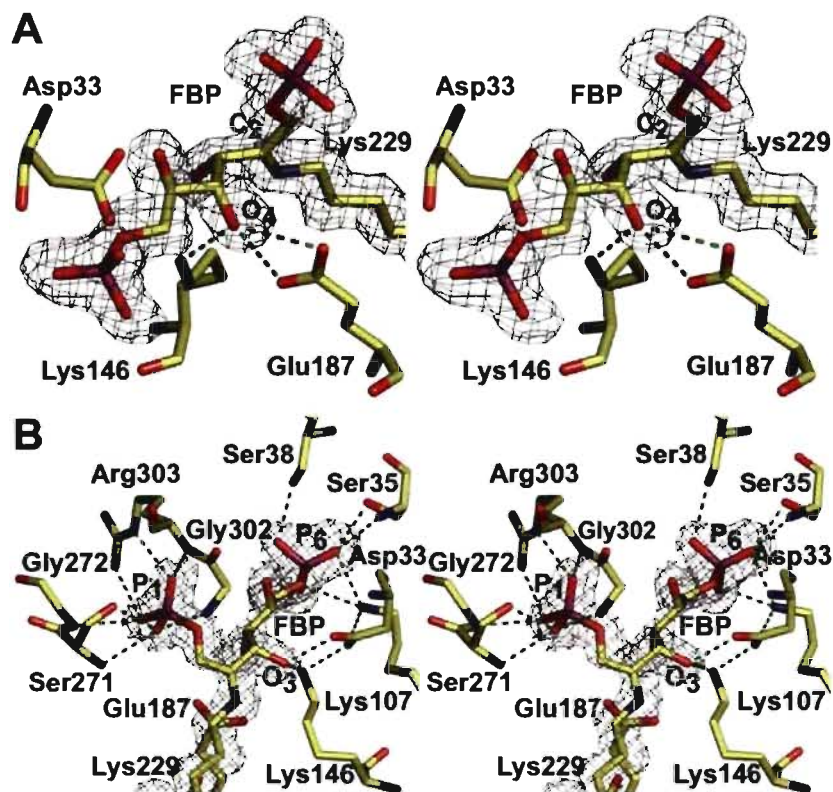


Figure 2.2 Electron density showing the Schiff base intermediate trapped in the active site of rabbit muscle aldolase.

Difference electron density was calculated from a 1.8 Å annealed $F_o - F_c$ omit map encompassing Lys-229 and FBP and contoured at 3σ . The *green dashes* illustrate hydrogen bonds. **A**, FBP is covalently bound to the Schiff base forming Lys-229 in all subunits, and the FBP O₄ is hydrogen-bonded to Glu-187 and Lys-146. Orientation is similar to Fig. 2.1. **B**, orientation showing the interaction of active site residues contacting the Schiff base intermediate. FBP phosphates interact extensively; the P₁ phosphate makes hydrogen bonding contacts with Ser-271, Gly-272, Arg-303, and Gly-302, whereas the P₆ phosphate interacts with Ser-35, Ser-38, and Lys-107. Orientation differs from Fig. 2.1 and consists of ~100° rotation about the β -barrel axis and then viewing approximately perpendicular to the rotation axis. Some hydrogen bonds were omitted for visual clarity.

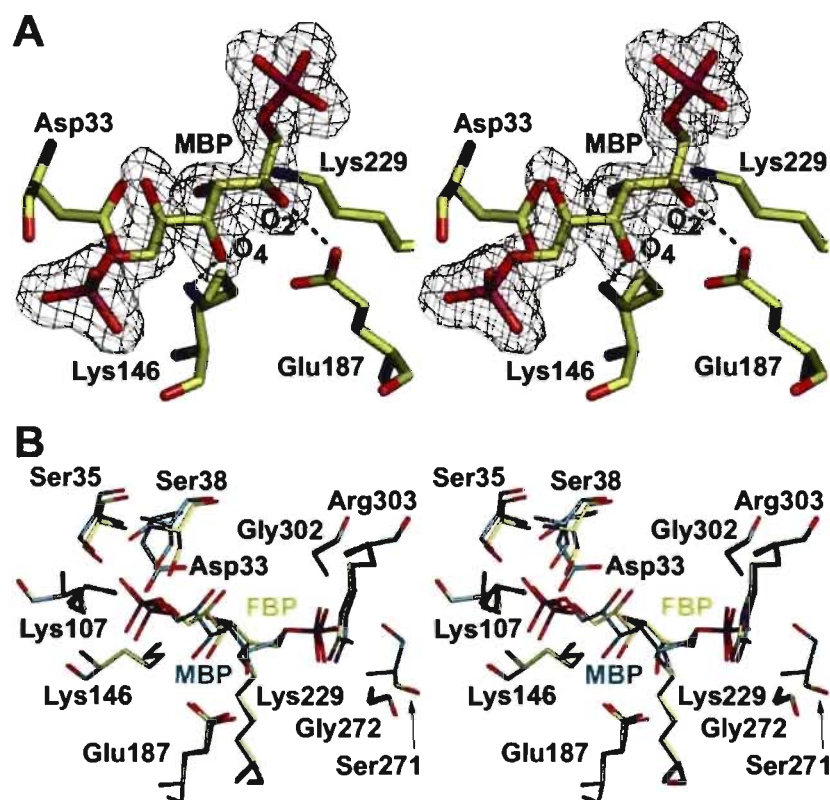


Figure 2.3 MBP bound in the rabbit muscle aldolase active site.

A, electron density showing competitive inhibitor MBP ((2*R*)-HBP) bound in the rabbit muscle aldolase active site. MBP mimics the carbinolamine precursor of the Schiff base. Glu-187 hydrogen-bonds MBP O₂ (green dash). Difference electron density calculated from a 1.9 Å annealed $F_o - F_c$ omit map encompassing MBP and contoured at 3σ . The view is as in Fig. 2.1. **B**, detailed comparison of the FBP Schiff base and MBP bound aldolase structures. Superposition was done with PyMOL using averaged subunits as described under “Materials and Methods”. Yellow and cyan colors were used to depict the structures corresponding to the FBP Schiff base and MBP, respectively. The P₁ phosphate of each ligand occupies the same binding locus. Differences were observed at the C₂ atom due to its different hybridization states and from atoms of the C₃ carbon to the P₆ oxyanion. Except for a small difference in P₆ phosphate binding loci, reflected by relative shift in the α -helix containing residues Ser-35 and Ser-38, positional differences by all other active site residues contacting FBP and MBP were nominal.

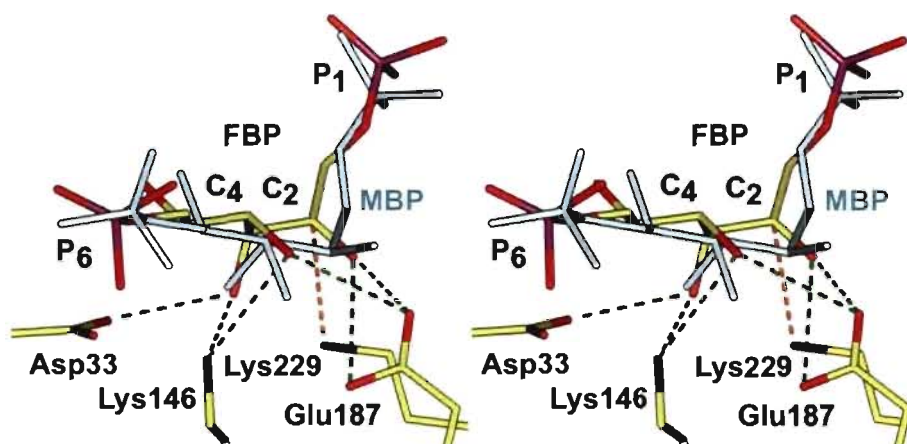


Figure 2.4 Acyclic form of FBP docked in the active site and superposition with MBP bound structure.

The ketohexose- P_2 was docked manually by superposition onto the determined MBP structure, shown in Fig. 2.3A. The modeled structure was then subjected to 2000 steps of conjugated gradient minimization with CNS using topology and parameter from PRODRG. Hydrogen bonding patterns (*green dashes*) were conserved when compared with those in FBP and MBP enzyme adducts. The only significant difference with respect to the observed enzyme adducts is an additional hydrogen bond made by Glu-187 with FBP O_2 . The *orange dash* illustrates the putative nucleophilic face *si* attack made on FBP C_2 carbonyl by Lys-229. Orientation is similar to Fig. 2.1.

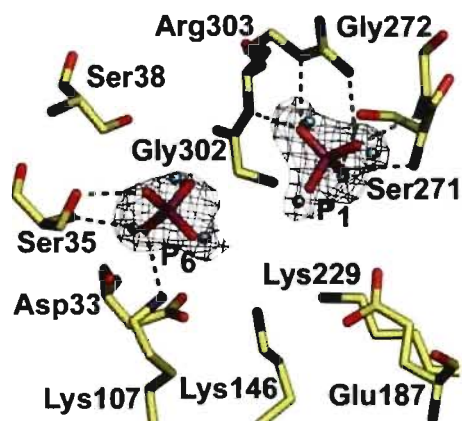


Figure 2.5 Binding by (4*S*)-TBP in the rabbit muscle aldolase active site.

Difference electron density shown was calculated from a 1.9 Å annealed F_o-F_c omit map contoured at 2.5σ . The *green dashes* illustrate hydrogen bonds. Only P₁ and P₆ phosphates were visible in electron density maps and were refined. Phosphates are present at half occupancy, with water molecules accounting for the remaining electron density, and are shown in *cyan*. Orientation is similar to Fig. 2.1.

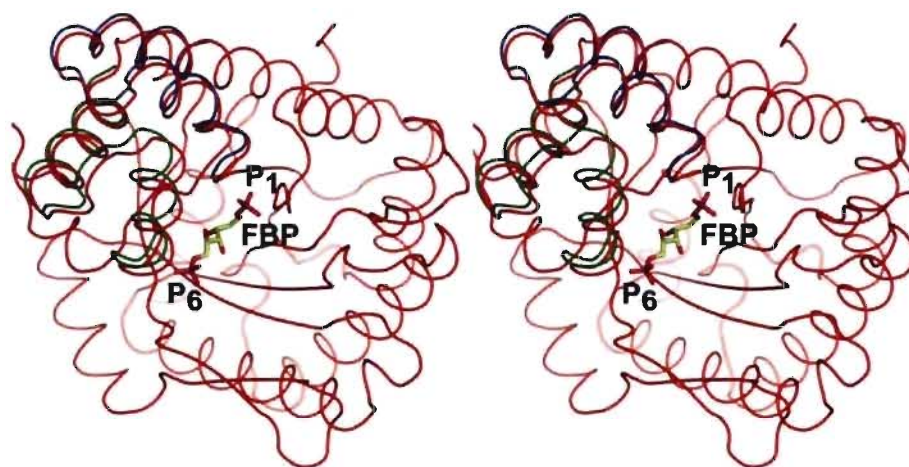


Figure 2.6 Conformational changes induced upon substrate binding.

The Schiff base intermediate was superposed onto the native structure as described under “Material and Methods”. In *red* is shown the trace of the polypeptide backbone of the covalently bound FBP structure. Trace thickness shown corresponds to a 0.35 Å diameter. Trace of residues 10-343 of the native polypeptide backbone was visually indistinguishable from that of the FBP bound structure except for the α -helical regions containing residues 34-65 and 302-329, which in the native structure is shown in *green* and *blue*, respectively. These regions display significant conformational changes upon substrate binding as indicated in Table 2.2. The view is looking into the subunit β -barrel along its axis.

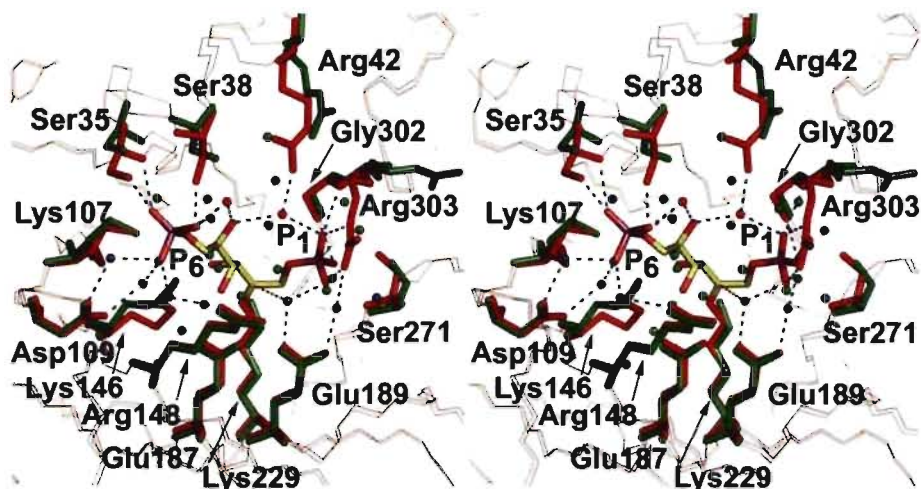


Figure 2.7 Active site changes induced by ligand binding in rabbit muscle aldolase.

In *red* are shown the polypeptide trace and active site residues for the covalently bound FBP structure, whereas in *green* are shown the trace and active site residues for the native structure. The *blue dashes* illustrate hydrogen bonds. Water molecules in *blue* are those found at the same loci in native and FBP structures as well as in the MBP structure. These water molecules form hydrogen-bonding bridges between FBP and side chains of invariant amino acids: Asp-109, Arg-148, and Glu-189. In *green* are shown water molecules found only in native structure that are ejected during FBP binding with accompanying side chain reorganization. Water molecules shown in *red* are only found in the covalent bound FBP structure, one of which participates in a hydrogen bonding relay between Arg-42 and FBP. The conformational changes allow Arg-303 to curl around the FBP P₁ phosphate, whereas Ser-35 and Ser-38 participate in binding the P₆ phosphate. The *orange dash* emphasizes the water molecule closest to FBP C₂ (4.3 Å). These differences were also observed upon MBP binding. The orientation is similar to Fig. 2.1.

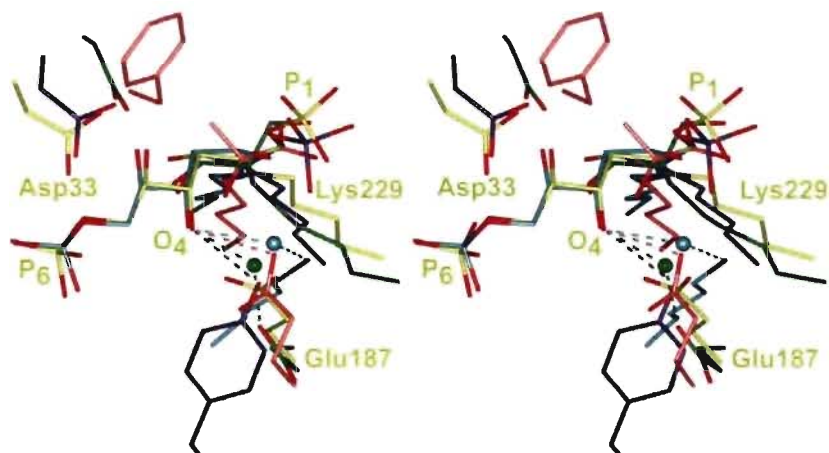


Figure 2.8 Superposition of Schiff base intermediates from diverse class I aldolases.

Comparison among class I aldolases was made at the level of the Schiff base intermediate by superposing equivalent atoms as described under “Materials and Methods”. The Schiff base intermediate of rabbit muscle aldolase is depicted in *yellow*, and shown are active site residues: Asp-33, Glu-187, Lys-229, and FBP. In *cyan* is illustrated the DERA carbinolamine intermediate formed with Lys-167 and D-2-deoxyribose-5-phosphate substrate (Protein Data Bank entry 1JCL) as well as Lys-201 and a water molecule that has a central role in the catalytic mechanism of DERA. The DERA Schiff base mutant structure (Protein Data Bank entry 1JCJ), corresponding to Lys-201→Leu, is isostructural with carbinolamine intermediate including the DERA substrate, allowing interchangeable use of these structures in the superposition. The *cyan dash* illustrates the hydrogen bond observed between the water molecule and Lys-201 and the putative hydrogen bond made by the water molecule with FBP O₄, which is coincident with the equivalent O₃ hydroxyl in the DERA substrate. *Green* depicts the covalent intermediate observed between Lys-132 of transaldolase B and its dihydroxyacetone substrate (Protein Data Bank entry 1UCW). Glu-96 hydrogen-bonds (*green dash*) a water molecule that is also within hydrogen bonding distance of FBP O₄. (suite page suivante).

Also shown is Asp-17 of transaldolase B, homologous to Asp-33 in mammalian class I aldolase. In *violet* is shown the covalent adduct between DHAP and Lys-177 of archaeal FBP aldolase (Protein Data Bank entry 1OK4). Tyr-146 hydrogen-bonds directly FBP O₄ (*violet dash*), as observed for Glu-187 in the Schiff base complex of mammalian FBP aldolase. Asp-24 in the archaeal aldolase is nearly coincident with Asp-33 in mammalian FBP aldolase. In *rose* is shown the pyruvate carbinolamine adduct formed with Lys-133 in KDPG aldolase (Protein Data Bank entry 1EUA), Glu-45 hydrogen-bonds directly FBP O₄ (*rose dash*). Phe-135 in KDPG aldolase is nearly coincident with Asp-17 of transaldolase B. In all structures, oxygen and nitrogen atoms are shown in *red* and *blue* colours, respectively. Superposition with TBP aldolase, not shown for visual clarity, has Glu-163 and Lys-205, coinciding respectively with Glu-187 and Lys-229 in mammalian FBP aldolase. The view is as in Fig. 2.1.

CHAPITRE 3

**Transfert de proton stéréospécifique par un catalyseur mobile
chez la fructose-1,6-bisphosphate aldolase de mammifères**

Mise en contexte

Dans le mécanisme de l'aldolase de muscle de lapin, une étape implique l'échange stéréospécifique du proton pro(*S*) du DHAP C3 (Figure 1.8). Ceci permet l'interconversion entre l'iminium et l'énamine. Malgré de nombreuses études par mutagenèse dirigée et cristallographie, le résidu responsable de cet échange n'a pas encore été identifié.

Dans le but d'observer des intermédiaires catalytiques de l'enzyme avec le DHAP, nous avons entrepris une étude cristallographique d'aldolases de muscle de lapin native et mutante en présence de DHAP. La technique de trempage utilisée permet d'incuber les cristaux d'enzyme avec son substrat pour de courtes périodes de temps et d'ainsi capturer d'authentiques intermédiaires énamine et iminium. Ceci donna accès à une description détaillée des événements entourant l'échange stéréospécifique du proton et d'identifier la tyrosine C-terminale Tyr-363 comme étant le résidu responsable de cet échange.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans un article intitulé « *Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase* » dans *The Journal of Biological Chemistry* en 2007. Dans cette étude, j'ai effectué la totalité des expériences cristallographiques et cinétiques. J'ai procédé à l'analyse finale des structures et à leur déposition dans la PDB, produit les figures et participé à la rédaction du manuscrit avec Dr Jurgen Sygusch.

Article 2.
**Stereospecific Proton Transfer by a Mobile Catalyst in
Mammalian Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase**

Miguel St-Jean and Jurgen Sygusch

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

Address correspondence to: Jurgen Sygusch, Biochimie/Médecine, Université de Montréal,
CP 6128, Station Centre Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada; Tel. 514 343-2389;
Fax: 514 343-6463; E-mail: [REDACTED]

J. Biol. Chem., 2007, **282** (42), 31028-31037

“Reprinted with permission from: Miguel St-Jean, and Jurgen Sygusch.
“Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-
bisphosphate aldolase” *J. Biol. Chem.*, 282 (42), 31028-31037 (2007). ©2007, *The
American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* Reprinted with permission
from *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*”

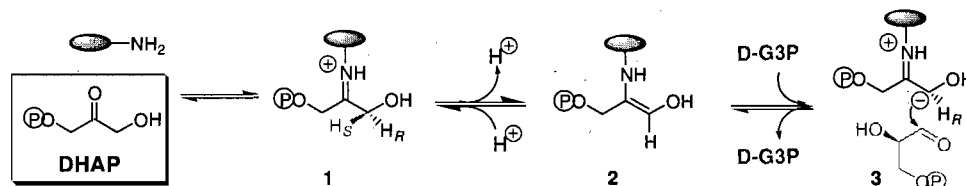
ABSTRACT

Class I fructose-1,6-bisphosphate aldolases catalyze the interconversion between the enamine and iminium covalent enzymatic intermediates by stereospecific exchange of the pro(*S*) proton of the dihydroxyacetone-phosphate C3 carbon, an obligatory reaction step during substrate cleavage. To investigate the mechanism of stereospecific proton exchange, high resolution crystal structures of native and a mutant Lys-146→Met aldolase were solved in complex with dihydroxyacetone phosphate. The structural analysis revealed trapping of the enamine intermediate at Lys-229 in native aldolase. Mutation of conserved active site residue Lys-146 to Met drastically decreases activity and enabled trapping of the putative iminium intermediate in the crystal structure showing active site attachment by C-terminal residues, 360-363. Attachment positions the conserved C-terminal Tyr-363 hydroxyl within 2.9 Å of the C3 carbon in the iminium in an orientation consistent with incipient *re* face proton transfer. We propose a catalytic mechanism by which the mobile C-terminal Tyr-363 is activated by the iminium phosphate via a structurally conserved water molecule to yield a transient phenate, whose developing negative charge is stabilized by a Lys-146 positive charge, and which abstracts the C3 pro(*S*) proton forming the enamine. An identical C-terminal binding mode observed in presence of phosphate in the native structure corroborates Tyr-363 interaction with Lys-146 and is consistent with transient C terminus binding in the enamine. The absence of charge stabilization and of a mobile C-terminal catalyst explains the extraordinary stability of enamine intermediates in transaldolases.

INTRODUCTION

Stereospecificity is one of the hallmarks of enzyme catalysis. Aldolases, which are abundant and ubiquitous enzymes, catalyze stereospecific carbon-carbon bond formation, one of the most important transformations in living organisms. Their role is best known in glycolysis where fructose-1,6-bis(phosphate) (FBP) aldolases [EC 4.1.2.13] promote the cleavage of FBP to triose phosphates, D-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP). A common feature to class I enzymes is the use of a covalent mechanism for catalysis implicating iminium (protonated Schiff base) formation between a lysine residue on the enzyme and a ketose substrate (1) that entails stereospecific

proton exchange in the covalent intermediate (2). Of the three aldolase isozymes found in vertebrates (3), the catalytic mechanism has been extensively studied using class I aldolase A from rabbit muscle and key intermediates are depicted in reaction Scheme 1.



SCHEME 1. Intermediates of the catalytic mechanism in class I aldolases.

In the condensation direction, the reaction involves covalent intermediate formation with the keto triose phosphate DHAP followed by condensation with the aldehyde G3P to form the ketose of the acyclic FBP substrate (4, 5). To form the C3-C4 bond of FBP, the enzyme stereospecifically abstracts the pro(*S*) C3 proton of the trigonal iminium **1** (6, 7) that is formed from the Michaelis complex with DHAP thereby generating via the enamine **2** (2) the carbanionic character at C3 of DHAP for the aldol reaction. The nascent carbon-carbon bond has the same orientation as the pro(*S*) α -hydrogen initially abstracted from the DHAP imine intermediate. The overall retention of configuration at C3 requires that proton abstraction from **1** to yield the enamine **2** and condensation with aldehyde in **3** must take place from the same direction on the enzyme (8). The iminium intermediate formed is then hydrolyzed and FBP is released by the inverse reaction sequence shown in Scheme 1.

A distinguishing mechanistic feature of class I aldolases is the relative stability of the iminium **1** and enamine **2** forms, which is a consequence of the catalytic requirements. The enzyme must stabilize the enamine **2** and/or the preceding iminium **1** such that no decomposition occurs prior to reaction with the aldehyde as shown in **3**. This stability is reflected in solution where the enzymatic populations **1** and **2** represent 20 and 60%, respectively, of bound DHAP on the muscle enzyme under equilibrium conditions (9). The interconversion between the two forms implicates the conserved C-terminal Tyr-363 residue whose proteolysis inhibits the stereospecific proton exchange step, making it rate limiting (10), whereas the penultimate residues (357-362) of the C-terminal region modulate the rate of exchange reaction (11). The C-terminal region (residues 343-363) is conformationally mobile (12, 13), has an extended secondary structure (14, 15), and

distinguishes mammalian aldolases and their orthologues. Although a number of structural studies have been performed that have investigated intermediates in class I aldolases (15, 16, 17, 18), characterization of the interconversion between the iminium and the enamine has so far proven elusive at the structural level.

