

Université de Montréal

**Structure d'une tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de classe I :  
étude d'une apparente perte de stéréospécificité**

par Clotilde LowKam

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maitrise en Biochimie

Novembre 2009

Clotilde LowKam 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Structure d'une tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de classe I :  
étude d'une apparente perte de stéréospécificité**

présenté par :

Clotilde LowKam

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jim Omichinski, président rapporteur

Jurgen Sygusch, directeur de recherche

Mirek Cygler, membre du jury

## Résumé

La tagatose-1,6-biphosphate aldolase de *Streptococcus pyogenes* est une aldolase de classe I qui fait montre d'un remarquable manque de spécificité vis à vis de ses substrats. En effet, elle catalyse le clivage réversible du tagatose-1,6-biphosphate (TBP), mais également du fructose-1,6-biphosphate (FBP), du sorbose-1,6-biphosphate et du psicose-1,6-biphosphate, quatre stéréoisomères, en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Afin de mettre à jour les caractéristiques du mécanisme enzymatique, une étude structurale de la TBP aldolase de *S. pyogenes*, un pathogène humain extrêmement versatile, a été entreprise. Elle a permis la résolution de la structure native et en complexe avec le DHAP, à respectivement 1.87 et 1.92 Å de résolution. Ces mêmes structures ont permis de se représenter plus clairement le site actif de l'enzyme en général, et les résidus catalytiques en particulier. Le trempage des cristaux de TBP aldolase dans une solution saturante de DHAP a en outre permis de piéger un authentique intermédiaire iminium, ainsi que sa géométrie particulière en atteste. Des expériences d'échange de proton, entreprises afin d'évaluer le stéréoisomérisme du transfert de proton catalytique, ont également permis de faire une intéressante découverte : la TBP aldolase ne peut déprotoner le côté pro-R du C3 du DHAP, mais peut le protonner. Ce résultat, ainsi que la comparaison de la structure du complexe TBP aldolase-DHAP avec la structure du complexe FBP aldolase de muscle de lapin- DHAP, pointe vers un isomérisme *cis-trans* autour du lien C2-C3 de la base de Schiff formée avec le DHAP.

De plus, la résolution de ces deux structures a permis de mettre en évidence trois régions très mobiles de la protéine, ce qui pourrait être relié au rôle postulé de son isozyme chez *S. pyogenes* dans la régulation de l'expression génétique et de la virulence de la bactérie.

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

**Mots-clés :** *Streptococcus pyogenes*, tagatose-1,6-biphosphate aldolase, transfert de proton, base de Schiff, stéréospécificité, énantiométrie, isomérisme, structure, cristallographie par rayons X.

## **Abstract:**

Tagatose-1,6-biphosphate aldolase from *Streptococcus pyogenes* is a class I aldolase that shows a lack of stereospecificity that is rare in enzymes in general, and in aldolases in particular. This aldolase catalyzes the reversible cleavage of tagatose-1,6-biphosphate (TBP), fructose-1,6-biphosphate (FBP), sorbose-1,6-biphosphate and psicose-1,6-biphosphate, four stereoisomers, in dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate (DHAP). In order to understand its mechanism, a structural study of TBP aldolase from *S. pyogenes*, one of the most versatile and virulent human pathogen, was initiated and high resolution crystallographic structures of native and DHAP-liganded TBP aldolase were solved. These structures allowed us to gain informations regarding active site residues implicated in catalysis and that give rise to the apparent lack of specificity. Soaking of TBP aldolase crystals in saturating DHAP solution specifically trapped the iminium intermediate, as demonstrated by its geometry. Furthermore, proton transfer studies uncovered an interesting phenomenon: TBP aldolase from *S. pyogenes* is unable to detritiate pro-*R* labelled hydrogen position at C3 of DHAP, yet it is able to tritiate both the pro-*R* and the pro-*S* position. These results, taken together with the superposition of the DHAP-TBP aldolase with the DHAP-FBP aldolase from rabbit muscle, suggest a *cis-trans* isomerism about the Schiff base C2-C3 bond.

The resolution of both the native and the liganded structure also proved useful in identifying three very mobile regions in the protein. This trend could be linked to the

putative metabolic sensor and genetic expression regulator role of LacD.1 in *S. pyogenes*.

X-rays crystallography and traditional enzymatic kinetics allowed us to gain insights into the catalytic mechanism and others structural properties of this important metabolic enzyme.

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*, tagatose-1,6-biphosphate aldolase, proton transfer, Schiff base, stereospecificity, enantiomerism, isomerism, structure, X-rays crystallography

## **Table des matières:**

**Résumé**

**Abstract**

**Table des matières**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

### **CHAPITRE 1: Introduction**

#### 1.1 *Streptococcus pyogenes*

1.1.1 Histoire et classification des streptocoques

1.1.2 Bactériologie de *Streptococcus pyogenes*

1.1.3 Constituants cellulaires, produits extracellulaires et virulence associée

1.1.4 Pathogénèse

1.1.5 Métabolisme

#### 1.2 Les aldolases

1.2.1 Généralités et classification

1.2.2 Structure tridimensionnelle

1.2.3 Site actif et mécanisme

1.2.4 Les aldolases des streptocoques : la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de *S. pyogenes*

1.2.5 LacD.1 : un régulateur de l'expression génétique ?

1.3 Objectif du projet de recherche

1.4 Méthodes

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

1.4.2 Diffraction des rayons X

1.4.3 Hexacyanoferrate III

1.4.4 Marquage isotopique

1.4.5 Chromatographie sur papier

## **CHAPITRE 2 : Article**

Abstract

Introduction

Experimental Procedures

Results

Discussion

Figures and tables

Footnotes

References

## **CHAPITRE 3 : Discussion**

## **CHAPITRE 4 : Perspectives**

## **Références**



## Liste des tableaux

Tableau I : Taxonomie de *Streptococcus pyogenes*

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

Tableau III : Aldolases pyruvate-dépendantes (non exhaustif)

Tableau IV : Aldolases DHAP-dépendantes (non exhaustif)

Table 1 : Data collection and refinement statistics

Table 2 : Proton exchange at C3 of DHAP

Table 3 : Control experiment of the proton exchange at C3 of DHAP

## Liste des figures :

Figure 1 : A. Bêta-hémolyse sur agar contenant du sang

B. *S. pyogenes* en division sous le microscope, grossissement x 900

Figure 2 : Schéma des constituants cellulaires de *S. pyogenes*

Figure 3 : Métabolisme du glucose de *Streptococcus pyogenes*

Figure 4 : Voie du tagatose-6-phosphate

Figure 5 : A. Homotétramère de la FBP aldolase de muscle de lapin, vu parallèlement à l'axe du tonneau beta.

B. Sous-unité de la FBP aldolase de muscle de lapin vue parallèlement à l'axe du tonneau beta.

Figure 6 : Mécanisme simplifié et site actif de la FBP aldolase de muscle de lapin

Figure 7 : Structures des quatre hexoses biphosphorylés clivés par la TBP aldolase de *S. pyogenes*

Figure 8 : Diagramme de phase selon la concentration en protéine et en agent précipitant.

Figure 9 : Cristaux de TBP aldolase de *S. pyogenes*

Figure 10 : Patron de diffraction de la TBP aldolase de *S. pyogenes*

Figure 11 : Dispositif de chromatographie descendante sur couche mince

Figure 1: Structure of a TBP aldolase dimer and subunit.

Figure 2: Electron density showing the carbanion intermediate in the active site of tagatose-1,6-biphosphate aldolase from *Streptococcus pyogenes*.

Figure 3: Enzymatic intermediate formed with DHAP in TBP aldolase active site.

Figure 4: Superposition of the trapped DHAP-TBP aldolase structure with the unliganded enzyme TBP aldolase.

Figure 5: Superposition of the trapped DHAP-TBP aldolase structure with the DHAP-rabbit muscle aldolase.

Figure 6: Possible conformation of the carbanion enzymatic intermediate formed with DHAP in the TBP aldolase active site.

Figure 7: Superposition of the TBP aldolase structure from *S. pyogenes* with three putative TBP aldolases from other *Streptococcus*.

## Liste des abréviations utilisées:

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
ATP	Adénosine triphosphate
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
F1P	Fructose-1-phosphate
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
kDa	kilo Dalton
$K_M$	Constante de Michaelis
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
mM	Millimolaire
$\mu\text{M}$	Micromolaire
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
PDB	Protein Data Bank
RMA	Rabbit Muscle Aldolase
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
TBP	Tagatose-1,6-bisphosphate
TIM	Triose-phosphate isomérase

# CHAPITRE 1: Introduction

## 1.1 *Streptococcus pyogenes*

### 1.1.1 Histoire et classification des streptocoques

La première description de la croissance en chaîne de micro-organismes globulaires a été faite par le chirurgien Viennois Theodor Billroth en 1874 (Peuckert, 1985), à partir d'exsudats de blessures ouvertes infectées (Billroth, 2003). Ces mêmes organismes, finalement nommés *streptococci* (du grec *streptos*, tordable comme une chaîne, et *coccus*, micro-organisme sphérique), étaient presque au même moment isolés de la gorge de patients affectés de scarlatine, et du sang d'individus présentant la fièvre puerpérale (Whiffin, 1903). Bien qu'au prime abord, il ait semblé que chaque type de maladie streptocoquale soit causé par une variété différente de streptocoques, ce que semblait corroborer le nombre sans cesse grandissant de types différents isolés chez l'homme et chez l'animal, il devint bientôt clair que dans les faits une seule variété de streptocoques pouvait provoquer une multitude de maladies (Sherman et Albus, 1918; Evans, 1936). C'est Schottmuller puis Brown qui, en 1903 et 1919, proposèrent que les streptocoques soient classifiés selon leur capacité à hémolyser les érythrocytes (Schottmuller, 1903; Brown, 1919; Budelmann, 1969). Le terme alpha, bêta, et gamma hémolyse fut introduit quelques années plus tard. Il faut noter que la classification des streptocoques basée sur l'hémolyse est loin de faire l'unanimité (Horstmeier, 1973), et

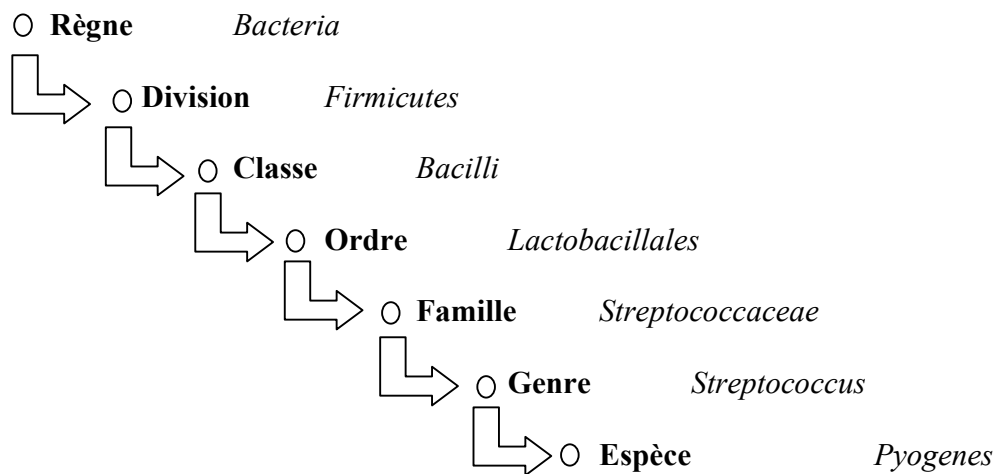
ce pour plusieurs raisons : certaines souches de certains streptocoques, considérées comme non hémolytiques après une incubation de 24 heures, peuvent présenter une alpha-hémolyse après 24 à 48 heures d'incubation supplémentaires (Jassim, 1989). De même, certaines variétés, considérées comme étant bêta-hémolytiques, sont en fait non hémolytiques dans certaines conditions (Orden, 1991). Malgré ces défauts, c'est ce système qui est le plus largement employé, encore de nos jours, pour classifier les streptocoques, l'un des plus large et hétérogène groupe du règne bactérien.

Dans les années 1930, Rebecca Lancefield s'attacha à avancer un peu plus la classification des streptocoques en différenciant quinze groupes immunologiques (A à O) parmi les streptocoques bêta-hémolytiques (Lancefield, 1933). C'est la nature d'un sucre sur la surface de la bactérie qui est immunogénique et discriminant. Le groupe A, au sein duquel sont retrouvés la majorité des streptocoques infectant l'homme, fut ensuite subdivisé en différents types antigéniques selon la nature d'une protéine de surface (Davis, 1973), et contient *S. pyogenes*.

### 1.1.2. Bactériologie de *S. pyogenes*

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

Tableau I : Taxonomie de *Streptococcus pyogenes*



Comme ses congénères du genre *Streptococcus*, l'espèce *S. pyogenes* se présente sous la forme de chaînes de cellules (Figure 1). *In vivo* néanmoins, elle est souvent trouvée sous forme de *diplococci*. Il semble en effet que la longueur de la chaîne soit inversement proportionnelle à la disponibilité en nutriments dans le milieu (Stollerman et Ekstedt, 1957). Après division d'un *coccus* individuel, si la paire résultante ou *diplococcus* ne se

sépare pas de ses voisines, il y a allongement subséquent de la chaîne. La préservation de la paroi intercoquale et donc la non-séparation du *diplococcus* du reste de la chaîne est promue par des conditions défavorables à la croissance (antibiotiques, manque de nutriments, froid par exemple), de même que par la présence d'anticorps contre les antigènes de la paroi de la bactérie (Iacono, 1985; Stollerman et Ekstedt, 1957; Lominski, 1968).

Les streptocoques sont des bactéries Gram-positive, du fait de la couleur mauve qu'elles adoptent après avoir été colorées à la coloration de Gram, coloration mettant en évidence des caractéristiques de la paroi cellulaire. D'après le critère d'hémolyse, l'espèce *Streptococcus pyogenes* est donc une bactérie bêta-hémolytique (Figure 1), c'est à dire qu'elle provoque la complète destruction des érythrocytes lorsque cultivée sur de l'agar contenant du sang (Brooks, 2007) (Figure 1). De plus, selon la classification de Lancefield, *S. pyogenes* fait partie du groupe A des streptocoques (Evans, 1936). Enfin, c'est une bactérie non motile, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas de flagelles moteurs, et elle ne forme pas de spores.



**A**



**B**



Figure 1 : A. Bêta-hémolyse sur agar contenant du sang

B. *S. pyogenes* en division sous le microscope, grossissement x 900 : Les chaînes de cellules sont caractéristiques du genre *Streptococcus* et lui ont donné son nom.

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

### 1.1.3 Constituants cellulaires, produits extra-cellulaires et virulence associée

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

Antigène C spécifique du groupe : La classification des streptocoques bêta-hémolytiques en quinze groupes immunologiques A à O se fait selon la présence de sucres (*carbohydrates* C) dans leur paroi cellulaire. Dans le cas du groupe A, le rhamnose-N-acetylgalactosamine peut constituer jusqu'à 10 % de la masse nette du micro-organisme (Fung, 1982). La spécificité immunologique du sucre réside principalement dans la nature du saccharide terminal sur la chaîne rhamnose, le N-acetylgalactosamine chez le groupe A (Coligan, 1975; Pritchard, 1981).

Antigène M spécifique du type : Chez les streptocoques bêta-hémolytiques, le groupe A peut être subdivisé en plus d'une centaine de types sérologiques selon l'antigène M protéique de leur paroi cellulaire (Bottone, 2006; Kahn, 2008). C'est l'un des plus notables facteurs de virulence de *S. pyogenes*, en effet responsable de la résistance de la bactérie à la phagocytose (Fischetti, 1989). L'absence de cette protéine chez un sérotype de *S. pyogenes* se traduit par un manque de virulence (Brooks, 2007).

La capsule d'acide hyaluronique : Un autre élément participant grandement à la virulence de la bactérie est sa capsule d'acide hyaluronique (Okamoto, 2004; Gryllos, 2008). Moins étudiée et peut-être un peu négligée du fait de son caractère évanescent (elle disparaît chez les cellules en culture artificielle, peut-être en raison de l'accumulation dans le milieu de l'hyaluronidase exprimée par la bactérie elle-même), et

non immunogénique (car indifférentiable chimiquement de l'acide hyaluronique des tissus conjonctifs de l'hôte), elle est néanmoins de première importance (Stollerman, 2008). De concert avec la protéine M, elle permet en effet à la bactérie de se jouer de la phagocytose.

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

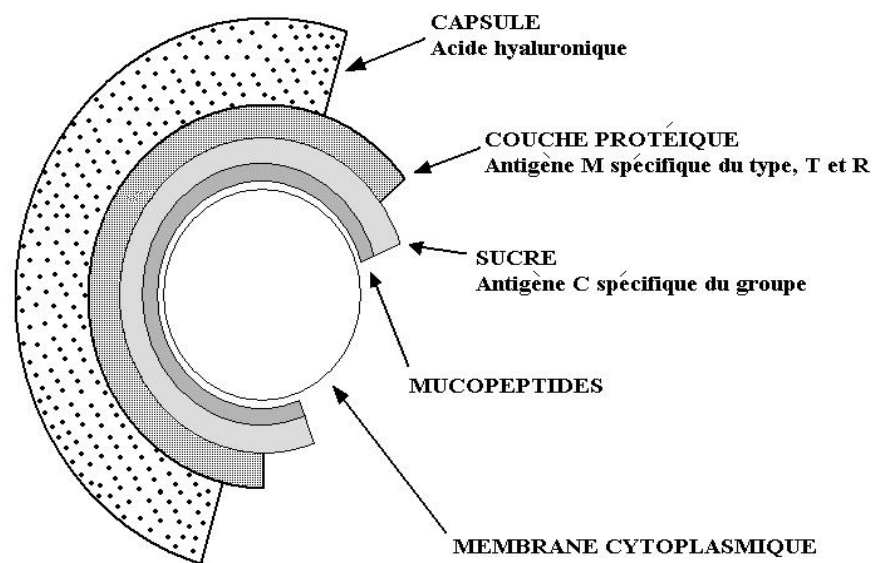


Figure 2 : Schéma des constituants cellulaires de *S. pyogenes*

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

Les toxines érythro- ou pyrogéniques : *S. pyogenes* exprime une variété d'exotoxines, dont les exotoxines A, B, C, G, H, J, K, et L (Bisno, 2003). Les exotoxines A et C par exemple, SpeA et SpeC (pour *Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A* et C), historiquement connues comme les toxines de la scarlatine, se lient au complexe d'histocompatibilité de classe II dans la région V $\beta$  du récepteur des cellules T. Elles agissent ainsi comme des super-antigènes et provoquent la destruction des tissus de l'hôte en stimulant la production incontrôlable de certaines cytokines, ce qui active différentes cascades fibrinolytiques et amène hypotension et défaillance polyviscérale (Oelschlaeger, 2000). Ces toxines sont de nature protéique (Dong, 2008; Fraser, 2008). La toxine B, ou SpeB, est une protéase à cystéine, qui est en fait la protéine la plus abondamment sécrétée par *S. pyogenes*. Elle a une activité endopeptidase et est capable de s'attaquer à la matrice extra-cellulaire de l'hôte, à ses immunoglobulines et aux composants de son complément immunitaire, en plus d'être à même d'indirectement stimuler la production de peptides au rôle biologique important, comme l'interleukine-1 ou encore l'histamine (Chiang-Ni, 2008; Bisno, 2003).

Les streptolysines S et O : Ces deux hémolysines sont responsables de la  $\beta$ -hémolyse caractéristique des streptocoques du groupe A. La streptolysine O doit son nom au fait qu'elle soit inactivée par la présence d'oxygène, alors que ce facteur n'a aucun effet sur la streptolysine S. On peut également ajouter que la streptolysine S, bien

que présentée ici comme une exotoxine, reste en fait largement attachée à la paroi cellulaire de *S. pyogenes* (Fontaine, 2003; Davis, 2006). La streptolysine O est, elle, strictement extra-cellulaire. Toutes deux peuvent, outre celle des érythrocytes, abîmer les parois d'autres cellules hôtes, comme les leucocytes et les macrophages (Goldman, 2009).

La streptokinase : Il en existe deux isozymes (A et B) au sein du groupe A des streptocoques. Il semble que cette enzyme digestive soit capable de s'attaquer aux barrières de fibrine érigées par l'hôte autour des lésions streptocoquales (Nelson, 2004), permettant la propagation extrêmement rapide de la bactérie (Chhatwal, 2005). Il est intéressant de noter que cette enzyme est l'un des facteurs les plus importants de la spécificité des infections streptocoquales pour l'homme : l'interaction de la streptokinase de la bactérie avec le plasminogène humain est en effet cruciale dans le cadre d'une pathogénèse streptocoquale (Sun, 2004).

La hyaluronidase : Cette autre enzyme digestive exprimée par *S. pyogenes* a un effet lytique sur les tissus conjonctifs de l'hôte, et lui permet donc également une propagation rapide (Hynes, 2000). Il est curieux de remarquer, comme cela a été déjà mentionné, que cette enzyme peut dans certains cas s'attaquer à la capsule d'acide hyaluronique de la bactérie elle-même, mais que chez certaines souches de la bactérie, l'enzyme exprimée ne soit pas assez active pour lui attribuer ce rôle. L'hypothèse de l'utilisation de l'acide hyaluronique (de l'hôte ou de la bactérie), comme source d'énergie alternative pour la bactérie a d'ailleurs récemment été formulée (Starr 2006).

*S. pyogenes* exprime et excrète de nombreuses autres protéines, comme des protéines de choc thermique, une streptodornase, une ADN dépolymérase, une ADNase, ou encore une  $\alpha$ -amylase (Nakamura, 2003)

Enfin, la simple sensibilité de la bactérie vis-à-vis de son environnement et de la disponibilité en nutriments constitue un mécanisme grâce auquel *S. pyogenes* peut progresser de la simple colonisation à la pathogénie caractérisée (Fung, 1992; Rosch, 2007; Shelburn, 2008; Loughman et Caparon, 2006).

