

Université de Montréal

Étude structurale de la fructoselysine 6-kinase d'*Escherichia coli* : reconnaissance
de substrats et mécanisme enzymatique

par

Guillaume Arthus-Cartier

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de maîtrise en biochimie

Décembre, 2009

Copyright, Guillaume Arthus-Cartier, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude structurale de la fructoselysine 6-kinase d'*Escherichia coli* : reconnaissance
de substrats et mécanisme enzymatique

Présenté par :
Guillaume Arthus-Cartier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jim Omichinski
Président-rapporteur

Jurgen Sygusch
Directeur de recherche

Myrek Cygler
Membre du jury

Résumé

Quelques enzymes sont connus pour déglyquer les kétoamines résultants de la réaction de Maillard entre des sucres et des amines primaires. Il a été démontré qu'*Escherichia coli* possède un opéron afin de métaboliser la fructose- ϵ -lysine. La fructose- ϵ -lysine 6-kinase, de la famille des PfkB, initie le processus de déglycation permettant l'utilisation ultérieure du glucose-6-P par la bactérie. La résolution de la structure de la FL6K par cristallographie et diffraction des rayons X a permis d'identifier son site actif en présence d'ATP, d'ADP et d'AMP-PNP. La modélisation de la fructose- ϵ -lysine au site actif de la kinase a permis d'identifier des résidus pouvant être importants pour sa liaison et son mécanisme enzymatique. De plus, les résultats de cinétique suggèrent que le mécanisme utilisé par la FL6K semble passer par un état ternaire de type S_N2 . Des modifications structurales à la FL6K pourraient permettre d'augmenter la taille des substrats afin de permettre ultimement la déglycation de protéines.

Déglycation, fructose- ϵ -lysine 6-kinase, fructose- ϵ -lysine, PfkB, métabolisme, mécanisme enzymatique.

Abstract

Some enzymes have been found to deglycate the products of the Maillard reaction between sugars and primary amines: ketoamines. An operon is found in *Escherichia coli* that allows the growth on fructose- ϵ -lysine media. The deglycation process is done by a kinase and a “deglycase”. The fructose- ϵ -lysine 6-kinase, a member of the PfkB family, phosphorylates its substrate on the sixth carbon to initiate the metabolism of fructose- ϵ -lysine. Here are presented x-ray crystallography structures obtained for the fructose- ϵ -lysine 6-kinase in its native form and bound with ATP, ADP and AMP-PNP. The active site of the kinase has been determined, and modelisation of fructose- ϵ -lysine allowed identification of some residues that might be important for the specific binding of the substrate and the enzymatic mechanism. Kinetic results tend to suggest a S_N2 mechanism for the phosphorylation catalyzed by the enzyme. Structural modifications of the FL6K could help to increase the size of the substrates recognized by the enzyme until it binds glycated proteins.

Deglycation, fructose- ϵ -lysine 6-kinase, fructose- ϵ -lysine, PfkB, metabolism, enzymatic mechanism.

Table des Matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
DÉDICACE	XIII
REMERCIEMENTS	XIV
INTRODUCTION	15
Modification de protéines	15
Glycation	16
Déglycation et métabolisme des kétoamines	19
Kétoamine-3-kinases	19
Amadoriases	22
Opéron <i>frl</i>	23
Hypothèse	27
Objectifs	28

MATÉRIEL ET MÉTHODES	29
Construction gène FL6K et sous-clonage	29
Expression de la FL6K	30
Purification de la FL6K	31
Cristallisation de la FL6K	33
Diffraction des rayons-X	34
SeMet-FL6K	35
SAD	36
Phasage et analyse des données	36
Structure en condition citrate	37
Structure avec ligand	37
Synthèse de la fructose- ϵ -lysine	38
Essai cinétique	38
RÉSULTATS	40
Expression, purification et caractérisation de la FL6K	40
Cristallisation	42
Résolution de la structure de la FL6K	44
FL6K en condition citrate	49
Caractérisation du site actif : interaction avec des nucléotides	51
Site de liaison de la fructose- ϵ -lysine	55

Mécanisme bi-substrats	56
DISCUSSION	58
Caractérisation de la FL6K et cristallisation	58
Structure de la FL6K	59
Site de liaison de l'ATP	60
Site hypothétique de la FL	62
Mécanisme enzymatique	66
Amélioration et suite du projet	68
CONCLUSION	71
BIBLIOGRAPHIE	72
ANNEXES	XIV
Annexe 1	xiv
Annexe 2	xv

Liste des tableaux

Tableau I. Statistiques de la collection des données et de l'affinement des structures

Liste des figures

Figure 1. Étape de la glycation.

Figure 2. Action de la FN3K sur la fructose- ϵ -lysine.

Figure 3. Réaction d'oxydation catalysée par la FAOX sur les fructosamines.

Figure 4. Métabolisme de la fructose- ϵ -lysine chez *E. coli*.

Figure 5. Gel SDS-PAGE représentant l'évolution de la purification de la FL6K.

Figure 6. Détermination des paramètres cinétiques de la FL6K pour la FL.

Figure 7. Photographie d'un cristal de FL6K.

Figure 8. Patron de diffraction de rayons X typique d'un cristal de FL6K.

Figure 9. Modèle de la FL6K obtenu par SAD dans les conditions de $MgSO_4$.

Figure 10. Modélisation de la FL6K dans les conditions de cristallographie de citrate : instabilité de certaines sous-unités.

Figure 11. Vues stéréo du site actif de la FL6K en présence de différents nucléotides.

Figure 12. Superposition des sous-unités B en présence et en absence d'ATP.

Figure 13. Vue globale de la cavité du site actif de la FL6K en présence d'ATP.

Figure 14. Cinétique enzymatique de la FL6K avec différentes concentrations en FL et en ATP : deux mécanismes possibles.

Figure 15. Alignement de séquence de la FL6K avec d'autres kinases de la famille PfkB.

Figure 16. Alignement structural de la FL6K avec d'autres kinases PfkB, comparaison de leurs sites actifs, et modélisation de la FL.

Figure 17. Site hypothétique de liaison de la fructose- ϵ -lysine dans la FL6K.

Figure 18. Mécanisme enzymatique proposé pour la FL6K.

Liste des sigles et abréviations

3DG	3-déoxyglucosone
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN codant
ADP	Adénosine diphosphate
AGE	<i>advanced glycation end-products</i>
AMP-PNP	Adénosine 5'-(β,γ -imido)triphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
ATP γ S	Adénosine 5'-[γ -thio]triphosphate
DTT	Dithiothréitol
FAD	flavine adénine dinucléotide
FAOX	fructosamine oxidasés
FL	fructose- ϵ -lysine
FL6K	fructoselysine 6-kinase
FN3K	fructosamine 3-kinase
FN3K-RP	FN3K- <i>related protein</i>

HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PEP	phosphoénolpyruvate
PK	Pyruvate kinase
PMSF	<i>phenylmethanesulphonylfluoride</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
rpm	rotation par minute
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TRIS	trishydroxyméthylaminométhane

Dédicace

Ce mémoire n'aurait jamais vu le jour aussi « rapidement » sans le support et les encouragements soutenus de ma famille, et particulièrement de ma petite Marie.

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Sygusch pour la confiance que vous avez eue en moi, la liberté que vous m'avez laissée, et votre emballement scientifique contagieux. Également, je tiens à remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour l'appui financier qu'il m'a octroyé. Un merci particulier aux différents membres du laboratoire du Dr Sygusch que j'ai appris à connaître et à apprécier. À Miguel SJ., pour son mentorat rigoureux. À Mathieu C. pour son esprit critique, son support constant, et notre complicité inoubliable. À Clotilde LK. pour son entraide ainsi que pour les discussions techniques et amicales que nous avons eues. À Natasha H. pour sa participation au projet. Et finalement, à Laurent C., Annie D., Emanuelle F. et Julien LV. pour leur présence et leur aide.

Introduction

Modification de protéines

Les diverses molécules dans la nature interagissent constamment entre elles. Les macromolécules du vivant sont aussi promptes à des réactions secondaires avec des molécules environnantes (radicaux libres, molécules électrophiles) (1), ainsi qu'à certains phénomènes physiques (rayons UV ou X) (2). Le vivant a donc établi différents mécanismes de réparation de ces biomolécules afin d'en préserver l'intégrité. Il est admis intuitivement qu'il s'agit de dispositifs nécessaires dans le cas de l'ADN puisqu'elle contient dans ses gènes tout le nécessaire au maintien de la vie.

Cependant, il apparaît moins important de réparer les protéines ou les lipides puisque ceux-ci peuvent être détruits et reconstruits par la machinerie cellulaire sur demande. Cette façon de faire entraîne par contre une dépense relativement élevée en énergie (surtout pour les protéines). Ainsi, certains mécanismes de réparation de protéines ont été mis à jour dernièrement. Il y a tout d'abord la réduction des résidus méthionines sulfoxyde par les méthionine sulfoxyde réductases (3,4). Un autre exemple est la *protein-isoaspartyl-methyltransferase* capable de réparer les résidus isoaspartyl présents dans les protéines (5). Finalement, la découverte de kinases catalysant la déglycation des

groupements amines des protéines ayant réagis avec des sucres a permis d'identifier de nouveaux mécanismes de déglycation.

Glycation

La glycation peut être décrite comme étant le procédé non-enzymatique par lequel les sucres réducteurs réagissent avec les amines primaires des macromolécules biologiques. Il y a entre autres les chaînes latérales des lysines et arginines et le N-terminal des protéines (6), les bases azotées purines de l'ADN ainsi que les aminophospholipides (7). La glycation est en fait une partie de ce qu'on appelle la réaction de Maillard (dommages cellulaires causés par des composés carbonylés réactifs). La réaction de Maillard entraîne à long terme la formation de produits terminaux de glycation avancée (AGE). Ces AGEs causent différents troubles et complications dans certaines maladies; principalement le diabète (8), mais aussi l'arthrite ou l'Alzheimer par exemple (9).

La réaction de glycation s'effectue en deux étapes (Figure 1). Il y a tout d'abord condensation entre l'amine primaire et le groupement carbonyle d'un sucre (sous sa forme linéaire), ce qui mène à la formation d'une base de Schiff. Il s'ensuit lentement un réarrangement d'Amadori (10) qui résulte en un produit plus stable, la kétoamine.

Plusieurs facteurs jouent un rôle lors de la réaction de glycation. Le premier est la concentration des sucres et des amines, comme dans toute réaction.

Ainsi, plus la concentration d'un sucre est élevée, plus il sera propice à interagir avec les amines primaires libres. Étant donné que le glucose est présent abondamment dans la nature, il a été rapidement considéré comme un des agents de glycation (11,12). Cependant, comme la réaction s'effectue avec la forme linéaire du sucre, la proportion de la forme acyclique par rapport à la forme linéaire joue un rôle tout aussi important. Cela étant différent pour chaque sucre, certains comme le fructose et le ribose seront des cibles plus faciles (11). Finalement, le groupement aldéhyde étant plus électrophile qu'un groupement cétone, les amines primaires interagiront davantage avec les aldoses (glucose, galactose, ribose) que les cétooses (fructose, sorbose) (11).

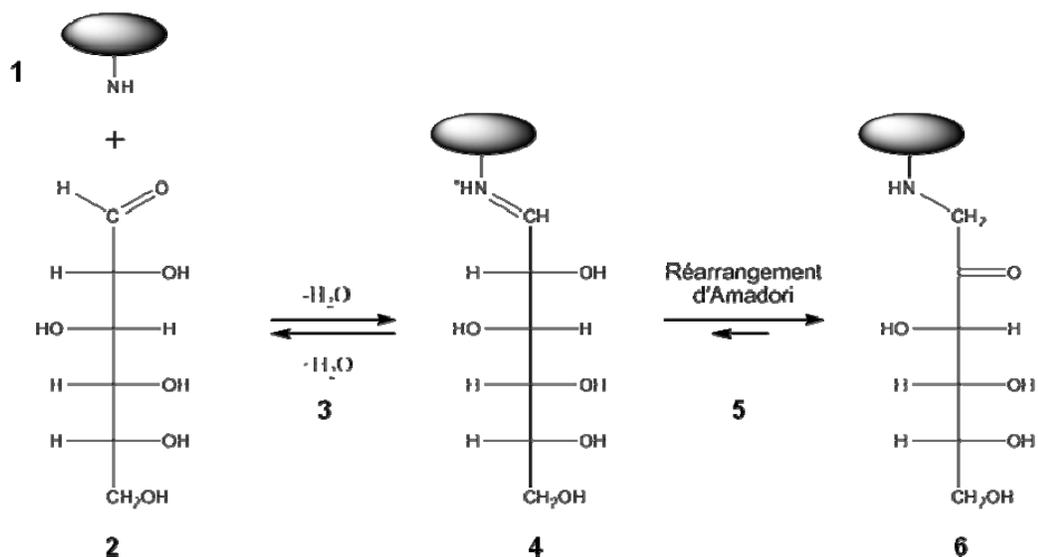


Figure 1. Étape de la glycation. L'amine primaire 1 et le sucre 2 linéarisé forment, par une réaction de condensation 3, une base de Schiff 4. Survient ensuite un réarrangement d'Amadori 5 produisant en définitive une kétoamine 6. Modifié de (13)

Mis à part le glucose, d'autres cétooses sont aussi présumés être d'importants agents de glycation de part leur plus grande réactivité. Ainsi, le ribose-5-P et le ribose ont été considérés pour cette raison (11,14). De plus, le glucose-6-P est lui aussi un candidat possible puisqu'il est cinq fois plus réactif que le glucose (13).

Les sucres réducteurs présents chez le vivant sont donc aptes à réagir avec les lysines, les arginines et les extrémités N-terminal des protéines. Toutefois, l'acétylation des extrémités N-terminal de certaines protéines cytosoliques d'eucaryotes aide à empêcher sa glycation (15). Dépendamment de la perméabilité des cellules, et des tissus chez les pluricellulaires, aux différents sucres, certaines protéines seront plus sujettes à la glycation. Ainsi, l'hémoglobine présente dans les globules rouges est une cible connue de glycation servant de mesure de la concentration sanguine de glucose intégrale sur une période de temps (16). Environ 5 % de l'ensemble des hémoglobines sont glyquées chez les sujets de glycémie normale (13). Par contre, les histones, qui possèdent de nombreuses lysines pouvant être acétylées et méthylées, ne semblent pas être une cible de glycation *in vivo*, malgré que des histones purifiées peuvent être glyquées *in vitro* (17).

Une hétérogénéité entre les résidus glyqués *in vitro* et *in vivo* de l'hémoglobine a été un des signes initiateurs de l'existence d'enzyme permettant la déglycation des protéines (18). Différentes autres enzymes ont aussi été mises à jour comme étant capables de métaboliser les kétoamines.

Déglycation et métabolisme des kétoamines

Kétoamine-3-kinases

La première classe d'enzymes identifiés jouant un rôle dans le métabolisme des kétoamines a été les kétoamine-3-kinases humaines (originellement nommées fructosamine-3-kinase (FN3K) et fructosamine-3-kinase related protein (FN3K-RP)) (20,21). Elles partagent 65 % d'identité de séquence entre elles (21). Comme leur nom l'indique, elles peuvent phosphoryler en présence d'ATP les kétoamines sur leur carbone 3 (Figure 2). Cela entraîne alors la décomposition spontanée de la

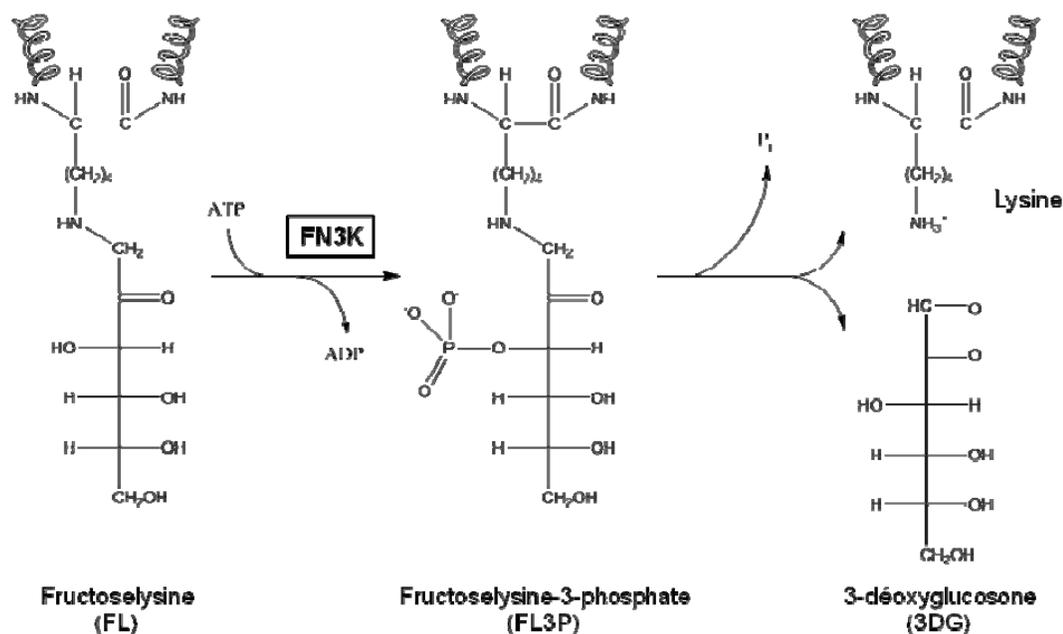


Figure 2. Action de la FN3K sur la fructose-ε-lysine. La FL est phosphorylée par la FN3K au niveau de son C3. Il y a ensuite dégradation spontanée de la FL3P qui est instable ce qui libère du 3DG, du Pi, et la lysine intacte. Copié de (19).

kétoamine-3-P due à son instabilité, et permet à l'amine primaire d'être recréée (22). Leur principale caractéristique est leur capacité de phosphoryler les kétoamines liées aux protéines (20), ce qui laisse présager une fonction de réparation des protéines glyquées (23).

