



HAL
open science

Etudes des facteurs moléculaires responsables de la spécificité de cofacteur des déshydrogénases à NAD(P)

Sophie Rahuel-Clermont

► **To cite this version:**

Sophie Rahuel-Clermont. Etudes des facteurs moléculaires responsables de la spécificité de cofacteur des déshydrogénases à NAD(P). Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1994. Français. NNT : 1994NAN10424 . tel-01747138

HAL Id: tel-01747138

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747138>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

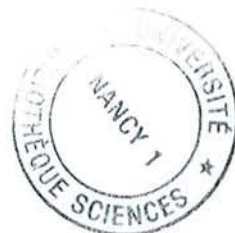
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY I

UFR SCIENCES ET TECHNIQUES BIOLOGIQUES
Ecole Doctorale Biologie et Santé



THESE

présentée par

Sophie RAHUEL-CLERMONT

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de NANCY I

en

Enzymologie

**ETUDE DES FACTEURS MOLÉCULAIRES RESPONSABLES
DE LA SPÉCIFICITÉ DE COFACTEUR DES
DÉSHYDROGÉNASES À NAD(P)**

Soutenue le 8 Novembre 1994 devant la commission d'examen :

<i>Président</i>	M. LINDEN G.	Professeur
<i>Rapporteurs</i>	M. GERARD D.	Professeur
	M. DIDEBERG O.	Directeur de Recherche au CNRS
<i>Examineurs</i>	M. HERVE G.	Directeur de Recherche au CNRS
	M. WONACOTT A.	Directeur de Recherche chez GLAXO
	M. BRANLANT G.	Professeur

A mes parents

A Didier, mon récent époux et secrétaire personnel

A Tanguy

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique URA CNRS 457 de la Faculté des Sciences de l'Université Henri Poincaré de Nancy I, dirigé par Monsieur le professeur Guy Branlant. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir dirigé ce travail. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour la formation scientifique qu'il m'a transmise, sa rigueur, son enthousiasme, sa persévérance dans les moments difficiles et pour ses conseils continus jusque dans la rédaction de ce mémoire.

J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur le Professeur Dominique Gérard pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'occasion de plusieurs stages, et pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je suis également très reconnaissante à Monsieur le Dr Otto Dideberg de l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'être rapporteur de cette thèse.

I am very indebted to Dr Alan Wonacott for precious discussion and critical revision of the manuscript of the articles included in this thesis, for the resolution of the structure of the mutant S and for accepting to be one of the examiners of this work.

Je tiens enfin à exprimer tous mes remerciements à Monsieur le Dr Guy Hervé et Monsieur le Professeur Guy Linden d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Madame le Dr Catherine Corbier pour l'encadrement de qualité dont elle m'a fait profiter, sa grande disponibilité, sa gentillesse, ses encouragements mais aussi pour tous les moments d'amitié que nous avons partagés.

Je tiens également à remercier Monsieur le Dr Yves Mely pour l'aide et l'encadrement qu'il m'a apportés lors des expériences de fluorescence, ainsi que pour les précieuses discussions que nous avons échangées.

Je remercie sincèrement Mesdames Jacqueline Bayeul, Evelyne Habermacher, Séverine Boutserin, Virginie Pint et Monsieur Jean-Paul Declé pour leur aide technique consciencieuse et efficace et pour leur gentillesse quotidienne.

J'associe également à ces témoignages de reconnaissance Solange, avec qui j'ai partagé les difficultés de l'enzymologie et heureusement bien d'autres choses moins compliquées, ainsi que Fabienne, Anne et Rémi pour notre joyeuse année de DEA et celles qui ont suivi.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont permis de mener à bien ce travail grâce à leur aide, leur gaieté, leur sourire et leur amitié, Nathalie, Annie, François, Régis, Afaf, Sandrine, Jacky, Pick, Mohammed, Lionel, Guillermo, Carole, tous mes collègues du laboratoire, et à mes amis du Concert Royal, Suzanne, Vincent, Judith, Cécile, Jef, Yves et Valérie.

TABLE DES MATIÈRES

Table des Matières.....	i
Abréviations.....	v
Avant-propos.....	vii

INTRODUCTION

I. LES SITES DE FIXATION DES NUCLÉOTIDES DANS LES PROTÉINES.....	1
IA. Les sites dinucléotidiques.....	1
IA1. Le repliement de Rossmann.....	1
IA1a. Description générale du repliement.....	1
IA1b. Généralisation à d'autres structures.....	3
IA1c. La conformation globale du NAD(P) lié.....	3
IA1d. Analyse des séquences associées au repliement de Rossmann.....	7
IA2. Le sous-site de liaison de l'adénosine.....	7
IA2a. La position P7 : le résidu C-terminal du brin β_B	7
IA2b. La région de la boucle β_A - α_B	9
IA2c. Le potentiel électrostatique du site.....	12
IA2d. Le site de liaison du cycle de l'adénine.....	14
IA3. Le sous-site de liaison de la partie nicotinamide-ribose des cofacteurs NAD et NADP.....	14
IA3a. Description.....	14
IA3b. Conformation du cycle nicotinamide et stéréospécificité du transfert d'hydrure.....	15
IA3c. Liaison du nicotinamide et catalyse.....	15
IA4. Les autres motifs de liaison des cofacteurs NAD(P).....	17
IA4a. Isocitrate déshydrogénase (ICD) et Isopropylmalate déshydrogénase (IPMDH).....	17
IA4b. La famille des aldo-céto réductases.....	17
IA4c. La famille des toxines agissant par ADP-ribosylation.....	19
IB. Les sites de fixation des mononucléotides.....	19
IB1. Les différents motifs.....	19
IB1a. Le repliement "classique".....	19
IB1b. Autres.....	21
IB2. Comparaison avec les sites dinucléotidiques.....	22
II. LE PROBLÈME DE LA SPÉCIFICITÉ POUR LES COFACTEURS À NICOTINAMIDE NAD ET NADP.....	22
IIA. Introduction.....	22
IIA1. Le rôle physiologique du NAD et du NADP.....	22
IIA2. Le degré de spécificité.....	22
IIB. Analyse des séquences primaires d'enzymes NAD- et NADP-spécifiques.....	23
IIB1. Un consensus pour les enzymes NADP-dépendantes?.....	23
IIB2. Les contraintes structurales de la liaison du NADP.....	23
III. OBJECTIFS.....	24
IV. UN MODÈLE D'ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ NAD/NADP : LA GAPDH.....	24
IVA. Les différentes classes de GAPDH.....	24
IVA1. La GAPDH glycolytique (EC 1.2.1.12).....	25
IVA1a. Rôle enzymatique.....	25
IVA1b. Spécificité de cofacteur.....	25
IVA1c. Localisation.....	25

IVA2. La GAPDH chloroplastique (EC 1.2.1.13).....	27
IVA2a. Localisation et fonction métabolique.....	27
IVA2b. Spécificité de cofacteur.....	27
IVA2c. Structure et parenté évolutive avec la GAPDH glycolytique.....	27
IVB. Structure de la GAPDH glycolytique NAD-dépendante.....	28
IVB1. Structure du monomère.....	28
IVB2. Structure quaternaire.....	28
IVB2a. Symétries.....	28
IVB2b. Interfaces entre sous-unités.....	31
IVC. La liaison du NAD à la GAPDH glycolytique de <i>B. stearothermophilus</i>	31
IVC1. Le mode de liaison du NAD.....	31
IVC1a. Le site de liaison.....	31
IVC1b. La transition apo-holo.....	33
IVC2. La coopérativité.....	33
IVC3. Le transfert de charge entre NAD et site actif.....	36
IVD. Le mécanisme réactionnel de la GAPDH.....	36
IVD1. Les acides aminés catalytiques.....	36
IVD2. Les étapes de la réaction.....	38
IVE. Autres rôles physiologiques possibles de la GAPDH.....	38
IVE1. Association avec les acides nucléiques.....	38
IVE1a. Fixation sur l'ADN simple brin.....	38
IVE1b. Fixation sur l'ARN.....	40
IVE2. Association avec les structures membranaires.....	40
IVE3. Activité phosphorylante.....	41
IVE4. GAPDH et NO.....	41

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. MATÉRIELS.....	42
IA. Souches Bactériennes.....	42
IA1. Souches utilisées pour les techniques de génie génétique.....	42
IA2. Souches utilisées pour la production de la GAPDH.....	42
IB. Plasmides et Phages.....	42
IB1. Les plasmides.....	42
IB2. Les phages.....	44
IC. Milieux de culture et Boîtes de Petri.....	44
II. TECHNIQUES GÉNÉRALES DE GÉNIE GÉNÉTIQUE.....	46
IIA. Transformation des cellules d' <i>E.coli</i>	46
IIA1. Technique classique (Maniatis et al., 1989).....	46
IIA2. Cas de la souche W3CG.....	47
IIA3. Transformation par électroporation.....	47
IIB. Préparation de l'ADN.....	48
IIB1. La technique du lysat clair.....	48
IIB2. Minipréparation plasmidique.....	48
IIB3. Préparation de l'ADN du phage M13.....	48
IIB3a. Physiologie du phage M13.....	48
IIB3b. Préparation de la forme double brin (db).....	49
IIB3c. Préparation de la forme simple brin (sb).....	49
IIC. Analyse et purification de l'ADN.....	49
IIC1. Analyse par digestion par les enzymes de restriction.....	49
IIC2. Purification des oligonucléotides sur gel de polyacrylamide.....	49
IIC3. Techniques de séquençage.....	50
IID. Technique de mutagénèse dirigée.....	51
IID1. Phosphorylation des amorces oligodésoxynucléotidiques.....	51

IID2. Méthode de Kramer (Kramer et al., 1984).....	51
IID2a. Principe	51
IID2b. Protocole	53
IID3. Les oligodésoxynucléotides utilisés.....	53
IID4. Réinsertion du gène muté dans un vecteur d'expression.....	54
IID4a. Préparation du vecteur B1b-EcoRI-SacI	54
IID4b. Ligation des fragments.....	54
III. TECHNIQUES DE PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE LA GAPDH.....	55
IIIA. Production et purification.....	55
IIIA1. Production.....	55
IIIA2. Purification.....	55
IIIA2a. Sonication.....	55
IIIA2b. Précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium.....	56
IIIA2c. Filtration sur gel.....	56
IIIA2d. Chromatographie d'échange d'anions sur Sépharose Q.....	56
IIIA2e. Préparation de la forme apoenzyme	56
IIIB. Techniques d'analyse des protéines.....	57
IIIB1. Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	57
IIIB2. Détermination de la masse moléculaire du monomère de GAPDH par spectrométrie de masse	58
IIIC. Cristallisation.....	58
IIID. Essai enzymatique	58
IIID1. Préparation des substrats.....	58
IIID2. Test d'activité.....	59
IV. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES.....	60
IVA. Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire	60
IVA1. Détermination des paramètres k_{cat} , K_M et K_i	60
IVA1a. G3P, NAD(P), Pi.....	60
IVA1b. NAD(P)H et 1,3dPG.....	60
IVA1c. Détermination des constantes d'inhibition K_i	60
IVA2. Mesure de k_{cat} en fonction du pH.....	61
IVB. Etude des étapes de la réaction	61
IVB1. Expériences en cinétique rapide	61
IVB2. Analyse de l'étape de phosphorylyse.....	61
V. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA GAPDH ET LE NAD(P).....	62
VA. Marquage d'affinité par le 3-CAPAD	62
VA1. Protocole expérimental	62
VA2. Interprétation cinétique	62
VB. Mesure de l'affinité du NAD(P) par extinction de fluorescence de la protéine.....	65
VC. Mise en évidence de la bande de Racker	67

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

I. PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA GAPDH.....	68
II. IDENTIFICATION DE DÉTERMINANTS DE SPÉCIFICITÉ DE COFACTEUR APPARTENANT À LA STRUCTURE QUATERNAIRE	68
IIA. Mise en évidence de déterminants dans la S-loop.....	68
IIB. Etude radiocristallographique de la structure du mutant S	70

III. ANALYSE DU RÔLE DE RÉSIDUS APPARTENANT À LA STRUCTURE TERTIAIRE	71
IV. EXISTE-T-IL UNE RELATION ENTRE L'EFFICACITÉ ENZYMATIQUE, L'AFFINITÉ POUR LE COFACTEUR ET LA TRANSITION APO→HOLO ?	76
IVA. Efficacité enzymatique et affinité.....	76
IVB. Etape limitante et transition apo→holo	76
IVB1. Mesure de la bande de Racker.....	76
IVB2. Conséquences sur le mécanisme enzymatique.....	78
IVC. Conclusions	81
V. ARTICLE 1 : Probing the Coenzyme Specificity of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases by Site-Directed Mutagenesis (Biochemistry, 1990, 29 7101-7106).....	82
VI. ARTICLE 2 : Determinants of Coenzyme Specificity in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases : Role of the Acidic Residue in the Fingerprint Region of the Nucleotide Binding Fold (Biochemistry, 1993, 32 10178-10184).....	88
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	
I. LE RÔLE DES RÉSIDUS DE LA SIGNATURE P1-P7	95
IA. La structure de type I : un déterminant de la NAD-spécificité.....	95
IB. Le résidu acide en P7 : un antidéterminant NADP des oxydoréductases strictement NAD-dépendantes.....	96
IC. Le cas des enzymes à dualité de cofacteur	98
II. LA RECONNAISSANCE DU NADP	98
IIA. Les effets stériques	98
IIB. Le caractère physicochimique du site du 2'-phosphate.....	103
IIB1. Un site à caractère cationique?.....	103
IIB2. Un site polaire mais non ionique?.....	105
IIB3. La présence de Glycines dans le site.....	106
IIB4. Conséquences sur la forme acidobasique du NADP lié.....	106
III. CONCLUSIONS	107
IV. PERSPECTIVES.....	110
 BIBLIOGRAPHIE	 113

ABRÉVIATIONS

Les acides aminés sont désignés par leurs abréviations du code à 3 lettres.

D32X	Asp32→Xaa (Xaa : tout acide aminé)
S	Leu187→Ala, Pro188→Ser
D32X-S	Asp32→Xaa, Leu187→Ala, Pro188→Ser
B-S	Leu33→Thr, Thr34→Gly, Asp35→Gly, Leu187→Ala, Pro188→Ser
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>C. symbiosium</i>	<i>Clostridium symbiosium</i>
1,3dPG	Acide 1,3-diphosphoglycérique
3-CAPAD	3-chloroacétylpyridine adénine dinucléotide
G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
db	double brin
sb	simple brin
ddNTP	2',3'-didésoxynucléotide triphosphate
dNTP	2'-désoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine adénine mononucléotide
kb	kilobase
pb	paire de bases
liaison H	liaison hydrogène
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme oxydée
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme réduite
PDB	Brookhaven Protein Data Bank
PEG	Polyéthylène glycol
Pi	Phosphate inorganique
Pipes	Piperazine N,N'-bis-2-éthanesulfonate
TES	N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminométhanesulfonate
Tris	N-Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
\bar{K}	constante de dissociation moyenne du NAD(P)
K_1 à K_4	constantes de dissociation du NAD(P) aux 4 sites du tétramère mesurées par extinction de fluorescence
k_{cat}	constante catalytique
$K_D(3-CAPAD)$	constante de dissociation du 3-CAPAD
$K_D(NAD(P))$	constante de dissociation du NAD(P) mesurée par protection vis-à-vis du 3-CAPAD
K_i	constante d'inhibition compétitive
K_M	constante de Michaelis
k_{off}	constante de vitesse apparente de dissociation du NAD(P)H

ADH	Alcool déshydrogénase
ADS	Aldose réductase
DHFR	Dihydrofolate réductase
FDH	Formate déshydrogénase
FNR	Ferrédoxine NADP réductase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDH	Glutamate déshydrogénase
GRS	Glutathione réductase
ICD	Isocitrate déshydrogénase
IPMDH	Isopropylmalate déshydrogénase
LDH	Lactate déshydrogénase
LIP	Lipoamide déshydrogénase
MDH	Malate déshydrogénase
PDR	Phtalate dioxygénase réductase
PHBH	Parahydroxybenzoate hydroxylase

AVANT-PROPOS

Dans le cadre de l'étude des relations existant entre structure et fonction des déshydrogénases, notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années à la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), une enzyme clef de la glycolyse. Cette enzyme présente des propriétés d'intérêt général qui en font un bon modèle d'étude des facteurs structuraux protéiques impliqués dans le site de reconnaissance du cofacteur et dans les sites anioniques à phosphate, des propriétés de coopérativité observées lors de la fixation du cofacteur et liées au caractère multimérique de l'enzyme, du repliement, en raison de sa structure en deux domaines, et de la chimie enzymatique. Elle catalyse l'oxydation réversible du D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en acide 1,3-diphosphoglycérique (1,3dPG). De par son mécanisme, elle peut être comparée aux protéases à Cystéine. Elle a de plus été décrite comme étant impliquée dans d'autres processus biologiques très variés. Enfin, notre équipe avait décrit une expression exceptionnelle du gène cloné de la GAPDH d'*Escherichia coli* (*E.coli*)(Branlant *et al.*, 1983b) et qui s'est révélée par la suite être la conséquence d'une très grande efficacité transcriptionnelle (Charpentier & Branlant, 1994).

Le fait de disposer de grandes quantités de GAPDH de *Bacillus stearothermophilus* (*B.stearothermophilus*) et d'*E. coli* à partir de leurs gènes clonés ainsi que de la structure tridimensionnelle de l'enzyme de *B.stearothermophilus* permettait d'aborder une étude de remodelage d'enzyme en associant les techniques de génie génétique, de modélisation moléculaire, d'enzymologie et de biologie structurale.

Pour ma part, j'ai appliqué ces méthodes à l'étude de la spécificité de cofacteur des GAPDHs. En effet, les déshydrogénases à cofacteur pyridinique présentent plusieurs types de spécificité : strictement NAD-dépendantes, strictement NADP-dépendantes ou à dualité de spécificité NAD et NADP. Ceci posait le problème de la nature des facteurs moléculaires responsables d'une part, de la reconnaissance du NADP par rapport au NAD, et d'autre part, du caractère dual ou strict de la spécificité de cofacteur. La GAPDH était un bon modèle pour aborder ces questions puisque les GAPDHs d'origine cytosolique eucaryotes et eubactériennes sont strictement NAD-spécifiques et que les GAPDHs d'origine chloroplastique présentent une dualité de spécificité. Ce modèle permettait également d'aborder le problème de la coopérativité de fixation du cofacteur aux 4 sous-unités de l'enzyme.

Au cours de mon travail de thèse, qui avait été initié par le Dr C. Corbier au laboratoire et par le Dr A. Wonacott à Londres, j'ai pu montrer que la spécificité de cofacteur des GAPDH dépendait de résidus appartenant à plusieurs sous-unités, en particulier la Pro188, ainsi que de résidus dont le rôle dépendait de la structure tertiaire de l'enzyme, comme l'Asp32, conservé dans de nombreuses déshydrogénases à NAD(P). J'ai mis en évidence le rôle à la fois stérique et/ou électrostatique de ces déterminants sur l'efficacité de liaison du cofacteur, en relation avec l'efficacité du changement conformationnel induit par cette liaison et avec le mécanisme enzymatique.

Mon mémoire commencera par une revue bibliographique générale sur les structures protéiques liant les mono et dinucléotides. J'y détaillerai en particulier les caractéristiques du repliement dit "de Rossmann", et je le comparerai aux autres types de structures connues, dans le but de dégager des caractéristiques communes des sites nucléotidiques. Puis je présenterai notre modèle d'étude, la GAPDH, au niveau structural, catalytique, et de la liaison du NAD. Après avoir exposé nos résultats, je les discuterai dans le cadre général de la spécificité de cofacteur des oxydoréductases à NAD(P).

INTRODUCTION

I. Les sites de fixation des nucléotides dans les protéines	1
II. Le problème de la spécificité pour les cofacteurs à nicotinamide NAD et NADP.....	22
III. Objectifs.....	24
IV. Un modèle d'étude de la spécificité NAD/NADP : la GAPDH.....	24

I. LES SITES DE FIXATION DES NUCLÉOTIDES DANS LES PROTÉINES

La fonction biologique d'un grand nombre de protéines implique une interaction spécifique avec un ligand nucléotidique. Ce nucléotide peut intervenir en tant que cofacteur dans des processus d'oxydoréduction comme pour les oxydoréductases à flavine ou à pyridinium, en tant que substrat dans des processus énergie-dépendant comme pour les kinases à ATP ou à GTP ou dans des processus d'ADPribosylation, ou encore en tant qu'effecteur dans les phénomènes d'allostérie. Les ligands ainsi impliqués dans ces fonctions biologiques très variées, aussi bien anaboliques que cataboliques ou de signalisation cellulaire, sont de deux types : mononucléotidique ou dinucléotidique.

IA. LES SITES DINUCLÉOTIDIQUES

La grande majorité des enzymes liant un dinucléotide, FAD ou NAD(P), et dont la structure tridimensionnelle a été déterminée, possède un domaine commun décrit par l'équipe de Rossmann et dont les caractéristiques seront détaillées en §IA1 à §IA3.

Néanmoins, d'autres motifs structuraux ont été récemment décrits. Leurs caractéristiques seront présentées et comparées à celles du repliement décrit par Rossmann dans le §IA4.

IA1. Le repliement de Rossmann

IA1a. Description générale du repliement

La plupart des structures liant un nucléotide appartiennent à la classe α/β des protéines globulaires définie par Levitt & Chothia (1976). Dès 1974, la comparaison des structures de la Lactate déshydrogénase (LDH), la Malate déshydrogénase (MDH), l'Alcool déshydrogénase (ADH) et la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Ohlsson *et al.*, 1974 ; Rossmann *et al.*, 1975) fait apparaître de fortes similitudes de structure tertiaire au niveau du domaine liant le NAD. De même note-t-on une conformation de la partie adénosine diphosphoribose du NAD lié très semblable dans toutes ces déshydrogénases. Par contre, le second domaine dit catalytique, spécifique du substrat, ne présente aucune similitude structurale.

Le repliement commun liant le NAD est typiquement constitué d'un feuillet β parallèle à 6 brins (β_A à β_F de l'extrémité N vers C-terminale) et quatre hélices α_B , α_C , α_E et α_{1F} connectant respectivement β_A à β_B , β_B à β_C , β_D à β_E et β_E à β_F . Le feuillet β central n'est pas plan, mais présente une torsion de 100° entre les brins β_C et β_F , ce qui constitue une structure thermodynamiquement stable (figure 1 p. 2).

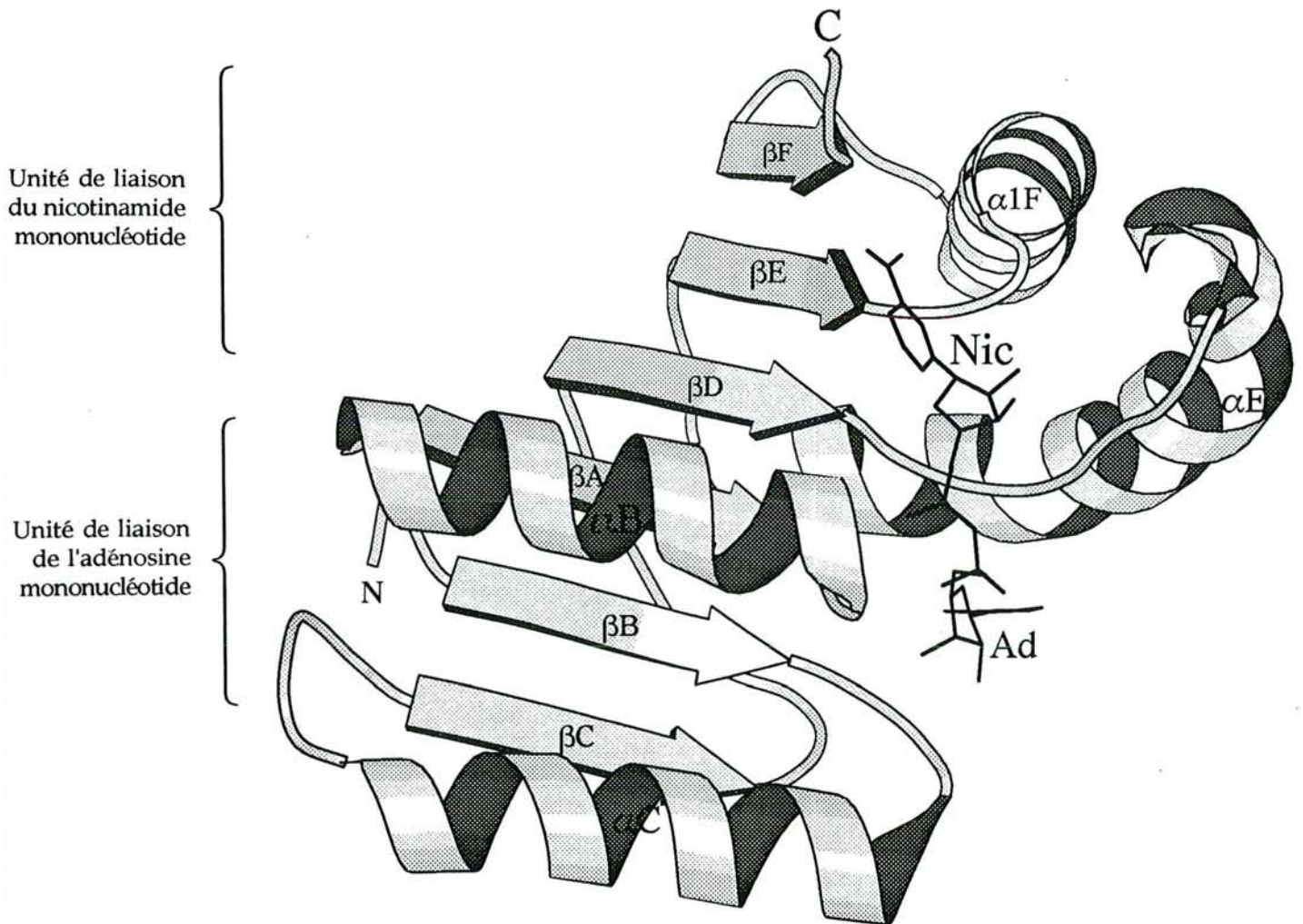


Figure 1 : Le repliement de Rossmann

Les coordonnées atomiques de la structure sont extraites du fichier 1ldm de la Lactate Déshydrogénase de la PDB. Les structures secondaires sont représentées par les rubans (hélices α) et les flèches (brins β), reliés par des lignes représentant les boucles. Les brins β forment un feuillet parallèle dont la surface présente une torsion de 100° entre les brins β_C et β_F . Le NAD est lié à l'extrémité C-terminale des brins β . Chacun des motifs $\beta_A\alpha_B\beta_B\alpha_C\beta_C$ et $\beta_D\alpha_E\beta_E\alpha_1F\beta_F$ constitue une unité de liaison mononucléotidique pour les parties adénosine (Ad) et nicotinamide mononucléotide (Nic) du NAD. Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991).

Rao & Rossmann (1973) ont montré sur la LDH qu'il existait un pseudoaxe de symétrie d'ordre 2 parallèle aux brins β et passant entre β_A et β_D , définissant deux unités de liaison d'un mononucléotide (figure 1 p. 2). Ainsi, le motif $\beta_A\alpha_B\beta_B\alpha_C\beta_C$ fixe la partie adénosine du NAD et le motif $\beta_D\alpha_E\beta_E\alpha_{1F}\beta_F$ la partie nicotinamide mononucléotide, le dinucléotide étant lié aux extrémités C-terminales des brins du feuillet β . Les hélices α_B et α_C flanquent l'une des faces du feuillet et, symétriquement, α_E et α_{1F} flanquent l'autre face.

Ce repliement $\beta\alpha\beta\alpha$ caractéristique est appelé "repliement de Rossmann".

IA1b. Généralisation à d'autres structures

Orengo *et al.* (1993), par une méthode fondée sur des comparaisons systématiques des structures protéiques de la Brookhaven Protein Data Bank (PDB), identifient deux familles au sein de la classe structurale α/β :

- . les structures en tonneau $(\alpha\beta)_8$ dont le feuillet β parallèle est "singly-wound",
- . les structures dont le feuillet β parallèle est twisté ("doubly-wound"). La plupart des protéines liant les dinucléotides appartiennent à cette famille, et présentent le repliement typique de Rossmann (tableau 1 p. 4 et 4bis).

Par ailleurs, Schulz (1992) propose une "topologie" de base (figure 2 p. 5) pour les protéines liant les dinucléotides, comprenant deux unités de liaison mononucléotidiques : un motif commun du type du repliement de Rossmann liant l'adénosine et un motif variable selon que le dinucléotide lié est le NAD(P) ou le FAD, une insertion étant possible entre les séquences de ces deux motifs.

IA1c. La conformation globale du NAD(P) lié

Situé à l'extrémité C-terminale du feuillet β , le NAD(P) est plus particulièrement proche des boucles $\beta_A\text{-}\alpha_B$, $\beta_B\text{-}\alpha_C$, $\beta_D\text{-}\alpha_E$, $\beta_E\text{-}\alpha_{1F}$. Le dinucléotide lié à la protéine présente une conformation étendue, où la distance entre les cycles adénine et nicotinamide est d'au moins 14 Å. De plus, ces cycles ne sont pas parallèles mais presque perpendiculaires. Les riboses sont en conformation C2' endo ou C3' endo selon les enzymes (figure 3 p. 6).

La conformation de la liaison N-glycosidique pour l'adénine est anti dans toutes les structures connues d'enzymes à NAD(P) ou à FAD. Par contre, la structure de l'unité de liaison de la partie nicotinamide étant plus variable, la conformation de la liaison N-glycosidique pour le cycle nicotinamide peut être soit syn, soit anti selon les enzymes, et est directement associée à la stéréospécificité du transfert d'hydrure (cf §IA3 p. 14).