To investigate the mechanism of stereoselective proton transfer in class I aldolases and how the enzyme is able to make efficient use of intermediates that are intrinsically unstable molecules, high resolution crystallographic studies were undertaken of rabbit muscle class I FBP aldolase in complex with DHAP using aldolase crystals incubated in presence of DHAP in non-acidic buffer (pH 7.5), similar to kinetic studies (9). Flash freezing of a native rabbit muscle aldolase crystal soaked in a saturating DHAP solution trapped the enamine intermediate. On the other hand, a crystal of the active site mutant Lys-146→Met revealed DHAP bound as the iminium intermediate and interacting with the C-terminal tyrosine in the active site. Attachment by the C-terminal region yielded reaction geometry conducive for incipient proton transfer at the DHAP C3 carbon and explained proton exchange chirality.

MATERIALS AND METHODS

Purification and Crystallization - Expression and purification of recombinant native (WT) and Lys-146→Met mutant (K146M) rabbit muscle aldolases were performed as described previously (11, 15, 19) and using *Escherichia coli* strain BL21 SI for overexpression of recombinant proteins (Invitrogen). Aldolase concentration was determined using an extinction coefficient of $0.91 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ at 280 nm (20). WT and K146M aldolases were crystallized using the conditions reported previously (15).

Proton Exchange - Stereospecific pro(*S*) proton exchange at the C3 carbon of DHAP catalyzed by WT and K146M aldolases and WT aldolase crystals was followed by appearance of the tritium isotope label as (*S*)-[3- $^3\text{H}_1$]DHAP from tritiated water. Incorporation of tritiated label at (*S*)-C3 of DHAP in presence of [^3H] $_2\text{O}$ was determined using an ion exchange protocol (Dowex Cl^- resin) described in the literature (8). Carboxypeptidase A treated aldolase was prepared according to conditions described

previously (10). Digestion of aldolase by carboxypeptidase A was monitored by loss of enzymatic activity using a coupled assay and following NADH oxidation at 340 nm (21). The proteolyzed enzyme was separated from carboxypeptidase A by size exclusion chromatography when aldolase activity was decreased to 5% of the original activity.

Data Collection and Processing - WT aldolase crystals were soaked either for 2 min in ligand buffer containing DHAP (mother liquor plus 1 mM DHAP) or in phosphate buffer for 5 min (mother liquor plus 20 mM NaH_2PO_4). A K146M mutant aldolase crystal was soaked for 10 min in a ligand buffer containing a higher concentration of DHAP (mother liquor plus 20 mM DHAP). Prior to data collection, single crystals were cryoprotected in a soaking buffer containing 15% glycerol and immediately flash frozen in a stream of gaseous N_2 cooled to 100 K. Data collections were performed at beamline X8-C of the National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, NY) and diffracted intensities were measured using Quantum4 charge-coupled device detector (Area Detector Systems, Poway, CA). All data sets were processed with HKL2000 (22) and the results are summarized in Table 3.1.

Structure Determination and Refinement - Liganded crystal structures were isomorphous with the crystal structure of native aldolase and belong to the monoclinic space group $\text{P}2_1$. Structures were solved by difference electron density maps using a native aldolase homotetramer structure as reference model (Protein Data Bank code 1ZAH) (15). Each asymmetric unit contains one homotetramer, consistent with the biologically active form of the enzyme. Refinement was performed using all reflections having an $I/\sigma(I) > 1$, however, electron density maps were calculated to the resolution indicated in the Table 3.1 to ensure at least ~70% completeness in the highest resolution shell with an $I/\sigma(I) > 2$. Each refinement cycle was performed as reported previously (15) using Crystallography and NMR System (23) and O (24). The PRODRG server was used to generate ligand topology and parameter files (25). The presence of ligands in the final models was confirmed by observation of simulated annealing $F_o - F_c$ omit maps. Final model statistics, calculated with CNS and PROCHECK (26), are shown in Table 3.1. The coordinates and structure factors of WT aldolase soaked with DHAP, WT aldolase soaked with inorganic phosphate (P_i), and K146M aldolase soaked with DHAP have been deposited with the Protein Data Bank (codes 2QUT, 2QUV, and 2QUU, respectively). The final structure models have R_{cryst} (R_{free})

values of 0.159 (0.191), 0.144 (0.191), and 0.157 (0.195), respectively. The corresponding positional errors in atomic coordinates using Luzzati plots were estimated at 0.17, 0.18, and 0.18 Å, respectively. Errors in hydrogen bond distances and positional differences are reported as standard deviations and were estimated based on their value in each subunit of the aldolase homotetramers unless specified otherwise. All figures were prepared using the program PyMOL (27). Superpositions were performed also with the program PyMOL overlaying C α atom coordinates of aldolase residues 158-259 that are invariant to binding events as noted previously (15).

Chemical identity of covalent intermediates trapped in the WT-DHAP and K146M-DHAP structures was selected from simulated annealing F_o-F_c omit maps using the real space statistic, R_{fact} , calculated in O (RS_FIT command). The statistic assesses the fit of Lys-229 C ϵ and N ζ atoms and DHAP C1, C2, C3, and O3 atoms in enamine and iminium forms to the electron density. In the enamine, Lys-229 N ζ would be sp^3 hybridized, whereas in the iminium, the hybridization would be sp^2 . The discrimination of this difference in hybridization between the iminium and the enamine was quantified using a paired Student's t test comparing pairwise R_{fact} statistics for identical subunits having the bound DHAP refined as either iminium or enamine form.

RESULTS

Enamine Intermediate - Flash freezing of a WT aldolase crystal in presence of DHAP trapped a covalent intermediate in each aldolase subunit. Continuous electron density, extending beyond Lys-229 N ζ in each subunit, shown in Fig. 3.1, indicates formation of a stable covalent adduct with DHAP. The planar shape of the electron density observed about the DHAP C2 carbon indicates trigonal hybridization, whereas non-planar shape of the electron density about the Lys-229 N ζ atom suggests tetrahedral hybridization and is consistent with trapping of a *cis*-enamine intermediate in each aldolase subunit (Fig. 3.2A). Comparison of average B -factors between bound DHAP and interacting side chains, 24 ± 3 and 21 ± 3 Å², respectively, indicates full active site occupancy by DHAP. To validate the electron density interpretation, real space R_{fact} was evaluated (24) to objectively

assess model fit to the electron density. The resulting paired Student's *t* test statistic calculated based on R_{fact} values for DHAP modeled as either an enamine or an iminium was discriminatory with $p = 0.042$, the enamine having consistently lower R_{fact} values in all subunits. This distinction is statistically significant and confirms trapping of a genuine enamine intermediate. Proton exchange in WT aldolase crystals as measured by production of (*S*)-[3-³H₁]DHAP (Table 3.2) indicates 10 turnovers within the 2-min soaking period of DHAP into the aldolase crystal and corroborates equilibrium trapping of an enamine intermediate in all subunits. Coplanarity of DHAP C1, C2, C3, and O3 atoms, a requisite structural feature in the enamine intermediate, further supports identification of the intermediate as the enamine.

Numerous interactions with active site residues stabilize the covalent intermediate, shown in Fig. 3.1. These interactions are identical to those reported in the structure of the iminium intermediate formed with FBP substrate by the same enzyme (15) including an unusual short hydrogen bond ($2.4 \pm 0.1 \text{ \AA}$) with Ser-271 side chain. Asp-33 and Lys-146 further stabilize the intermediate by hydrogen bonding with DHAP C3 hydroxyl and on the basis of consistency with the hydrogen bonding pattern, Lys-146 is protonated. An additional hydrogen bond between Ser-300 hydroxyl and Lys-229 N ζ specifically stabilizes the enamine intermediate (Fig. 3.2A), which is not possible in the carbanion or the iminium requiring sp^2 hybridization at Lys-229 N ζ . Stabilization of the enamine by the hydrogen bond is reflected in the reduced pro(*S*) proton exchange rate at C3 of DHAP when measured for the mutations Ser-300 to Ala and Cys and compared to native enzyme (28). Elimination of hydrogen bonding potential in the mutation S300A yielded a 5-fold reduction in exchange rate, whereas weakening of the same hydrogen bond in mutation S300C reduced the rate 3-fold.

Active site binding of DHAP induces identical conformational changes in each aldolase subunit with respect to native enzyme that results in the asymmetric narrowing of the active site cleft, similar to the conformational change observed in the structure of the iminium intermediate formed with FBP (15). From Table 3.3, conformational displacements of these helical regions, although smaller than for the FBP bound structure, are significant when compared with residues 158-259 of the β -barrel, which make up part of the active site and inter-subunit contacts.

Superposition of the native and enamine bound structures identified two conserved water molecules, W1 and W2, whose positions remain invariant upon DHAP attachment (Fig. 3.1). W1 that has a low *B*-factor ($23 \pm 4 \text{ \AA}^2$), similar to that of *C* α atoms of residues 10-343 ($20 \pm 8 \text{ \AA}^2$), is positioned by hydrogen bonds with Glu-187 and W2, at $3.1 \pm 0.1 \text{ \AA}$ from both DHAP C2 and C3 carbons. The orientation of W1 is perpendicular to the enamine plane and more in line with the DHAP C2 carbon. A similar in line geometry with the C3 carbon position would require only a slight positional displacement by the water molecule.

Phosphate Binding - Phosphate anion binding to aldolase is inhibited by DHAP (29) indicating competition for the P1 phosphate binding site. To address the specificity of the induced conformational changes in stabilization of the enamine intermediate, a WT aldolase crystal was soaked in a phosphate buffer. Structural analysis revealed subunit heterogeneity in response to phosphate binding with respect to the extent of asymmetric narrowing of the active site cleft and binding specificity was controlled by active site attachment of C-terminal residues 360-363.

In one subunit (D), phosphate anion binding coincides with the DHAP P1 phosphate site in the enamine structure and concomitant with the C terminus occluding the active site (Fig. 3.3). The conformational changes induced by phosphate bound at the P1 phosphate binding site were greatest in this subunit and comparable with those induced by DHAP with respect to the native enzyme. In addition, Ser-38 from the helical region 33-65 was displaced by 0.6 \AA along the helical axis to avoid close contact with Tyr-363 in the active site. An additional partially occupied phosphate binding site was found at the subunit interface and interacting with residues Gln-202, Arg-258, and Lys-12, the latter from an adjacent subunit.

In two other subunits (A and C), the phosphate anion binding site is shifted $\sim 2 \text{ \AA}$ from the previous DHAP P1 phosphate binding locus towards the surface of the active site (not shown). Binding at this site does not involve active site attachment by the C terminus region nor significant conformational changes and is of lower affinity as phosphate positions refined to partial occupancy. The C-terminal regions are fully bound at their proper subunit interface as in the enamine structure and C terminus Tyr-363 interacts with

the same residues involved in phosphate binding as those implicated at the subunit interface of D.

In the remaining subunit (B), electron density in the active site was interpreted as a superposition of the two previous mutually exclusive phosphate binding sites, which included alternate geometries of the C-terminal regions, consistent with the refined partial occupancy for each site. Increased C terminus resistance to carboxypeptidase A degradation in the presence of phosphate (12) would argue that physiological concentrations of phosphate enhance active site sequestration of Tyr-363, as observed in subunits B and D.

Iminium Intermediate - Site-directed mutation of Lys-146 to Met severely compromises aldolase catalytic activity (30) and stereospecific proton exchange at the enamine, shown in Table 3.2. Flash freezing of a K146M mutant crystal soaked in presence of DHAP trapped a covalent intermediate in the active site of all subunits. The fit by DHAP to the electron density, shown in Fig. 3.2B, and modeled as an iminium instead of an enamine was statistically significant yielding a paired Student's *t* test statistic of $p = 0.035$. Comparison of average *B*-factors between bound DHAP and interacting side chains, 23 ± 2 and $23 \pm 3 \text{ \AA}^2$ respectively, suggests full active site occupancy by DHAP. Covalent attachment by DHAP yielded a conformation including coplanarity of Lys-229 N ζ , DHAP C1, C2, C3, and O3 atoms as well as an unusual short hydrogen bond ($2.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$) with Ser-271 side chain. Phosphate anion was bound at the same loci in a K146M-P_i structure compared to the WT-P_i structure (M. St-Jean and J. Sygusch, unpublished data), indicating that the mutation does not affect active site integrity with respect to ligand binding at the P1 phosphate binding site.

Surprisingly, in subunit D of the K146M-DHAP structure, the last four residues of the C-terminal region, disordered in the native and enamine structures, were bound ordered in the active site with Tyr-363 adjacent to the iminium intermediate (Fig. 3.4). Conformational similarity of the bound C-terminal region with that of the same C-terminal region observed in WT-P_i (Fig. 3.3) (root mean square deviation of 0.51 \AA for backbone atoms of residues 360-363) suggests that the observed C-terminal conformation is determined through contacts with active site residues, shown in Fig.3.4, that are conserved (31). Lys-107 displays two conformations of equal occupancy, one of which interacts with

the Tyr-363 carboxylate, also observed in the WT-P_i structure, whereas in the second conformation, Lys-107 makes a salt bridge with Asp-109 present in all subunits.

Active site interaction positions the Tyr-363 hydroxyl 2.9 Å from the DHAP C3 carbon and approximately perpendicular to the *re* face of the plane as defined by DHAP carbon atoms. Active site attachment by the C terminus was not an artifact of the Lys146→Met mutation, as C terminus binding was not observed in the active site of unbound K146M mutant aldolase (M. St-Jean and J. Sygusch, unpublished data). DHAP binding induced the same conformational changes in both α-helical regions as in the enamine although displacements of the helices comprising residues 33-65 were comparatively smaller (<0.4 Å) in all subunits of the K146M mutant. The smaller displacement could be reasonably explained by the loss of the interaction between Lys-107 and Asp-33 that anchors the flanking helix comprising residues 33-45.

C-terminal Active Site Docking - To discern conformational changes corresponding to entry of the C terminus into the active site, the structures of WT-DHAP, K146M-DHAP, and WT-P_i were compared after superposition onto the native structure. Two conformational states were evident for each aldolase subunit and are a function of the C-terminal conformation: an open conformation, observed in the WT-DHAP structure, where the C terminus is not bound in the active site and a closed conformation, observed in subunit D of the WT-P_i and K146M-DHAP structures (Figs. 3.3 & 3.4, respectively), where the C-terminal region binds the active site. C-terminal active site interactions include Tyr-363 carboxylate salt bridging with Lys-107 and hydrogen bonding linking Ala-362 backbone carbonyl with Ser-38 and His-361 with Arg-42, which in turn interacts with Ser-38 (Fig 3.5A). The Arg-148 side chain further stabilizes attachment by hydrogen bonding with His-361 backbone carbonyl. In the closed conformation, the helix flanking the active site (residues 33-45) and interacting with the C-terminal region not only narrows the active site cleft but also shifts by ~0.5 Å outwards along its helical axis relative to the structure of the enamine.

The outward positional movement of the flanking helix disrupts a hydrogen bonding network mediated by two water molecules that involves Ser-38. The network in the open conformation entails Lys-107 Nζ hydrogen bonding both with Asp-33 side chain and backbone carbonyl and with a water molecule W3 (Fig. 3.5B). W3 in turn hydrogen bonds

Ser-35 backbone amide and another water molecule W4, which in turn hydrogen bonds Ser-38 hydroxyl. C terminus entry displaces W3 and W4 and concomitant movement of the flanking helix enables Ser-38 to interact with the incoming C-terminal Ala-362 backbone carbonyl. Displacement by Ser-38 of the flanking helix is essential to avoid an otherwise close contact (2.6 Å) with Tyr-363 C β (Fig. 3.5B). The hydrogen bond between Tyr-363 and Lys-146 (2.7 Å) in the WT-P_i structure would result in a close contact of ~2 Å between Tyr-363 hydroxyl and DHAP C3 carbon when superimposed onto the enamine structure (Fig. 3.5B). The close contact is alleviated in the iminium structure by slight lateral adjustment of Tyr-363 and His-361 side chains. Active site penetration by Tyr-363 hydroxyl in the iminium displaces the conserved water molecule W1, bound by Glu-187, present in all subunits of WT-DHAP and WT-P_i structures.

DISCUSSION

The ability to cryotrap the enamine and iminium intermediates of the aldolase catalytic cycle in the crystalline state provided a unique opportunity to characterize conformational states associated with proton transfer during iminium-enamine interconversion. Analysis of the conformational states enabled a detailed description of the molecular events catalyzing stereospecific proton exchange by the C-terminal region in class I aldolases.

DHAP Covalent Intermediates - The covalent enzymatic complexes trapped in the presence of DHAP in crystals of native and K146M mutant rabbit muscle aldolases represent authentic enamine and iminium intermediates, respectively. A unique feature of the enamine structure is Ser-300 hydroxyl hydrogen bonding Lys-229 N ζ that is only possible in the enamine form and not in the iminium (Fig. 3.2). Stabilization of the enamine intermediate is further assisted by Asp-33 and Lys-146, which hydrogen bond DHAP O3 and maintain the DHAP O3 coplanar with respect to the C2 and C3 carbons that is requisite for resonance stabilization of the enamine form. The unusual short hydrogen bond between Ser-271 and the DHAP P1 phosphate in both iminium and enamine is not present in case of

the phosphate anion bound. Covalent attachment by DHAP apparently induces strain, which is resolved by short strong hydrogen bond formation (32).

C-terminal Region - The trapping of the C terminus in the active site of the K146M mutant, shown in Fig. 3.4, is the first structural evidence corroborating that C-terminal Tyr-363 engages in stereospecific proton exchange in rabbit muscle aldolase (10). Artfactual active site binding as a result of the mutation is unlikely as an identical interaction with active site residues is observed in the WT-P_i structure. Partial occupancy by the C-terminal region in the mutant iminium intermediate indicates that the entropic penalty due to C-terminal ordering upon binding is compensated by binding interactions with active site residues and entropic gain due to displacement of water molecules, W3 and W4.

Comparison of the two DHAP bound structures indicates that in the enamine diminished active site hydrophobicity and electrostatic charge destabilization of Lys-107 by Lys-146, weakening Lys-107 interaction with Tyr-363 carboxylate would diminish active site interaction energy of Tyr-363. Reduced interaction energy would favor transient C-terminal attachment that is in agreement with the absence of C-terminal binding in the native enamine structure. Conformational mobility by the C-terminal region is requisite for its catalytic function, as in the closed conformation the C terminus would collide with the nascent G3P moiety of the FBP molecule, seen in Fig. 3.6A. Weak interaction by the C-terminal region would thus limit its active site competition enabling product release and/or substrate binding. The extensive configurational entropy of the C-terminal region and its limited active site affinity are indispensable mechanistic requirements wherein the C-terminal region functions as a mobile catalyst.

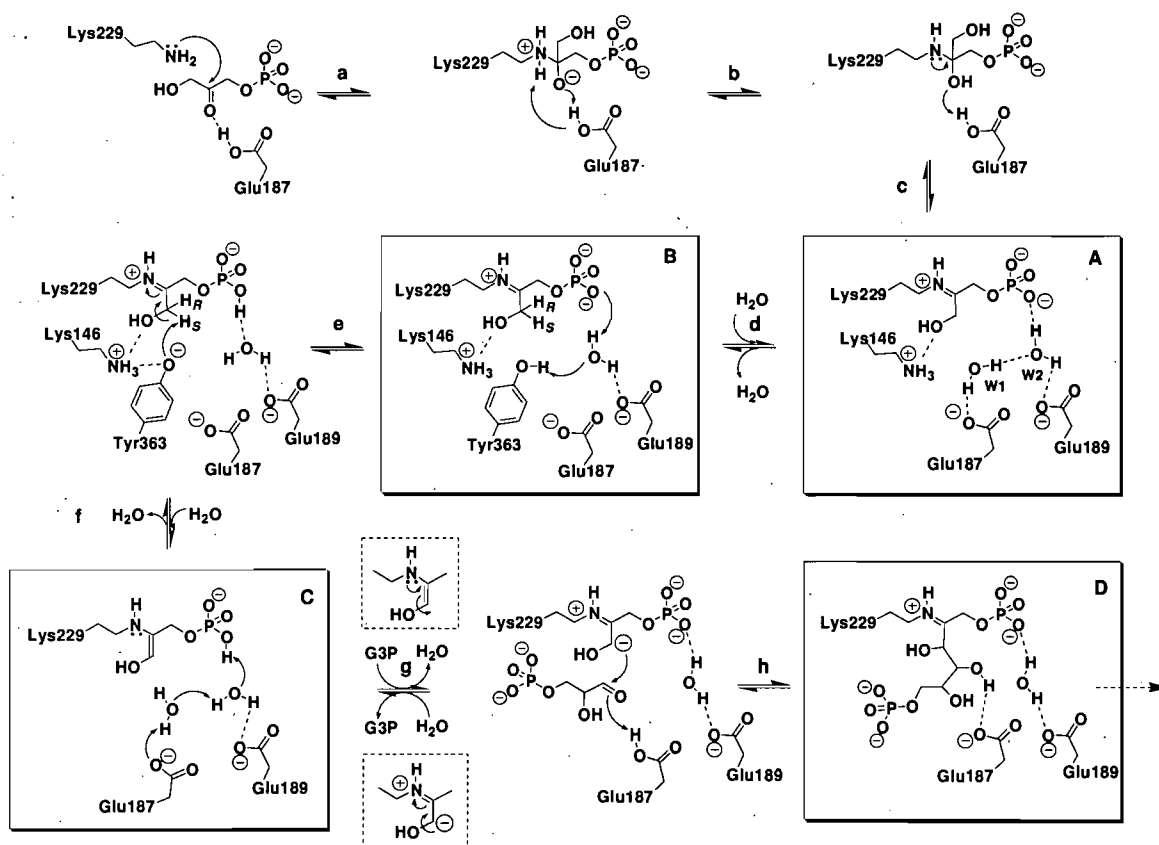
Interactions made by the C-terminal region with active site residues are predominantly through its peptide backbone alluding to similar modes of active site docking by C-terminal regions of class I aldolase orthologues. The five penultimate residues of the C-terminal sequence are not conserved and only Asn-360 and His-361 side chains interact with the active site locus contacting side chains of residues, Lys-152 and conserved Arg-42, respectively. The flexible side chains of the interacting residues tolerate amino acid substitution obviating sequence conservation of the penultimate residues with regards to catalytic function. Differences in active site binding affinity due to sequence variation at residues 360 and 361 is consistent with modulation of the DHAP exchange

reaction by chimeric constructs implicating these penultimate residues of the C-terminal region in aldolase orthologues (11).

Stereospecific Proton Transfer - The crystallographic structures are consistent with Tyr-363 facilitating *re face* stereospecific pro(*S*) proton exchange with respect to the DHAP C3 carbon atom in the iminium and enamine intermediates of rabbit muscle aldolase. The immediate microenvironment of Tyr-363 in the active site is not hydrophobic consisting of charged residues and a water molecule that would argue for a solution $pK_a \sim 10.5$ for Tyr-363 and is supported by a proposed $pK_a > 9$ for the basic group involved in α -proton abstraction in muscle aldolase (33). A $pK_a \sim 18$ has been estimated for the ionization at DHAP C3 (34), which in the iminium would be lowered to a value approaching that of a tyrosine (35, 36, 37), favoring proton transfer by matching pK_a values. Overlay of the K146M-DHAP and WT-P_i structures onto WT-FBP structure (15) positions the C terminus Tyr-363 hydroxyl in close contact with the C4 atom of the FBP molecule (Fig. 3.6A), indicating a common stereochemical route to bond formation at C3 in the proton exchange and G3P addition and corroborating overall retention of configuration at C3 in the enamine (8). A catalytic mechanism is outlined in Scheme 2 integrating the enzymological and crystallographic data and describing FBP condensation in class I FBP aldolases, including interconversion between the iminium and enamine forms.