Plusieurs orthologues de ces enzymes ont été retrouvés chez d'autres espèces. Il semble que seulement les mammifères et les oiseaux possèdent une copie de chacun des deux enzymes (24). Dans les génomes des poissons, des vers, des plantes et des procaryotes, un seul orthologue a été retrouvé correspondant à la FN3K-RP (24-26). Fait intéressant, contrairement aux kétoamine-3-kinases des autres espèces, celle de *Escherichia coli* ne semble pas posséder d'activité catalytique (26).

Une différence importante entre ces deux enzymes est le type de substrat qu'elles peuvent phosphoryler. Les deux sont aptes de réagir principalement avec la ribulosamine (créée par la condensation du ribose avec une amine) et la psicosamine (formée à partir d'allose). Cependant, seulement le FN3K est capable d'interagir avec la fructosamine qui résulte de la condensation du glucose avec une amine (21). Le fait que beaucoup d'organismes ne possèdent pas d'orthologue de FN3K a permis de se questionner sur la formation du substrat physiologique de la FN3K-RP.

L'allose n'étant pas un sucre physiologique chez la grande majorité des organismes, le substrat principal de la FN3K-RP a été déterminé comme étant la

ribulosamine. Le ribose libre n'étant pas non plus en quantité importante dans les cellules, le ribose-5-P a été suggéré comme étant la source principale des ribulosamines physiologiques. Par contre, la FN3K-RP n'étant pas capable de phosphoryler les ribulosamine-5-P, l'existence de phosphatases capables d'enlever le groupement 5-P nuisible pour l'enzyme a été proposée (25). La découverte de celles-ci a permis de donner plus de poids à l'importance du ribose-5-P dans la glycation et au rôle que la FN3K-RP a à y jouer (27). De plus, la découverte du gène de cette phosphatase associé avec celui de la FN3K-RP chez 11 procaryotes dont *Thermus thermophilus* et *Cytophaga hutchinsonii* semble corroborer le tout (26).

Afin d'évaluer l'importance de ces enzymes chez les mammifères, des souris déficientes en FN3K ont été créées (28). Les souris *FN3K*^{-/-} présentaient un niveau 2,5 fois plus élevé d'hémoglobine glyquée que les souris *FN3K*^{+/+}. De plus, des protéines cytosoliques étaient entre 1,5 à 1,8 fois plus glyquées dans le foie, les reins, le cerveau et les muscles squelettiques des souris *FN3K*^{-/-}. Par ailleurs, la FN3K ne semble pas participer au métabolisme de la fructose-ε-lysine provenant de l'alimentation. Elle participe néanmoins au métabolisme de la fructose-ε-lysine produite de façon endogène.

Amadoriases

Une autre classe d'enzymes retrouvées chez certains micro-organismes a été reportée comme jouant un rôle dans le métabolisme des kétoamines. Il s'agit des Amadoriases qui sont en fait des fructosamine oxidases (FAOX) (30). Contrairement aux kétoamine-3-kinases, elles ne peuvent pas agir sur des protéines glyquées, mais bien seulement sur des molécules de plus petite taille (fructose- ϵ -lysine ou fructose- α -glycine par exemple) (31). Elles ont besoin d'un cofacteur FAD afin d'oxyder la fructosamine et recréer une base de Schiff (Figure 3). L'hydrolyse de la base de Schiff provoque ensuite la libération de l'amine et d'une molécule de glucosone. Il y aussi production de peroxyde d'hydrogène lors de l'oxydation du FADH₂ par l'oxygène moléculaire. De l'ingénierie de protéine a été réalisée dans le but d'augmenter la taille des fructosamines pouvant être déglyquées (32), sans toutefois arriver à oxyder des fructosamines liées à des

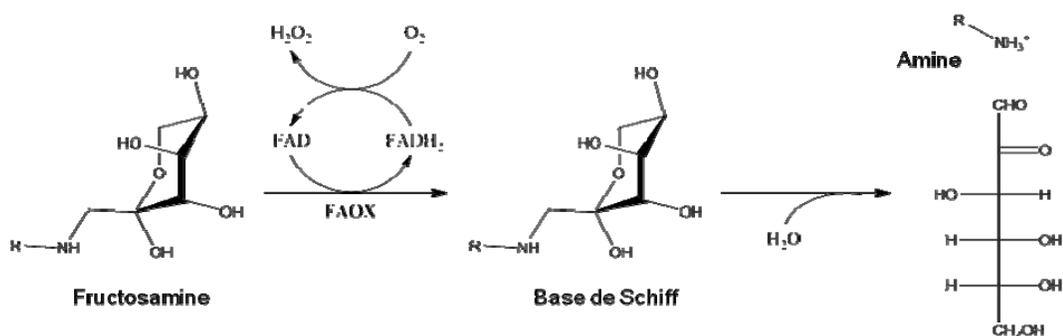


Figure 3. Réaction d'oxydation catalysée par la FAOX sur les fructosamines.

La FAOX capte deux hydrogènes au niveau du lien N-C entre la partie amine et fructosyl à l'aide de son cofacteur FAD. Il y a alors création d'une base de Schiff puis libération de l'amine et de glucosone par hydrolyse. Le FAD est régénéré en présence d'O₂. Modifié de (29).

protéines. Le rôle physiologique des Amadoriases semble être la déglycation des acides aminés glyqués (29). Elles sont capables d'oxyder autant la fructose- ϵ -lysine, la fructose- α -glycine ou la fructose- α -valine. Aucune donnée n'a été publiée par rapport à leur efficacité contre des kétoamines formées à partir de sucres autre que le glucose. Une certaine variation est observée au niveau de la partie amine, mais pas au niveau kétose (groupement fructosyl reconnu uniquement). Il s'agit d'une différence par rapport aux kétoamines 3-kinases qui peuvent phosphoryler différentes kétoamines (ribulosamine, psicosamine).

Opéron *fri*

Finalement, un troisième groupe d'enzymes a été découvert en rapport avec le métabolisme des fructosamines. Il ne s'agit pas toutefois d'une classe d'enzymes catalysant la même réaction mais bien d'un opéron au complet qui semble exister afin de métaboliser la fructose- ϵ -lysine chez *Escherichia coli* (33). Il est constitué de cinq protéines distinctes : un transporteur membranaire de la fructose- ϵ -lysine (prédiction) (FrlA), la fructose- ϵ -lysine-6-phosphate déglycase (FrlB), la fructose- ϵ -lysine 3-épimérase (FrlC), la fructose- ϵ -lysine 6-kinase (FrlD) et un régulateur transcriptionnel liant l'ADN (prédiction) (FrlR) (33). Il a d'ailleurs été démontré qu'*E. coli* était capable de croître avec comme unique source d'énergie la fructose- ϵ -lysine (33). La fructose- ϵ -lysine peut donc être

considéré comme une source d'énergie potentielle pour cette bactérie si elle est présente.

Il semble que cet opéron se retrouve également chez *Bacillus subtilis*, ayant un substrat légèrement différent : les acides aminés α -fructosyl (33,34). Il n'est toutefois pas présent chez les eucaryotes.

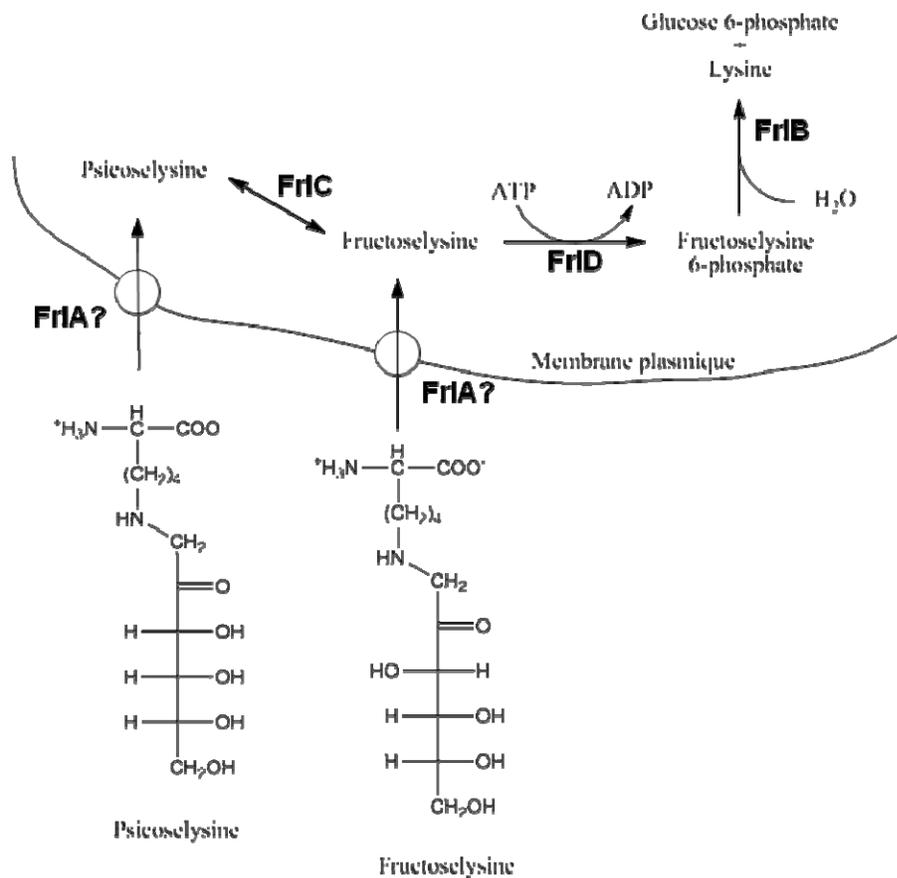


Figure 4. Métabolisme de la fructose- ϵ -lysine chez *E. coli*. Le transporteur FrlA permettrait l'entrée du substrat dans le cytosol. L'épimérase FrlC permet de modifier la psicose- ϵ -lysine en fructose- ϵ -lysine qui est ensuite phosphorylée par la kinase FrlD. La fructose- ϵ -lysine-6-P est ensuite déglyquée par la déglycase FrlB. Copié de (35).

Le rôle du régulateur FrlR serait de permettre l'expression de l'ensemble de l'opéron en présence de fructose- ϵ -lysine, et de l'inhiber en son absence. Cela permettrait l'expression du transporteur membranaire FrlA menant à l'incorporation de la fructose- ϵ -lysine (Figure 4). L'épimérase étant située dans le cytosol, il semble très plausible que le transporteur puisse aussi permettre l'absorption de psicoselysine (35). Son rôle reste cependant à être confirmé, tout comme celui du régulateur. L'importance de l'allose dans la nature étant assez limitée, certaines questions demeurent quant à l'utilité de l'épimérase FrlC. Inversement, le fait qu'*E. coli* puisse vivre en présence uniquement de psicoselysine suggère que ce substrat a pu être important pour la bactérie au cours de son évolution (35).

La fructose- ϵ -lysine dans le cytosol peut ensuite être phosphorylée au niveau du C6 par la fructose- ϵ -lysine 6-kinase (FL6K)(33). Il s'agit d'une enzyme de la famille PfkB qui utilise l'ATP pour phosphoryler un alcool primaire. Elle possède un K_m de 18 μ M pour la fructose- ϵ -lysine et de 50 μ M pour l'ATP (33). De plus, il a été observé par RMN ^{31}P que la partie fructosyl de la fructose- ϵ -lysine-6-P adoptait une conformation furanose, suggérant une conformation similaire pour le substrat de la kinase. La FL6K a une affinité très faible pour la fructose- α -glycine (80 mM), et presque nulle pour le fructose libre.

L'étape suivant la phosphorylation est réalisée par la fructose- ϵ -lysine-6-P déglycase (33). Elle catalyse l'hydrolyse de la fructose- ϵ -lysine-6-P en glucose-6-P

et lysine; réaction inverse de la glycation (condensation et réarrangement d'Amadori). La déglycase a un K_m de 400 μM pour son substrat, et, contrairement à la FL6K, la réaction de la déglycase est réversible. Cependant la constante d'équilibre mesurée semble indiquer un déséquilibre en faveur de la réaction de déglycation (33).

L'existence de cet opéron pourrait être importante pour *E. coli* en raison de l'environnement qu'elle occupe. En effet, la bactérie est reconnue comme faisant partie de la flore intestinale. Il a été observé qu'une faible partie (10 %) de la fructose- ϵ -lysine ingérée par des patients se retrouvait dans leurs excréments (36). De plus, la fructose- ϵ -lysine mis en contact avec des excréments est tranquillement consommée, et ne l'est plus en présence d'antibiotique (36). Par ailleurs, la fructose- ϵ -lysine et la glucose- ϵ -lysine sont très abondantes dans différents fruits et légumes, représentant environ 7 % de leur masse (37). Ces observations consolident l'idée que l'opéron *frl* permet à *Escherichia coli* de métaboliser la fructose- ϵ -lysine.

Hypothèse

Deux des mécanismes de déglycation impliquent des kinases afin de déglyquer les kétoamines. De plus, les kétoamine 3-kinases sont capables d'agir sur les protéines, ce que la FL6K ne fait pas. Il est donc intéressant de se demander comment la FL6K, la FN3K et la FN3K-RP reconnaissent leurs substrats, et quelles distinctions structurales de la FL6K l'empêchent de phosphoryler les fructosamines liées aux protéines. Étant donné que la FL6K semble avoir évolué différemment des kétoamine 3-kinases, il est fort probable que sa structure tridimensionnelle soit différente afin de phosphoryler le carbone 6 de son substrat plutôt que le carbone 3.

Objectifs

Afin d'en connaître davantage sur la reconnaissance de son substrat, la structure de la FL6K devra être résolue par cristallographie/diffraction des rayons-X. Ces différents substrats (ATP, fructose- ϵ -lysine) pourront ensuite être utilisés pour déterminer le site actif de la FL6K et ses résidus importants. Différents analogues des substrats pourront être utilisés pour élucider le mécanisme de l'enzyme.

Éventuellement, les structures des kétoamine 3-kinases devront aussi être résolues afin de les comparer avec celle de la FL6K. La détermination de leurs résidus importants pourra être réalisée de la même façon que pour la FL6K. Une fois ces éléments connus, la comparaison entre les structures pourra possiblement permettre de modifier la FL6K pour qu'elle puisse agir sur les protéines glyquées présentant des résidus lysines glyquée à leur surface.