Enzyme	Cofacteur	Résolution	Sw.	Liaisons H directes entre le pyrophosphate et les résidus P1 à P6	Commentaires	Références
ENZYMES A NAD(P)						
Alcool déshydrogénase (ADH) EC 1.1.1.1	NAD	2,9 Å	#	P4(NH)-NO2 ; P5(NH)-NO2		Eklund <i>et al.</i> , 1984
Lactate déshydrogénase (LDH) EC 1.1.1.27	NAD	2,1 Å	#	P5(NH)-NO2		White <i>et al.</i> , 1976 Abad-Zapatero <i>et al.</i> , 1987 Skarzynski <i>et al.</i> , 1987
Glycéraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase (GAPDH) EC 1.2.1.12	NAD	1,8 Å	#	P4(NH)-AO2 ; P5(NH)-NO2		
Formate déshydrogénase (FDH) EC 1.2.1.2	NAD	2,05 Å		P4(NH)-AO2 ; P4(Cl)-AO2 ; P4(NH)-NO1 ; P5(NH)-NO1		Lamzin <i>et al.</i> , 1994
Glycérate déshydrogénase EC 1.1.1.29	NAD	2,4 Å		Structure déterminée sous forme apo		Goldberg <i>et al.</i> , 1994
6-phosphogluconate déshydrogénase EC 1.1.1.44	NADP	2,5 Å	#	nd		Adams <i>et al.</i> , 1991
Dihydroptéridine Réductase EC 1.6.99.7	NAD	2,3 Å		nd		Varughese <i>et al.</i> , 1992
Glutamate déshydrogénase (GDH) EC 1.4.1.2	NAD	1,96 Å	#	P5(NH)-NO2	Insertion d'un élément $\beta\alpha$ entre β_B et α_C (figure 26A p. 99)	Baker <i>et al.</i> , 1992a
Malate déshydrogénase (MDH) EC 1.1.1.37	NAD	2,5 Å	@	P4(NH)-NO2 ; P5(NH)-NO1	Insertion d'un résidu P2' entre P2 et P3	Birktoft <i>et al.</i> , 1989
UDP-galactose épimérase	NAD	2,5 Å	@	nd	Insertion d'un résidu P2' entre P2 et P3	Bauer <i>et al.</i> , 1992
3 α ,20 β -hydroxystéroïde déshydrogénase EC 1.1.1.53	NAD	2,6 Å			Pas de signature P1-P6 ; mode de liaison du NAD fortement modifié	Ghosh <i>et al.</i> , 1991
Dihydrofolate Réductase (DHFR) EC 1.5.1.3	NADP	1,7 Å			Motif $\beta_A\alpha_B\beta_B$ uniquement ; pas de signature P1-P6	Filman <i>et al.</i> , 1982

FLAVOENZYMES						
OXYDORÉDUCTASES À DISULFURE						
Glutathione Réductase (GRS) EC 1.6.4.2	NADP FAD	2 Å 1,54 Å	# #	P4(NH)-AO1 ; P5(NH)-NO2 P5(NH)-FO1		Karplus & Schulz, 1989 Karplus & Schulz, 1987
Thiorédoxine réductase EC 1.6.4.a	NADP FAD	2 Å	# #	P5(NH)-NO2 ; P5(cl)-NO2 ; P5(cl)-NO5' P5(NH)-FO2 ; P6(NH)-FO2		Waksman <i>et al.</i> , 1994
Trypanothione réductase EC 1.6.4.8	NADP FAD	3,3 Å (2,4 Å)	# #	nd nd		Lantwin <i>et al.</i> , 1994 Kuriyan <i>et al.</i> , 1991
Réductase mercurique	NADP FAD	3 Å	# #	nd nd		Schiering <i>et al.</i> , 1991
Triméthylamine déshydrogénase EC 1.7.99.aa	NAD(P)? FAD ?	2,4 Å	#	structure déterminée en complexe binaire avec l'ADP lié au site putatif du FAD uniquement		Lim <i>et al.</i> , 1988
Lipoamide déshydrogénase (LIP) EC 1.6.4.3	NAD FAD	2,05 Å		nd nd		Mattevi <i>et al.</i> , 1992
NADH peroxydase EC 1.11.1.1	NAD FAD	2,4 Å 2,16 Å	# #	P4(NH)-AO1 ; P5(NH)-NO2 P3(cl)-AO2 ; P5(NH)-FO1		Stehle <i>et al.</i> , 1993 Stehle <i>et al.</i> , 1991
AUTRES						
Cholestérol oxydase EC 1.1.3.6	FAD	1,8 Å	#	P5(NH)-FO1		Vrielink <i>et al.</i> , 1991
p-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH) EC 1.14.13.2	NADP FAD	1,9 Å	#	structure déterminée sans NADP P5(NH)-FO2		Schreuder <i>et al.</i> , 1989
FAMILLE DE LA FNR						
Ferredoxine NADP Réductase (FNR) EC 1.6.7.1	NADP FAD	2,2 Å	♣	structure déterminée en complexe avec le 2',5'-ADP uniquement	P6 = Pro ; mode de liaison du cofacteur décalé (β_C joue le rôle de β_B) Domaine du FAD/FMN : tonneau β antiparallèle à 6 brins (croix grecque)	Karplus <i>et al.</i> , 1991
Phtalate dioxygénase réductase (PDR)	NAD FMN	2,7 Å	♣	P2(NH)-NO1	idem	Correll <i>et al.</i> , 1992

Tableau 1 : Classification des enzymes à repliement de Rossmann

Les références citées correspondent à la description de la structure du complexe enzyme-cofacteur, ou à défaut, à la structure apo de résolution maximale. La colonne "Sw." reprend la classification de Swindells (1993) : chaque signe #, @, ♣ identifie un type structural présentant une conformation commune des 12 résidus consécutifs à partir de P1 (nomenclature précisée au § IA2). En commentaires sont précisées les différences structurales éventuelles par rapport au repliement de Rossmann classique. NH : liaison H impliquant le groupement NH peptidique ; cl : liaison H impliquant la chaîne latérale du résidu ; nd : non décrit.

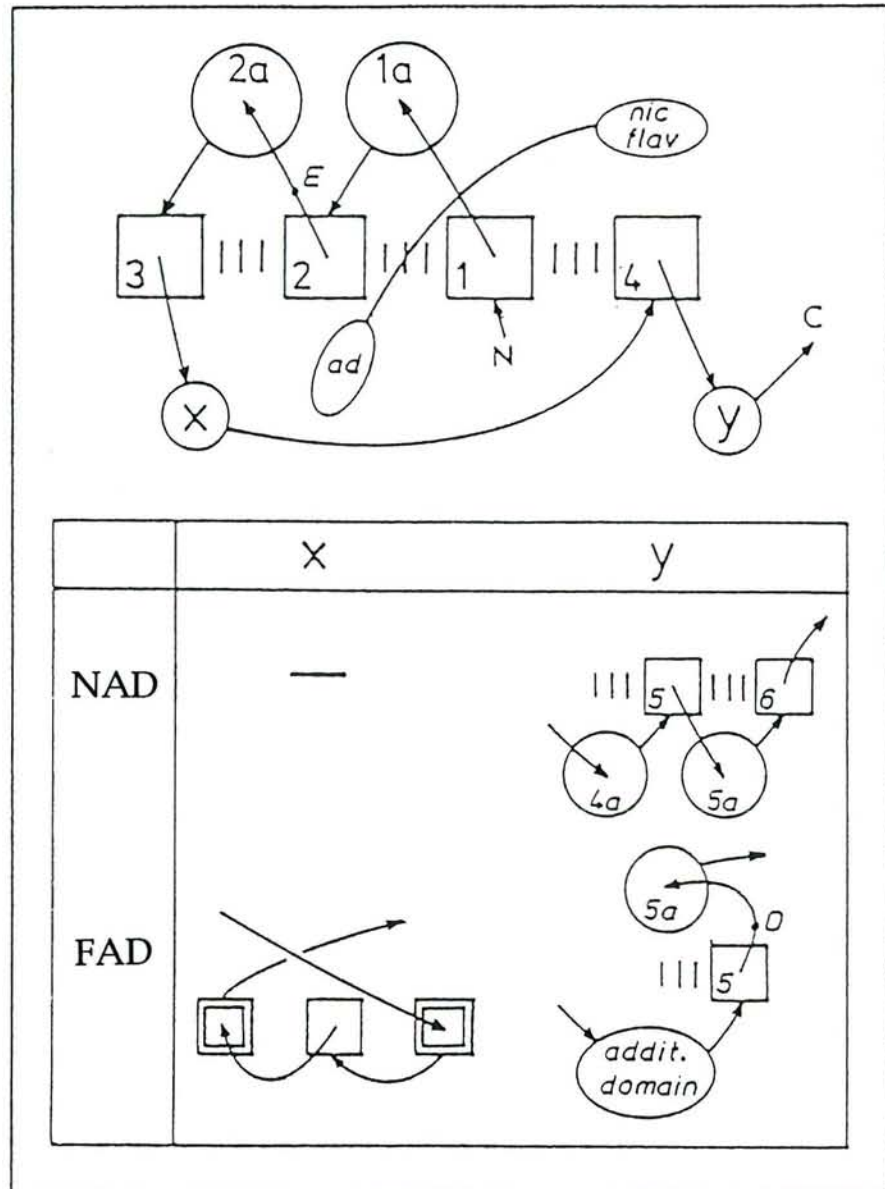


Figure 2 : Schéma de la topologie générale des sites dinucléotidiques (d'après Schulz, 1992)

Les brins β sont représentés par les carrés, l'extrémité C-terminale pointant vers le lecteur, et les hélices α sont représentés par les cercles, l'extrémité N-terminale pointant vers le lecteur. Le réseau de liaisons H associant les brins en feuillet est représenté par les 3 traits verticaux. La localisation générale du dinucléotide est indiquée (ad, adénine, nic, nicotinamide, flav, flavine). Les motifs 1-1a-2-2a-3 et 4-4a-5-5a-6 correspondent aux deux unités de liaison mononucléotidiques décrites par Rao & Rossmann (1973). Dans les sites de liaison du FAD, le motif de liaison de la partie flavinique du cofacteur (éléments 4, 5 et 5a) diffère du repliement de Rossmann (addit. domain, domaine additionnel).

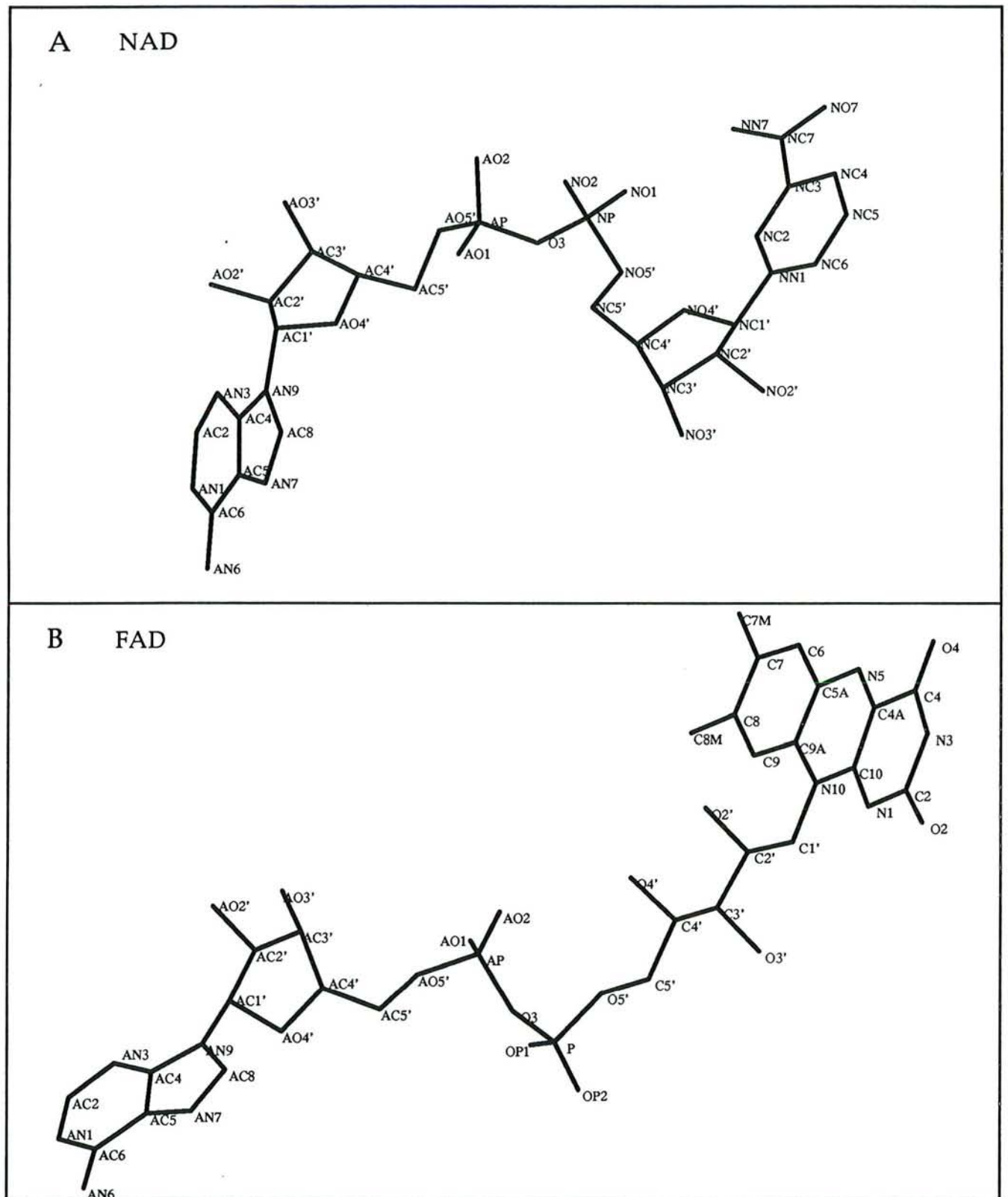


Figure 3 : Structure et nomenclature atomique du NAD (A) et du FAD (B)

Le NAD est représenté dans sa conformation liée à la GAPDH (fichier PDB 1gd1) et le FAD lié à la GRS (entrée PDB 1grb). Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991).

IA1d. Analyse des séquences associées au repliement de Rossmann

Malgré de fortes similitudes de structure tridimensionnelle, les séquences primaires des déshydrogénases à NAD et en général des oxydoréductases ne présentent pas de forts taux d'identité. Cependant, c'est dans le motif $\beta_A\alpha_B\beta_B$, où la structure tridimensionnelle est la plus conservée (Ohlsson *et al.*, 1974), qu'est apparu un consensus de séquence primaire, d'abord entre les déshydrogénases à NAD (Rossmann *et al.*, 1975), puis entre les oxydoréductases à NAD(P) et à FAD (Möller & Amons, 1985).

Ceci a conduit Wierenga *et al.* (1986) à partir de 5 protéines à NAD et à FAD puis Bork & Grunwald (1990) sur les séquences de protéines de structure connue à NAD d'une part, à FAD d'autre part, à affiner le consensus en définissant des empreintes incluant les caractéristiques physicochimiques des acides aminés en chaque position (figure 4B p. 8). Ceci a permis de souligner les éléments moléculaires essentiels à la structuration du motif $\beta_A\alpha_B\beta_B$ et du site de liaison du dinucléotide, décrits en §IA2.

Une seconde séquence consensus spécifique des sites FAD a été décrite sous la forme $\frac{T}{M}X_4hahhGD$ (X : tout résidu ; h : résidu hydrophobe ; a : résidu aromatique) (Eggink *et al.*, 1990) et correspond au brin β_5 (figure 2 p. 5) de l'unité de liaison de la partie flavinique du FAD, dont le repliement diffère de celui de Rossmann. Par contre, aucune similitude de séquence claire n'a pu être dégagée pour l'unité de liaison de la partie nicotinamide du NAD(P) bien que sa structure tridimensionnelle soit conservée et présente aussi un repliement de Rossmann.

IA2. Le sous-site de liaison de l'adénosine

IA2a. La position P7 : le résidu C-terminal du brin β_B

Les empreintes définies (figure 4B p. 8) ont permis d'identifier et d'aligner un grand nombre de séquences de protéines liant le NAD et le FAD (Bork & Grunwald, 1990), où il apparaît que le résidu en position C-terminale du brin β_B possède très généralement une chaîne latérale à caractère acide, Asp ou Glu. Le rôle de cette position est mis en évidence par l'analyse des structures cristallines connues qui suggère que ce résidu participe à la liaison du cofacteur via deux liaisons hydrogène entre les atomes d'oxygènes de sa chaîne latérale et les fonctions hydroxyles en 2' et 3' du ribose adjacent à l'adénine du NAD ou du FAD (figure 4A p. 8).

Suivant la nomenclature définie par Baker *et al.* (1992b), cette position sera désignée par P7 dans la suite du texte.

IA2b. La région de la boucle β_A - α_B

Conformation

La spécificité fonctionnelle des séquences associées à la région β_A - α_B a été soulignée par les travaux de Sheridan & Venkataraghavan (1992). En effet, la recherche systématique de séquences signatures dans la banque de la National Biomedical Research Foundation (NBRF) et dans la PDB a mis en évidence une famille de séquences de protéines liant le NAD(P) ou le FAD, présentant le consensus décrit ci-dessous pour les éléments $\beta_A\alpha_B$. De plus, parmi 4 familles conformationnelles de boucles décrites dans les structures α/β (Edwards *et al.* 1987), l'une est systématiquement associée à la liaison d'un dinucléotide. Cette conformation repose sur les éléments mis en évidence dans les empreintes définies par Bork & Grunwald (1990) et Wierenga *et al.* (1986) (figure 4B p. 8). La nomenclature utilisée par la suite est celle définie par Baker *et al.* (1992b) pour les 6 résidus consécutifs de la boucle β_A - α_B et de l'extrémité N-terminale de α_B , désignés P1 à P6 (figure 4A p. 8):

- . En position P1, un résidu à chaîne latérale peu encombrante, très généralement une glycine, permet à la chaîne peptidique de se réorienter et d'amorcer la boucle reliant β_A à α_B .

- . En position P3, on trouve aussi un résidu de faible encombrement stérique, très généralement une glycine et exceptionnellement une Ala ou une Ser qui joue un rôle analogue à P1 en permettant à la chaîne peptidique d'amorcer l'hélice α_B . De plus, l'absence de chaîne latérale en P3 permettrait d'ajuster le site protéique au cofacteur et ainsi d'optimiser les interactions de stabilisation.

- . Un ensemble de positions hydrophobes réparties dans les structures secondaires β_A , α_B et β_B forment le cœur du motif $\beta_A\alpha_B\beta_B$ et assurent sa compaction et sa stabilité thermodynamique (figure 4A p. 8). En particulier, la présence en position P6 dans l'hélice α_B d'un résidu à chaîne latérale réduite (Gly, Ala ou Ser) favorise l'établissement des contacts entre β_A et α_B . On retrouve ainsi le consensus "classique" généralement cité pour les résidus P1 à P6, $GXGXX\frac{G}{A}$.

- . Un résidu à chaîne latérale polaire au début du brin β_A dont la fonction n'est pas évidente.

C'est la présence de la signature GXGXXS, d'un Asp en P7 et d'homologies de séquences avec la Glutamate déshydrogénase (GDH), dont la structure présente un repliement de Rossmann (Baker *et al.*, 1992a)(tableau 1 p. 4), qui a conduit Simonin *et al.* (1990) à proposer que le domaine catalytique de la Poly(ADP-ribose)polymérase humaine possède également un motif $\beta_A\alpha_B\beta_B$ liant le NAD, hypothèse confortée par des expériences de mutagenèse dirigée sur P7 (Simonin, 1992). Cette enzyme de localisation nucléaire catalyse la synthèse de poly(ADP-ribose) en utilisant le NAD comme substrat et pourrait moduler un certain nombre de fonctions dans la chromatine comme par exemple la réparation de l'ADN.

Par contre, aucune signature de ce type n'a pu être retrouvée dans les séquences connues de l'Urocanase, deuxième enzyme de la voie de dégradation de l'Histidine (Lenz & Retey, 1993). Le NAD intervient dans ce cas comme cofacteur dans la réaction de substitution électrophile de l'eau sur

le substrat, en activant d'abord ce dernier par formation d'un adduit entre l'atome NC4 et l'urocanate (Klepp *et al.*, 1990).

Swindells (1993) a étendu la corrélation entre la conformation de la région β_A - α_B et sa fonction en établissant un classement fondé sur la comparaison des conformations de la chaîne peptidique : la plupart des protéines présentant un repliement de Rossmann peuvent être superposées sur les C α des 12 résidus consécutifs de la boucle β_A - α_B et de l'extrémité N-terminale de α_B . Ainsi, aux déshydrogénases à NAD (ADH, LDH et GAPDH) déjà étudiées par Rossmann *et al.* (1975), viennent s'ajouter les enzymes citées dans le tableau 1 p. 4. La Ferredoxine NADP réductase (FNR) et la Phtalate dioxygénase Réductase (PDR) définissent un variant structural du repliement de Rossmann identifié par le signe \clubsuit .

Interactions entre les résidus de la région β_A - α_B et le cofacteur

L'analyse des structures tridimensionnelles actuellement connues à haute résolution montre que le groupement pyrophosphate des trois nucléotides étudiés, NAD, NADP et FAD est lié à la structure protéique par un nombre variable de liaisons H directes et indirectes (impliquant des molécules d'eau) avec ses atomes d'oxygène. Les résidus impliqués dans ces liaisons H correspondent entre autres aux sites P3 à P6 formant l'extrémité N-terminale de α_B , les autres résidus apparaissant comme spécifiques à chaque structure. Le tableau 1 p. 4 et 4bis, résumant les interactions directes entre les résidus P1 à P6 et le pyrophosphate du dinucléotide lié aux différentes structures décrites, met en évidence que

- . d'une part, c'est généralement la fonction amide peptidique et non la chaîne latérale qui intervient dans la liaison H,

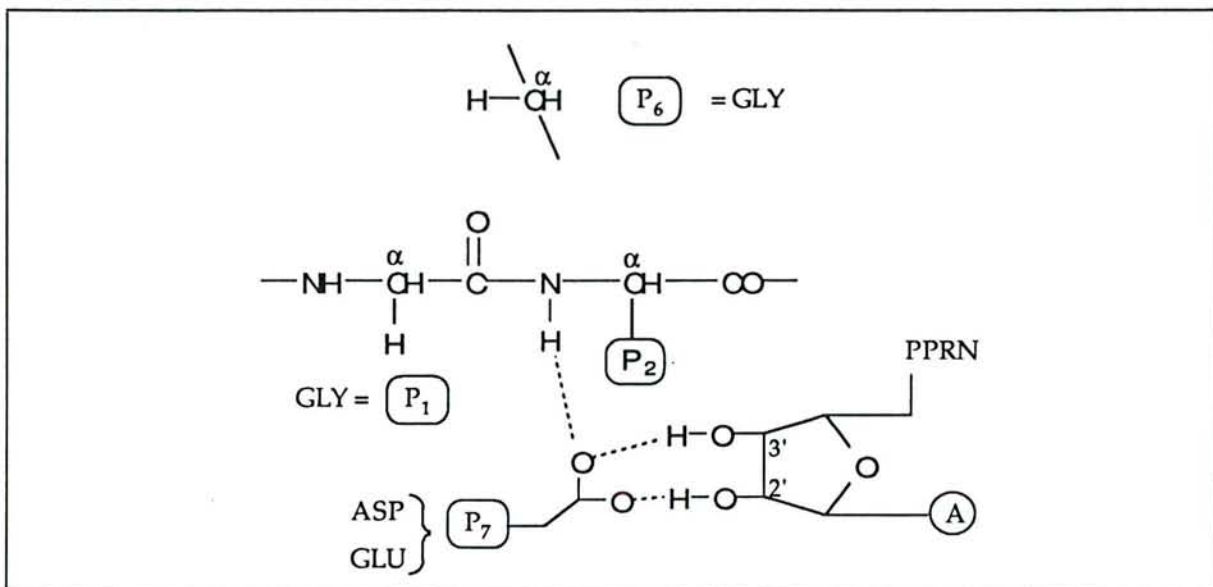
- . d'autre part, l'interaction entre un atome d'oxygène du pyrophosphate et P5 est conservée dans presque toutes les structures possédant un repliement de Rossmann. Ceci avait déjà été souligné par Wierenga *et al.* (1985) à partir d'un nombre plus restreint de structures.

Structure de type I ou de type II?

Baker *et al.* (1992b) ont déduit de la comparaison des structures déterminées à haute résolution de 7 déshydrogénases à pyridine et à flavine que le résidu P2 intervenait également dans la liaison du dinucléotide grâce à une interaction entre son groupement amide peptidique et le ribose de l'adénosine. Cette interaction met en jeu une liaison H directe (structure de type II) ou indirecte (structure de type I) via la chaîne latérale d'un Asp ou d'un Glu en position P7, lui-même lié au NAD ou au FAD (cf §IA2a).

Le déterminant majeur de ce type d'interaction est la nature du résidu en position P6 : en effet, dans la structure de type I, l'oxygène du carbonyl de P1 est en contact avec le C α de la glycine en P6, permettant au groupement NH peptidique de P2 de s'orienter vers la chaîne latérale de l'Asp ou du Glu en P7 et de former un réseau de liaisons H (figure 5A p. 11). Par contre, dans la structure

A Structure de type I



B Structure de type II

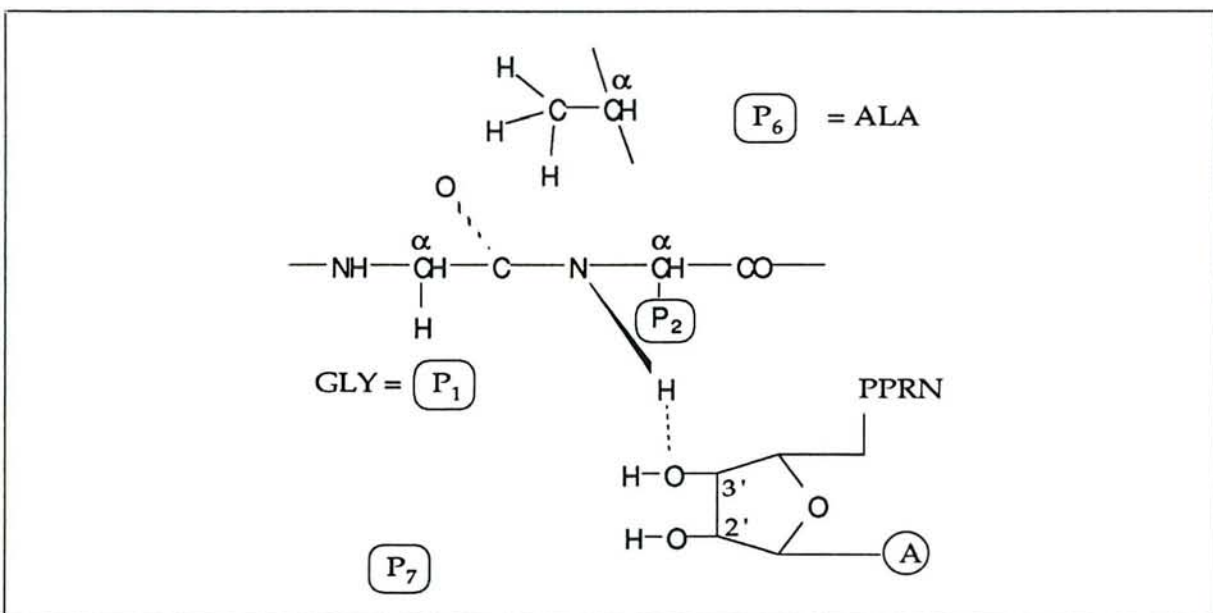


Figure 5 : Représentation schématique de la structure de type I (A) ou de type II (B) liant le ribose de la partie adénosine du dinucléotide à la boucle β_A - α_B (d'après Baker *et al.*, 1992b)

La structure I existe dans le site du NAD de la GAPDH, de la LDH et de l'ADH et dans le site du FAD de la GRS et de la PHBH. La structure II existe dans le site du NADP de la GRS et le site du NAD de la GDH de *C. symbiosium* (cas représenté ci-dessus).

Les liaisons H sont représentées en lignes pointillées. PP, pyrophosphate, R, ribose, N, nicotinamide, A, adénine.

de type II, le méthyl de l'Ala en P6 prend la place précédemment occupée par l'oxygène du carbonyl en P1 dans la structure de type I. La liaison peptidique entre P1 et P2 est ainsi contrainte à effectuer une rotation d'environ 80°, de telle sorte que le NH peptidique de P2 ne pointe plus vers P7, mais vers le ribose adjacent à l'adénine du NAD(P) ou du FAD (figure 5B p. 11). La liaison H formée avec le cycle ribose dépend de la position précise du cofacteur dans chaque structure. Dans la GRS, elle implique l'atome d'oxygène du cycle du ribose, alors que dans la GDH de *Clostridium symbiosium* (*C. symbiosium*), il s'agit de l'oxygène en 3' (Baker *et al.*, 1992a).

Ainsi les différents éléments du motif structural $\beta_A\alpha_B\beta_B$ sont-ils associés pour assurer la cohésion du site de liaison de la partie adénosine du dinucléotide.