The catalytic cycle begins by DHAP binding narrowing the active site cleft to stabilize ligand attachment. Glu-187 catalyzes iminium formation as previously described (15), shown in Scheme 2, reactions *a-c*. The resultant iminium, *panel A*, can be reversibly hydrolyzed by the conserved water molecule W1, activated by Glu-187 and is positioned perpendicular to the plane defined by DHAP carbon atoms and Lys-229 N ζ and hydrogen bonds the DHAP C2 carbon of the iminium, reaction *c*. Transient binding by Tyr-363, reaction *d*, displaces W1 in *panel B*, and Tyr-363 hydroxyl is activated by sequential proton transfer through the conserved water molecule W2, hydrogen bonded to the iminium phosphate dianion that acts as a conjugate base, reaction *e*. Proton abstraction generates the Tyr-363 phenate that is electrostatically stabilized by Lys-146, consistent with Tyr-363 - Lys-146 interaction in the WT-P_i structure; subsequent stereospecific pro(*S*) α -proton abstraction by Tyr-363 phenate in reaction *f* generates the enamine, *panel C*. C terminus expulsion is followed by rebinding of water molecule W1. The enamine phosphate

catalyzes proton transfer via intervening water molecules, W1 and W2, to generate the acid form of Glu-187 for subsequent aldehyde activation in reaction *g*. Concomitant attachment of G3P displaces W1 and the electrophilic character at C1 of the activated G3P aldehyde promotes carbanion mesomer formation. The acid form of Glu-187 thus catalyzes C-C bond formation, shown in reaction *h*, yielding the FBP iminium in *panel D*, described previously (15).



SCHEME 2. FBP condensation in class I aldolase.

Proton transfer during the catalytic cycle is consistent with a trajectory of least atomic motion, including interconversion of the iminium to the enamine that entails only slight torsional librations by Tyr-363 side chain in the active site, Scheme 2, reaction *e*, illustrated in Fig. 3.6B. Central to the proposed interconversion mechanism is the activation of the Tyr-363 hydroxyl. Glu-187 has been implicated in multiple proton transfers in the catalytic mechanism of the aldolase (15, 38) and as a conjugate base, Glu-187 could abstract the proton of the Tyr-363 hydroxyl. However, this possibility is unlikely as it

would require deeper penetration of the Tyr-363 hydroxyl into the active site for proper hydrogen bonding with Glu-187, which is not observed. By contrast, the trajectory of the Tyr-363 hydroxyl resulting from a small side chain libration ($\sim 20^\circ$) primarily by the tyrosyl ring about its C α -C β bond (coupled to a similar movement by His-361 side chain) enables close contact (≤ 2.5 Å) with the invariant water molecule W2, hydrogen bonded to the DHAP P1 phosphate, or with DHAP C3 atom (Fig. 3.6B); the latter conformation also resulting in hydrogen bond formation with Lys-146 and thus electrostatically stabilizing the Tyr-363 phenate. The P1 phosphate dianion $pK_a \sim 6.45$ (39) supports the role of the phosphate oxyanion as the conjugate base at physiological pH catalyzing proton transfer relayed through the invariant water molecule W2. The proposed mechanism explains the absence of α -proton exchange in presence of dihydroxyacetone-sulfate, binding resulting in iminium but not enamine formation (40) as the sulfate dianion is too weakly basic to catalyze proton exchange. Indeed in model systems, the phosphate dianion has been shown to catalyze intramolecular α -proton abstraction, whereas the sulfate dianion did not accomplish the same function (41).

The catalytic model reconciles longstanding findings implicating the C terminus in class I aldolase catalysis (10, 42). The 500-fold rate reduction upon Tyr-363 loss by proteolysis (43) is consistent with the water molecule W1, activated by Glu-187 shown in *panel A*, partitioning between iminium hydrolysis and, to a lesser extent, pro(*S*) α -proton abstraction. The activated water molecule is well aligned for nucleophilic attack at the DHAP C2 carbon, whereas a slight lateral shift (< 1 Å) towards the DHAP C3 carbon would result in hydrogen bonding with Lys-146 and position it to catalyze the pro(*S*) α -proton transfer. Electrostatic stabilization of a hydroxyl nucleophile by Lys-146, and indirectly Lys-107, would further facilitate alignment of the nucleophile for α -proton transfer and predicts a pH dependence of enamine formation dependant on respective pK_a values of the lysine residues. Indeed, pH profile analysis of enamine formation in the proteolyzed enzyme shows a sharp fall in DHAP trapped as enamine from pH 7.5 to 8.5, and was shown to depend on a change of approximately two protons with similar pK_a values of ~ 8.0 (33).

Mobile C-Terminal Catalyst - The C-terminal tyrosine is conserved in all class I FBP aldolases sequenced to date including orthologues found in mammals, higher plants, as well as parasites (31). Although proteolysis of the C-terminal region inhibits α -proton

exchange in the enamine, the enzyme retains transaldolase activity as proteolysis does not significantly affect the ability to exchange FBP with G3P (10, 44). Transaldolases that have the same fold and similar active site disposition of catalytic residues as class I aldolases (16) differ by the exceptional stability of their enamine (45) due to an absence of a mechanistic pathway enabling interconversion of the enamine to the iminium. Indeed, in contrast to class I aldolase, the active site of bacterial transaldolase B has no amino acid residue capable of charge stabilization vicinal to the C3 carbon of dihydroxyacetone and the enzyme lacks a mobile C-terminal region capable of mediating α -proton transfer (46).

In the proton exchange mechanism describing interconversion of the acetaldehyde iminium to enamine in D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA), a water molecule that is activated by Lys-201, adjacent to the iminium forming Lys-167, was postulated on the basis of molecular mechanics as responsible for stereospecific *pro(S)* α -protonation of the acetaldehyde C2 carbon (18). The water molecule is positioned competent for catalyzing proton transfer at the C2 position in the enamine and would, as in class I FBP aldolase, enable iminium hydrolysis at the C1 position, yet cleavage activity of native DERA exceeds that of carboxypeptidase-treated muscle aldolase by more than 400-fold. DERA, similar to muscle aldolase, also has a C-terminal region and mutation of its C terminus Tyr-259 to Phe diminishes catalytic activity by 200-fold (18). Even though the last eight residues of the C-terminal region in DERA are apparently conformationally disordered, molecular modeling indicates that the C terminus Tyr-259 can reach into the active site (18). Active site penetration by C terminus Tyr-259 to promote α -proton exchange during iminium-enamine interconversion, as in muscle aldolase, would resolve the apparent mechanistic conflict of the same water molecule participating in two competing reactions. Finally, it is intriguing that in archaeal FBP aldolases, which do not have a mobile C terminus tyrosine catalyst, the cleavage reaction rate is 2 orders of magnitude lower compared with mammalian FBP aldolases (47).

FOOTNOTES

This work was supported in part by the Natural Science and Engineering Research Council (Canada) and Canadian Institutes for Health Research. Work was carried out in part at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, which is supported

by the United States Department of Energy, Division of Materials Sciences and Division of Chemical Sciences under contract DE-AC02-98CH10886. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

M. St-J. was recipient of a Ph.D. Scholarship from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christine Munger for proton exchange experiments with the Ser300 aldolase mutants and Drs. Casimir Blonski and Tina Izard for insightful critiques and suggestions. Assistance by Dr. L. Flaks, X8-C beamline, was appreciated. We also thank computational resources available at ASDP web site (asdp.bnl.gov).

ABBREVIATIONS

FBP, fructose-1,6-bis(phosphate); G3P, D-glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; WT, recombinant wild type; DERA, D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase.

DATA DEPOSITION

The atomic coordinates and structure factors (codes 2QUT, 2QUV, and 2QUU) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, NewBrunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

REFERENCES

-
1. Grazi, E., Rowley, P. T., Chang, T., Tchola, O., and Horecker, B. L. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 38-43
 2. Rose, I. A., and Rieder, S. V. (1958) *J. Biol. Chem.* **231**, 315-329
 3. Penhoet, E. E., and Rutter, W. J. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 318-323

4. Rose, I. A., and Warms, J. V. (1985) *Biochemistry* **24**, 3952-3957
5. Ray, B. D., Harper, E. T., and Fife, W. K. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3731-3732
6. Jencks, W. P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill Book Company, New York, p.120-121
7. Grazi, E., Cheng, T. and Horecker, B. L. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 250-253
8. Rose, I. A. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5835-5836
9. Rose, I. A., Warms, J. V. B., and Kuo, D. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 692-701
10. Rose, I. A., O'Connell, E. L., and Mehler, A. H. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1758-1765
11. Berthiaume, L., Tolan, D. R., and Sygusch, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10826-10835
12. Adelman, R. C., Morse, D. E., Chan, W., and Horecker, B. L. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 343-352
13. Sygusch, J., Beaudy, D., and Allaire, M. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 227-233
14. Blom, N., and Sygusch, J. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 36-39
15. St-Jean, M., Lafrance-Vanasse, J., Liotard, B., and Sygusch, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 27262-27270
16. Choi, K. H., Shi, J., Hopkins, C. E., Tolan, D. R., and Allen, K. N. (2001) *Biochemistry* **40**, 13868-13875
17. Lorentzen, E., Pohl, E., Zwart, P., Stark, A., Russell, R. B., Knura, T., Hensel, R., and Siebers, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47253-47260
18. Heine, A., DeSantis, G., Luz, J. G., Mitchell, M., Wong, C. H., and Wilson, I. A. (2001) *Science* **294**, 369-374
19. Morris, A. J., and Tolan, D. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1095-1100
20. Baranowski, T., and Niederland, T. R. (1949) *J. Biol. Chem.* **180**, 543-551
21. Racker, E. (1947) *J. Biol. Chem.* **167**, 843-854
22. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326
23. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J.,

-
- Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921
24. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **47**, 110-119
25. Schuttelkopf, A. W., and van Aalten, D. M. (2004) *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**, 1355-1363
26. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-290
27. DeLano, W. L. (2004) *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA
28. Munger, C. (2002) *Enzymatic mechanism of the fructose 1,6-bisphosphate aldolase from rabbit muscle: Role study of serines 271 and 300 from the active site*. Master's thesis, Université de Montréal, Qc, Canada
29. Ginsburg, A., and Mehler, A. H. (1966) *Biochemistry* **5**, 2623-2634
30. Morris, A. J., and Tolan, D. R. (1994) *Biochemistry* **33**, 12291-12297
31. Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. (2003) *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2**, 11-41
32. Cassidy, C. S., Lin, J., and Frey, P. A. (1997) *Biochemistry* **36**, 4576-4584
33. Iyengar, R., and Rose, I. A. (1981) *Biochemistry* **20**, 1223-1229
34. Richard, J. P. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 4926-4936
35. Rios, A., Amyes, T. L., and Richard, J. P. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9373-9385
36. Rios, A., Crugeiras, J., Amyes, T. L., and Richard, J. P. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7949-7950
37. Richard, J. P., and Amyes, T. L. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 626-633
38. Maurady, A., Zdanov, A., de Moissac, D., Beaudry, D., and Sygusch, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 9474-9483
39. Grazi, E., and Trombetta, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **364**, 120-127
40. Grazi, E., Sivieri-Pecorari, C., Gagliano, R., and Trombetta, G. (1973) *Biochemistry* **12**, 2583-2590

-
41. Periana, R. A., Motur-Degroot, R., Chiang, Y., and Hupe, D. J. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 3923-3927
 42. Drechsler, E. R., Boyer, P. D., and Kowalsky, A. G. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 2627-2634
 43. Rutter, W. J., Richards, O. C., and Woodfin, B. M. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 3193-3197
 44. Rose, I. A., and O'Connell, E. L. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 126-134
 45. Venkataraman, R., and Racker, E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 1883-1886
 46. Jia, J., Schorken, U., Lindqvist, Y., Sprenger, G. A., and Schneider, G. (1997) *Protein Sci.* **6**, 119-124
 47. Siebers, B., Brinkmann, H., Dörr, C., Tjaden, B., Lilie, H., van der Oost, J., and Verhees, C. H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28710-28718

TABLES

Table 3.1 Data collection and refinement statistics (article 2).

	WT-DHAP	WT-P _i	K146M-DHAP
Data collection			
Resolution (Å)	50-1.88 (1.98-1.88) ^a	50-2.22 (2.34-2.22) ^a	50-1.98 (2.07-1.98) ^a
Wavelength (Å)	0.9795	0.9795	1.100
Unique reflections/	111679 / 3.7	67988 / 3.6	96378 / 3.5
Redundancy	(14586 / 3.1)	(9692 / 3.4)	(9641 / 2.5)
Completeness (%)	98.5 (90.4)	99.6 (99.8)	96.5 (77.3)
Average $I/\sigma(I)$	15.2 (2.4)	7.9 (2.4)	21.4 (3.8)
R_{sym}^b	0.087 (0.466)	0.146 (0.607)	0.052 (0.258)
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Unit cell parameters			
a (Å), b (Å), c (Å), β (°)	82.8, 102.9, 84.2, 98.5	83.0, 102.7, 84.6, 98.2	83.9, 103.7, 84.9, 98.8
Refinement			
Number of atoms			
Protein	10767	10973	10820
Water	2860	2592	2230
Hetero	36	35	36
σ cutoff; $I/\sigma(I) >$	1	1	1
$R_{\text{cryst}} (\%)^c$	15.9	14.4	15.7
$R_{\text{free}} (\%)^d$	19.1	19.1	19.5
Root mean square deviation			
Bond length (Å)	0.005	0.006	0.005
Bond angle (°)	1.247	1.330	1.211
Average B-factor (Å ²)	28.8	28.6	25.1
Ramachandran analysis ^e (%)			
Most favourable	91.6	90.2	91.4
Allowed	8.4	9.8	8.6
Luzzati positional error (Å)	0.17	0.18	0.18

^a All values in parentheses are given for the highest resolution shell

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

^c $R_{\text{cryst}} = \sum_{hkl} |I_o(hkl) - I_c(hkl)| / \sum_{hkl} I_o(hkl)$.

^d $R_{\text{free}} = \sum_{hkl \in T} |I_o(hkl) - I_c(hkl)| / \sum_{hkl \in T} I_o(hkl)$, where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. Test data set was not used throughout refinement and contains 5%, 5% and 10% of the total unique reflections for WT-DHAP, WT-P_i, and K146M-DHAP, respectively.

^e Analyzed by PROCHECK (26).

Table 3.2 Stereospecific pro(*S*) proton exchange at C3 of DHAP.

The rate of proton exchange was measured by appearance of tritium isotope label as (*S*)-[3-³H₁] DHAP from tritiated water as described under "Materials and Methods".

Aldolase	¹ H/ ³ H exchange rate (min ⁻¹) ^a
Native	9.7×10 ² ± 1.3×10 ²
Native crystals ^b	5.14 ± 0.69
K146M	0.0733 ± 0.0086
Carboxypeptidase-treated aldolase	0.457 ± 0.061
Background ^c	0.0118 ± 0.0011

^a Error calculated using individual errors derived at each step of the measurement protocol.

^b Size of crystals used was comparable to crystals used for data collection

^c Exchange rate measured in absence of aldolase.

Table 3.3 Conformational changes induced by DHAP binding.

Conformational changes were identified on the basis of differences between identical atomic positions in liganded aldolases as compared with native enzyme. Comparisons were made between the same subunits and then averaged over all subunits in the aldolase tetramer. Values tabulated represent root mean square differences between equivalent C α atoms and are given in Å.

Residues selected	WT-DHAP	WT-FBP ^a
158-259	0.09	0.09
33-65 ^b	0.72	1.02
302-329 ^b	0.66	0.84
35 ^b	0.66	1.25
38 ^b	0.30	0.62
303 ^b	0.70	0.74

^a Protein Data Bank code 1ZAI (15).

^b Calculation of root mean square differences for these residues was based on superposition of liganded complexes onto native enzyme using C α atom coordinates of residues 158-259.

FIGURES

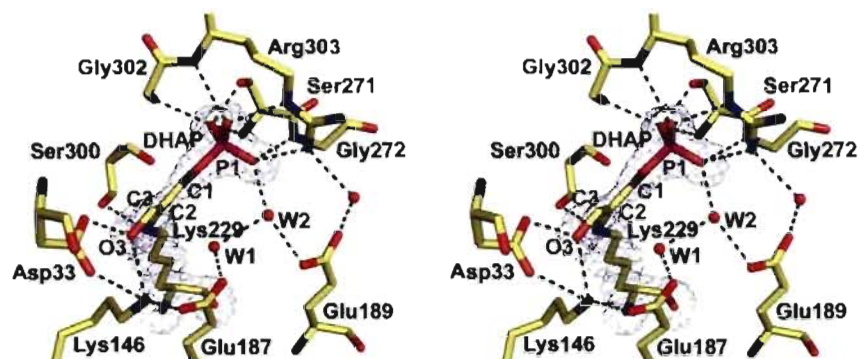


Figure 3.1 Electron density showing the enamine intermediate trapped in the active site of rabbit muscle aldolase.

DHAP P1 phosphate is extensively bound making interactions with Ser-271, Gly-272, Gly-302, and Arg-303. DHAP C3 hydroxyl interacts with Asp-33 and Lys-146 stabilizing it in geometry coplanar with DHAP carbon atoms. Difference electron density was calculated from a 1.88 Å simulated annealing F_o-F_c omit map encompassing Lys-229 and DHAP and contoured at 3.5σ . The same color scheme was used in all figures with *green dashes* to illustrate hydrogen bonding interactions and salt bridges, and *red spheres* to represent water molecules, unless stated otherwise.

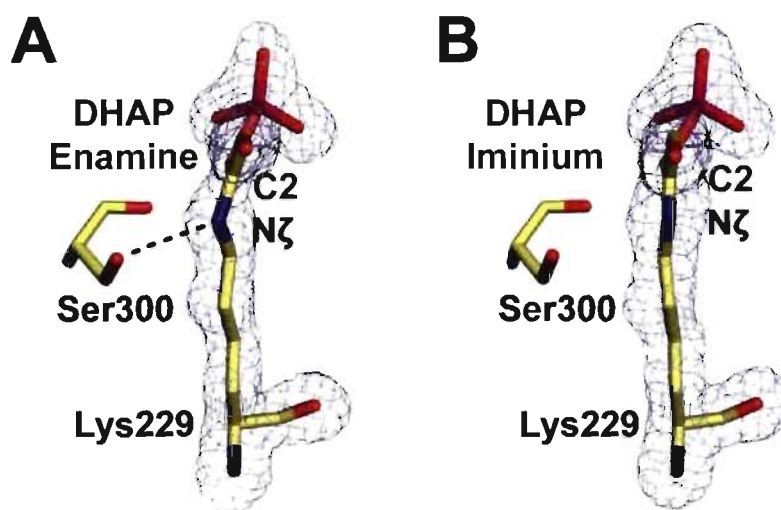


Figure 3.2 Discrimination of enzymatic intermediates formed with DHAP in aldolase active site.

Geometry of enzymatic intermediates was used to identify the chemical entity of the trapped DHAP-aldolase complexes. *A*, an enamine intermediate was identified in all subunits in the structure of native aldolase on the basis of sp^3 hybridization of Lys-229 N ζ and enables hydrogen bond formation between the Ser-300 hydroxyl and Lys-229 N ζ . Difference electron density shown was calculated as described in the legend to Fig. 3.1 and contoured at 4.0σ . *B*, an iminium intermediate was identified in all subunits in the structure of the K146M mutant aldolase complexed with DHAP. sp^2 hybridization of Lys-229 N ζ precludes hydrogen bond formation with Ser-300. Difference electron density was calculated from a 1.98 Å simulated annealing F_o-F_c omit map encompassing Lys-229 and DHAP and contoured at 4.0σ .

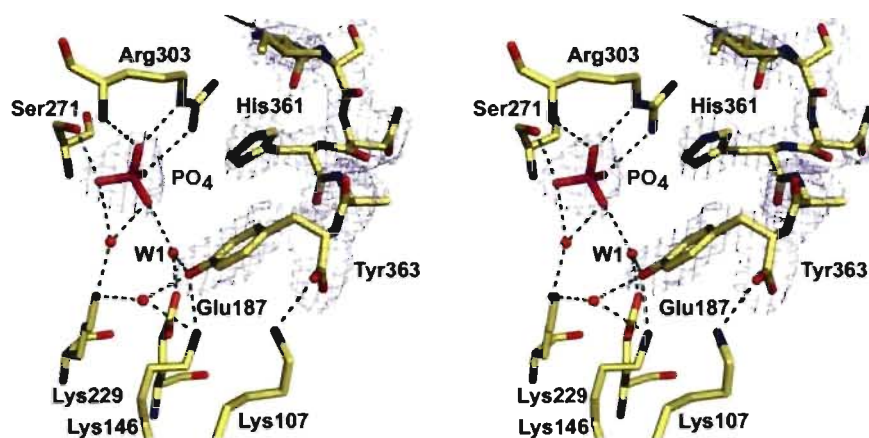


Figure 3.3 Active site attachment by the phosphate anion at the DHAP P1 binding locus recruits its proper C-terminal region.

C-terminal Tyr-363 interacts with Lys-107, Lys-146, and active site water molecules, whereas His-361 stacks with Arg-303 that binds the phosphate anion as shown in Fig. 3.1. Difference electron density was calculated from a 2.22 Å simulated annealing F_o-F_c omit map encompassing C-terminal residues 358-363 and phosphate anion and contoured at 3.5σ .

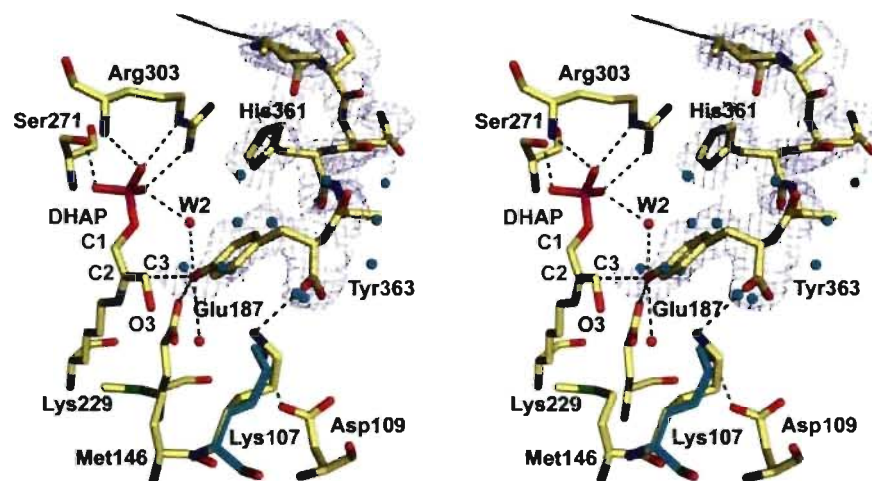


Figure 3.4 C terminus binding upon iminium formation in the active site of a subunit of the K146M mutant aldolase.

The bound C terminus is shown superposed onto an alternate conformation of water molecules (*cyan spheres*) and Lys-107 side chain (*cyan*). Occupancy of the C-terminal residues 360-363 was refined to 0.5 with water molecules accounting for the remaining electron density shown. Notably, the Tyr-363 hydroxyl is positioned at 2.9 Å from the DHAP C3 and in an orientation that would favor the stereospecific *pro(S)* α -proton abstraction of the iminium (*black dashes*). Tyr-363 carboxylate binds Lys-107 whose side chain conformation is identical to that observed in native structures. Difference electron density was calculated from a 1.98 Å simulated annealing F_o-F_c omit map encompassing C-terminal residues 358-363 and contoured at 2.5σ .