Matériel et Méthodes

Construction gène FL6K et sous-clonage

La séquence d'ADNc de la FL6K d'*Escherichia coli* a été synthétisée par la compagnie Genscript après optimisation des codons en vue de son expression dans *E. coli*. L'optimisation des codons a pour but d'utiliser les ARNt les plus fréquents de l'organisme hôte en vue d'améliorer l'efficacité de traduction. Lors de la synthèse, un site de restriction de *NdeI* a été ajouté en amont de l'ADNc, en plus d'un codon STOP (TAA) suivi d'un site *HindIII* en aval. Une double digestion enzymatique du plasmide obtenu contenant l'ADNc de la FL6K avec les enzymes *HindIII* et *NdeI* (ratio 1U pour 2U) de chez Fermentas a été réalisée à 37°C pendant 3 heures dans le tampon Rouge de Fermentas. La même digestion a été effectuée avec le plasmide pET21a en vue d'y insérer l'ADNc de la FL6K (sans *His-tag*). Les produits de digestions ont été séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. La bande d'ADN équivalent à l'ADNc de la FL6K et la bande d'ADN du vecteur pET21a linéarisé ont ensuite été extraites de l'agarose et purifiées avec le kit *QIAquick Gel Extraction* de chez Qiagen. L'insert et le vecteur ont ensuite été reliés par ligation avec l'enzyme *T4 DNA Ligase* de chez Fermentas à différents ratios insert/vecteur (1/1, 3/1 et 6/1) selon les directives de Fermentas. Les produits de ligation ont été utilisés ensuite pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen) par choc

thermique à 42°C. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur pétris de LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline mis à 37°C pour la nuit. Différents clones ont alors été sélectionnés, et leur vecteur pET21-FL6K a été extrait grâce au kit *QIAprep Spin Miniprep* de Qiagen puis envoyé séquencer à la plateforme de séquençage de l'IRIC afin de vérifier la présence de l'insert dans le vecteur.

Expression de la FL6K

Le plasmide pET21-FL6K contenant l'ADNc du gène de la FL6K sous contrôle de l'opéron *Lac* a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* BL21(DE3)-pLys compétentes (Invitrogen) par la méthode de choc thermique. Les bactéries ayant incorporé le plasmide pET21-FL6K ont ensuite été sélectionnées sur pétris LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline (Bioshop) mis à 37°C. Afin de vérifier leur expression de FL6K à l'aide d'une lyse bactérienne, quelques colonies ayant poussés ont été piquées pour inoculer chacune 50 mL de LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline mis à 37°C avec agitation (250 rpm). L'expression de la FL6K a été induite avec 0,5 mM IPTG (Bioshop) lorsque l' A_{600nm} a atteint 0,5-0,6; les clones ont été laissés toute la nuit à température pièce à 250 rpm. Des échantillons (environ 2 mL) avant et après induction, en quantité de bactéries équivalente, ont été utilisés pour la lyse bactérienne.

Les bactéries ont été culotées par centrifugation, le surnageant enlevé et les culots resuspendus dans 100 µL de tampon TES (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 EDTA 1

mM et 15 % sucrose), et laissés 10 minutes à température pièce. Ensuite, 20 μ L de solution lysozyme fraîchement préparée à 25 mg/ml dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 EDTA 1 mM) ont été ajoutés puis laissés incuber à température pièce 15 minutes. Puis, 30 μ L de tampon TE contenant 0,3% de Triton X-100 ont été ajoutés et laissés incuber à température pièce 15 minutes. Le tout a alors été centrifugé à 12000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant et le culot ont été mis séparément sur un gel SDS-PAGE 12,5% acrylamide, le culot étant simplement resuspendu dans H₂O. Le clone semblant exprimer le plus la FL6K a alors été utilisé pour être exprimé en grande quantité.

Le clone choisi a été utilisé pour inoculer 1 L de milieu LB à 37°C; l'expression de la FL6K a été induite lorsque l' A_{600nm} atteint 0,5-0,7 en ajoutant de l'IPTG à concentration finale de 0,5 mM. La culture a été laissée à température pièce toute la nuit à 250 rpm. Le lendemain, les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 7000 rpm pendant 10 minutes (4°C), et le culot a été mis à -80°C s'il n'était pas utilisé immédiatement pour être purifié.

Purification de la FL6K

Pour extraire les protéines des bactéries, la technique du broyage a été utilisée. À l'aide d'un mortier et pilon mis sur glace, le culot de bactérie, auquel le double d'oxyde d'aluminium (Sigma) en quantité a été ajouté, a été broyé pendant trois fois 2 minutes. Puis 250 U de DNase (Amersham) a été ajouté par gramme de

bactérie. Le tout a de nouveau été broyé trois fois 2 minutes. Ensuite, environ 75 mL de tampon de lyse (HEPES 25 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, Glycérol 5 %, DTT 5 mM, PMSF 0,5 mM) ont été ajoutés au broyat, et le tout centrifugé 45 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Afin de laisser agir la DNase, le broyat a été laissé sur glace pendant 30 minutes.

Le broyat a été ensuite appliqué sur 40 mL de résine compactée DEAE Sepharose Fast Flow (GE) préalablement équilibrée avec du tampon DEAE (HEPES 25 mM pH 7,1, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Le *flow through* a été récupéré et la résine lavée avec 200 mL de tampon DEAE. Un gradient de NaCl a ensuite été appliqué par palier de 50 mM (50 mL par palier), allant de 50 mM à 300 mM. Un gel SDS-PAGE 12,5% a été réalisé pour déterminer les fractions contenant la FL6K. Les fractions ont alors été mises à dialyser pour la nuit à 4°C contre trois fois 3 L de tampon Phényl-A (Tris 25 mM pH 8,0, (NH₄)₂SO₄ 0,75 M).

Le dialysat a alors été appliqué sur une colonne *Hi-Prep Phenyl Sepharose 16/10* (GE) préalablement équilibrée avec le tampon Phényl-A. La colonne a été lavée avec le tampon Phényl-A jusqu'à ce que l' $A_{280\text{nm}}$ soit nulle. Un gradient décroissant en (NH₄)₂SO₄ de 0,75 à 0 M en 200 mL a été alors appliqué afin de faire décrocher la FL6K de la colonne hydrophobe. Les fractions contenant la FL6K ont été déterminées à l'aide d'un gel SDS-PAGE 12,5 % et mises à dialyser contre le tampon de précipitation (Tris 100 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 5 mM et (NH₄)₂SO₄ 90 %) pendant une nuit à 4°C.

Le précipitât a été récupéré le lendemain et centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Le surnageant a été alors retiré, puis le précipitât solubilisé dans le tampon TENaCl (Tris 50 mM pH7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM). Ensuite, le tout a été injecté sur un tamis moléculaire *Hi Load 16/60 Superdex 200 prep grade* (GE) qui a été préalablement équilibré avec le tampon TENaCl. Cela permet de séparer les protéines par leur poids moléculaire, donc les protéines autres que la FL6K, ainsi que les agrégats de FL6K qui auraient pu se former.

Cristallisation de la FL6K

La FL6K purifiée après filtration sur gel a été ensuite dialysée contre le tampon de cristallisation (Tris 20 mM pH 7,0) 3 fois 1 L. La FL6K a été alors concentrée en utilisant des filtres Amicon Ultra MWCO 10 000 (Millipore) jusqu'à une concentration de 10 ou 20 mg/ml. La concentration de FL6K a été déterminée à l'aide d'un essai BCA (Pierce) en utilisant l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme courbe étalon.

La FL6K concentrée à 10 et 20 mg/ml a été utilisée pour faire des tests de cristallisation à grande échelle afin de tester une gamme de conditions disponibles. Pour ce faire, les kits Clear Strategy I et II (Molecular Dimensions), JBScreen Classic HTS I et II et JBScreen Kinase (Jena Bioscience), et SaltRx (Hampton Research) ont été utilisés avec des plaques 96 puits permettant l'utilisation de la méthode par goutte assise de 1 µL se basant sur le principe de diffusion de vapeur.

De ces 576 conditions testées, deux conditions ont permis la cristallogenèse dans le kit JBScreen Classic HTS II. La première condition consistait en 1,4 M MgSO₄ 0,1 M MES pH 6,5; tandis que la seconde était 0,7 M Na-Citrate 0,1 M Na-HEPES pH 7,5. Ces conditions ont été répétées et optimisées dans des plaques 24 puits (goutte pendante), en utilisant un volume équivalent de protéine et de solution du réservoir.

Afin de tester d'avantages de conditions, la protéine FL6K concentrée à 10 mg/ml a été envoyée au *Center for High-Throughput Structural Biology* au Hauptman-Woodward Institute (Buffalo, NY) qui peut tester 1536 conditions à la fois.

Diffraction des rayons-X

Le pouvoir de diffraction des rayons-X des cristaux de FL6K a été testé grâce à un générateur Bruker AXS. Les tests ont aussi permis de déterminer les conditions de cryoprotection de 20 % glycérol. Afin d'obtenir des données de meilleure résolution, des cristaux de FL6K obtenus dans la condition de MgSO₄ ont été montés dans des loupes de nylon, cryoprotégés et congelés dans un jet d'azote liquide à 100 K, puis montés au faisceau X26c au synchrotron du Brookhaven National Laboratory (Upton, NY). La collecte a été réalisée sur 180° avec un accroissement de 0,5°. Les données ont été traitées avec le programme HKL2000 (38).

Le serveur BioInfoBank Meta Server (<http://meta.bioinfo.pl>) a été utilisé pour déterminer le meilleur modèle pour réaliser un remplacement moléculaire (39). Le programme PHENIX AutoMR a été utilisé pour réaliser le remplacement moléculaire sans succès (40). Un autre essai a été tenté grâce au serveur CASPR du CNRS (<http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Caspr2/index.cgi>), mais encore une fois sans succès (41).

SeMet-FL6K

Afin d'exprimer la FL6K contenant des sélénométhionines (SeMet-FL6K) plutôt que des méthionines, le clone exprimant la FL6K décrit ci-haut a été utilisé dans du milieu minimal M9 contenant 100 µg/ml d'ampicilline supplémenté de thiamine (0,5 mg/L) et de FeSO₄ (4 mg/L) à 37°C jusqu'à une A_{600nm} de 0,3 (42). Puis, les acides aminés suivants ont été ajoutés : L-lysine (Fisher)(100 mg/L), L-phénylalanine (Fisher)(100 mg/L), L-thréonine (Fisher)(100 mg/L), L-isoleucine (Fisher)(50 mg/L), L-leucine (Fisher)(50 mg/L), L-valine (Fisher)(50 mg/L) et L-sélénométhionine (Sigma)(50 mg/L) (43). Après 15 minutes d'attente afin d'inhiber la voie de synthèse de la méthionine de la souche utilisée, l'expression de la SeMet-FL6K a été induite et s'est poursuivie comme décrit précédemment pour la FL6K native.

La purification a été réalisée comme pour l'enzyme native avec quelques changements mineurs : tous les tampons ont été dégazés, et la concentration en

DTT dans les différents tampons a été augmentée à 10 mM. La SeMet-FL6K a été cristallisée dans les mêmes conditions que la native et a résulté en des cristaux isomorphes à ceux de la native. L'incorporation de sélénométhionines dans la SeMet-FL6K a été vérifiée par analyse LC-MS/MS. à la plateforme de Protéomique de l'Institut de recherche en immunologie et cancérologie.

SAD

Un cristal de SeMet-FL6K a été monté, comme précédemment décrit, sur le faisceau X25 afin de procéder à une collecte de type *Single-wavelength Anomalous Dispersion* (SAD). La longueur d'onde optimale (12,6662 eV ou 0,9789 Å) pour la collection des données a été déterminée en réalisant un spectre de fluorescence des rayons X pour le sélénium (maximum de la f''). Le détecteur ADSC Q315 CCD a été mis à une distance de 412,6 mm du cristal. La collecte a été réalisée sur 180° avec un accroissement de 0,5° et un temps d'exposition de 2 s; un dédoublement des données a été réalisé pour collecter les paires de Friedel par tranche de 20°. Les données ont été traitées à l'aide du programme HKL2000 (38).

Phasage et analyse des données

La détermination des phases initiales a été réalisée à l'aide du programme AutoSol de PHENIX utilisant SOLVE/RESOLVE et PHASER (40). Avec ce

résultat et les données de la FL6K native, le programme AutoBuild de PHENIX a été utilisé pour bâtir un model initial de la FL6K (40). Celui-ci a alors été travaillé manuellement à l'aide du programme COOT pour construire les résidus manquants (44). Les affinements des données ont été réalisés à l'aide du programme REFINE de la suite PHENIX (40).

Structure en condition citrate

La structure d'un cristal de FL6K poussé en condition citrate a été obtenue comme décrit précédemment pour la condition $MgSO_4$. La structure résolue en condition $MgSO_4$ a été utilisée pour réaliser un remplacement moléculaire à l'aide du programme AutoMR de PHENIX. L'emplacement de huit sous-unités a été déterminé. Deux autres sous-unités ont été ajoutées manuellement à l'aide des programmes PyMOL et COOT. Les affinements des données ont été ensuite réalisés avec le programme REFINE de PHENIX.

Structure avec ligand

Les cristaux obtenus dans la condition de $MgSO_4$ ont été trempés en présence des molécules suivantes durant le temps indiqué : ATP 1 mM 6 min, ADP 1 mM 9 min, AMP-PNP 2 mM 8 min, $ATP\gamma S$ 1 mM 1 min, FL 1 mM 5 min, ATP 1 mM + FL 1 mM 4 min, et $ATP\gamma S$ 1 mM + FL 1 mM 6 min. Chaque cristal a ensuite été cryoprotégé dans une solution contenant 20 % glycérol. Ces dernières

collectes ont été réalisées sur les faisceaux X25 et X29 du National Synchrotron Light Source (BNL, Upton, NY). Les structures de ces collectes ont été résolues par remplacement moléculaire en utilisant la structure native de la FL6K et ont été affinées grâce à la suite PHENIX (40). Elles ont été modifiées manuellement avec le logiciel COOT (44). Les cartes d'omission (*Omit map*) ont été réalisées en omettant les ligands des structures puis en réalisant un affinement avec un faible chauffage (500 K). Elles ont été réalisées vers le début du processus d'affinement pour éviter tout biais. Les différentes images de toutes les structures ont été réalisées avec le logiciel PyMOL (45).

Des tests de cocristallisation ont été tentés en présence de FL6K 10 mg/ml (dans Tris 20 mM pH 7) et d'ATP-Na 1 mM ou d'ATP γ S-Li 1 mM. Cependant, la formation de précipité en présence des molécules a mis fin à la poursuite des tests.

Synthèse de la fructose- ϵ -lysine

La fructose- ϵ -lysine a été synthétisée à partir de N- α -t-BOC-lysine et glucose comme décrit précédemment (46).

Essai cinétique

Les cinétiques pour la FL6K ont été réalisées grâce à un essai couplé PK/LDH; la disparition du NADH a été suivie à 340 nm avec un spectromètre

Lambda2 (Perkin-Elmer). Le tampon utilisé pour l'essai avait la composition suivante : 25 mM HEPES pH 7,1, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Chaque essai contenait les différents substrats suivants : 0,25 mM PEP, 0,15 mM NADH, 10 µg/ml pyruvate kinase de muscle de lapin (Roche) et 5 µg/ml lactate déshydrogénase de muscle de lapin (Roche).

Résultats

Expression, purification et caractérisation de la FL6K

L'expression de la FL6K a été réalisée comme décrit précédemment par Wiame et al. (33) avec quelques modifications. La purification a aussi été inspirée de Wiame et al. mais avec quelques étapes supplémentaires afin d'augmenter le degré de pureté de la FL6K (Figure 5). En plus de la colonne DEAE, l'étape de

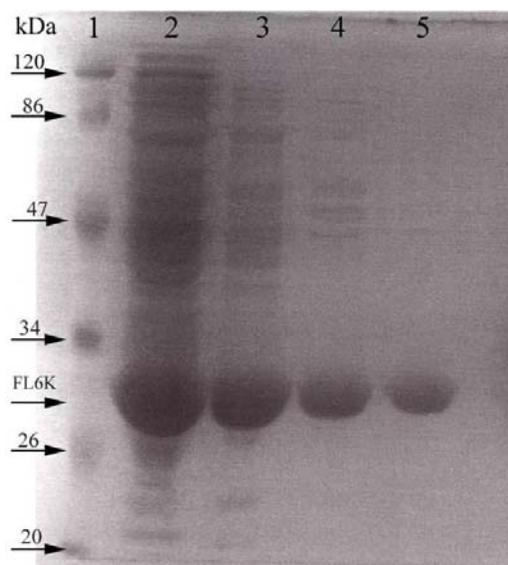


Figure 5. Gel SDS-PAGE représentant l'évolution de la purification de la FL6K. Gel SDS-PAGE 12,5 % révélé au bleu de Coomassie; 10 μ L d'extrait protéique par puits. **Colonne 1** : Poids moléculaire *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). **Colonne 2** : Extrait cellulaire après broyage. **Colonne 3** : Dialysat après colonne DEAE. **Colonne 4** : Dialysat après colonne Phényl. **Colonne 5** : Dialysat après colonne Gel filtration (avant cristallographie).