IA2c. Le potentiel électrostatique du site

L'hélice de fixation du nucléotide

Chaque liaison peptidique présente un moment dipolaire parallèle aux groupements amides et carbonyl, lié à la polarité de ces liaisons et au caractère partiellement double de la liaison C-N. Sur la base de calculs électrostatiques préliminaires, Hall & Banaszak (1993) suggèrent, pour la MDH, que les liaisons peptidiques des résidus P3 à P5 participent au potentiel positif existant dans le site : en effet, leurs groupements amide formant des liaisons H avec la partie adénosine du NAD lié (tableau 1 p. 4 et 4bis), le microdipôle individuel de chaque unité peptidique est favorablement orienté pour stabiliser un ligand de charge négative.

Par ailleurs, au sein d'une hélice α , l'alignement quasi parfait de chaque unité peptidique, combiné à une polarisation supplémentaire induite par les liaisons H, conduit à la formation d'un macrodipôle dans la direction de l'axe de l'hélice, équivalent à 2 charges partielles de signe opposé, de +0,5 à +0,75 unités à l'extrémité N-terminale et de -0,5 à -0,75 unités à l'extrémité C-terminale (Hol, 1985).

Le rôle du potentiel électrostatique créé par une hélice α a d'abord été souligné par Hol (1985) au niveau des résidus catalytiques de plusieurs enzymes et au niveau de la fixation de ligands de petite taille, en particulier de ligands phosphorylés. Wierenga *et al.* (1985) ont ensuite montré sur les structures de 6 oxydoréductases liant le NAD(P) et/ou le FAD que l'orientation de l'axe de l'hélice α_B était constante et pratiquement perpendiculaire à un axe passant par les atomes AC5' et NC5' du cofacteur, son extrémité N-terminale pointant de façon optimale vers les charges négatives du pyrophosphate (figure 6 p. 13). La fonction d'une glycine dénuée de chaîne latérale en P3 serait donc non seulement de rendre accessible l'extrémité N-terminale de α_B au NAD (favorisant la formation d'une liaison H avec P5 en particulier, cf §IA2b), mais aussi de renforcer l'interaction électrostatique entre les charges du pyrophosphate et le dipôle créé par α_B .

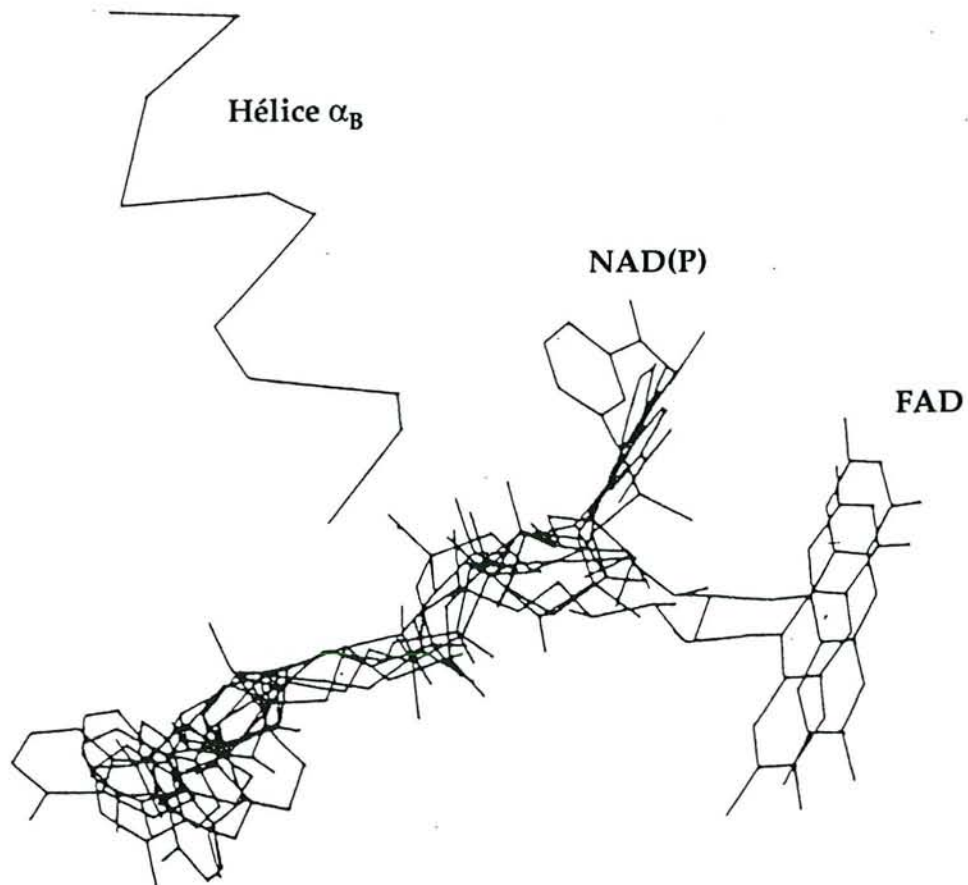


Figure 6 : Positions relatives des dinucléotides par rapport à l'hélice α_B (d'après Wierenga *et al.*, 1985)

Les hélices α_B ont été superposées sur une hélice "idéale". Sont représentés les dinucléotides liés à l'ADH (NAD), la LDH (NAD), la GAPDH (NAD), la GRS (NADP), la PHBH (FAD) et la GRS (FAD).

Chez les flavoenzymes, l'hélice 5a de l'unité de liaison "flavinique" décrite par Schulz (1992) (figure 2 p. 5), dont l'extrémité N-terminale pointe vers les atomes N1 et O2 de la flavine, pourrait stabiliser l'état anionique intermédiaire du FAD après réduction.

Présence de résidus chargés positivement

La présence de résidus basiques (arginines surtout) n'est pas une caractéristique générale de la liaison des dinucléotides. Elle a été décrite dans les sites de fixation du NAD(P) de l'ADH, la LDH, la Dihydrofolate réductase (DHFR), la Formate déshydrogénase (FDH) (Lamzin *et al.*, 1994), la FNR (Karpplus *et al.*, 1991), et les sites du FAD de la p-Hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH) et de la Glutathione réductase (GRS) (Hol, 1985 ; Wierenga *et al.*, 1985). Ceci suggère que, comme l'extrémité N-terminale de α_B est en général plus enfouie dans la structure protéique que les chaînes latérales basiques, le groupement pyrophosphate est probablement mieux stabilisé par interaction avec le dipôle hélicoïdal qu'avec une charge positive localisée (Hol, 1985).

IA2d. Le site de liaison du cycle de l'adénine

Le site de liaison du cycle de l'adénine est constitué de résidus de β_A , α_B , β_B et β_D formant une poche à caractère hydrophobe. Il existe quelques liaisons H spécifiques à chaque structure entre le cycle adénine et en général un groupement CO ou NH peptidique du site, comme par exemple entre l'atome AN6 et l'oxygène peptidique du CO de l'Arg77 dans la GAPDH (Skarzynski *et al.*, 1987).

IA3. Le sous-site de liaison de la partie nicotinamide-ribose des cofacteurs NAD et NADP

IA3a. Description

C'est au niveau de l'atome NC4 du cycle du nicotinamidium que se fait le transfert d'hydrure ($H^+ + 2e^-$). Cette partie du cofacteur est donc essentielle et son positionnement correct est indispensable pour assurer l'efficacité de la catalyse.

L'unité de liaison de la partie nicotinamide mononucléotide se situe à l'extrémité C-terminale des brins β du motif $\beta_D\alpha_E\beta_E\alpha_1\beta_F$ du repliement de Rossmann. Il n'existe pas d'homologie évidente au niveau des résidus impliqués dans la liaison du ribose et du cycle nicotinamide entre les diverses oxydoréductases de structure connue.

Cependant, le sous-site de liaison du cycle pyridinium présente invariablement des résidus hydrophobes interagissant avec l'une des faces du cycle, l'autre face, où le transfert a lieu, restant accessible au solvant. Ces résidus à caractère hydrophobe peuvent être aromatiques et développer une interaction de "stacking" avec le cycle pyridinium. Ceci a été proposé par exemple pour la GAPDH et la DHFR où il s'agit de résidus tyrosine. Chez toutes les flavoenzymes à NAD(P), le

transfert d'hydrure a lieu entre les cycles nicotinamide et flavine des deux cofacteurs dont les nuages π des noyaux aromatiques interagissent.

Le substituant carboxamide en NC3 du nicotinamide est lié par liaisons H avec des résidus du site, de telle sorte que les atomes NO7 et NN1 soient en disposition trans (figure 3 p. 6). Les résidus impliqués dans ces liaisons sont généralement conservés dans toutes les séquences primaires d'une enzyme donnée. Ils contribuent à une partie de l'énergie de liaison du cofacteur (Corbier *et al.*, 1990 ; Deng *et al.*, 1991).

IA3b. Conformation du cycle nicotinamide et stéréospécificité du transfert d'hydrure

Il existe deux classes de déshydrogénases : celles qui transfèrent l'hydrogène proR et celles qui transfèrent l'hydrogène proS en NC4 du cycle nicotinamidium. Ce sont respectivement les enzymes des classes A et B.

Dans chaque classe, la disposition du cycle nicotinamide par rapport au ribose adjacent est la même : pour les enzymes A-spécifiques, sa conformation est anti, pour les enzymes B-spécifiques, elle est syn, à l'exception de la GRS où elle est anti (Pai *et al.*, 1988). En conséquence, les dispositions spatiales relatives du cofacteur et du substrat sont très semblables dans les deux classes d'enzyme, sauf pour le cycle nicotinamide dont la face accessible dans le site actif change, et donc la nature proR ou proS de l'hydrogène transféré.

IA3c. Liaison du nicotinamide et catalyse

Origine de la disposition syn/anti du cycle par rapport au ribose

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer la préférence des enzymes pour une conformation particulière : l'hypothèse stérique et l'hypothèse électrostatique. Dans la première, l'une des deux conformations serait interdite par encombrement stérique entre la fonction carboxamide en NC3 et des résidus du site. Dans la seconde, elle serait favorisée par des interactions électrostatiques (liaisons H, interactions dipolaires).

Sur l'ADH, la suppression d'une interaction encombrante vis-à-vis du carboxamide a permis de modifier le taux de transfert de l'hydrogène non stéréospécifique (Weinhold *et al.*, 1991). Cependant, l'utilisation d'analogues de substrats et de la modélisation moléculaire sur la LDH suggèrent que le nicotinamide du NAD pourrait se lier dans les deux conformations (Lareau & Anderson, 1992). Les interactions stériques avec le groupement carboxamide ne seraient qu'un déterminant partiel de la stéréospécificité du transfert d'hydrure. Dans le cas de la GAPDH, la sélection positive du conformère syn grâce à une forte liaison H entre NO7 et l'Asn313 ne suffit pas à expliquer la B-stéréospécificité de l'enzyme (Corbier *et al.*, 1990). D'autres effets plus fins doivent donc être nécessairement à l'origine des différences observées.

Conformation interne du cycle et réactivité

Almarsson & Bruice (1993) suggèrent par deux méthodes (calcul semi-empirique de l'énergie potentielle conformationnelle et dynamique moléculaire) que, dans l'environnement du site actif de la LDH, l'état de transition du transfert d'hydrure serait stabilisé par les déformations anisotropes des atomes NN1 et NC4 hors du plan du cycle nicotinamide, d'environ 5 et 15° respectivement, conduisant à une conformation de type bateau. Les interactions avec des acides aminés existant sur une face du cycle seraient responsables de l'anisotropie des déformations sur l'autre face, vers le substrat. L'hydrogène transféré sur le C4 tendrait ainsi à une disposition pseudoaxiale avec les conséquences suivantes :

- . une orientation optimale de ses orbitales moléculaires et de celles du substrat (Almarsson & Bruice, 1993),
- . une différence de réactivité chimique entre les deux hydrogènes en NC4. En effet, d'après des mesures de fréquence de vibration des liaisons C4-H du NADH, la liaison du cofacteur au site actif diminuerait la réactivité de l'hydrogène en position pseudoéquatoriale (Deng *et al.*, 1992).

Conformation du carboxamide

Bien qu'en solution la conformation la plus stable soit celle où NN1 et NO7 sont en disposition cis, c'est la disposition trans qui prévaut dans les structures d'enzymes à NAD(P) actuellement connues (Li & Goldstein, 1992). En effet, elle conduirait à une polarisation du cycle et à une charge positive partielle sur l'atome NC4, augmentant ainsi le caractère électrophile de cette position.

Cet effet pourrait être renforcé par des interactions polaires impliquant la fonction carboxamide comme une liaison H avec NO7 (Corbier *et al.*, 1990) ou une interaction dipôle-dipôle entre le carbonyl et le macrodipôle créé par une hélice (Lareau & Anderson, 1992). La disposition trans de NO7 et NN1 serait nécessaire pour rendre NO7 accessible à ces interactions avec des éléments du site actif.

L'orientation de la fonction carboxamide par rapport au plan du cycle peut également jouer un rôle dans l'efficacité du transfert d'hydrure. En effet, bien que la conformation coplanaire soit la plus stable, la rotation du carboxamide hors du plan conduirait à une perturbation de l'état électronique du cycle et à une activation de la réactivité chimique de NC4 (Beijer *et al.*, 1990). Ainsi, dans les structures d'enzymes à NAD(P) actuellement connues, les atomes NN1 et NO7 sont en disposition trans, le groupement carboxamide formant un angle de torsion de -27 à +34° par rapport au plan du cycle pyridinium (Li & Goldstein, 1992). De plus, les travaux de Beijer *et al.* (1990) et de De Kok *et al.* (1986) suggèrent que cette rotation hors du plan pourrait contrôler à la fois réactivité et stéréospécificité, l'hydrogène transféré et NO7 se trouvant toujours du même côté du plan du cycle. Le rôle des interactions spécifiques entre le cycle nicotinamide et le site actif serait donc également de stabiliser le groupement carboxamide hors du plan du cycle.

IA4. Les autres motifs de liaison des cofacteurs NAD(P)

La plupart des oxydoréductases à NAD(P) fixent le cofacteur au niveau d'une structure possédant un repliement de Rossmann classique (décrit ci-dessus) ou avec des variantes dans la structure du site (DHFR) et/ou dans le mode de liaison du NAD(P) (famille FNR/PDR)(cf tableau 1 p. 4). Cependant, trois autres types de structures complètement différents ont été récemment décrits.

IA4a. Isocitrate déshydrogénase (ICD) (Hurley et al., 1991) et Isopropylmalate déshydrogénase (IPMDH) (Imada et al., 1991)

Le repliement de la chaîne peptidique de ces deux enzymes est identique et consiste en un feuillet β central mixte twisté dont les brins sont pour la plupart reliés par des hélices et permettent donc d'inclure la structure dans la classe α/β , famille "doubly-wound". Chacune des sous-unités de ce dimère se divise en deux domaines dont le feuillet β est majoritairement parallèle. A l'extrémité C-terminale, le petit domaine se termine par un motif de 5 ou 6 hélices α . Le NAD(P) est lié à l'interface des deux domaines, entre deux brins β antiparallèles et le motif hélicoïdal, parallèlement à la direction des brins β (figure 7A p. 18). Bien que les cycles adénine et nicotinamide soient perpendiculaires et que sa conformation globale soit étendue, le NAD(P) présente une conformation radicalement différente de celle du NAD(P) lié au domaine de Rossmann (Stoddard *et al.*, 1993). Le seul point commun avec le mode de liaison du cofacteur serait la stabilisation du pyrophosphate par des liaisons H avec des groupements amides de la boucle $\beta_D-\alpha_J$, et éventuellement l'interaction du macrodipôle hélicoïdal de α_J avec les charges négatives du pyrophosphate, par analogie avec le rôle des éléments β_A et α_B du repliement de Rossmann (figure 7A p. 18) (Hurley *et al.*, 1991).

IA4b. La famille des aldo-céto réductases

L'Aldose réductase (ADS) présente un repliement appartenant à la seconde famille de la classe α/β , les tonneaux β parallèles ($\alpha\beta$)₈ "singly-wound" (Rondeau *et al.*, 1992).

Le mode de liaison du NADP présente plusieurs points communs avec le repliement de Rossmann. Le NADP se fixe à l'extrémité C-terminale des brins β parallèles au niveau du motif $\beta_7\alpha_7\beta_8\alpha_8$ (figure 7B p. 18), plus particulièrement des boucles 7 et 8 ($\beta_7-\alpha_7$ et $\beta_8-\alpha_8$) (Rondeau *et al.*, 1992 ; Wilson *et al.*, 1992). Le pyrophosphate est stabilisé par liaison H avec des résidus de la boucle 7, renforçant l'analogie avec le motif $\beta_A\alpha_B\beta_B$ de Rossmann. Par contre, il n'existe pas d'interaction entre ses charges négatives et un dipôle hélicoïdal, mais le pyrophosphate est fermement maintenu, après changement conformationnel, dans un tunnel formé des boucles 7, 8 et 1.

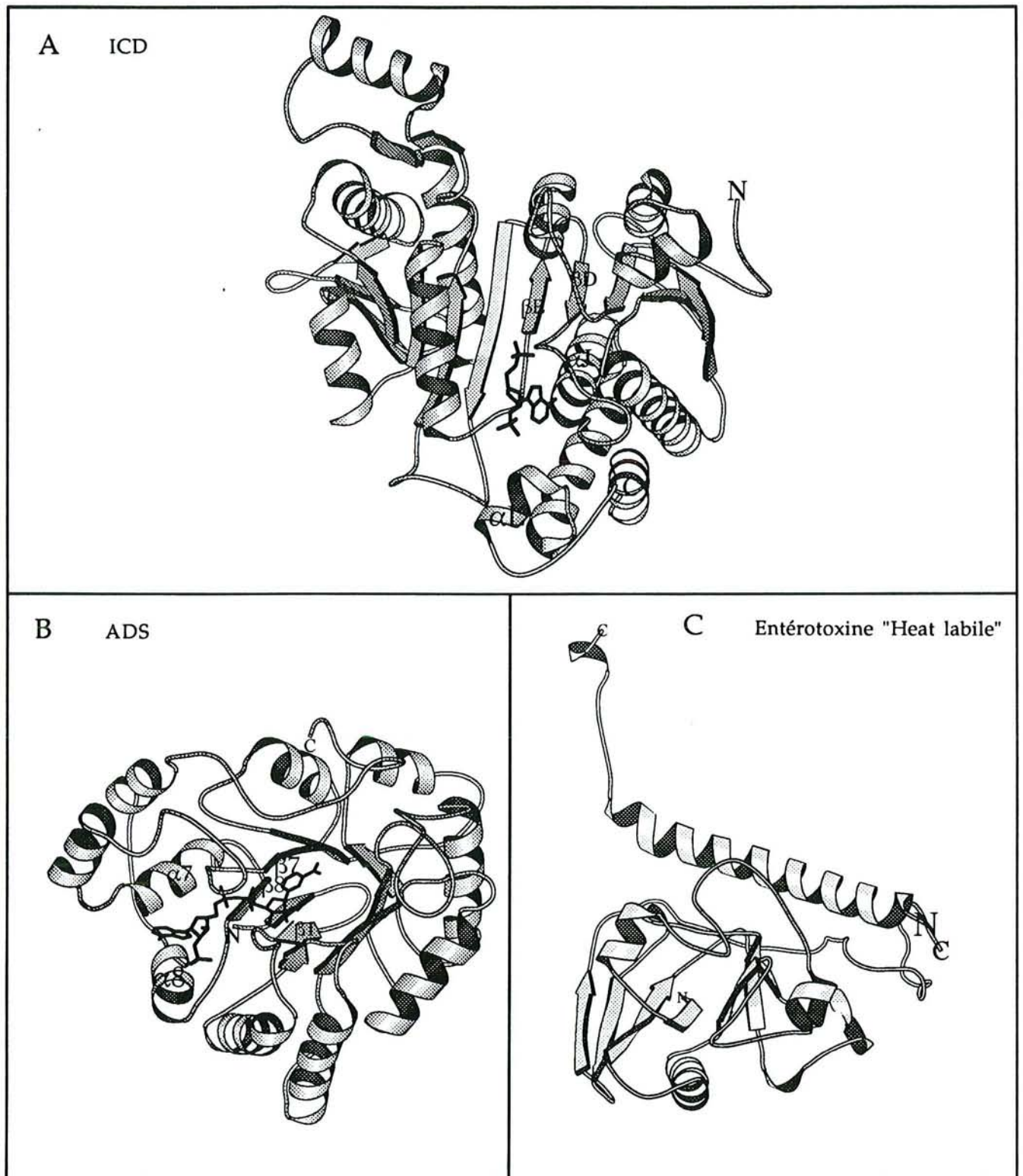


Figure 7 : Modèles en "rubans-flèches" de protéines liant le NAD(P) au niveau d'un motif structural différent du repliement de Rossmann

A : Isocitrate déshydrogénase en complexe avec le NADP. Seul est représentée la partie 2', 5'-ADP du cofacteur, le reste de la molécule étant mal défini (entrée PDB 9icd, résolution 2,5 Å).

B : Aldose réductase en complexe avec le NADP (entrée PDB 1ads, résolution 1,6 Å).

C : Entérotoxine "heat labile" d'*E. coli* sous forme apo (entrée PDB 1lts, résolution 1,95 Å).

Ces schémas ont été réalisés grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991).

Le cycle nicotinamide, orienté vers le site actif au centre du tonneau β , est situé dans une poche très hydrophobe où il interagit avec le nuage π du noyau aromatique d'une tyrosine sur sa face B. Seul l'atome d'hydrogène 4proR sur la face A est disponible pour le transfert d'hydrure, ce qui explique que l'ADS appartienne à la classe de stéréospécificité A. Comme chez les autres déshydrogénases de classe A, la conformation du cycle pyridinium est anti (Borhani *et al.*, 1992 ; Wilson *et al.*, 1992).

Enfin, la conformation du NADP est étendue et semblable à celle d'autres dinucléotides liés aux oxydoréductases, bien qu'elle soit plus proche de la conformation du FAD des flavoenzymes que de celle du NAD(P) (Borhani *et al.*, 1992).

Il a été récemment montré que la 3 α -hydroxystéroïde/dihydrodiol déshydrogénase (NAD(P) dépendante) possédait également une structure en tonneau ($\alpha\beta$)₈ (Hoog *et al.*, 1994).

IA4c. La famille des toxines agissant par ADP-ribosylation

Les structures cristallines de trois membres de cette famille sont aujourd'hui connues : celle de l'Exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* (Allured *et al.*, 1986), de la toxine diphtérique (Choe *et al.*, 1992) et de l'entérotoxine "Heat-labile" d'*E. coli* (Sixma *et al.*, 1991 ; Sixma *et al.*, 1993). Le domaine catalytique de ces protéines est constitué de 2 feuillets β mixtes reliés par de petites hélices α et ne présente aucune similitude avec le repliement de Rossmann. Le site de fixation du NAD a été grossièrement localisé à l'interface de ces 2 feuillets, mais n'a pu être précisément défini en l'absence de cristaux du complexe protéine-NAD (figure 7C p. 18).

IB. LES SITES DE FIXATION DES MONONUCLÉOTIDES

IB1. Les différents motifs

IB1a. Le repliement "classique"

D'abord décrit pour l'adénylate kinase (Schulz *et al.*, 1974), ce motif a été établi chez de nombreuses protéines liant l'ATP et le GTP comme la guanylate kinase, EF-Tu, P21ras, la nitrogénase ou RecA (Schulz, 1992 et références citées ; Swindells, 1993).

Ces protéines appartiennent à la classe structurale α/β , et possèdent un feuillet β parallèle twisté "doubly wound", comme le repliement de Rossmann. Néanmoins, l'arrangement des éléments de structure secondaire β et α est très différente (Schulz, 1992). Comme pour les protéines à dinucléotide, le mononucléotide est lié à l'extrémité C-terminale du feuillet β . La boucle liant le brin β à l'hélice α 1a (figure 8 p. 20) constitue l'élément de liaison principal des groupes phosphates du nucléotide et peut être comparée au motif $\beta_A \alpha_B$ de Rossmann. La spécificité

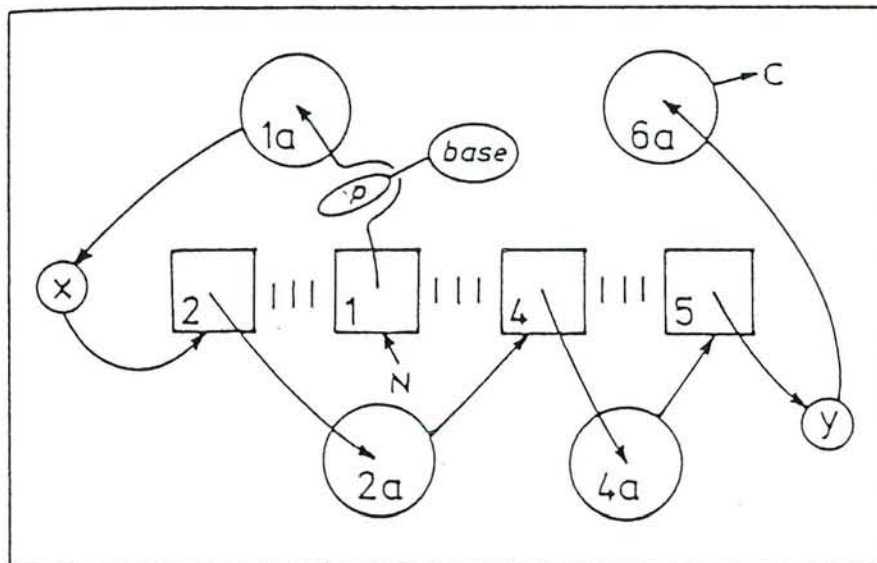


Figure 8 : Schéma de la topologie générale des sites mononucléotidiques (d'après Schulz, 1992)

Les brins β sont représentés par les carrés, l'extrémité C-terminale pointant vers le lecteur, et les hélices α sont représentés par les cercles, l'extrémité N-terminale pointant vers le lecteur. Le réseau de liaisons H associant les brins en feuillet est représenté par les 3 traits verticaux. La localisation générale du nucléotide est indiquée, les groupements phosphates (p) étant liés au niveau de la boucle β_1 - α_{1a} . X et Y représentent des insertions variables suivant les enzymes.

fonctionnelle de cette région a été démontrée par les mêmes méthodes que celles utilisées pour l'étude des structures à dinucléotides : recherche systématique de séquences consensus (Sheridan & Venkataraghavan, 1992), définition d'une signature $GXXXXGK(G)\frac{T}{S}$ (le "type A" (Walker *et al.*, 1982) ou la P-loop (Saraste *et al.*, 1990)), puis d'une empreinte de séquence primaire incluant les propriétés physicochimiques de chaque résidu (Bork & Grunwald, 1990), et enfin comparaison systématique de la conformation du squelette peptidique de cette région (Swindells, 1993).

Le mode de liaison du nucléotide décrit en détail à partir de la structure du complexe P21ras-GTP résolue à 1,35Å (Pai *et al.*, 1990) présente les caractéristiques suivantes :

- . la conformation de la liaison N-glycosidique de la base est anti,
- . les résidus glycine se trouvent dans des régions conformationnelles interdites aux autres résidus, comme fréquemment dans les structures de boucles, et permettent ainsi la réorientation de la chaîne peptidique,
- . les groupements phosphate sont stabilisés par liaison H avec les chaînes latérales hydrophiles et les groupements NH peptidiques des résidus de la boucle. L'absence de chaîne latérale de la seconde glycine conservée permet un contact optimum entre le nucléotide et la boucle qui s'enroule autour des phosphates. La taille du groupement phosphate, les contraintes liées à la catalyse expliquent la longueur importante de cette boucle.
- . l'orientation des groupements NH peptidiques vers le site, la présence d'un ligand Mg^{2+} sur les phosphates β et γ du GTP et la chaîne latérale du résidu lysine conservé contribuent à créer un potentiel électrostatique positif dans le site, favorable à la stabilisation des charges négatives des phosphates.

IB1b. Autres

En comparaison des structures connues liant les dinucléotides, il existe une variabilité beaucoup plus grande parmi les structures à mononucléotides :

Hormis le repliement dit classique, la Phosphoglycérate kinase (Banks *et al.*, 1979), la Phosphofruktokinase (Shirakihara & Evans, 1988) et la Flavodoxine (Smith *et al.*, 1977) lient l'ADP à l'extrémité C-terminale du feuillet β d'un domaine structural de type α/β "doubly-wound", mais selon un mode de liaison différent du type classique, auquel participe également la boucle reliant un brin β à une hélice α .

Le flavocytochrome b2, la glycolate oxydase et la triméthylamine déshydrogénase lient le FMN sur une structure en tonneau ($\alpha\beta$)₈, à l'extrémité C-terminale des brins 7 et 8, au niveau des boucles les reliant aux hélices adjacentes (Wilmanns *et al.*, 1991).

D'autres, comme les protéines kinases d'une part, l'actine, l'hexokinase et la protéine de choc thermique HSC70 d'autre part, lient l'ATP au niveau de la boucle reliant deux brins β antiparallèles sur des structures de topologies très variées (Schulz, 1992).

IB2. Comparaison avec les sites dinucléotidiques

Malgré cette grande diversité, il est possible, pour l'ensemble des sites décrits, de dégager des caractéristiques fonctionnelles convergentes avec celles de l'unité de liaison de l'adénosine des protéines à dinucléotide :

- . le lien N-glycosidique de la base est toujours en conformation anti,
- . les groupements phosphate en 5' du sucre sont fixés au niveau d'une boucle reliant un brin β à une hélice α ou 2 brins β , riche en résidus glycine dont le rôle est conformationnel et/ou stérique et permet le contact protéine-ligand,
- . le potentiel électrostatique du "site phosphate" est positif.