### 1.1.3 Pathogénèse

Si *S. pyogenes* fait l'objet d'une attention toute particulière, c'est qu'elle est une bactérie extraordinairement versatile responsable d'une myriade de maladies, des plus bénignes aux plus dangereuses (Quinn, 1950; Cunningham, 2000). Bien que la bactérie soit présente sans conséquence chez jusqu'à 15 % de la population, ou porteurs sains, (Shet 2004), elle ne provoque des dommages sévères que si elle est capable de disséminer de son point d'infection initial et souvent superficiel jusqu'à des tissus plus profonds, *via* la circulation sanguine (Medina, 2003). Parmi les maladies purulentes, elle cause directement pharyngites et pneumonies par infection du conduit respiratoire, de même que l'impétigo par infection de la peau (Cvjetkovic, 2008; Shelburne, 2008; Papadas, 2008; Hedrick, 2003). Plus drastique et extrêmement rapide, le syndrome du choc toxique cause insuffisance respiratoire et défaillance polyviscérale, et entraîne la mort chez 30 % des patients (Luca-Harari, 2009; Thomas, 2008). C'est la production des exotoxines A ou C qui est associée à ce type d'infection létale. Ces protéines, excrétées par *S. pyogenes* se lient au récepteur des cellules T et agissent comme des super-antigènes (Fraser, 2008). Enfin, et c'est évidemment la pathologie qui frappe le plus les esprits, *S. pyogenes* conjointement avec les autres membres du groupe A des streptocoques, est également responsable de la *fasciitis necroticans*. Cette gangrène streptococcocale est une nécrose extrêmement rapide des tissus sous-cutanés, et a récemment valu à *S. pyogenes* l'appellation de « bactérie mangeuse de chair » (Weidle, 2009; Bingol-Kologlu, 2007; Gonzalez Castro, 2008). La pathogénèse de ces maladies suppuratives par *S. pyogenes* dépend en grande partie de sa faculté de propagation, et

donc repose sur sa hyaluronidase et sa streptokinase, facteurs qui la promeuvent. De même sa capacité à éviter la phagocytose grâce à sa capsule d'acide hyaluronique et à sa protéine M est cruciale (Olsen, 2009; Stollerman, 2008)

Enfin, il faut mentionner les maladies non purulentes post-streptocoquales, qui se manifestent donc après infection par *S. pyogenes* et en sont les séquelles. Ainsi, la fièvre rhumatismale endommage le muscle et les valves cardiaques chez les individus ayant préalablement développé une infection streptocoquale (Cunningham, 2008). Dans le cas de la glomérulonéphrite (Skattum, 2006), la réaction auto-immune observée pourrait être due aux exotoxines A et C, ou à la protéine M (Burova, 2003)

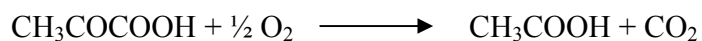


Table II : Infections et pathogénies de *S. pyogenes* (adapté de Aziz, 2008)

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

### 1.1.4 Métabolisme de *Streptococcus pyogenes*

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



l'énergie est essentiellement tirée du métabolisme du glucose avec l'acide lactique comme produit final de la voie (Brooks, 2007) (Figure 3).

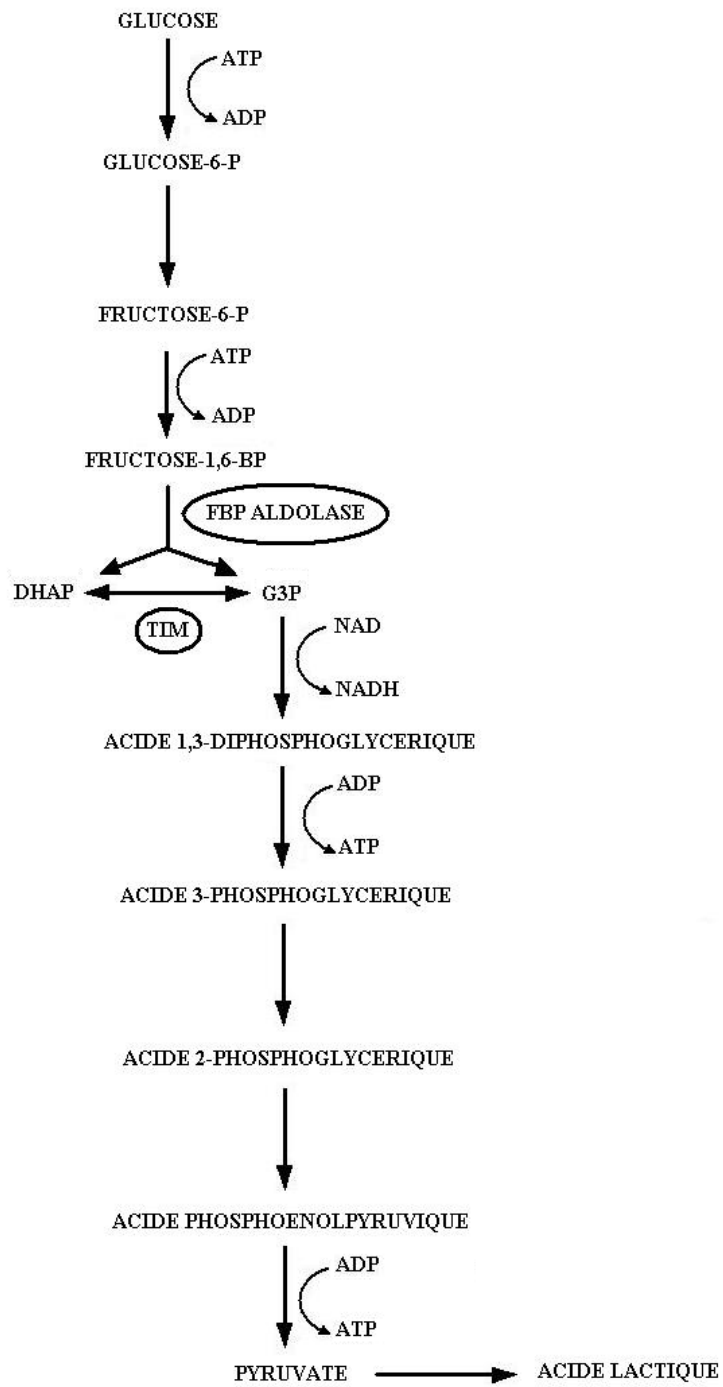


Figure 3 : Métabolisme du glucose de *Streptococcus pyogenes*

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

Des hexoses autres que le glucose, comme le mannose, le galactose et le fructose sont également utilisés par *S. pyogenes* (Salminen, 2004). Ces sucres s'insèrent dans la glycolyse au niveau du glucose-6-phosphate ou du fructose-6-phosphate après isomérisation ou phosphorylation. Le lactose est hydrolysé en ses moitiés glucose, ce dernier étant dirigé vers la glycolyse, et galactose. Le galactose néanmoins peut connaître deux sorts différents : la voie de Leloir, qui voit le galactose transformé en galactose-1-phosphate, en glucose-1-phosphate puis en glucose-6-phosphate qui peut ensuite rejoindre la glycolyse (Maxwell, 1962). Il peut également être métabolisé grâce à la voie du tagatose-6-phosphate après avoir été phosphorylé en galactose-6-phosphate (Steele, 1954) (Figure 4).

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

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

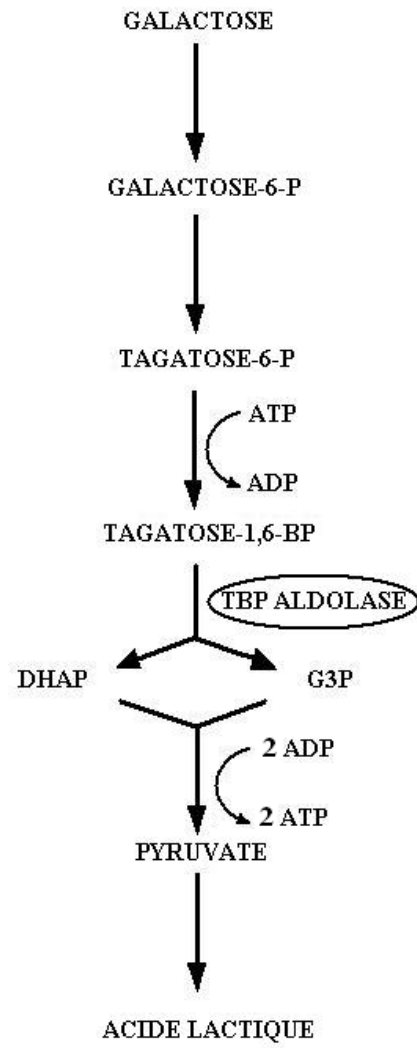


Figure 4 : Voie du tagatose-6-phosphate

## 1.2 Les aldolases

### 1.2.1. Généralités et classification :

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

Tableau III : Aldolases pyruvate-dépendantes (non exhaustif)

<b>Aldolase</b>	<b>Donneur</b>	<b>Accepteur</b>
$\gamma$ -Méthyle- $\gamma$ -hydroxy- $\alpha$ -ketoglutaric aldolase	Pyruvate	Pyruvate
2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase	Pyruvate	Glyoxylate
$\alpha$ -keto- $\beta$ -deoxyglutarate aldolase	Pyruvate	Glyoxylate
2-keto-3-deoxygluconate-6-phosphate aldolase	Pyruvate	Glycéraldéhyde-3-phosphate
2-keto-3-deoxygalactonate-6-phosphate aldolase	Pyruvate	G3P

Tableau IV : Aldolases DHAP-dépendantes (non exhaustif)

<b>Aldolase</b>	<b>Donneur</b>	<b>Accepteur</b>
Fructose-1,6-biphosphate aldolase	Dihydroxyacétone phosphate	G3P
Tagatose-1,6-biphosphate aldolase	DHAP	G3P
Fuculose-1-phosphate aldolase	DHAP	Lactaldéhyde
Rhamnulose-1-phosphate aldolase	DHAP	Lactaldéhyde

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

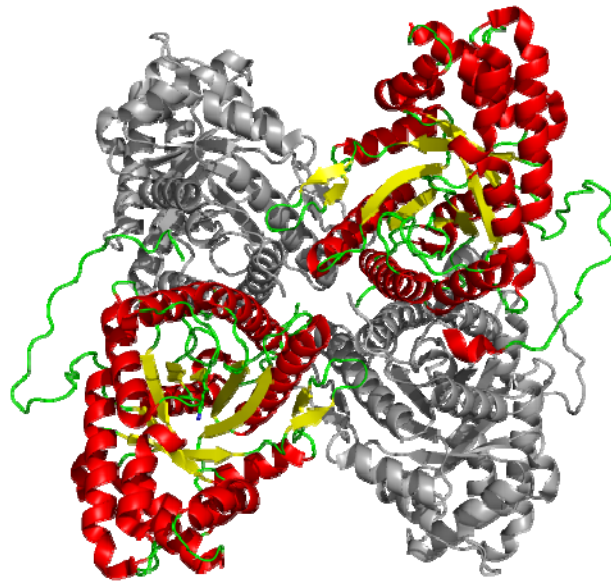
fortement remise en question aujourd'hui (Kroth, 2005; Lorentzen, 2005), notamment avec l'avènement d'une sous-classe d'aldolases qui consiste en une troisième famille de séquence primaire, la classe I des *Archae* (Lorentzen, 2004). Il est intéressant de noter que les deux classes d'enzymes, en plus de catalyser la même réaction, partagent en outre le même type de repliement, un tonneau  $(\alpha\beta)_8$  de type triose-phosphate isomérase. Cette caractéristique conforte l'hypothèse d'une évolution divergente des deux classes (Ramsaywak, 2004).



### **1.2.2 Structure tridimensionnelle :**

Les aldolases, environ 40 kilodaltons par sous-unité, se présentent généralement sous forme d'homotétramères d'environ 160 kDa (Lorentzen, 2005) pour les enzymes de classe I (Figure 5 A.), et d'homodimères d'environ 80 kDa pour celles de classe II (Galkin, 2009). Les deux classes d'aldolases présentent un repliement de type TIM. Le tonneau bêta, au centre de l'enzyme, est formé par les huit brins bêta parallèles séparés par les hélices alpha en enjambement à droite. C'est au cœur de ce tonneau que l'on trouve le site actif de l'enzyme (Figure 5 B.) (Figure et suivantes réalisées grâce au programme PyMOL (DeLano, 2002).

A



B

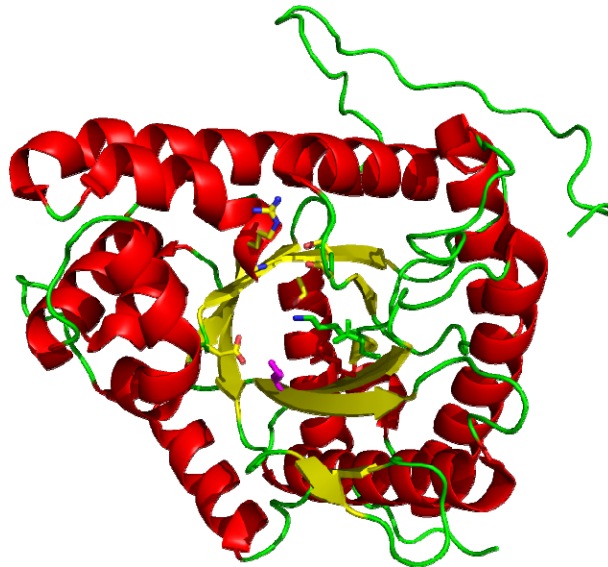


Figure 5 : A. Homotétramère de la FBP aldolase de muscle de lapin, vu parallèlement à l'axe du tonneau bêta. B. Sous-unité de la FBP aldolase de muscle de lapin vue parallèlement à l'axe du tonneau bêta. Les résidus du site actif, visibles au centre du tonneau, sont représentés en bâtonnets.

### 1.2.3 Site actif et mécanisme

L'aldolase de muscle de lapin, FBP aldolase de classe I, est depuis toujours le modèle de prédilection pour l'étude de cette classe d'enzyme. De multiples structures tridimensionnelles ont été déposées dans la PDB (codes 1ADO, 1ZAH, 1EWD, ou 6ALD), et son mécanisme catalytique est depuis peu complètement élucidé (St-Jean, 2005; St-Jean, 2007).

Dans le sens de la condensation du DHAP et G3P en FBP, la catalyse débute par la liaison covalente du DHAP au site actif *via* la Lys<sup>229</sup>. Lys<sup>229</sup> attaque nucléophiliquement le C2 du DHAP, et Glu<sup>187</sup> catalyse la formation de l'intermédiaire iminium, ce qui entraîne un rétrécissement conformationnel du site actif. La chaîne latérale de Arg<sup>303</sup> par exemple, est considérablement déplacée afin de lier électrostatiquement l'oxyanion du phosphate P1. Après avoir été activé par un transfert de proton séquentiel *via* une molécule d'eau, et stabilisé par Lys<sup>146</sup>, Tyr<sup>363</sup> peut ensuite abstraire stéréospécifiquement le proton pro-*S* du C3 de l'intermédiaire substrat-enzyme, produisant l'énamine. Glu<sup>187</sup> est ensuite protonné par un transfert de proton séquentiel, et peut à son tour activer le G3P arrivant en le protonnant en C4. Il y a ensuite attaque nucléophile du C3 de l'intermédiaire DHAP-enzyme sur le carbanion en C4 du G3P, ce qui génère un nouveau lien C-C. L'étape finale de ce mécanisme catalytique est évidemment la relâche du FBP (Figure 6) (St-Jean, 2007).

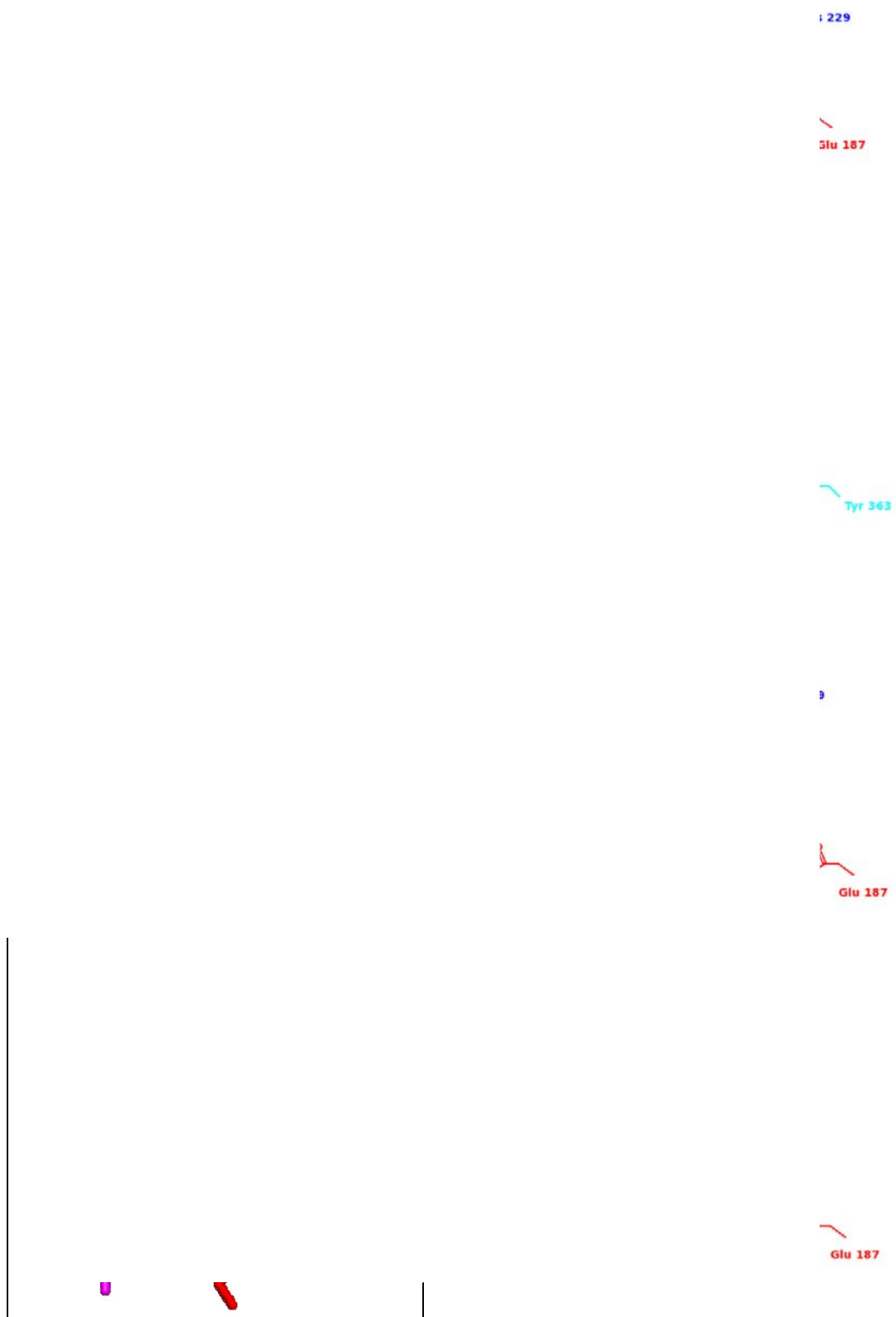


Figure 6 : Mécanisme simplifié de la catalyse par la FBP aldolase du muscle de lapin, avec son site actif en encadré (adapté de St-Jean, 2007)

Le phosphate P1 du DHAP est impliqué dans de nombreuses interactions stabilisatrices avec des résidus du site actif : outre Arg<sup>303</sup>, Ser<sup>271</sup>, Gly<sup>272</sup> et Gly<sup>302</sup> lient directement l'oxyanion phosphate. Enfin, l'hydroxyle C3 du DHAP et de FBP interagit avec Asp<sup>33</sup> et Lys<sup>146</sup> (St-Jean, 2007)

La liaison des substrats au site actif de la FBP aldolase de muscle provoque de plus d'importants changements conformationnels (St-Jean, 2005). Outre l'Arg<sup>303</sup> qui, comme vu précédemment, interagit directement avec l'oxyanion du phosphate P1 du DHAP, et qui, de la structure native à celle ligandée (DHAP ou FBP), présente un r.m.s.d. d'environ 0.7 Å, les régions comprises entre les résidus 33 à 65, et 302 à 329 montrent des r.m.s.d. pouvant aller jusqu'à 1.02 et 1.25 Å, respectivement.

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

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

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

bisphosphate, et le psicose-1,6-bisphosphate, quatre stéréoisomères énantiomères deux par deux (Bissett et Anderson, 1980).

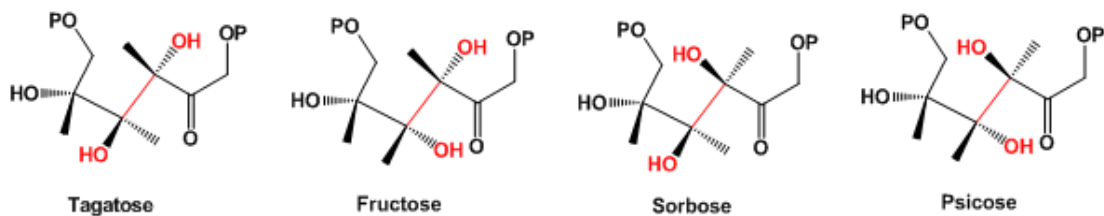


Figure 7 : Structures des quatre hexoses biphosphorylés clivés par la TBP aldolase de *S. pyogenes*

Un tel manque de spécificité relativement à la géométrie des carbones C3 et C4 des hexoses est extrêmement rare chez les enzymes en général, et les aldolases en particulier. En effet, les aldolases DHAP-dépendantes catalysent l'addition du DHAP sur une variété d'accepteurs aldéhydes (Tableau IV), mais le font en contrôlant finement la stéréochimie des deux nouveaux stéréocentres créés, le C3, résultant de l'addition du DHAP sur l'aldéhyde, et, dans une moindre mesure, le C4, résultant du C1 de l'aldéhyde (Shannon et Marcus, 1962; Meloche, 1973; Meloche, 1975). Certaines de ces aldolases, telle la fucose-1-phosphate aldolase par exemple, acceptent une multitude d'accepteurs aldéhydes (Meloche, 1970; Kroemer, 2003) et démontrent donc une faible spécificité au niveau du C4, dont la stéréochimie dans le produit de condensation résulte de la celle de l'accepteur aldéhyde (Ghalambor et Heath, 1962;

Espelt, 2005). Toutefois, la stéréospécificité relativement au C3 est, elle, strictement conservée (Takayama, 1997; Fessner, 1998). Aucune structure tridimensionnelle de TBP aldolase de classe I n'ayant été déposée à ce jour, les informations structurales concernant cette enzyme et pouvant aider à comprendre son manque extraordinaire de stéréospécificité sont donc manquantes.