Phényl-Sépharose a permis d'éliminer une bonne partie des protéines non-désirées. Enfin, le tamis moléculaire a enlevé les dernières impuretés restantes en plus d'éliminer les agrégats de FL6K qui auraient pu se former tout au long de la purification, nuisant ainsi à la cristallisation de la FL6K. Pour un litre de bactéries, une quantité avoisinant 30 mg de FL6K purifiée était généralement obtenue. Son poids moléculaire sur gel SDS-PAGE correspondait à environ 28 kDa comme il était attendu. De plus, le poids moléculaire en solution obtenu sur colonne *Hi Load 16/60 Superdex 200 prep grade* confirmait sa forme monomérique comme l'avait mentionné Wiame et al. (33).

La FL6K fraîchement purifiée a été utilisée pour déterminer ses paramètres cinétiques pour la fructose- ϵ -lysine à l'aide d'un essai PK/LDH (Figure 6). Les

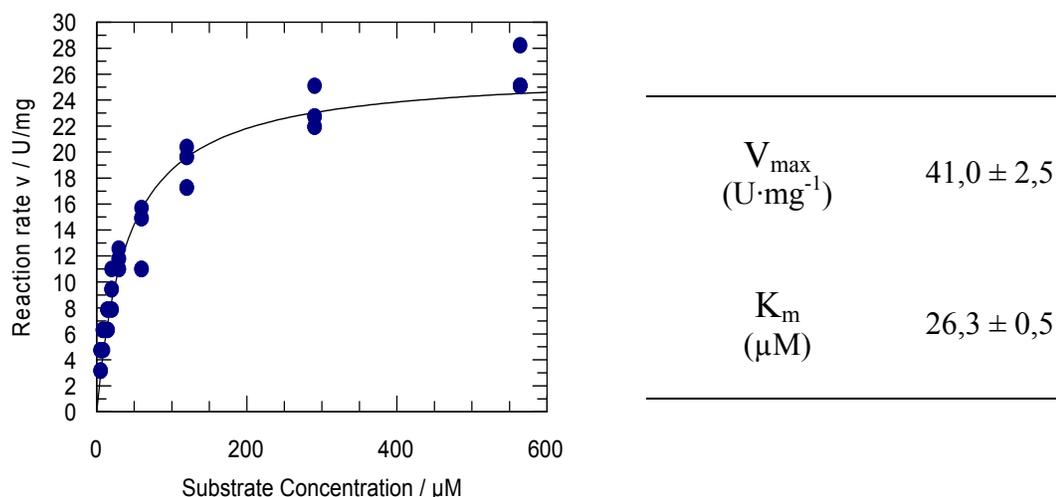


Figure 6. Détermination des paramètres cinétiques de la FL6K pour la FL. Les essais cinétiques ont été réalisés en triplicata avec une concentration fixe d'ATP de 1 mM et 0,06 μg de FL6K. L'analyse graphique a été réalisée avec le logiciel Grafit 5, et les paramètres cinétiques ont été calculés par ce même logiciel.

valeurs pour le V_{\max} et le K_m sont respectivement de $41,0 \pm 2,5$ U/mg et $26,3 \pm 0,5$ μ M en présence de 1 mM ATP. Les données ont été produites en triplicata.

Cristallisation

Afin d'obtenir la structure de la FL6K, plusieurs kits de cristallographie ont été testés pour déterminer des conditions de cristallisation de la FL6K. Deux concentrations de FL6K ont été utilisées lors de la cristallographie, soit 5 et 10 mg/mL. Une première observation a été que la FL6K précipitait presque constamment dans les conditions contenant du polyéthylène glycol (PEG), peu importe le poids moléculaire. De plus, en présence de sels comme agents précipitants, la FL6K ne précipitait pas autant, bien qu'un peu plus de la moitié des conditions testées fassent précipiter la FL6K à 10 mg/ml.

Deux conditions ont permis de produire des cristaux de façon répétée : la première étant 1,4 M $MgSO_4$ 0,1 M MES pH 6,5, et la seconde 0,7 M Na-Citrate 0,1 M Na-HEPES pH 7,5. Des tests de cristallisation ont aussi été réalisés à la plateforme de cristallisation du Hauptman-Woodward Institute (Buffalo, NY), mais sans résultat significatif autre que ceux mentionnés ci-haut.

Afin d'évaluer la qualité des cristaux, leur pouvoir de diffraction a été testé avec une source de rayons X maison. En plus de s'assurer qu'il s'agissait de protéines, cela a permis de déterminer les conditions de cryoprotection nécessaires (20 % glycérol).

Les cristaux de la première condition (MgSO_4) étaient obtenus en deux temps et en deux formes différentes. Il y avait initialement une forme cristalline cylindrique vrillée qui possède un pouvoir de diffraction très faible. Puis, une deuxième forme cristalline en plaquette pousse à partir du centre de nucléation d'un cristal de la première forme. La plaquette pousse généralement tout autour de

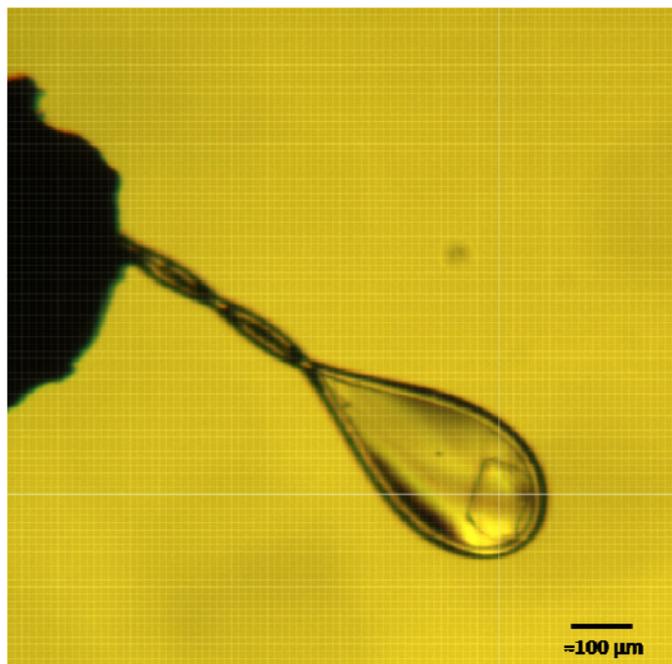


Figure 7. Photographie d'un cristal de FL6K. Le cristal a été obtenu dans la condition de MgSO_4 , cryoprotégé dans 20 % glycérol, et monté dans une boucle de nylon de 0,5-0,7 mm (Hampton Research). Photographie prise par la caméra au faisceau X25 du NSLS du Brookhaven National Laboratory (Upton, USA).

la forme cristalline primitive. Il en résulte une plaquette qui est fusionnée et transpercée par le cristal initial. Il arrive que plus d'une plaquette poussent à partir du même cristal, au même centre de nucléation. La deuxième forme cristalline a un pouvoir de diffraction supérieur à celui de la première forme. Il faut donc tailler la première forme cristalline qui est incrustée dans la plaquette avant de pouvoir utiliser les cristaux en forme de plaquettes. On peut observer un cristal en forme de plaquette à la Figure 7.

Les cristaux obtenus dans la condition de citrate de sodium sont plus simples, une seule forme cristalline n'étant visible. Ils n'ont pas une forme bien régulière, formant des sortes d'éclats de verre avec des arêtes pointues. De manière générale, ce ne sont pas des cristaux qui possèdent un pouvoir de diffraction très élevé.

Résolution de la structure de la FL6K

Une première collecte de données de la FL6K (condition MgSO_4) a été réalisée au NSLS afin de résoudre la structure par remplacement moléculaire. La Figure 8 présente un patron de diffraction typique pour la FL6K native. Les données ont pu être indexées comme étant un groupe d'espace en C2. Les paramètres de maille sont assez grands, avec environ : $a = 182,3 \text{ \AA}$, $b = 135,0 \text{ \AA}$, $c = 88,9 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 93,9^\circ$ et $\gamma = 90^\circ$. La résolution maximale était de $2,4 \text{ \AA}$ mais les données n'étaient complètes qu'à partir de $2,9 \text{ \AA}$. La structure utilisée pour le

remplacement moléculaire était la 2-kéto-3-déoxygluconate kinase de *Thermus Thermophilus* (pdb 1v19_A) (47), qui possède 24 % de similarité de séquence avec la FL6K, le plus haut pourcentage retrouvé dans les structures déposées. Cependant, le remplacement moléculaire n'a pas permis de résoudre la structure de la FL6K, et la technique de SAD a donc été choisie afin d'obtenir les phases initiales.

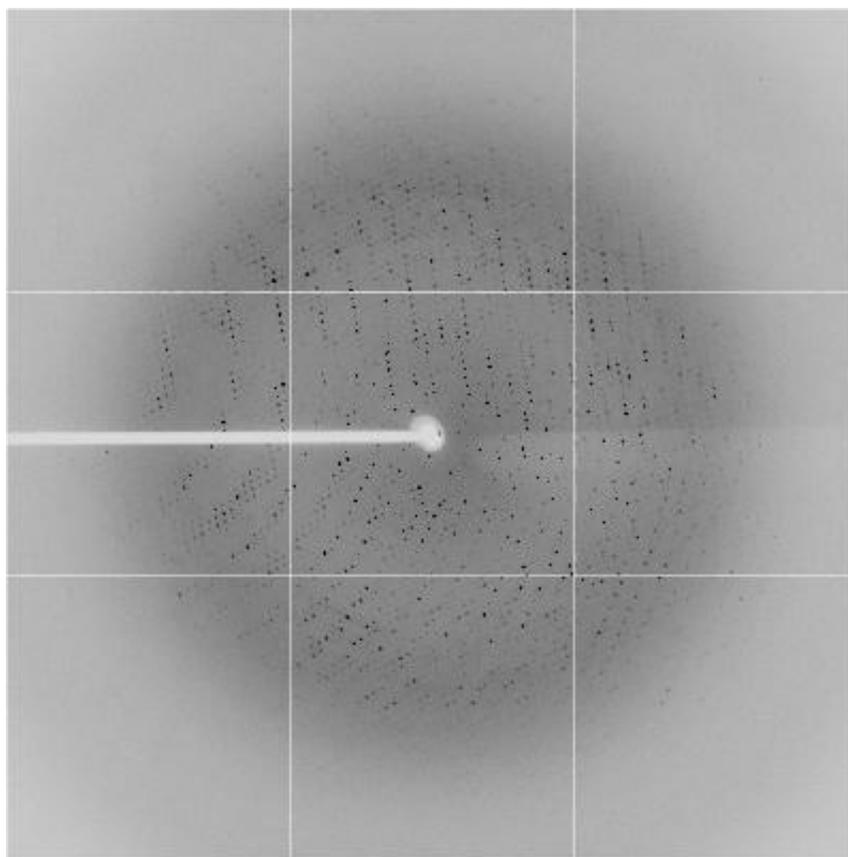


Figure 8. Patron de diffraction de rayons X typique d'un cristal de FL6K. Obtenu au faisceau X25 du NSLS du Brookhaven National Laboratory (Upton, USA) par un détecteur ADSC Q315 CCD avec une oscillation de ϕ de $0,5^\circ$ et un temps d'exposition de 3 sec.. Cristal poussé en condition de $MgSO_4$.

Pour ce faire, l'expression de FL6K contenant des sélénométhionines a été réalisée compte tenu que la FL6K contient six méthionines pour 261 résidus. L'incorporation des sélénométhionines a été vérifiée par spectrométrie de masse. La SeMet-FL6K a ensuite été cristallisée dans la même condition que la FL6K (MgSO_4), et les cristaux obtenus étaient isomorphes à ceux de l'enzyme native. Une collecte de données a été réalisée jusqu'à une résolution de 2,8 Å avec un cristal de SeMet-FL6K à la longueur d'onde du maximum d'absorption du sélénium. Le résumé des caractéristiques de la collecte est décrit dans le Tableau I. Les paramètres de maille obtenus étaient très similaires de ceux de la FL6K native. Le logiciel AutoSolve a permis de solutionner des phases initiales afin de bâtir un premier modèle structural avec AutoBuild.

Une seconde collecte de la FL6K native de meilleure qualité a aussi été obtenue (Tableau I). Ces nouvelles données ont permis d'améliorer et compléter manuellement la structure de la FL6K native. L'unité asymétrique se compose de 6 sous-unités comme le montre la Figure 9, ce qui représente un V_m de 3,21 Å³/Da et un pourcentage de solvant de 61,7 % (48,49). La FL6K est un membre de la famille des kinases PfkB (33). Leur caractéristique structurale propre est la présence d'un domaine α/β de liaison à l'ATP. Ce domaine chez FL6K est composé de neuf brins β entourés de huit hélices α . Il s'agit d'un feuillet de brins β presque entièrement parallèles à l'exception d'un seul. Un deuxième feuillet surplombe le feuillet principal et est composé de quatre brins β . L'écart-type moyen de la déviation calculée entre chaque sous-unité est de 0,365 Å. La

différence la plus notable entre les sous-unités est le positionnement du C-terminal qui peut adopter deux conformations. De plus, huit ions SO_4^{2-} sont présents interagissant avec une seule sous-unité, ou deux parfois.

Tableau I. Statistiques de la collection des données et de l'affinement des structures.

	FL6K- SeMet	FL6K	FL6K- ATP	FL6K- ADP	FL6K- AMP- PNP	FL6K
Condition cristallographique	MgSO ₄	Citrate				
Collection des données						
Résolution (Å)	50 - 2,8	50 - 2,4	50 - 2,2	50 - 2,85	50 - 2,7	50 - 2,08
Longueur d'onde (Å)	0,9789	0,9795	0,9795	1,0809	1,0809	0,9792
Réflexions						
Observées	300292	315645	579481	195131	217635	774943
Uniques	95422	84455	107652	57911	58810	219769
Complétude (%)	91,8 (60)	99,9 (100)	100 (100)	99,6 (99,6)	99,8 (99,5)	97,7 (88,3)
Moyenne I/σ(I)	7,2 (1,1)	11,4 (1,4)	12,6 (1,2)	7,7 (1,2)	11,7 (1,1)	17,7 (2,0)
R _{sym} [§]	0,155 (0,594)	0,110 (0,905)	0,111 (0,946)	0,120 (0,893)	0,103 (0,950)	0,058 (0,465)
Groupe d'espace	C 1 2 1	C 1 2 1	C 1 2 1	C 1 2 1	C 1 2 1	C 1 2 1
Paramètres de maille						
A (Å)	181,421	182,271	180,097	179,341	179,754	186,360
b (Å)	135,039	134,976	135,335	134,624	135,696	132,332
c (Å)	88,735	88,903	88,793	88,613	88,769	156,104
α (°)	90	90	90	90	90	90
β (°)	94,23	93,94	93,89	94,11	93,69	118,37
γ (°)	90	90	90	90	90	90
Affinement						
Nombre d'atomes						
Protéine	-	11127	11080	10742	11033	18199
Eau	-	1337	517	211	451	1040
Hétéro	-	40	343	174	315	-
σ cutoff; I/σ(I)	-	1	1	1	1	1
R _{cryst} (%) [‡]	-	21,8	19,8	23,9	20,3	22,8
R _{free} (%) [†]	-	23,7	24,3	28,2	25,5	25,2
Rms deviation						
Longueur lien (Å)	-	0,002	0,007	0,002	0,004	0,002
Angle (°)	-	0,556	1,131	0,643	0,785	0,661
B moyen (Å ²)	-	32,98	27,75	44,25	43,21	33,10
Analyse Ramachandran[¶]						
Favorable (%)	-	97,89	97,74	95,50	96,10	96,77
Aberrant (%)	-	0	0,07	0,29	0,21	0,04
Score MolProbability (100 ^{ème} percentile étant le meilleur)	-	97 ^{ème}	87 ^{ème}	95 ^{ème}	96 ^{ème}	83 ^{ème}
Courbe de Luzzati (Å) ^ε	-	0,37	0,34	0,44	0,39	0,33

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données de la couche à plus haute résolution.

[§]R_{sym} = $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - I_c(hkl)| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ pour *i* prenant valeur pour chaque observation indépendante de réflexion hkl.

[‡]R_{cryst} = $\sum_{hkl} ||I_o(hkl) - I_c(hkl)|| / \sum_{hkl} I_o(hkl)$.