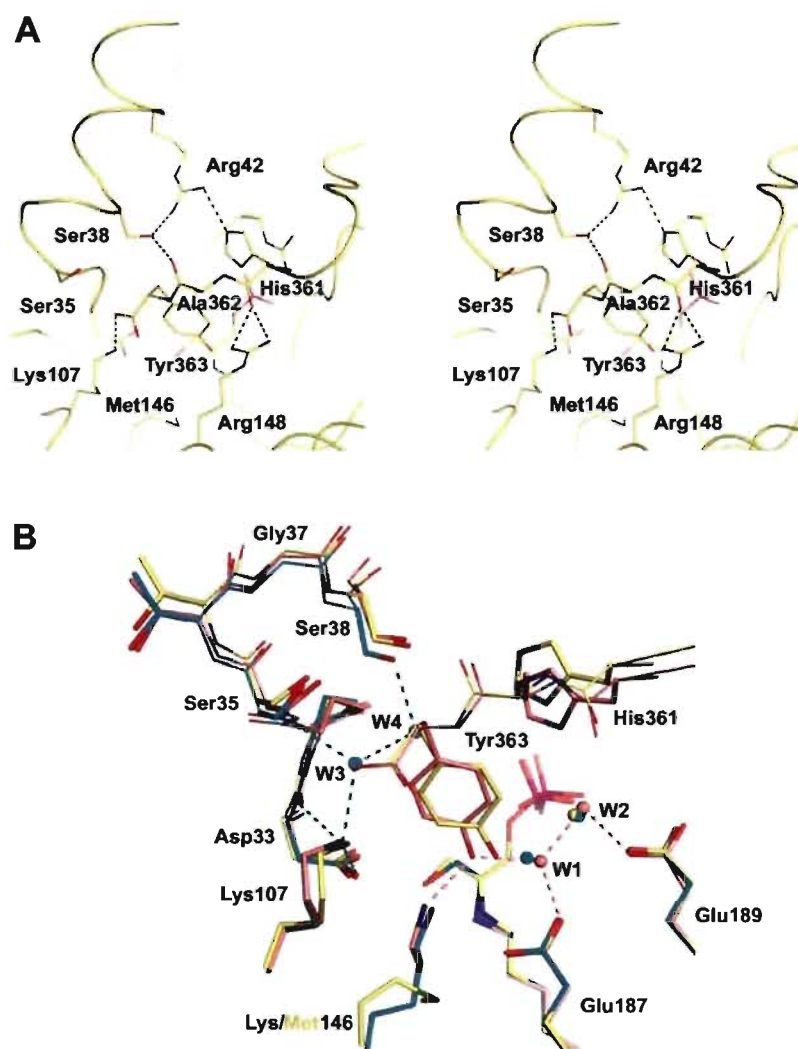


Figure 3.5 Interactions made by the C-terminal region in the active site of muscle aldolase. *A*, the C-terminal residues 361-363 interact with Ser-38, Arg-42, Lys-107, and Arg-148 in the active site of the K146M-DHAP structure. *B*, superposition of WT-DHAP (*cyan*), K146M-DHAP (*yellow*), and WT-P_i (*pink*) structures. In the WT-DHAP structure, Ser-38 interacts with Lys-107 via two bridging water molecules, W3 and W4. Active site entry by the C terminus in K146M-DHAP and WT-P_i structures displaces W3 and W4. Outwards movement of the flanking helix (residues 33-45) along its helical axis precludes a close contact that would result between Ser-38 side chain and Tyr-363 C β upon active site binding.

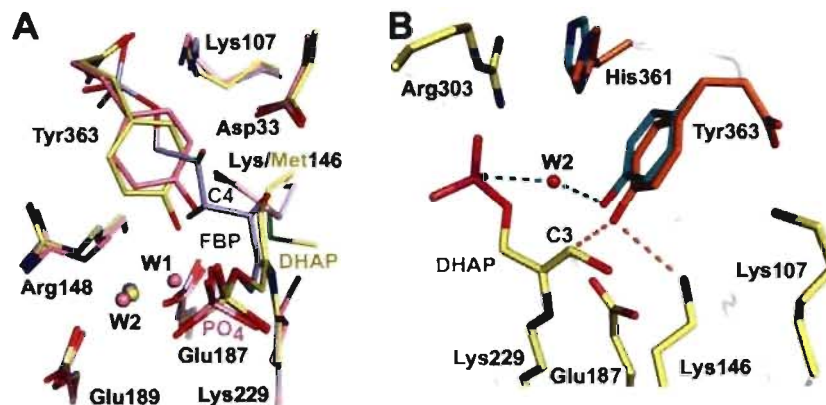


Figure 3.6 Proposed mechanism for stereospecific proton transfer with conservation of reaction chirality.

A, superposition of WT-FBP (PDB code 1ZAI) (*lightblue*), K146M-DHAP (*yellow*), and WT-P_i (*pink*) structures shows active site binding by the C-terminal Tyr-363 at the same locus as the nascent G3P moiety of the iminium formed with FBP in aldolase. The close contact by Tyr-363 hydroxyl with the FBP C4 atom indicates that stereospecific proton transfer occurs in the same direction as G3P addition to the enamine. B, C-terminal Tyr-363 hydroxyl is activated by a catalytic mechanism implicating a proton transfer relay mediated by the DHAP P1 dianion via water molecule W2 (*cyan*). Subsequent small oscillation of Tyr-363 side chain allows Lys-146 to electrostatically stabilize the developing negative charge on Tyr-363 (*orange*). In this configuration, Tyr-363 phenate is aligned to catalyze stereospecific transfer of the pro(*S*) α -proton at DHAP C3 carbon.

CHAPITRE 4

La structure cristallographique du complexe WASP-aldolase révèle qu'une poche hydrophobe dans le site actif de l'aldolase glycolytique est responsable de l'interaction avec la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich

Mise en contexte

L'aldolase glycolytique peut former des complexes avec divers partenaires cellulaires, appartenant à des voies métaboliques distinctes. Compte tenu de la concentration cellulaire importante de l'aldolase, ses interactions ne peuvent être négligées. Néanmoins, les détails moléculaires régissant la formation de ces complexes ne sont pas connus.

Dans le but de mieux comprendre les fondements structuraux des interactions, nous avons entrepris de résoudre la structure de l'aldolase de muscle de lapin en complexe avec un peptide provenant de l'un de ses partenaires connus, WASP. Nous avons été intrigués par le fait que cette interaction est dépendante de la présence d'un résidu Trp de WASP, compte tenu du caractère chargé du site actif de l'aldolase et de sa propension à lier habituellement des ligands phosphorylés. La structure obtenue par co-cristallisation de l'aldolase en complexe avec un peptide du C-terminus de WASP révèle les détails du mode d'interaction. Entre autres, l'importance connue d'un résidu Trp subterminal de WASP s'explique par le fait que sa chaîne latérale se loge dans une poche hydrophobe située en bordure du site actif de l'aldolase. Basés sur cette structure, nous avons également découvert un nouvel inhibiteur compétitif de l'aldolase (NASEP, Naphthol AS-E phosphate) et résolu la structure du complexe aldolase-NASEP. La structure montre que l'inhibiteur utilise la même poche hydrophobe que WASP.


Les résultats de cette étude ont été publiés dans un article intitulé « *A hydrophobic pocket in the active site of glycolytic aldolase mediates interactions with Wiskott-Aldrich syndrome protein* » dans *The Journal of Biological Chemistry* en 2007. Dans cette étude, les complexes aldolase-inhibiteur et aldolase-WASP ont été obtenus par trempage et co-cristallisation, respectivement, le premier par moi-même et le second par Dr Tina Izard. Dr Jurgen Sygusch et moi-même avons effectué chacun une collecte de données cristallographiques. J'ai résolu et affiné les deux structures, procédé à leur analyse et à leur déposition dans la PDB. Enfin, j'ai produit l'ensemble des figures et participé à la rédaction du manuscrit avec les Drs Jurgen Sygusch et Tina Izard.

Article 3.

A Hydrophobic Pocket in the Active Site of Glycolytic Aldolase Mediates Interactions with Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

Miguel St-Jean¹, Tina Izard², Jurgen Sygusch¹

From the Department of Biochemistry¹, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada, and the Department of Oncology², St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee 38105, USA.

Address correspondence to: Jurgen Sygusch, Biochimie/Médecine, Université de Montréal, CP 6128, Station Centre Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada; Tel. 514 343-2389; Fax: 514 343-6463; E-mail: 

J. Biol. Chem., 2007, **282** (19), 14309-14315

“Reprinted with permission from: Miguel St-Jean, Tina Izard and Jurgen Sygusch. “A hydrophobic pocket in the active site of glycolytic aldolase mediates interactions with Wiskott-Aldrich syndrome protein.” *J. Biol. Chem.*, 282 (19), 14309-14315 (2007). ©2007, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* Reprinted with permission from *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*”

ABSTRACT

Aldolase plays essential catalytic roles in glycolysis and gluconeogenesis. However, aldolase is a highly abundant protein that is remarkably promiscuous in its interactions with other cellular proteins. In particular, aldolase binds to highly acidic amino acid sequences, including the C terminus of the Wiskott-Aldrich syndrome protein, an actin nucleation-promoting factor. Here we report the crystal structure of tetrameric rabbit muscle aldolase in complex with a C-terminal peptide of Wiskott-Aldrich syndrome protein. Aldolase recognizes a short, four-residue DEWD motif (residues 498-501), which adopts a loose hairpin turn that folds around the central aromatic residue, enabling its tryptophan side chain to fit into a hydrophobic pocket in the active site of aldolase. The flanking acidic residues in this binding motif provide further interactions with conserved aldolase active site residues Arg-42 and Arg-303, aligning their side chains and forming the sides of the hydrophobic pocket. The binding of Wiskott-Aldrich syndrome protein to aldolase precludes intramolecular interactions of its C terminus with its active site and is competitive with substrate as well as with binding by actin and cortactin. Finally, based on this structure, a novel naphthol phosphate-based inhibitor of aldolase was identified, and its structure in complex with aldolase demonstrated mimicry of the Wiskott-Aldrich syndrome protein-aldolase interaction. The data support a model whereby aldolase exists in distinct forms that regulate glycolysis or actin dynamics.

INTRODUCTION

Aldolase directs glycolysis and gluconeogenesis by reversibly catalyzing the conversion of fructose-1,6-bisphosphate (FBP) into glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate (1). However, free pools of aldolase also cross-link actin filaments (2) and can bundle microtubules by binding to the α subunit of tubulin (3, 4). These findings, along with those indicating that other glycolytic enzymes also bind to components of the actin cytoskeleton and microtubule network, support the concept that the cytoskeleton and microtubule network forms scaffolds that allow for the efficient delivery of substrates and products in this essential pathway of intermediary metabolism.

Precisely how aldolase directs the bundling of microtubules and cross-linking of actin filaments is not resolved. Such diverse functions suggest that aldolase might have several binding partners, and, indeed, the enzyme interacts with several other proteins in the cell, including the glucose transporter GLUT4 (5), phospholipase D2 (6), light chain 8 of dynein (7), and the erythrocyte anion exchanger Band 3 protein (8). Furthermore, parasite aldolase also interacts with invasin proteins of pathogens such as *Toxoplasma gondii*, where it directs the entry and motility of this parasite by binding to the cytoplasmic tail of the micronemal protein 2 (MIC2), and this is critical for the association of MIC2 with actin filaments (9). Moreover, the MIC2 homolog thrombo-spondin-related anonymous protein (TRAP) in *Plasmodium falciparum* also binds to aldolase (10). Thus, aldolase can function as a bridge that connects its partners to the actin cytoskeleton and can take part in the regulation of their activity.

The binding motif of TRAP for aldolase is comprised of a short stretch (~8) of acidic residues and a subterminal tryptophan residue. This motif is present in several cytoskeletal proteins, in particular in the N terminus of cortactin, which directs activation of the Arp2/3 complex (11), and in the C termini of several members of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family, including WASP, N-WASP, and the three WASP family verprolin homologous proteins, WAVE-1, WAVE-2, and WAVE-3. WASP family proteins are critical regulators of actin dynamics that bind to actin monomers and that activate the Arp2/3 complex to promote and direct actin nucleation (12). The C terminus of all WASP proteins comprises three domains, the verprolin homology (WASP homology 2/WH2 domain), central, and acidic domains, which together are all necessary and sufficient to activate actin polymerization by the Arp2/3 complex (13, 14). The central domain binds to the Arp2/3 complex and induces conformational changes necessary for actin polymerization (15), but this domain also plays a role in the autoinhibition of WASP proteins (16), whereas the verprolin homology domain binds to actin monomers (17). The acidic domain of WASP family proteins is also required for binding to Arp2/3 (18), and it directs interactions of WASP proteins with aldolase (19), suggesting that this interaction directs the actin cross-linking functions of aldolase.

The binding of aldolase with WASP proteins is competitively inhibited by its substrates and products, suggesting that the acidic domain of WASP interacts with the

active site of aldolase. Here we report the crystal structure of rabbit muscle aldolase in complex with the 15 C-terminal residues of WASP. This structure reveals that the WASP interaction indeed disrupts the binding of substrates to the active site of aldolase and that WASP competes with aldolase C terminus by interacting with the periphery of the active site. Finally, using the WASP-aldolase structure as a guide, we identified and solved the structure of aldolase in complex with a novel competitive inhibitor of the enzyme. The results support a model where the regulation of actin dynamics is linked to the intermediary metabolism by aldolase.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Peptides and Inhibitors - WASP peptide (EDQAGDEDEDDEWDD) was synthesized by the Hartwell Center (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN). Naphthol AS-E phosphate (NASEP), $C_{17}H_{13}NO_5ClP$, was purchased from Research Organic Inc.

Purification and Crystallization - Recombinant rabbit muscle aldolase was expressed and purified as described previously (20, 21). Aldolase concentration was determined using an extinction coefficient of $0.91 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ at 280 nm (22). Enzymatic activity was monitored by spectrophotometry (23), and native aldolase was crystallized as described previously (24). The WASP-aldolase complex was co-crystallized by vapor diffusion from a 1:1 mixture of protein-peptide solution (0.084 mM aldolase tetramer and 1.5 mM WASP peptide in 20 mM Tris-HCl, pH 7.0) and precipitant solution (24% polyethylene glycol 550 monomethyl ether, 50 mM $MgCl_2$, 0.1 M HEPES pH 7.5). This mixture was then equilibrated against a reservoir of precipitant solution.

Data Collection and Processing - A native aldolase crystal was soaked in a NASEP solution (mother liquor plus 3 mM NASEP) for 8 min. The crystal was cryoprotected by transfer through a cryobuffer solution (NASEP solution plus 20% glycerol) and flash-frozen in a stream of gaseous N_2 . Diffraction data was collected at beamline X8-C of the National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, New York).

A crystal of the WASP-aldolase complex was cryoprotected by transfer through a cryobuffer solution (mother liquor plus 11% polyethylene glycol 550 monomethyl ether) and flash-frozen in a stream of gaseous N_2 . Diffraction data were collected at beamline 22-BM at the Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, Argonne, IL). Data sets were processed with HKL2000 (25), and the results are summarized in Table 4.1.

Structure Determination and Refinement - The crystal soaked with NASEP inhibitor was isomorphous to the native aldolase (Protein Data Bank (PDB) PDB code 1ZAH) (24) with monoclinic space group $P2_1$. The WASP-aldolase complex crystal was also a $P2_1$ space group, and its structure was solved by molecular replacement using the structure of a native aldolase homotetramer (PDB code 1ZAH) as a starting model. Each asymmetric unit contains one aldolase homotetramer, which is the active form of the enzyme. All observed reflections having an $I/\sigma(I)$ value of > 1 were used in the refinement process. However, statistics and electron density maps were calculated to 2.05 Å, a resolution limit corresponding to the completeness of better than 70% in the highest resolution shell (Table 4.1). The structures were subjected to iterative rounds of refinement with the Crystallography and NMR System (26) and model building using O (27). A portion of the aldolase C-terminal sequence between residues 346-357 rich in alanine and glycine amino acids was associated with weak electron density in both WASP-aldolase and NASEP-aldolase and was omitted from the refined model. Residues 358-363 were clearly discernable in a simulated annealing electron density omit map.

Ligand modeling was based on interpretation of electron density shapes of an F_o-F_c simulated annealing omit map and using PRODRG for topology and parameter generation (28). Binding by WASP peptide residues (498-501) and NASEP were readily discernable and were associated with clearly defined electron densities in the active site. Difference electron density (F_o-F_c) annealed omit maps calculated in the final round of refinement confirmed identical binding of ligands in all four subunits. Model statistics were evaluated with Crystallography and NMR System and PROCHECK (29) (Table 4.1). The refined structures of the WASP-aldolase and the NASEP-aldolase complexes have, respectively, R_{crist} (R_{free}) of 0.152 (0.200) and 0.149 (0.197), with corresponding Luzzati atomic coordinate errors evaluated at 0.18 and 0.17 Å. Ramachandran analysis of structures with

PROCHECK placed 91.8% (WASP-aldolase) and 92.5% (NASEP-aldolase) of nonglycine and nonproline residues in the most favourable region and the remainder in the allowed region, attesting to good model geometry in the structures.

The coordinates and structure factors of the WASP-aldolase complex and NASEP-soaked aldolase have been deposited in the Protein Data Bank under PDB codes 2OT0 and 2OT1, respectively. All figures in the present paper were prepared using the program PyMOL (30).

Structure Comparisons - Structure superposition was performed using PyMOL. To evaluate the overlap of binding loci between the aldolase substrate FBP and WASP and the conformational changes upon WASP peptide binding, the WASP-aldolase complex was superposed on the structure of aldolase covalently bound to FBP as a Schiff base intermediate (PDB code 1ZAI) (24) using C α atoms of residues 101-200. Residues common to both structures were selected on the basis of lowest root mean square deviation upon superposition and comparable with the error in atomic coordinates of the model.

WASP Homologue Modeling - The C terminus region of *T. gondii* MIC2 (residues 765-768) and that of *P. falciparum* TRAP (residues 556-559), both homologous to the WASP peptide, were threaded into the WASP peptide structure using PyMOL. Side chain conformations were selected from the PyMOL rotamer library that resulted in no steric clashes with aldolase active site residues.

RESULTS

The Structure of the WASP-Aldolase Complex - The interaction between the WASP C-terminal domain and glycolytic aldolase requires the penultimate tryptophan residue in the C terminus of WASP (19). This interaction is displaced by aldolase substrates, suggesting the aldolase active site also binds to WASP. However, precisely how aldolase interacts with WASP is unknown. To define this interaction, rabbit muscle aldolase was co-crystallized with a 15-mer WASP C-terminal peptide corresponding to the amino acid sequence

EDQAGDEDEDDEWDD (residues 488-502).

The structure of the WASP peptide in complex with aldolase was solved to 2.05 Å resolution by molecular replacement using a native aldolase tetramer (PDB code 1ZAH) as the search model. Crystallographic refinement yielded a model with R_{cryst} and R_{free} values of 15.2% and 20.0%, respectively (Table 4.1). A difference ($F_o - F_c$) simulated annealing omit map was used to build the WASP peptide in the active sites of tetrameric aldolase (Fig. 4.1). Only WASP residues 498-501 could be traced from the electron density and were included in the model. Residues 488-497 and 502 appeared disordered and were not fitted into electron density. The modeled WASP peptide adopted the same conformation in all aldolase subunits and the N- to C-terminal orientation of the peptide was unambiguously assigned on the basis of the trace of residues 499-501 in the electron density map. The relatively high average B-factor of the WASP peptides ($60 \pm 7 \text{ \AA}^2$) in comparison with the overall B-factor for the protein ($23 \pm 10 \text{ \AA}^2$) suggests a loose binding of WASP for the aldolase active site. To verify this weak binding, a crystal of the WASP-aldolase complex was soaked in the presence of a fresh 10 mM WASP peptide solution for 2 min, and the electron density map calculated from data collected on this crystal revealed no new additional features (data not shown). These data are consistent with a low ordered binding to aldolase by the WASP 15-mer peptide under these crystallization conditions.

The binding site used by the WASP peptide delineates a novel hydrophobic pocket within the aldolase active site. This pocket is generated by the side chains of Arg-42 and Arg-303, which loosely sandwich ($3.6 \pm 0.1 - 3.8 \pm 0.1 \text{ \AA}$) the planar tryptophan side chain between them, and also by the Gln-306 side chain that contributes ($3.8 \pm 0.1 \text{ \AA}$) to the hydrophobic environment that surrounds the tryptophan side chain (Fig. 4.1, *magenta dashes*). Moreover, the nitrogen atom of the tryptophan indole ring hydrogen bonds to the carboxylate group of the Glu-34 side chain. These two binding features, characteristic of a tryptophan side chain, account for the requirement of a tryptophan residue in the C-terminal domain of WASP (19). The WASP peptide contains a large number of acidic residues that are complementary to the essential basic character of the aldolase active site, which has a preponderance of lysine and arginine residues. Indeed, the carboxylate of the WASP Glu-499 side chain makes a salt bridge with aldolase Lys-146 N ζ , WASP Asp-498 makes electrostatic interactions with aldolase Lys-41 N ζ and Arg-42 NH $_1$, and its carbonyl

backbone makes a weak contact with the Arg-148 side chain. Arg-303 further stabilizes the peptide by interacting with WASP Trp-500 backbone carbonyl. However, the binding geometry (donor-acceptor angle) for these interactions is not optimal (31), as they do not fully respect atom hybridization state, consistent with the low affinity of the peptide to aldolase active site. Hydrogen bonding involving other peptide moieties was not observed.

The NASEP-Aldolase Complex - To further probe the WASP binding site on aldolase, a native aldolase crystal was soaked with an inhibitor that mimics the tryptophan residue of WASP and which contains a negatively charged group. A family of naphthol phosphate-based inhibitors, differing in the substituents of the phenyl moiety (from Research Organic, Inc.), were tested on basis of competitive inhibition of aldolase. The best inhibitor ($K_i \approx 0.1$ mM), NASEP, containing a chlorine atom, was selected.

The aldolase crystal soaked in a NASEP solution was isomorphous with the native crystal form, and its structure was solved to 2.05 Å resolution by molecular replacement using a native aldolase tetramer (PDB code 1ZAH) as the search model. The crystallographic refinement resulted in a model with R_{cryst} and R_{free} values of 14.9 and 19.7%, respectively (Table 4.1). The difference ($F_o - F_c$) simulated annealing omit map confirmed the presence of the inhibitor in the active sites of aldolase (Fig. 4.2). The binding mode was identical in all aldolase subunits.

The NASEP inhibitor utilizes the same hydrophobic pocket as the WASP peptide, again generated by the Arg-303 and Arg-42 side chains. Moreover, the NASEP phosphate group is stabilized by salt bridging one of the two alternate conformations displayed by Arg-303. The NASEP phosphate group also hydrogen bonds to the Gly-272 backbone carbonyl through a water molecule (not shown).

A Novel Binding Site in the Active Site of Aldolase - The most salient feature in the binding of both WASP peptide and NASEP inhibitor is their use of the same hydrophobic pocket (Fig. 4.3). To assess the minimum binding requirements, a native aldolase crystal was also soaked in a mother liquor solution containing 6 mM L-tryptophan for 7 min. However, electron density maps calculated from data collected to 2.0 Å resolution failed to reveal any distinguishing features (data not shown), underscoring the contribution of acidic residues of

the ligand in binding. Thus, although a planar aromatic moiety is necessary for binding, it is not sufficient to ensure binding.

WASP Peptide Competes with the Substrate and the C Terminus of Aldolase - The effect of WASP peptide on substrate binding was evaluated by superposing WASP-aldolase complex structure on the structure of aldolase covalently bound to its substrate FBP (PDB code 1ZAI) (Fig. 4.4). Active site adaptation is slight and requires only the reorganization of Arg-303 and Arg-42 side chains to create the hydrophobic pocket to accommodate the tryptophan side chain. The Arg-303 side chain stabilizes attachment by the FBP P1 phosphate and adopts a conformation that results in steric clashes with the WASP Trp-500 side chain and the WASP backbone. The Arg-42 side chain in the FBP-aldolase structure also collides with WASP Trp-500. Moreover, the WASP Glu-499 side chain clashes with FBP C4, C5, and C6 atoms. The binding of aldolase by WASP peptide and by FBP as well as by aldolase triose phosphate products are thus physically incompatible within the aldolase active site.

Furthermore, Fig. 4.4 shows that the WASP peptide clashes with the C terminus of aldolase, which can interact with the active site periphery vicinal to Arg-303. This conformation of the aldolase C terminus is also observed in the native enzyme (PDB code 1ZAH) (not shown). The C-terminal region mediates proton exchange at the level of the enamine intermediate in the aldolase catalytic mechanism (32), and the aldolase C-terminal residue Tyr-363 is essential for this proton transfer (33). The docking of the WASP peptide and the C-terminal region of aldolase to the active site appears mutually exclusive, as indicated by the conformation of the aldolase C termini in the crystal structure of the WASP-aldolase complex, which do not interact with the active site binding motif.

Modeling WASP C-terminal Homologues - To evaluate whether the interaction of WASP peptide with the active site of aldolase shared features with other peptides known to bind Schiff base-forming aldolases, the cytoplasmic C-terminal tail of the MIC2 protein from *T. gondii* (9) and that of the TRAP protein from *P. falciparum* (10) were modeled with PyMOL in the binding pocket using WASP coordinates as the template. Modeling consisted of threading the homologous MIC2 and TRAP C-terminal sequences onto the

WASP peptide. Side chain rotamers could be selected from the PyMOL library that resulted in no structural clashes (Fig. 4.5). This strongly suggests a common binding site on aldolase for these different interacting partners, with each possessing a conserved tryptophan residue in their C-terminal domain and proximal acidic residues.