### 1.2.5. LacD.1 : un régulateur de l'expression génétique ?

Pour terminer, au-delà de son activité purement métabolique, la TBP aldolase de *S. pyogenes* pourrait également démontrer un rôle de senseur et par extension, de régulateur de virulence chez la bactérie (Loughman et Caparon, 2006). Il est déjà connu que des enzymes glycolytiques, comme l'hexokinase, la lactate déshydrogénase ou encore la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, ont été adaptées afin de jouer un rôle de régulation de l'expression génétique chez certains organismes (Kim et Dang, 2005). L'autre isozyme de la TBP aldolase chez *S. pyogenes*, la TBP aldolase 1, ou LacD.1, avec laquelle elle partage 72.6 % d'identité de séquence, serait pour sa part capable de lier directement RopB, un facteur impliqué dans la régulation du métabolisme du streptocoque, et dans l'activation de l'expression de certains gènes impliqués dans sa virulence, dont celui codant pour SpeB (Loughman et Caparon, 2006; Loughman et Caparon, 2007). Le gène codant pour cette protéase à cystéine est l'un des plus hautement exprimé *in vivo* lors d'une infection par *S. pyogenes*, et répond à différents signaux environnementaux. Or, le mutant LacD.1<sup>-</sup> n'est plus sensible à ces signaux, et présente une expression aberrante de SpeB, phénotype complètement corrigé par l'introduction d'un plasmide codant pour LacD.1. Dans le modèle proposé, la liaison de LacD.1 à ses substrats, DHAP et G3P, en conditions d'excès d'énergie *via* la glycolyse, y induirait un changement conformationnel qui lui permettrait de séquestrer RopB, inhibant ainsi l'activation des gènes cibles de RopB. Ce rôle de senseur métabolique et de régulateur de virulence serait donc subordonné aux différents changements conformationnels adoptés par cette aldolase après liaison du substrat. La

résolution de la structure native et ligandée de cette TBP aldolase de classe I pourrait donc permettre d'identifier les régions les plus mobile et les plus susceptibles d'être liées à cette facette de la TBP aldolase de *S. pyogenes*.

### 1.3 Objectif du projet de recherche

La tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, du fait de son manque singulier de stéréospécificité, est une exception dans le monde des enzymes. De plus, son rôle putatif de régulateur de l'expression génétique de *S. pyogenes* pourrait avoir une part dans la virulence de cette bactérie. Son appartenance à la classe I des aldolases signifie qu'elle catalyse le clivage réversible de quatre hexoses biphosphorylés *via* la formation d'une base de Schiff. Bien qu'une structure en trois dimensions d'une tagatose-1,6-bisphosphate aldolase ait déjà été déposée dans la PDB, il s'agissait d'une classe II dont le mécanisme est donc par essence différent de celui de la TBP aldolase de *S. pyogenes*. Les informations structurales concernant les résidus du site actif impliqués dans la catalyse ou les régions mobiles peut-être liées au rôle de senseur métabolique étant très fragmentaires, nous avons décidé de tenter de remédier à cette situation en initiant une étude structurale de l'enzyme. L'objectif principal de ladite étude était donc de déposer la première structure d'une tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de classe I, native tout d'abord, et en complexe avec l'un de ses substrats ensuite. La résolution de ces deux structures permettant de se représenter un peu mieux la topologie du site actif et l'identité des résidus catalytique, des études de cinétique enzymologique ont ensuite été entreprises afin de mieux cerner les modalités de la catalyse. Une cinétique suivant l'oxydation de l'intermédiaire enzyme-substrat suivies par réduction de l'indicateur hexacyanoferrate III a ainsi été réalisée. Enfin, le stéréoisomérisme du transfert de

proton a été étudié grâce à une cinétique de marquage isotopique et l'utilisation d'eau tritiée et de DHAP marqué.

## **1.4 Méthodes**

### **1.4.1 Purification et cristallisation de la TBP aldolase de *S. pyogenes***

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

La cristallisation de la protéine est réalisée grâce à la méthode de la goutte pendante. La solution de 5 milligramme par millilitre de protéine est mélangée à proportion égale avec la solution précipitante. La goutte ainsi obtenue est suspendue dans le puit

hermétique d'une plaque de cristallisation dont le fond contient environ 1 millilitre de la solution précipitante. Après équilibration du système *via* l'évaporation de l'eau contenue dans la goutte, la supersaturation est atteinte. En effet, l'évaporation progressive de l'eau de la goutte permet d'y augmenter de manière tout aussi progressive la concentration en protéine et en agents précipitants (Figure 8). Il y a alors nucléation de la protéine, ce qui a pour effet d'en faire diminuer la concentration en solution dans la goutte. Les cristaux de TBP aldolase commencent de croître.

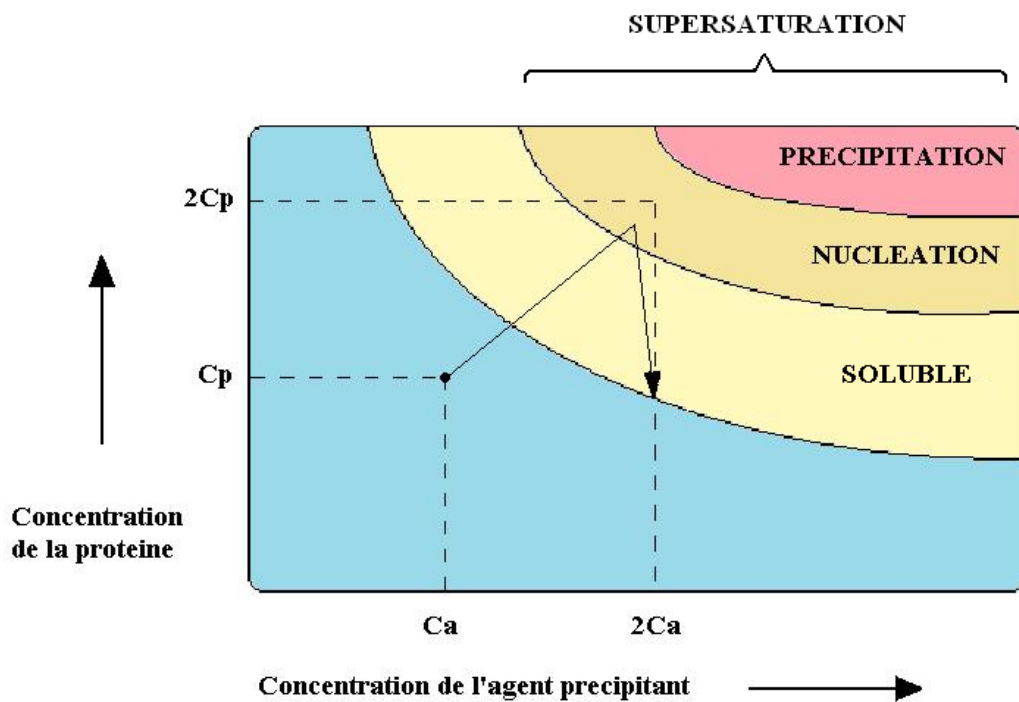


Figure 8: Diagramme de phase selon la concentration en protéine et en agent précipitant. Le chemin emprunté par le système lors d'une expérience de goutte pendante, par évaporation de l'eau contenue dans la goutte et équilibration avec le réservoir contenant la solution précipitante, est représenté par une flèche.

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



Figure 9 : Cristaux de TBP aldolase après 48 heures de croissance

#### 1.4.2 Diffraction des rayons X

Après trois jours environ, les cristaux ainsi obtenus sont suffisamment gros et surtout épais pour l'expérience de diffraction des rayons X. Les cristaux choisis pour la diffraction sont trempés dans une solution à hauteur de 20 % de cryoprotectant, du glycérol en l'occurrence, et dans une solution saturante de ligand le cas échéant. Dans le cas de la structure de la TBP aldolase complexée au DHAP, une solution de 5 mM de DHAP a ainsi été utilisée. Le cristal est ensuite congelé par immersion immédiate dans de l'azote liquide, et soumis au flux de rayons X. La congélation du cristal permet de minimiser les dommages causés par le faisceau de photons de haute énergie, et la cryoprotection permet elle d'éviter la formation de glace dommageable à l'analyse des résultats. Le patron de diffraction ainsi obtenu (Figure 10) est ensuite analysé grâce à des programmes informatiques (Otwinowski, 1997), réduit et utilisé pour résoudre la structure en trois dimensions de la protéine. La structure native de la TBP aldolase de *S. pyogenes* a été résolue grâce à un modèle préalablement construit par *Multiple-wavelength Anomalous Dispersion phasing*. Ce modèle initial a servi de départ à un remplacement moléculaire dont le résultat, après de multiples étapes d'affinement, est la structure native de la TBP aldolase (code pdb). Le trempage de cristaux de la TBP aldolase dans une solution saturante de DHAP a de même permis de piéger un intermédiaire réactionnel enzyme-substrat, soit la structure de la TBP aldolase liée au DHAP (code pdb).

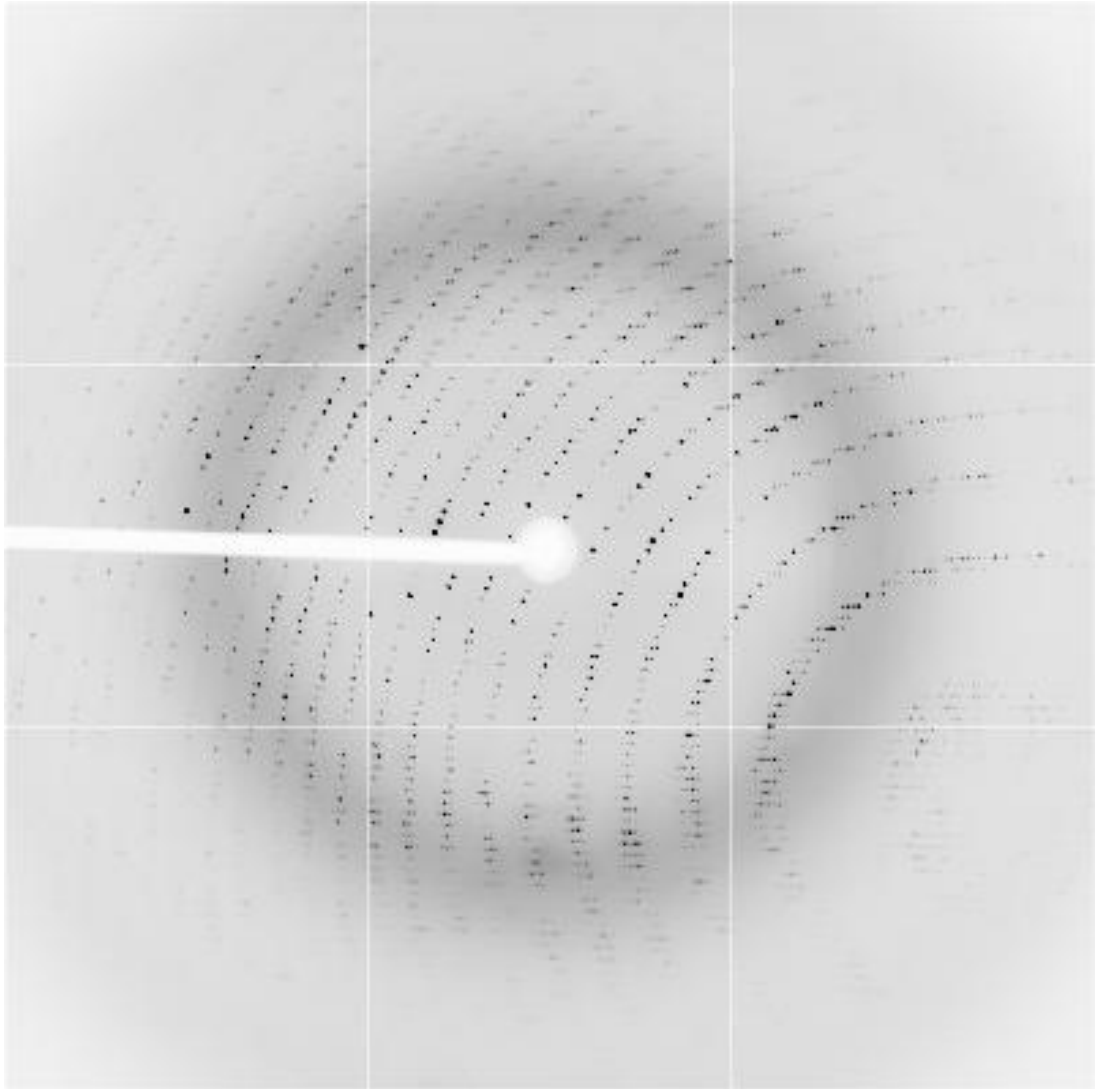


Figure 10 : Patron de diffraction de la TBP aldolase de *S. pyogenes*, collecté au faisceau X29 du *Brookhaven National Laboratory*, NY.



### 1.4.3 Hexacyanoferrate III

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

### 1.4.4 Marquage isotopique

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

### 1.4.5 Chromatographie sur papier

Afin de vérifier la capacité de la TBP aldolase de *S. pyogenes* à produire du tagatose-2P, du fructose-2P, du psicose-2P et du sorbose-2P à partir de DHAP et G3P, des quantités catalytiques de l'enzyme ont été incubées la nuit durant en présence de TBP et de FBP. Le mélange réactionnel a ensuite été débarrassé de toute trace d'enzyme par l'utilisation d'un appareillage de filtration Amicon, et les ketohexoses résultant déphosphorylés grâce à de la phosphatase acide provenant du germe du blé. Un dispositif de chromatographie descendante sur couche mince a ensuite été mis à contribution : après l'avoir à nouveau soumis à une filtration sur Amicon de manière à en ôter la phosphatase acide, une microgoutte du mélange réactionnel a été déposée sur du papier à chromatographie Whatman numéro 1 (Bissett et Anderson, 1980). Des standards de chacun des ketohexoses attendus y ont également été apposés, et la feuille de papier introduite dans le dispositif de chromatographie descendante.

Après une migration d'environ cinq heures, la feuille de papier séchée a été traitée au spray d'orcinol, puis chauffée à 100°C afin de révéler la position des sucres.

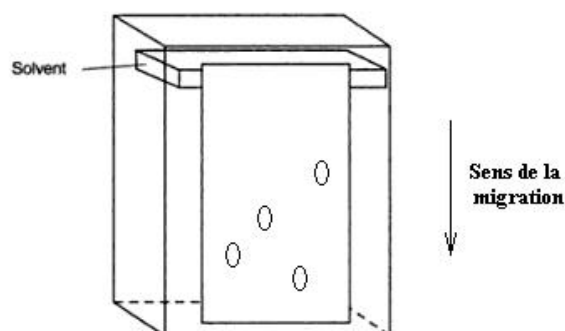


Figure 11 : Dispositif de chromatographie descendante sur couche mince

**CHAPITRE 2 : Article**

**STRUCTURE OF A CLASS I  
TAGATOSE-1,6-BIPHOSPHATE ALDOLASE :  
STUDY INTO AN APPARENT LOSS OF  
STEREOSPECIFICITY**

**Clotilde LowKam, Brigitte Liotard, and Jurgen Sygusch<sup>1</sup>**

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

<sup>1</sup>Correspondance to: Jurgen Sygusch, CP 6128, Station Centre Ville, Montréal  
H3C 3J7, Quebec, Canada. Tel.: 514-343-2389; Fax: 514-343-6463

## Abstract

Tagatose-1,6-bisphosphate (TBP) aldolase from *Streptococcus pyogenes* is a class I aldolase that exhibits a remarkable lack of chiral discrimination with respect to the configuration of hydroxyl groups at both C3 and C4 positions. The enzyme catalyzes the reversible cleavage of four diastereoisomers: fructose-1,6-bisphosphate (FBP), psicose-1,6-bis-phosphate, sorbose-1,6-bisphosphate and tagatose-1,6-bisphosphate to dihydroxyacetone-P and D-glyceraldehyde 3-P with high catalytic efficiency. To investigate its enzymatic mechanism, high resolution crystal structures were determined of both native enzyme and native enzyme in complex with dihydroxyacetone-P. The electron density map revealed a  $(\alpha/\beta)_8$  fold in each dimeric subunit. Flash cooled crystals of native enzyme soaked with dihydroxyacetone-P trapped a covalent intermediate with carbanionic character at Lys<sup>205</sup>, different from the enamine mesomer bound in stereospecific class I FBP aldolase. Structural analysis indicates extensive active site conservation with respect to class I FBP aldolases including conserved conformational responses to DHAP binding and conserved stereospecific proton transfer at the DHAP C3 carbon mediated by a proximal water molecule. Exchange reactions with tritiated water and tritium labelled DHAP at C3 hydrogen were carried out in both solution and crystalline state to assess stereochemical control at C3. The kinetic studies show labelling at both pro-*R* and pro-*S* C3 positions of DHAP yet detritiation only at the C3 pro-*S* labelled position. Detritiation of the C3 pro-*R* label was not detected and is consistent with preferential *cis-trans* isomerism about the C2-C3

## **bond in the carbanion as the mechanism responsible for C3 epimerization in TBP aldolase.**

### **Introduction**

Aldolases are crucial enzymes in living organisms because of their role in essential metabolic pathways such as gluconeogenesis and glycolysis. Their ability to control the stereochemistry of one of the most important biochemical transformation, the carbon-carbon bond formation, makes them models for *de novo* preparation of carbohydrates (1), and ideal alternatives to traditional methods in synthetic organic chemistry (2, 3, 4). Tagatose-1,6-bisphosphate (TBP) aldolase is an inducible enzyme which, although demonstrating greatest affinity for D-tagatose-1,6-bisphosphate, can also use as substrate the bisphosphorylated D-hexose stereoisomers: sorbose-P2, psicose-P2 and fructose-P2 (5). The four sugars are diastereoisomers and differ in stereochemistry at carbon 3 and at carbon 4 with respect to the configuration of their hydroxyl groups. The cleavage of the four sugars produces glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP), while the condensation of G3P and DHAP produces a mixture of the four D-hexoses in *Staphylococcus aureus* (5). Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolases, on the other hand, are constitutively expressed and catalyze generally a highly stereospecific reaction, although exceptions have been reported (6).

Aldolases are broadly categorized with respect to their catalytic mechanism into two classes. Class I aldolases are characterized by formation of a covalent Schiff base

intermediates (7, 8), while class II aldolases are metallo-dependant enzymes and use a divalent transition metal ion to polarize the substrate ketose (9, 10). Of all aldolases, class I FBP aldolase from rabbit muscle has been the most extensively studied (11) and its catalytic mechanism implicates a protonated Schiff base or iminium formed between the lysine residue in the active site of the enzyme and a ketose substrate (12). To form the FBP C3-C4 bond in aldol condensation, the enzyme stereospecifically abstracts the pro-*S* C3 proton of the iminium intermediate formed with DHAP (13, 14, 15), thereby generating the carbanionic character at C3 of DHAP for the aldol reaction. The nascent carbon-carbon bond has the same orientation as the pro-*S*  $\alpha$ -hydrogen initially abstracted from the DHAP imine intermediate; the carbanion *si* face being subjected to a nucleophilic attack by the *si face* of the incoming G3P aldehyde. The overall retention of configuration requires that proton abstraction to yield the enamine and condensation with the aldehyde must take place from the same direction on the enzyme (16). The iminium intermediate formed is then hydrolyzed and FBP is released. Similarly, in L-rhamnulose-1-phosphate aldolase, the attack by the *re face* of L-lactaldehyde on the *re face* of DHAP yields rhamulose-1-phosphate (17, 18) and also retains configuration.

Racemic aldol condensation products with respect to the configuration at C4 have been noted in a number of class I or class II aldolases. In 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase, a class I aldolase (19) and  $\alpha$ -keto- $\beta$ -deoxyhexarate aldolase, a class II enzyme (20), racemisation occurs at C4 of their condensation product, yielding (4-*RS*)-2-keto-4-hydroxyglutarate from pyruvate and glyoxalate (21). The epimerisation at the C4 hydroxyl is a result of the random orientation of the aldehyde during stereofacial attack on the enzyme-bound pyruvate by either the *si* or *re* face of the incoming aldehyde.

Similarly, analysis of condensation products in a stereoselectivity study of L-fuculose-1-phosphate aldolase, a DHAP dependent class II aldolase, showed stereofacial attack on the bound DHAP with stereochemistry at the C4 position in products controlled by the chemical nature of the attacking aldehyde (22). In contrast, configuration at both C3 and at C4 is not retained in the catalytic mechanism of the class I TBP aldolase from *S. aureus*, given that aldol condensation yields a mixture of sorbose-P2, psicose-P2, fructose-P2 and tagatose-P2 (5)<sup>i</sup>. Attempts have been made to switch specificity of class II TBP aldolases; however these have been met with limited success (23, 24).

Three-dimensional structures of class I FBP aldolases have been determined from different organisms and correspond to a subunit ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> barrel fold for aldolase tetramer (25, 26, 27). Reaction intermediates have been characterized particularly in FBP aldolases (28) and have provided a detailed description of the catalytic mechanism at the molecular level, including a structural explanation for stereospecific proton exchange at C3 (11). For TBP aldolase, only a single structure has been reported: a class II tetrameric enzyme from *Escherichia coli* also displaying a ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> barrel fold in complex with a putative enediolate transition state intermediate (29). This enzyme has reduced substrate specificity at C4 and can cleave both TBP and FBP substrates, which was attributed to an active site that is more open at the G3P binding side, hence affording more conformational freedom to different aldehyde binding modes. Insight into how class I TBP aldolase catalyze racemic aldol condensation products at the molecular level has been hampered by an absence of structures of reaction

---

<sup>i</sup> This observation was verified for *S. pyogenes* TBP aldolase and is described in Experimental Procedures.

intermediates. We thus initiated high resolution crystallographic studies of class I TBP aldolase from *Streptococcus pyogenes* in conjunction with isotopic labelling studies to investigate its reaction mechanism and the structural basis for the apparent loss of stereospecificity.