II. LE PROBLÈME DE LA SPÉCIFICITÉ POUR LES COFACTEURS À NICOTINAMIDE NAD ET NADP

IIA. INTRODUCTION

IIA1. Le rôle physiologique du NAD et du NADP

Les coenzymes à nicotinamide, NAD et NADP, représentent l'une des classes majeures de coenzymes redox du métabolisme, parallèlement à d'autres types de molécules comme les flavines ou les quinones. Ce sont donc des molécules ubiquitaires dans les cellules vivantes.

La structure chimique du NADP ne diffère de celle du NAD que par un groupement phosphate supplémentaire estérifié en 2' du ribose adjacent à l'adénine. Leur fonction dans les réactions catalysées par les déshydrogénases est identique, à savoir le transfert de deux électrons et un proton au niveau de la position C4 du nicotinamide.

Cependant, ils interviennent dans des voies distinctes du métabolisme : le NAD est généralement le cofacteur des réactions d'oxydation exergoniques conduisant au stockage d'énergie sous forme d'ATP, alors que le NADPH est impliqué dans les réactions de réductions endergoniques des voies de biosynthèse (Stryer, 1988). La plupart des déshydrogénases présentent donc une spécificité marquée pour le NAD ou le NADP, leurs sites de liaison au cofacteur ayant dû évoluer pour discriminer entre ces deux ligands.

IIA2. Le degré de spécificité

D'une façon générale, les déshydrogénases à NAD(P) ne peuvent catalyser efficacement leur réaction qu'avec le cofacteur dont elles sont spécifiques : on parle alors de spécificité stricte. (Elles

peuvent néanmoins posséder une activité enzymatique avec le cofacteur dont elles ne sont pas spécifiques, inférieure à 1 % de l'activité normale).

Cependant, certaines enzymes présentent une dualité de spécificité en acceptant les deux cofacteurs avec en général une préférence pour l'un ou l'autre. C'est le cas des GAPDH chloroplastiques (cf § IVA2) et des GDH de Vertébrés (Smith *et al.*, 1975).

IIB. ANALYSE DES SÉQUENCES PRIMAIRES D'ENZYMES NAD- ET NADP-SPÉCIFIQUES

IIB1. Un consensus pour les enzymes NADP-dépendantes?

Le site de liaison du NADP dans les déshydrogénases présente les caractéristiques structurales générales du repliement de Rossmann décrites pour les dinucléotides en §IA1, 2 et 3.

Cependant, la séquence signature P1-P7 définie pour le motif de liaison de l'adénosine (Wierenga *et al.*, 1985 ; Wierenga *et al.*, 1986 ; Bork & Grunwald, 1990) concerne les déshydrogénases à NAD et à FAD. Une séquence consensus a également été proposée par Hanukoglu & Gutfinger (1989) pour les protéines liant spécifiquement le NADP, avec en P6 une Ala à la place de la Gly existant généralement dans les enzymes NAD-dépendantes ; de plus le caractère acide du résidu en P7 ne serait pas conservé, et on trouverait plus fréquemment en P7 ou en une position voisine un ou plusieurs résidus basiques.

Il existe cependant de nombreuses exceptions à cette règle comme par exemple l'enzyme malique (Loeber *et al.*, 1991), la GDH (Teller *et al.*, 1992), ou l'ADH (Kumar *et al.*, 1992 ; Stélandre *et al.*, 1992).

IIB2. Les contraintes structurales de la liaison du NADP

Comme décrit en §IA2a, la fonction d'un Asp ou d'un Glu en P7 serait de lier l'adénosine du NAD ou du FAD par liaison H avec les fonctions 2'OH et 3'OH du ribose. Dans les protéines à NADP, la présence d'un résidu basique chargé positivement en P7 ou en une position voisine dans la région de l'extrémité C-terminale de β_B pourrait stabiliser le phosphate chargé négativement en 2' et ainsi permettre la reconnaissance spécifique du NADP.

Il n'existe pas d'hypothèse structurale évidente justifiant que le résidu P6 soit un déterminant de la spécificité NAD/NADP. Par contre (cf §IA2b) P6 détermine le type de réseau de liaisons H associant le cofacteur, P7 et la boucle β_A - α_B . Son implication dans la spécificité de cofacteur sera précisée au chapitre Discussion.

III. OBJECTIFS

Le travail présenté dans cette thèse avait pour but

- . d'identifier les facteurs moléculaires responsables de la spécificité de coenzyme des déshydrogénases à NAD(P),
- . d'analyser le mode de liaison du NAD et du NADP aux déshydrogénases présentant une dualité de spécificité vis-à-vis du cofacteur.

Ces questions ont été abordées en utilisant une enzyme modèle : la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase phosphorylante. En effet, les GAPDH présentent plusieurs types de spécificité de cofacteur : les GAPDH glycolytiques sont strictement NAD-spécifiques et les GAPDH chloroplastiques présentent une dualité de spécificité.

En se basant sur la connaissance de la structure tridimensionnelle des GAPDH phosphorylantes d'eubactéries spécifiques du NAD et de la structure primaire des GAPDH phosphorylantes chloroplastiques et glycolytiques, la stratégie utilisée a été

- 1) de définir les substitutions nécessaires pour transformer une GAPDH NAD-dépendante en une GAPDH à dualité de cofacteur,
- 2) d'étudier les propriétés des mutants obtenus par mutagenèse dirigée, au niveau de leur efficacité enzymatique et de leur efficacité de fixation des cofacteurs, en relation avec leur structure tridimensionnelle.

IV. UN MODÈLE D'ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ NAD/NADP : LA GAPDH

IVA. LES DIFFÉRENTES CLASSES DE GAPDH

Les GAPDH font partie de la famille des aldéhydes déshydrogénases à cofacteur NAD(P), qui se répartissent en deux sous-familles :

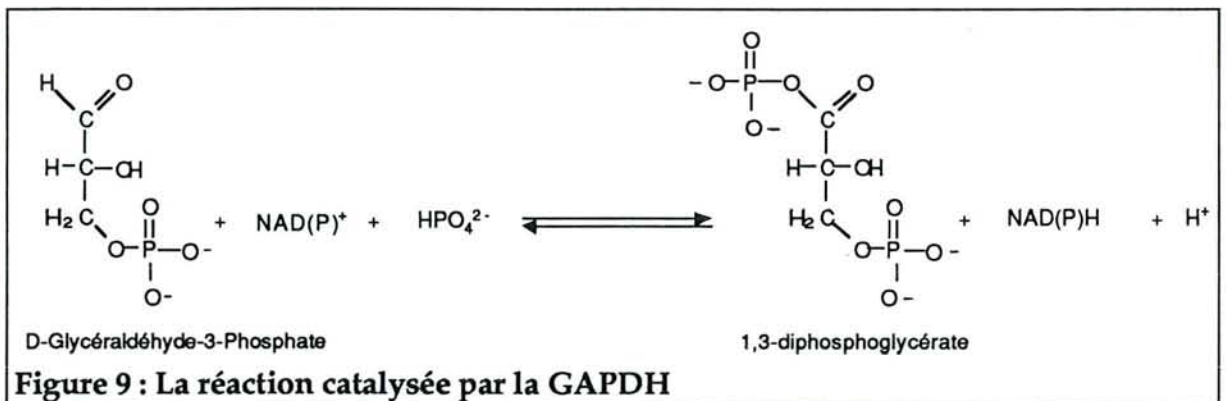
- . le type I, oxydant réversiblement une fonction aldéhyde en acide activé,
- . le type II, oxydant une fonction aldéhyde en acide, impliqué en particulier dans les processus de détoxification des aldéhydes en forme acide chimiquement moins réactive (Lindahl, 1992).

La GAPDH phosphorylante à cofacteur NAD ou à dualité de cofacteur appartient au type I alors que la GAPDH non phosphorylante strictement NADP-dépendante appartient au type II. Notre étude a porté uniquement sur la GAPDH phosphorylante.

IVA1. La GAPDH glycolytique (EC 1.2.1.12)

IVA1a. Rôle enzymatique

La GAPDH glycolytique est une enzyme homotétramérique de 145 kD environ qui catalyse réversiblement la phosphorylation oxydative du D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en acide 1,3-diphosphoglycérique (1,3dPG)(figure 9 p. 25). Elle est impliquée dans la glycolyse, où elle permet la synthèse d'ATP via la réaction catalysée par la phosphoglycérate kinase, et dans la néoglucogénèse (figure 10 p. 26).



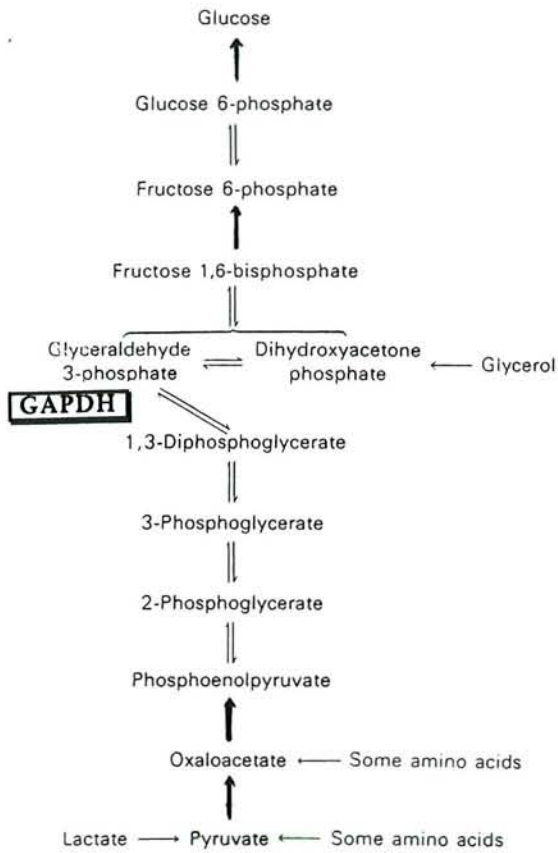
IVA1b. Spécificité de cofacteur

La GAPDH cytosolique d'eubactéries et d'eucaryotes est strictement NAD-spécifique, alors que celle d'archéobactéries non halophiles présente une dualité de cofacteur NAD(P), avec une préférence pour le NADP (situation originale par rapport à sa fonction dans une voie catabolique, la glycolyse).

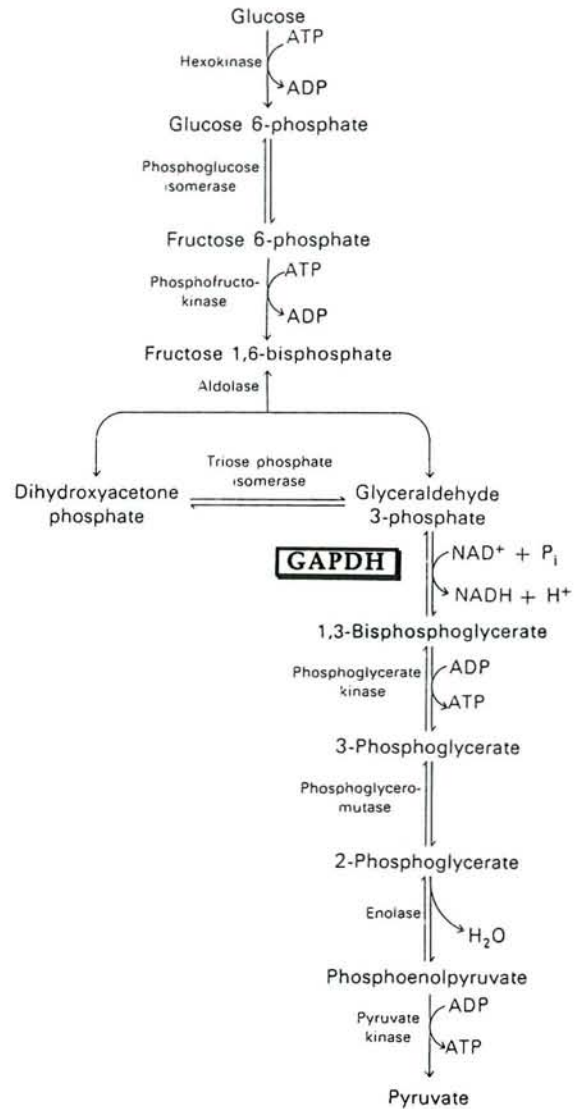
IVA1c. Localisation

La GAPDH glycolytique est ubiquitaire, localisée dans le cytoplasme des cellules eucaryotes aussi bien que d'eubactéries ou d'archéobactéries, où elle peut représenter plus de 5% des protéines solubles chez *Z. mobilis* (Pawluk *et al.*, 1986), la levure (Krebs, 1953) ou les cellules musculaires

B Néoglucogénèse



A Glycolyse



C Cycle de Calvin

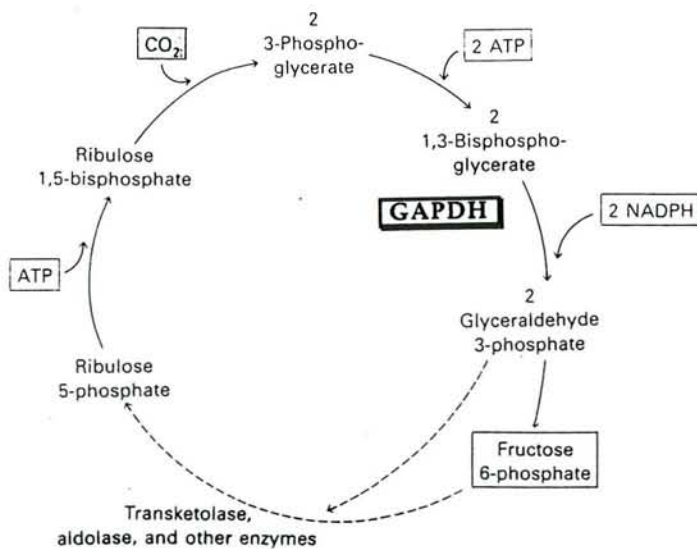


Figure 10 : Les voies métaboliques de la glycolyse (A), de la néoglucogénèse (B) et du cycle de Calvin (C) (d'après Stryer, 1988)

Les étapes de la néoglucogénèse distinctes de celles de la glycolyse sont indiquées par les flèches en gras.

(Cori *et al.*, 1945). Les séquences des GAPDH glycolytiques présentent entre elles un fort degré d'identité, supérieur à 45%, à l'exception de celles d'archéobactéries non halophiles, qui ne présentent que 10 à 15% d'identité avec leurs homologues eucaryotes et eubactériennes (Martin *et al.*, 1993 et références citées). La GAPDH existe également dans le glycosome de parasites (Michels *et al.*, 1986 ; Misset *et al.*, 1987).

IVA2. La GAPDH chloroplastique (EC 1.2.1.13)

IVA2a. Localisation et fonction métabolique

Elle est présente dans le stroma des chloroplastes des organismes photosynthétiques. Elle fait partie des enzymes du cycle de Calvin qui permettent la conversion du CO₂ en glucides (figure 10C p. 26) (Melandri *et al.*, 1970 et références citées) et catalyse la formation de NADP et de G3P à partir de 1,3dPG et de NADPH.

IVA2b. Spécificité de cofacteur

La GAPDH chloroplastique présente une dualité de spécificité de cofacteur, avec une préférence pour le NADPH par rapport au NADH (Ferri *et al.*, 1978) (ce qui est cohérent avec son rôle dans une voie anabolique).

IVA2c. Structure et parenté évolutive avec la GAPDH glycolytique

Il existe en fait deux isoenzymes chloroplastiques, tétramériques, de structure A₂B₂ (isoenzyme I) ou A₄ (isoenzyme II) (Cerff, 1979 ; Ferri *et al.*, 1990). Les sous-unités A et B, d'environ 36 et 39 kD respectivement (Ferri *et al.*, 1978 ; Cerff, 1979 ; Ferri *et al.*, 1990) présentent un taux d'identité d'environ 90% en séquence primaire, B possédant une extension C-terminale (Brinkmann *et al.*, 1989).

Les sous-unités A et B, dont les gènes sont localisés dans le génome nucléaire, sont homologues aux sous-unités des GAPDH glycolytiques (45% d'identité environ entre les enzymes de même origine) (Brinkmann *et al.*, 1989), plus particulièrement d'origine eubactérienne : ce fait soutient l'hypothèse de l'origine endosymbiotique des chloroplastes (Martin & Cerff, 1986 ; Shih *et al.*, 1986). En particulier, tous les résidus essentiels sont conservés. Ces deux arguments justifient le choix de la GAPDH glycolytique strictement NAD-dépendante, d'origine eubactérienne (*Bacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*)), comme modèle pour l'étude de la spécificité de cofacteur des déshydrogénases présentant une activité duale avec le NAD et le NADP.

IVB. STRUCTURE DE LA GAPDH GLYCOLYTIQUE NAD-DÉPENDANTE

Parmi les structures de GAPDH déterminées par radiocristallographie, seules ont été affinées celles relatives au muscle de homard (Buehner *et al.*, 1974 ; Moras *et al.*, 1975 ; Murthy *et al.*, 1980), de *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*) (Biesecker *et al.*, 1977 ; Skarzynski *et al.*, 1987 ; Skarzynski & Wonacott, 1988) et d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Dideberg, communication personnelle).

IVB1. Structure du monomère

Le monomère de GAPDH comporte deux domaines (figure 11 p. 29), comme les autres déshydrogénases à cofacteur pyridinique ADH, LDH, FDH, MDH, GDH, 6-phosphogluconate déshydrogénase et glycérate déshydrogénase (références incluses dans le tableau 1 p. 4) :

. le domaine de fixation du NAD est constitué des résidus 1 à 148 arrangés en 9 brins β essentiellement parallèles (résidus 2 à 7, 29 à 32, 56 à 60, 63 à 66, 71 à 74, 90 à 94, 115 à 118, 126 à 129 et 144 à 147) et 4 hélices α (résidus 10 à 18, 36 à 45, 84 à 87 et 102 à 110) formant un repliement de Rossmann décrit au §I, par rapport auquel il présente toutefois quelques différences : 2 brins β antiparallèles (résidus 56 à 60 et 63 à 66) forment une insertion entre α_C et β_C dans le sous-site de liaison de l'adénosine et un brin β (résidus 126 à 129) remplace l'hélice α_{1F} dans le sous-site de liaison du nicotinamide mononucléotide. L'hélice α C-terminale constituée des résidus 311 à 330 se replie sur le domaine N-terminal et vient en contact étroit avec le NAD.

. le domaine catalytique comprend les résidus 149 à 310, organisé en un feuillet β antiparallèle de 7 brins (résidus 170 à 178, 204 à 207, 225 à 233, 238 à 246, 272 à 275, 290 à 301 et 305 à 312), 3 hélices α (résidus 148 à 164, 210 à 215 et 251 à 264) ainsi qu'une région sans structure spatiale définie, la S-loop (résidus 178 à 204). Ce domaine fixe les substrats de la réaction (G3P et Pi) au niveau d'un large site ouvert et accessible au solvant.

IVB2. Structure quaternaire

IVB2a. Symétries

L'analyse cristallographique de la GAPDH de *B. stearothermophilus* révèle une symétrie de groupe D₂ (222) précise du tétramère sous forme holo (Skarzynski *et al.*, 1987) et sous forme apo (Skarzynski & Wonacott, 1988).

La structure du tétramère est décrite dans un système de coordonnées d'axes P, Q, R (figure 12 p. 30) défini par Rossmann pour la LDH (Rossmann *et al.*, 1973), permettant des comparaisons aisées entre les structures quaternaires de diverses déshydrogénases (Lamzin *et al.*, 1992).



Figure 11 : Modèle en "rubans-flèches" de la structure du monomère O de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous forme holo

Les coordonnées sont extraites du fichier PDB 1gd1 (Skarzynski *et al.*, 1987). Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991).

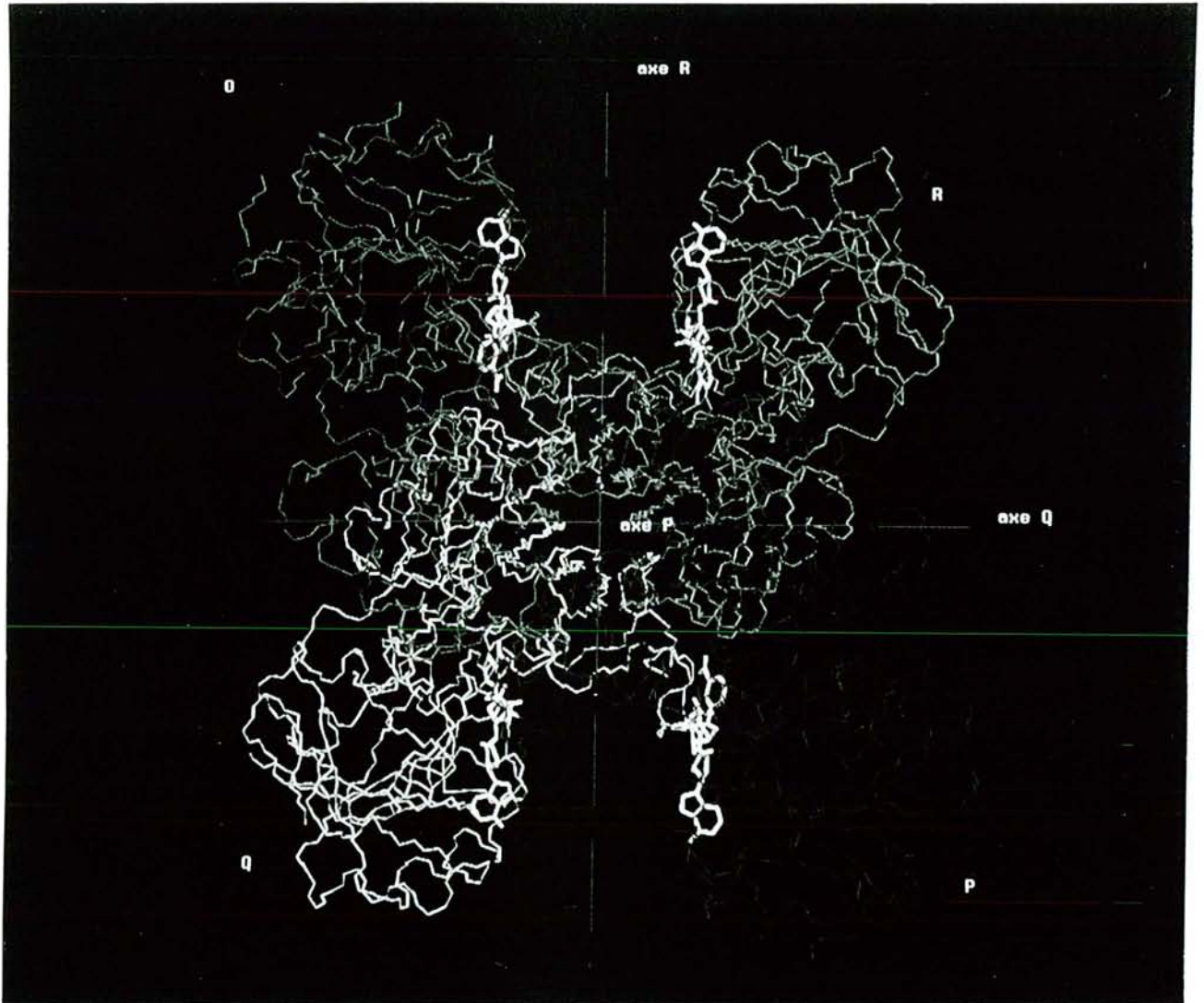


Figure 12 : Structure du tétramère de la GAPDH de *B. stearrowthermophilus* sous forme holo (Skarzynski et al., 1987)

Seule la chaîne principale et les molécules de NAD (en blanc) sont représentés. Chaque sous-unité est colorée suivant la convention définie par Rossmann *et al.* (1973). Les sous-unités symétriques par rapport à l'axe R (O et R ; P et Q) interagissent par l'intermédiaire du domaine du NAD et de la S-loop.

IVB2b. Interfaces entre sous-unités (Skarzynski et al., 1987)

Les interactions les plus nombreuses s'établissent entre les sous-unités symétriques par rapport à l'axe P, sous forme de liaisons H directes ou via une molécule d'eau, d'interactions ioniques et de contacts hydrophobes. Elles impliquent essentiellement le feuillet β antiparallèle du domaine catalytique, et la S-loop.

Les sous-unités symétriques par rapport à l'axe R interagissent par l'intermédiaire des résidus de la S-loop, du site de liaison du NAD et du NAD lui-même.

Les contacts entre sous-unités symétriques par rapport à l'axe Q sont beaucoup moins nombreux.

IVC. LA LIAISON DU NAD À LA GAPDH GLYCOLYTIQUE DE *B. STEAROTHERMOPHILUS*

IVC1. Le mode de liaison du NAD

IVC1a. Le site de liaison

Le NAD se fixe dans une crevasse formée par son domaine de fixation, la S-loop, et la S-loop de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe R. Les interactions principales entre le NAD et les résidus du site sont indiquées sur la figure 13 p. 32. Ce site présente les caractéristiques décrites au §I, à savoir

- pour le sous-site de liaison de l'adénosine :

- . le NAD est lié selon une structure de type I avec P7 (Asp32) et P2 (Phe8), dans laquelle la chaîne latérale de l'Asp32 engage en plus, une liaison H avec le NH peptidique de la Leu33 (un réseau équivalent existe chez l'alcool déshydrogénase de foie de cheval (Eklund *et al.*, 1984)),

- . le pyrophosphate est stabilisé par interaction électrostatique avec la charge positive générée par le macrodipôle de l'hélice α_B (résidus 10 à 18), et par deux liaisons H entre les atomes AO2 et NO2 et les NH peptidiques de P4 (Arg10) et P5 (Ile11) respectivement,

- . l'adénine, en conformation anti, est enfouie dans une poche hydrophobe formée des chaînes latérales de la Leu33 (dans la boucle β_B - α_C) et de la Thr96 (dans la boucle β_D - α_E) et est stabilisée par une liaison H entre le NH2 en C6 et le carbonyl peptidique de l'Arg77 (dans la boucle β_C - α_D) ;

- et pour le sous-site de liaison du nicotinamide :

- . le cycle pyridinium et les chaînes latérales des résidus Tyr317 et Ile11 développent des interactions hydrophobes,

- . le cycle nicotinamide est en conformation syn par rapport au ribose adjacent, conduisant à une stéréospécificité de type B. Cette conformation est stabilisée par une liaison H entre l'atome

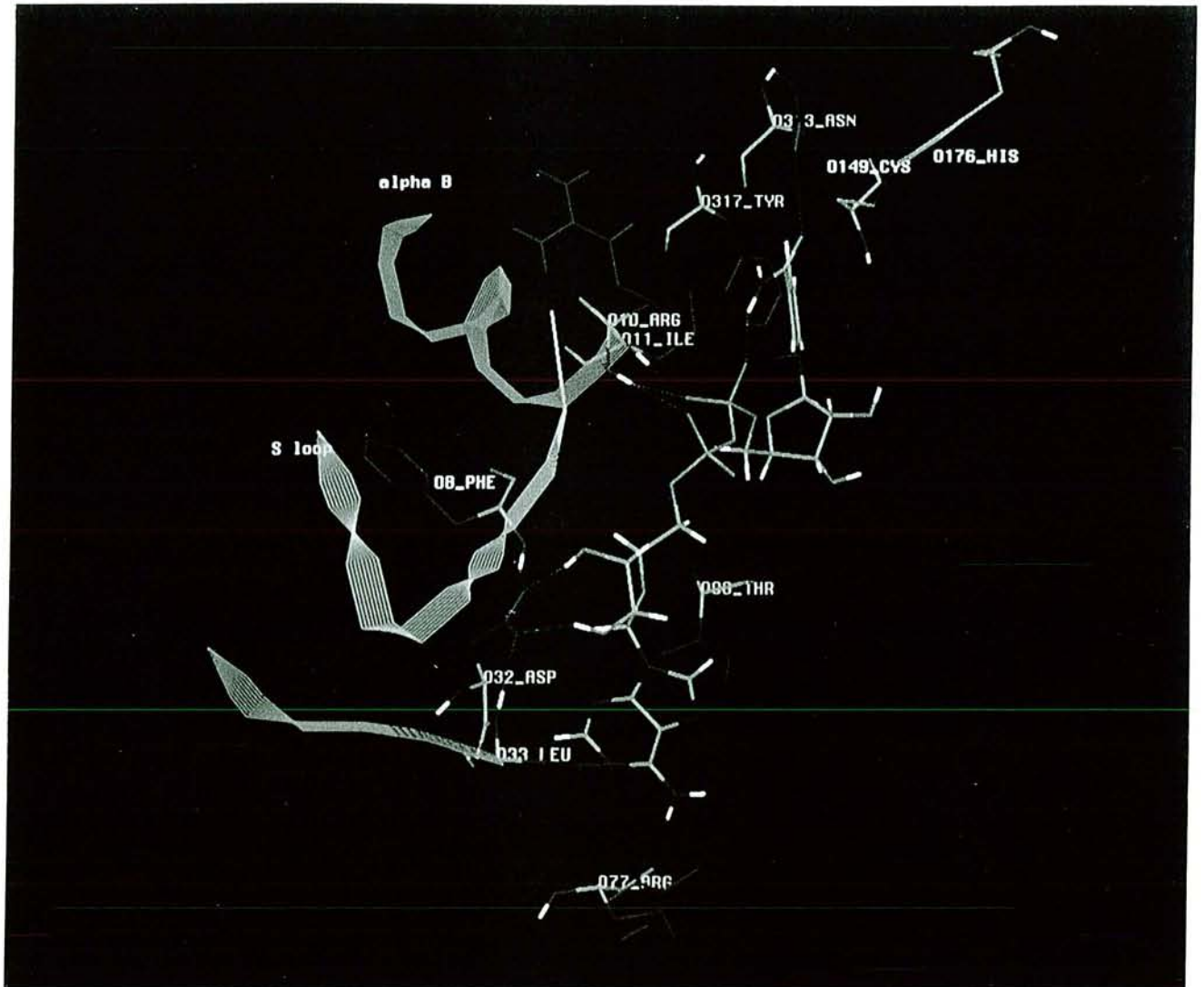


Figure 13 : Le site de fixation du NAD dans la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Skarzynski *et al.*, 1987)

Le NAD et les chaînes principales des acides aminés sont représentés en couleurs atomiques conventionnelles (C, vert, O, rouge, N, bleu, P, rose, H, blanc). Seuls les atomes d'hydrogène polaires sont représentés. Les chaînes latérales des résidus participant à la liaison du NAD sont en bleu foncé, celles des deux résidus catalytiques, Cys149 et His176, en rose. En mode ruban bleu clair sont également représentés l'hélice α_B , dont l'orientation par rapport au groupement pyrophosphate est mise en évidence, la boucle β_B - α_C , et en mode ruban vert un fragment de la S-loop (résidus 186 à 193). La Ser119 n'est pas indiquée pour des raisons de clarté. Le cycle nicotinamide est présenté "de profil", ce qui met en évidence la déviation du groupement carboxamide hors du plan du cycle. Le réseau de liaisons H formé autour de l'Asp32 est également apparent.