DISCUSSION

Aldolase exhibits functional duality as a glycolytic enzyme that also interacts with diverse cellular and pathogenic partners. Here we defined the structure of the WASP-aldolase complex, which identified a novel binding site on the aldolase surface. Further, this structure supports the concept that interactions of aldolase with the acidic domain of WASP may well regulate its functions in binding to and activating the Arp2/3 complex (34). Finally, this structure establishes a paradigm for the interactions of acidic peptides folded about a conserved tryptophan residue in a loose β -like turn, which here direct the interaction of WASP with the active site of aldolase.

Hydrophobic Interactions Mediate WASP Binding to Aldolase - Our structure demonstrates that binding of aldolase by the WASP peptide requires a conserved tryptophan residue, Trp-500. In turn, this residue loosely docks into a hydrophobic pocket on the aldolase surface that is formed by the aliphatic carbons of the side chains of basic residues in the active site of aldolase as well as by interactions with other conserved residues (Fig. 4.1). Although potentially electrostatic in nature, these interactions do not exhibit optimal binding geometry, and their number and strengths suggest a rather low affinity of WASP for aldolase. These rather modest hydrophobic interactions also explain the low affinity binding for the homologous TRAP 13-mer peptide with aldolase (10), whose modeled structure superimposes with that of WASP and aldolase (Fig. 4.5).

WASP Binding Competes with Active Site Ligands - The structure of the WASP-aldolase complex also demonstrates that binding of this enzyme substrate and products is mutually exclusive with WASP. Structural clashes also occur between WASP and the C-terminal region of aldolase (Fig. 4.4), which interacts in an intramolecular fashion with the active

site of the enzyme. However, interference by the C-terminal regions at the periphery of the active site does not take place in the WASP-aldolase complex structure, where the C-terminal regions for each subunit are distant from the active site and make crystal contacts with adjacent tetramers. Therefore, aldolase appears to exist in at least three, mutually exclusive distinct states, native *versus* substrate/product- or WASP-bound. In the cell, the intramolecular nature of the C terminus interaction with its active site would increase its effective concentration (35) and would thus be predicted to inhibit the binding of weak interacting competitors. WASP binding to aldolase would thus be predicted to require a combination of low substrate concentrations, molecular crowding, and possibly sequestration of the aldolase C-terminal region, distal to the active site binding motif. Nonetheless, given the abundance of aldolase one would predict that such scenarios are frequent in the cell and facilitate aldolase-WASP interactions.

Specific Inhibition of the Aldolase-WASP Interaction - Guided by its similarity to the tryptophan residue of WASP and its ability to competitively inhibit aldolase, we identified a naphthol phosphate-based inhibitor coined NASEP. Our structure of the NASEP-aldolase complex underscored the specificity and the novel features of this binding locus with respect to the active site. Indeed, here the aromatic moiety of the inhibitor competes for the same hydrophobic pocket as the WASP peptide and utilizes the same mode of binding (Fig. 4.3). Tryptophan, however, does not bind at similar concentrations, indicating that interaction by the NASEP phosphate group with conserved Arg-303 is required for attachment (Fig. 4.2). Thus, this inhibitor has the potential to interfere with any WASP-type interactions made by aldolase and would thus be predicted to disable proper regulation of actin dynamics, a notion which clearly needs to be put to the test.

Binding Modes of the Aldolase Partners - Other cellular partners known to bind to aldolase share a common acidic motif with a central tryptophan, including cortactin (DDWET) (19), Bloom syndrome protein (DDDWED) (19), and sorting nexin 9 (DDWDEDWDG) (36), suggesting they all bind to aldolase in a fashion similar to that described here for WASP. Further, our modeling of the interactions of WASP homologues TRAP and MIC2 with aldolase predicts a similar structure and mode of binding. Similar to its interactions with

WASP, the binding of aldolase to F- and G-actin also requires Arg-42 and Arg-148 (37, 38, 39, 40). However, in contrast to WASP binding, actin binding to aldolase is not disrupted but merely weakened (~10-fold) by FBP (41). Nevertheless, the fact that binding by aldolase reactants diminishes both actin and WASP binding to aldolase (19, 40) indicates overlapping features in their binding to aldolase.

Role of the Aldolase-WASP Interaction in Actin Dynamics - Aldolase accounts for up to 7% of soluble protein within the cell (42) and its broad cytoplasmic distribution (5) may promote the recruitment of WASP and its many other cytoskeletal partners. Indeed, aldolase localizes to active ruffles in the leading edge of motile cells (43) along with N-WASP (44, 45). Molecular crowding of aldolase in such a scenario would inhibit actin dynamics by favouring sequestration of actin monomers, cortactin, and WASP by aldolase. This is consistent with viscometric findings, where equimolar concentrations of aldolase inhibits actin polymerisation (41) and reverses actin gelling (40). However, FBP blocks these effects, indicating that FBP destabilizes aldolase complexes with actin or WASP homologues (9, 10). Thus, the release of aldolase by substrate suggests that, in the cell, activation of glycolysis would simultaneously liberate WASP to activate Arp2/3 and increase the pool of free actin monomers, facilitating actin nucleation.

The interactions of aldolase with WASP and its homologues are likely to occur at the onset of actin polymerisation (19, 46), when glucose levels are low and glycolysis is not fully active. WASP-aldolase interactions would then transiently inhibit cortical F-actin polymerization by preventing the association of WASP with the Arp2/3 complex, which also requires the WASP acidic domain. In turn, as FBP levels rise and become sufficient to sustain ATP production, FBP binding would then displace WASP, leaving it free to nucleate actin polymerization. Such a model is concordant with the dependence of actin polymerization on ATP supplied by glycolysis (47), as uncoupling glycolysis from ATP generation results in actin polymerization and the accumulation of dispersed F-actin aggregates (48, 49, 50, 51). In this regard it is also noteworthy that FBP is a protective agent in experimental ischemia, where it appears to exert its action by inhibiting F-actin filament aggregation (52). Fluctuating levels of FBP thus may act as a switch that controls,

in both space and time, the role of aldolase as a regulator of both intermediary cell metabolism and actin dynamics.

FOOTNOTES

This research was supported by funding from the Natural Science and Engineering Research Council (Canada) and the Canadian Institutes for Health Research (to J. S.), and by a grant (GM071596) from the National Institutes of Health (to T. I.), a Cancer Center support grant, and by the American Lebanese Syrian Associated Charities. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

M. St-J. was recipient of a Ph.D. scholarship from Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

ACKNOWLEDGMENTS

Work was carried out, in part, at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, which is supported by the United States Department of Energy, Division of Materials Sciences and Division of Chemical Sciences under contract number DE-AC02-98CH10886. Assistance by X8-C beamline personnel, Dr. L. Flaks, was appreciated. Use of the Advanced Photon Source was supported by the United States Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences under Contract No. W-31-109-ENG-38. We thank the staff at the Advanced Photon Source (22-BM) for synchrotron support. We also acknowledge computational resources made available through the Automated Structure Determination Platform web site (asdp.bnl.gov).

ABBREVIATIONS

FBP, fructose-1,6-bis(phosphate); MIC2, micronemal protein 2; TRAP, thrombospondin-related anonymous protein; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein; NASEP, naphthol AS-E phosphate.

DATA DEPOSITION

The atomic coordinates and structure factors (codes 2OT0 and 2OT1) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

REFERENCES

1. Meyerhof, O., Lohmann, K. and Sehuster, P. H. (1936) *Biochem. Z.* **236**, 301-319
2. Clarke, F. M. and Morton, D. J. (1976) *Biochem. J.* **159**, 797-798
3. Volker, K. W., Reinitz, C. A. and Knull, H. R. (1995) *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **112**, 503-514
4. Volker, K. W. and Knull, H. R. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **338**, 237-243
5. Kao, A. W., Noda, Y., Johnson, J. H., Pessin, J. E. and Saltiel, A. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17742-17747
6. Kim, J. H., Lee, S., Kim, J. H., Lee, T. G., Hirata, M., Suh, P. G. and Ryu, S. H. (2002) *Biochemistry* **41**, 3414-3421
7. Navarro-Lerida, I., Martinez Moreno, M., Roncal, F., Gavilanes, F., Albar, J. P. and Rodriguez-Crespo, I. (2004) *Proteomics* **4**, 339-346
8. Strapazon, E. and Steck, T. L. (1976) *Biochemistry* **15**, 1421-1424
9. Jewett, T. J. and Sibley, L. D. (2003) *Mol. Cell* **11**, 885-894
10. Buscaglia, C. A., Coppens, I., Hol, W. G. and Nussenzweig, V. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 4947-4957
11. Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y. x., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C. and Zhan, X. (2001) *Nat. Cell. Biol.* **3**, 259-266
12. Yarar, D., To, W., Abo, A. and Welch, M. D. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 555-558
13. Yamaguchi, H., Miki, H., Suetsugu, S., Ma, L., Kirschner, M. W. and Takanewa, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12631-12636
14. Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D. and Higgs, H. N. (2001) *Nat. Cell. Biol.* **3**, 76-82
15. Panchal, S. C., Kaiser, D. A., Torres, E., Pollard, T. D. and Rosen, M. K. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10**, 591-598
16. Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A. and Rosen, M. K. (2000) *Nature* **404**, 151-158
17. Miki, H. and Takanewa, T. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 73-78

18. Machesky, L. M. and Insall, R. H. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1347-1356
19. Buscaglia, C. A., Penesetti, D., Tao, M. and Nussenzweig, V. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 1324-1331
20. Morris, A. J. and Tolan, D. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1095-1100
21. Penhoet, E., Kochman, M., Valentine, R. and Rutter, W. J. (1967) *Biochemistry* **6**, 2040-2049
22. Baranowski, T. and Niederland, T. R. (1949) *J. Biol. Chem.* **180**, 543-551
23. Racker, E. (1947) *J. Biol. Chem.* **167**, 843-854
24. St-Jean, M., Lafrance-Vanasse, J., Liotard, B. and Sygusch, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 27262-27270
25. Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326
26. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921
27. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr. Sect. A* **47**, 110-119
28. Schuttelkopf, A. W. and van Aalten, D. M. (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1355-1363
29. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291
30. DeLano, W. L. (2004) *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA
31. Pimentel, G. C. and McClelland, A. L. (1960) *The Hydrogen Bond*. W. H. Freeman and Company, San Francisco
32. Berthiaume, L., Loisel, T. P. and Sygusch, J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17099-17105
33. Rose, I. A., O'Connell, E. L. and Mehler, A. H. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1758-1765
34. Higgs, H. N. and Pollard, T. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32531-32534
35. Page, M. I. and Jencks, W. P. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1678-1683
36. Lundmark, R. and Carlsson, S. R. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42694-42702
37. Arnold, H. and Pette, D. (1968) *Eur. J. Biochem.* **6**, 163-171
38. Arnold, H., Henning, R. and Pette, D. (1971) *Eur. J. Biochem.* **22**, 121-126
39. O'Reilly, G. and Clarke, F. (1993) *FEBS Lett.* **321**, 69-72
40. Wang, J., Morris, A. J., Tolan, D. R. and Pagliaro, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6861-6865

-
41. Schindler, R., Weichselsdorfer, E., Wagner, O. and Bereiter-Hahn, J. (2001) *Biochem. Cell. Biol.* **79**, 719-728
 42. Maughan, D. W., Henkin, J. A. and Vigoreaux, J. O. (2005) *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1541-1549
 43. Wang, J., Tolan, D. R. and Pagliaro, L. (1997) *Exp. Cell. Res.* **237**, 445-451
 44. Miki, H., Miura, K. and Takenawa, T. (1996) *EMBO J.* **15**, 5326-5335
 45. Sukumvanich, P., Desmarais, V., Sarmiento, C. V., Wang, Y., Ichetovkin, I., Mouneimne, G., Almos, S. and Condeelis, J. (2004) *Cell. Motil. Cytoskeleton* **59**, 141-152
 46. Lizunov, V. A., Matsumoto, H., Zimmerberg, J., Cushman, S. W. and Frolov, V. A. (2005) *J. Cell. Biol.* **169**, 481-489
 47. Bershadsky, A. D. and Gelfand, V. I. (1983) *Cell Biol. Int. Rep.* **7**, 173-187
 48. Jahraus, A., Egeberg, M., Hinner, B., Habermann, A., Sackman, E., Pralle, A., Faulstich, H., Rybin, V., Defacque, H. and Griffiths, G. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 155-170
 49. Atkinson, S. J., Hosford, M. A. and Molitoris, B. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 5194-5199
 50. Kellerman, P. S., Clark, R. A., Hoilien, C. A., Linas, S. L. and Molitoris, B. A. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, F279-F285
 51. Kuhne, W., Besselmann, M., Noll, T., Mühs, A., Watanabe, H. and Piper, H. M. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, H1599-H1608
 52. Antunes, N., Martinusso, C. A., Takiya, C. M., da Silva, A. J., de Ornellas, J. F., Elias, P. R., Leite, M. Jr. and Cardoso, L. R. (2006) *Kidney Int.* **69**, 68-72

TABLES

Table 4.1 Data collection and refinement statistics (article 3).

	WASP-aldolase complex	NASEP soaking
Data collection		
Beamline	22-BM (Advanced Photon Source, ANL)	X8-C (National Synchrotron Light Source, BNL)
Resolution (Å)	50-2.05 (2.16-2.05) ^a	50-2.05 (2.14-2.05) ^a
Wavelength (Å)	1.0000	1.1000
Reflections Observed/Unique	1637838 / 91889	1324057 / 85601
Completeness (%)	99.8 (99.9)	95.3 (72.1)
Average $I/\sigma(I)$	13.1 (2.2)	26.3 (7.1)
R_{sym}^b	0.105 (0.459)	0.054 (0.162)
Space group	P2 ₁	P2 ₁
Unit cell parameters		
a (Å), b (Å), c (Å), β (°)	84.1, 56.7, 156.2, 97.8	84.8, 103.4, 83.6, 98.7
Refinement		
Number of atoms		
Protein	10933	10764
Water	1801	1863
Hetero	0	100
σ cutoff; $I / \sigma(I) >$	1	1
$R_{\text{cryst}} (\%)^c$	15.2	14.9
$R_{\text{free}} (\%)^d$	20.0	19.7
Root mean square deviation		
Bond length (Å)	0.005	0.005
Bond angle (degrees)	1.23	1.21
Average B-factor (Å ²)	26.1	25.4
Ramachandran analysis ^e (%)		
Most favourable	91.8	92.5
Allowed	8.2	7.5
Luzzati plot (Å)	0.18	0.17

^a All values in parentheses are given for the highest resolution shell

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

^c $R_{\text{cryst}} = \sum_{\text{hkl}} ||I_o(\text{hkl})| - I_c(\text{hkl})| / \sum_{\text{hkl}} I_o(\text{hkl})|$.

^d $R_{\text{free}} = \sum_{\text{hkl} \in T} |I_o(\text{hkl}) - I_c(\text{hkl})| / \sum_{\text{hkl} \in T} I_o(\text{hkl})|$, where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. Test data set was not used throughout refinement and contained 9% of the total unique reflections.

^e Analyzed by PROCHECK (29)

FIGURES

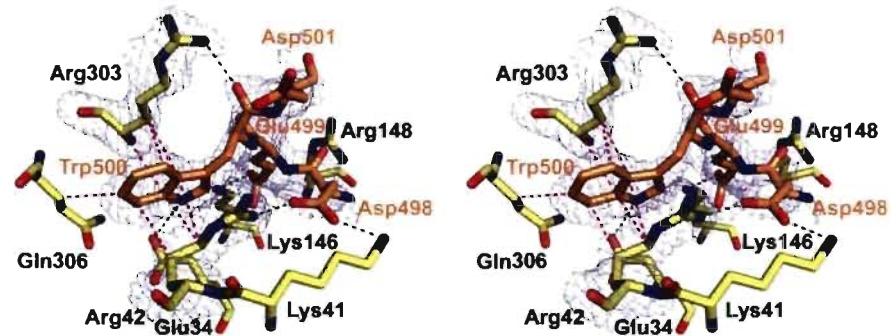


Figure 4.1 WASP peptide bound to the rabbit muscle aldolase active site.

The difference electron density shown was calculated from a 2.05 Å simulated annealing F_o-F_c omit map contoured at 3.0σ level and encompasses Arg-42, Arg-303, and WASP. WASP peptide is depicted in *orange*. Only WASP residues 498-501 were visible in the electron density map and included in the model. The *green* and *magenta dashes* illustrate hydrogen bonds and hydrophobic contacts, respectively.

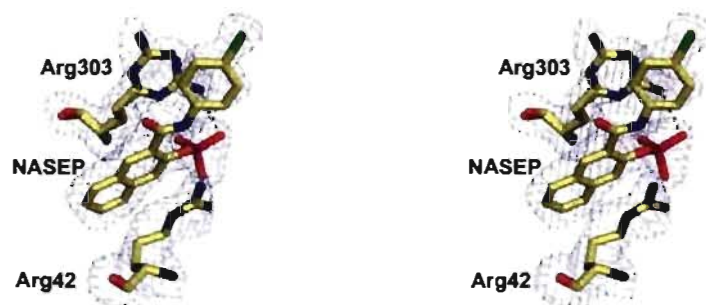


Figure 4.2 Naphthol AS-E phosphate inhibitor bound to the active site of aldolase.

Difference electron density was calculated from a 2.05 Å simulated annealing F_o-F_c omit map contoured at 3.0σ level and encompassing Arg-42, Arg-303 (alternate conformations), and the inhibitor. The *green dashes* illustrate hydrogen bonds.

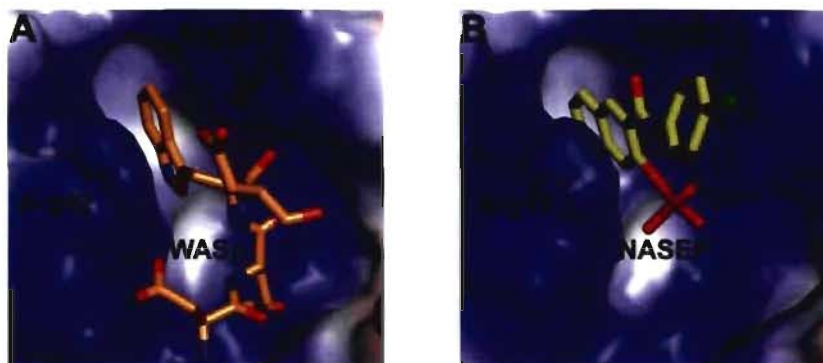


Figure 4.3 WASP and the naphthol AS-E phosphate aldolase inhibitor utilize a unique hydrophobic binding site.

Comparison of both structures shows that the two ligands compete in muscle aldolase for the same binding pocket made up by the conserved residues, Arg-42 and Arg-303. The overlapping binding loci are occupied in both cases by an aromatic moiety, the Trp-500 side chain in the case of WASP (A) and the naphthalene ring in the NASEP inhibitor (B). Surface representations of the aldolase active site were generated using the program PyMOL.

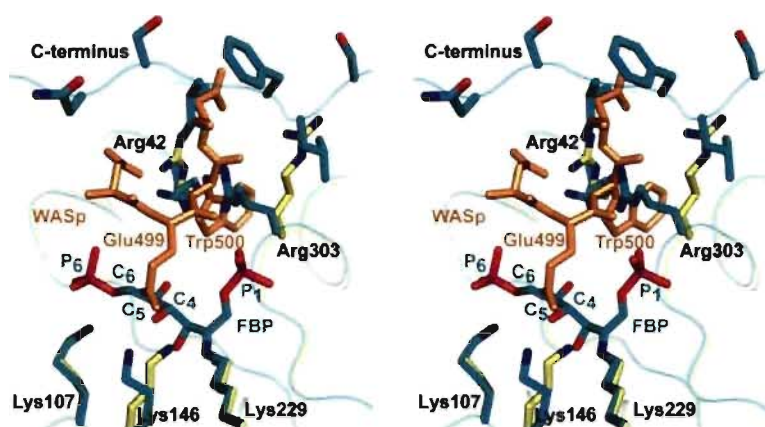


Figure 4.4 WASP competes with the aldolase substrate and C terminus in binding to aldolase active site vicinity.

WASP peptide is depicted in *orange*. Superimposed in *cyan* is shown the covalent Schiff base intermediate formed between the substrate FBP and muscle aldolase in another crystal form (PDB 1ZAI). Steric clashes occur between side chains of Trp-500 in WASP and both Arg-42 and Arg-303 of aldolase when FBP is bound in the active site. Additionally, the WASP Glu-499 side chain occupies the same position as the FBP C4, C5, and C6 atoms. Attachment of triose phosphate products dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate would also be similarly compromised by WASP binding in the active site. WASP binding does not induce major conformational changes with respect to the native or FBP-bound enzyme forms. Only the side chains of Arg-42 and Arg-303 reorganize to facilitate WASP binding. WASP binding also conflicts with active site binding of the aldolase C-terminal region. In the WASP-aldolase complex, each C terminus residue Tyr-363 interacts identically with Arg-258 found in a subunit interface of an adjacent tetramer (not shown). In the crystal form of native enzyme and FBP-bound aldolase, the C-terminal region in each subunit adopts different conformations, each capable of interacting with the active site, and in one subunit, C-terminal binding was clearly observed within the active site periphery. The interaction of the C-terminal region with the active site is consistent with a mechanistic role of Tyr-363 in mediating proton exchange during catalysis and in the crystalline state (M. St-Jean, and J. Sygusch, unpublished data). Binding of the C-terminal region at the active site periphery thus interferes with WASP binding in the crystal form of native aldolase and FBP-bound aldolase.

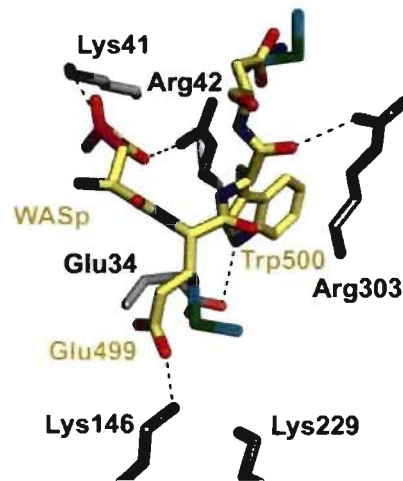


Figure 4.5 The WASP binding mode is compatible with the interaction of WASP homologues with aldolase.

Residues 498-501 corresponding to the sequence DEWD of the WASP peptide were used as template to model the bound conformation of homologous peptides known to interact with homologous aldolases and also implicating a tryptophan residue. Shown in *gray* and *yellow* are aldolase and WASP residues 498-501, respectively. Side chains of WASP residues were substituted using PyMOL software with side chains of the amino acids of homologous sequences, DMWM (*cyan*) and NEWN (*magenta*), corresponding respectively to the cytoplasmic C-terminal tail of the MIC2 protein from *T. gondii* and that of the TRAP protein from *P. falciparum*. Each substitution was made using side chain conformations available in the PyMOL rotamer library and was devoid of steric clashes. The *green dashes* illustrate hydrogen bonds.

CHAPITRE 5

Discussion

5.1 Mécanisme de la FBP aldolase de mammifères

Au chapitre 2, nous avons déterminé la structure cristallographique à haute résolution de l'aldolase de muscle de lapin en complexe covalent avec son substrat FBP sous forme d'iminium (PDB # 1ZAI). Il s'agit de la première structure publiée rapportant la capture d'un authentique intermédiaire FBP-iminium. Cette structure a permis d'identifier avec certitude Glu-187 comme étant le résidu responsable de l'abstraction du proton de FBP O4 menant au clivage du lien C3-C4. Aussi, nous avons résolu la structure cristallographique de l'aldolase en complexe non covalent avec un inhibiteur compétitif, le (2*R*)-mannitol-1,6-bisphosphate (MBP) (PDB # 1ZAJ). Cet inhibiteur possède une géométrie ressemblant à celle de l'intermédiaire FBP-carbinolamine. Au chapitre 3, nous avons poursuivi l'étude du mécanisme de la FBP aldolase, et plus précisément de l'étape du transfert stéréospécifique du proton pro(*S*) du DHAP C3. Nous avons déterminé à haute résolution les structures cristallographiques de l'aldolase de muscle de lapin native et mutante, (K146M) en complexe covalent avec le DHAP, sous forme d'énamine (PDB # 2QUT) et d'iminium (PDB # 2QUU), respectivement. Chez le mutant, nous avons étonnamment observé la présence du C-terminus de l'enzyme dans le site actif d'une des sous-unités. Le positionnement de la tyrosine terminale Tyr-363 adjacente à l'iminium suggère fortement que ce résidu soit responsable du transfert du proton. Cette conformation particulière du C-terminus a également été observée chez l'enzyme native en présence de P_i. Il est important de rappeler que le C-terminus de l'aldolase est une région hautement flexible, ne faisant pas partie du site actif lui-même. Nous avons donc qualifié le C-terminus de catalyseur mobile.