Here, we present the three-dimensional structure of a native class I TBP aldolase, as well as its complex with DHAP using TBP aldolase crystals incubated in the presence of DHAP. Flash cooling of a native TBP aldolase crystal soaked in a saturating DHAP solution trapped a covalent reaction intermediate. The complex structure revealed conformational changes upon binding whereby the active site undergoes asymmetrical narrowing that grasps DHAP. The location of an invariant water molecule within close contact of the DHAP C3 carbon in the trapped intermediate underscored a stereospecific proton transfer mechanism conserved in Schiff base forming aldolases.

The extent of stereochemical control in class I TBP aldolases with respect to C3 epimerization was also examined in both solution and crystalline state. Catalytic proton transfer was assessed by the lability of the pro-*R* and pro-*S* C3 hydrogens of DHAP to exchange in tritiated water, and by stereospecific loss of label at either C3 hydrogen of DHAP. The proton exchange studies in conjunction with the structural data afforded identification of the carbanion as the dominant steady state reaction intermediate and indicated *cis-trans* isomerism about the carbanion C2-C3 bond in explaining the loss of stereospecific proton exchange at the DHAP C3 carbon in TBP aldolase. These findings stand in contrast to the highly stereospecific proton exchange mechanism found in class I FBP aldolases and point to rotational isomerisation in specific reaction intermediates as an evolutionary simple solution capable of generating enantiomeric promiscuity.



## Experimental Procedures

*Purification & Crystallization:* Plasmid pKK-223-3 with T7 IPTG-inducible promoter and coding for the *lacD2* gene product from *Streptococcus pyogenes*, tagatose-1-6-biphosphate aldolase 2, was transformed and overexpressed using the JM109 strain (Promega) in *Escherichia coli*. Recombinant TBP aldolase was purified to homogeneity using a three steps chromatographic protocol as reported previously (30). Briefly, cells were lysed at 4°C and the lysate was applied onto an anion-exchange column (DEAE Sepharose Fast Flow) and eluted with a NaCl gradient at pH 7.5. Enzymatic activity was determined by following NADH oxidation at 340 nm using a coupled assay (31). The active fractions were dialyzed overnight against a solution of 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 and then applied onto a hydrophobic affinity column (Phenyl Sepharose, Amersham Biosciences). TBP aldolase was eluted using a continuous gradient of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The active fractions were then dialyzed overnight against a precipitating solution of 90 % saturating (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, pH 7.0, and then applied after resolubilization onto a size exclusion column (Superdex<sup>TM</sup> 200, Amersham Biosciences). The purified protein was precipitated overnight using the same 90 % saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, pH 7.0 solution as before, and stored at 4°C. Yields corresponded to ~ 50 mg of purified enzyme per liter of *E. coli* culture.

TBP aldolase crystals were grown using the hanging drop method, from a 1:1 mixture of protein solution (initial concentration 5 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0) and precipitant buffer (9-11% polyethylene glycol 4000 in 0.2 M Calcium Acetate and 0.1 M Tris-acetic acid, pH 7.5) that was equilibrated against a reservoir of precipitant.

*Cleavage Assay:* The substrate cleavage rate was determined by measuring the decrease in  $A_{340}/\text{min}$  in a coupled assay. Aldolase was diluted in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and added to a cuvette containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.16 mM NADH, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  glycerol-3-phosphate dehydrogenase / triose-phosphate isomerase. Assays (1 mL) were performed in triplicate at 23°C following addition of substrate. The cleavage rate for FBP and TBP substrates was measured over a substrate concentration range of 1 - 5000  $\mu\text{M}$ , using 1  $\mu\text{g}$  of wild type enzyme. TBP aldolase concentration was determined by BCA protein assay reagent (Pierce), with bovine serum albumin serving as a standard.

*Data Collection and Processing:* TBP aldolase crystals were soaked in DHAP buffer (mother liquor plus 5 mM DHAP) for 5 minutes. Crystals were then mounted in nylon cryoloops (Hampton Research) after brief immersion in cryoprotectant (mother liquor plus 5 mM DHAP plus 20% glycerol) and then immediately flash cooled in a nitrogen-gas stream at 100 K. Diffraction data were collected at beamlines X25 of the National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, NY). A native dataset was also collected at beamline X29. Data indexing and integration was performed using HKL2000 (32).

*MAD phasing and Refinement:* The three-dimensional structure of TBP aldolase from *Streptococcus pyogenes* was solved using MAD phasing on previously collected data of a SeMet crystal (30). The three different wavelengths (inflexion, peak and remote) MAD datasets allowed the program SOLVE (33) to determine the positions of 5 selenium atoms out of 6 possible in each protomer, and to estimate initial protein phases. Solvent flattening with the program RESOLVE (34) yielded an interpretable

electron density map calculated at 2.6 Å resolution. Iterative cycles of chain tracing using O (35) and model refinement using the Crystallography and NMR System (CNS) (36) defined a trace of the polypeptide backbone that refined to  $R_{\text{cryst}}$  ( $R_{\text{free}}$ ) values of 0.246 (0.290).

*Molecular replacement and Refinement:* Native free TBP aldolase crystallized in the  $P2_12_12_1$  space group with four protomers in the asymmetric unit and diffracted to 1.87 Å resolution; the structure was obtained by molecular replacement using the initial MAD phased model as a search probe. The structures were subjected to iterative rounds of refinement (simulated annealing and minimization) with CNS and Phenix (37), and model building using O and Coot (38). Water molecules were initially added automatically by CNS and Phenix and by manual addition in subsequent rounds. The final model has 322 residues per subunit, 2031 water molecules and 7 atoms of calcium.

The liganded crystal structure was isomorphous with the crystal structure of the native aldolase and diffracted to 1.92 Å resolution. Initial phases used for model building of the liganded structure were obtained by molecular replacement using the MAD phased model for the TBP aldolase as a search probe. The polypeptide trace of the liganded structure was determined using the same model building and refinement protocol as described for the native enzyme. DHAP was refined as a covalent intermediate bound to Lys<sup>205</sup> bound in all four protomers.

Structure refinement used all reflections having an  $I/\sigma(I) > 1$ , however electron density maps were calculated to the resolution indicated in Table 1 to ensure at least ~80% completeness in the highest resolution shell with an  $I/\sigma(I) > 2$ . The PRODRG server was used to generate ligand topology and parameter files (39). The presence of

ligands in the final models was confirmed by inspection of simulated annealing  $F_o-F_c$  omit maps. Final model statistics, calculated with CNS and MolProbity are shown in Table 1. The atomic coordinates and structure factors for native and DHAP bound TBP aldolases have been deposited with the Protein Data Bank (PDB # xxxx, PDB # yyyy, respectively). The final structure models have  $R_{cryst}$  ( $R_{free}$ ) values of 0.175 (0.218) and 0.161 (0.199), respectively. The corresponding positional errors in atomic coordinates using Maximum Likelihood plots were estimated to be 0.21 Å and 0.17 Å, respectively. Errors in hydrogen bond distances and positional differences are reported as standard deviations and were estimated based on their value in each aldolase protomer unless specified otherwise. Inter-subunit variability among the four protomers in the asymmetric unit cell was analyzed by the program Polypose (40) and yielded rms differences, based on  $C_\alpha$  atom coordinates, that were less than the error in the atomic coordinates for each structure. All figures were prepared using the program PyMOL (41).

Chemical identity of the enzymatic intermediate trapped in the DHAP-TBP aldolase structure was determined with the program O (35), using a simulated annealing omit map. The real space statistic  $R_{fact}$  was calculated in O (RS\_FIT function) to evaluate the fit of Lys<sup>205</sup> N $\zeta$  and C $\epsilon$  atoms, and DHAP C1, C2, C3 and O3 atoms modelled as enamine and iminium forms to the electron density. The discrimination between those two chemical species was made using Student's  $t$  test comparing pairwise  $R_{fact}$  statistics in each subunit with bound DHAP refined as either iminium/carbanion or enamine form (11).

*Superpositions:* Superpositions of the native and liganded structures of the TBP aldolase from *S. pyogenes* were performed with the program PyMOL overlaying C $\alpha$  atom coordinates of TBP aldolase residues 100-230, which were invariant to binding events based on difference matrix plot analysis. Difference distance matrix plots were produced using the DDMP program from the Center for Structural Biology at Yale University (New Haven, Connecticut, USA). R.m.s.d. of coordinates was calculated using C $\alpha$  atoms for the appropriate residues.

Superposition of the TBP aldolase structures onto the FBP rabbit muscle aldolase structure was performed using PyMOL and Swiss-PdbViewer (42). For the active site comparison, C $\alpha$  atoms of conserved residues in TBP and FBP aldolase active sites in proximity of the Schiff-base forming lysine residue were overlaid using PyMOL, while the Fragment Alternate Fit function of the Swiss-PdbViewer program was used for sequence alignment comparison of the overall fold.

A Blast search (NCBI BLAST2) was performed against the UniprotKB database with the *S. pyogenes* aldolase sequence (accession number P63706) to identify orthologues. Orthologue sequences were submitted to SWISS-MODEL workspace for three dimensional model building (43).

*Detection of ketohexoses:* To verify the ability of *S. pyogenes* TBP aldolase to form the hexose 1,6-bisphosphates: tagatose-1,6-bisphosphate, fructose-1,6-bisphosphate, sorbose-1,6-bisphosphate and psicose-1,6-bisphosphate, from DHAP and G3P, catalytic amounts of the enzyme were incubated in presence of TBP or FBP overnight. Wheat germ acid phosphatase was used to dephosphorylate the phosphated ketohexoses, and the resulting mixture was then spotted onto Whatman # 1 chromatography paper (5).

Spots corresponding to migration of sugar molecules were identified using an orcinol spray. Four spots were detected and their migration pattern corresponded to the ketohexoses: fructose, tagatose, sorbose and psicose, used as reference standards for migration.

*Hexacyanoferrate (III) oxidation of trapped DHAP:* The rate of hexacyanoferrate (III) reduction was monitored by the decrease in absorbance at 420 nm (44). The initial rate of reaction was concentration dependant and followed saturation kinetics. The reaction mixture contained 1.0 mM hexacyanoferrate (III) in 0.1 M Tris-hydrochloric acid at pH 8.0, and either 0.05 - 5 mM TBP or 0.05 - 5mM FBP or 0.05 - 5 mM DHAP and was started at time zero by addition of TBP aldolase (final concentration 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to the cuvette. The concentration of reduced indicator formed was calculated from absorbance readings at  $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ , with molar absorption  $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . The rate of decrease in absorbance was measured within the first 30 seconds at 23°C.

*Proton Exchange:* Tritium was used as tracer to measure label incorporation at the DHAP C3 hydrogen catalyzed by TBP aldolase in solution and in crystals. Incorporation of the label at (*S*)-C3 and (*R*)-C3 of DHAP was determined using an ion exchange protocol (Dowex  $\text{Cl}^-$  resin) described previously (16). Stereospecific deprotonation at DHAP C3 by rabbit muscle aldolase and triose isomerase was used to determine extent of stereospecific labelling as (*S*)-[3- $^3\text{H}_1$ ]DHAP and (*R*)-[3- $^3\text{H}_1$ ]DHAP, respectively (16). Label released as tritiated water (detrification) was determined as previously described and quantitated to assess epimerisation at C3 by TBP aldolase.

DHAP labelled as (*S*)-[3- $^3\text{H}_1$ ]DHAP or (*R*)-[3- $^3\text{H}_1$ ]DHAP from tritiated water (tritiation) was prepared using the ability of FBP aldolase and triosephosphate

isomerase to stereospecifically label pro-*S* and pro-*R* C3 positions of DHAP, respectively. Detritiation catalyzed by TBP aldolase in solution and in crystals was followed by appearance of label as tritiated water from (*S*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP or (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP using the same ion exchange protocol. Rates of label exchange were determined under conditions corresponding to initial rate kinetics.

Aliquots of soluble TBP aldolase ranging from 1-5 μg made up in 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.0, were used for the exchange studies. For the tritiation experiments, 20 mM DHAP and 5 mCi T<sub>2</sub>O (average specific activity of 70884 cpm/micromole) were added to the mixture and incubated for 1 to 10 minutes at room temperature. For the detritiation experiments, 4 mM DHAP and 1 mM of DHAP labelled at either pro-*R* or pro-*S* position of carbon C3 (average specific activity of 2053 cpm/micromole), were added and incubated for 1 to 10 minutes at room temperature. For tritiation and detritiation by TBP aldolase in the crystalline state crystals (~ 25 x 75 x 20 microns average dimensions) were washed three times in fresh mother precipitant solution, then incubated in the same tritiation and detritiation mixtures as was the soluble protein. Quantities of crystalline TBP aldolase used, ranged from 38 - 51 μg, and incubation times, from 10 minutes to 4 hours. The amount of crystalline enzyme used and incubation times was greater compared to soluble TBP aldolase to ensure sufficient count rates that were significant above background. Net count rates were calculated by subtracting background count rate measured in the absence of enzyme. Background represented < 0.1 % of the lowest exchange rate measured in the presence of soluble enzyme and between 25-50% of the count rate in presence of crystalline

enzyme. The final assay volume was 1 mL, and 300  $\mu$ L aliquots were used for analysis. Exchange rates were measured in triplicate with both soluble and crystalline enzyme.

*Kinetic solvent isotope effect:* To evaluate D<sub>2</sub>O kinetic solvent isotope effects, enzyme activity measurements were performed in D<sub>2</sub>O using 50mM Tris-Acetic acid buffer pH 7.5 and effect of D<sub>2</sub>O on pH was corrected for. Substrate and Tris-Acetic acid buffer was made up in D<sub>2</sub>O and coupling enzymes were diluted in D<sub>2</sub>O prior to usage. Together this amounted to less than a 5% reduction in D<sub>2</sub>O concentration in the activity assay. TBP aldolase was dialyzed against three successive changes of D<sub>2</sub>O for at least 1 hour each until measured activity became stable. Enzyme dialyzed against similar three successive changes of H<sub>2</sub>O was used for control.

## Results

*Native TBP aldolase:* TBP aldolase from *S. pyogenes* exhibits a  $\alpha/\beta_8$ -TIM barrel fold similar to the fold observed for rabbit muscle aldolase (25), with which it shares less than 12% sequence identity. The secondary structure elements assigned using PyMOL consist of eleven  $\alpha$ -helices and eight  $\beta$ -strands. The native enzyme has four protomers in the asymmetric unit cell and arrangement of the protomers is best described in terms of two identical dimers. Each dimer interface consists primarily of hydrogen bonds formed between subunit  $\alpha$  helices,  $\alpha_5$  and  $\alpha_6$  of one subunit interacting with the same helices  $\alpha_5$  and  $\alpha_6$  of the other. The surface buried at the subunit dimer interface represents 1908  $\text{\AA}^2$  while the dimer-dimer interface, constituted by one dimer subunit interacting with the subunit dimer interface of the second dimer buries 1319  $\text{\AA}^2$ . All calcium ions were located at the dimer-dimer interfaces and participated in bridging



interactions. Size exclusion chromatography corroborated the dimeric quaternary structure of TBP aldolase, which elutes at relative molecular weight of 70k Daltons. A cartoon representation of the TBP aldolase dimer with overall dimensions of 34 x 36 x 44 Å is given in Figure 1 whose subunits are related by a non-crystallographic twofold axis of rotation such that subunit active sites face in the same direction.

*Carbanion intermediate:* A TBP aldolase crystal soaked in a DHAP solution and flash cooled trapped a covalent enzymatic intermediate in each of the four subunits in the asymmetric unit that permitted unambiguous identification of the active site. The active site of TBP aldolase is situated deep in the center of the  $\alpha/\beta_8$ -TIM barrel fold, as was observed for rabbit muscle aldolase. Continuous electron density extending from Lys<sup>205</sup> N $\zeta$  to DHAP C2 shows formation of a stable covalent intermediate (Fig. 2). The iminium and/or carbanion intermediate can be distinguished from the enamine intermediate because of  $sp^2$  hybridization at Lys<sup>205</sup> N $\zeta$ , as shown by the planar shape of the electron density observed about the Lys<sup>205</sup> N $\zeta$ . Furthermore, DHAP O3 points slightly out of the plane defined by Lys<sup>205</sup> N $\xi$  and DHAP carbon atoms C1, C2, and C3, which is not possible in the enamine intermediate and is consistent with the trapping of an iminium and/or carbanion intermediate in each TBP aldolase subunit (Fig. 3). Average  $B$ -factors of the bound DHAP ( $18.0 \pm 5.5$  Å<sup>2</sup>) and of interacting side chains ( $16.3 \pm 4$  Å<sup>2</sup>) indicate full active site occupancy by DHAP.

To further corroborate the identity of the bound intermediate, real space  $R_{\text{fact}}$  statistic was calculated using the O program in order to gauge the model fit to the electron density. The derived Student's  $t$ -test compared  $R_{\text{fact}}$  values for DHAP modeled either as an enamine intermediate with planar geometry for DHAP atoms C1, C2, C3

and O3 and  $sp^3$  hybridization at Lys<sup>205</sup> N $\zeta$  or as an iminium/carbanion intermediate with  $sp^2$  hybridization at Lys<sup>205</sup> N $\zeta$  and coplanarity for DHAP atoms C1, C2, and C3 only. The statistic was discriminatory with  $p = 0.072$ , the iminium and / or carbanion showing significantly lower  $R_{\text{fact}}$  than the enamine in all four subunits.

The DHAP intermediate is engaged in several stabilizing bonds with active site residues. DHAP P1 hydrogen bonds with Arg<sup>278</sup>, Gly<sup>277</sup> and Ser<sup>249</sup>: Arg<sup>278</sup> curls around and interacts electrostatically with the P1 oxyanion, creating a binding pocket while Gly<sup>277</sup> and Ser<sup>249</sup> provide three additional hydrogen bonds with the oxyanion. The intermediate is further stabilized by Gln<sup>28</sup> hydrogen bonding DHAP O1 and oxyanion. DHAP C3 via its hydroxyl forms two hydrogen bonds with Asp<sup>27</sup> and Lys<sup>125</sup>. A water molecule W1, hydrogen bonded to Glu<sup>163</sup>, is positioned nearly perpendicular to the plane of the iminium/carbanion and makes *si* face close contact with DHAP C3 hydroxyl ( $3.45 \pm 0.16$  Å). Comparison of B-factors of W1 with those of proximal water molecules suggests variable occupancy by W1 in the four protomers. Water molecule, W2, hydrogen bonds to the phosphate oxyanion and makes close contact with W1, and contrary to W1, shows full occupancy in all protomers. Superposition of the four subunits of the native and DHAP-bound aldolase showed the positions of these two water molecules to be invariant to active site binding.

*Sequence similarity:* BLAST2 using *S. pyogenes* TBP aldolase as search probe yielded high sequence similarity with the TBP aldolases from *S. uberis*, *S. mutans*, *S. equi*, *S. gordonii*, and *S. sanguinis*, an uncharacterized protein from *S. infantarius*, *S. aureus* TBP aldolase (5) and a paralogue of *S. pyogenes* LacD.2 gene, LacD.1. Sequence homologies for these proteins with the *S. pyogenes* lacD.2 gene product were

80 %, 78%, 75 %, 74 %, 74 %, 80 %, 73.6 %, and 72.6 %, respectively and were corroborated using the SIM program on the Expasy server (45). Sequence homology between class I FBP aldolase from rabbit muscle and class I TBP aldolase from *S. pyogenes* revealed 11.3 % for sequence identity and 16.1% in terms of sequence homology.

Three dimensional models were built for the uncharacterized protein from *S. infantarius*, LacD.1 from *S. pyogenes*, and TBP aldolases from *S. mutans*, *S. gordonii* and *S. aureus*, and were successfully threaded onto the native structure determined for *S. pyogenes* LacD.2 TBP aldolase. Comparison of invariant residues 100-230 of *S. pyogenes* TBP aldolase with equivalent residues in the modelled proteins corresponded to a r.m.s.d. < 0.40 Å. Residues Asp<sup>27</sup>, Gln<sup>28</sup>, Arg<sup>29</sup>, Glu<sup>92</sup>, Lys<sup>125</sup>, Glu<sup>163</sup>, Lys<sup>205</sup>, Leu<sup>275</sup>, Gly<sup>277</sup> and Arg<sup>278</sup> proximal to the bound DHAP intermediate in *S.pyogenes* TBP LacD.2 aldolase were conserved and threaded into identical positions for all structures. Residues within ~ 15 Å radius around the Schiff base forming lysine were also conserved in both identity and position; residue differences were observed primarily at the protein surface.

A structure similarity search was also submitted to the Dali server<sup>46</sup> using the native *S. pyogenes* TBP aldolase as search probe. The structures ranked according to highest scoring were : native putative class I Yiht aldolase from *Salmonella typhimurium* (PDB ID: 1TO3) (Z score : 31.5), rabbit muscle FBP aldolase in complex with DHAP (PDB ID: 2QUT) (Z score : 26.4), a dimer variant of native rabbit muscle FBP aldolase (PDB ID: 3BV4) (Z score : 26.0), and mutant rabbit muscle FBP aldolase in complex with

FBP (PDB ID: 6ALD) (Z score : 25.7), respectively. The next thirty best hits were all variants of the rabbit muscle FBP aldolase structure (Z scores from 25.6 to 25.4).

*Conformational changes and active site binding:* Comparison of the four protomers in the asymmetric unit cell of the native TBP aldolase with those of the DHAP bound enzyme yielded r.m.s.d. values of 0.98 Å using all residues and 0.36 Å comparing only residues 100 to 230 delineating the same central domain in each subunit that is invariant to binding events. Superposition of the native and the DHAP-bound structures of TBP aldolase defined three regions that underwent systematic conformational changes due to active site binding (Fig. 4). Region 1 (residues 25 - 50), region 2 (residues 245 - 250) and region 3 (residues 275 - 295) contributed residues Asp<sup>27</sup> and Gln<sup>28</sup>, residue Ser<sup>249</sup>, and residues Gly<sup>277</sup> and Arg<sup>278</sup>, respectively, which interacted with the covalent intermediate thereby narrowing the active site with respect to the free enzyme. The calculated r.m.s.d. values between the native and liganded structures corresponding to the rigid body movements of region 1, 2, and 3 were  $0.65 \pm 0.24$  Å,  $0.80 \pm 0.02$  Å and  $1.17 \pm 0.24$  Å, respectively.