[†]R_{free} = $\sum_{hkl \in T} ||I_o(hkl) - I_c(hkl)|| / \sum_{hkl \in T} I_o(hkl)$, où T est un ensemble de données test sélectionnées au hasard parmi l'ensemble des réflexions avant l'affinement. Les données test n'ont pas été utilisées lors des affinements et contenaient 8% de l'ensemble des réflexions uniques pour chaque collecte.

[¶]Analyse effectuée par Molprobability (50).

^εAnalyse effectuée par le logiciel SFCHECK (51).

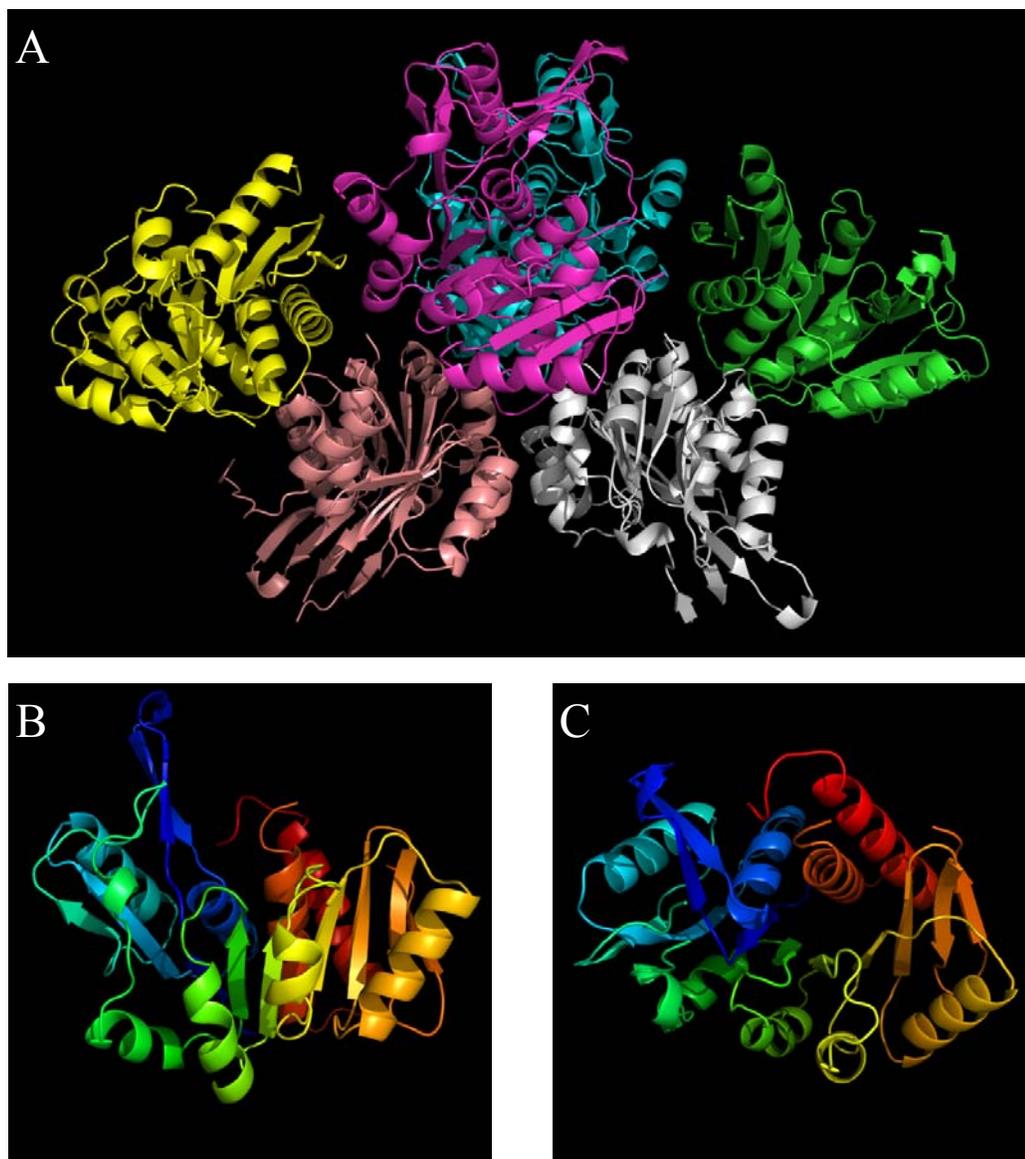


Figure 9. Modèle de la FL6K obtenu par SAD dans les conditions de MgSO_4 . *A.* Vue des six sous-unités de l'ensemble de l'unité asymétrique de la FL6K. *B.* Vue latérale d'une des sous-unités de la FL6K. *C.* Vue du haut de la même sous-unité. Les images ont été réalisées avec le logiciel PyMOL (45). Pour *B* et *C*, le N-terminal est en bleu et le C-terminal en rouge.

FL6K en condition citrate

Collecter de bonnes données pour les cristaux poussés en condition citrate a été beaucoup plus ardu. Ces cristaux possédant un pouvoir de diffraction assez médiocre en général (résolution maximale 5-7 Å), il a fallu en tester plusieurs avant de trouver un cristal de bonne qualité (résolution ~2 Å). Les données ont été indexées en C2, et les paramètres de maille obtenus ressemblent quelque peu à ceux en condition MgSO₄, à l'exception de la dimension c qui est presque le double et de l'angle β qui est plus ouvert.

Afin de résoudre cette structure dans les conditions de citrate, un remplacement moléculaire a été réalisé à l'aide de la structure de FL6K obtenue précédemment dans la condition MgSO₄ et du logiciel AutoMR. Huit sous-unités ont été trouvées dans l'unité asymétrique en premier lieu par le logiciel. Cependant, deux autres sous-unités ont dû être ajoutées manuellement. Ainsi donc, 10 sous-unités composent l'unité asymétrique de la FL6K en condition citrate (Figure 10). Cela représente un V_m de 2,98 Å³/Da et un pourcentage de solvant de 58,8 % (48,49). L'écart-type moyen de la déviation (RMSD) d'une sous-unité à l'autre est de 0,314 Å.

Les deux structures sont pratiquement identiques, avec un RMSD de 0,383 Å lorsqu'on les compare entre elles, ce qui est similaire aux RMSD propres à chacune des deux structures. La principale différence est l'absence d'ions sulfate interagissant avec la FL6K. De plus, aucune molécule de citrate n'a été observée.

Une caractéristique importante de cette structure est la différence en facteur B de deux des sous-unités par rapport à l'ensemble des autres (Figure 10). Ces deux sous-unités sont celles qui n'ont pas été trouvées par le logiciel de remplacement moléculaire. Elles présentent des facteurs B plus élevés que le reste de la structure, signe d'un désordre plus grand. Cette particularité ainsi que la plus grande difficulté à obtenir des cristaux de qualité expliquent pourquoi des cristaux obtenus en condition MgSO_4 ont été préférés pour la suite du projet.

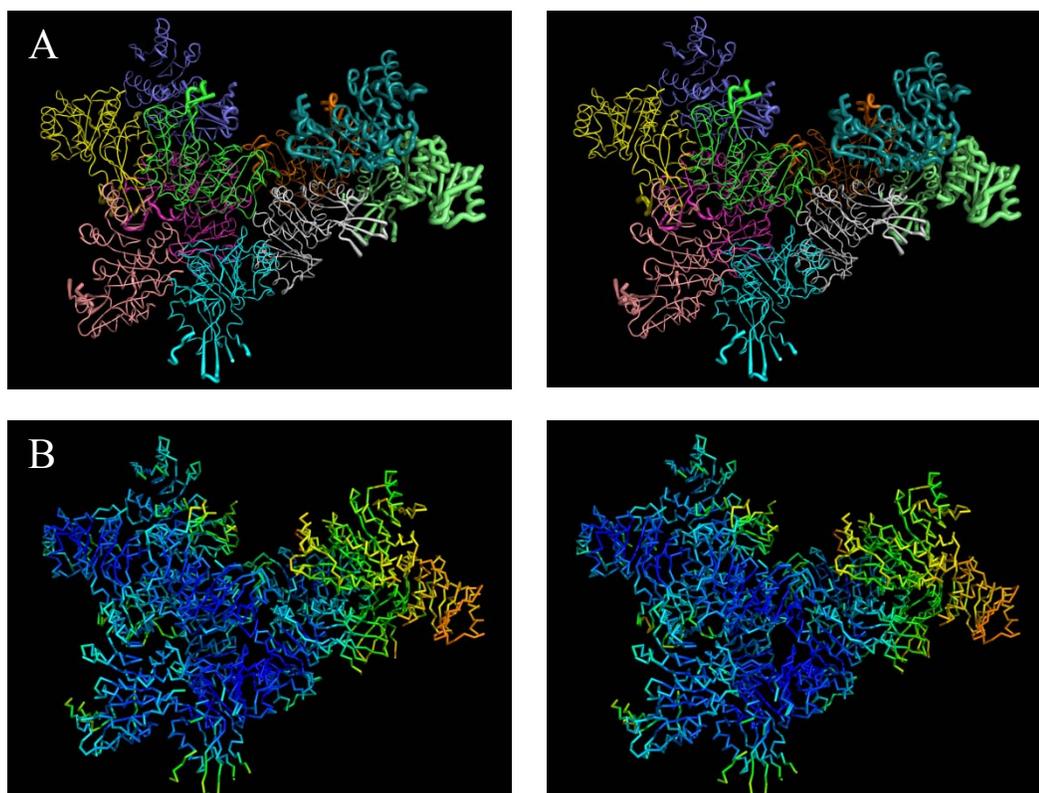


Figure 10. Modélisation de la FL6K dans les conditions de cristallographie de citrate : instabilité de certaines sous-unités. *A.* Vue stéréo des 10 sous-unités de la FL6K en mode ruban, où le diamètre du ruban est proportionnel au facteur B. *B.* Vue stéréo des mêmes 10 sous-unités colorées en fonction de leur facteur B, bleu étant faible et rouge étant élevé.

Caractérisation du site actif : interaction avec des nucléotides

Après avoir déterminé la structure de la FL6K, l'objectif suivant a été de caractériser son site actif afin de comprendre les interactions avec ses substrats ainsi que son mécanisme enzymatique. Pour ce faire, des cristaux de FL6K en condition MgSO_4 ont été trempés en présence d'ATP, d'ADP, d'AMP-PNP, d'ATP γ S, ou de FL. De plus, des trempages avec ATP et FL, ainsi qu'ATP γ S et FL, ont été réalisés. Malheureusement, les molécules de fructose- ϵ -lysine et d'ATP γ S n'ont pas pu être observées dans aucune des collectes effectuées. L'intérêt de ces analogues d'ATP est qu'ils sont non-hydrolysables. Ils ont été utilisés afin de vérifier quel mécanisme de phosphorylation privilégie la FL6K. Ils pourraient fournir des informations supplémentaires particulièrement s'il s'agit d'un mécanisme *ping-pong* (hydrolyse du γPO_4 suivie de la phosphorylation de la FL).

Par contre, il a été très intéressant de constater la présence d'ATP, d'ADP et d'AMP-PNP, mais pas dans toutes les sous-unités (Figure 11). Pour ces trois structures, les paramètres de maille étaient similaires à ceux de l'enzyme native. Les données obtenues pour la FL6K avec ATP ont une résolution maximale de 2,2 Å. Une molécule d'ATP est présente dans trois des six sous-unités. Dans chaque cas, celle-ci est présente en trois conformations alternatives possibles de son groupement γPO_4 (Figure 11A). Elle se situe dans une cavité entre le feuillet β principal et les deux hélices α près du C-terminal (en rouge, Figure 9C).

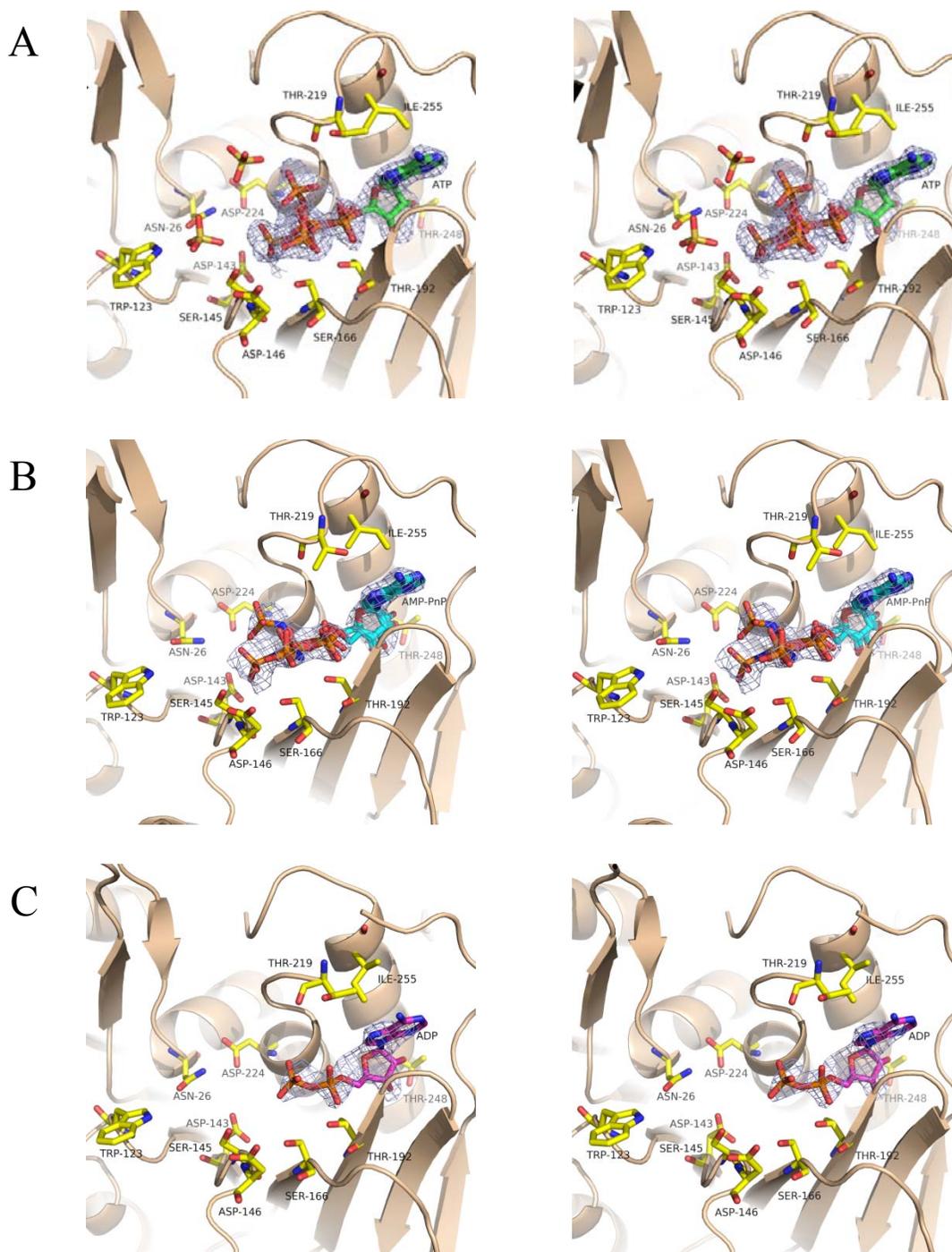


Figure 11. Vues stéréo du site actif de la FL6K en présence de différents nucléotides. A. ATP. B. AMP-PNP. C. ADP. Les cartes de densité électronique $F_o - F_c$ ont été réalisées comme décrit dans la section *Matériel et Méthodes*.

Les principales interactions existant sont de type Van der Waals avec les deux hélices α , les résidus 192 à 198 du feuillet β , et la boucle des résidus 210 à 220. Il existe aussi quelques pont-H entre l'enzyme et le nucléotide. L'atome N3 de l'adénine interagit via une molécule d'eau avec le groupement carbonyle de Glu 212. Les groupements hydroxyle O2' et O3' du ribose réalisent des pont-H avec le résidu Gly 197 (O) et, par l'entremise de molécule d'eau, avec les résidus Glu 212 (N), Ser 198 (OG) et surtout Thr 248 (O et OG1). Le groupement αPO_4 interagit avec Gly 194, Thr 192 et Ala 167, tandis que le γPO_4 interagit avec Ser 145, Asp 143 ou la Ser 166 dépendamment de sa conformation alternative.