Basés sur les données structurales et enzymologiques disponibles, nous proposons un mécanisme représentant un cycle catalytique de condensation aldolique pour la FBP aldolase de mammifères (Figure 5.1). L'étape initiale consiste en l'entrée du DHAP dans le site actif de l'enzyme pour former un complexe non covalent enzyme-substrat. Ce complexe Michaelis a été partiellement observé par cristallographie et le groupement carbonyle du DHAP se trouve à proximité de Lys-229 (Blom et Sygusch, 1997). Une étude cristallographique en cours portant sur le mutant Lys-229→Met de l'aldolase de muscle de lapin en présence de DHAP montre le DHAP non covalent dans le site actif, dans une seule conformation, avec le groupement carbonyle pointant vers Glu-187 (St-Jean, M., Arthus-

Cartier, G., et Sygusch, J., données non publiées). Une fois le DHAP entré dans le site actif, l'enzyme procède alors à une attaque nucléophile avec Lys-229 au niveau du DHAP C2 (réaction a). Cette réaction crée une DHAP-carbinolamine dipolaire transitoire qui est neutralisée par la protonation du O2 par Glu-187 (réaction b), générant ainsi une DHAP-carbinolamine neutre. À ce jour, des intermédiaires de type carbinolamine ont été observés chez la D-2-désoxyribose-5-phosphate aldolase et la 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase en complexe avec leur substrat respectif (Heine et al., 2001; Allard et al., 2001). Une seconde protonation du O2 par Glu-187 libère une molécule d'eau (réaction c), créant l'intermédiaire DHAP-iminium. Cet intermédiaire a été observé dans toutes les sous-unités de notre structure du mutant K146M en présence de DHAP (panneau A). On note la présence de deux molécules d'eau structurales dans le site actif, W1 et W2, adjacentes au DHAP. La prochaine étape implique le caractère mobile du C-terminus de l'aldolase puisque ce dernier doit pénétrer dans le site actif, expulsant du même coup W1 (réaction d). L'occupation du C-terminus dans le site actif en présence de l'iminium a été observée dans l'une des sous-unités de la structure K146M-DHAP (panneau B). En accord avec notre observation, il a été rapporté que la présence du substrat FBP chez une aldolase de parasite pouvait induire le recrutement de la région C-terminale de l'aldolase dans l'entourage du site actif (Lafrance-Vanasse et Sygusch, 2007). Ensuite, via la molécule d'eau structurale W2, le groupement phosphate dibasique du DHAP active l'hydroxyle de la tyrosine terminale Tyr-363, générant ainsi un groupement phénate (réaction e). La charge négative du phénate est stabilisée électrostatiquement par Lys-146. Tyr-363 peut alors procéder à l'abstraction stéréospécifique du proton pro(S) en C3 du DHAP-iminium, créant ainsi l'énamine (réaction f). L'énamine a été observée dans toutes les sous-unités de notre structure de l'enzyme native en présence de DHAP (panneau C). Il avait déjà été proposé que Asp-33 soit responsable de cette abstraction (Choi et al., 2001). Cependant, nos structures à haute résolution montrent que ce résidu est trop éloigné du C3 et surtout qu'il n'est pas du bon côté du DHAP pour abstraire le proton pro(S), ce dernier pointant vers le solvant en direction de Tyr-363 transitoirement dans le site actif dans notre structure K146M-DHAP. L'abstraction du proton effectuée, le C-terminus doit être expulsé du site actif. Nous proposons que la grande flexibilité conformationnelle du C-terminus et la mobilité observée d'une hélice α en bordure du site actif (résidus 35-45) participent à la sortie du C-terminus du site actif. De façon concomitante, la molécule d'eau structurale W1 peut reprendre son emplacement, maintenue à la fois par Glu-187 et W2. Ensuite, le

groupement phosphate monobasique du DHAP va indirectement céder un proton à Glu-187, via les deux molécules d'eau structurales (réaction g). La protonation de Glu-187 est une nécessité mécanistique. En effet, dès son entrée subséquente dans le site actif qui s'accompagne de l'expulsion de W1, le G3P doit se positionner correctement pour permettre l'attaque de son groupement carbonyle par le C3 du DHAP. Ceci pourrait être facilité par un pont hydrogène entre Glu-187 protoné et l'oxygène du groupement carbonyle du G3P. Le positionnement adéquat du G3P favorise alors, par le caractère électrophile du carbone du groupement carbonyle, la forme carbanionique de l'énamine, portant une charge négative sur le C3. L'existence du DHAP-carbanion est démontrée par la réaction de ce dernier en présence d'un oxydant comme l'hexacyanoferrate(III) (Healy et Christen, 1973). L'attaque nucléophile par le DHAP C3 sur le carbonyle du G3P, de concert avec la protonation par Glu-187 de l'oxygène du carbonyle (réaction h), crée le lien carbone-carbone propre au FBP (C3-C4), lié à l'enzyme sous forme de FBP-iminium. Dans l'une de nos structures cristallographiques, cet intermédiaire a été capturé dans toutes les sous-unités de l'enzyme native en présence de FBP (panneau D). L'enzyme doit maintenant hydrolyser le FBP-iminium pour libérer le FBP acyclique. Pour ce faire, la molécule d'eau W1 doit de nouveau entrer dans le site actif, avec un ajustement de conformation du FBP-iminium pour éviter un contact rapproché (réaction i). W1 activée par Glu-187 procède alors à une attaque nucléophile sur le C2 du FBP-iminium, créant ainsi la FBP-carbinolamine (réaction j). Le C2 de cet intermédiaire possède un état d'hybridation tétragonal sp^3 , donc différent du FBP-iminium dont le C2 est hybridé sp^2 (trigonal). Sur la base de ce critère d'hybridation, notre structure cristallographique du complexe non covalent aldolase-MBP ressemble à la FBP-carbinolamine (panneau pointillé). L'inhibiteur MBP semble donc imiter un intermédiaire du cycle catalytique. Un authentique intermédiaire FBP-carbinolamine a été observé chez une FBP aldolase mutante d'archéobactérie, montrant clairement la géométrie tétragonale du C2 et le O2 du FBP pointant vers l'extérieur du site actif (Lorentzen et al., 2005). Pour libérer le FBP, l'enzyme doit ensuite créer une FBP-carbinolamine dipolaire par l'échange d'un proton entre Lys-229 et le O2 du FBP, via Glu-187 (réaction k). Enfin, la formation du groupement cétone au C2 du FBP mène à la rupture du lien covalent qui unit l'enzyme au substrat, libérant ainsi le FBP acyclique et laissant entrer de nouveau W1 (réaction l). Comme mentionné en introduction, des évidences dans la littérature suggèrent que l'aldolase possède une activité d'ouverture du cycle β -furanose du β -FBP cyclique,

généralisant ainsi le FBP acyclique qu'elle peut attaquer avec Lys-229. Par le principe de micro-réversibilité, nous pouvons proposer un mécanisme de fermeture du FBP acyclique lors de la réaction de condensation aldolique. Le cycle β -furanose se forme par la création d'un lien intramoléculaire entre O5 et C2 du FBP acyclique. Via deux molécules d'eau structurales du site actif, le phosphate P1 du FBP va activer le O5 pour le rendre nucléophile et donc apte à une attaque sur le C2 du groupement carbonyle (réaction **m**). Un mécanisme impliquant le phosphate a déjà été proposé (Model et al., 1968), et connaissant maintenant l'architecture du site actif et ses détails en présence de substrats, nous pouvons impliquer des molécules d'eau structurales dans le mécanisme. L'étude cristallographique d'une aldolase mutante d'archéobactérie en présence de FBP suggère également l'implication d'une molécule d'eau (Lorentzen et al., 2005). Lors de la réaction **m**, Lys-229 est responsable de la protonation de FBP O2, hypothèse soutenue par la structure de l'aldolase archéobactérienne en complexe avec le FBP cyclique. Le phosphate P1 du β -FBP cyclique formé retrouve ensuite son caractère dibasique en cédant son proton à Glu-187, via les deux molécules d'eau structurales (réaction **n**). Dans l'état final (panneau **E**), l'enzyme est régénérée, avec Lys-229 nucléophile et Glu-187 protoné, et le β -FBP cyclique peut être relâché. Ce complexe non covalent est observé dans une structure du mutant Lys-229→Met de l'aldolase de muscle de lapin en présence de FBP (St-Jean, M., Arthus-Cartier, G., et Sygusch, J., données non publiées). Il est important de mentionner que cette structure a été obtenue dans les mêmes conditions, outre la mutation, que celle de l'enzyme native en présence de FBP. Nous pouvons y observer les deux molécules d'eau qui établissent clairement un pont entre le phosphate P1 et le O5 du β -FBP cyclique. Ce constat cristallographique appuie donc l'idée d'un mécanisme de fermeture dépendant entre autres du phosphate P1. Enfin, dans l'état final régénéré, il est probable que le proton de Glu-187 soit continuellement échangé avec Lys-229, par une oscillation mineure de la chaîne latérale de Glu-187. Ceci confère donc le rôle d'activateur à Glu-187, pour maintenir Lys-229 dans un état nucléophile, capable d'abstraire le proton de O2 du FBP cyclique et de procéder à l'attaque nucléophile sur le substrat. On note que Glu-187 occupe une place centrale dans les échanges de protons du mécanisme de l'aldolase (Maurady et al., 2002).

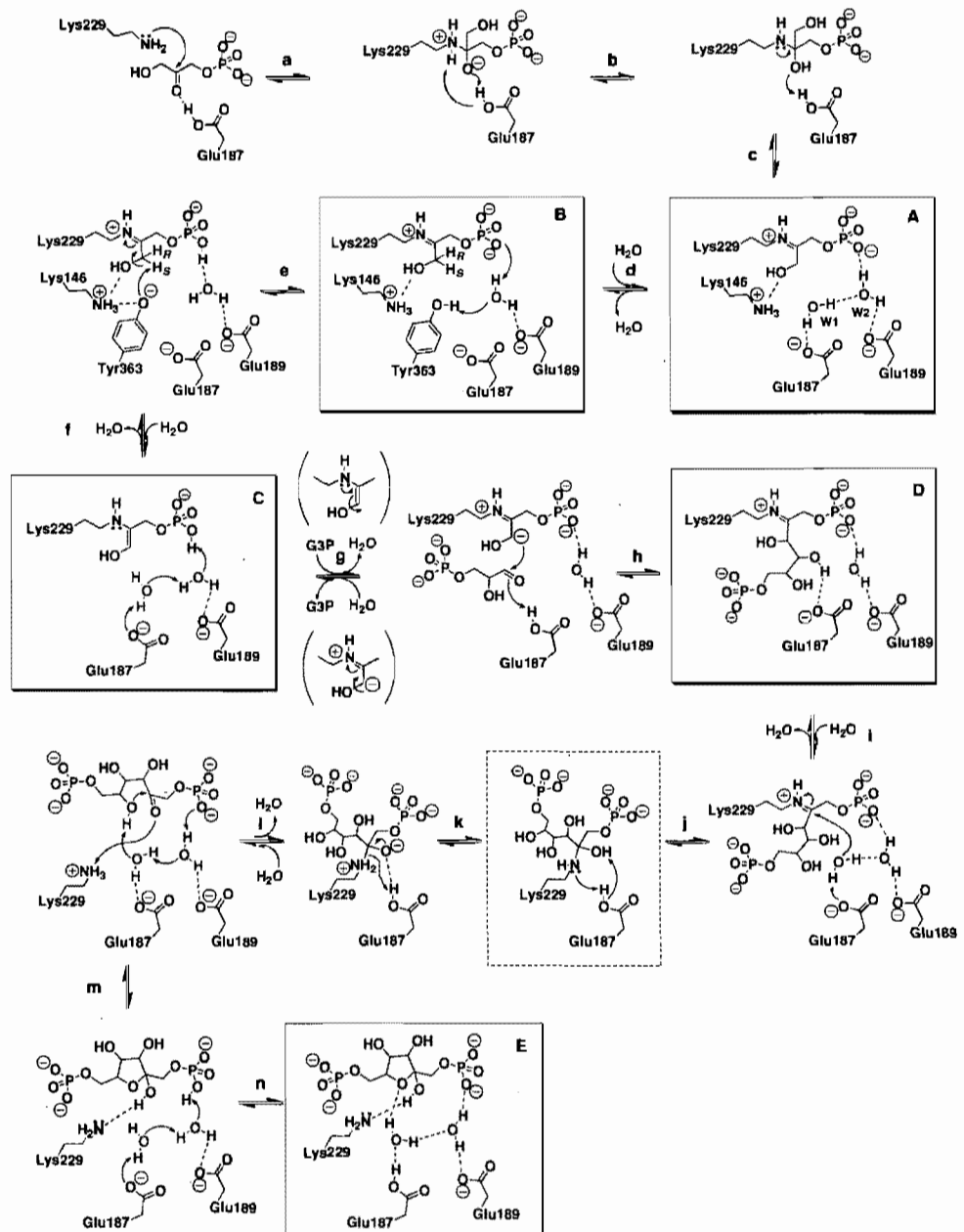


Figure 5.1 Mécanisme catalytique proposé de la condensation aldolique chez la FBP aldolase de mammifères.

Les panneaux A-E représentent des intermédiaires observés dans nos structures cristallographiques. Le panneau pointillé souligne que l'intermédiaire est imité par un inhibiteur retrouvé dans une structure. Les réactions a-n sont décrites dans le texte.

5.2 Rôle cellulaire potentiel de l'interaction WASP-aldolase

Au chapitre 4, nous avons localisé le site d'interaction d'un partenaire protéique de la FBP aldolase. En effet, la résolution de la structure cristallographique d'un complexe entre l'aldolase et un peptide du C-terminus de WASP révéla les détails structuraux du mode de liaison. C'est la première fois dans la littérature que ces informations sont rapportées. Notre structure montre que le résidu Trp-500 de WASP, reconnu pour être crucial dans la liaison, utilise une poche hydrophobe en bordure du site actif de l'aldolase comme site de liaison. Le positionnement du peptide est incompatible avec la présence des substrats de l'aldolase, expliquant la nature compétitive de l'interaction. Durant la même période, une structure cristallographique a été publiée d'un complexe entre l'aldolase et un peptide d'une adhésine d'un parasite, dont le C-terminus est homologue à celui de WASP. Le mode de liaison décrit est similaire à notre complexe WASP-aldolase, utilisant le Trp subterminal de l'adhésine et une poche hydrophobe en bordure du site actif de l'aldolase du parasite (Bosch et al., 2007). Par ailleurs, il est important de mentionner que la structure de WASP n'a jamais été déterminée pour la protéine complète. Des structures ont été rapportées pour des domaines restreints de WASP, mais aucune n'inclut la région C-terminale de WASP responsable de l'interaction avec l'aldolase (Peterson et al., 2004; Kim et al., 2000; Abdul-Manan et al., 1999).

Remarquablement, le résidu subterminal Trp-500 de WASP est à la fois critique pour l'interaction avec l'aldolase et avec Arp2/3 (Buscaglia et al., 2006; Marchand et al., 2001). Ceci laisse présager une compétition possible entre l'aldolase et Arp2/3 pour le C-terminus de WASP dans la cellule. On pourrait donc établir un couplage entre la glycolyse et la dynamique de l'actine via WASP et ses interactions avec l'aldolase et Arp2/3.

Il a été montré par co-immunoprécipitation que dans des extraits cellulaires, l'interaction WASP-aldolase ne dure que quelques minutes après une stimulation hormonale (Buscaglia et al., 2006). Cette observation est importante puisqu'elle révèle que l'interaction est dynamique et transitoire. En effet, l'aldolase doit participer à la glycolyse et WASP doit recruter Arp2/3 pour amorcer la polymérisation d'actine. Nous proposons donc un modèle décrivant le rôle cellulaire possible de l'interaction WASP-aldolase et son contexte (Figure 5.2). Dans son état inactif, WASP est auto-inhibée, son C-terminus étant replié sur le corps de la protéine pour établir des interactions intramoléculaires (Miki et al.,

1998). Dans cette conformation, le C-terminus est inaccessible à l'aldolase et interagit avec les domaines de recrutement à la membrane de WASP, qui s'effectue via la liaison à PIP₂ et à Cdc42 prénylé localisé à la membrane. Suite à une stimulation, WASP va lier PIP₂ et Cdc42 à la membrane, ce qui libère son C-terminus de l'interaction auto-inhibitrice et rend WASP active (Rohatgi et al., 2000). Les détails des événements initiaux de cette activation de WASP sont cependant plus ou moins bien compris. Une fois libéré, le C-terminus de WASP peut interagir avec l'aldolase. Nous émettons l'hypothèse que cette interaction durera jusqu'à ce qu'un niveau suffisamment élevé de FBP s'accumule localement. Les éléments activateurs de WASP pourraient également accroître l'entrée de glucose dans la cellule et indirectement augmenter le niveau de FBP par l'action des réactions précédant l'aldolase dans la glycolyse. Lorsqu'il est en concentration assez élevée, le FBP entre en compétition avec le C-terminus de WASP pour la liaison au site actif de l'aldolase. Le C-terminus de WASP libéré, il peut alors recruter et activer Arp2/3, ce dernier amorçant la polymérisation d'actine. Ce processus de polymérisation d'actine nécessite un apport soutenu en ATP glycolytique pour assurer l'intégrité de la F-actine en polymérisation (Bershadsky et Gelfand, 1983). Ainsi, il est cohérent de penser qu'un niveau suffisant de FBP doit être présent afin que localement la glycolyse puisse fournir l'ATP nécessaire. Il est important de rappeler que les filaments d'actine sont des structures très dynamiques, sensibles au ratio ATP-actine/ADP-actine. Nous croyons donc que l'interaction WASP-aldolase constitue en quelque sorte un point de contrôle, jugeant localement les niveaux de FBP avant de permettre la polymérisation intensive de la F-actine par Arp2/3, un processus nécessitant de l'ATP glycolytique en continu. Bien que nous ne l'ayons pas incluse dans notre modèle, l'interaction directe de l'aldolase avec la F-actine et la G-actine doit vraisemblablement jouer un rôle dans les événements entourant la régulation de la dynamique de l'actine dépendante de WASP et Arp2/3.

Il a été observé que l'exocytose insulino-dépendante des vésicules dans lesquelles est enclavé GLUT4 latent dépend de la formation des complexes GLUT4-aldolase-F-actine et WASP-Arp2/3-F-actine (Kao et al., 1999; Jiang et al., 2002). Ainsi, pour que notre modèle soit valide, les interactions GLUT4-aldolase et WASP-aldolase doivent être de forces différentes et donc inhibées par des concentrations plus ou moins élevées de FBP. En effet, puisque la voie WASP-Arp2/3-F-actine est nécessaire à l'exocytose massive de GLUT4 par l'action de l'insuline, l'interaction WASP-aldolase doit avoir été rompue par le FBP. Or, ce

FBP ne doit pas rompre simultanément l'interaction GLUT4-aldolase, ce qui aurait pour effet d'interrompre prématurément l'exocytose de GLUT4 à la membrane et ainsi ralentir l'entrée de glucose. De fait, il doit exister un délai entre l'inhibition par le FBP des interactions WASP-aldolase et GLUT4-aldolase, cette dernière étant inhibée par un niveau plus élevé de FBP. Malheureusement, la force des interactions avec l'aldolase n'est pas connue pour GLUT4 et WASP complètes. Par ailleurs, le rôle potentiel de l'état homotétramérique de l'aldolase dans la régulation de ses interactions demeure un mystère. Il n'est pas impensable que les premières accumulations de FBP soient captées par les sous-unités libres de l'aldolase, les autres étant impliquées dans une interaction; une fois les sous-unités libres occupées par le FBP, le FBP supplémentaire pourrait entrer en compétition avec des partenaires de l'aldolase.

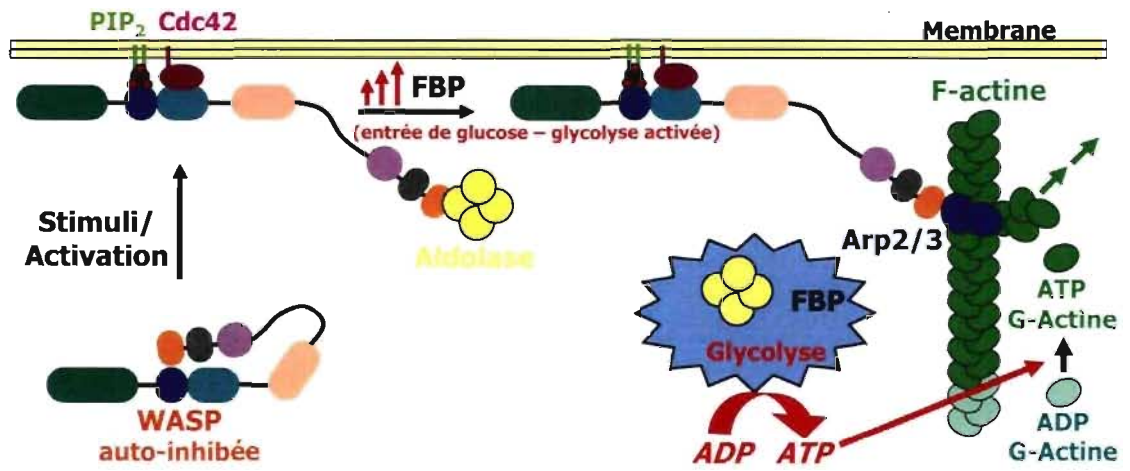


Figure 5.2 Rôle cellulaire potentiel de l'interaction WASP-aldolase.

5.3 Inhibition de l'aldolase par le composé NASEP

La découverte de NASEP comme nouvel inhibiteur de l'aldolase suscite un grand intérêt. En effet, cette molécule utilise un site hydrophobe inhabituel de l'aldolase et pourrait être utilisé comme composé meneur (« *lead compound* ») dans l'optique de générer d'autres composés possédant un potentiel d'inhibition plus grand. Le fait que NASEP et WASP utilisent la même poche hydrophobe en bordure du site actif de l'aldolase montre que NASEP interfère à la fois avec l'activité catalytique et les partenaires d'interaction de l'aldolase qui utilisent ce même site. Une thérapie anti-cancéreuse basée sur l'inhibition de l'aldolase pour bloquer la voie glycolytique, qui est une source d'énergie critique pour les cellules cancéreuses, pourrait tirer profit d'exploiter ce site de liaison sur l'aldolase. Un composé se logeant dans la poche hydrophobe inhiberait l'aldolase en plus de perturber les évènements cellulaires dépendants d'une interaction avec ce site de l'aldolase. Enfin, il est envisageable d'utiliser notre connaissance structurale des divers complexes aldolase-ligands connus et de procéder à la conception rationnelle d'inhibiteurs, formés de groupements fonctionnels exploitant au maximum les sites de liaison de l'aldolase.

CHAPITRE 6

Perspectives et conclusion

6.1 Perspectives

6.1.1 Mécanisme catalytique

Dans l'analyse du mécanisme catalytique de la FBP aldolase de mammifères, le rôle précis joué par certains résidus du site actif demeure encore nébuleux. En effet, Asp-33 est situé à proximité du site de liaison des substrats et l'introduction de mutations à cette position affecte drastiquement l'activité enzymatique (Morris et Tolan, 1993). Une étude en cours dans le laboratoire tente de déterminer le rôle de ce résidu en utilisant la résolution de structures cristallographiques et des cinétiques d'activité enzymatique de mutants. Entre autres, l'analyse de structures des mutants Asp-33→Asn et Asp-33→Ser en présence de DHAP indique un désordre inhabituel des chaînes latérales de Lys-107 et Lys-146, adjacentes à Asp-33. La poursuite de ces analyses permettrait de mieux comprendre le rôle de ce résidu du site actif.

Nous prévoyons également finaliser notre analyse structurale du complexe non covalent entre le mutant Lys-229→Met de l'aldolase et le β -FBP cyclique. Nous pourrions alors publier le mécanisme proposé de fermeture/ouverture du β -FBP cyclique pour l'aldolase glycolytique de mammifères, correspondant aux réactions **m-n** de la Figure 5.1.