*Active site comparison of class I TBP and FBP aldolases:* To investigate structural similarity of the active site of TBP aldolase with that of FBP aldolase, superposition of the DHAP-bound structures of TBP aldolase and of FBP rabbit muscle aldolase (PDB ID: 2QUT) (11) were performed. The best alignment corresponded to a match of 148 residues that yielded a calculated r.m.s.d. of 1.64 Å (based on C $\alpha$  atoms) and revealed extensive homology among active site residues. Finer alignment based on conserved active site residues and DHAP atoms yielded r.m.s.d. values between the two aldolase active sites of 1.06 Å based on C $\alpha$  atom coordinates and 0.28 Å for DHAP atoms; the

latter r.m.s.d. value could be further decreased to 0.12 Å when the DHAP O3 atom was excluded. Active site residues interacting and those in close contact with the trapped covalent intermediate, shown in Fig. 5, were largely conserved between the two different aldolases. Spatial disposition of active site residues Lys<sup>205</sup>, Glu<sup>163</sup>, Lys<sup>125</sup>, Asp<sup>27</sup>, Gly<sup>277</sup>, Arg<sup>278</sup>, Ser<sup>249</sup> and Leu<sup>248</sup>, conserved in class I TBP aldolases, was isomorphous with active site residues Lys<sup>229</sup>, Glu<sup>187</sup>, Lys<sup>146</sup>, Asp<sup>33</sup>, Gly<sup>302</sup>, Arg<sup>303</sup>, Ser<sup>271</sup> and Leu<sup>270</sup>, also conserved in class I FBP aldolases. The positions of water molecules W1 and W2 were also spatially similarly disposed as observed in FBP aldolases. The only striking difference was the replacement of rabbit muscle aldolase Ser<sup>300</sup> by Leu<sup>275</sup> in the TBP aldolase structure. Ser<sup>300</sup> hydroxyl in the DHAP-RMA structure forms a hydrogen bond with Lys<sup>229</sup> N $\zeta$ , thus stabilizing the enamine intermediate (11), which is not possible by Leu<sup>275</sup> in TBP aldolase.

*Kinetic characterization:* Michaelis-Menten kinetics was used to analyze initial rate velocities measured using FBP and TBP as substrates and kinetic parameters  $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{m}}$  are shown in Table 2. While  $k_{\text{cat}}$  was higher for the TBP substrate than for FBP (13 s<sup>-1</sup> as opposed to 4 s<sup>-1</sup>),  $K_{\text{m}}$  was lower for TBP than for FBP (543  $\mu\text{M}$  and 931  $\mu\text{M}$ , respectively); substrate specificity, defined by  $k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$ , clearly shows preference by the enzyme for its natural substrate, TBP.

To verify the presence of carbanion in the TBP aldolase-DHAP intermediate, carbanion oxidation reaction was analyzed using Michaelis-Menten kinetics and yielded  $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{m}}$  values shown in Table 2. Hexacyanoferrate (III) was also reduced when in presence of FBP and TBP, although with less efficiency. The turnovers and  $K_{\text{m}}$  for TBP aldolase substrates in the oxidation reaction were significantly lower than for the

cleavage reaction and comparable to carbanion oxidation in presence of DHAP (Table 2). Comparable turnover of TBP, FBP and DHAP by hexacyanoferrate (III) oxidation indicates a common reaction step subsequent to substrate cleavage and specific to oxidation of the carbanion that is rate determining and different from DHAP release. The reduction of  $K_m$  values of substrates, FBP and TBP, in carbanion oxidation, significant compared to cleavage, is compatible with rapid equilibration of rate determining enzymatic intermediates that occur subsequent to substrate cleavage in the carbanion oxidative shunt.

To evaluate  $D_2O$  kinetic solvent isotope effects, enzyme activity measurements were performed in  $D_2O$  and resultant turnover compared with turnover in  $H_2O$  and is shown in table 2. A significant isotope effect was observed with the largest  $k_{cat}^{H_2O} / k_{cat}^{D_2O}$  ratio of 3.3 measured for FBP as substrate compared to 2.3 for TBP.

*Proton exchange:* To determine the rate of label exchange at DHAP C3 hydrogen, initial rate velocities were measured in tritiated water to assess label uptake as (*S*)-[3- $^3H_1$ ]DHAP or (*R*)-[3- $^3H_1$ ]DHAP or by appearance of label in tritiated water from (*S*)-[3- $^3H_1$ ]DHAP or (*R*)-[3- $^3H_1$ ]DHAP. The rates of proton exchange at C3 of DHAP determined at saturation concentrations in solution and crystalline state are shown in Table 3. TBP aldolase labelled both pro-*R* and pro-*S* C3 hydrogen positions of DHAP in solution with an approximate two-fold kinetic preference for pro-*S* labelling as compared to pro-*R*. Detritiation results were surprising as the enzyme was unable to detritiate label at the pro-*R* C3 hydrogen position of DHAP; label release was indistinguishable from that measured in absence of enzyme. A control experiment was performed in order to confirm this result: DHAP was first labelled using TBP aldolase,

the labelled DHAP was then detritiated again using TBP aldolase. The amount of residual label present as (*S*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP or (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP was then measured and rates shown in Table 3. The results show that the enzyme was not capable of significantly detritiating pro-*R* labelled DHAP even though it had effectively labelled the pro-*R* C3 position.

Exchange rates for the crystalline state shown in Table 3 were considerably smaller. Label uptake in TBP aldolase crystals had strong kinetic preference for labelling the pro-*S* C3 hydrogen position of DHAP. Rate of label uptake as (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP is not statistically different from background and indicated a limit on label partitioning of > 3:1 in favour of pro-*S* labelling in the crystalline state. Similar to the soluble enzyme, detritiation of label at the pro-*R* C3 hydrogen position of DHAP was not detected in the crystalline enzyme as label release was statistically indistinguishable from background. Both the rate for labelling and detritiation at the pro-*S* DHAP C3 hydrogen in the crystalline state indicate that soaking of TBP aldolase crystals for a period of 5 minutes with DHAP corresponds to multiple turnovers in both directions and is consistent with exchange occurring under steady state conditions.

The 7 fold greater rate of detritiation in solution compared to tritium label incorporation in Table 3 corresponds to an equilibrium distribution of covalent intermediates on the enzyme where the combined enamine and carbanion population exceeds that of the Schiff base intermediate by ~ 85:15. In TBP aldolase crystals, although the uncertainties are greater, the exchange rates indicate a similar preference (6.6 fold) for enamine and carbanion populations over the Schiff base. The dominant covalent intermediate trapped on the enzyme in the crystalline state is thus not an imine

and is consistent with cryotrapping of a predominant carbanion species in the active site.

## **Discussion**

The structure determination of this class I TBP aldolase has afforded insight into this enzyme's mechanism and evolution. The folding of the polypeptide chain of TBP aldolase, shown in Figure 1, corresponds to a  $(\alpha/\beta)_8$  or TIM barrel fold that is typical of class I and II aldolase classes (47). The extensive conservation of the active site residues and their identical spatial disposition between class I FBP and TBP aldolases is consistent with the hypothesis of divergent evolution from a common ancestor (48). The largest difference between the two aldolases was a loss in TBP aldolase of 23 residues that comprise the flexible C-terminal region in FBP aldolase which interacts with the active site (11); the remaining differences were associated with conformations of connecting loops between secondary structure elements and a positional shift in helices 5 and 6 to accommodate differential subunit interfaces between the two aldolases. In TBP aldolase, the C-terminus position terminates at the end of helix  $\alpha 11$  and is  $\sim 20 \text{ \AA}$  distant from its active site and therefore cannot interact with it. Loss of the C-terminal region in FBP aldolase reduces cleavage activity by  $\sim 20$  fold (49) and Schiff-base-carbanion interconversion by 2 orders of magnitude (50). Thus, although the two aldolases have comparable catalytic activity, the truncation of the C-terminal region in TBP aldolase implies a divergent evolutionary solution to the mechanism of  $\alpha$ -proton exchange by the two aldolases.



*DHAP carbanion intermediate:* The trapping of the DHAP enzymatic intermediate clearly demarked the active site locus in TBP aldolase and delineated amino acid residues that are responsible for stabilization of the covalent intermediate. Both structural characterisation and proton exchange data at C3 corroborate the identification of the dominant steady state intermediate as the carbanion (Figure 3). The carbanion is extensively stabilized by numerous electrostatic interactions and hydrogen bonds with active site residues which are nearly identical as those observed in the enamine complex that was trapped in class I FBP aldolase (Figure 5). In addition to covalent intermediate formation involving an equivalent lysine residue on each enzyme, the mode of DHAP binding in the active sites of both enzymes is isomorphous and makes use of similar arginine, serine and glycine residues to grasp the P1 oxyanion while an equivalent aspartate and lysine residues are used to bind the DHAP O3. A distinctive feature in the FBP aldolase was the preferential enamine stabilization, promoted by Ser<sup>300</sup> hydroxyl hydrogen bonding Lys<sup>229</sup> N $\zeta$  that allowed the enzyme to differentiate between enamine and carbanion mesomers (11). The equivalent serine residue is absent in the TBP aldolase active site and is replaced by Leu<sup>275</sup>. The mesomeric discrimination against the enamine in TBP aldolase is consistent with Leu<sup>275</sup> destabilizing the enamine intermediate because the residue cannot engage in hydrogen bond formation with Lys<sup>205</sup>.

*C3 epimerisation:* Class I TBP aldolases, contrary to FBP aldolases, lack a flexible C-terminal region capable of mediating *si face* proton transfer at C3 of the carbanion. The active site of TBP aldolase however contains two water molecules, W1 and W2, that are invariant to binding events (Figure 2) and are similarly positioned with respect

to bound DHAP as two water molecules (similarly designated W1 and W2) found in the structure of FBP aldolase (Figure 5). Water molecule W1 in TBP aldolase is well positioned *si face* to the DHAP C3 by hydrogen bonding with Glu<sup>163</sup> and is relatively mobile, while water molecule W2 is tightly bound to the phosphate oxyanion. W2 is also in close contact with W1, making them well situated to mediate a sequential proton transfer as was described for FBP aldolase (11). Such a proton exchange role is not inconsistent with the observed kinetic solvent isotope effect and is supported by the virtual identity of active site residues between FBP and TBP aldolases. In FBP aldolase, the P1 phosphate dianion acts as a conjugate base to catalyze proton transfer at physiological pH that is relayed through its invariant water molecule W2 and activates W1. This activated water molecule with a slight lateral shift ( $< 1 \text{ \AA}$ ) towards the DHAP C3 carbon in FBP aldolase would hydrogen bond with Lys<sup>146</sup> and positioning it to catalyze stereospecific pro-*S*  $\alpha$ -proton transfer in FBP aldolase. The ability to label C3 pro-*S* hydrogen of DHAP by TBP aldolase would support such a mechanism as water molecule, W1, is positioned within close contact and *si face* with respect to C3. A lateral shift by W1 of  $\sim 1 \text{ \AA}$  enables Lys<sup>125</sup> to hydrogen bond W1 and positioning it for pro-*S*  $\alpha$ -proton transfer.

Labelling of the C3 pro-*R* hydrogen from the *re face* of DHAP cannot be reconciled with a proton transfer mechanism such as described for *si face* proton exchange at C3. The crystal structure shows no water molecule positioned roughly perpendicularly and *re face* with respect to the plane defined by DHAP C1, C2, and C3 that could mediate pro-*R* labelling. A water molecule positioned as the mirror image of W1 with respect to C3 cannot be accommodated, since this would result in steric clash

with Ala<sup>25</sup>. Asp<sup>27</sup> could act as a conjugate base to catalyze *re face* proton transfer, however, from Figure 2, the residue is not well positioned with respect to C3 to mediate proton transfer. Rotations by the Asp<sup>27</sup> side chain do not result in an orientation favourable for *re face* proton transfer by Asp<sup>27</sup>. Furthermore the trajectory of conformational change by helical region 1 (residues 25-50) which brings Asp<sup>27</sup> within hydrogen bonding of DHAP C3 hydroxyl also does not result in a geometry capable of pro-*R* labelling by Asp<sup>27</sup> and makes this residue an unlikely candidate for *re face* proton transfer.

*Cis-trans isomerisation:* Rotation of the hydroxymethyl group of the bound DHAP has been postulated as a mechanism for the apparent C3 epimerisation and requires that enolization as well as C-C bond cleavage or synthesis proceed at rates faster than release of the products from the enzyme (51). Isotopic studies on deoxyribose 5-P aldolase have indicated that, during the cleavage of deoxyribose 5-P, rotation of the methyl group of the enzyme-bound acetaldehyde and enolization occurred prior to product release, resulting in an apparent lack of stereospecificity with respect to proton uptake at C2 (equivalent to C3 of a pyruvate lyase substrate) (51). Indeed proton exchanges in TBP aldolase, shown in table 2, appear to proceed at rates faster than C-C bond cleavage. Rotation about the equivalent C2-C3 bond in the DHAP intermediate of TBP and FBP aldolases is however restricted due to its double bond character and limits the rotamers to the two discrete isomers; E where the DHAP O3 hydroxyl is oriented *cis* to the DHAP C2- Lys<sup>205</sup> Nζ bond and Z where the orientation is *trans*. Their relative populations depend on the active site stabilization of each isomer and their rate of interconversion is determined by the height of the rotational barrier which depends on

the extent of double bond character at C2-C3. The rotational barrier would be greater in the enamine than in the carbanion which has reduced C2-C3 double character.

Figure 2 shows the DHAP intermediate bound as the E isomer while Figure 6 shows a possible conformation for the Z isomer as modelled from the E isomer. Stabilization of the DHAP C3 hydroxyl in the E isomer implicates three hydrogen bonds with active residues Asp<sup>27</sup> and Lys<sup>125</sup>. The DHAP C3 hydroxyl by adopting a *trans* configuration in Figure 6 forms a hydrogen bond with DHAP O1 (2.4-2.6 Å) that would be further stabilized by hydrogen bonding with Gln<sup>28</sup>. The observed 2:1 ratio in the rates of pro-*S* and pro-*R* labelling at C3 of DHAP in TBP aldolase is consistent with a mechanism of stereofacial *si face* proton transfer at C3 in both E and Z isomers with more extensive hydrogen bonding stabilizing the E isomer. Preferential stabilization of carbanion mesomer by the enzyme would favour the requisite *cis-trans* isomerisation about the C2-C3 bond due to its reduced double bond character in the carbanion. In FBP aldolase, the presence of Glu<sup>34</sup>, equivalent to Gln<sup>28</sup> in TBP aldolase (Fig. 5), would not favour hydrogen bonding with DHAP O3 hydroxyl in the Z isomer compared to TBP aldolase, because such an interaction with Glu<sup>34</sup> would simultaneously make a repulsive interaction with DHAP O1. Furthermore, the greater double bond character of C2-C3 bond in the enamine heightens the barrier to *cis-trans* isomerisation. Together, these considerations explain the inability to detect pro-*R* labelling of the DHAP C3 hydrogen in FBP aldolase (16). The loss of stereospecific labelling at C3 in TBP aldolase is thus a likely consequence of *cis-trans* isomerization of the carbanion promoted by Gln<sup>28</sup> and Leu<sup>275</sup>. From an evolutionary perspective, C3 epimerisation in class I DHAP dependent

aldolases is based on a conserved stereospecific proton transfer mechanism exploiting *cis-trans* isomerization in the carbanion intermediate.

The preferential labelling in the crystalline state of the pro-*S* C3 hydrogen with respect to the pro-*R* DHAP C3 hydrogen of > 3:1 implies a population for the *Z* isomer that would have occupancy of less than 25% in the crystal structure and which would make it technically challenging to observe above the noise level in the electron density map. The small exchange rates in the crystalline state as well as labelling pattern would argue that crystal lattice packing decreases exchange rates and differentially stabilize *Z* and *E* isomer populations with respect to solution. Indeed, in all subunits, conformational mobile regions 1 and 2 that respond to DHAP binding participate in crystal packing contacts and thus could redirect *Z* and *E* isomer stability and the barrier height to *cis-trans* isomerisation. Fluctuations along the conformational trajectory made by region 1 upon DHAP binding which could disrupt Asp<sup>27</sup> hydrogen bond formation with DHAP O3 and facilitate *cis-trans* isomerisation also would be hindered by the crystal lattice packing.

The *Z* isomer configuration shown in Figure 6 is however only possible if the carbanion intermediate has  $sp^2$  hybridization at C3 as  $sp^3$  hybridization at C3 would result in an unacceptable close contact between DHAP C3 hydroxyl and DHAP O1 in this isomer. A planar carbanion center is favoured as the nucleophile is adjacent to the DHAP C2- Lys<sup>205</sup> N $\zeta$  double bond that affords conjugative stabilization. The destabilisation of the *Z* isomer in the Schiff base, due to its  $sp^3$  hybridization at C3, is consistent with a very low rate of pro-*R* detritiation at C3, which was not detected, in comparison to a very high rate of pro-*S* detritiation at C3 as shown in Table 3. The

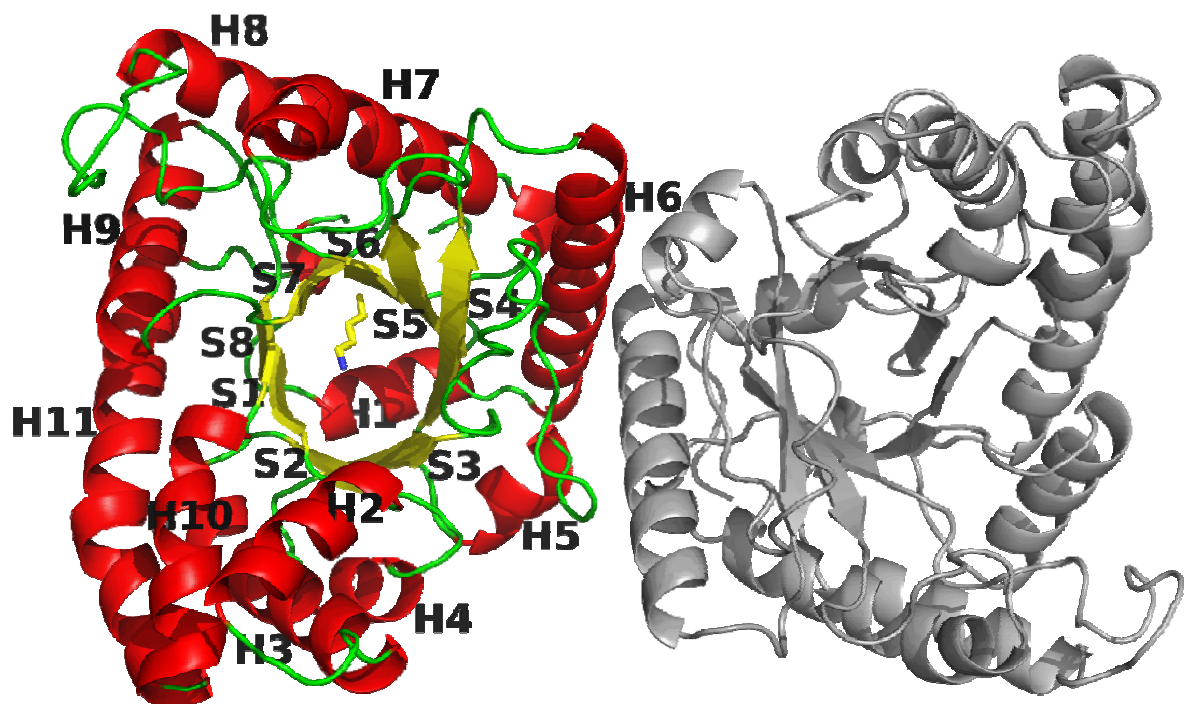
inhibition of Schiff base to carbanion interconversion and a kinetic preference for pro-*S* labelling indicates a transaldolase rather than aldolase activity towards sorbose-P2 and psicose-P2 as substrates.

*Induced conformational changes:* In Figure 4, three regions in the native enzyme are shown to undergo small yet significant conformational changes upon active site binding by DHAP. The conformational changes consist of rigid body movements induced by DHAP that serve to stabilize the DHAP-enzyme intermediate and are very akin to those observed in the structures of rabbit muscle aldolase bound to DHAP and FBP (11, 28). Both FBP and TBP aldolases respond to active site binding by identical asymmetrical active site narrowing implicating equivalent  $\alpha$  helices and regions of  $\beta$  turn flanking the active site, as shown in Figure 7. Conformational displacements by these secondary structure features serve in both cases to bind the DHAP phosphate oxyanion and C3 hydroxyl. The low sequence homology between those two class I aldolases that are functionally very similar suggests not only that the alpha/beta barrel platform is functionally robust and able to tolerate considerable sequence divergence, but also that the conformational changes requisite to binding are strongly conserved, being invariant to the same degree of sequence divergence.