Une autre particularité observée dans cette structure est la présence de deux ions sulfates près de la molécule d'ATP, dont un en alternance avec un ion Mg^{2+} . Un de ces ions est stabilisé par le Trp 123 et la Ser 145, tandis que l'autre, qui est en alternance, est stabilisé via des molécules d'eau par Asn 26 et l'extrémité N-terminal de l'hélice α des résidus 220 à 237. Étonnamment, aucun autre ion Mg^{2+} n'est observé dans la structure.

Pour la structure contenant l'AMP-PNP, la résolution maximale est 2,7 Å, et, dans les mêmes trois sous-unités que pour l'ATP, on observe la molécule d'AMP-PNP. On retrouve ici aussi trois conformations alternatives pour le groupement γPO_4 . Les interactions entre la FL6K et les groupements base azotée et ribose de l'AMP-PNP sont similaires à celles décrites ci-haut pour l'ATP.

Cependant, plutôt que des ions sulfates, ce sont deux ions Mg^{2+} qui se retrouvent près des conformations du γPO_4 .

La molécule d'ADP a pu être observée dans cinq sous-unités de la FL6K. Les interactions sont les mêmes que celles répertoriées pour les deux autres nucléotides, afin de stabiliser les molécules d'ADP dans les sites actifs. Toutefois, on ne retrouve ni d'ions sulfate, ni d'ions Mg^{2+} aux endroits décrits précédemment; il s'agit plutôt de deux molécules d'eau.

La liaison des nucléotides au site actif de la FL6K amène quelques changements structuraux. Le plus notable est la stabilisation de la boucle 211-220 qui enrobe la partie ribose-base azotée des nucléotides et qui n'est pas visible dans la structure native (Figure 12). D'autres modifications sont la déstabilisation de la boucle 14-21 et, de façon moindre, la stabilisation de la partie C-terminal. Cependant, de façon générale, il n'y a pas de mouvement précis d'acide aminés du site actif dû à la liaison des nucléotides (autre que la boucle 211-220). De plus, la boucle 81-93 n'est toujours pas visible en présence des nucléotides.

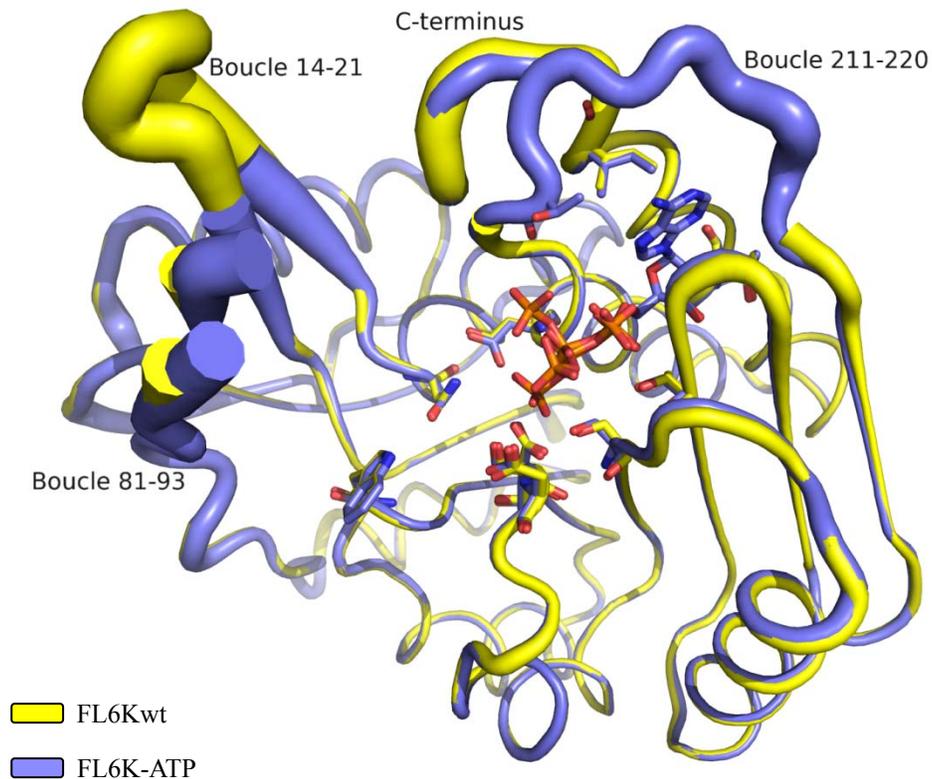


Figure 12. Superposition des sous-unités B en présence et en absence d'ATP.

La molécule d'ATP stabilise la boucle 211-220 et le C-terminus, et la boucle 14-21 semble être déstabilisée du même coup. La boucle 81-93 n'a été observée dans aucune des structures résolues (condition MgSO_4).

Site de liaison de la fructose- ϵ -lysine

Ayant observé le site de liaison de l'ATP, il était intéressant de déterminer si la fructose- ϵ -lysine avait aussi accès au site actif. Pour ce faire, la surface électrostatique de la FL6K en présence d'ATP a été calculée grossièrement à l'aide de PyMOL (Figure 13). On peut tout d'abord bien observer la cavité dans laquelle la molécule d'ATP se retrouve, et comment la FL6K entoure le nucléotide. De plus, une partie de la cavité demeure libre du côté du groupement γPO_4 . Cette

partie semble être plutôt acide (charge négative à pH 6,5) tandis que la partie occupée par la molécule d'ATP semble être plus neutre.

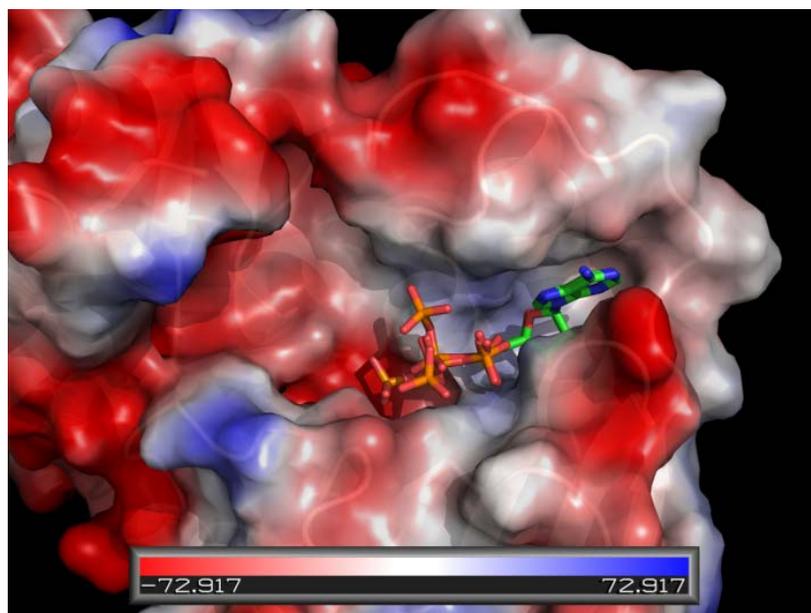


Figure 13. Vue globale de la cavité du site actif de la FL6K en présence d'ATP. Les surfaces électrostatiques ont été calculées à l'aide de PyMOL.

Mécanisme bi-substrats

Afin de déterminer par quel mécanisme à deux substrats passe la réaction catalysée par la FL6K, des essais cinétiques préliminaires ont été réalisés à différentes concentrations d'ATP, en faisant varier la concentration en fructose-ε-lysine. Les données ont été analysées en fonction des deux mécanismes possibles : ping-pong et état ternaire (Figure 14). Les valeurs obtenues sont assez similaires pour les deux mécanismes; un K_m d'environ 30 μM a ainsi été déterminé pour

l'ATP. Un χ^2 inférieur a toutefois été obtenu pour le mécanisme passant par un état ternaire.

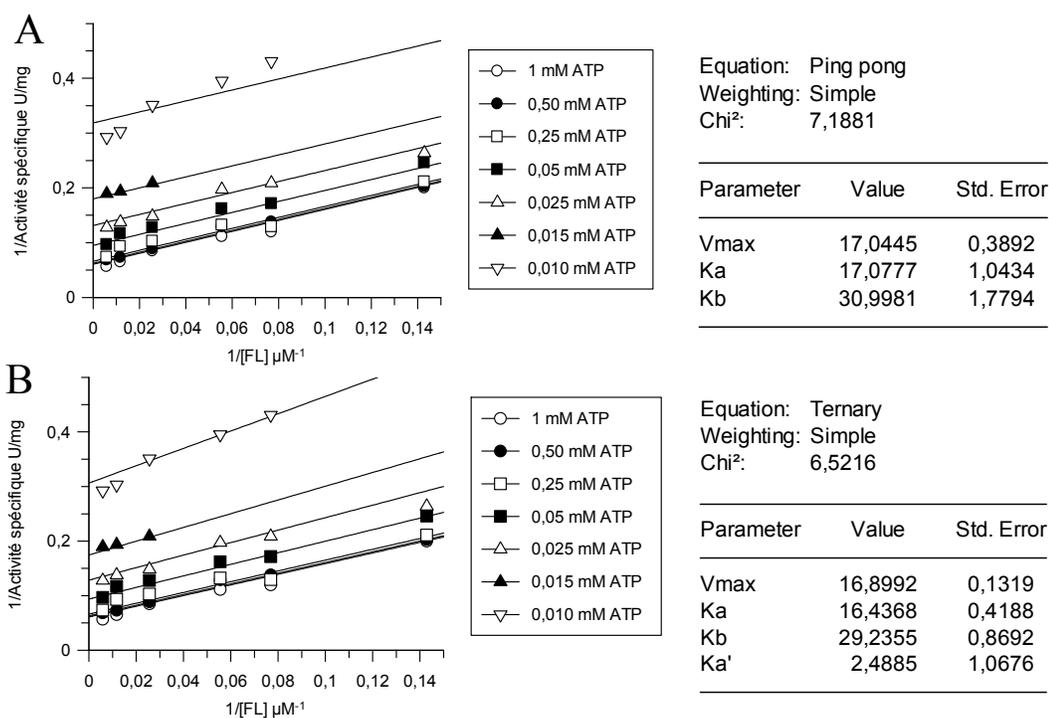


Figure 14. Cinétique enzymatique de la FL6K avec différentes concentrations en FL et en ATP : deux mécanismes possibles. A. Mécanisme ping-pong. B. Mécanisme passant par un état ternaire. Réalisé avec le logiciel Grafit5.

Discussion

Caractérisation de la FL6K et cristallisation

La FL6K a pu être exprimée et purifiée à des degrés satisfaisants afin de la cristalliser. L'ajout de deux étapes de purification supplémentaires a permis d'améliorer la pureté de la FL6K par rapport à ce qui avait été publié (33). Cependant, par le fait même, la quantité d'enzyme purifiée est moindre. Les paramètres cinétiques mesurés avec l'enzyme native pour la fructose-ε-lysine sont du même ordre de grandeur que ceux publiés par Wiame et al. Toutefois, le V_{\max} supérieur obtenu peut s'expliquer par un plus haut degré de pureté de notre échantillon. Cela permet de conclure que la FL6K exprimée possède les propriétés attendues.

Les tests de cristallisation ont permis de déterminer deux conditions distinctes pour la FL6K. La première condition composée de $MgSO_4$ a permis de résoudre la structure de l'enzyme par SAD. La deuxième condition avec du citrate ne produit pas des cristaux d'égale qualité; leur pouvoir de diffraction étant souvent faible. Cependant, la structure résolue de la FL6K en condition citrate permet de comprendre pourquoi ces cristaux ne sont pas bons en général. Sur dix sous-unités, deux possèdent des facteur-B supérieurs aux autres. Tellement, qu'une partie de la densité électronique de ces sous-unités n'est pratiquement pas visible.

Cela démontre une certaine instabilité au niveau de ces sous-unités qui découle de leur trop grande mobilité dans le cristal. Elles n'ont d'ailleurs aucun contact avec les unités asymétriques attenantes, ce qui peut expliquer leur manque de stabilité à travers le cristal. Ainsi, le cristal pousse avec une partie ordonnée et une autre, plus petite, désordonnée. Cela peut limiter le pouvoir de diffraction des cristaux

Structure de la FL6K

La FL6K fait partie de la famille PfkB qui comporte également la ribokinase (pdb 1RKD) et la 2-kéto-3-déoxygluconate kinase (pdb 1V19) (47,52). La comparaison avec ces structures permet de constater que la FL6K n'est pas très différente structuralement. Les RMSD pour ces structures sont respectivement de 1,4 Å et 1,5 Å. Toutefois, certaines différences existent bien entendu. La première, mineure, est la longueur de la partie C-terminal qui est plus court chez la FL6K. Cependant, cette partie n'a pas été notée comme étant important dans le fonctionnement de ces enzymes. Une deuxième différence est l'instabilité du deuxième feuillet β , composé des boucles 14-21 et 81-93, qui ne présente pas cette caractéristique dans les deux autres structures. Il est important de noter toutefois que, chez les deux autres kinases, ce feuillet interagit avec le même feuillet β d'une autre sous-unité. Cela peut expliquer qu'il soit visible chez ces structures et désordonné chez la FL6K, où il n'est stabilisé par aucun autre contact. Une ressemblance importante avec la 2-kéto-3-déoxygluconate kinase est le manque de

stabilité de la boucle 211-220 chez l'enzyme native par rapport à l'enzyme liant un nucléotide.

Site de liaison de l'ATP

Comme noté précédemment, la liaison de l'ATP entraîne la stabilisation de la boucle 211-220 de la FL6K (Figure 12). Cette particularité a aussi été remarquée chez la ribokinase et la 2-kéto-3-déoxygluconate kinase (47,52), et la boucle interagit aussi via des molécules d'eau avec l'adénine. De plus, la partie ribose de l'ATP est aussi stabilisée de façon similaire à ce qui est observé pour les deux autres kinases, et adopte une conformation C3'-endo commune.

Bien que deux boucles 211-220 de deux sous-unités soient vis-à-vis dans l'hexamère, leur stabilisation ne semble pas être due aux contacts cristallins. La principale raison est que l'autre sous-unité possédant une molécule d'ATP en son site actif n'interagit, au niveau de sa boucle 211-220, avec aucune autre sous-unité de l'hexamère ou d'un hexamère d'une autre unité asymétrique. Cette boucle possède des facteurs B similaires à ceux des deux autres boucles 211-220. Rallonger le temps de trempage des cristaux en présence d'ATP, ou tester d'avantages de conditions de cocrystallisation, pourrait permettre une occupation totale des sites actifs.

Un autre changement est la légère stabilisation des derniers résidus du C-terminal, sans provoquer de changement de conformation. Cependant, cette

modification semble désordonner la boucle 14-21 d'une sous-unité voisine avec laquelle la partie C-terminal interagit.

Un fait intéressant à mentionner est que la partie C-terminal peut adopter deux conformations, et que les molécules d'ATP et d'AMP-PNP ne sont retrouvées que dans les trois sous-unités adoptant une conformation spécifique. Il se pourrait que cette conformation soit nécessaire afin qu'un nucléotide triphosphate ait accès au site actif de l'enzyme. Toutefois, la molécule d'ADP a pu être observée dans cinq sous-unités indépendamment de la conformation du C-terminal. Le lien entre les nucléotides triphosphates et la conformation du C-terminal demeure à être clarifier afin de s'assurer de son importance.

Une différence importante entre chacune des structures de la FL6K interagissant avec un nucléotide est la présence d'ions près du γPO_4 le cas échéant. Il est assez surprenant d'observer deux ions SO_4^{2-} , dont un en alternance avec un ion Mg^{2+} , près d'une région contenant de nombreuses charges négatives pour la structure FL6K-ATP. Cependant, ces ions n'ayant pas été observés dans la structure FL6K-AMP-PNP (ions Mg^{2+} à la place), il se pourrait qu'il s'agisse d'ions PO_4^{2-} hydrolysés à partir de l'ATP. D'ailleurs, chez la ribokinase, un ion PO_4^{2-} est observé à proximité du site actif (condition cristallographique contenant du PO_4^{2-}) (52). À l'opposé, aucun ion n'est présent à cet endroit dans la structure de la FL6K native et celle de la FL6K-ADP. Par ailleurs, des ions Mg^{2+} pourraient être présents en place des conformations alternatives de l'ATP. Cependant, aucune observation ne semble abonder en ce sens.