Par ailleurs, l'implication des résidus subterminaux du C-terminus de l'aldolase dans la modulation de son activité catalytique demeure inexplicée. La détermination de structures cristallographiques d'aldolases de muscle de lapin contenant des mutations ponctuelles dans le C-terminus, en présence de substrats ou de P_i , permettrait de mieux comprendre le rôle de ces résidus. Ces structures pourraient révéler des détails sur l'importance de certains résidus du C-terminus lors de son passage transitoire dans le site actif. Aussi, la détermination de structures des isoformes B et C de la FBP aldolase avec ces mêmes ligands pourrait nous informer sur la modulation de l'activité catalytique qui diffère selon les C-termini des isoformes A, B et C.

Il serait aussi pertinent d'entreprendre des études de dynamique moléculaire pour élucider les changements de conformation responsables de l'entrée du C-terminus dans le site actif en présence et absence des substrats ou de P_i . Ceci pourrait apporter des éclaircissements au niveau de la dynamique du site actif lors de la catalyse. Compte tenu de

la taille importante de l'aldolase, de tels renseignements se sont avérés inaccessibles lors d'une étude préliminaire par RMN. Une étude de dynamique moléculaire sur l'aldolase de muscle de lapin a déjà permis d'élucider le mécanisme d'action d'un inhibiteur de type covalent (Dax et al., 2005).

Enfin, indirectement relié au mécanisme catalytique, la production de méthylglyoxal (MG) par l'aldolase A en présence de DHAP a déjà été détectée et des études en cours dans le laboratoire ont pour but d'en élucider l'origine et la portée physiologique. Dans la littérature, différentes cibles du MG sont connues. Effectivement, ce métabolite peut réagir réversiblement et irréversiblement avec divers acides aminés de protéines et plus spécifiquement avec la chaîne latérale des Arg, Lys et Cys (Takahashi, 1968; Takahashi, 1977a; Takahashi, 1977b). Il peut également réagir avec les acides nucléiques en modifiant les nucléotides G, A, et C (Krymkiewicz, 1973). Les effets physiologiques des modifications impliquant le MG sont encore mal compris, mais il est clair que les problèmes liés au MG surviennent lorsqu'un déséquilibre est créé entre sa génération et sa détoxification par le système des glyoxalases I et II (Thornalley, 1995). L'accumulation de MG peut alors favoriser sa réaction avec d'autres entités cellulaires et ainsi interférer avec leurs activités normales. Un exemple de pathologie ayant un lien avec le MG est l'hypertension, qui serait due à un effet dommageable du MG sur la structure et le fonctionnement de la vascularisation (Wu, 2006; Chang et Wu, 2006). Par ailleurs, les sources principales de production de MG sont à la fois non enzymatiques et enzymatiques. D'une part, la fragmentation non enzymatique du DHAP et du G3P par β -élimination libère du MG et du P_i (Riddle et Lorenz, 1968; Richard, 1984; Phillips et Thornalley, 1993). D'autre part, des enzymes produisent du MG : la méthylglyoxal synthase (Ray et Ray, 1981), le cytochrome P450 3a (Koop et Casazza, 1985) et une amine oxydase (Lyles et Chalmers, 1992). Notons également qu'il a été détecté que la TIM pouvait générer du MG, comme sous-produit de dégradation d'un intermédiaire de son mécanisme réactionnel (Pompliano et al., 1990). Cependant, l'importance de la production de MG par l'aldolase demeure encore ignorée. Comme expliqué dans l'introduction, une réaction secondaire de dégradation de l'intermédiaire énamine serait responsable de la génération du MG par l'aldolase. Nous avons effectué des expériences cinétiques dans le but de détecter le MG produit par l'aldolase. L'essai consiste à la transformation du MG par la glyoxalase I en S-

lactoyl-glutathion, détectable par spectrophotométrie. Le MG généré par l'aldolase peut donc être détecté directement par cet essai couplé. Nos résultats *in vitro* préliminaires montrent que l'aldolase A produit du MG de façon pH-dépendante en présence de DHAP, avec un pH optimal de 5.5. Nous avons également entrepris une étude cristallographique par trempage de cristaux d'aldolase dans des solutions de DHAP à différents pH et pour des périodes de temps plus ou moins longues. Ceci nous a permis d'observer dans certains sites actifs le P_i produit lors de la réaction de production de MG, mais pas le MG lui-même, n'étant visiblement pas stabilisé au site actif. Néanmoins, le défi principal consiste à détecter *in vivo* la production de MG par l'aldolase, ce qui s'avère un projet difficile. En effet, la grande réactivité chimique du MG se révèle être un obstacle majeur à l'étude de ce métabolite puisqu'il est majoritairement (90%) retrouvé sous sa forme liée aux protéines et non pas libre (Lo et al., 1994). De plus, l'analyse du rôle cellulaire de l'aldolase dans la production de MG est problématique puisque l'aldolase est intimement reliée au métabolisme des trioses-phosphates glycolytiques, eux-mêmes reconnus comme source importante de MG. Nonobstant ces difficultés, il est clair que l'implication de l'aldolase dans le métabolisme du MG ne peut être négligée, et plus particulièrement de nos jours où le sucre est présent en excès et à peu de frais dans nos assiettes. Afin de vérifier la production de MG par l'aldolase dans un contexte plus représentatif de la cellule, nous pourrions suivre l'apparition du MG produit par l'aldolase avec le même essai décrit précédemment, mais dans un régime où l'aldolase fonctionne à l'état stationnaire, c'est-à-dire dans lequel elle est en présence de son substrat glycolytique FBP en plus d'y ajouter la TIM et la GAPDH qui sont les deux enzymes suivant l'aldolase dans la glycolyse. Pour ne pas confondre le MG produit par l'aldolase et la TIM, nous pourrions tenter de remplacer cette dernière par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase qui produit du glycérol-3-phosphate à partir du DHAP. Ainsi, dans un tel système, nous évitons l'accumulation des produits de l'aldolase (DHAP et G3P). Enfin, il pourrait être intéressant de vérifier la production de MG par l'aldolase B hépatique, importante dans le métabolisme du fructose et la gluconéogenèse.

6.1.2 Interactions avec des partenaires cellulaires

Compte tenu de la diversité et du nombre d'interactions rapportées pour l'aldolase glycolytique, son implication dans la dynamique cellulaire ne peut être ignorée. Cependant, son aspect multifonctionnel, sa concentration élevée et son état homotétramérique complexifient son étude dans des cellules vivantes. Pour cette raison, la mise au point de systèmes modèles constitue une avenue intéressante pour l'investigation du rôle précis joué par une interaction particulière de l'aldolase. Lors des études de l'activation de WASP par PIP_2 et Cdc42, et l'effet de WASP sur la polymérisation d'actine dépendante de Arp2/3, un système modèle a été mis au point (Higgs et al., 1999; Blanchoin et al., 2000; Higgs et Pollard, 2000). Ce système pourrait facilement être utilisé pour vérifier notre proposition du rôle potentiel de l'interaction WASP-aldolase. L'expérience consiste à placer WASP en présence de micelles lipidiques contenant PIP_2 , de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Cdc42 prénylé, de Arp2/3 et d'actine partiellement marquée au pyrène. Le système est ensuite observé par microscopie à fluorescence, permettant de visualiser la polymérisation d'actine. On pourrait facilement envisager de reconstituer cette expérience en y incluant l'aldolase et son substrat, en concentrations variables. Notre proposition du rôle de l'interaction WASP-aldolase prédit qu'en absence de FBP, WASP activée et recrutée par PIP_2 et $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Cdc42 serait moins efficace pour recruter Arp2/3 de par son interaction avec l'aldolase. L'ajout de FBP devrait alors déplacer WASP de son interaction avec l'aldolase et WASP serait alors disponible pour recruter et activer Arp2/3 et une augmentation de la polymérisation d'actine serait ainsi observée. Aussi, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'inhibiteur naphthol AS-E phosphate que nous avons découvert et qui utilise la même poche hydrophobe que WASP pour interagir avec l'aldolase. Par ailleurs, lors de l'utilisation d'un tel système, on doit garder en tête que l'aldolase est en mesure de former des complexes avec la G-actine et la F-actine et de modifier l'organisation de la F-actine. Il sera alors primordial d'évaluer ce même système en absence de WASP et/ou Arp2/3 pour vérifier les effets de l'aldolase sur l'actine et trouver des conditions permettant de les minimiser.

Nous avons également entrepris une vaste étude cristallographique sur l'interaction de l'aldolase avec les I-P. En utilisant la méthode de trempage de cristaux d'aldolase native, nous avons obtenu la structure de complexes entre l'aldolase et plusieurs I-P différents (I-

1,4-P₂, I-1,5-P₂, I-1,4,5-P₃, I-1,3,4,5,6-P₅, I-1,2,3,4,5,6-P₆). L'analyse de ces structures n'est pour le moment que préliminaire, mais déjà on peut clairement distinguer le site de liaison utilisé par certains I-P, qui se situe en bordure du site actif de l'aldolase. En plus de fournir de précieuses informations structurales sur la capacité de liaison de l'aldolase, ces structures permettront de mieux comprendre le rôle possible des interactions aldolase-I-P dans un contexte cellulaire, là où le métabolisme des I-P y est très dynamique. Par ailleurs, pour quantifier la force des interactions et leur nature, nous pourrions effectuer des expériences de cinétique d'inhibition et de calorimétrie par titrage isothermale, cette dernière permettant de mesurer l'affinité de deux entités (protéine-ligand) grâce aux variations de température induite par leur association/dissociation (Leavitt et Freire, 2001).

6.2 Conclusion

Le but général de ce projet de thèse était d'apporter des réponses d'ordre structural au mécanisme catalytique et aux interactions de la FBP aldolase de mammifères. Cette enzyme glycolytique attire l'attention par sa capacité à former ou cliver un lien carbone-carbone, son état homotétramérique, sa concentration cellulaire élevée, et par les nombreuses interactions qu'elle peut établir avec divers partenaires cellulaires. Nous avons donc entrepris d'étudier les détails structuraux de son mécanisme catalytique et aussi de découvrir le site de liaison d'un partenaire protéique de l'aldolase. La détermination de structures cristallographiques à haute résolution de l'aldolase de muscle de lapin en complexe avec des substrats, des inhibiteurs et un peptide a permis d'aborder d'un point de vue structural la multifonctionnalité de l'aldolase glycolytique. Chacun des trois articles présentés dans cette thèse répond à une question non résolue, mentionnée dans nos objectifs spécifiques. Voici donc nos trois conclusions à cet égard.

- Glu-187 est responsable de la déprotonation du FBP O4 (clivage du FBP) et de la protonation du G3P O3 (synthèse du FBP).
- Tyr-363 est responsable du transfert stéréospécifique du proton pro(S) du DHAP C3 lors de l'interconversion énamine-iminium.
- Le site de liaison de WASP sur l'aldolase se situe en bordure du site actif et est constitué d'une poche hydrophobe, utilisée par WASP pour y loger Trp-500.

L'exploration des modes de liaison des divers ligands étudiés a rendu accessible une description détaillée du mécanisme enzymatique et d'une interaction protéine-protéine de l'aldolase et dans quelle mesure ces deux activités pourraient entrer en compétition dans un contexte cellulaire.

Bibliographie

- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A., et Rosen, M. K. (1999) Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature* **399**, 379-383.
- Abel, K., Anderson, R. A., et Shears, S. B. (2001) Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *J. Cell Sci.* **114**, 2207-2208.
- Allard, J., Grochulski, P., et Sygusch, J. (2001) Covalent intermediate trapped in 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase structure at 1.95-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3679-3684.
- Altekar, W., et Dhar, N. M. (1988) Archaeobacterial class I and class II aldolases from extreme halophiles. *Orig. Life Evol. Biosph.* **18**, 59-64.
- Anai, M., Lai, C. Y., et Horecker, B. L. (1973) The pyridoxal phosphate-binding site of rabbit muscle aldolase. *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 712-719.
- Arnold, H., et Pette, D. (1968) Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur. J. Biochem.* **6**, 163-171.
- Arnold, H., et Pette, D. (1970) Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase. *Eur. J. Biochem.* **15**, 360-366.
- Arnold, H., Henning, R., et Pette, D. (1971) Quantitative comparison of the binding of various glycolytic enzymes to F-actin and the interaction of aldolase with G-actin. *Eur. J. Biochem.* **22**, 121-126.
- Avigad, G., et England, S. (1972) The covalent binding of D-fructose 1,6-diphosphate to muscle aldolase. *Arch. Biochem. Biophys.* **153**, 337-346.
- Bai N. J., Pai, M. R., Murthy, P. S., et Venkitasubramanian, T. A. (1975) Fructose diphosphate aldolase from *Mycobacterium smegmatis*: Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **168**, 230-234.
- Balaban, N., et Goldman, R. (1990) The association of glycosomal enzymes and microtubules: a physiological phenomenon or an experimental artifact? *Exp. Cell. Res.* **191**, 219-226.

- Baranowski, T., et Niederland, T. R. (1949) Aldolase activity of myogen A. *J. Biol. Chem.* **180**, 543-551.
- Baron, C. B., Ozaki, S., Watanabe, Y., Hirata, M., LaBelle, E. F., et Coburn, R. F. (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate binding to porcine tracheal smooth muscle aldolase. *J. Biol. Chem.* **270**, 20459-20465.
- Baron, C. B., Greeley, P., et Coburn, R. F. (1998) Smooth muscle aldolase C-bound inositol 1,4,5-trisphosphate studied in vitro under physiological conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**, 81-92.
- Baron, C. B., Tolan, D. R., Choi, K. H., et Coburn, R. F. (1999) Aldolase A Ins(1,4,5)P₃-binding domains as determined by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **341**, 805-812.
- Batke, J. (1989) Remarks on the supramolecular organization of the glycolytic system in vivo. *FEBS Lett.* **251**, 13-16.
- Bednarski, M. D., Simon, E. S., Bischofberger, N., Fessner, W. D., Kim, M. J., Lees, W., Saito, T., Waldmann, H., et Whitesides, G. M. (1989) Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 627-635.
- Beernink, P. T., et Tolan, D. R. (1992) Construction of a high-copy "ATG vector" for expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **3**, 332-336.
- Bershady, A. D., et Gelfand, V. I. (1983) Role of ATP in the regulation of stability of cytoskeletal structures. *Cell Biol. Int. Rep.* **7**, 173-187.
- Berthiaume, L., Tolan, D. R., et Sygusch, J. (1993) Differential usage of the carboxyl-terminal region among aldolase isozymes. *J. Biol. Chem.* **268**, 10826-10835.
- Berthiaume, L., Loisel, T. P., et Sygusch, J. (1991) Carboxyl terminus region modulates catalytic activity of recombinant maize aldolase. *J. Biol. Chem.* **266**, 17099-17105.
- Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A., et Pollard, T. D. (2000) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007-1011.
- Blom, N. S., Tétreault, S., Coulombe, R., et Sygusch, J. (1996) Novel active site in *Escherichia coli* fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 856-862.
- Blom, N., et Sygusch, J. (1997) Product binding and role of the C-terminal region in class I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 36-39.

- Bosch, J., Buscaglia, C. A., Krumm, B., Ingason, B. P., Lucas, R., Roach, C., Cardozo, T., Nussenzweig, V., et Hol, W. G. (2007) Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7015-7020.
- Boyer, P. D. *The Enzymes*, 3rd Ed., Vol. 7, New York: Academic Press, 1972.
- Brünger, A. T. (1992) Free *R* value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Buono, P., de Conciliis, L., Olivetta, E., Izzo, P., et Salvatore, F. (1993) Cis-acting elements in the promoter region of the human aldolase C gene. *FEBS Lett.* **328**, 243-249.
- Buono, P., de Conciliis, L., Izzo, P., et Salvatore, F. (1997) The transcription of the human fructose-bisphosphate aldolase C gene is activated by nerve-growth-factor-induced B factor in human neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **323**, 245-250.
- Buono, P., Cassano, S., Alfieri, A., Mancini, A., et Salvatore, F. (2002) Human aldolase C gene expression is regulated by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) in PC12 cells. *Gene* **291**, 115-121.
- Buono, P., Barbieri, O., Alfieri, A., Rosica, A., Astigiano, S., Cantatore, D., Mancini, A., Fattoruso, O., et Salvatore, F. (2004) Diverse human aldolase C gene promoter regions are required to direct specific LacZ expression in the hippocampus and Purkinje cells of transgenic mice. *FEBS Lett.* **578**, 337-344.
- Buscaglia, C. A., Penesetti, D., Tao, M., et Nussenzweig, V. (2006) Characterization of an aldolase-binding site in the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 1324-1331.
- Buscaglia, C. A., Coppens, I., Hol, W. G., et Nussenzweig, V. (2003) Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in plasmodium. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 4947-4957.
- Buchner, E. (1897) Alkoholische Gahrung ohne Hefezellen. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **30**, 117-124.
- Campanella, M. E., Chu, H., et Low, P. S. (2005) Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2402-2407.

- Canete-Soler, R., Reddy, K. S., Tolan, D. R., et Zhai, J. (2005) Aldolases A and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J. Neurosci.* **25**, 4353-4364.
- Carr, D., et Knoll, H. R. (1993) Aldolase-tubulin interactions: removal of tubulin C-terminals impairs interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 289-293.
- Certa, U., Ghersa, P., Döbeli, H., Matile, H., Kocher, H. P., Shrivastava, I. K., Shaw, A. R., et Perrin, L. H. (1988) Aldolase activity of a Plasmodium falciparum protein with protective properties. *Science* **240**, 1036-1038.
- Chang, T., et Wu, L. (2006) Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**, 1229-1238.
- Choi, K. H., et Tolan, D. R. (2004) Presteady-state kinetic evidence for a ring-opening activity in fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3402-3403.
- Choi, K. H., Shi, J., Hopkins, C. E., Tolan, D. R., et Allen, K. N. (2001) Snapshots of catalysis: the structure of fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase covalently bound to the substrate dihydroxyacetone phosphate. *Biochemistry* **40**, 13868-13875.
- Choi, K. H., Mazurkie, A. S., Morris, A. J., Utheza, D., Tolan, D. R., et Allen, K. N. (1999) Structure of a fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase liganded to its natural substrate in a cleavage-defective mutant at 2.3 Å. *Biochemistry* **38**, 12655-12664.
- Chumachenko, Y. V. (1994) Some evidence in favour of the partnership between rabbit muscle aldolase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in the consecutive reactions. *Ukr. Biokhim. Zh.* **66**, 52-57.
- Clarke, F. M., et Morton, D. J. (1976) Aldolase binding to actin-containing filaments. Formation of paracrystals. *Biochem. J.* **159**, 797-798.
- Creighton, D. J. et Murthy, N. S. R. K. (1990) Stereochemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions at Carbon. *The enzymes*, Academic Press Inc., San Diego, New York, Boston, **19**, 323-421.
- Concordet, J.-P., Maire, P., Kahn, A., et Daegelen, D. (1991) A ubiquitous enhancer shared by two promoters in the human aldolase A gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4173-4180.
- Concordet, J.-P., Salminen, M., Demignon, J., Moch, C., Maire, P., Kahn, A., et Daegelen, D. (1993) An opportunistic promoter sharing regulatory sequences with either a

- muscle-specific or a ubiquitous promoter in the human aldolase A gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 9-17.
- Connett, R. J. (1985) In vivo glycolytic equilibria in dog gracilis muscle. *J. Biol. Chem.* **260**, 3314-3320.
- Cooper, S. J., Leonard, G. A., McSweeney, S. M., Thompson, A. W., Naismith, J. H., Qamar, S., Plater, A., Berry, A., et Hunter, W. N. (1996) The crystal structure of a class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure* **4**, 1303-1315.
- Costanzo, P., Lupo, A., Rippa, E., Grosso, M., Salvatore, F., et Izzo, P. (1993) Multiple control elements regulate transcription from the most distal promoter of human aldolase A gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 935-944.
- Costanzo, P., Lupo, A., Medugno, L., D'Agostino, P., Zevino, C., et Izzo, P. (1999) PKC-dependent phosphorylation of the p97 repressor regulates the transcription of aldolase A L-type promoter. *FEBS Lett.* **454**, 61-66.
- Dax, C., Coincon, M., Sygusch, J., et Blonski, C. (2005) Hydroxynaphthaldehyde phosphate derivatives as potent covalent Schiff base inhibitors of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* **44**, 5430-5443.
- de Moissac, D. (1995) Détermination du rôle de résidus clés du site actif dans le mécanisme catalytique de l'aldolase de muscle de lapin recombinante. *Mémoire de Maîtrise*, Université de Montréal, Qc, Canada.
- de Réaumur, R. A. F. (1752) Sur la digestion des oiseaux. Second mémoire. De la manière dont elle se fait dans l'estomac des oiseaux de proie. *Mémoire de l'Académie royale des sciences*, imprimé en 1756, 461-495.
- Derry, J. M., Ochs, H. D., et Francke, U. (1994) Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**, 635-644.
- di Iasio, A., Trombetta, G., et Grazi, E. (1977) Fructose 1,6-bisphosphate aldolase from liver: the absolute configuration of the intermediate carbinolamine. *FEBS Lett.* **73**, 244-246.
- Drechsler, E. R., Boyer, P. D., et Kowalsky, A. G. (1959) The catalytic activity of carboxypeptidase-degraded aldolase. *J. Biol. Chem.* **234**, 2627-2634.
- Drenth, J. *Principles of Protein X-ray Crystallography*. New York: Springer, 1999.

- Ducruix, A., et Giegé, R. *Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach*. New York: Oxford University Press, 1992.
- Ellis, R. J. (2001a) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 114-119.
- Ellis, R. J. (2001b) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 597-604.
- Fisher, E. (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **27**, 2985-2993.
- Gefflaut, T., Blonski, C., Perie, J., et Wilson, M. (1995) Class I aldolases: substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**, 301-340.
- Götz, F., Fischer, S., et Schleifer, K. H. (1980) Purification and characterisation of an unusually heat-stable and acid/base-stable class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* **108**, 295-301.
- Gray, G. R. (1971) An examination of D-fructose 1,6-diphosphate and related sugar phosphates by fourier transform ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **10**, 4705-4711.
- Grazi, E., Cheng, T. et Horecker, B. L. (1962a) Formation of Stable Aldolase-Dihydroxyacetone Phosphate Complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 250-253.
- Grazi, E., Rowley, P. T., Cheng, T., Tchola, O., et Horecker, B. L. (1962b) The mechanism of action of aldolases. III. Schiff base formation with lysine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 38-43.
- Grazi, E., et Trombetta, G. (1978) A new intermediate of the aldolase reaction, the pyruvaldehyde-aldolase-orthophosphate complex. *Biochem. J.* **175**, 361-365.
- Green, H. J. (1997) Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise. *J. Sports Sci.* **15**, 247-256.
- Gregori, C., Ginot, F., Decaux, J. F., Weber, A., Berbar, T., Kahn, A., et Pichard, A.-L. (1991) Expression of the rat aldolase B gene: a liver-specific proximal promoter and an intronic activator. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 722-729.
- Gregori, C., Kahn, A., et Pichard, A.-L. (1993) Competition between transcription factors HNF1 and HNF3, and alternative cell-specific activation by DBP and C/EBP

- contribute to the regulation of the liver-specific aldolase B promoter. *Nucleic Acids Res.* **21**, 897-903.
- Gregori, C., Porteu, A., Lopez, S., Kahn, A., et Pichard, A.-L. (1998) Characterization of the aldolase B intronic enhancer. *J. Biol Chem.* **273**, 25237-25243.
- Gregori, C., Porteu, A., Mitchell, C., Kahn, A., et Pichard, A.-L. (2002) In vivo functional characterization of the aldolase B gene enhancer. *J. Biol Chem.* **277**, 28618-28623.
- Gross, W., Lenze, D., Nowitzki, U., Weiske, J., et Schnarrenberger, C. (1999) Characterization, cloning, and evolutionary history of the chloroplast and cytosolic class I aldolases of the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Gene* **230**, 7-14.
- Hall, D. R., Leonard, G. A., Reed, C. D., Watt, C. I., Berry, A., et Hunter, W. N. (1999) The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *J. Mol. Biol.* **287**, 383-394.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R., et Michels, P. A. (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2**, 11-41.
- Hartman, F. C., et Barker, F. (1965) An exploration of the active site of aldolase using structural analogs of fructose diphosphate. *Biochemistry* **4**, 1068-1075.
- Hartman, F. C., et Brown, J. P. (1976) Affinity labeling of a previously undetected essential lysyl residue in class I fructose bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **251**, 3057-3062.
- Healy, M. J. et Christen, P. (1973) Mechanistic probes for enzymic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase). *Biochemistry* **12**, 35-41.
- Heine, A., DeSantis, G., Luz, J. G., Mitchell, M., Wong, C. H., et Wilson, I. A. (2001) Observation of covalent intermediates in an enzyme mechanism at atomic resolution. *Science* **294**, 369-374.
- Heinz, F., Lamprecht, W., et Kirsch, J. (1968) Enzymes of fructose metabolism in human liver. *J. Clin. Invest.* **47**, 1826-1832.