The conformational changes observed in TBP aldolase may thus represent the molecular basis enabling LacD.1, a paralogue of TBP aldolase in *S. pyogenes* and to which TBP aldolase is highly homologous (73% identical and 86% similar), to act as a putative metabolic sensor that regulates global transcription of virulence genes in *S. pyogenes* (52, 53). Sequence differences between the two catalogues are largely at the level of surface-exposed residues while active site residues are conserved and implicitly

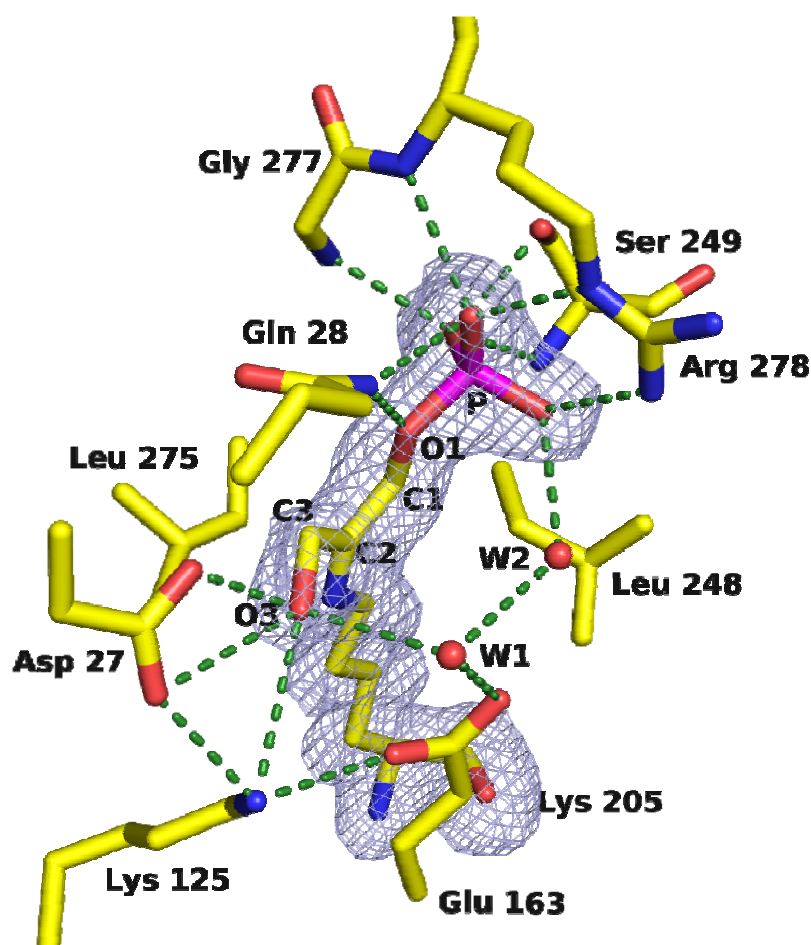
support the hypothesis of homologous conformational changes in LacD.1 triggered by active site binding. All residues in *S. pyogenes* LacD.2 found proximal to the bound DHAP intermediate, namely: Asp<sup>27</sup>, Gln<sup>28</sup>, Arg<sup>29</sup>, Glu<sup>92</sup>, Lys<sup>125</sup>, Glu<sup>163</sup>, Lys<sup>205</sup>, Leu<sup>275</sup>, Gly<sup>277</sup> and Arg<sup>278</sup>, are sequence and spatially conserved in the computed LacD.1 model. Furthermore, residues vicinal to the active site were also conserved both in identity and position. Experimental data indicates that the role of LacD.1 depends on substrate recognition, especially on DHAP, but not on enzymatic activity, and is most sensitive to changes in DHAP levels (52). Under conditions of high glycolysis, product binding by DHAP could thus induce a conformational change in LacD.1. Indirect evidence suggests that LacD.1 sequesters a regulatory partner and by inhibiting it from activating its target genes, triggers virulence gene expression (52). Interference with or exploitation of these conformational changes in *S. pyogenes* would represent a novel target to inhibit virulence of this versatile human pathogen, which is the causative agent of numerous human diseases, ranging from pharyngitis and impetigo to the often fatal necrotizing fasciitis and septicaemia (54).

## Figures and tables

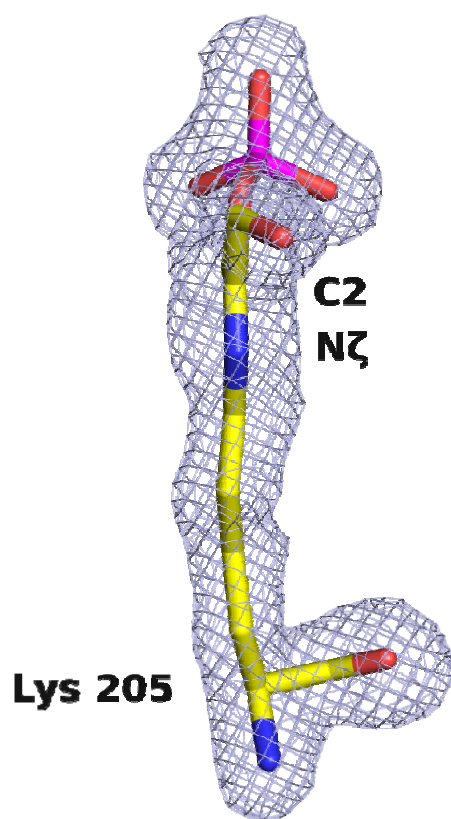


**Figure 1: Quaternary structure of *S. pyogenes* TBP aldolase showing subunit polypeptide folding.** Cartoon representation depicting a TBP aldolase dimer of the native enzyme.  $\alpha$ -helices are colored in *red*,  $\beta$  strands in *yellow*, and loops in *green*. The side chain of catalytic Lys<sup>205</sup> is shown in stick representation in the center of the  $\alpha/\beta_8$  barrel fold. Cartoon was drawn using PyMol (41).

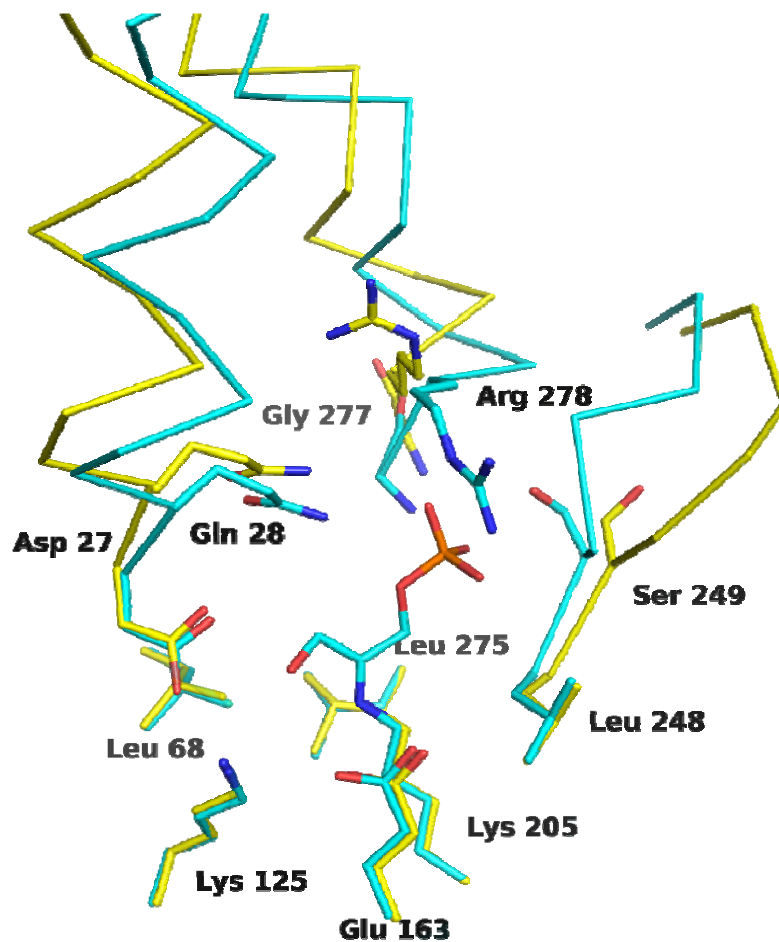




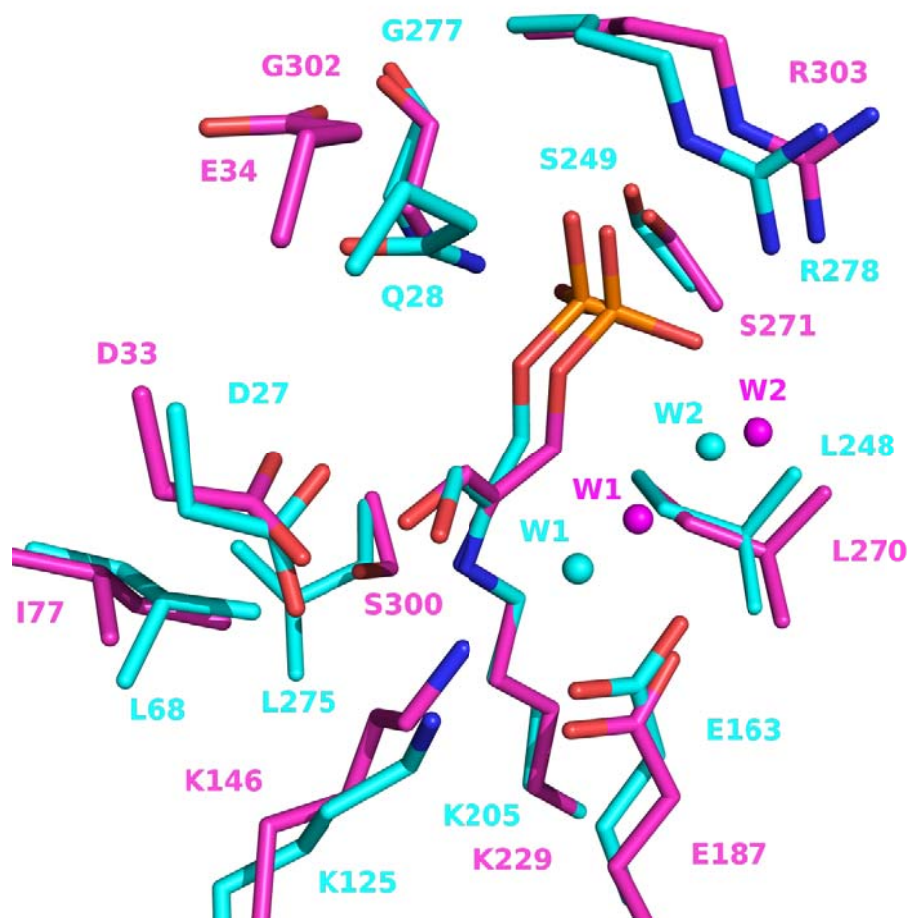
**Figure 2: Covalent enzymatic intermediate formed with DHAP in the active site of *S. pyogenes* TBP aldolase.** DHAP P1 makes interactions with Arg<sup>278</sup>, Gly<sup>277</sup>, and Ser<sup>249</sup> and DHAP C3 *via* its hydroxyl interacts with Asp<sup>27</sup> and Lys<sup>125</sup>. Water molecule W1 makes close contact with DHAP C3 hydroxyl and hydrogen bonds with Glu<sup>163</sup> while W2 interacts with the DHAP oxyanion and makes close contacts with W1, Glu<sup>163</sup> and Arg<sup>278</sup>. Difference electron density was calculated from a 1.92 Å simulated annealing *F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>* omit map encompassing Lys<sup>205</sup> and DHAP and contoured at 4.0  $\sigma$ .



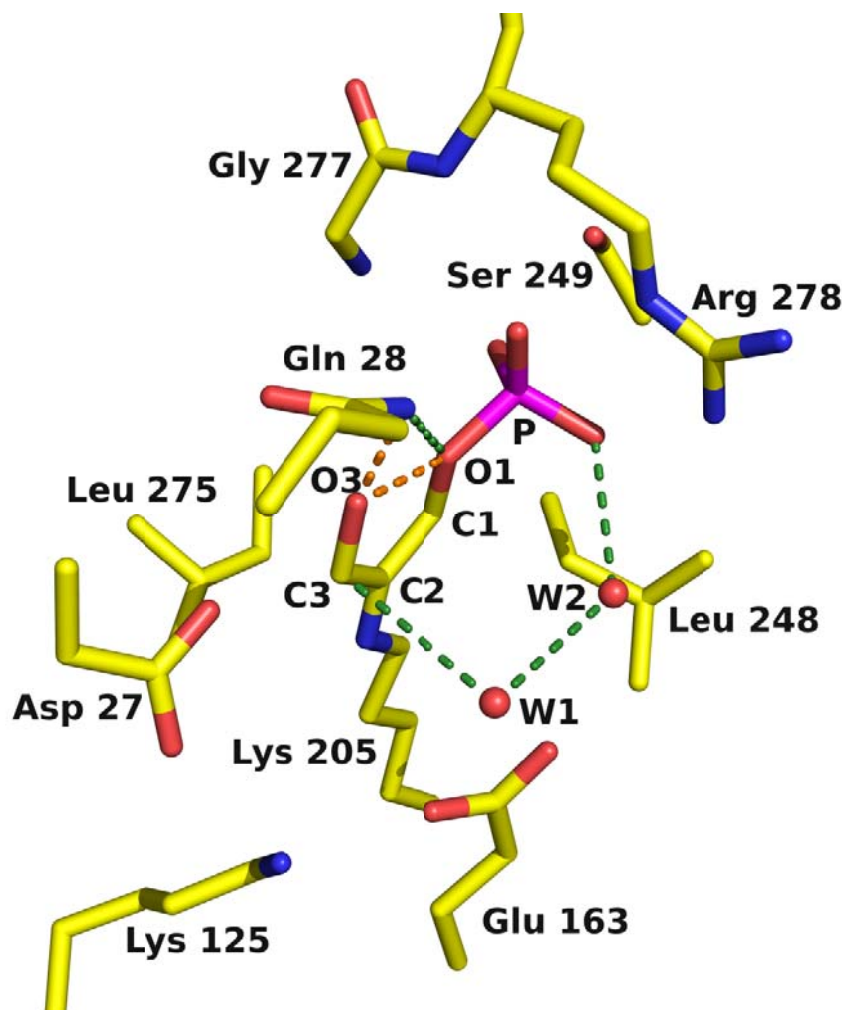
**Figure 3: Electron density showing trapping of a carbanion intermediate in the active site of TBP aldolase.** Electron density of the enzymatic intermediate was consistent with geometry corresponding to a carbanion and/or iminium species bound in the active site of all subunits of the trapped DHAP-TBP aldolase complex. The covalent intermediate has  $sp^2$  hybridization at Lys<sup>205</sup> N $\xi$  and hence planar shape when viewed perpendicular to the plane containing DHAP carbon atoms C1, C2, and C3; additionally DHAP O3 points out of this plane corroborating the intermediate identification as a carbanion and/or iminium. Difference electron density was calculated from a 1.92 Å simulated annealing *Fo-Fc* omit map encompassing Lys<sup>205</sup> and DHAP and contoured at 4.0  $\sigma$ . *Green dashes* represent hydrogen bonding and *red spheres* water molecules.



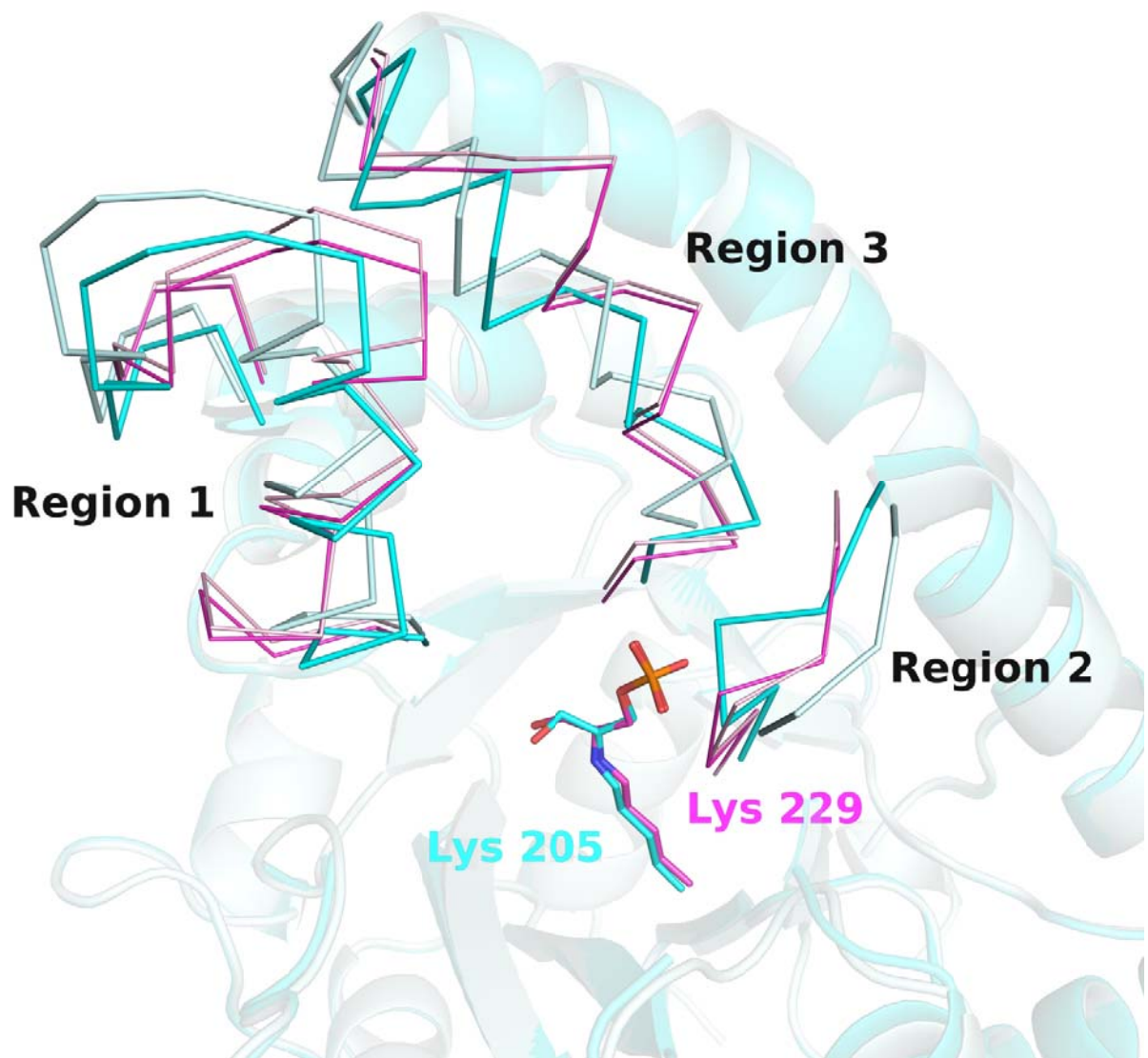
**Figure 4: Superposition of liganded TBP aldolase structure (cyan) with that of native enzyme (yellow).** Three regions of continuous sequence whose backbone undergo conformational displacement upon DHAP binding are shown in stick representation. For region 1, residues Asp<sup>27</sup> and Gln<sup>28</sup> interact with DHAP upon binding, in region 2, residue Ser<sup>249</sup> interacts with DHAP, while in region 3, residues Gly<sup>277</sup> and Arg<sup>278</sup> are shown interacting with the carbanion intermediate. The conformational displacements narrow asymmetrically the active site cavity with respect to the free enzyme.



**Figure 5: Superposition of the DHAP bound TBP aldolase structure (cyan) with the DHAP bound FBP aldolase (magenta).** Superposition showing residues interacting or in close contact with DHAP are conserved between the two aldolase structures. The residues are Lys<sup>205</sup>, Glu<sup>163</sup>, Lys<sup>125</sup>, Asp<sup>27</sup>, Gly<sup>277</sup>, Arg<sup>278</sup>, Ser<sup>249</sup> and Leu<sup>248</sup> in the DHAP-TBP aldolase complex that superpose with residues Lys<sup>229</sup>, Glu<sup>187</sup>, Lys<sup>146</sup>, Asp<sup>33</sup>, Gly<sup>302</sup>, Arg<sup>303</sup>, Ser<sup>271</sup> and Leu<sup>270</sup> in the trapped DHAP-FBP aldolase complex, respectively. Loci of invariant water molecules, W1 and W2, in each structure were also conserved. Two notable differences are the replacement of Glu<sup>34</sup> and Ser<sup>300</sup> in FBP aldolase by Gln<sup>28</sup> and Leu<sup>275</sup> in the TBP aldolase structure, respectively.



**Figure 6: Isomerisation of the carbanion enzymatic intermediate formed with DHAP in the TBP aldolase active site.** The DHAP C3 hydroxyl which is predominantly bound as the E isomer or *cis* configuration is shown modelled binding as the Z isomer or *trans* configuration with respect to the DHAP C2-Lys<sup>205</sup> N $\zeta$  bond. The Z isomer results in formation of two hydrogen bonds (shown in orange) by DHAP C3 hydroxyl with DHAP O1 and Gln<sup>28</sup>, and would allow protonation of the *pro-R* position of DHAP C3 by the same stereofacial proton transfer mechanism implicating water molecules W1 and W2 as used for protonation *pro-S* position of DHAP C3 as shown in Figure 2. Gln<sup>28</sup> is positioned by its two hydrogen bonds made with the DHAP ester oxygen and oxyanion. Pertinent hydrogen bonds or close contacts present in the E isomer are shown in green.



**Figure 7: Superposition of the crystal structures of native (pale cyan) and DHAP bound (cyan) TBP aldolase with the native (pale magenta) and DHAP bound (magenta) FBP aldolase. The regions 1, 2 and 3 which undergo conserved conformational displacement upon ligand binding are shown as sticks. The overall fold of the DHAP bound TBP and FBP aldolases are shown in cartoon representation.**

**Table 1: Data collection and refinement statistics**

	native	DHAP-bound
<b>Data collection</b>		
Resolution	50-1.87 (1.97-1.87) <sup>a</sup>	50-1.92 (2.02-1.92)
Wavelength	0.9795	0.9795
Unique reflections	144212 (15756)	142361 (12153)
Completeness (%)	82.5 (74.8)	85.9 (74.1)
Average I/σ(I)	7.1 (1.4)	7.8 (2.9)
Rsym <sup>b</sup>	0.092 (0.513)	0.101 (0.326)
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit cell parameters a(Å), b(Å), c(Å)	63.7, 106.2, 238.5	64.1, 108.2, 238.7
<b>Refinement</b>		
Number of atoms		
Protein	10248	10192
Water	2336	2597
Hetero	7 Ca	7 Ca, 36 DHAP atoms
Sigma cutoff; I/σ(I) >	1	1
Rcryst (%) <sup>c</sup>	17.45	16.11
Rfree (%) <sup>d</sup>	21.81	19.90
Root mean square deviation		
Bond length (Å)	0.005	0.004
Bond angle (°)	0.929	0.869
Average B-factor (Å <sup>2</sup> )	32.75	22.22
Ramachandran analysis <sup>e</sup> (%)		
Favoured	96.3	97.1
Allowed	3.7	2.9

<sup>a</sup> Values in parentheses are given for the highest resolution shell.

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

<sup>c</sup>  $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl} |I_o(hkl) - |I_c(hkl)||}{\sum_{hkl} I_o(hkl)}$ .

<sup>d</sup>  $R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \in T} |I_o(hkl) - |I_c(hkl)||}{\sum_{hkl \in T} I_o(hkl)}$ , 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 7.5% of the total unique reflections for native and native aldolase bound with DHAP.