Site hypothétique de la FL

Des diverses structures des enzymes de la famille des PfkB résolues, plusieurs ont permis d'identifier le site de liaison de la molécule qui leur est spécifique : par exemple, le ribose pour la ribokinase (52), et l'adénosine pour l'adénosine kinase humaine (54). La plupart des résidus interagissant avec la molécule ne sont pas conservés d'une enzyme à l'autre en raison du besoin de

```

ecFL6K -----
ttKDGK -----
ecKDGK MFKSDAARTRQRLSARKGRTLPPGRGKFPHSTTESFRNTFWLKKIMEHCFNMVDDQQTFTA 60
ecRIBK -----M 1

ecFL6K -----MKTLATIGDNCVDIYP-----QLNKAFSGGNVAVVYCTR----YGIQ 40
ttKDGK -----MLEVVTAGEPLVALVPOEPGHLRGKRLLLEVYVGGAEVNVAVALAR----LGVK 49
ecKDGK QTNANFLQIRFTTMSKKIAVIGECMIELSEKGADVKRGFGDTLNTSVYIARQVDPAAALT 120
ecRIBK QNAGSLVVLGSINADHILNLQSFPTGETVTGNHYQVAFGGKGANQAVAAGR----SCAN 57
          . . . . . * * * *

ecFL6K PGCITWVGDDDDYGTCLKQDLARMGVDISHVHTKHG-VTAQTQVELH--DNDRVFGDYTEG 97
ttKDGK VGFVGRVGEDELGAMVEERLRAEGWDLTHFRRAPG-FTGLYLREYPLPGQGRVVFYRKG 108
ecKDGK VHYVTALGTDSFSQOMLDAWHGENVDTSLTQRMENRPLGLYYIETDS-TGERTFYWRNE 179
ecRIBK IAFIACTGDDSIGESVRQQLATDNIDITPVSVIKGESTGVALIFVNGEGENVIGIHAGAN 117
          * * . . . . . *

ecFL6K VMADFALSEED----YAWLAQYDIVHAAIWG-----HAEDAFFPOLHAAGK-LTAFDFS 145
ttKDGK AGSALAPGAFD----PDYLEGVRFLHLSGITPALSPPEARAFSLWAMEEAKRR-GVRVSLD 163
ecKDGK AAAKFWLESEQSAACEELANFDVLYLSGISLAILSPTRSREKLLSLLRECRANGKGVIFD 239
ecRIBK AALSPALVEAQ----RERIANASALLMQLES-----PLESVMAAAKIAHQNKTIVALN 166
          . . . . .

ecFL6K DKWDSPLWQT-----LVPHLDFAFASAPQEDETLR-----LKMKAIVARG 185
ttKDGK VNYRQTLWSPEE-ARGFLERALPGVDLLFLSEEEAELLFG-----RVEEALRALS 212
ecKDGK NNYRPRLWASKEETQQVYQMLECTDIAFLTLDDDEDALWGQOP----VEDVIARTHAG 294
ecRIBK PAPARELPDE-----LLALVDIITPNETEA EKLTGIRVENDEDAAKAAQVLEHG 216
          * . . . . . *

ecFL6K AGTVIVTLGENGSIAWDGAQFWRQAPPEP----VTVIDTMGAGDSFIAGFLOGWSAGMTLP 241
ttKDGK APEVVLKRGAKGAWAFVDGRRVEGSAFA----VEAVDPVGAGDAFAAGYLAGAVWGLPVE 268
ecKDGK VKEVVVKRGADSLVSIAGEGLVDVPAVKLPKEKVIDTTAAGDSFSAGYLAVRLTGGSAAE 354
ecRIBK IRTVLIITLSSRGVWASVNGEGQRVPGFR----VQAVDTIAAGDTFNGALITALLEEKPLP 272
          * . . . * . . . . . * * * *

ecFL6K QAIAGGTACAAKTIQYHGAW----- 261
ttKDGK ERLRLANLLGASVAASRGDHEGAPYREDLEVLLKATQTFMR 309
ecKDGK DAAKRGHLTASTVIQYRGAIIPREAMP----- 382
ecRIBK EAIRFAHAAAAIAVTRKGAQPSVWREEIDAFLDROR---- 309
          . . . . . *

```

Figure 15. Alignement de séquence de la FL6K avec d'autres kinases de la famille PfkB. Alignement multiple réalisé par le logiciel clustalW2 (53). Les résidus conservés sont répertoriés (*). La FL6K (ecFL6K) est alignée avec la KDGK de *Thermus thermophilus* (ttKDGK), la KDGK d'*Escherichia coli* (ecKDGK), et la ribokinase d'*Escherichia coli*.

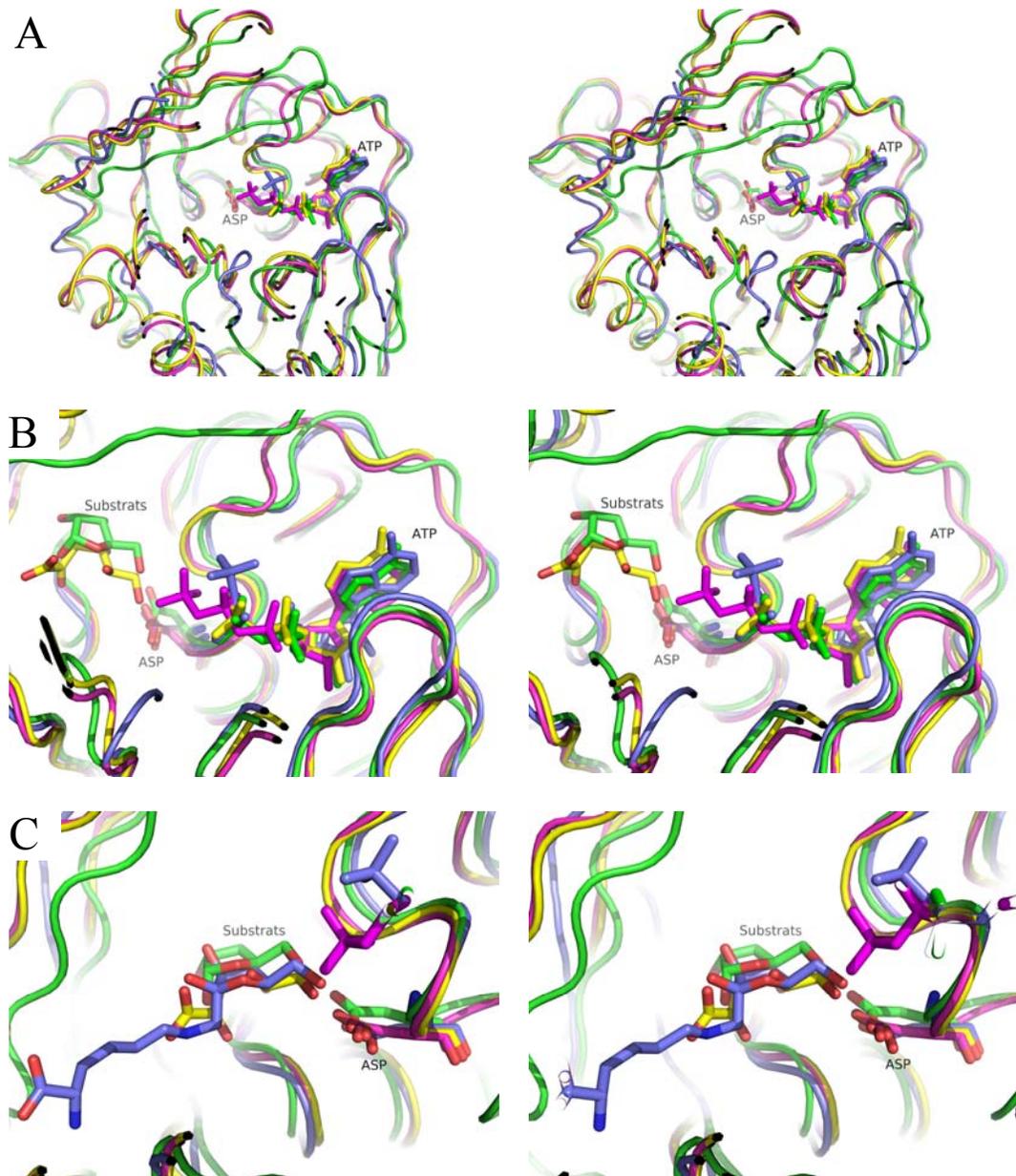


Figure 16. Alignement structural de la FL6K avec d'autres kinases PfkB, comparaison de leurs sites actifs, et modélisation de la FL. A. Alignement structural de la FL6K en bleue avec une sous-unité des structures 1RKD (ADP et ribose) en vert, 1V1A (ADP et KDG) en jaune, et 1V1B (ATP) en magenta. Le résidu aspartate conservé est identifié. **B.** Sites actifs des différentes kinases. **C.** Modélisation de la FL par rapport aux autres substrats des enzymes et de l'Asp.

spécificité de chacune. Toutefois, un acide aspartique a été déterminé comme étant hautement conservé chez tous les individus de la famille PfkB (Figure 15). Ce résidu se situe dans chacun des cas à proximité du groupement hydroxyle devant être phosphorylé (47,52,54). À l'aide de ces informations, la superposition des structures 1RKD, 1V1A et 1V1B avec la FL6K-ATP a été réalisée et une molécule de FL a été modélisée selon les différents éléments mentionnés (Figure 16).

Le modèle obtenu permet de déterminer certains résidus qui pourraient être importants à la stabilisation de la partie fructosyl de la FL (Figure 17). Les résidus Asp 13, Gly 25, Asn 26, Asn 29 et Asp 224 pourraient interagir directement avec les O3', O4' et O6' de la fructose- ϵ -lysine respectivement. L'interaction avec la chaîne latérale de l'Asp 13 pourrait être importante structuralement, et entraîner le mouvement du petit feuillet β composé des boucles 14-21 et 81-93 pour couvrir le site actif comme il a déjà été observé par exemple chez l'adénosine kinase humaine (55) et de *Toxoplasma gondii* (56).

Le fait le plus intéressant qui ressort du modèle est la position que pourrait adopter la partie lysine hydrophobe de la FL en sandwich entre les résidus aromatiques hydrophobes Tyr 94 et Trp 123. Cela pourrait expliquer la plus grande affinité de l'enzyme pour la FL (K_m , 18 μ M) que pour la fructose- α -glycine (K_m , 80 mM) ou le fructose (presque indétectable) qui ne possèdent pas cette longue chaîne carbonée (33). De plus, le groupement NH_3^+ pourrait être stabilisé à l'aide de ponts-H formés avec les résidus Tyr 94, Glu 96 et Trp 123. Cette spécificité

permettrait à l'enzyme de lier supérieurement la FL plutôt que le deoxymorpholinofructose (K_m , 24 mM) qui n'en possède pas (33) (Voir Annexe 2).

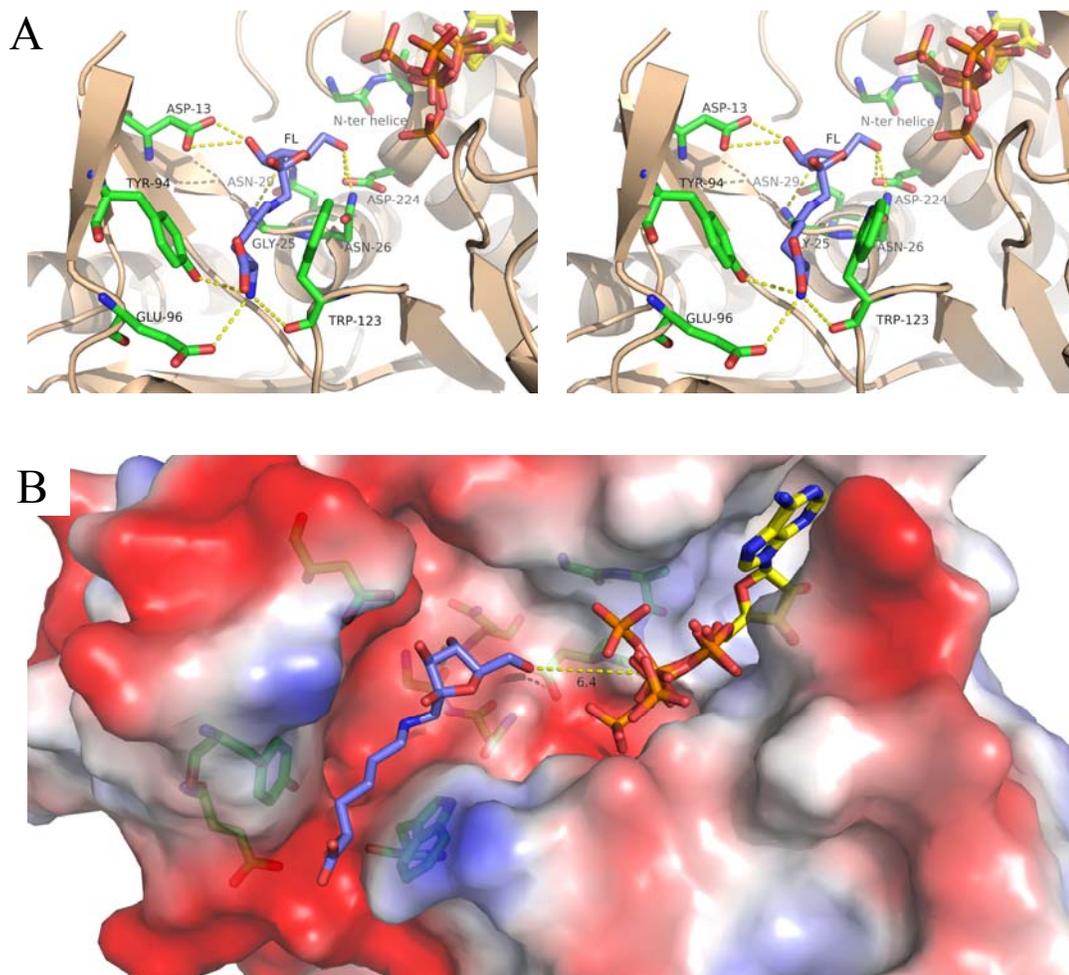


Figure 17. Site hypothétique de liaison de la fructose- ϵ -lysine dans la FL6K.

A. La partie fructose fait des pont-H avec l'Asp 13, la Gly 25, l'Asn 26, l'Asn 29 et l'Asp 224. La partie lysine est stabilisée par interaction hydrophobe avec les résidus Tyr 94 et Trp 123, et son groupement N-terminal crée des pont-H avec Tyr 94, Glu 96 et Trp 123. **B.** La distance entre le groupement OH du C6 de la partie fructose et le βPO_4 de l'ATP est de 6,4 Å. L'anomère β de la fructose- ϵ -lysine est représenté ici.

Une des questions qui se pose est si la FL6K lie préférentiellement une des deux conformations anomériques que peut adopter la fructose- ϵ -lysine au niveau du carbone C2 de son cycle furanose. Ce qui ressort du modèle est la possibilité que les deux anomères soient liés également par l'enzyme puisqu'aucun résidu ne semble interagir avec le groupement OH du carbone anomérique. Un autre fait à noter est la distance entre le O6' qui doit être phosphorylé et le phosphate β de l'ATP qui est d'environ 6,4 Å (Figure 17B). Cette distance est dans la moyenne de ce qui se retrouve chez la ribokinase (7,3 Å) et la 2-kéto-3-déoxygluconate kinase (6,2 et 6,5 Å). Le positionnement de la fructose- ϵ -lysine semble donc permettre que la FL6K passe par un mécanisme similaire à ce qui est proposé chez ces deux autres kinases.

Mécanisme enzymatique

Il a été évoqué pour la première fois chez la ribokinase l'importance d'un résidu Asp dans le mécanisme des enzymes de la famille PfkB (52). Ce résidu permettrait l'abstraction du proton du groupement hydroxyle à phosphoryler qui peut alors effectuer une attaque nucléophile sur le γ -phosphate selon un mécanisme de type S_N2 (Figure 18A). L'état de transition pentacovalent serait stabilisé en partie par un trou à anion formé par la partie N-terminal de l'hélice comportant l'Asp conservé. Chez la FL6K, ce résidu serait l'Asp 224 (Figure 15) qui fait des pont-H avec O6' à phosphoryler de la fructose- ϵ -lysine (Figure 17).