- Henze, K., Morrison, H. G., Sogin, M. L., et Müller, M. (1998) Sequence and phylogenetic position of a class II aldolase gene in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Gene* **222**, 163-168.
- Higgs, H. N., Blanchoin, L., et Pollard, T. D. (1999) Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* **38**, 15212-15222.
- Higgs, H. N., et Pollard, T. D. (2000) Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* **150**, 1311-1320.
- Hodel, A., Kim, S.-H., et Brünger, A. T. (1992) Model bias in macromolecular crystal structures. *Acta Cryst.* **A48**, 851-858.
- Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., Hiatt, H. H., et Marks, P. A. (1955) Tetrose phosphate and the formation of sedoheptulose diphosphate. *J. Biol Chem.* **212**, 827-836.
- Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B., et Simon, M. C. (2003) Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9163-9174.
- Irvine, R. F., et Schell, M. J. (2001) Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 327-338.
- Iyengar, R., et Rose, I. A. (1981) Concentration of activated intermediates of the fructose-1,6-bisphosphate aldolase and triosephosphate isomerase reactions. *Biochemistry* **20**, 1223-1229.
- Izzo, P., Costanzo, P., Lupo, A., Rippa, E., Paoletta, G., et Salvatore, F. (1988) Human aldolase A gene. Structural organization and tissue-specific expression by multiple promoters and alternate mRNA processing. *Eur. J. Biochem.* **174**, 569-578.
- Jacobshagen, S., et Schnarrenberger, C. (1988) Two Class I Aldolases in the Green Alga *Chara foetida* (Charophyceae). *Plant Physiol.* **87**, 78-82.
- Jean, J. C., Rich, C. B., et Joyce-Brady, M. (2006) Hypoxia results in an HIF-1-dependent induction of brain-specific aldolase C in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**, L950-L956.
- Jewett, T. J., et Sibley, L. D. (2003) Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol. Cell.* **11**, 885-894.

- Jiang, Z. Y., Chawla, A., Bose, A., Way, M., et Czech, M. P. (2002) A phosphatidylinositol 3-kinase-independent insulin signaling pathway to N-WASP/Arp2/3/F-actin required for GLUT4 glucose transporter recycling. *J. Biol. Chem.* **277**, 509-515.
- Kaletta-Gmünder, U., Wolf, H. P., et Leuthardt, F. (1957) Über Aldolasen. 2. Mitteilung. Chromatographische Trennung von 1-Phosphofruktaldolase und Diphosphofruktaldolase der Leber. *Helv. Chim. Acta* **40**, 1027-1032.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S. et al. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Kao, A. W., Noda, Y., Johnson, J. H., Pessin, J. E., et Saltiel, A. R. (1999) Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* **274**, 17742-17747.
- Karkhoff-Schweizer, R., et Knull, H. R. (1987) Demonstration of tubulin-glycolytic enzyme interactions using a novel electrophoretic approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 827-831.
- Keleti, T., Ovadi, J., et Batke, J. (1989) Kinetic and physico-chemical analysis of enzyme complexes and their possible role in the control of metabolism. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **53**, 105-152.
- Kim, J. H., Lee, S., Kim, J. H., Lee, T. G., Hirata, M., Suh, P. G., et Ryu, S. H. (2002) Phospholipase D2 directly interacts with aldolase via Its PH domain. *Biochemistry* **41**, 3414-3421.
- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., et Rosen, M. K. (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151-158.
- Kirchhausen, T. (1998) Wiskott-Aldrich syndrome: a gene, a multifunctional protein and the beginnings of an explanation. *Mol. Med. Today* **4**, 300-304.
- Kiri, A., et Goldspink, G. (2002) RNA-protein interactions of the 3' untranslated regions of myosin heavy chain transcripts. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 119-129.

- Koop, D. R., et Casazza, J. P. (1985) Identification of ethanol-inducible P-450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. *J. Biol. Chem.* **260**, 13607-13612.
- Koppitz, B., Vogel, F., et Mayr, G. W. (1986) Mammalian aldolases are isomer-selective high-affinity inositol polyphosphate binders. *Eur. J. Biochem.* **161**, 421-433.
- Krymkiewicz, N. (1973) Reactions of methylglyoxal with nucleic acids. *FEBS Lett.* **29**, 51-54.
- Kuo, D. J., et Rose, I. A. (1985) Chemical trapping of complexes of dihydroxyacetone phosphate with muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* **24**, 3947-3952.
- Lafrance-Vanasse, J., et Sygusch, J. (2007) Carboxy-Terminus Recruitment Induced by Substrate Binding in Eukaryotic Fructose Bis-phosphate Aldolases. *Biochemistry* **46**, 9533-9540.
- Leavitt, S., et Freire, E. (2001) Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 560-566.
- Lebherz, H. G., et Rutter, W. J. (1973) A class I (Schiff base) fructose diphosphate aldolase of prokaryotic origin. Purification and properties of *Micrococcus aerogenes* aldolase. *J. Biol. Chem.* **248**, 1650-1659.
- Lehninger, A. L., Sice, J., et Jensen, E. V. (1955) Effect of substrate structure on the aldolase equilibrium. *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 285-287.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., et Aepfelbacher, M. (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9648-9653.
- Lo, T. W., Westwood, M. E., McLellan, A. C., Selwood, T., et Thornalley, P. J. (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* **269**, 32299-32305.
- London, J. (1974) Variations in the quaternary structure of three lactic acid bacteria aldolases. Evidence for the existence of a class I and class II aldolase in *Lactobacillus casei*. *J. Biol. Chem.* **249**, 7977-7983.

- Lorentzen, E., Siebers, B., Hensel, R., et Pohl, E. (2005) Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* **44**, 4222-4229.
- Low, P. S., Allen, D. P., Zioncheck, T. F., Chari, P., Willardson, B. M., Geahlen, R. L., et Harrison, M. L. (1987) Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. *J. Biol. Chem.* **262**, 4592-4596.
- Lu, H., Forbes, R. A., et Verma, A. (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 23111-23115.
- Lu, M., Holliday, L. S., Zhang, L., Dunn, W. A. Jr., et Gluck, S. L. (2001) Interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. *J. Biol. Chem.* **276**, 30407-30413.
- Lu, M., Sautin, Y. Y., Holliday, L. S., et Gluck, S. L. (2004) The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **279**, 8732-8739.
- Lu, M., Ammar, D., Ives, H., Albrecht, F., Gluck, S. L. (2007) Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J. Biol. Chem.* **282**, 24495-24503.
- Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* **192**, 189-221.
- Lundmark, R., et Carlsson, S. R. (2003) Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components. *J. Biol. Chem.* **278**, 46772-46781.
- Lundmark, R., et Carlsson, S. R. (2004) Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *J. Biol. Chem.* **279**, 42694-42702.
- Lyles, G. A., et Chalmers, J. (1992) The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1409-1414.
- Machesky, L. M., et Insall, R. H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **8**, 1347-1356.

- Maire, P., Gautron, S., Hakim, V., Gregori, C., Mennecier, F., et Kahn, A. (1987) Characterization of three optional promoters in the 5' region of the human aldolase A gene. *J. Mol. Biol.* **197**, 425-438.
- Mamczur, P., Dus, D., et Dzugaj, A. (2007) Colocalization of aldolase and FBPase in cytoplasm and nucleus of cardiomyocytes. *Cell Biol. Int.* **31**, 1122-1130.
- Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D., et Higgs, H. N. (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 76-82.
- Marsh, J. J. et Lebherz, H. G. (1992) Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 110-113.
- Maughan, D. W., Henkin, J. A., et Vigoreaux, J. O. (2005) Concentrations of glycolytic enzymes and other cytosolic proteins in the diffusible fraction of a vertebrate muscle proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1541-1549.
- Maurady, A., Zdanov, A., de Moissac, D., Beaudry, D., et Sygusch, J. (2002) A conserved glutamate residue exhibits multifunctional catalytic roles in D-fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *J. Biol. Chem.* **277**, 9474-9483.
- Medugno, L., Costanzo, P., Lupo, A., Monti, M., Florio, F., Pucci, P., et Izzo, P. (2003) A novel zinc finger transcriptional repressor, ZNF224, interacts with the negative regulatory element (AldA-NRE) and inhibits gene expression. *FEBS Lett.* **534**, 93-100.
- Medugno, L., Florio, F., De Cegli, R., Grosso, M., Lupo, A., Costanzo, P., et Izzo, P. (2005) The Kruppel-like zinc-finger protein ZNF224 represses aldolase A gene transcription by interacting with the KAP-1 co-repressor protein. *Gene* **359**, 35-43.
- Melher, A. H., et Bloom, B. (1963) Interaction between rabbit muscle aldolase and dihydroxyacetone phosphate. *J. Biol. Chem.* **238**, 105-107.
- Mehler, A. H., et Cusic, M. E. (1967) Aldolase reaction with sugar diphosphates. *Science* **155**, 1101-1103.
- Meyerhof, O., et Lohmann, K. (1934) Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. *Biochem. Z.* **271**, 89-110.

- Meyerhof, O., Lohmann, K., et Schuster, Ph. (1936) Aldolkondensation von Dioxyacetonphosphorsäure mit Acetaldehyd. *Biochem. Z.* **236**, 301-319.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., et Takenawa, T. (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**, 93-96.
- Minaschek, G., Groschel-Stewart, U., Blum, S., et Bereiter-Hahn, J. (1992) Microcompartmentation of glycolytic enzymes in cultured cells. *Eur. J. Cell Biol.* **58**, 418-428.
- Misset, O., et Opperdoes, F. R. (1984) Simultaneous purification of hexokinase, class-I fructose-bisphosphate aldolase, triosephosphate isomerase and phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **144**, 475-483.
- Misset, O., Bos, O. J., et Opperdoes, F. R. (1986) Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. *Eur. J. Biochem.* **157**, 441-453.
- Model, P., Ponticorvo, L., et Rittenberg, D. (1968) Catalysis of an oxygen-exchange reaction of fructose 1,6-diphosphate and fructose 1-phosphate with water by rabbit muscle aldolase. *Biochemistry* **4**, 1339-1347.
- Morris, A. J., et Tolan, D. R. (1993) Site-directed mutagenesis identifies aspartate 33 as a previously unidentified critical residue in the catalytic mechanism of rabbit aldolase A. *J. Biol. Chem.* **268**, 1095-1100.
- Morris, A. J., et Tolan, D. R. (1994) Lysine-146 of rabbit muscle aldolase is essential for cleavage and condensation of the C3-C4 bond of fructose 1,6-bis(phosphate). *Biochemistry* **33**, 12291-12297.
- Munger, C. (2002) Mécanisme enzymatique de la fructose 1,6-bisphosphate aldolase de muscle de lapin : Étude du rôle des sérines 271 et 300 du site actif. *Mémoire de Maîtrise*, Université de Montréal, Qc, Canada.
- Munnich, A., Besmond, C., Darquy, S., Reach, G., Vaulont, S., Dreyfus, J. C., et Kahn, A. (1985) Dietary and hormonal regulation of aldolase B gene expression. *J. Clin. Invest.* **75**, 1045-1052.
- Murthy, S. N., Liu, T., Kaul, R. K., Kohler, H. et Steck, T. L. (1981) The aldolase-binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH2 terminus of band 3. *J. Biol. Chem.* **256**, 11203-11208.

- Navarro-Lerida, I., Martinez Moreno, M., Roncal, F., Gavilanes, F., Albar, J. P., et Rodriguez-Crespo, I. (2004) Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8. *Proteomics* **4**, 339-346.
- O'Reilley, G., et Clarke, F. (1993) Identification of an actin binding region in aldolase. *FEBS Lett.* **321**, 69-72.
- Okada, M., Hatakeyama, T., Itoh, H., Tokuta, N., Tokumitsu, H., Kobayashi, R. (2004) S100A1 is a novel molecular chaperone and a member of the Hsp70/Hsp90 multichaperone complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 4221-4233.
- Orosz, F., Christova, T. Y., et Ovadi, J. (1988) Modulation of phosphofructokinase action by macromolecular interactions. Quantitative analysis of the phosphofructokinase-aldolase-calmodulin system. *Biochim. Biophys. Acta* **957**, 293-300.
- Otwinowski, Z., et Minor, W. (1997) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Ouporov, I. V., Knull, H. R., Huber, A., et Thomasson, K. A. (2001) Brownian dynamics simulations of aldolase binding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and the possibility of substrate channeling. *Biophys. J.* **80**, 2527-2535.
- Ovadi, J., et Keleti, T. (1978) Kinetic evidence for interaction between aldolase and D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **85**, 157-161.
- Penhoet, E., Rajkumar, T., et Rutter, W. J. (1966) Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **56**, 1275-1282.
- Penhoet, E. E., Kochman, M., et Rutter, W. J. (1969) Molecular and catalytic properties of aldolase C. *Biochemistry* **8**, 4396-4402.
- Penhoet, E. E., et Rutter, W. J. (1971) Catalytic and immunochemical properties of homomeric and heteromeric combinations of aldolase subunits. *J. Biol. Chem.* **246**, 318-323.
- Perrotta, S., Borriello, A., Scaloni, A., De Franceschi, L., Brunati, A. M., Turrini, F., Nigro, V., del Giudice, E. M., Nobili, B., Conte, M. L., et al. (2005) The N-terminal 11 amino acids of human erythrocyte band 3 are critical for aldolase binding and protein phosphorylation: implications for band 3 function. *Blood* **106**, 4359-4366.

- Peterson, J. R., Bickford, L. C., Morgan, D., Kim, A. S., Ouerfelli, O., Kirschner, M. W., et Rosen, M. K. (2004) Chemical inhibition of N-WASP by stabilization of a native autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 747-755.
- Phillips, S. A., et Thornalley, P. J. (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* **212**, 101-105.
- Plaumann, M., Pelzer-Reith, B., Martin, W. F., et Schnarrenberger, C. (1997) Multiple recruitment of class-I aldolase to chloroplasts and eubacterial origin of eukaryotic class-II aldolases revealed by cDNAs from *Euglena gracilis*. *Curr. Genet.* **31**, 430-438.
- Pompliano, D. L., Peyman, A., et Knowles, J. R. (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **29**, 3186-3194.
- Ray, B. D., Harper, E. T., et Fife, W. K. (1983) Carbon-13 NMR evidence of carbinolamine formation at the active site of an imine-forming aldolase. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3731-3732.
- Ray, S., et Ray, M. (1981) Isolation of methylglyoxal synthase from goat liver. *J. Biol. Chem.* **256**, 6230-6233.
- Richard, J. P. (1984) Acid-base catalysis of the elimination and isomerization reactions of triose phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 4926-4936.
- Richards, O. C., et Rutter, W. J. (1961) Comparative properties of yeast and muscle aldolase. *J. Biol. Chem.* **236**, 3185-3192.
- Riddle, V., et Lorenz, F. W. (1968) Nonenzymic, polyvalent anion-catalyzed formation of methylglyoxal as an explanation of its presence in physiological systems. *J. Biol. Chem.* **243**, 2718-2724.
- Rohatgi, R., Ho, H. Y., et Kirschner, M. W. (2000) Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* **150**, 1299-1310.
- Ronai, Z., Robinson, R., Rutberg, S., Lazarus, P., et Sardana, M. (1992) Aldolase-DNA interactions in a SEWA cell system. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**, 20-28.

- Rose, I. A., Warms, J. V. B., et Kuo, D. J. (1987) Concentration and partitioning of intermediates in the fructose bisphosphate aldolase reaction. Comparison of the muscle and liver enzymes. *J. Biol. Chem.* **262**, 692-701.
- Rose, I. A., O'Connell, E. L., et Mehler, A. H. (1965) Mechanism of the aldolase reaction. *J. Biol. Chem.* **240**, 1758-1765.
- Rose, I. A., et Warms, J. V. B. (1985) Complexes of muscle aldolase in equilibrium with fructose 1,6-bisphosphate. *Biochemistry* **24**, 3952-3957.
- Rose, I. A. (1958) The absolute configuration of dihydroxyacetone phosphate tritiated by aldolase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5835-5836.
- Rutter, W. J. (1964) Evolution of Aldolase. *Fed. Proc.* **23**, 1248-1257.
- Rutter, W. J., Richards, O. C., et Woodfin, B. M. (1961) Comparative studies of liver and muscle aldolase. I. Effect of carboxypeptidase on catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **236**, 3193-3197.
- Sanchez de Jiminez, E., Lee, E., Torres, J., et Soberon, G. (1964) On the mechanism of the effect of ionic strength on crystalline aldolase activity. *J. Biol. Chem.* **239**, 4154-4158.
- Schnarrenberger, C., Herbert, M., et Kruger, I. (1983) Intracellular compartmentation of isozymes of sugar phosphate metabolism in green leaves. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* **8**, 23-51.
- Schneider, M. L., et Post, C. B. (1995) Solution structure of a band 3 peptide inhibitor bound to aldolase: a proposed mechanism for regulating binding by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* **34**, 16574-16584.
- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., et Wang, G. L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **269**, 23757-23763.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., et Giallongo, A. (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529-32537.

- Shin, N., Lee, S., Ahn, N., Kim, S. A., Ahn, S. G., YongPark, Z., et Chang, S. (2007) Sorting nexin 9 interacts with dynamin 1 and N-WASP and coordinates synaptic vesicle endocytosis. *J. Biol. Chem.* **282**, 28939-28950.
- Siebers, B., Brinkmann, H., Dorr, C., Tjaden, B., Lilie, H., van der Oost, J., et Verhees C. H. (2001) Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase. *J. Biol. Chem.* **276**, 28710-28718.
- Skala, H., Porteu, A., Thomas, M., Szajnert, M. R., Okazawa, H., Kahn, A., et Phan-Dinh-Tuy, F. (1998) Upstream elements involved in vivo in activation of the brain-specific rat aldolase C gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 31806-31814.
- Srivastava, D. K., et Bernhard, S. A. (1986) Enzyme-enzyme interactions and the regulation of metabolic reaction pathways. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 1-68.
- St-Jean, M., Lafrance-Vanasse, J., Liotard, B., et Sygusch J. (2005) High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit. *J. Biol. Chem.* **280**, 27262-27270.
- St-Jean, M., Izard, T., et Sygusch, J. (2007) A hydrophobic pocket in the active site of glycolytic aldolase mediates interactions with Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 14309-14315.
- St-Jean, M., et Sygusch, J. (2007) Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **282**, 31028-31037.
- Stauffer, J. K., Colbert, M. C., et Ciejek-Baez, E. (1990) Nonconservative utilization of aldolase A alternative promoters. *J. Biol. Chem.* **265**, 11773-11782.
- Stefanizzi, I., et Canete-Soler, R. (2007) Coregulation of light neurofilament mRNA by poly(A)-binding protein and aldolase C: implications for neurodegeneration. *Brain Res.* **1139**, 15-28.
- Strapazon, E., et Steck, T. L. (1976) Binding of rabbit muscle aldolase to band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **15**, 1421-1424.
- Stribling, D., et Perham, R. N. (1973) Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from *Escherichia coli* (Crookes' strain). *Biochem. J.* **131**, 833-841.

- Sumner, J. B. (1926) The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. Preliminary Paper. *J. Biol. Chem.* **69**, 435-441.
- Sygyusch, J. et Beaudry, D. (1997) Allosteric communication in mammalian muscle aldolase. *Biochem. J.* **327**, 717-720.
- Sygyusch, J., Beaudry, D., et Allaire, M. (1987) Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7846-7850.
- Takahashi, I., Takasaki, Y., et Hori, K. (1989) Site-directed mutagenesis of human aldolase isozymes: the role of Cys-72 and Cys-338 residues of aldolase A and of the carboxy-terminal Tyr residues of aldolases A and B. *J. Biochem.* **105**, 281-286.
- Takahashi, K. (1968) The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* **243**, 6171-6179.
- Takahashi, K. (1977a) The reactions of phenylglyoxal and related reagents with amino acids. *J. Biochem. (Tokyo)* **81**, 395-402.
- Takahashi, K. (1977b) Further studies on the reactions of phenylglyoxal and related reagents with proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* **81**, 403-414.
- Taylor, J. F., Green, A. A., et Cori, G. T. (1948) Crystalline aldolase. *J. Biol. Chem.* **173**, 591-604.
- Thomas, M., Makeh, I., Briand, P., Kahn, A., et Skala, H. (1993) Determinants of the brain-specific expression of the rat aldolase C gene: ex vivo and in vivo analysis. *Eur. J. Biochem.* **218**, 143-151.
- Thomson, G. J., Howlett, G. J., Ashcroft, A. E. et Berry, A. (1998) The dhna gene of *Escherichia coli* encodes a class I fructose bisphosphate aldolase. *Biochem. J.* **331**, 437-445.
- Thornalley, P. J. (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **14**, 287-371.
- Thornalley, P. J. (1995) Advances in glyoxalase research. Glyoxalase expression in malignancy, anti-proliferative effects of methylglyoxal, glyoxalase I inhibitor diesters and S-D-lactoylglutathione, and methylglyoxal-modified protein binding and endocytosis by the advanced glycation endproduct receptor. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **20**, 99-128.

- Topper, Y. J., Mehler, A. H., et Bloom, B. (1957) Spectrophotometric evidence for formation of a dihydroxyacetone phosphate-aldolase complex. *Science* **126**, 1287.
- Trombetta, G., Balboni, G., di Iasio, A., et Grazi, E. (1977) On the stereospecific reduction of the aldolase-fructose 1,6 bisphosphate complex by NaBH₄. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 1297-1301.
- Volker, K. W., et Knull, H. R. (1993) Glycolytic enzyme-tubulin interactions: role of tubulin carboxy terminals. *J. Mol. Recognit.* **6**, 167-177.
- Volker, K. W., Reinitz, C. A., et Knull, H. R. (1995) Glycolytic enzymes and assembly of microtubule networks. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **112**, 503-514.
- Volker, K. W., et Knull, H. R. (1997) A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **338**, 237-243.
- von Ruckmann, B., et Schubert, D. (2002) The complex of band 3 protein of the human erythrocyte membrane and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: stoichiometry and competition by aldolase. *Biochim. Biophys. Acta* **1559**, 43-55.
- Walsh, J. L., Keith, T. J. et Knull, H. R. (1989) Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* **999**, 64-70.
- Walsh, J. L., et Knull, H. R. (1988) Heteromeric interactions among glycolytic enzymes and of glycolytic enzymes with F-actin: effects of poly(ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 83-91.
- Wang, J., Morris A. J., Tolan D. R., et Pagliaro, L. (1996) The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* **271**, 6861-6865.
- Warburg, O. (1930) The metabolism of tumors. Constable, London.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314.
- Wierenga, R. K. (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* **492**, 193-198.
- Williams, H. S. (1904) A History of Science. Volume IV: Modern Development of the Chemical and Biological Sciences. Harper and Brothers (New York), 102-140.

- Witke, C., et Götz, F. (1993) Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding the class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* **175**, 7495-7499.
- Wu, L. (2006) Is methylglyoxal a causative factor for hypertension development? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**, 129-139.
- Xu, Y., Zheng, Y., Fan, J. S., et Yang, D. (2006) A new strategy for structure determination of large proteins in solution without deuteration. *Nat. Methods* **3**, 931-937.
- Yankeelov, J. A., Mitchell, C. D., et Crawford, T. H. (1968) A simple trimerization of 2,3-butanedione yielding a selective reagent for the modification of arginine in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1664-1666.
- Yarar, D., Waterman-Storer, C. M., et Schmid, S. L. (2007) SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev. Cell* **13**, 43-56.
- Zhang, D., Kiyatkin, A., Bolin, J. T., et Low, P. S. (2000) Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood* **96**, 2925-2933.
- Zimmer, D. B., Wright Sadosky, P., et Weber, D. J. (2003) Molecular mechanisms of S100-target protein interactions. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 552-559.
- Zimmer, D. B., et Van Eldik, L. J. (1986) Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **261**, 11424-11428.