NO7 du groupement carboxamide et la chaîne latérale de l'Asn313, maintenant NO7 et NN1 en trans et assurant une déviation de 22° du carboxamide hors du plan du pyridinium, ainsi que par une liaison H interne entre NN7 et NO1.

IVC1b. La transition apo-holo

La fixation du NAD sur la GAPDH provoque d'importants changements conformationnels. La comparaison des structures tridimensionnelles apo et holo de la GAPDH de *B. stearothermophilus* a conduit Skarzynski & Wonacott (1988) à proposer le mécanisme suivant :

La partie ADP du NAD se fixe en premier sur l'apostructure, mettant en place l'essentiel de ses interactions, à l'exception de l'Asp32 (P7) dont l'atome OD1 ne forme qu'une liaison H avec AO3' du ribose et OD2 avec la chaîne latérale de la Thr34. La partie nicotinamide, non liée, est cependant favorablement orientée pour interagir avec son site. C'est la conformation apo ou ouverte.

L'enzyme subit alors un ensemble de changements conformationnels, où les éléments $\beta_A\alpha_B\beta_B$, l'unité de liaison de la partie nicotinamide et l'hélice α_C -terminale subissent une rotation de 5,5° par rapport au domaine catalytique (4,3° en moyenne pour l'ensemble du domaine du cofacteur (Leslie & Wonacott, 1984)). Cela conduit à la conformation holo ou fermée. Une transition conformationnelle analogue existe chez l'ADH (Eklund *et al.*, 1984) et chez la FDH (Lamzin *et al.*, 1994).

Dans le domaine du cofacteur, le NAD s'enfonce dans la structure, impliquant une contraction du site de l'adénosine qui se déplace vers l'Asn313 d'environ 1,8 Å. Ce mouvement permet d'établir des interactions optimales : d'une part dans le site nicotinamide, entre la Ser119 et l'atome NO2' du ribose, l'Asn313 et le carboxamide, le pyridinium et la Tyr317, et le pyridinium et l'Ile11 dont la chaîne latérale change de conformation ; d'autre part dans le site adénosine, où en particulier l'Asp32 et la boucle $\beta_B\alpha_C$ (résidus 33, 34, 35) changent de conformation. Leurs mouvements comptent parmi les plus importants de ceux accompagnant la transition apo-holo. En conséquence, l'Asp32 n'engage plus de liaison H avec la Thr34 mais avec le groupement NH peptidique de la Leu33. Les contacts hydrophobes entre la chaîne latérale de la Leu33 et le cycle adénine sont également améliorés.

Bien que le domaine catalytique subisse peu de modifications, la transition apo-holo permet de renforcer la liaison H entre les deux acides aminés catalytiques Cys149 et His176 (figure 13 p. 32) et l'efficacité de fixation des sites de reconnaissance anionique des substrats, G3P et Pi.

IVC2. La coopérativité

La fixation du NAD(H) aux quatre sous-unités de la GAPDH présente une coopérativité positive ou négative selon la source de l'enzyme. Les GAPDH de muscle de lapin (Conway & Koshland, 1968 ; Boers *et al.*, 1971), de muscle d'esturgeon (Seydoux *et al.*, 1973 ; Kelemen *et al.*, 1975), de muscle de homard (De Wijlder *et al.*, 1969), de *B. stearothermophilus* (Allen & Harris, 1975) et d'*E. coli*

(Corbier *et al.*, 1990) fixent le NAD avec une affinité décroissante. La GAPDH de levure fixe le NAD avec une affinité croissante à 40°C (Kirschner *et al.*, 1971). Différents modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène.

Le modèle "*symétrique concerté*" (Monod *et al.*, 1965) postule qu'à l'état non lié l'enzyme peut exister sous deux formes homogènes (R et T) qui sont en équilibre thermodynamique (figure 14A p. 35). Dans chacune de ces deux formes conformationnelles, les sites de fixation du ligand sont équivalents et indépendants, et la fixation est de type michaelien. La forme R se distingue de la forme T par sa plus grande affinité pour le ligand, qui va donc se fixer préférentiellement sur la forme R et ainsi déplacer l'équilibre vers la formation de R, conduisant à la coopérativité positive observée. Des études en cinétique rapide et saut de température suggèrent que la coopérativité positive de la GAPDH de levure à 40°C obéit à ce modèle (Kirschner *et al.*, 1971).

Koshland *et al.* (1966) ont introduit le modèle de la fixation séquentielle, ou "*asymétrie induite*" (figure 14B p. 35), permettant d'expliquer coopérativité positive et négative. Ce modèle, comme le précédent, suppose une symétrie complète des états apo et holo de la protéine. Par contre, la fixation d'un ligand sur une sous-unité induirait un changement conformationnel d'une sous-unité adjacente pour laquelle la seconde molécule de ce ligand aura plus d'affinité (coopérativité positive) ou moins d'affinité (coopérativité négative) et ainsi de suite. Les états intermédiaires (contenant 1, 2 ou 3 molécules de ligand) ne sont donc pas symétriques, l'asymétrie étant induite par le ligand. De nombreuses données à l'équilibre sur diverses GAPDH sont en faveur de ce modèle (Conway & Koshland, 1968 ; Henis & Levitzki, 1980 ; Branlant *et al.*, 1983a ; Wilder *et al.*, 1989).

De plus, la symétrie 222 parfaite des structures déterminées à haute résolution de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous forme apo et holo satisfait à ces hypothèses. Leslie & Wonacott (1984) ont montré en outre sur une structure à résolution moyenne que la liaison d'une seule molécule de NAD au tétramère provoquait le passage de la sous-unité ayant lié le NAD d'une structure apo à une structure très similaire à l'holoenzyme, les autres sous-unités conservant une structure très proche de l'apoenzyme. Bien que suggérant fortement une transition conformationnelle induite par la fixation du NAD, ces résultats ne révèlent pas la nature des interactions inter sous-unités responsables de la diminution progressive de l'affinité des sites pour le NAD.

Le modèle proposé par Malhotra & Bernhard (1968, 1973) à partir d'expériences d'alkylation du site actif suppose une asymétrie préexistante de la molécule, causée par des interactions différentes entre les sous-unités. L'enzyme se comporterait comme un dimère de dimères ayant au maximum un axe de symétrie, et donc seulement deux types de sites, comme le suggère la structure cristallographique obtenue sur la GAPDH de homard (Moras *et al.*, 1975). Certaines expériences ont effectivement été interprétées par des modèles impliquant seulement deux types de sites (Seydoux *et al.*, 1973 ; Kelemen *et al.*, 1975).

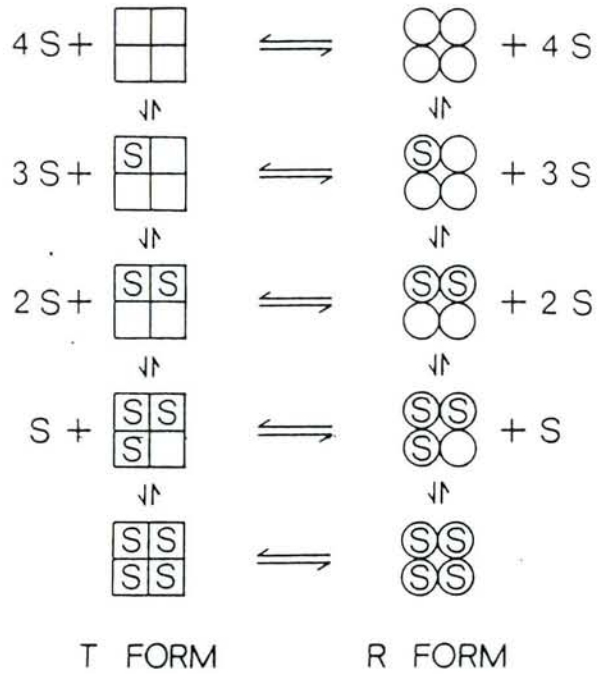


Figure 14A : Le modèle symétrique concerté (Monod, Wyman & Changeux, 1965) de la liaison d'un ligand S à une protéine tétramérique

T : conformation "tendue" de faible affinité pour S
 R : conformation "relâchée de forte affinité pour S

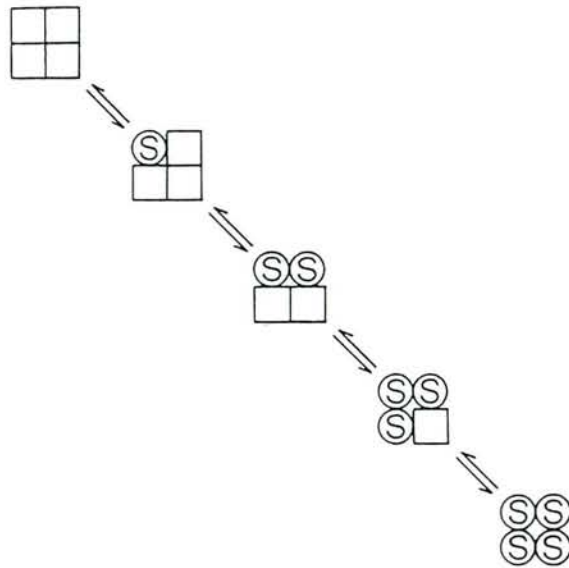


Figure 14B : Le modèle de la fixation séquentielle (Koshland, Nemety & Filmer, 1966) de la liaison d'un ligand S à une protéine tétramérique

Cependant, l'étude par RMN de la liaison du [4-¹³C]NAD à la GAPDH de muscle d'esturgeon a montré que ce modèle n'était pas incompatible avec le modèle de l'asymétrie induite. Ce mécanisme implique l'existence de deux états conformationnels E-NAD et E'-NAD en équilibre, l'état E' des deux premiers sites étant stabilisé par la liaison du NAD aux troisième et quatrième sites, qui deviendraient ainsi moins affines pour le NAD (Klepp *et al.*, 1989).

IVC3. Le transfert de charge entre NAD et site actif

La fixation du NAD sur la GAPDH provoque la formation d'une bande d'absorption (appelée bande de Racker) dont le maximum se situe à 360-370 nm (Racker & Krimsky, 1952). Elle disparaît lorsque l'enzyme est alkylée par l'acide iodoacétique ou acylée par le 1,3dPG.

Kosower (1956) a suggéré l'existence d'un complexe par transfert de charge entre le NAD et un résidu du site actif de la GAPDH expliquant ce phénomène. L'étude de mutants des résidus du site actif Cys149 et His176 a montré que la Cys149 devait être impliquée dans l'apparition de cette bande d'absorption (Mougin *et al.*, 1988).

Klepp *et al.* (1989) ont de plus infirmé l'hypothèse selon laquelle la bande de Racker serait due à un équilibre entre le complexe non covalent GAPDH-NAD et un adduit entre l'atome C4N et la Cys149. Par contre, la Cys149, stabilisée sous forme de thiolate par liaison H avec l'His176 (Skarzynski *et al.*, 1987 ; Soukri *et al.*, 1989), agirait en tant que donneur d'électrons pour le pyridinium et favoriserait la fixation du cofacteur.

IVD. LE MÉCANISME RÉACTIONNEL DE LA GAPDH

Le mécanisme couramment admis (Harris & Waters, 1976) a été initialement proposé par Segal & Boyer (1953), puis confirmé et affiné par de nombreuses études cinétiques (Trentham, 1971b ; Harrigan & Trentham, 1974 ; Meunier & Dalziel, 1978). Il est résumé dans la figure 15 p. 37.

IVD1. Les acides aminés catalytiques

Deux acides aminés sont directement impliqués dans la catalyse (figure 13 p. 32) :

- La Cys149 : le rôle essentiel d'un groupement thiol, suggéré par l'action d'agents alkylants (Segal & Boyer, 1953 ; Krimsky & Racker, 1955) a été démontré par Harris & Perham (1965) pour le résidu 149. Elle intervient dans la formation des intermédiaires covalents hémithioacétal et thioacyl.

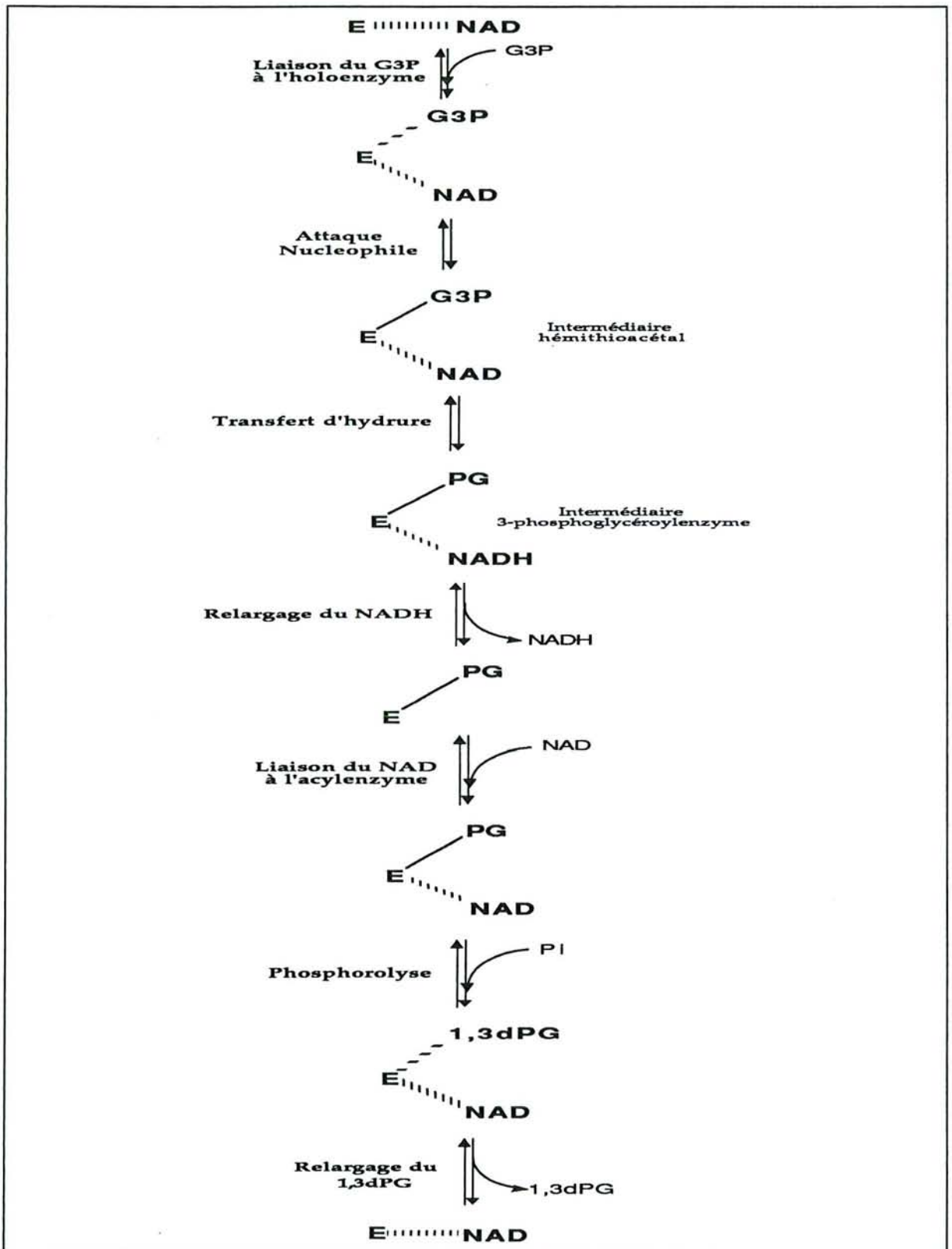


Figure 15 : Les étapes du mécanisme de la GAPDH proposé par Segal & Boyer (1953)

Les liaisons des intermédiaires covalents sont représentés par des traits continus et les liaisons des intermédiaires non covalents par des traits pointillés.

E : GAPDH ; PG : 3-phosphoglycéroyl

- L'His176 : son rôle essentiel a été définitivement prouvé par Soukri *et al.* (1989). Elle intervient vraisemblablement à trois niveaux :

- . elle augmenterait la nucléophilie de la Cys149 par abaissement de son pKa, via la formation d'une liaison H (Skarzynski *et al.*, 1987),
- . elle jouerait le rôle de catalyseur acide-base à différentes étapes de la réaction ,
- . elle stabiliserait les intermédiaires réactionnels par liaison H.

IVD2. Les étapes de la réaction

Elles sont détaillées dans la figure 16 p. 39 et sa légende.

Les études initiales de Trentham, (1971a, 1971b), puis de Corbier *et al.* (1990, 1994) et Liu & Huskey (1992), suggèrent que les étapes limitantes de la réaction pour des GAPDH de diverses origines seraient (figure 15 p. 37):

- . dans le sens oxydation phosphorylante : la phosphorylation à bas pH, et une étape associée au relargage du NADH à pH élevé
- . dans le sens déphosphorylation réductive : le relargage du G3P à bas pH et un changement conformationnel lié à la fixation du NADH à pH élevé.

IVE. AUTRES RÔLES PHYSIOLOGIQUES POSSIBLES DE LA GAPDH

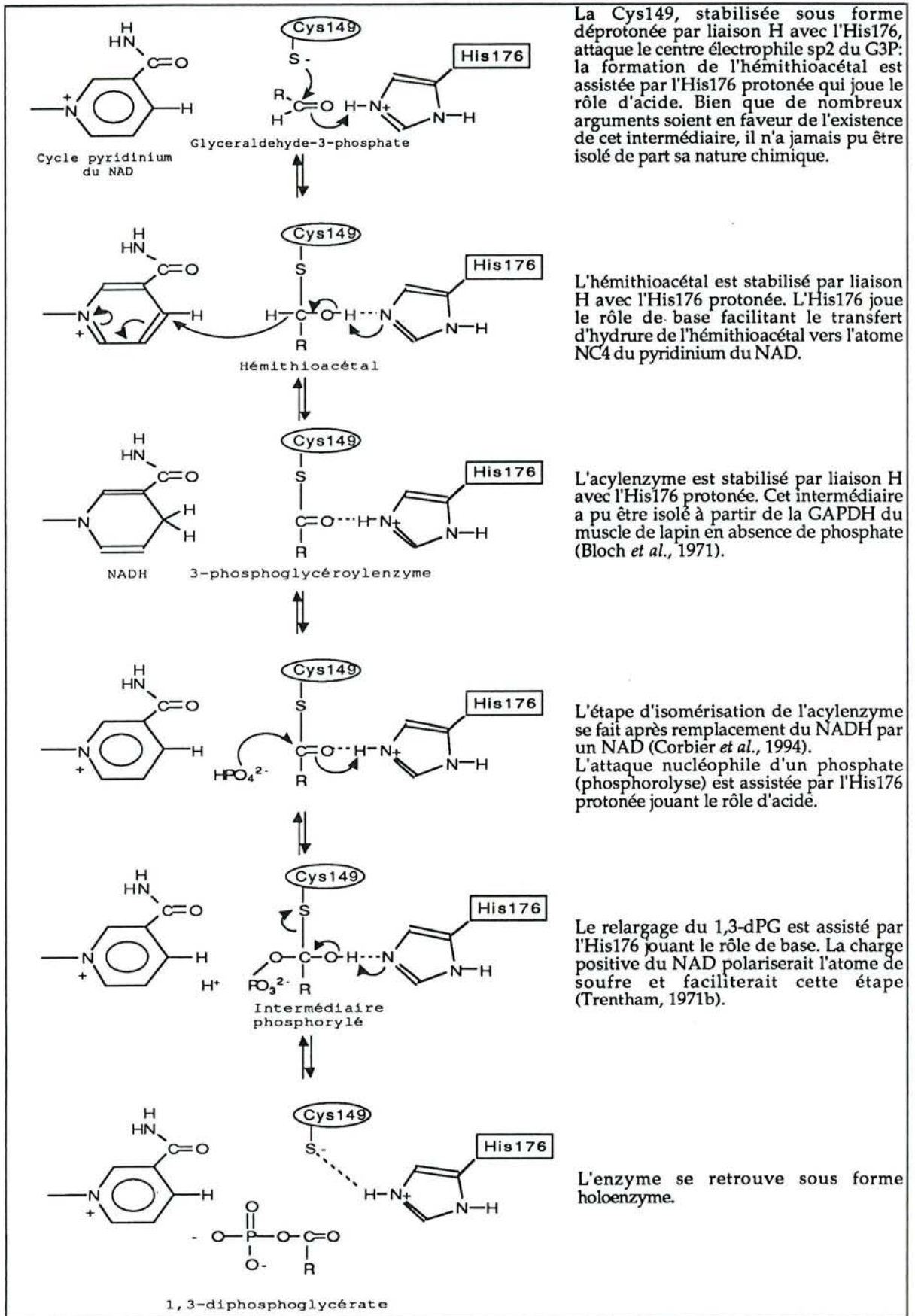
Du fait de son rôle central dans le métabolisme, de sa forte abondance dans les cellules et de son origine très ancienne dans l'évolution, il n'est pas déraisonnable de penser qu'en plus de son rôle dans la glycolyse et la néoglucogénèse, la GAPDH ait pu acquérir d'autres fonctions.

IVE1. Association avec les acides nucléiques.

IVE1a. Fixation sur l'ADN simple brin.

La recherche de protéines se fixant à l'ADN simple brin dans divers systèmes eucaryotes a révélé que la GAPDH (Tsai & Green, 1973 ; Perucho *et al.*, 1977) ainsi que la LDH (Patel & Thomson, 1980) sont capables de se fixer spécifiquement et avec une forte affinité sur l'ADN simple brin. En effectuant une étude similaire sur l'ADN de thymus de veau, Grosse *et al.* (1986) ont montré que la LDH exerçait une activité stimulatrice sur la synthèse de l'ADN, alors qu'au contraire, la GAPDH exerçait un effet inhibiteur à concentration élevée.

Une fonction uracil ADN glycosylase a été aussi récemment proposée pour la GAPDH humaine (Vollberg *et al.*, 1989 ; Meyer-Siegler *et al.*, 1991).



La Cys149, stabilisée sous forme déprotonée par liaison H avec l'His176, attaque le centre électrophile sp^2 du G3P: la formation de l'hémithioacétal est assistée par l'His176 protonée qui joue le rôle d'acide. Bien que de nombreux arguments soient en faveur de l'existence de cet intermédiaire, il n'a jamais pu être isolé de part sa nature chimique.

L'hémithioacétal est stabilisé par liaison H avec l'His176 protonée. L'His176 joue le rôle de base facilitant le transfert d'hydrure de l'hémithioacétal vers l'atome NC_4 du pyridinium du NAD.

L'acylzyme est stabilisé par liaison H avec l'His176 protonée. Cet intermédiaire a pu être isolé à partir de la GAPDH du muscle de lapin en absence de phosphate (Bloch *et al.*, 1971).

L'étape d'isomérisation de l'acylzyme se fait après remplacement du NADH par un NAD (Corbier *et al.*, 1994). L'attaque nucléophile d'un phosphate (phosphorolyse) est assistée par l'His176 protonée jouant le rôle d'acide.

Le relargage du 1,3-dPG est assisté par l'His176 jouant le rôle de base. La charge positive du NAD polariserait l'atome de soufre et faciliterait cette étape (Trentham, 1971b).

L'enzyme se retrouve sous forme holoenzyme.

Figure 16 : Le mécanisme chimique de la réaction catalysée par la GAPDH

$\text{R} = \text{CHOH-CH}_2\text{OPO}_3^{2-}$

IVE1b. Fixation sur l'ARN.

La GAPDH a été identifiée comme étant l'une des trois protéines majeures (avec EF2 et EF1) se fixant à l'ARN des réticulocytes (Ryazanov, 1985). Elle est également capable de former des complexes avec les mono et les polyribosomes, par l'intermédiaire d'interactions avec certaines régions d'ARN exposées dans ces structures (Ryazanov *et al.*, 1988). Cette association conférerait à la cellule un avantage pour les besoins en énergie que requiert le processus de traduction de l'ARN messenger.

Récemment, Singh & Green (1993) ont proposé que la GAPDH interagisse avec l'ARNt de la méthionine au niveau du noyau de cellules HELA. Il semblerait que la GAPDH reconnaisse une structure particulière de l'ARNt, et qu'elle intervienne dans le transport de l'ARNt au niveau de la membrane nucléaire.

Hentze (1994) a proposé que certaines protéines liant l'ARN puissent avoir évolué à partir d'une structure spécifique des (di)nucléotides, en observant que plusieurs oxydoréductases NAD(P)-dépendantes (GAPDH, GDH, LDH, DHFR) ainsi que la Thymidylate synthase (de substrat dUMP) ont également été décrites pour interagir avec l'ARN. Ces propriétés pourraient avoir des conséquences sur la régulation des interactions ARN-protéines.

IVE2. Association avec les structures membranaires.

L'association de la GAPDH avec les membranes des globules rouges a été très étudiée (Kant & Steck, 1973 ; Tsai *et al.*, 1982). Dans les érythrocytes, 60 à 70 % de l'activité enzymatique est liée aux membranes, ce qui représente 5 à 7 % des protéines membranaires totales (Kant & Steck, 1973). L'interaction de la GAPDH avec la protéine "bande 3" des membranes pourrait réguler l'activité de l'enzyme et donc de la glycolyse (Harrison *et al.*, 1991 ; Low *et al.*, 1993). Récemment, Lachaal (1990) a suggéré que la GAPDH puisse réguler la fonction du transporteur glucose des membranes érythrocytaires.

Il a été suggéré de plus que la GAPDH intervienne dans l'ancrage d'éléments du cytosquelette à la membrane, en particulier à la tubuline des microtubules (Huitorel & Pantaloni, 1985).

Chez les bactéries des groupes *streptococci* A et B, deux types de GAPDH seraient produites (Pancholi & Fischetti, 1992). L'une correspond à l'enzyme glycolytique, l'autre est membranaire et constitue une protéine majeure de la surface de la bactérie, et jouerait un rôle dans la pathogénicité (Lottenberg *et al.*, 1992 ; Pancholi & Fischetti, 1992). Cette protéine membranaire conserve une activité GAPDH mais possède en plus une activité ADP-ribosylase et est capable de s'autoADPribosyler (Pancholi & Fischetti, 1993).

IVE3. Activité phosphorylante

Des études de Kawamoto & Caswell (1986) ont révélé que la GAPDH était capable de s'autophosphoryler en présence de MgATP. La protéine phosphorylée se comporterait ensuite comme une kinase et catalyserait la phosphorylation de protéines de microsomes de muscles squelettiques, par transfert du groupement phosphate incorporé.

IVE4. GAPDH et NO

L'explosion récente des travaux sur les fonctions du nitroxyde d'azote a conduit à considérer la GAPDH comme cible spécifique du NO. Le NO induirait une S-nitrosylation de la Cys149, inactivant l'activité enzymatique et stimulant la modification de la GAPDH par le NAD à de faibles stœchiométries (environ 0,1%), peut-être via une réaction d'ADP-ribosylation (Dimmeler & Brune, 1992 ; Kots *et al.*, 1992 ; Molina Y Vedia *et al.*, 1992 ; Zhang & Snyder, 1992 ; Mcdonald & Moss, 1993). La GAPDH pourrait jouer le rôle de transporteur du messenger cellulaire NO (Mcdonald *et al.*, 1993).

De façon générale, on peut cependant se poser la question de la validité des résultats publiés. En effet, certaines des fonctions décrites pourraient être dues à des interactions aspécifiques, entre acides nucléiques par exemple et des GAPDH dont le pHi serait basique. Néanmoins, dans le cas des streptocoques, il est raisonnable de penser qu'une autre forme de GAPDH soit apparue au cours de l'évolution.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels	42
II. Techniques générales de Génie Génétique.....	46
III. Techniques de production, purification et caractérisation de la GAPDH.....	55
IV. Techniques d'étude des propriétés enzymatiques	60
V. Techniques d'étude des interactions entre la GAPDH et le NAD(P).....	62

I. MATÉRIELS

IA. SOUCHES BACTÉRIENNES

IA1. Souches utilisées pour les techniques de génie génétique

Souches utilisées pour les préparations plasmidiques :

E.coli HB101 : F⁻, supE, hsdS (rb⁻mb⁻), recA, ara, proA, lacY, galK, rpsL, xyl, mtl, leuB, thi

E. coli BJ 5183 : F⁻, endA, sbcB, recBC, galK, met, str^R, thi, bio, hsdR (rk⁻, mk⁺), λ⁻

Cette souche permet d'obtenir des taux de transformation élevés par le plasmide pBR322.