<sup>e</sup> Analyzed by MolProbity [34]

**Table 2: Kinetic parameters of FBP and TBP cleavage reaction for TBP aldolase and carbanion oxidation rates in presence of DHAP, FBP and TBP.**

Substrate	Cleavage reaction			Carbanion oxidation	
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{m}}$ ( $\mu\text{M}$ )	${}^{\text{D}}_2\text{O}k_{\text{cat}}$ <sup>a</sup>	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{m}}$ ( $\mu\text{M}$ )
FBP	4.06±0.07	931±48	3.3	1.92±0.08	292±36
TBP	13.0±0.27	543±32	2.3	2.25±0.08	191±20
DHAP	-	-		2.64±0.11	144±20

<sup>a</sup> kinetic solvent isotope effect represented by ratio of  $k_{\text{cat}}^{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{cat}}^{\text{D}_2\text{O}}$



**Table 3: Proton exchange of C3 hydrogen positions of DHAP**

The rate of proton exchange catalyzed by TBP aldolase of DHAP C3 hydrogen was measured by appearance of tritium isotope label as (*S*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP or (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP from tritiated water (tritiation), and by appearance of tritiated water from (*S*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP and (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP (detritiation), as described in the Material & Methods section.

TBP aldolase	Tritiation <sup>b</sup> (s <sup>-1</sup> )			Detritiation <sup>b</sup> (s <sup>-1</sup> )	
	Total <sup>a</sup>	Pro- <i>R</i> <sup>c</sup>	Pro- <i>S</i> <sup>c</sup>	Pro- <i>R</i>	Pro- <i>S</i>
Soluble enzyme	33.1 ± 2.0	14.9 ± 2.4	29.6 ± 6.6	- <sup>d</sup>	206 ± 23
Control - soluble enzyme <sup>e</sup>	30.9 ± 4.8			- <sup>d</sup>	219 ± 23
Crystals	15 ± 2 x 10 <sup>-3</sup>	4 ± 2 x 10 <sup>-3</sup>	13 ± 2 x 10 <sup>-3</sup>	- <sup>d</sup>	0.10 ± 0.03

<sup>a</sup> Rate of label incorporation at (*S*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP and (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP combined.

<sup>b</sup> Errors calculated from at least three experiments, unless otherwise stated.

<sup>c</sup> Labelling of DHAP as (*S*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP or (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP was determined using stereospecific detritiation by rabbit muscle aldolase or triose isomerase respectively.

<sup>d</sup> Not detected. Rate of detritiation was statistically insignificant from background.

<sup>e</sup> Detritiation of (*S*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP or (*R*)-[3-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]DHAP previously labelled by TBP aldolase was performed using TBP aldolase.

## References

---

- 1 Suri, J.T., Mitsumori, S., Albertshofer, K., Tanaka, F., Barbas, C.F. 3rd. Dihydroxyacetone variants in the organocatalytic construction of carbohydrates: mimicking tagatose and fuculose aldolase. (2006) *J. Org. Chem.* **71**, 3822-3828.
- 2 Takayama, S., McGarvey, G.J., Wong, C.H. Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars. (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 285-310.
- 3 Fessner, W.D. Enzyme mediated C-C bond formation. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2(1)**, 85-97.
- 4 Wong, C.H., Whitesides, G. M. (1994), *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry* 1st ed., Elsevier Science & Technology Books.
- 5 Bissett, D.L. and Anderson, R.L. Lactose and D-galactose metabolism in *Staphylococcus aureus*. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 8750-8755.
- 6 Lee, J.H., Bae, J., Kim, D., Choi, Y., Im, Y.J., Koh, S., Kim, J.S., Kim, M.K., Kang, G.B., Hong, S.I., Lee, D.S., Eom, S.H. Stereoselectivity of fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Thermus caldophilus*. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 616-625.
- 7 Grazi, E., Rowley, P.T., Cheng, T., Tchola, O., Horecker, B.L. The mechanism of action of aldolases. III. Schiff base formation with lysine. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 38-43.
- 8 Kobashi, K., Lai, C.Y., Horecker, B.L. Organic phosphate groups in native and borohydride-reduced aldolase. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 437-444.
- 9 Kobes, R.D., Simpson, R.T., Vallee, R.L., Rutter, W.J. A functional role of metal ions in a class II aldolase. (1969) *Biochemistry.* **8**, 585-588.
- 10 Harris, C.E., Kobes, R.D., Teller, D.C., Rutter, W.J. The molecular characteristics of yeast aldolase. (1969) *Biochemistry.* **8**, 2442-2454.
- 11 St-Jean, M. and Sygusch, J. Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 31028-31037.
- 12 Rose, I.A. (1969) *Glycolysis : Regulation and mechanisms of the enzymes; Comprehensive Biochemistry*, Vol. 17, ed. Florin, M. & Stoltz, E.H., Elsevier, Amsterdam, London and New York
- 13 Jencks, W.P. (1987), *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Courier Dover Publications.
- 14 Grazi, E., Cheng, T., Horecker, B.L. The formation of a stable aldolase-dihydroxyacetone

- 
- phosphate complex (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 250-253.
- 15 Rose, I.A. and Rieder, S.V. Studies on the mechanism on the aldolase reaction; isotope exchange reactions of muscle and yeast aldolase. (1958) *J. Biol. Chem.* **231**, 315-329.
- 16 Rose, I.A. The absolute configuration of dihydroxyacetone phosphate tritiated by aldolase reaction. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5835-5836.
- 17 Chiu, T.H. and Feingold, D.S. Substrate specificity of L-rhamnulose 1-phosphate aldolase (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 511-516.
- 18 Chiu, T.H. and Feingold, D.S. L-rhamnulose 1-phosphate aldolase from *Escherichia coli*. Crystallization and properties. (1969), *Biochemistry.* **8**, 98-108.
- 19 Kobes, R.D., and Dekker, K.E. 2-Keto-4-hydroxyglutarate aldolase of bovine liver. Purification, criteria of purity, and general properties, (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 1919-1925
- 20 Fish, D.C., and Blumenthal, H.J., 2-keto-3-deoxy-d-glucarate aldolase (1966) *Methods Enzymol.* **9**, 529-534
- 21 Meloche, H.P. and Mehler, L. The stereochemistry at carbon 3 of pyruvate lyase condensation products. Aldolases forming condensation products racemic at carbon 4. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6333-6338.
- 22 Espelt, L., Bujons, J., Parella, T., Calveras, J., Joglar, J., Delgado, A., Clapés, P. Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-fuculose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde (2005) *Chemistry.* **11**, 1392-1401.
- 23 Zgiby, S.M., Thomson, G.J., Qamar, S., Berry, A. Exploring substrate binding and discrimination in fructose-1,6-bisphosphate and tagatose-1,6-bisphosphate aldolases (2000) *Eur.J.Biochem.* **267**, 1858-1868.
- 24 Williams, G.J., Domann, S., Nelson, A., Berry, A. Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 3143-3148.
- 25 Sygusch, J., Beaudry, D.F., Allaire, M. Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7-Å resolution. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**, 7846-7850.
- 26 Chudzick, D.M., Michels, P.A., de Walque, S., Hol, W.G. Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases. (2000) *J. Mol. Biol.* **300**, 697-707.
- 27 Dalby, A.R., Tolan, D.R., Littlechild, J.A. The structure of human liver fructose-1,6-bisphosphate aldolase. (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **57**, 1526-33.

- 
- 28 St-Jean, M., Lafrance-Vanasse, J., Liotard, B., Sygusch, J. High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-biphosphate aldolase. (2005) *J.Biol.Chem.* **280**, 27262-27270.
- 29 Hall, D.R., Bond, C.S., Leonard, G.A., Watt, C.I., Berry, A., Hunter, W.N. Structure of tagatose-1,6-bisphosphate aldolase. Insight into chiral discrimination, mechanism, and specificity of class II aldolases. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22018-22024
- 30 Liotard, B. and Sygusch, J. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of native and selenomethionine class I tagatose-1,6-bisphosphate aldolase from *Streptococcus pyogenes*. (2003) *Acta.Cryst.Sect.D.* **60**, 528-530.
- 31 Racker, E. Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity.(1947) *J.Biol.Chem.* **47**, 843-854.
- 32 Otwinowski, Z., Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- 33 Terwilliger, T.C. and Berendzen J. Automated MAD and MIR structure solution. (1999) *Acta Cryst.* **D55**, 849-861.
- 34 Terwilliger, TC. Maximum likelihood density modification. (2000) *Acta Cryst.* **D56**, 965-972.
- 35 Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. (1991) *Acta Crystallogr.Sect.A.* **47**, 110-111.
- 36 Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. (1998) *Acta Crystallogr.Sect.D.* **54**, 905-921.
- 37 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., Terwilliger, T.C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. (2002) *Acta Crystallogr.* **D58**, 1948-1954.
- 38 Emsley, P. and Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. (2004) *Acta Crystallogr.Sect.D.* **60**, 2126-2132.
- 39 Schuttelkopf, A. W., and van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. (2004) *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol.*

- 
- Crystallogr.* **60**, 1355-1363.
- 40 Diamond, R. On the multiple simultaneous superposition of molecular structures by rigid body transformations. (1992) *Protein Sci.* **1**, 1279-1287.
- 41 DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>.
- 42 Guex, N. and Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. (1997), *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- 43 Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. (2006) *Bioinformatics.* **22**, 195-201.
- 44 Healy, M.J., and Christen, P. Mechanistic probes for enzymatic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase) (1973) *Biochemistry.* **12**, 35-41
- 45 Miller, W., Huang, X. A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm (1991) *Advances in Applied Mathematics.* **12**, 337-357.
- 46 Holm L, Kaariainen S, Rosenstrom P, Schenkel A. Searching protein structure databases with DaliLite v.3. (2008) *Bioinformatics* **24**, 2780-2781.
- 47 Lorentzen, E., Siebers, B., Hensel, R., Pohl, E. Structure, function and evolution of the Archaeal class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase. (2004) *Biochem Soc Trans.* **32**, 259-63.
- 48 Wierenga RK. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. (2001) *FEBS Lett.* Mar 16;492(3):193-8.
- 49 Spolter, P. D., Adelman, R. C., Weinhouse, S. Distinctive properties of native and carboxypeptidase-treated aldolases of rabbit muscle and liver. (1965) *J. Biol. Chem.* **244**, 126-134.
- 50 Rutter, W. J., Richards, O. C., Woodfin, B. M. Comparative studies of liver and muscle aldolase. I. Effect of carboxypeptidase on catalytic activity. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 3193-3197
- 51 Corina, D. L., and Wilton, D. C. An apparent lack of stereospecificity in the reaction catalysed by deoxyribose 5-phosphate aldolase due to methyl-group rotation and enolization before product release. (1976) *Biochem. J.* **157**, 573-576
- 52 Loughman, J.A. and Caparon, M.G. A novel adaptation of aldolase regulates virulence in

- 
- Streptococcus pyogenes. (2006) *EMBO J.* **25**, 5414-5422.
- 53 Loughman, J.A. and Caparon, M.G. Comparative functional analysis of the lac operon in Streptococcus pyogenes. (2007) *Molecular Microbiology.* **64**, 269-280.
- 54 Cunningham, M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. (2000) *Clin Microbiol Rev.* **13**, 470-511

**Footnotes:**

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

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

Work was carried out in part at beamlines X12B, X25 and X29 of the National Synchrotron Light Source. Financial support comes principally from the Offices of Biological and Environmental Research and of Basic Energy Sciences of the US Department of Energy, and from the National Center for Research Resources of the National Institutes of Health. Assistance by beamline personnel, Drs L. Flaks, D.K. Schneider, A. Soares, A. Héroux and H. Robinson, is gratefully acknowledged. The generous help of Laurent Cappadoccia in data collection was also particularly appreciated. Critical reading of the manuscript by Dr. Casimir Blonski was appreciated. Tagatose-bisphosphate was generous gift of Dr. W. Fessner.

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

## CHAPITRE 3: Discussion

La résolution des structures de la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase de *Streptococcus pyogenes* native et en complexe avec son substrat DHAP a permis de déposer une des premières structures tridimensionnelles d'une TBP aldolase de classe I. Son repliement, un tonneau ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> caractéristique des aldolases de classe I ou II, voit le site actif enfoui au cœur du tonneau, et gardé par trois régions très mobiles et de faible densité électronique dans la structure native. Une recherche dans la base de données UniProt grâce au serveur Blast (NCBI BLAST2) a permis de mettre en évidence de nombreuses similitudes de séquences avec des TBP aldolases de divers streptocoques. L'alignement des structures modelées *via* le programme Swiss-model (Arnold, 2006) des meilleurs résultats du serveur Blast sur la structure native de la TBP aldolase de *S. pyogenes* a été réalisé grâce au programme PyMOL. Les modèles, ceux d'une protéine non identifiée de *Streptococcus infantarius*, d'une TBP aldolase de *Streptococcus mutans*, d'une TBP aldolase de *Streptococcus gordonii*, et d'une TBP aldolase de *Streptococcus sanguinis*, et la structure de la TBP aldolase de *Streptococcus pyogenes*, partagent tous les mêmes résidus au sein de leur site actif : Arg<sup>278</sup>, Gly<sup>277</sup>, Ser<sup>249</sup>, Gly<sup>277</sup>, Ser<sup>249</sup>, Asp<sup>27</sup>, Gln<sup>28</sup>, Lys<sup>125</sup> et Leu<sup>275</sup> (numérotation de la TBP aldolase de *S. pyogenes*). De même, l'alignement de la structure de la TBP aldolase de *S. pyogenes* sur la structure modelée de la TBP aldolase de *Staphylococcus aureus*, avec laquelle elle partage 73,6 % d'identité, a permis de souligner les mêmes résidus du site actif.



Le trempage pendant cinq minutes de cristaux de la TBP aldolase de *S. pyogenes* dans une solution saturante de DHAP a permis de piéger un intermédiaire réactionnel enzyme-substrat. Cet intermédiaire présente un caractère iminium certain, en contraste avec la FBP aldolase de muscle qui, elle, montre une énamine dans ces conditions (St-Jean, 2007). L'intermédiaire iminium chez la TBP aldolase de *S. pyogenes* est stabilisé par de nombreux ponts hydrogènes et interactions électrostatiques avec des résidus du site actif, très similaires à celles présentes dans la structure de la FBP aldolase de muscle en complexe avec le DHAP. L'alignement de la structure de la TBP aldolase de *S. pyogenes* sur celle de la FBP aldolase de muscle a ainsi permis de vérifier que tous les résidus du site actif considérés comme importants pour la catalyse étaient conservés chez les deux enzymes, mis à part la Leu<sup>275</sup> de la TBP aldolase. Cette Leucine est, dans la FBP aldolase, remplacée par Ser<sup>300</sup>, résidu que l'on pense à présent (St-Jean, 2007) capable de former un pont hydrogène stabilisateur avec l'atome N $\zeta$  de la Lys<sup>229</sup> ce qui stabilise la forme énamine de l'intermédiaire. La formation de ce pont hydrogène n'est possible que dans la forme énamine de l'intermédiaire réactionnel, et non dans la forme iminium. Il est donc intéressant de noter que cette Serine est remplacée par une Leucine dans la structure de la TBP aldolase de *S. pyogenes*, et que c'est l'iminium qui y est stabilisé. La figure 6 de l'article montre une possible conformation de l'intermédiaire réactionnel iminium : l'hydroxyle du C3 du DHAP pourrait subir une isomérisation et adopter une conformation *cis* autour du lien C2-C3 du DHAP. Cette isomérisation *cis-trans* pourrait permettre la formation d'un pont hydrogène de 2.39 Å entre l'hydroxyle C3 du DHAP et son O1. Une telle géométrie n'est néanmoins acceptable que s'il y a

hybridation  $sp^2$  au niveau du C3 de l'intermédiaire réactionnel. En effet, une hybridation  $sp^3$  induirait une distance trop courte et un encombrement stérique entre l'hydroxyle du C3 et son O1. Enfin, une telle géométrie permettrait d'expliquer les résultats de transfert de proton obtenus lors de la tritiation/détritiation du DHAP catalysée par la TBP aldolase. En effet, l'enzyme, bien que capable de marquer au tritium les deux cotés *pro-S* et *pro-R* du carbone C3 de l'intermédiaire réactionnel, ne semble capable de ne démarquer que le côté *pro-S*. Or, la formation du sorbose-bisphosphate et du psicose-bisphosphate à partir du DHAP et G3P catalysée par la TBP aldolase implique

Dans le cadre de la condensation catalysée par la FBP aldolase de muscle, la face *si* du DHAP est attaquée nucléophiliquement par la face *si* du G3P, ce qui provoque la rétention de la configuration au niveau du carbone C3, et donc résulte en la formation du fructose-1,6-bisphosphate (St-Jean, 2005; St-Jean, 2007). De même, la L-rahmnulose-1-phosphate aldolase est capable de produire du L-rahmnulose-1-phosphate en catalysant l'attaque de la face *re* du L-lactaldéhyde sur la face *re* du DHAP (Kroemer, 2003). A l'opposé, il existe des aldolases qui génèrent des produits racémiques au niveau de l'orientation de leurs hydroxyles. Ainsi, la  $\alpha$ -keto- $\beta$ -deoxyhexarate aldolase et la 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase, deux enzymes pyruvate-dépendantes (Tableau III), démontrent une racémisation au carbone C4 de leur produit de condensation (Fish, 1966; Kobes, 1969). Il a déjà été démontré (Meloche, 1973), que ce manque de stéréospécificité et de discrimination chirale est le résultat de

l'orientation peu contrôlée de l'aldéhyde au sein du site actif de ces aldolases. Ce sont donc les deux faces *si* et *re* de l'accepteur aldéhyde qui sont ainsi capables d'être attaquées nucléophiliquement par une seule face du donneur pyruvate, provoquant ainsi une rétention de configuration au niveau du carbone C3 mais non du C4. La racémisation des produits de condensation n'est donc pas le résultat de l'attaque de l'aldéhyde sur n'importe laquelle des faces de l'accepteur pyruvate, ce qui amènerait une racémisation au niveau du carbone C3 et serait un phénomène atypique des aldolases. Pour ce qui est des aldolases DHAP-dépendantes, la L-fucose-1-phosphate aldolase génère également une isomérisation des produits (Ghalambor, 1962). Dans ce dernier cas, il a été démontré que la stéréochimie du carbone C4 dépend de la structure de l'accepteur aldéhyde (Espelt, 2005).

L'incapacité de la TBP aldolase de *S. pyogenes* à détritier la position pro-*R* du C3 du DHAP, alors qu'elle semble à même de tritier les deux positions pro-*R* et pro-*S*, s'inscrit dans ce contexte. En effet, et ce malgré les apparences, cette enzyme semble bien démontrer une certaine spécificité au niveau de la déprotonation du DHAP lié au site actif. Afin de vérifier ce point qui, bien qu'en accord avec le mécanisme aldolasique standard, est tout de même étonnant au regard des quatre produits de condensation de la TBP aldolase de *S. pyogenes*, nous avons concocté une expérience de contrôle supplémentaire. Ainsi que la section Matériel et Méthodes de l'article l'explique en détails, la TBP aldolase a été incubée avec du DHAP dans un milieu contenant du <sup>3</sup>H. Le DHAP marqué résultant a ensuite été mis en présence de la même TBP aldolase, afin que cette dernière puisse détritier le DHAP qu'elle avait elle-même tritié précédemment.

L'incubation à la triose phosphate isomérase ou à la FBP aldolase de muscle a finalement permis d'évaluer la préférence de la TBP aldolase pour le proton en position *pro-R* ou *pro-S*.

La superposition de la structure de la TBP aldolase liée au DHAP sur celle de l'enzyme libre a permis de distinguer trois régions particulièrement mobiles. Incidemment, ces trois régions étaient celles qui étaient les moins bien définies et dessinées dans la carte de densité électronique de la structure native. Le déplacement de ces régions de la structure native à celle liée au DHAP indique que la liaison du DHAP à l'atome N $\zeta$  de la Lys<sup>205</sup> induit un mouvement de fermeture du site actif, ce qui a pour effet de stabiliser l'intermédiaire enzyme-substrat. Des mouvements conformationnels de ce type ont déjà été observés dans la FBP aldolase lorsque liée à ses substrats DHAP et FBP (St-Jean, 2007). La région qui fait preuve du plus large déplacement, baptisée région 3, est une hélice alpha qui renferme l'Arg<sup>278</sup> impliquée dans de nombreuses interactions stabilisatrices avec l'oxyanion du phosphate P1. Le r.m.s.d. moyen de la région 3 atteint les  $1.17 \pm 0.24$  Å.

De même, deux molécules d'eau W1 et W2, conservées de la structure de la TBP aldolase native à celle ligandée ont également été mises en évidence. Ces deux molécules, baptisées W1 et W2 comme dans la structure de la FBP aldolase de muscle (St-Jean, 2007), y ont des positions comparables : W1 est perpendiculaire au plan de l'iminium intermédiaire, et proche de son carbone C3 ( $3.45 \pm 0.16$  Å). W2 est, elle, engagée dans un pont hydrogène avec l'un des oxygènes de l'oxyanion phosphate P1 dans la structure complexée au DHAP ( $2.85 \pm 0.06$  Å), et avec W1 dans les structures

native et ligandée ( $3.50 \pm 0.27 \text{ \AA}$  et  $3.37 \pm 0.53 \text{ \AA}$ , respectivement). La possibilité d'un transfert de proton séquentiel *via* ces deux molécules d'eau, si proches du carbone C3 de l'intermédiaire réactionnel, est donc à envisager.

## CHAPITRE 4: Perspectives

La résolution de la structure de la tagatose-1,6-biphosphate aldolase de *Streptococcus pyogenes* native et en complexe avec un de ses substrats naturels le DHAP a donc permis un premier pas vers la compréhension de son mécanisme catalytique et en particulier de son étonnant manque de stéréospécificité. La suite évidente à ce projet est donc naturellement la résolution de structures trois-dimensionnelles de la TBP aldolase complexées à ses cinq autres substrats le fructose-1,6-bisphosphate aldolase, le tagatose-1,6-phosphate aldolase, le sorbose-1,6-bisphosphate, le psicose-1,6-bisphosphate aldolase, ainsi que le glycéraldéhyde-3-phosphate. De même, les structures de la TBP aldolase en complexe avec divers inhibiteurs, compétitifs ou non, pourraient permettre d'éclairer un peu plus son mécanisme, et les caractéristiques qui lui permettent d'être si peu spécifique au niveau du carbone 3 et 4 de ses substrats. Elles pourraient également conforter l'hypothèse d'un isomérisme *cis-trans* autour du lien C2-C3 du DHAP dans le sens de la condensation. Dans le cadre de la suite à amener à ce projet, certaines de ses structures ont déjà été entreprises, conjointement avec les études enzymologiques adéquates, et des résultats prometteurs obtenus. Bien que la structure de la TBP aldolase en complexe avec son substrat préféré, le tagatose-1,6-phosphate, de même que celle de la TBP aldolase complexée au fructose-1,6-bisphosphate, aient été difficile à obtenir du fait de l'équilibre favorable au clivage de la catalyse, cela a été réalisé récemment. En effet, la mise au point d'une technique de trempage des cristaux de TBP aldolase à des pH décroissants successifs a permis de piéger à un pH acide

moins favorable à la catalyse les deux substrats dans le site actif de l'enzyme. L'affinement et l'analyse structurale de ces deux structures sont en cours.