L'oxyanion ainsi créé peut être stabilisé temporairement par l'Asn 26, et ensuite procéder à l'attaque du γ -phosphate de l'ATP (Figure 18B). L'intermédiaire résultant pourrait être stabilisé en partie par le trou à anion créé par les résidus 221 à 223 (Gly-Ala-Gly). La Ser 145 et le Trp 123, via un ion Mg^{2+} , pourraient aussi permettre la stabilisation de l'intermédiaire catalytique. Le groupement γ -

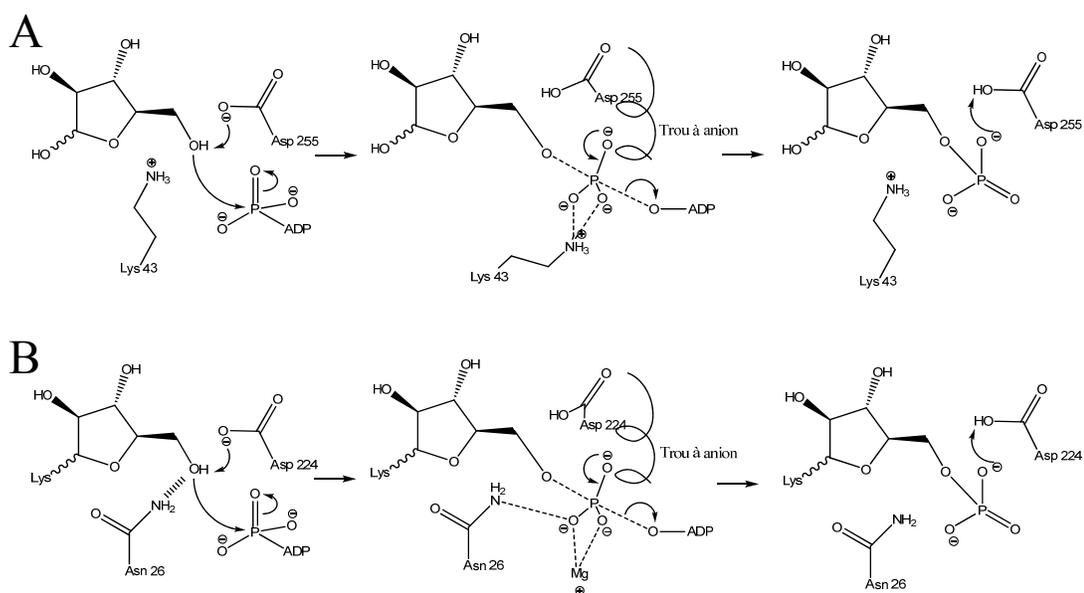


Figure 18. Mécanisme enzymatique proposé pour la FL6K. **A.** Mécanisme S_N2 pour la ribokinase d'*E. coli* proposé par Sigrell et al (52). L'Asp 255 abstrait le proton du O5. L'oxyanion peut être stabilisé par la Lys 43, puis provoquer une attaque nucléophile sur le γPO_4 de l'ATP. L'intermédiaire pentavalent est stabilisé par un trou à anion formé des résidus 252-255, et par la Lys 43. **B.** Mécanisme proposé pour la FL6K basé sur celui en A. L'Asp 224 joue le rôle d'initiateur de la réaction. L'Asn 26 pourrait jouer un rôle similaire pour stabiliser l'oxyanion. Un ion Mg^{2+} stabiliserait l'intermédiaire pentavalent en plus du trou à anion.

phosphate serait ensuite séparé de l'ADP et serait lié au O6' de la fructose- ϵ -lysine. L'Asp 224 serait finalement déprotonée soit par une molécule d'eau ou le groupement phosphate de la fructose- ϵ -lysine-6-phosphate.

Ce type de mécanisme serait conforme avec les résultats préliminaires de cinétique enzymatique obtenus qui semblent privilégier un mécanisme passant par un complexe ternaire (Figure 14). Cependant, ces données devront être accompagnées de nouvelles données confirmant avec une plus grande précision ce résultat préliminaire.

Amélioration et suite du projet

La première étape qui devra être réalisée sera de valider et répéter les essais cinétiques bi-substrat permettant d'établir si le mécanisme de la FL6K passe par un état ternaire ou se fait en deux temps (mécanisme ping-pong).

Par ailleurs, les essais de trempage des cristaux de FL6K avec la FL n'ont pas permis d'obtenir la molécule dans le site actif de l'enzyme. Une des raisons de ce non-résultat pourrait être un manque de pureté durant la production de la fructose- ϵ -lysine menant à une surestimation des quantités utilisées. De plus, il se pourrait que le $MgSO_4$ nuise à l'activité catalytique de l'enzyme pour la FL puisque des essais cinétiques préliminaires menés en présence de 200 mM $MgSO_4$ ont démontré une perte totale d'activité (données non présentées). L'ajout d'ADP a permis de s'assurer que les enzymes couplés n'étaient pas inhibés. Cependant,

aucun ion dans la FL6K native ne nous laisse penser qu'il pourrait y avoir obstruction du site de liaison potentiel de la FL. Il devra être envisagé de tester de nouveau cette expérience avec de la fructose- ϵ -lysine dont on connaît la pureté et la qualité. De plus, des essais de cocrystallisation pourraient aussi être tentés, en absence d'ATP, afin de permettre à la FL6K d'interagir avec son substrat avant la cristallisation. Cela pourrait même découler en de nouvelles conditions cristallographiques.

Éventuellement, il pourra aussi être tenté des essais de *docking* moléculaire avec la fructose- ϵ -lysine et la FL6K afin de visualiser quels pourraient être les sites de liaison de la FL *in silico*. Parallèlement, la dynamique moléculaire pourrait aussi permettre d'observer un mouvement possible du petit feuillet β lors de la liaison de la fructose- ϵ -lysine qui est observé chez d'autres PfkB kinases.

Une fois cette étape réalisée, des analogues de l'état de transition, tel l' AlF_3 , pourraient être utilisés par trempage ou cocrystallisation avec l'ADP et la FL (57,58). Cela permettrait de déterminer les résidus importants pour la stabilisation des intermédiaires catalytiques. Ces résidus pourront être mutés par mutagenèse dirigée, et la caractérisation cinétique des différents mutants permettra de comprendre d'avantage leur implication dans le mécanisme enzymatique de la FL6K. De plus, des mutants pourront aussi être produits pour les résidus impliqués dans la liaison de la fructose- ϵ -lysine ou de l'ATP. Présentement, certains résidus pourraient être ciblés afin de vérifier leur importance; l'Asp 224, l'Asn 26, l'Asn

29, l'Asp 13, la Tyr 94, le Trp 123, le Glu 96, la Ser 145, la Thr 248 et la Ser 198. Ainsi, par exemple, la mutation d'Asp 224 en Asn 224 serait intéressante du point de vue de la réaction enzymatique, tandis que la mutation Thr 248 en Val 248 pourrait être nuisible pour la liaison de nucléotides.

Un autre point qui serait intéressant de vérifier est l'effet des ions pentavalents (PVI) sur la FL6K. Il a été démontré qu'ils augmentaient le V_{\max} et l'affinité de la ribokinase pour son substrat (59). Une séquence NXXE qui est conservée dans la famille PfkB a été rapporté importante pour l'effet des PVI (60). Cependant, la FL6K ne possède pas cette séquence consensus, et il se pourrait que l'enzyme ne soit pas affecté par ces ions.

Finalement, le phosphoénolpyruvate a aussi été démontré comme ayant un effet similaire chez la ribokinase à celui des PVI (59). Étant donné que l'essai couplé utilisé pour caractériser la FL6K contient du PEP, il serait important de vérifier son effet sur la FL6K à l'aide d'un essai avec de la FL radiomarquée.

Conclusion

En bref, la résolution de la structure de la FL6K par diffraction de rayons X permet d'observer des similitudes à celles d'autres kinases de la famille des PfkB phosphorylant aussi une fonction alcool primaire. Le site actif de l'enzyme a pu être identifié, et un site de liaison probable de la fructose-ε-lysine permet d'identifier des résidus importants pour sa liaison. De plus, les résultats de cinétique suggèrent que le mécanisme utilisé par la FL6K semble passer par un état ternaire. Après confirmation du site de liaison de la FL, il serait intéressant de muter les résidus impliqués dans sa reconnaissance afin d'augmenter la taille des substrats pouvant être phosphorylés par la FL6K. La structure des autres enzymes de l'opéron *frl* pourraient aussi donner plus d'informations sur cet ensemble de protéines impliquées dans le métabolisme de la fructose-ε-lysine.

Bibliographie

1. Evans, M. D., and Cooke, M. S. (2004) *Bioessays* **26**, 533-542
2. Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., and Horikawa, T. (2003) *Toxicology* **189**, 21-39
3. Moskovitz, J. (2005) *Curr Pharm Des* **11**, 1451-1457
4. Moskovitz, J. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1703**, 213-219
5. Clarke, S. (2003) *Ageing Res Rev* **2**, 263-285
6. Baynes, J. W. (1991) *Diabetes* **40**, 405-412
7. Ravandi, A., Kuksis, A., Marai, L., and Myher, J. J. (1995) *Lipids* **30**, 885-891
8. Hammes, H. P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K., and Brownlee, M. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11555-11558
9. Rahbar, S., and Figarola, J. L. (2003) *Arch Biochem Biophys* **419**, 63-79
10. Hodge, J. E. (1955) *Adv Carbohydr Chem* **10**, 169-205
11. Bunn, H. F., and Higgins, P. J. (1981) *Science* **213**, 222-224
12. Levi, B., and Werman, M. J. (2001) *J Nutr Biochem* **12**, 235-241
13. Van Schaftingen, E., Delpierre, G., Collard, F., Fortpied, J., Gemayel, R., Wiame, E., and Veiga-da-Cunha, M. (2007) *Adv Enzyme Regul* **47**, 261-269
14. Sharma, S. D., Pandey, B. N., Mishra, K. P., and Sivakami, S. (2002) *J Biochem Mol Biol Biophys* **6**, 233-242
15. Brown, J. L., and Roberts, W. K. (1976) *J Biol Chem* **251**, 1009-1014
16. Goldstein, D. E., Little, R. R., Wiedmeyer, H. M., England, J. D., and McKenzie, E. M. (1986) *Clin Chem* **32**, B64-70
17. Talasz, H., Wasserer, S., and Puschendorf, B. (2002) *J Cell Biochem* **85**, 24-34

18. Shapiro, R., McManus, M. J., Zalut, C., and Bunn, H. F. (1980) *J Biol Chem* **255**, 3120-3127
19. Szwergold, B. S. (2005) *Med Hypotheses* **65**, 337-348
20. Delpierre, G., Rider, M. H., Collard, F., Stroobant, V., Vanstapel, F., Santos, H., and Van Schaftingen, E. (2000) *Diabetes* **49**, 1627-1634
21. Collard, F., Delpierre, G., Stroobant, V., Matthijs, G., and Van Schaftingen, E. (2003) *Diabetes* **52**, 2888-2895
22. Szwergold, B. S., Howell, S., and Beisswenger, P. J. (2001) *Diabetes* **50**, 2139-2147
23. Delpierre, G., and Van Schaftingen, E. (2003) *Biochem Soc Trans* **31**, 1354-1357
24. Delplanque, J., Delpierre, G., Opperdoes, F. R., and Van Schaftingen, E. (2004) *J Biol Chem* **279**, 46606-46613
25. Fortpied, J., Gemayel, R., Stroobant, V., and van Schaftingen, E. (2005) *Biochem J* **388**, 795-802
26. Gemayel, R., Fortpied, J., Rzem, R., Vertommen, D., Veiga-da-Cunha, M., and Van Schaftingen, E. (2007) *FEBS J* **274**, 4360-4374
27. Fortpied, J., Gemayel, R., Vertommen, D., and Van Schaftingen, E. (2007) *Biochem J* **406**, 139-145
28. Veiga da-Cunha, M., Jacquemin, P., Delpierre, G., Godfraind, C., Theate, I., Vertommen, D., Clotman, F., Lemaigre, F., Devuyst, O., and Van Schaftingen, E. (2006) *Biochem J* **399**, 257-264
29. Collard, F., Zhang, J., Nemet, I., Qanungo, K. R., Monnier, V. M., and Yee, V. C. (2008) *J Biol Chem* **283**, 27007-27016
30. Saxena, A. K., Saxena, P., and Monnier, V. M. (1996) *J Biol Chem* **271**, 32803-32809
31. Takahashi, M., Pischetsrieder, M., and Monnier, V. M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 3437-3443
32. Zheng, J., Guan, H., Xu, L., Yang, R., and Lin, Z. (2009) *Appl Microbiol Biotechnol*

33. Wiame, E., Delpierre, G., Collard, F., and Van Schaftingen, E. (2002) *J Biol Chem* **277**, 42523-42529
34. Wiame, E., Duquenne, A., Delpierre, G., and Van Schaftingen, E. (2004) *FEBS Lett* **577**, 469-472
35. Wiame, E., and Van Schaftingen, E. (2004) *Biochem J* **378**, 1047-1052
36. Erbersdobler, H. F., and Faist, V. (2001) *Nahrung* **45**, 177-181
37. Monnier, V. M. (2005) *Biochem J* **392**, e1-3
38. Otwinowski, Z. M., W. (1997) *Methods in Enzymology* **276**, 307-326
39. Ginalski, K., Elofsson, A., Fischer, D., and Rychlewski, L. (2003) *Bioinformatics* **19**, 1015-1018
40. Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., and Terwilliger, T. C. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1948-1954
41. Claude, J. B., Suhre, K., Notredame, C., Claverie, J. M., and Abergel, C. (2004) *Nucleic Acids Res* **32**, W606-609
42. Guerrero, S. A., Hecht, H. J., Hofmann, B., Biebl, H., and Singh, M. (2001) *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 718-723
43. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1993) *J Mol Biol* **229**, 105-124
44. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132
45. DeLano, W. L. (2004) *DeLano Scientific, LLC, San Carlos, CA*
46. Fortpied, J., Maliekal, P., Vertommen, D., and Van Schaftingen, E. (2006) *J Biol Chem* **281**, 18378-18385
47. Ohshima, N., Inagaki, E., Yasuike, K., Takio, K., and Tahirov, T. H. (2004) *J Mol Biol* **340**, 477-489
48. Matthews, B. W. (1968) *J Mol Biol* **33**, 491-497
49. Kantardjieff, K. A., and Rupp, B. (2003) *Protein Sci* **12**, 1865-1871

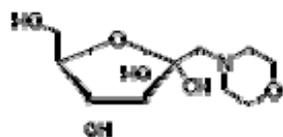
50. Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2007) *Nucleic Acids Res* **35**, W375-383
51. Vaguine, A. A., Richelle, J., and Wodak, S. J. (1999) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 191-205
52. Sigrell, J. A., Cameron, A. D., Jones, T. A., and Mowbray, S. L. (1998) *Structure* **6**, 183-193
53. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) *Bioinformatics* **23**, 2947-2948
54. Mathews, II, Erion, M. D., and Ealick, S. E. (1998) *Biochemistry* **37**, 15607-15620
55. Reddy, M. C., Palaninathan, S. K., Shetty, N. D., Owen, J. L., Watson, M. D., and Sacchettini, J. C. (2007) *J Biol Chem* **282**, 27334-27342
56. Schumacher, M. A., Scott, D. M., Mathews, II, Ealick, S. E., Roos, D. S., Ullman, B., and Brennan, R. G. (2000) *J Mol Biol* **298**, 875-893
57. Coleman, D. E., Berghuis, A. M., Lee, E., Linder, M. E., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1994) *Science* **265**, 1405-1412
58. Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1994) *Nature* **372**, 276-279
59. Maj, M. C., and Gupta, R. S. (2001) *J Protein Chem* **20**, 139-144
60. Maj, M. C., Singh, B., and Gupta, R. S. (2002) *Biochemistry* **41**, 4059-4069

Annexes

Annexe 1

Séquence (261 aa) de la FL6K (selon (33)) :

MKTLATIGDNCVDIYPQLNKAFSSGGNAVNVAVYCTRYGIQPGCITWVGDD
DYGTKLKQDLARMGVDISHVHTKHGVTAQTQVELHDNDRVFGDYTEGV
MADFALSEEDYAWLAQYDIVHAAIWGHAEDAFPQLHAAGKLTAFDFSDK
WDSPLWQTLVPHLDFAFASAPQEDELRLKMKAIVARGAGTVIVTLGENG
SIAWDGAQFWRQAPEPVTVIDTMGAGDSFIAGFLCGWSAGMTLPQAIAQG
TACAAKTIQYHGAW

Annexe 2

Structure du Deoxymorpholinofructose (source : www.sigmaaldrich.com)