Souches utilisées pour la préparation des dérivés du phage M13 et pour la mutagenèse dirigée :

Elles possèdent toutes le facteur épisode F' nécessaire à l'infection par le phage M13, et sont déficientes pour l'activité β-galactosidase.

E. coli JM103 : endA, hsdR, supE, sbcB, thi, strA, Δ(lac-proAB), λ⁻, F' (traD36, lacI^Q, lacZΔM15, proAB⁺)

Elle possède l'ARNt suppresseur (SupE) nécessaire au développement du phage M13mp9.

E.coli HB2151 : ara, thi, Δ(lac-proAB), F' (proA⁺B⁻, lacI^Q, lacZΔM15)

E.coli HB2154 : ara, thi, mutL :: Tn10, Δ(lac-proAB), F' (proA⁺B⁻, lacI^Q, lacZΔM15)

IA2. Souches utilisées pour la production de la GAPDH

E.coli W3CG (Ganter & Plückthun, 1990) : W3110 (dérivé de K12, λ⁻, F⁻), gapA::Tn10

Elle possède le gène de résistance à la tétracycline (transposon Tn10).

E.coli DS113 (Della-Seta, communication personnelle) : MG1655 (K12, λ⁻, F⁻), ΔgapA::Cm, ΔgapB::Erm

Elle possède les gènes de résistance au chloramphénicol et à l'érythromycine.

IB. PLASMIDES ET PHAGES

IB1. Les plasmides

pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) : Ce vecteur de 4,3 kb dérive du plasmide ColE1 et porte les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. Il est utilisé pour le sous-clonage et l'expression des gènes sauvages et mutés de la GAPDH.

B1b (figure 17 p. 43) (Branlant *et al.*, 1983b): Plasmide recombinant construit à partir de pBR322 et contenant un fragment d'ADN de 4,1 kb renfermant le gène de la GAPDH de *B. stearothermophilus* inséré dans le site BamHI de pBR322. Il ne possède donc plus que le gène de résistance à l'ampicilline.

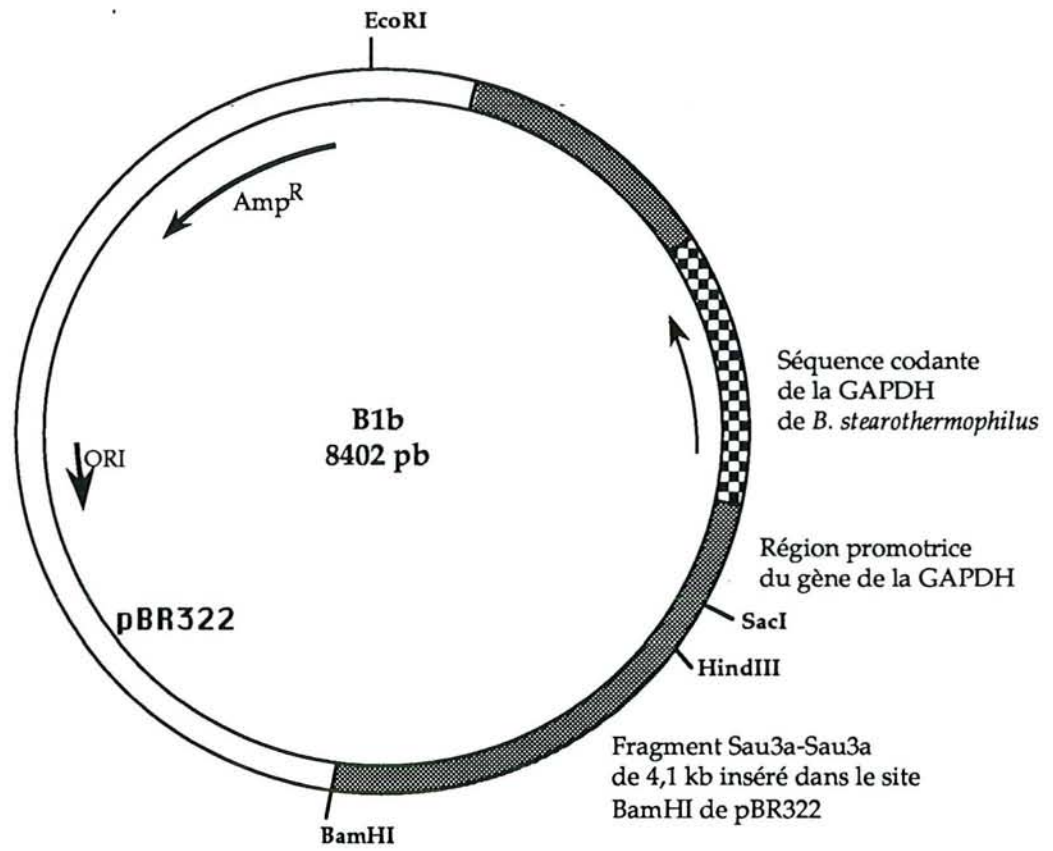


Figure 17 : Structure du plasmide B1b

■ Fragment d'ADN génomique inséré dans pBR322 et contenant la séquence codante du gène de la GAPDH ■

IB2. Les phages

M13mp9, M13mp19 : Ils ont été obtenus par modification du phage M13 sauvage (Messing *et al.*, 1977) par insertion de l'opérateur Lac suivi d'un fragment du gène de la β -galactosidase d'*E.coli* qui permet la complémentation de souches de génotype Δ lac. Une séquence "polylinker" contenant différents sites uniques de coupure pour des enzymes de restriction est intégrée dans ce fragment et permet l'insertion d'une séquence d'ADN. Le phage M13mp9 contient deux mutations de type ambre et ne peut se développer que dans une souche possédant le tRNA suppresseur correspondant (JM 103).

ss12 (figure 18 p. 45) : Phage recombinant construit à partir du phage M13mp9 et contenant un fragment de 2,9kb portant la séquence codante du gène de la GAPDH de *B. stearothermophilus* inséré dans le site HindIII du "polylinker" : ce phage n'est donc plus capable de compléter l'activité β -galactosidase.

ssS : Phage identique à ss12, portant la mutation S (Leu187→Ala, Pro188→Ser) dans la séquence codante du gène de la GAPDH, obtenu par sous-clonage du fragment modifié dans M13mp9 après mutagénèse.

IC. MILIEUX DE CULTURE ET BOITES DE PETRI

Milieu complet LB :	Peptone pancréatique de viande	5g
	Peptone tryptique de caséine	5g
	Extrait de levure	5g
	NaCl	5g
	H ₂ O distillée	qsp1l

Le pH est ajusté à 7,5 avec NaOH 10N. Le milieu est autoclavé 50 min à 1 bar.

Milieu synthétique minimum M63 :

KH ₂ PO ₄	100 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 mM
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0.4 mM
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,0002 mM

Le pH est ajusté à 7,5 avec KOH 10N. Le milieu est autoclavé 30 min à 0,5 bar.

M63 succinate-glycérol (M63SG):

M63	1l (volume final)
tryptophane/méthionine 0.125 % (P/V)	20 ml stérilisé par filtration
thiamine 0.2 % (P/V)	0.5 ml stérilisé par filtration

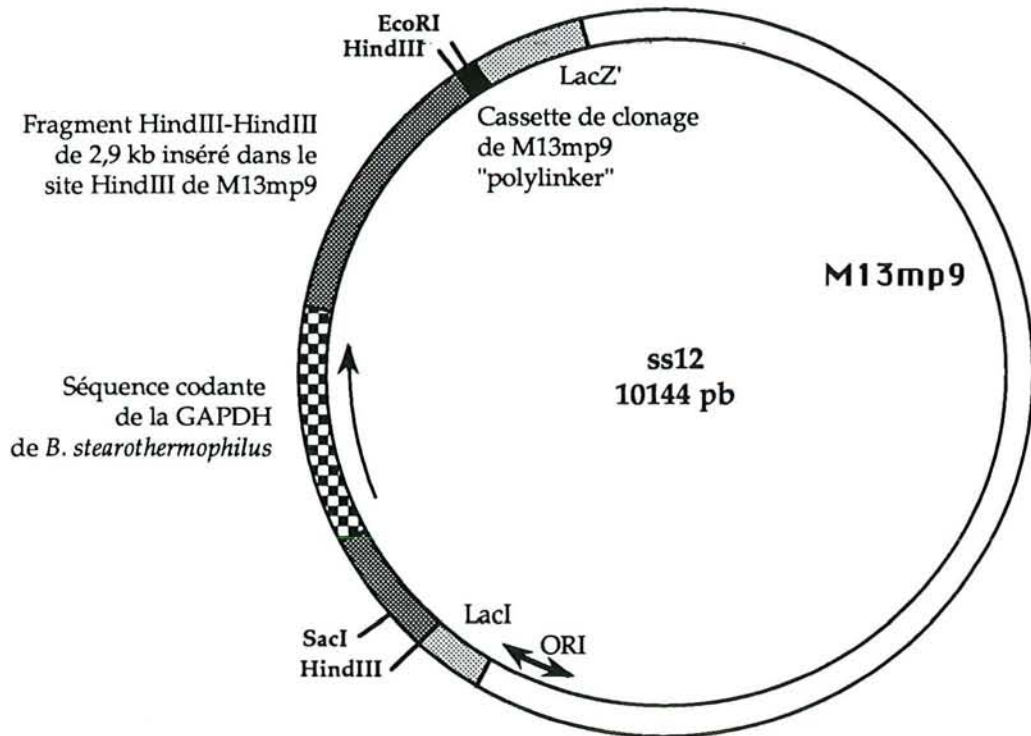


Figure 18 : Structure du phage ss12

■ Fragment d'ADN extrait de B1b sous-cloné dans M13mp9 et contenant la séquence codante du gène de la GAPDH ■

casaminoacides 2.5 % (P/V)	40 ml
succinate 20 % (P/V) Glycérol 4,5% (P/V)	20 ml

Le pH est ajusté à 7,5 avec KOH 10N.

M63 glucose (M63G): même composition que le milieu M63 succinate-glycérol, le succinate-glycérol étant remplacé par du glucose 0,4%(P/V) final.

Milieu SOC (glucose):	Bactotryptone	2% (p/v)
	Extrait de levure	0.5 % (p/v)
	NaCl	10mM
	KCl	2.5 mM
	MgCl ₂	10mM
	MgSO ₄	10mM
	glucose	20mM

Milieus gélosés :	Bacto-agar	15 g/l
-------------------	------------	--------

L'ajout de bacto-agar se fait avant d'autoclaver les milieux.

Les additifs :	Ampicilline (A)	100 mg/l
	Tétracycline (T)	15 mg/l
	Chloramphénicol (Cm)	25 mg/l
	Erythromycine (Erm)	200 mg/l

II. TECHNIQUES GÉNÉRALES DE GÉNIE GÉNÉTIQUE

IIA. TRANSFORMATION DES CELLULES D'E.COLI

IIA1. Technique classique (Maniatis *et al.*, 1989)

Les cellules compétentes sont obtenues par traitement au CaCl₂ 50 mM d'une culture d'*E. coli* sur milieu LB, arrêtée en phase exponentielle de croissance (DO (densité optique) à 700 nm comprise entre 0,3 et 0,5). Les bactéries compétentes, reprises dans 1/10^{ième} du volume initial de culture, peuvent être conservées 2 à 3 jours à 4°C, ou plusieurs mois en glycérol 15% après congélation rapide de fractions aliquotes dans l'azote liquide et stockage à -80°C.

A 150 μl de cellules compétentes sont ajoutés 20 ng de plasmide ou de phage simple brin (sb), ou 2ng de phage double brin (db). Le mélange est incubé 30 min à 0°C puis 1 min 30 s à 42°C (choc thermique).

Dans le cas d'un plasmide, le mélange ainsi obtenu est étalé sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique de sélection adapté et incubé à 37°C.

Dans le cas des phages, qui ne portent pas de gène de résistance aux antibiotiques, seul le système de complémentation de l'activité β -galactosidase peut-être utilisé. Dans ce dernier cas, on utilisera une souche d'*E.coli* mutée dans le gène de la β -galactosidase. Cette activité est mise en évidence par ajout de 20 μl d'IPTG 100 mM (isopropyl β -D-thiogalactoside), inducteur de transcription, et 30 μl d'une solution de X-Gal 2% (p/v) (5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl β -D-galactopyranoside), analogue de substrat libérant un chromophore bleu. Le mélange est coulé sur une boîte de Pétri en présence de 100 μl de cellules d'*E.coli* en phase stationnaire formant un tapis cellulaire permettant de visualiser les plages de ralentissement de croissance et de 3 ml de gélose molle (LB, bacto-agar 7 g/l), puis incubé à 37 °C.

IIA2. Cas de la souche W3CG

La culture bactérienne est réalisée en milieu M63SG et traitée par une solution de MnCl_2 100mM, CaCl_2 75mM, NaAc 10mM pH 5,3. La suspension est reprise dans 1/20^{ième} du volume de culture de cette solution.

300 ng de plasmide permettent de transformer 150 μl de cellules compétentes, que l'on incube 1 heure à 37°C après le choc thermique et l'ajout de 200 μl de milieu M63. Les cellules sont alors étalées sur boîte M63 SG ou M63 G contenant l'antibiotique de sélection.

IIA3. Transformation par électroporation

Cette technique est utilisée pour transformer la souche DS113. La culture bactérienne arrêtée en phase exponentielle de croissance est lavée deux fois à l'eau ultrapure stérile puis traitée au glycérol 10% et reprise dans 0,3% de son volume initial de glycérol 10%. La concentration en cellules est approximativement de 3.10^{10} cellules par ml. Les cellules compétentes peuvent être conservées plusieurs mois à -80°C.

La transformation des cellules est faite sur un appareil Gene-Pulser (Biorad) dans des cuves de 0,4 ml possédant deux électrodes distantes de 0,2 cm. L'ADN doit être dans un tampon de faible force ionique, afin d'éviter le risque d'arc électrique à haut voltage. Le mélange de 40 μl de suspension cellulaire et 1 à 2 μl d'ADN (quelques ng) est soumis à un champ électrique de 12 kV/cm généré par un condensateur de capacité 25 μF , avec une résistance de 200 ohms. Les bactéries ainsi traitées sont resuspendues rapidement dans 200 μl de milieu SOC, puis incubées 1 heure à 37°C afin de faciliter la régénération des bactéries transformées et étalées sur boîte.

IIB. PRÉPARATION DE L'ADN

(Maniatis *et al.*, 1989)

IIB1. La technique du lysat clair

Cette technique est utilisée pour les préparations plasmidiques et phagiques en grande quantité, à partir d'une culture sur milieu sélectif de 250 ml de bactéries transformées par le phage ou le plasmide à préparer.

Elle repose sur une lyse enzymatique des parois bactériennes par le lysozyme complétée par un traitement au Triton X100. Les acides nucléiques solubles sont ensuite isolés par précipitation au PEG (polyéthylène glycol)/NaCl puis purifiés par ultracentrifugation à l'équilibre en solution de CsCl pour séparer l'ADN phagique ou plasmidique de l'ADN chromosomique et des ARN. L'ADN phagique ou plasmidique prélevé est finalement traité à la ribonucléase A, puis concentré par précipitation alcoolique. La concentration est mesurée spectrophotométriquement à 260nm (1 unité DO₂₆₀ = 50 µg d'ADN/ml). L'absence de protéines dans la solution est estimée par le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ qui doit être proche de 1,8.

IIB2. Minipréparation plasmidique

Cette technique est utilisée pour cribler des plasmides après un sous-clonage, à partir d'une culture de quelques ml de bactéries transformées sur milieu sélectif.

Elle repose également sur une lyse des parois bactériennes au lysozyme, suivie d'une dénaturation de l'ADN chromosomique à la soude. L'ADN plasmidique, resté soluble après précipitation, est purifié par extraction au phénol-chloroforme, puis traité à la ribonucléase A. Il est ensuite précipité soit simplement à l'alcool, soit au PEG/NaCl, selon que la préparation est utilisée respectivement pour une analyse par des enzymes de restriction ou par séquençage.

IIB3. Préparation de l'ADN du phage M13

IIB3a. Physiologie du phage M13

Le phage M13 est un phage filamenteux qui contient un ADN circulaire et monocaténaire. Il ne lyse pas les cellules mais ralentit leur croissance 2 à 3 fois. L'infection de la cellule hôte est médiée par le facteur sexuel F ou F'. A l'intérieur de la cellule, l'ADN viral se réplique sous la forme d'un double brin (forme répliquative) qui sert à la synthèse de nombreuses formes simple brin qui sont encapsidées et excrétées dans le milieu extérieur.

Par conséquent, il est possible de disposer de la forme db ou sb, selon que l'on purifie l'ADN à partir des cellules infectées ou du surnageant de culture.

IIB3b. Préparation de la forme double brin (db)

Les cellules d'*E.coli* infectées par le phage M13 se trouvent sur boîte de Pétri sous la forme de plages claires de ralentissement de croissance. Une plage claire est récupérée avec un cure-dent et incubée dans 1 ml de milieu LB pendant 6 heures à 37°C, qui sert à infecter 1l de culture de la même souche d'*E.coli* en phase stationnaire. Après 4 heures d'incubation supplémentaires, les cellules sont traitées par la technique du lysat clair.

IIB3c. Préparation de la forme simple brin (sb)

1,5 ml de LBensemencés avec une plage de cellules infectées et 15 µl de cellules d'*E.coli* en phase exponentielle sont incubés 6 heures à 37°C sous agitation. Le culot cellulaire contenant la forme db est éliminé et le surnageant contenant la forme sb est traité par 200 µl d'une solution de PEG 20%, NaCl 2,5 M pendant 15 min à température ambiante, puis centrifugé 15 min à 16000g. Le culot est repris dans du tampon TE (TrisHCl 10mM pH 8, EDTA 1mM) et les protéines éliminées par deux extractions phénoliques successives suivies d'une extraction au chloroforme. Enfin, l'ADN est concentré par précipitation alcoolique et repris dans 15 µl de tampon TE.

IIC. ANALYSE ET PURIFICATION DE L'ADN

(Maniatis *et al.*, 1989)

IIC1. Analyse par digestion par les enzymes de restriction

Les hydrolyses sont réalisées pendant 1h à 1h30 à 37°C. La quantité d'enzyme par µg de matériel à hydrolyser est déterminée dans chaque cas par une cinétique de coupure, une unité étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1 µg d'ADN du bactériophage λ pendant 1h à 37°C. La plupart des enzymes utilisées sont fournies par Biolabs ou Boehringer et ont été utilisées dans les conditions décrites par le fournisseur. Les fragments d'ADN hydrolysé sont ensuite séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (p/v).

IIC2. Purification des oligonucléotides sur gel de polyacrylamide

Les oligonucléotides sont purifiés sur gel de polyacrylamide à 15% ou 20% (p/v), par migration verticale dans du tampon TBE (Tris-base 0,1 M, acide borique 8,8 mM, EDTA 2,5 mM) à une vitesse moyenne de 40 V/cm. La bande de gel contenant l'oligonucléotide visualisée par fluorescence est découpée dans un microtube et incubée dans du tampon d'élution (acétate d'ammonium 500 mM, acétate de magnésium 10 mM, SDS 0,1%, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) pendant une nuit à température ambiante. Les fragments de polyacrylamide sont éliminés par centrifugation 15 min à 16000 g, puis

l'oligonucléotide solubilisé est concentré par précipitation alcoolique. Le rendement de cette technique est d'environ 50%.

IIC3. Techniques de séquençage

L'ADN peut être séquencé soit sous forme sb, soit sous forme db. Dans le cas d'un ADN sb (criblage des mutants après mutagenèse), la technique employée est celle de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) fondée sur l'emploi du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E.coli*. L'ADN db a été séquencé en utilisant l'ADN polymérase du bactériophage T7 (vérification de la séquence codante de la GAPDH après réinsertion dans le vecteur d'expression plasmidique).

Méthode de séquençage db (Tabor & Richardson, 1987)

L'utilisation de l'ADN polymérase du bactériophage T7 permet d'éliminer les risques d'apparition de bandes artéfactuelles dues à la terminaison des chaînes par un dNTP et non un ddNTP.

La première étape est la dénaturation de l'ADN db circulaire à séquencer :

- ADN plasmidique double brin 0,5 pmole
- NaOH 2.5 N, EDTA 2.5 mM 2 µl
- H₂O qsp 20 µl

Le mélange est laissé 5 mn à température ambiante.

L'hybridation de l'amorce nucléotidique se fait lors des deux étapes suivantes :

- Oligonucléotide 6 pmol
- NaAc 3 M, pH 4.6 4 µl
- EtOH 75 µl

Le mélange est homogénéisé par inversion, laissé 10 mn à -20°C, puis centrifugé 15 mn à 16000 g. Le culot est lavé avec 200 µl d'EtOH 70%, puis repris par :

- H₂O 8 µl
- Tampon 5X 2 µl
(Tris-HCl 200 mM pH 7,5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 250 mM)

Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 min et complété par :

- [α -³²P]dATP 5 µCi
- DTT 100 mM 1 µl
- l'ADN polymérase du bactériophage T7 2 U
- mélange d'extension 1x 2 µl
(mélange d'extension 5x : dCTP 7,5 µM, dGTP, 7,5 µM, dTTP 7,5 µM)

Après une incubation de 5 min à température ambiante (étape d'élongation), 3,5 µl de ce mélange sont transférés dans 4 microtubes contenant chacun 2,5 µl d'un des 4 mélanges ddNTP/dNTP (20 µM/200 µM) (étape d'arrêt statistique de l'élongation). Après 5 min d'incubation à 37 °C, la réaction est arrêtée en ajoutant 4 µl de bleu de formamide. Les produits de la réaction sont fractionnés sur gel

de polyacrylamide dénaturant (polyacrylamide 6%, urée 8M). Après fixation de l'ADN sur le gel par trempage dans l'acide acétique 10% (v/v), les bandes d'ADN élonguées sont révélées par autoradiographie.

IID. TECHNIQUE DE MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE

IID1. Phosphorylation des amorces oligodésoxynucléotidiques

Cette étape permet d'ajouter un phosphate en 5' de l'oligonucléotide, en vue de l'étape de ligation de la mutagenèse dirigée.

• Oligodésoxynucléotide	300 pmoles
• Tampon kinase 10X (Tris-HCl 70 mM pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, DTT 5 mM)	3 µl
• ATP (10mM)	3 µl
• T4 polynucléotide kinase	1 U
• H ₂ O	qsp 30 µl

Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 mn, puis à 70°C pendant 10 mn pour inactiver l'enzyme.

IID2. Méthode de Kramer (Kramer *et al.*, 1984)

IID2a. Principe (figure 19 p. 52)

Elle consiste à former un hétéroduplex entre un brin du phage M13mp19 db coupé par les enzymes de restriction *Hind* III et *Eco*R I (de telle façon à ce que la cassette de clonage soit enlevée) et le brin opposé du phage M13mp9 contenant la séquence à muter (ss12 par exemple). La séquence à muter se trouve ainsi sous forme d'une fenêtre sb sur laquelle l'oligonucléotide complémentaire, servant à réaliser la mutation, peut être hybridé. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E.coli* et de l'ADN ligase du bactériophage T4 permettent ensuite de recréer un phage db complet.

La sélection du phage portant la séquence mutée est réalisée par transformation d'une souche d'*E.coli* HB2154 qui est mutée dans son système général de réparation de l'ADN mutL (Carter *et al.*, 1985), en présence d'un tapis cellulaire d'*E.coli* HB2151. Le phage M13mp9 porte sur deux gènes essentiels des codons ambres, ce simple brin ne peut donc donner lieu à des phages dans la souche d'*E.coli* HB2154 qui ne possède pas d'ARNt suppresseur. L'emploi de la souche d'*E.coli* HB2151 qui elle, n'est pas mutée dans son système de réparation, permet de conserver la séquence correcte du phage sb M13mp19 portant le gène muté, qui seul donne naissance à des phages infectieux.

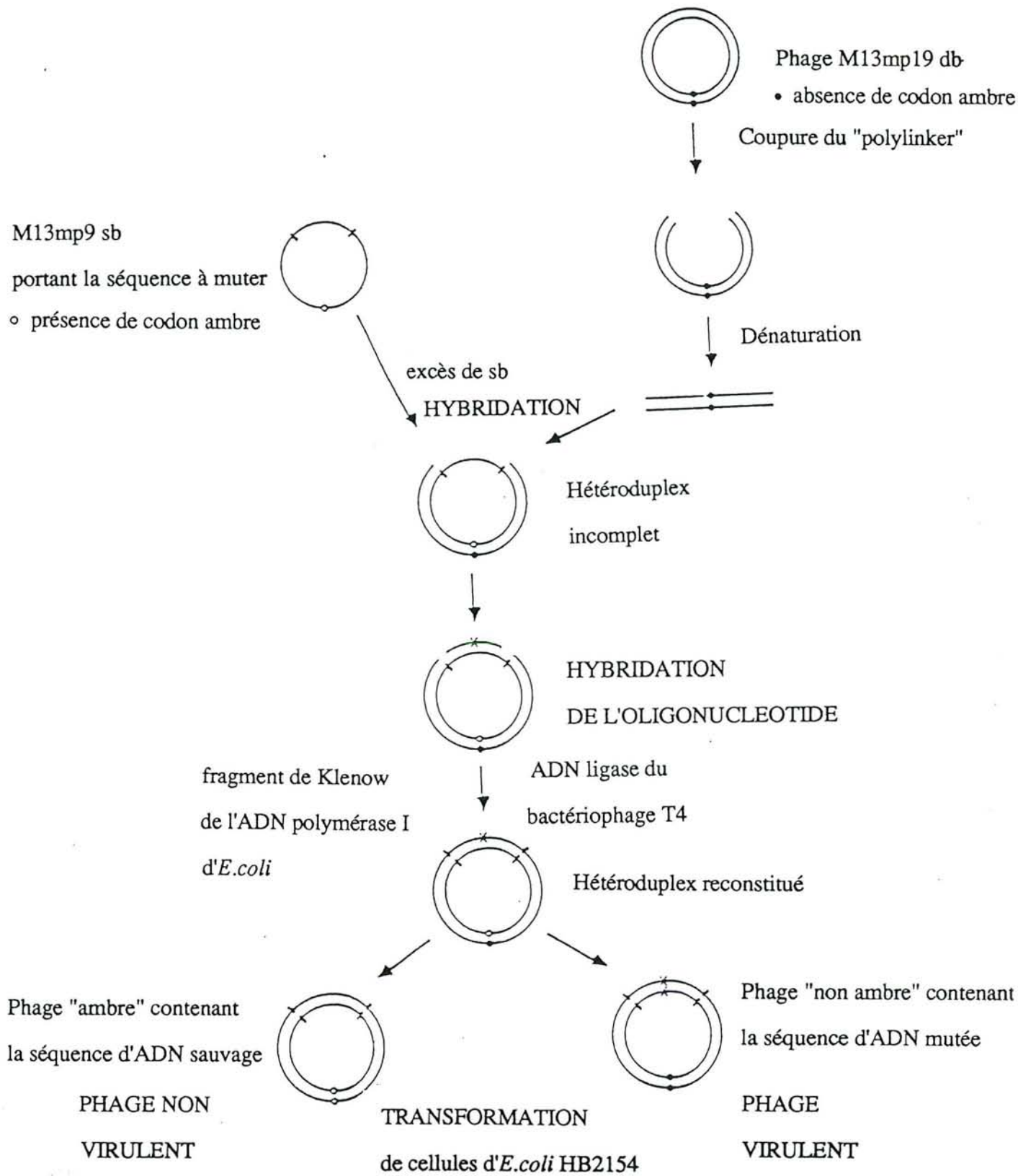


Figure 19 : Principe de la technique de mutagenèse dirigée par la méthode de Kramer (Kramer *et al.*, 1984)

IID2b. Protocole

Mélange M1 : Hybridation du phage mp9 contenant le fragment à muter et du phage mp19

• M13mp19 db coupé par HindIII et EcoRI	1 µg
• M13mp9 sb portant le fragment d'ADN à muter	2,5 µg
• tampon mut 5x (Tris-HCl 62,5 mM, KCl 1 M)	4 µl
• H ₂ O ultrapure	qsp 20 µl

Ce mélange est incubé à 100°C pendant 3 min, à 65°C pendant 5 min, puis à température ambiante pendant 10 min, la présence de l'hétéroduplex est vérifiée sur gel d'agarose 0,8% (p/v).

Mélange M2 : Hybridation des oligonucléotides

• mélange d'hybridation	15 µl
• oligonucléotide phosphorylé	excès de 20x mole à mole
• tampon de mutagenèse A 10x (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, MgCl ₂ 100 mM, DTT 100 mM, NaCl 500 mM)	2 µl
• H ₂ O	qsp 20 µl

L'incubation est de 5 min à 55°C.

La dernière étape permet de compléter et de circulariser l'hétéroduplex :

• mélange M2	20 µl
• tampon de mutagenèse B 10x (Tris-HCl 200 mM pH 8,5, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM)	1 µl
• dNTP 10 mM	1 µl
• ATP 10 mM	1 µl
• fragment de Klenow	2,5 U
• ADN ligase du bactériophage T4	1,5 U
• DTT 100 mM	1 µl
• H ₂ O ultrapure	qsp 40 µl

Le mélange est incubé une nuit à 15°C puis 2 h à température ambiante en présence d'une unité supplémentaire du fragment de Klenow et de l'ADN ligase du bactériophage T4. 100 µl de cellules compétentes de la souche d'*E.coli* HB2154 sont alors transformés par 1 µl de ce mélange final en présence de 100 µl de cellules d'*E.coli* HB2151 en phase stationnaire. Les phages sb sont ensuite extraits et sélectionnés par séquençage selon la méthode de Sanger.