De plus, la mutation des résidus du site actif mise en évidence par la résolution de sa structure tridimensionnelle devrait également permettre d'identifier leur rôle spécifique dans la catalyse. Les mutations ponctuelles de Arg<sup>278</sup> et Gln<sup>28</sup> en résidus isomorphes mais non hydrophobes ou non chargés par exemple pourraient se traduire par une perte d'affinité de la TBP aldolase pour ses substrats. De même, les mutations de Lys<sup>125</sup>, Glu<sup>163</sup>, Asp<sup>27</sup> et Leu<sup>275</sup> en résidus isomorphes de charge opposées pourraient amener une perte d'activité de l'enzyme. Certaines de ces mutations ont déjà été réalisées, et ici aussi, les résultats, sont prometteurs. Le mutant Leu<sup>275</sup>Ser par exemple, semble exhiber une perte totale d'activité de clivage du FBP, ce qui conforte l'hypothèse d'un rôle important de ce résidu dans la catalyse.

L'identification de trois régions mobiles dans la structure de la TBP aldolase, régions dont le mouvement est dépendant de la liaison de l'enzyme à son substrat, offre une piste de recherche dans le rôle putatif de l'homologue de LacD.2 dans *S. pyogenes*, LacD.1. En effet, la liaison de LacD.1 à RopB semble être subordonnée à sa capacité à lier ses substrats naturels, et pourrait imputer un rôle aux différents mouvements conformationnels adoptés par la protéine. Diverses mutations au sein de ces régions dans LacD.2, qui auraient pour effet de minimiser ou maximiser ces changements conformationnels après liaison au substrat devraient donc permettre de mesurer leur

importance dans le rôle de senseur métabolique attribué à LacD.1. Pour cela, des expériences *in vivo*, faites conjointement avec Caparon *et al.* (Loughman et Capron, 2006; Loughman et Caparon, 2007), et qui permettraient d'observer les effets de ces mutations affectant les changements conformationnels sur la virulence du streptocoque lui même, sont envisagées. Enfin, la résolution de la structure trois-dimensionnelle de LacD1, native ou mutée et complexée a ses substrats et peut être également à RopB, est prévue.



## Références :

1. Peuckert, W., Microbiology of streptococcal infections, *Klin. Padiatr.*, 1985, **197**(1), 5-8.
2. Billroth, T., Pathology and therapeutics, in fifty lectures 1871, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2003, **408**, 4-11.
3. Whiffin, R.A., Puerperal Septicemia, *Cal. State J. Med.*, 1903, **1**(13), 395-7.
4. Sherman, J.M. and Albus, W.R., Some Characters which Differentiate the Lactic-acid Streptococcus from Streptococci of the Pyogenes Type Occurring in Milk, *J. Bacteriol.*, 1918, **3**(2), 153-74
5. Evans, A.C., Studies on Hemolytic Streptococci: II. Streptococcus pyogenes, *J. Bacteriol.*, 1936, **31**(6), 611-24.
6. Brown, J.H., The use of blood agar for the study of streptococci, *Rockefeller Institute Medical Research Monograph*, 1919, **9**
7. Schottmuller, H., Die Arunterscheidung des fur den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar, *Munch. med. Wochschr.*, 1903, **50**, 849-853, 909-12.
8. Budelmann, G., Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis, *Internist (Berl)*, 1969. **10**(3), 92-101.
9. Horstmeier, C. and Washington, J.A. 2nd, Microbiological study of streptococcal bacteremia, *Appl. Microbiol.*, 1973. **26**(4), 589-91.
10. Jassim, S., Salt, W.G., Stretton, R.J., In vitro studies of haemolysis by some staphylococci grown in chemically defined media, *J. Appl. Bacteriol.*, 1989, **67**(5), 511-20.
11. Orden, B., Streptococcus pyogenes not producing beta hemolysis during aerobiosis, *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, 1991, **9**(8) 516-7
12. Lancefield, R.C., A sereological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exptl. Med.*, 1933, **57**, 571-95.
13. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., Microbiology, 1973, 2<sup>nd</sup> Edition, Harper & Row Publishers.

14. Bottone, E.J., *An Atlas of the Clinical Microbiology of Infectious Diseases*, 2006, Illustrated Edition, Informa Health Care.
15. Iacono, V.J., Lysozyme-mediated de-chaining of *Streptococcus mutans* and its antibacterial significance in an acidic environment, *J. Dent. Res.*, 1985. **64**(1), 48-53.
16. Stollerman, G.H. and Ekstedt, R., Long chain formation by strains of group A streptococci in the presence of homologous antiserum: a type-specific reaction. *J Exp Med*, 1957. **106**(3): p. 345-56.
17. Lominski, I. and Shaikh, M.R., Long-chain mutants of *Streptococcus faecalis* induced by ultraviolet irradiation, *J. Med. Microbiol.*, 1968, **1**(2), 219-20.
18. Brooks, G.F, Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Jawetz, Melnick & Adelberg's *Medical Microbiology*, 2007, 24<sup>th</sup> Edition, illustrated, revised, McGraw-Hill Professional.
19. Fung, J.C., Wicher, K., McCarty, M., Immunochemical analysis of streptococcal group A, B, and C carbohydrates, with emphasis on group A, *Infect. Immun.*, 1982. **37**(1), 209-15.
20. Coligan, J.E., Schnute, W.C. Jr., Kindt, T.J., Immunochemical and chemical studies on streptococcal group-specific carbohydrates, *J. Immunol.*, 1975, **114**(6), 1654-8.
21. Pritchard, D.G., Coligan, J.E., Speed, S.E., Gray, B.M., Carbohydrate fingerprints of streptococcal cells, *J. Clin. Microbiol.*, 1981, **13**(1), 89-92.
22. Kahn, F., Mörgelin, M., Shannon, O., Norrby-Teglund, A., Herwald, H., Olin, A.I., Björck, L., Antibodies against a surface protein of *Streptococcus pyogenes* promote a pathological inflammatory response, *PLoS Pathog.*, 2008, **4**(9), e1000149.
23. Fischetti, V.A., Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989. **2**(3), 285-314.
24. Okamoto, S., Kawabata, S., Terao, Y., Fujitaka, H., Okuno, Y., Hamada, S., The *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-

infected alveolar epithelial cells and lethal bacterial-viral superinfection, *Infect. Immun.*, 2004, **72**(10), 6068-75.

25. Gryllos, I., Tran-Winkler, H.J., Cheng, M.F., Chung, H., Bolcome, R. 3rd, Lu, W., Lehrer, R.I., Wessels, M.R., Induction of group A Streptococcus virulence by a human antimicrobial peptide, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(43), 16755-60.
26. Stollerman G. H. and Dale J. B., The importance of group A streptococcus capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective, *Clinical Infectious Diseases*, 2008, **46**, 1038-45
27. Hanski, E., Horwitz, P.A., Caparon, M.G., Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells, *Infect. Immun.*, 1992, **60**(12), 5119-25.
28. Nakamura, T., Hasegawa, T., Torii, K., Hasegawa, Y., Shimokata, K., Ohta, M., Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the abundance of virulent exoproteins of group A streptococcus caused by environmental changes, *Arch. Microbiol.*, 2004, **181**(1), 74-81.
29. Bisno, A.L., Brito, M.O., Collins, C.M., Molecular basis of group A streptococcal virulence, *Lancet Infect. Dis.*, 2003, **3**(4), 191-200.
30. Oelschlaeger, T.A., Hacker, J., Bacterial Invasion Into Eukaryotic Cells, 2000, Illustrated Edition, Springer.
31. Dong, H., Li, S., Song, Q., Liu, S., Lin, H., Chai, Y., Zhou, A., Fang, T., Zhang, H., Jin, C., Lu, W., Cao, G., Beta-haemolytic group A streptococci emm75 carrying altered pyrogenic exotoxin A linked to scarlet fever in adults, *J. Infect.*, 2008, **56**(4), 261-7.
32. Fraser, J.D. and Proft, T., The bacterial superantigen and superantigen-like proteins, *Immunol. Rev.*, 2008, **225**, 226-43.
33. Chiang-Ni C., Wu J.J., Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of Streptococcus pyogenes, *J. Formos. Med. Assoc.*, 2008, **107**(9), 677-85

34. Fontaine, M.C., Lee, J.J., Kehoe, M.A, Combined contributions of streptolysin O and streptolysin S to virulence of serotype M5 *Streptococcus pyogenes* strain Manfredo, *Infect. Immun.*, 2003, **71**(7), 3857-65.
35. Goldmann, O., Sastalla, I., Wos-Oxley, M., Rohde, M., Medina, E., *Streptococcus pyogenes* induces oncosis in macrophages through the activation of an inflammatory programmed cell death pathway, *Cell Microbiol.*, 2009, **11**(1), 138-55.
36. Nelson, L., Potential drug target for flesh-eating bug, *Drug Discov. Today*, 2004, **9**(20), 862.
37. Chhatwal, G.S. and McMillan, D.J., Uncovering the mysteries of invasive streptococcal diseases, *Trends Mol. Med.*, 2005, **11**(4), 152-5.
38. Sun, H., Ringdahl, U., Homeister, J.W., Fay, W.P., Engleberg, N.C., Yang, A.Y., Rozek, L.S., Wang, X., Sjöbring, U., Ginsburg, D., Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection, 2004, **305**(5688), 1283-6.
39. Hynes, W.L., Dixon, A.R., Walton, S.L., Aridgides, L.J., The extracellular hyaluronidase gene (hyla) of *Streptococcus pyogenes*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **184**(1), 109-12.
40. Starr, C.R. and Engleberg, N.C., Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus, *Infect. Immun.*, 2006, **74**(1), 40-8.
41. Rosch J. W. and Tuomanen E., Adapting a diet from sugar to meat: double-dealing genes of *Streptococcus pyogenes*, *Molecular Microbiology*, 2007, **64**, 257-9
42. Quinn, R.W. and Liao, S.J., A comparative study of antihyaluronidase, antistreptolysin "O," antistreptokinase, and streptococcal agglutination titers in patients with rheumatic fever, acute hemolytic streptococcal infections, rheumatoid arthritis and non-rheumatoid forms of arthritis, *J. Clin. Invest.*, 1950, **29**(9), 1156-66.
43. Cunningham, M.W., Pathogenesis of group A streptococcal infections, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, **13**, 470–511

44. Shet, A., Kaplan, E., Addressing the burden of group A streptococcal disease in India, *Indian J. Pediatr.*, 2004, **71**(1), 41-8.
45. Medina, E., Goldmann, O., Toppel, A.W., Chhatwal, G.S., Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion, *J. Infect. Dis.*, 2003, **187**(4), 597-603.
46. Cvjetkovic, D., Jovanović, J., Hrnjaković-Cvjetković, I., Aleksić-Dordević, M., Stefan-Mikić, S., Significance of group A streptococcal infections in human pathology, *Med. Pregl.*, 2008, **61**(9-10), 529-32.
47. Shelburne, S.A. 3rd, Keith, D.B., Davenport, M.T., Horstmann, N., Brennan, R.G., Musser, J.M., Molecular characterization of group A *Streptococcus* maltodextrin catabolism and its role in pharyngitis, *Mol. Microbiol.*, 2008, **69**(2), 436-52.
48. Papadas, T.A., Karkoulas, K.P., Mastronikolis, N.S., Sampsonas, F.L., Spiropoulos, K.B., Concurrent tonsillitis and pneumonia due to *S. pyogenes*, *Clin. Ter.*, 2008, **159**(1), 33-4.
49. Hedrick, J., Acute bacterial skin infections in pediatric medicine: current issues in presentation and treatment, *Paediatr. Drugs*, 2003, **5 Suppl 1**, 35-46.
50. Luca-Harari, B., Darenberg, J., Neal, S., Siljander, T., Strakova, L., Tanna, A., Creti, R., Ekelund, K., Koliou, M., Tassios, P.T., van der Linden, M., Straut, M., Vuopio-Varkila, J., Bouvet, A., Efstratiou, A., Schalén, C., Henriques-Normark, B., Strep-EURO Study Group, Jasir, A., Clinical and Microbiological Characteristics of Severe *Streptococcus pyogenes* Disease in Europe, *J. Clin. Microbiol.*, 2009, **47**, 1155-65.
51. Thomas, D., Perpoint, T., Dauwalder, O., Lina, G., Floccard, B., Richard, J.C., Bouvet, A., Peyramond, D., Allaouchiche, B., Chidiac, C., Vandenesch, F., Etienne, J., Ferry, T., In vivo and in vitro detection of a superantigenic toxin Vbeta signature in two forms of streptococcal toxic shock syndrome, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, **28**(6), 671-6.

52. Weidle, P.A., Brankamp, J., Dedy, N., Haenisch, C., Windolf, J., Jonas, M., Complication of a closed Colles-fracture: necrotising fasciitis with lethal outcome. A case report, *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 2009, **129**(1), 75-8.
53. Bingöl-Koloğlu, M., Yildiz, R.V., Alper, B., Yağmurlu, A., Ciftçi, E., Gökçora, I.H., Ince, E., Emiroğlu, M., Dindar, H., Necrotizing fasciitis in children: diagnostic and therapeutic aspects, *J Pediatr Surg.*, 2007, **42**(11), 1892-7.
54. González Castro A, Rodriguez-Borregan JC, Obeso T, Castellanos A, Perez-Ceballos A, Sesmero JR., Necrotizing fasciitis after cesarean section., *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2008, **277**(6), 579-81. Erratum in: *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2008, **277**(6), 583.
55. Olsen, R.J., Shelburne, S.A., Musser, J.M., Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis, *Cell Microbiol.*, 2009, **11**(1), 1-12
56. Cunningham, M.W., Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008, **609**, 29-42.
57. Skattum, L., Akesson, P., Truedsson, L., Sjöholm, A.G., Antibodies against four proteins from a Streptococcus pyogenes serotype M1 strain and levels of circulating mannan-binding lectin in acute poststreptococcal glomerulonephritis, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2006, **140**(1), 9-19.
58. Burova, L., Thern, A., Pigarevsky, P., Gladilina, M., Seliverstova, V., Gavrilova, E., Nagornev, V., Schalén, C., Totolian, A., Role of group A streptococcal IgG-binding proteins in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit, *APMIS*, 2003, **111**(10), 955-62.
59. Aziz, R.K. and Kotb, M., Rise and persistence of global M1 T1 clone of Streptococcus pyogenes, *Emerg. Infect. Di.*, 2008, **14**(10), 1511-7
60. Dworkin, M., Falkow, S., The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 2006, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer.
61. Gibson, C.M., Mallett, T.C., Claiborne, A., Caparon, M.G., Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of Streptococcus pyogenes, *J. Bacteriol.*, 2000, **182**, 448-455.

62. Pearce, W. A. Jr, Glucose and galactose metabolism in streptococcus pyogenes, *J. Bacteriol.*, 1957, **74**(2), 186-93.
63. Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 2004, 3<sup>rd</sup> Edition, illustrated, revised, CRC Press.
64. Maxwell, E. S., K. Kurahashi, H. M. Kalckar, Enzymes of the Leloir pathway, *Methods in enzymology*, 1962, vol. 5. Academic Press Inc., New York, 174-189.
65. Steele, R.H., White, A.G., and Pierce, W.A., Jr., The fermentation of galactose by *Streptococcus pyogenes*, *J. Bacteriol.*, 1954, **67**(1), 86-9.
66. van Rooijen, R.J., van Schalkwijk, S., de Vos, W.M., Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 7176-7181.
67. Meyerhof O., Junowicz-Kocholaty, R., The equilibria of isomerase and aldolase, and the problem of the phosphorylation of glyceraldehyde phosphate, *J. Bio. Chem.*, 1943, **149**, 71-92.
68. Meyerhof O., Oesper, P., The mechanism of the oxydative reaction in fermentation, *J. Biol. Chem.*, 1947, **170**, 1-22.
69. Kresge, N., Simoni, R.D., and Hill, R.L., Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**(4), e3.
70. Rutter, W.J., Evolution of Aldolase, *Fed. Proc.*, 1964. **23**, 1248-57.
71. Blonski, C., De Moissac, D., Périé, J., Sygusch, J., Inhibition of rabbit muscle aldolase by phosphorylated aromatic compounds, *Biochem. J.*, 1997, **323 ( Pt 1)**, 71-7.
72. Thomson, G.J., Howlett, G.J., Ashcroft, A.E., Berry, A., The *dhnA* gene of *Escherichia coli* encodes a class I fructose bisphosphate aldolase, *Biochem. J.*, 1998, **331**(2), 437-45.

73. Hall, D.R., Bond, C.S., Leonard, G.A., Watt, C.I., Berry, A., Hunter, W.N., Structure of tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 22018-24.
74. Kroth, P.G., Schroers, Y., Kilian, O., The peculiar distribution of class I and class II aldolases in diatoms and in red algae, *Curr. Genet.*, 2005, **48**(6), 389-400.
75. Lorentzen, E., Siebers, B., Hensel, R., Pohl, E., Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates, *Biochemistry*, 2005, **44**(11), 4222-9.
76. Lorentzen, E., Siebers, B., Hensel, R., Pohl, E., Structure, function and evolution of the Archaeal class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *Biochem. Soc. Trans.*, 2004, **32**(Pt 2), 259-63.
77. Ramsaywak, P.C., Labbé, G., Siemann, S., Dmitrienko, G.I., Guillemette, J.G., Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*--a novel Class II A tetramer, *Protein Expr. Purif.*, 2004, **37**(1), 220-8.
78. Galkin, A., Li, Z., Li, L., Kulakova, L., Pal, L.R., Dunaway-Mariano, D., Herzberg, O., Structural insights into the substrate binding and stereoselectivity of giardia fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *Biochemistry*, 2009, **48**, 3186-96
79. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web, <http://www.pymol.org>.
80. St-Jean, M., Lafrance-Vanasse, J., Liotard, B., Sygusch, J., High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 27262-70.
81. St-Jean, M. and Sygusch, J., Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 31028-37.
82. Bissett, D.L. and Anderson, R.L., Lactose and D-galactose metabolism in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 8750-55.



83. Shannon, L.M. and Marcus, A., Gamma-Methyl-gamma-hydroxy-alpha-ketoglutaric aldolase. I. Purification and properties, *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 3342-7.
84. Shannon, L.M. and Marcus, A., Gamma-Methyl-gamma-hydroxy-alpha-ketoglutaric aldolase. II. Studies with pyruvate-C14, *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 3348-53.
85. Meloche, H.P., The 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase catalyzed pyruvate-proton exchange reaction: enzymic synthesis of crystalline sodium 3H-pyruvate, *Anal. Biochem.*, 1970, **38**(2), 389-92.
86. Meloche, H.P. and Mehler, L., The stereochemistry at carbon 3 of pyruvate lyase condensation products: Aldolases forming condensation products racemic at carbon 4, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**(18), 6333-8.
87. Meloche, H.P., Mehler, L., Wurster, J.M., The stereochemistry at carbon 3 of pyruvate lyase condensation products: 2-Keto-3-deoxygluconate-6-phosphate aldolase, *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**(17), 6870-4.
88. Kroemer, M., Merkel, I., Schulz, G.E., Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase, *Biochemistry*, 2003, **42**, 10560-8.
89. Heath, E.C. and Ghalambor, M.A., The metabolism of L-fucose. I. The purification and properties of L-fuculose kinase, *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 2423-6.
90. Ghalambor and Heath, The metabolism of L-fucose. II. The enzymatic cleavage of L-fuculose 1-phosphate, *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 2427-33.
91. Espelt, L., Bujons, J., Parella, T., Calveras, J., Joglar, J., Delgado, A., Clapés, P., Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-fuculose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde, *Chemistry*, 2005, **11**(5), 1392-401.
92. Takayama, S., McGarvey, G.J., Wong, C.H., Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1997, **51**, 285-310.

93. Fessner, W.D., Enzyme mediated C-C bond formation, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, **2**(1), 85-97.
94. Loughman, J.A. and Caparon, M.G., A novel adaptation of aldolase regulates virulence in *Streptococcus pyogenes*. *EMBO*, 2006, **25**, 5414-22.
95. Loughman, J.A. and Caparon, M.G., Comparative functional analysis of the lac operon in *Streptococcus pyogenes*, *Molecular Microbiology*, 2007, **64**, 269-80.
96. Kim, J.W. and Dang, C.V., Multifaceted roles of glycolytic enzymes, *Trends Biochem. Sci.*, 2005, **30**(3), 142-50.
97. Liotard, B. and Sygusch, J., Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of native and selenomethionine class I tagatose-1,6-bisphosphate aldolase from *Streptococcus pyogenes*, *Acta.Cryst.Sect.D*, 2003, **60**, 528-30.
98. Racker, E., Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity, *J.Biol.Chem*, 1947, **47**, 843-54.
99. Otwinowski, Z.a.M.W., Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, 1997. **276**, 307-26.
100. Healy, M.J. and Christen, P., Mechanistic probes for enzymatic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase, *Biochemistry*, 1973, **12**, 35-41
101. Rose, I.A. and Rieder, S.V., Studies on the mechanism on the aldolase reaction; isotope exchange reactions of muscle and yeast aldolase, *J. Biol. Chem.*, 1958, **231**, 315-29.
102. Rose, I.A., The absolute configuration of dihydroxyacetone phosphate tritiated by aldolase reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958. **80**, 5835-36.
103. Arnold, K., Bordoli,L., Kopp, J., Schwede, T., The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics*, 2006, **22**(2), 195-201.