IID3. Les oligodésoxynucléotides utilisés

L'ensemble des mutants obtenus sur la séquence codante sauvage de la GAPDH de *B. stearothermophilus* portée par le phage ss12 est résumé dans le tableau suivant. Les bases créant les mutations sont indiquées en gras sur les oligonucléotides.

Mutation	Oligo-nucléotide	5' Séquence 3'
S : Leu187→Ala, Pro188→Ser	63	CG CAA ATC TTT ATG GGA AGC GTC CAA AAT TCG TT
D32A : Asp32→Ala	23	ATC GGT TAA AGC GTT CAC CGC
D32G : Asp32→Gly	268	ATC GGT TAA ACC GTT CAC CGC
D32E : Asp32→Glu	265	C ATC GGT TAA TTC GTT CAC CG
D32N : Asp32→Asn	303	C ATC GGT TAA GTT GTT CAC CGC CA
B : Leu33→Thr, Thr34→Gly, Asp35→Gly	142	AAG CGT ATT CGC ACC GCC GGT ATC GTT CAC CGC CAC

Les mutants Asp32→Ala, Leu187→Ala, Pro188→Ser (D32A-S), Asp32→Gly, Leu187→Ala, Pro188→Ser (D32G-S) et Leu33→Thr, Thr34→Gly, Asp35→Gly, Leu187→Ala, Pro188→Ser (B-S) ont été obtenus par mutagenèse sur le phage ssS, portant la mutation S, avec les oligonucléotides 23, 268 et 142 respectivement.

IID4. Réinsertion du gène muté dans un vecteur d'expression

La mutagenèse étant effectuée sur un fragment du gène de la GAPDH ne renfermant pas le promoteur, il est nécessaire de replacer le fragment muté derrière sa séquence promotrice dans le plasmide pour qu'il puisse s'exprimer.

IID4a. Préparation du vecteur B1b-EcoRI-SacI

Le plasmide B1b est hydrolysé par les enzymes de restriction EcoRI et SacI, libérant des extrémités cohésives, puis traité par la phosphatase alcaline (Boehringer) qui a la propriété d'enlever les phosphates présents en 5' aux extrémités des acides nucléiques, dans le but de favoriser l'insertion d'un fragment d'ADN étranger. Une picomole d'extrémité 5' libre est traitée par 2 U de phosphatase alcaline d'intestin de veau pendant 1 h 30 à 37°C dans un tampon dont la force ionique est de 50 mM NaCl. Le vecteur est purifié par extraction au phénol-chloroforme.

IID4b. Ligation des fragments

Après mutagenèse et criblage des phages sb mutants, le phage db correspondant est préparé par la technique du lysat clair, et le fragment du gène de la GAPDH portant la mutation est excisé par les enzymes EcoRI et SacI. La formation d'une liaison covalente phosphodiester entre le vecteur et ces fragments est catalysée par l'ADN ligase du bactériophage T4 pendant une nuit à 15°C ou encore pendant 4 heures à température ambiante. La réaction est ATP-dépendante. Nous avons en général travaillé en présence d'un excès de fragment avec un rapport molaire fragment/vecteur égal à trois.

La composition du mélange de ligation est la suivante :

• vecteur	50 ng
• quantité appropriée d'ADN à insérer	
• ATP 10 mM	1 µl
• DTT 100 mM	1 µl
• tampon de ligation 10x (Tris-HCl 0,2 M pH 7,5, MgCl ₂ 0,1 M)	1 µl
• ADN ligase du bactériophage T4	1U
• H ₂ O	qsp 10 µl

Les plasmides recircularisés sont sélectionnés par transformation dans la souche BJ 5183, puis testés en séquençage sur une minipréparation pour vérifier la présence de la mutation, avant d'être préparés en grande quantité et séquencés sur toute la séquence codante pour vérifier qu'aucune autre mutation ne soit apparue.

III. TECHNIQUES DE PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE LA GAPDH

IIIA. PRODUCTION ET PURIFICATION

IIIA1. Production

La GAPDH de *B. stearothermophilus* est produite dans la souche d'*E. coli* W3CG (ou DS113) transformée par le plasmide B1b ou l'un de ses dérivés mutés. La culture est réalisée en milieu M63SG A/T (souche W3CG) ou M63SG A/Erm/Cm (souche DS113) ensemencé au 1/100^{ième}, et incubé 30 à 36 heures à 37°C sous agitation. Les cellules récoltées par centrifugation à 4°C à 3000 g sont lavées au tampon A (saccharose 25%, EDTA 5 mM, TrisHCl 50 mM, pH 7,5).

Dans toutes les étapes de purification suivantes, l'échantillon est maintenu à 4°C.

IIIA2. Purification

IIIA2a. Sonication

Les cellules reprises dans 10 ml de tampon de purification (Tris HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8) par litre de culture sont soniquées sous une puissance de 20 W pendant 1 min 30 s, par périodes de 1 s

d'ultrasons et 1 s d'arrêt. Le sonicat est centrifugé 1 h à 30 000 g ; le culot de débris cellulaires est éliminé.

IIIA2b. Précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium

Le surnageant de sonication est amené à 66% de saturation en sulfate d'ammonium ; une grande partie des protéines autres que la GAPDH est précipitée en 1 h et éliminée par centrifugation à 30 000 g pendant 1h. Le surnageant contenant la GAPDH est amené à 88% de saturation en sulfate d'ammonium : après 1 nuit de précipitation et 1h de centrifugation à 30 000g, le culot contenant la GAPDH est conservé à 4°C.

IIIA2c. Filtration sur gel

Le culot est repris en un volume minimum de tampon de purification et déposé sur une colonne de tamisage moléculaire ACA 34 (acrylamide 3%, agarose 4%, IBF) équilibrée dans le même tampon. Le profil d'élution est déterminé par lecture de la DO à 280 et 260 nm de chaque fraction d'une part, par essai enzymatique d'autre part, ce qui permet de distinguer les pics d'acides nucléiques ($DO_{280}/DO_{260} = 0,5$) des pics protéiques, en particulier de GAPDH ($DO_{280}/DO_{260} = 1$). Les fractions contenant la GAPDH sont rassemblées.

IIIA2d. Chromatographie d'échange d'anions sur Sépharose Q

Le volume précédent est dilué pour obtenir une DO_{280} inférieure ou égale à 1, puis injectée sur une colonne Sepharose Q préparative Pharmacia (agarose 6% greffée par des groupements triméthylammonium methyl), équilibrée dans le tampon de purification et couplée à un système FPLC (Pharmacia). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de KCl 0-1M. Cette étape permet de séparer la GAPDH, éluée à 0,3M KCl, des fragments d'acides nucléiques de même taille, élués à 0,8M KCl. Les fractions contenant la GAPDH sont rassemblées et concentrées par passage sous pression sur une membrane Amicon YM30. A ce stade, la GAPDH est pure et peut être conservée à -20°C sous forme de suspension précipitée au sulfate d'ammonium 88% contenant 1 mM DTT.

IIIA2e. Préparation de la forme apoenzyme

L'apoenzyme est préparée par traitement de la GAPDH au charbon activé :

. suspension de GAPDH précipitée	qsp 20 mg
. charbon actif	100 mg
. EDTA 5mM pH8	qsp 5 ml

Le mélange est incubé 10 min à 0°C, puis le charbon est éliminé par centrifugation 10 min à 3000 g. La solution d'apoenzyme (DO280/DO260 = 1,8) est ensuite dialysée contre le tampon voulu puis concentrée.

La quantité de GAPDH est estimée spectrophotométriquement en utilisant pour l'apoGAPDH un coefficient d'extinction molaire à 280 nm de $1,17.10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, et pour l'holoGAPDH de $1,31.10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La normalité N en enzyme correspond à la concentration en sites, i.e. 4 fois la concentration en GAPDH.

IIIB. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTÉINES

IIIB1. Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Cette technique permet d'évaluer la pureté de la solution de GAPDH vis-à-vis d'autres protéines à chaque étape de la purification. La technique d'électrophorèse est celle décrite par Laemmli (1970) permettant, après concentration des échantillons par migration dans un gel de polyacrylamide à 5%, de les séparer suivant leur taille dans un gel à 10%.

Les protéines peuvent être spécifiquement colorées sur le gel dans une solution de bleu de Coomassie à 0,2% (p/v) sous agitation douce pendant 45 min, l'excédent de bleu étant éliminé par rinçage dans une solution d'acide acétique à 10% (v/v).

La coloration argentique, selon une modification de la méthode de Oakley *et al.* (1980), est une méthode 10 à 100 fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie et permet également de révéler les acides nucléiques. Toutes les solutions sont préparées dans de l'eau ultrapure. Les étapes de ce protocole sont résumées dans le tableau suivant :

ETAPE	SOLUTION	DURÉE DU TRAITEMENT
Fixation	50% (v/v) éthanol 12% (v/v) acide acétique 0,05% (v/v) formaldéhyde à 37%	supérieur à 1h
Lavages	50% (v/v) éthanol	3 fois 20 min
Prétraitement	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3, 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l	1 min
Rinçage	H_2O ultrapure	3 fois 20s
Imprégnation	AgNO_3 2 g/l	20 min
Rinçage	H_2O ultrapure	2 fois 20s
Révélation	Na_2CO_3 60 g/l formaldéhyde à 37% 0,5 ml/l	10 min
Lavages	H_2O ultrapure	2 fois 2 min
Arrêt	50% (v/v) éthanol 12% (v/v) acide acétique	10 min
Lavages	50% (v/v) éthanol	supérieur à 20 min

IIIB2. Détermination de la masse moléculaire du monomère de GAPDH par spectrométrie de masse électrospray

La technique de la spectrométrie de masse nécessitant un échantillon débarrassé de toute trace de sels, 200 µg de GAPDH sont injectés sur une colonne analytique en phase inverse (C8) puis élués par un gradient linéaire 0-80% en acétonitrile et lyophilisés. La masse du monomère des différentes GAPDH mutées a ensuite été déterminée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique (Pr Van Dorselaer, ULP Strasbourg) et comparée à la masse théorique calculée, sur la base de 35944 Da pour le monomère de la GAPDH sauvage.

IIIC. CRISTALLISATION

Dans l'optique d'études cristallographiques ultérieures, en collaboration avec le Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire (Dr Dideberg, IBS Grenoble) et le Laboratoire de Cristallographie (Dr Aubry, Université de NancyI), nous avons cristallisé deux des GAPDH mutées, D32G-S et B-S, en présence de NADP.

Environ 4 mg de protéine pure (forme holo) est dialysée 3 fois contre du tampon phosphate 200 mM pH 7,2, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, NADP 30 mM, dans une unité de filtration (Microsep, Filtron) par centrifugation dans un rotor à angle fixe à 7500 g, dans le but de substituer le NAD lié à la GAPDH par du NADP. Le NADP en excès est éliminé par au moins 4 cycles de dialyse supplémentaires contre le même tampon sans NADP. Après concentration, la solution est ajustée à 7 mg/ml en protéine, 2 M en sulfate d'ammonium dans un tampon phosphate 50 mM pH 6,9, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, NADP 30 mM. La technique de cristallisation utilisée est celle de la goutte suspendue, avec un réservoir de sulfate d'ammonium 2,5 M, tamponné par du phosphate 50 mM pH 6,9.

IIID. ESSAI ENZYMATIQUE

IIID1. Préparation des substrats

Le DL-Glycéraldéhyde-3-Phosphate

100 mg de diéthyl acétal de DL-G3P (D.L-glycéraldéhyde-3-phosphate diéthylacétal, sel de monobarium ; Sigma Chemical) et 1,5 g de Dowex 50 dans 5 ml d'eau sont portés à 100°C au bain marie pendant 3 min pour hydrolyser l'acétal. Après décantation de la Dowex, le surnageant contenant 40 mM de DL-G3P est prélevé (dont 20 mM de D-G3P, seul énantiomère actif). La solution est précisément dosée enzymatiquement en présence de NAD, GAPDH et arsenate (rendant la réaction irréversible) en excès.

Le 1,3-diphosphoglycérate

Le 1,3dPG est synthétisé enzymatiquement par la GAPDH à partir de D-G3P et en présence de NAD et phosphate, l'équilibre de la réaction étant déplacé en faveur de la synthèse de 1,3dPG par l'addition de lactate déshydrogénase et de pyruvate (Furfine & Velick, 1965).

Le 1,3dPG est purifié sur colonne échangeuse d'anions DEAE Sépharose CL6B (portant des groupements diéthylammonium ethyl, Pharmacia). Il est élué par un gradient de KCl de 0 à 0,6 M dans du tampon Pipes 10 mM pH 7,1. Les fractions contenant le 1,3dPG pur sont dosées par test enzymatique avec la GAPDH, en présence de NADH et GAPDH en fort excès. La solution de 1,3dPG est conservée à -80°C.

Coenzymes

Ils sont fournis par Boehringer. NAD (free acid, grade I) et NADP (disodium salt, 98%) sont dissous dans du tampon Tris 100 mM, pH8, EDTA 0,2 mM. NADH (disodium salt, grade I) et NADPH (tetrasodium salt, 98%) sont dissous dans l'eau.

IIID2. Test d'activité

Test de Ferdinand dans le sens phosphorylation oxydative

Il se fait dans le tampon Ferdinand (KH₂PO₄ 50 mM, EDTA 0,2 mM, triéthanolamine 40 mM pH 8,9), en présence de NAD ou NADP, G3P, dans un volume final de 1 ml. La réaction est amorcée par ajout de l'extrait enzymatique.

Test dans le sens déphosphorylation réductive

Il se fait dans le tampon Pipes 10 mM pH 7,1 en présence de 1,3dPG et NADH dans un volume final de 1 ml. La réaction est amorcée par ajout de l'extrait enzymatique.

Les conditions de pH dans lesquelles les mesures sont faites (8,9 dans le sens oxydation, 7,1 dans le sens réduction) sont optimales pour la réaction catalysée par la GAPDH. Les concentrations en substrats et coenzymes sont choisies en fonction des paramètres cinétiques de chaque mutant, de façon à être saturantes (coenzyme et phosphate) ou optimales en cas d'inhibition par excès de substrat (G3P et 1,3dPG). L'apparition ou la disparition du NADH en fonction du temps, c'est-à-dire la vitesse de la réaction, est mesurée par la variation de DO à 340 nm.

L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en μ moles de NADH apparues ou disparues par minute et par unité de DO à 280 nm .

IV. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES

IVA. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES À L'ÉTAT STATIONNAIRE

Tous les paramètres cinétiques ont été mesurés à 22°C.

IVA1. Détermination des paramètres k_{cat} , K_M et K_i de la réaction

IVA1a. G3P, NAD(P), Pi

Les mesures sont faites dans le tampon de Ferdinand dans les conditions du test d'activité décrit ci-dessus (§IIIB3b). Dans le cas où l'on veut déterminer les paramètres cinétiques pour le phosphate inorganique Pi, le tampon utilisé est le même, sans phosphate. La concentration du substrat étudié est variable de 0,2 à 5 K_M , sauf quand la valeur de K_M est trop élevée pour que cette règle soit respectée. Le K_M (NAD(P)) des mutants étant en général sensiblement augmenté, il est nécessaire de travailler à fortes concentrations : pour éviter tout effet lié au pH, les solutions stock de NAD(P) ont été tamponnées et les concentrations en NAD(P) limitées à 7 mM.

Les concentrations en enzyme dépendent de l'activité spécifique de chaque mutant et sont choisies de façon à mesurer la vitesse initiale de la réaction quelle que soit la concentration en substrat variable. Elles se situent entre $4 \cdot 10^{-9}$ et $2 \cdot 10^{-7}$ N.

Les valeurs de k_{cat} ¹ et K_M sont déduites de 3 séries de mesures, en général par régression non linéaire sur l'équation de Michaelis-Menten.

IVA1b. NAD(P)H et 1,3dPG

Les conditions utilisées sont celles du test d'activité dans le sens déphosphorylation réductive décrit au § IIIB3b, et suivent les principes décrits au §IVA1a. Les constantes ont été déterminées graphiquement par représentation en double inverse ($\frac{1}{v}$ en fonction de $\frac{1}{[S]}$).

IVA1c. Détermination des constantes d'inhibition K_i

Les valeurs de K_i pour le NAD(P) ont été mesurées dans les conditions du test d'activité dans le sens déphosphorylation réductive en présence de NADH, puis déduites de la représentation en double inverse pour plusieurs concentrations fixes en NAD(P) ou de la représentation de Dixon ($\frac{1}{v}$ en fonction de $[NAD(P)]$).

¹Les valeurs de k_{cat} sont exprimées pour les 4 sites du tétramère (article 1) ou pour un site (article 2).

IVA2. Mesure de k_{cat} en fonction du pH

L'étude de la variation de la vitesse de la réaction en fonction du pH dans le sens de la phosphorylation oxydative a été réalisée dans un mélange de trois tampons, dont l'un est nécessairement du phosphate, substrat de la réaction, et dont les concentrations sont choisies de façon à éviter de fortes variations de force ionique (Ellis & Morrison, 1982) :

. Acetate (pKa=5,16)	30 mM
. Phosphate (pKa=6,5)	30 mM
. Tris (pKa=8,37)	120 mM

Les valeurs de pKa apparents des tampons utilisées sont celles des conditions de température et de force ionique de l'expérience. La gamme de pH couverte va de 5 à 9,5 par incréments de 0,3. Pour chaque valeur de pH, la force ionique du mélange est évaluée par mesure de la conductance, et ajustée à 100 mM (après étalonnage du conductimètre au NaCl) par ajout de KCl 3M. La vitesse de la réaction est mesurée dans les conditions des tests d'activité (§IIIB3b).

Nous avons ainsi montré pour l'enzyme sauvage et les mutants S et D32A-S que l'activité enzymatique (tampon Ferdinand) était effectivement optimale à pH 8,9, comme précisé au §IIIB3b.

IVB. ETUDE DES ÉTAPES DE LA RÉACTION

IVB1. Expériences en cinétique rapide

Les conditions de mesure de la vitesse du premier cycle enzymatique et de la vitesse de dissociation du NAD(P)H sont précisément décrites dans le chapitre "Materials and Methods" ainsi que dans la légende du tableau III de l'article 2 pp. 90-91.

IVB2. Analyse de l'étape de phosphorolyse

L'étude de la phosphorolyse (sens phosphorylation oxydative) repose sur l'utilisation d'accepteurs différents du thioacylenzyme, phosphate ou arsenate qui, si cette étape est limitante, doit affecter la constante catalytique k_{cat} de la réaction à l'état stationnaire. Dans le cas contraire, l'étape limitante doit nécessairement se situer à un autre niveau du mécanisme enzymatique.

V. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA GAPDH ET LE NAD(P)

VA. MARQUAGE D'AFFINITÉ PAR LE 3-CAPAD

Le 3-CAPAD (3-chloroacétylpyridine adénine dinucléotide) est un analogue structural du NAD où la fonction carboxamide est remplacée par une fonction chlorométhylcétone (figure 20 p. 63). Sa concentration est mesurée spectrophotométriquement en prenant pour coefficient d'extinction molaire à 258 nm $1,82 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Biellmann *et al.*, 1974).

Le 3-CAPAD se comporte sur la GAPDH de muscle d'Esturgeon et de *B. stearrowthermophilus* comme un marqueur d'affinité, présentant une cinétique d'inactivation de l'enzyme de pseudo-premier ordre (Branlant *et al.*, 1982a). Il forme un complexe non covalent dans le site du NAD de la GAPDH, et l'inactive par réaction de sa fonction chlorométhylcétone avec la Cys149 (Branlant *et al.*, 1982b) (figure 20 p. 63).

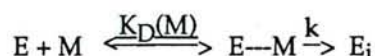
VA1. Protocole expérimental

L'apoenzyme sauvage, S (0,8 μN), D32A (1,2 μN) ou D32A-S (5 μN) est incubée à 22°C en tampon TES 0,1 M, EDTA 1 mM pH 8,4 en présence de 3-CAPAD en concentration variable de 0,5 à 5 K_D (3-CAPAD) (constante de dissociation du 3-CAPAD), sauf pour le mutant D32A-S pour lequel K_D (3-CAPAD) est trop élevé. A différents temps d'incubation, l'activité enzymatique résiduelle est dosée par test d'activité dans le sens oxydation.

L'effet protecteur du NAD(P) est mesuré à concentration fixe en 3-CAPAD (12, 58, 23 et 106 μM pour l'enzyme sauvage et les mutants S, D32A et D32A-S, respectivement). Dans le but de déterminer les constantes de dissociation K_D (NAD(P)), la concentration en NAD(P) varie de 0 à 4 K_D (NAD(P)) en général.

VA2. Interprétation cinétique

Le modèle cinétique de l'inactivation d'une enzyme par un marqueur d'affinité (Meloche, 1967) est le suivant : (M : marqueur d'affinité, At : activité résiduelle à l'instant t, E--M : complexe non covalent entre le marqueur et le site spécifique de l'enzyme, $[E]_t$: concentration en enzyme active à l'instant t, E_i : enzyme inactivée, $[E]_{\text{tot}}$: concentration totale en enzyme)



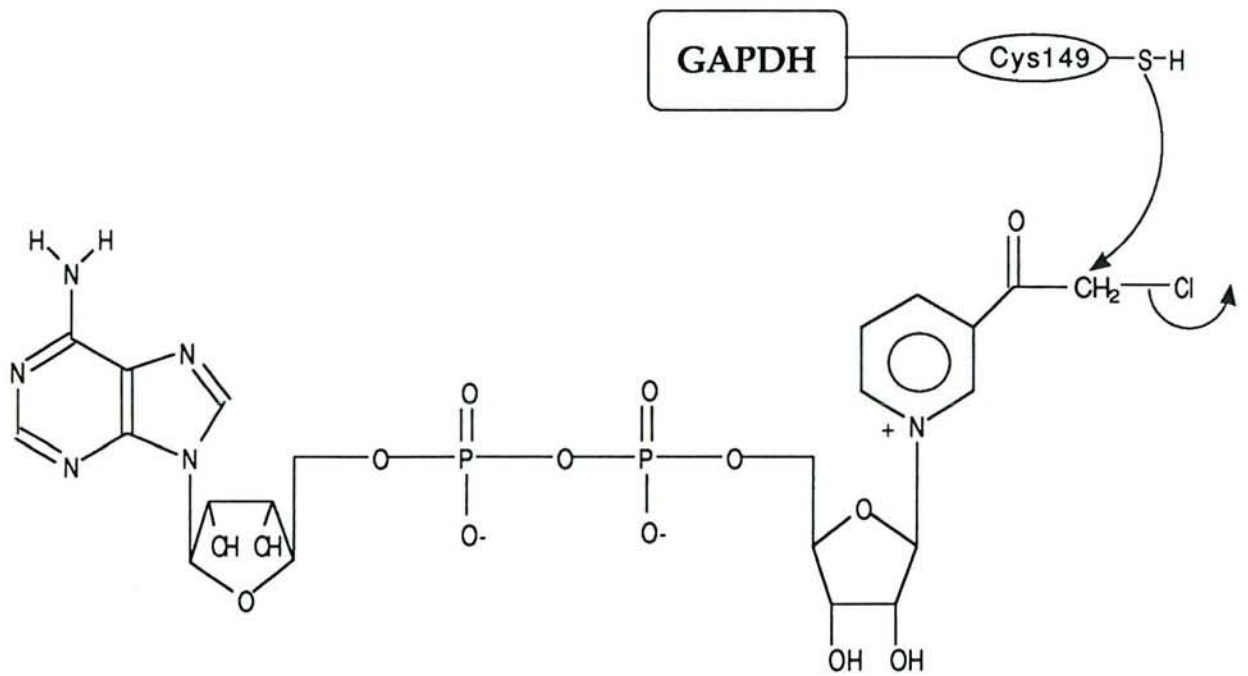


Figure 20 : Alkylation de la GAPDH par le 3-CAPAD

Il en découle la relation suivante :

$$\frac{d[E_i]}{dt} = k [E \cdots M]$$

or
$$K_D(M) = \frac{[E][M]}{[E \cdots M]}$$

$$\text{et } [E_i] = [E]_{\text{tot}} - ([E \cdots M] + [E])$$

En se plaçant dans des conditions telles que $[M] \gg [E]$ et $[M]$ soit constant, on en déduit que

$$\frac{d[E]}{[E]} = k \frac{[M]}{K_D(M) + [M]} dt$$

d'où
$$\ln \frac{[E]_0}{[E]_t} = \ln \frac{A_0}{A_t} = k_{\text{obs}} t$$

avec
$$k_{\text{obs}} = k \frac{[M]}{K_D(M) + [M]}$$

L'inactivation de l'enzyme suit donc une cinétique de pseudo-premier ordre dans ces conditions. Le tracé de $\ln \frac{A_0}{A_t}$ en fonction du temps permet de déterminer k_{obs} . Le tracé de $\frac{1}{k_{\text{obs}}}$ en fonction de $\frac{1}{[M]}$ permet de déterminer k et $K_D(M)$.

En présence du coenzyme ou d'un analogue de substrat S formant un complexe non covalent avec l'enzyme, avec une constante de dissociation $K_D(S)$ (expériences de compétition) :



la constante de vitesse d'inactivation devient :

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k} \left(1 + \frac{K_D(M)}{[M]} \right) + \frac{1}{k} \frac{K_D(M)}{[M]} \frac{[S]}{K_D(S)}$$

Le tracé de $\frac{1}{k_{\text{obs}}}$ en fonction $[S]$ permet de déterminer $K_D(S)$.

VB. MESURE DE L'AFFINITÉ DU NAD(P) PAR EXTINCTION DE FLUORESCENCE DE LA PROTÉINE

L'extinction de fluorescence du Tryptophane par le NAD est une méthode de mesure et de comparaison de l'efficacité de la fixation du cofacteur à la GAPDH (Kelemen *et al.*, 1975 ; Branlant *et al.*, 1983 ; Corbier *et al.*, 1990).

Cette méthode a été utilisée pour déterminer les constantes de dissociation du NAD(P) des 4 sites des GAPDH sauvages et mutées K_1 à K_4 , en mesurant l'effet d'additions successives de NAD(P) sur l'intensité de fluorescence de l'apo-protéine à 330 ou 350 nm (le maximum du spectre d'émission se situant à 330 nm), la longueur d'onde d'excitation étant réglée à 295 ou 298 nm (où seuls les tryptophanes absorbent). Les spectres de fluorescence ont été réalisés sur un spectrofluorimètre Perkin Elmer MPF 66, en collaboration avec le Laboratoire de Biophysique (Dr Mély et Pr Gérard, ULP Strasbourg). Les concentrations de NAD et NADP ont été déterminées spectrophotométriquement en utilisant pour coefficient d'extinction molaire à 259 nm les valeurs $1,78 \cdot 10^4$ et $1,80 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivement. Les solutions de protéines et de cofacteur sont diluées extemporanément dans du tampon Tris 100 mM pH 8, EDTA 0,2 mM. La concentration précise en protéine est déduite d'un spectre d'absorption entre 240 et 400 nm à chaque expérience.

Diverses corrections sont apportées aux intensités mesurées :

- pour la dilution liée à l'addition de NAD(P),
- pour l'effet d'écran dû à l'absorption du NAD(P), sensible en particulier aux fortes concentrations (Helene *et al.*, 1971). Si DO_m et DO_{th} représentent respectivement l'absorbance de la solution de GAPDH en présence et en absence de cofacteur (corrigée de la dilution) à la longueur d'onde d'excitation et si I_F représente l'intensité de fluorescence alors la valeur corrigée est déduite de la valeur mesurée par la relation suivante :

$$I_{F\text{corrigée}} = I_{F\text{mesurée}} \cdot \frac{DO_m}{DO_{th}} \cdot \frac{1-10^{-DO_{th}}}{1-10^{-DO_m}}$$

- pour l'émission RAMAN, en soustrayant l'intensité de fluorescence du tampon de celle de l'échantillon,
- pour un effet lié probablement à la liaison aspécifique du NAD(P) à la protéine, observé de façon sensible aux fortes concentrations en NAD(P), et linéaire par rapport à la concentration en cofacteur (figure 21 p. 66). La fluorescence I_F associée à la saturation des sites spécifiques au cofacteur est ainsi déduite de la valeur mesurée I_{Fm} par la relation $I_F = I_{Fm} + a[\text{NAD(P)}]_t$, a étant déterminé lors d'expériences effectuées à forte concentration en protéine et cofacteur.

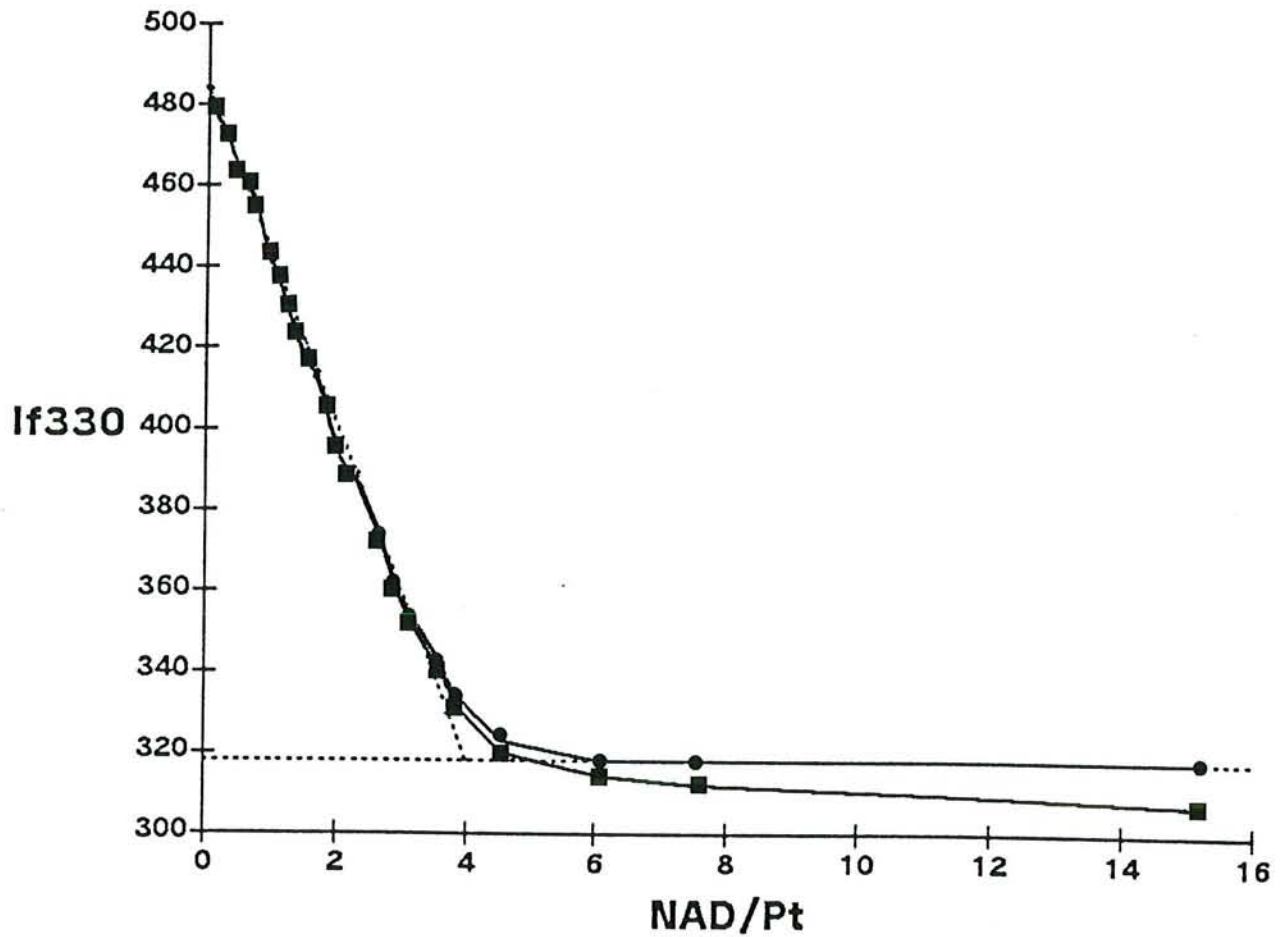


Figure 21 : Titration stœchiométrique de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sauvage par le NAD, suivie par fluorescence

L'intensité de fluorescence à 330 nm (If330) est portée en fonction du rapport du nombre de moles de NAD ajouté par mole de tétramères de GAPDH (15 μ M). Les points et les carrés représentent respectivement les intensités de fluorescence corrigée et non corrigée de la liaison aspécifique. La décroissance de la fluorescence intrinsèque de la protéine est linéaire, indiquant que la liaison d'un NAD à chaque site provoque une diminution de fluorescence équivalente, et atteint un plateau pour 1 NAD par site.

La méthode d'analyse des données permettant la détermination des constantes macroscopiques de dissociation du NAD(P) aux 4 sites de l'enzyme est décrite dans le chapitre "Materials and Methods" de l'article 2 p. 90. La constante de dissociation moyenne \overline{K} est calculée par la relation $\overline{K} = (K_1 K_2 K_3 K_4)^{1/4}$.

VC. MISE EN ÉVIDENCE DE LA BANDE DE RACKER

L'apparition de la bande d'absorption lors de la liaison du NAD(P) à la GAPDH est détectée par spectrophotométrie différentielle, dans deux cuves à double compartiment de trajet optique 0,438 cm. Le compartiment avant des deux cuves référence et échantillon contient l'apoenzyme diluée dans du tampon Tris 100 mM pH 8, EDTA 0,2 mM, le compartiment arrière contenant le tampon seul. La concentration précise en protéine est déduite d'un spectre d'absorption à chaque expérience.

Le coenzyme est ensuite ajouté dans le compartiment avant de la cuve échantillon et dans le compartiment arrière de la cuve de référence, permettant de corriger le spectre de l'absorption liée au cofacteur libre. Un volume identique de tampon est ajouté dans la solution enzymatique de référence pour annuler l'effet de la dilution. Un spectre d'absorption est enregistré entre 300 et 500 nm pour chaque concentration en NAD(P) et permet de mesurer l'intensité maximale de l'absorbance, vers 370 nm. Les concentrations d'enzyme choisies, d'environ 10 μ M, assurent une fixation stœchiométrique du cofacteur au tétramère.

La valeur du coefficient d'extinction molaire moyen par site est calculée à saturation des 4 sites. Dans le cas de mutants peu affines, la courbe de titration peut présenter une déviation de linéarité, liée à la faible capacité de liaison des 3^{ième} et 4^{ième} sites pour le cofacteur. Dans ce cas, l'absorption à saturation est extrapolée à partir de la portion linéaire de la courbe.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Les paragraphes I à IV de ce chapitre présentent l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail, qui sont pour la plupart développés dans les articles 1 et 2.

I. Production et purification de la GAPDH.....	68
II. Identification de déterminants de spécificité de cofacteur appartenant à la structure quaternaire.....	68
III. Analyse du rôle de résidus appartenant à la structure tertiaire.....	71
IV. Existe-t-il une relation entre l'efficacité enzymatique, l'affinité pour le cofacteur et la transition apo→holo ?.....	76
V. Article 1.....	82
VI. Article 2.....	88

I. PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA GAPDH

Les souches d'*E.coli* W3CG ou DS113, dont le gène chromosomique *gapA* est interrompu par un transposon ou délété, respectivement, ne peuvent pas produire de GAPDH endogène. Après transformation par le plasmide pBR322 portant le gène de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, elles surexpriment cette GAPDH par rapport aux autres protéines cellulaires, comme le montre l'analyse du surnageant de sonication sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (figure 22 p. 69). Les taux d'expression des enzymes sauvages et mutées sont les mêmes, soit environ 80 mg d'enzyme par litre de culture (dont la DO à 700 nm atteint 1,5) dans le surnageant de sonication. Le tableau 2 résume les activités spécifiques et les rendements obtenus à chaque étape de la purification de la GAPDH sauvage, les rendements de purification des GAPDH mutées étant comparables à ceux de l'enzyme sauvage. Les trois étapes de purification permettent d'obtenir environ 30 mg d'holoenzyme purifiée à homogénéité par litre de culture (figure 22), soit 30 à 40% de rendement pour l'ensemble de la purification (tableau 2 p. 69), l'étape de préparation de la forme apoenzyme ayant ensuite un rendement de 50%.

II. IDENTIFICATION DE DÉTERMINANTS DE SPÉCIFICITÉ DE COFACTEUR APPARTENANT À LA STRUCTURE QUATERNAIRE

IIA. MISE EN ÉVIDENCE DE DÉTERMINANTS DANS LA S-LOOP

Le travail présenté dans l'article 1 p. 82 repose à la fois sur la comparaison de la séquence primaire de la GAPDH glycolytique NAD-dépendante de *B. stearothermophilus* avec celles de GAPDH d'origine chloroplastique à dualité de cofacteur NAD et NADP (tableau I article 1 p. 82), et sur la simulation graphique de la liaison du NADP à l'holostructure de l'enzyme bactérienne (figure I article 1 p. 83). Ces deux types d'enzymes présentent en effet plus de 55% d'identité de séquence, ce qui permettait de proposer des hypothèses raisonnables quant aux déterminants de spécificité de cofacteur potentiels. Ainsi, nous avons pu prédire que la liaison du groupement 2'-phosphate du NADP à la GAPDH NAD-dépendante serait défavorisée par encombrement stérique du groupement 2'-phosphate avec deux résidus de la S-loop appartenant à la sous-unité symétrique par rapport à l'axe R, la Leu 187 et la Pro188. Leur substitution, par mutagenèse dirigée, par les résidus existant dans la séquence des GAPDH chloroplastiques, Ala et Ser respectivement (mutant S), a permis d'obtenir une enzyme active avec le NADP et le NAD (tableau II article 1 p. 84).

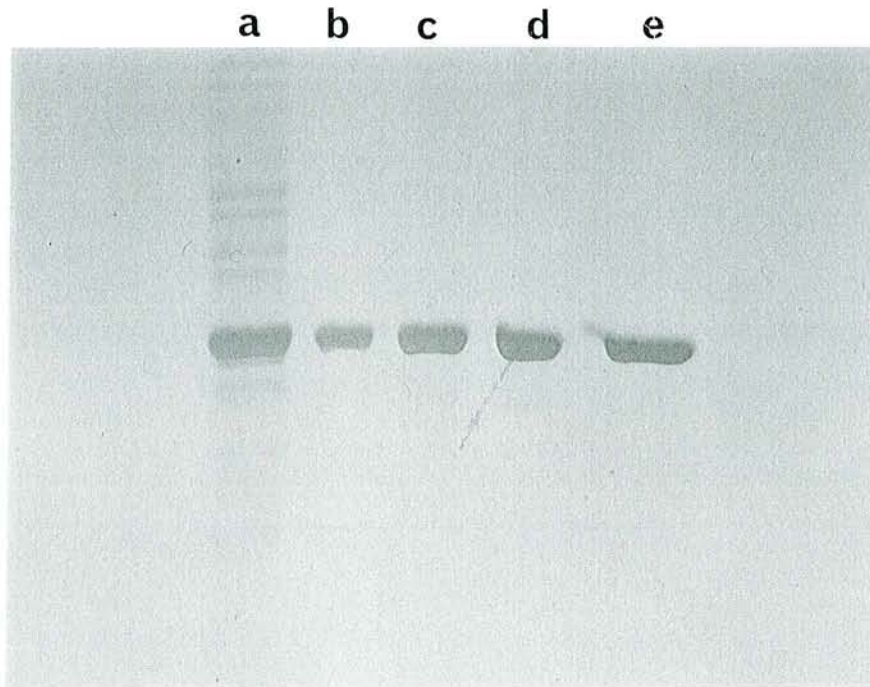


Figure 22 : Analyse des étapes de purification de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, révélé par coloration argentique

a : Surnageant de sonication ; b : Culot de précipitation à 88% ; c : Solution de GAPDH après filtration sur gel ; d : Solution de GAPDH après chromatographie d'échange d'anions ; e : Apo GAPDH

La quantité de matériel déposée dans le puits a (estimée par la DO à 280 nm) correspond à 10 fois celle déposée dans les autres puits.

Etape de la purification	$\frac{DO\ 280nm}{DO260nm}$	Activité Spécifique ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{DO}\ 280nm^{-1}$)	Quantité estimée de GAPDH (mg)	Rendement (%)
Surnageant de sonication	0,6	8,5	82	100
Culot de précipitation à 88% en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{2-}$	0,8	64,0	70	85
Filtration sur gel ACA34	1,05	91,5	40	49
Chromatographie d'échange d'anions Sépharose Q	1,4	100,0	32	39
Traitement au charbon activé	1,8	100,0	16	20

Tableau 2 : Activités spécifiques et rendements obtenus pour 1 litre de culture au cours de la purification de la GAPDH sauvage de *B. stearothermophilus*

Dans le but de déterminer l'affinité réelle de la GAPDH pour le cofacteur, nous avons adopté deux approches expérimentales complémentaires : la mesure de l'effet protecteur du NAD(P) vis-à-vis d'un marqueur d'affinité, le 3-CAPAD, permet de déterminer une constante de dissociation macroscopique du NAD(P), $K_D(\text{NAD(P)})$ (tableau V article 2 p. 92), alors que la mesure de l'atténuation de fluorescence intrinsèque de la GAPDH due à la fixation du NAD(P) permet de déterminer les constantes de dissociation du cofacteur des 4 sites du tétramère, K_1 à K_4 et de définir une constante moyenne \overline{K} égale à $(K_1K_2K_3K_4)^{1/4}$ (tableau IV article 2 p. 92). Ainsi, nous avons montré que l'affinité du mutant S pour le NADP demeurait inférieure à celle de l'enzyme sauvage pour le NAD d'un facteur 1000 environ, d'après la comparaison des valeurs de K_1 , K_2 et \overline{K} . Des déterminants structuraux autres que quaternaires devraient donc être à l'origine de la spécificité de cofacteur des GAPDH chloroplastiques.

IIB. ETUDE RADIOCRISTALLOGRAPHIQUE DE LA STRUCTURE DU MUTANT S

Dans le but de préciser les autres facteurs moléculaires responsables de la spécificité de cofacteur, nous avons entrepris, en collaboration avec l'équipe du Dr Wonacott, l'étude de la structure du complexe S-NADP (Wonacott, communication personnelle). Elle a été déterminée à une résolution de 2,7 Å avec un facteur cristallographique R de 16% pour le modèle final.

Le domaine du coenzyme du mutant avec le NADP présente une conformation légèrement plus "ouverte" que celui de l'enzyme sauvage avec le NAD, qui résulte d'une rotation de ce domaine par rapport au domaine catalytique de seulement 1,5° en moyenne pour les 4 sous-unités. Lors de la transition apo→holo complète de la GAPDH sauvage avec le NAD, l'angle de rotation moyen atteint 4,3° (Leslie & Wonacott, 1984). La comparaison des sites de liaison du cofacteur dans les deux structures révèle que le NADP est lié selon une géométrie très semblable à celle du NAD, en particulier au niveau du nicotinamide. Les différences se situent au niveau de l'adénosine, qui reste liée à la structure partiellement apo du domaine de coenzyme.

L'effet global des mutations Leu187→Ala, Pro188→Ser consiste essentiellement en la suppression de l'encombrement stérique avec le 2'-phosphate du NADP, et la création d'un site plus hydrophile, ce qui est en accord avec les prédictions déduites de la simulation de la structure du mutant. Cependant, on n'observe aucune liaison H directe entre le 2'-phosphate et la protéine. La densité électronique correspondant à l'atome d'oxygène de la chaîne latérale de la Ser188 est mal définie, ce qui indique qu'il n'occupe pas une position fixe. Il est peut-être lié par liaison H à la Thr34 (figure 23 p70), et est probablement impliqué dans des interactions indirectes avec le 2'-phosphate, par l'intermédiaire de molécules d'eau mal structurées autour de ce groupement.

La structure tridimensionnelle du complexe S-NADP révèle également que la charge négative de l'Asp32 produit une interaction énergétiquement défavorable avec le 2'-phosphate. Ceci avait d'ailleurs été prédit lors de la simulation de la liaison du NADP à l'holostructure (figure 1 article 1 p. 83). En effet, ce groupement est orienté vers le solvant, l'angle dièdre (AC1', AC2', AO2', AP2') mesurant $+145^\circ$ (figure 23 p. 72) et il subit en outre des vibrations thermiques plus intenses que le reste de la molécule de NADP, comme l'indique son facteur de température B de $49,3 \text{ \AA}^2$ par rapport à la valeur moyenne de $29,4 \text{ \AA}^2$ pour le NADP. De plus, la distance entre les atomes AO2' du cofacteur et OD2 de l'Asp32 est de $3,2 \text{ \AA}$ contre $2,6 \text{ \AA}$ dans la structure de la GAPDH sauvage avec NAD. Seules subsistent les liaisons H entre l'Asp32 (atome OD1) et la Phe8 (groupement NH peptidique) et l'Asp32 (atome OD2) et l'hydroxyle en 3' du ribose (figure 23). La liaison de l'Asp32 avec la Leu33, qui n'existe que dans la forme holo de l'enzyme sauvage, n'est pas maintenue dans cette structure partiellement apo.

La faible affinité du mutant S pour le NADP doit donc s'expliquer par l'existence d'autres antidéterminants structuraux n'appartenant pas à la structure quaternaire. En particulier, comment peut-on concilier la présence du résidu Asp32, dont le rôle dépendrait de la structure tertiaire, et qui est conservé dans les GAPDH chloroplastiques, avec une fixation efficace du NADP et de son 2'-phosphate ?

III. ANALYSE DU RÔLE DE RÉSIDUS APPARTENANT À LA STRUCTURE TERTIAIRE

La comparaison des séquences montre en effet que le résidu Asp32 est conservé dans toutes les GAPDH chloroplastiques connues (tableau I article 2 p. 89). La présence de ce résidu est donc compatible avec une bonne fixation du NAD(P). Ceci nous a amenés à essayer de définir plus précisément le rôle d'acides aminés présents dans le site du cofacteur grâce au repliement tertiaire de la protéine et qui participeraient à la reconnaissance du 2'-phosphate du NADP.

Des résidus du site de l'adénosine appartenant à la boucle $\beta_B\text{-}\alpha_C$ (résidus 33 à 35) pourraient contribuer à la spécificité de cofacteur et ont été analysés dans la Discussion de l'article 1 p. 86. La substitution du résidu Leu33 par une Thr, résidu existant dans les enzymes chloroplastiques, pourrait permettre de stabiliser le NADP par liaison H directe ou indirecte avec le 2'-phosphate (figure 24 p. 73). En outre, l'existence de deux glycines aux positions des résidus Thr34 et Asp35 pourrait donner à la boucle 33-35 plus de flexibilité et promouvoir le changement conformationnel de la boucle $\beta_B\text{-}\alpha_C$ associé à la transition apo→holo lors de la liaison du NADP (cf Introduction §IVC1b p. 33). Les trois substitutions Leu33→Thr, Thr34→Gly, Asp35→Gly (mutation B) ont été réalisées

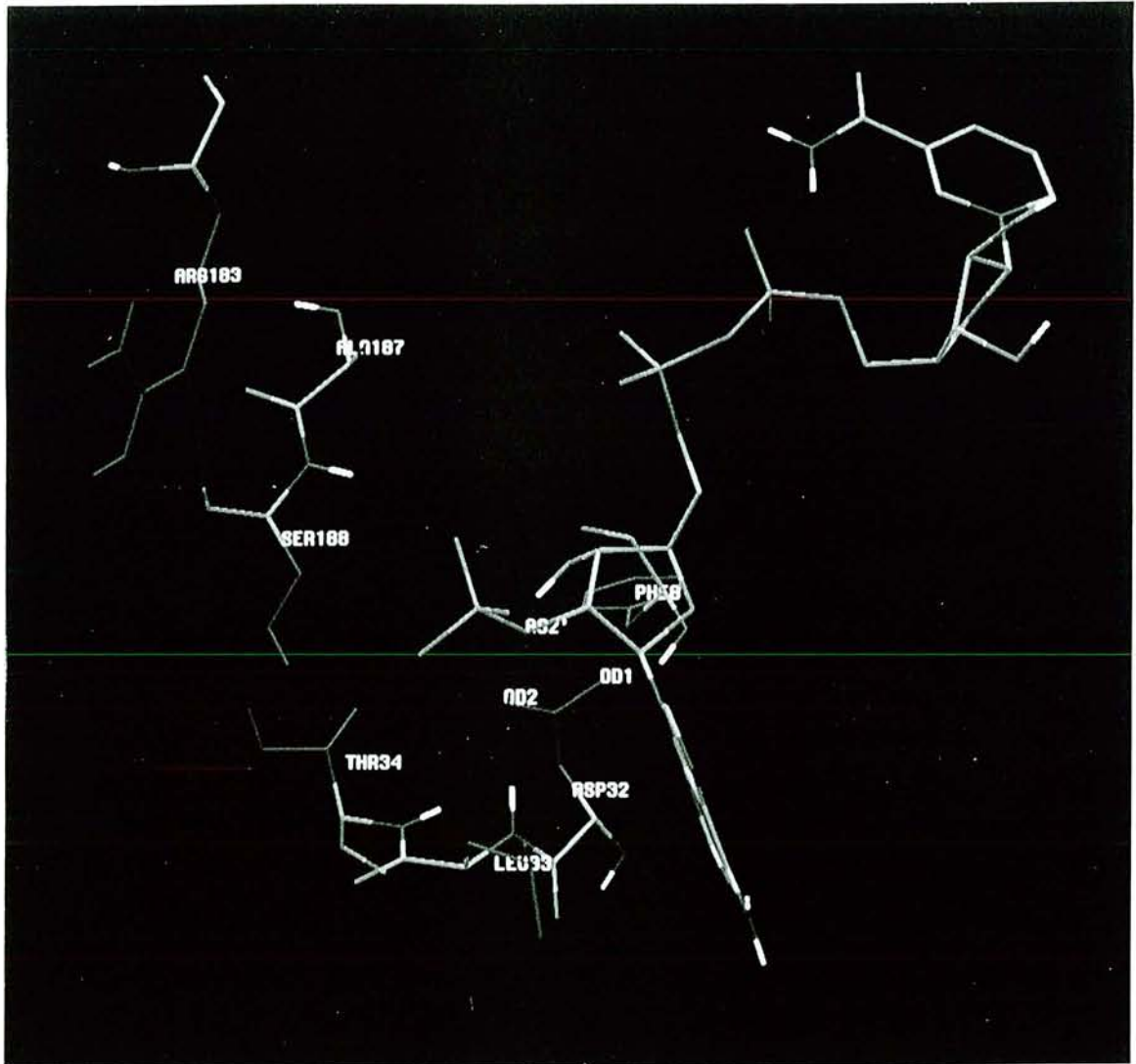


Figure 23 : Le site de fixation du NADP à la GAPDH de *B. stearothermophilus* portant la mutation S (Leu187→Ala, Pro188→Ser) (Wonacott, communication personnelle)

Le NADP et les chaînes principales des acides aminés sont représentés en couleurs atomiques conventionnelles (C, vert, O, rouge, N, bleu, P, rose, H, blanc). Seuls les atomes d'hydrogène polaires sont représentés. Les chaînes latérales des acides aminés sont en bleu foncé.

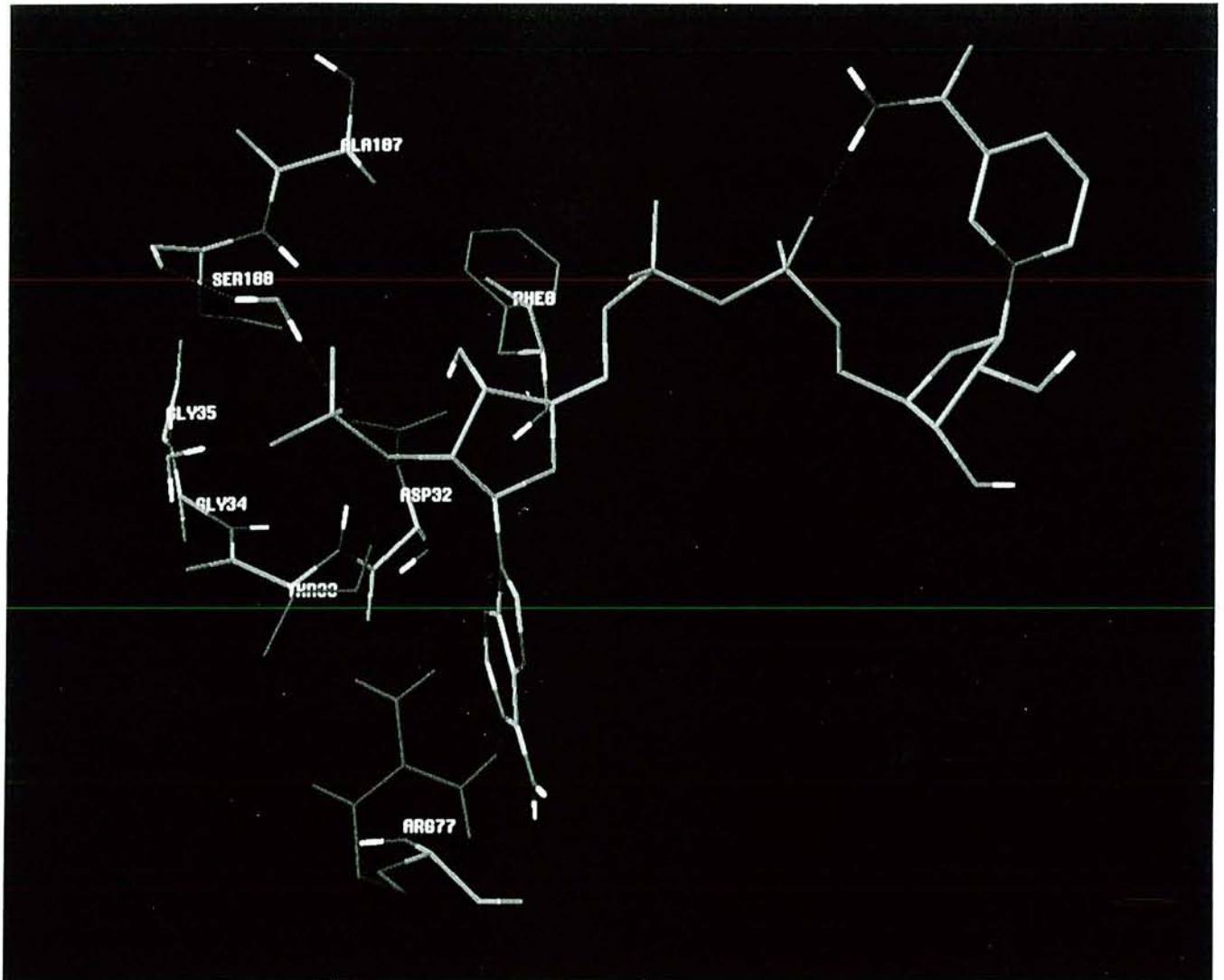


Figure 24 : Simulation de la liaison du NADP à la GAPDH de *B. stearothermophilus* portant les mutations B-S (Leu33→Thr, Thr34→Gly, Asp35→Gly, Leu187→Ala, Pro188→Ser)

La partie adénosine du NADP et les chaînes principales des acides aminés sont représentés en couleurs atomiques conventionnelles (C, vert, O, rouge, N, bleu, P, rose, H, blanc). Seuls les atomes d'hydrogène polaires sont représentés. Les chaînes latérales des acides aminés sont en bleu foncé.

conjointement à la mutation S. De plus, dans le but d'étudier la contribution du résidu Asp32 à la liaison du cofacteur, nous avons choisi d'effectuer les mutations suivantes, en les combinant éventuellement à la mutation S :

- . Asp32→Asn (mutant D32N), l'Asn étant un résidu isostère à l'Asp, dont la chaîne latérale porte un groupement CO pouvant maintenir une partie du réseau de liaisons H dans lequel l'Asp32 est impliqué (cf Introduction §IVC1a p. 31) ; il est dénué de charge, ce qui permettra de mesurer l'importance des effets électrostatiques de ce dernier ;

- . Asp32→Gly, Ala, Glu (mutants D32G, D32A, D32E) afin d'analyser, en plus des effets électrostatiques, les effets stériques de ce résidu.

L'étude des propriétés de ces mutants est présentée dans l'article 2 p. 88. La contribution des résidus de la boucle β_B - α_C testée grâce à la mutation B ne permet pas d'expliquer comment le groupement 2'-phosphate est stabilisé en présence du résidu Asp32 lors de la liaison du NADP à la GAPDH chloroplastique.

En revanche, l'étude des GAPDH mutées en position 32 confirme que la répulsion électrostatique entre le 2'-phosphate et la chaîne latérale de l'Asp32 pourrait en partie expliquer l'absence d'activité de la GAPDH NAD-dépendante avec le NADP. De plus, il apparaît que l'affinité de la GAPDH pour le NADP augmente à mesure que l'encombrement stérique du site de liaison du 2'-phosphate est réduit. Ces résultats ont été confirmés par des études complémentaires non publiées sur les mutants D32G et D32G-S. La comparaison des constantes de dissociation du NAD(P) de ces deux mutants avec celles de l'enzyme sauvage et des mutants D32A, S et D32A-S (tableau 3 p. 75) confirme que plus on réduit l'encombrement stérique des résidus aux positions 32, 187 ou 188, plus l'affinité de la protéine pour le NADP augmente. Cet effet est plus sensible entre les mutants S, D32A-S et D32G-S, pour lesquels K_1 diminue successivement d'un facteur 30 puis 20, qu'entre l'enzyme sauvage, D32A et D32G, pour lesquels K_1 diminue d'un facteur 2,5 puis 3,7. Ceci suggère que le rôle du résidu en position 32 ne se révèle que si d'autres contraintes sont supprimées aux positions 187 et 188. De plus, il semble absolument nécessaire de libérer le site de tout encombrement stérique pour assurer la force de la liaison. En effet, seul le mutant D32G-S présente une affinité pour le NADP comparable à celle de l'enzyme sauvage pour le NAD. Vis-à-vis du NAD, l'affinité des enzymes mutées varie généralement de façon inverse, à l'exception du mutant D32G-S.

Enfin, nous proposons que le résidu en position 32 et, plus généralement, le sous-site de liaison de l'adénosine, possèdent un rôle déterminant dans l'expression des propriétés de coopérativité positive ou négative de la GAPDH vis-à-vis de la liaison du NAD.

Enzyme	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	\overline{K}
	Constantes de dissociation macroscopiques du NAD (μM)				
Sauvage*	0,04 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,45 ± 0,2	1,3 ± 0,6	0,26 ± 0,07
S*	0,30 ± 0,06	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	19 ± 1	1,5 ± 0,2
D32A*	0,27 ± 0,08	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,2	500 ± 200	3,0 ± 0,8
D32G	140 ± 30	370 ± 80	230 ± 90	770 ± 400	310 ± 100
D32A-S*	40 ± 20	300 ± 100	1700 ± 900	420 ± 90	300 ± 100
D32G-S	8,3 ± 2,8	22 ± 3	33 ± 7	180 ± 80	32 ± 9
	Constantes de dissociation macroscopiques du NADP (μM)				
Sauvage*	180 ± 10	360 ± 80	1400 ± 900	400 ± 100	440 ± 90
S*	40 ± 20	150 ± 70	2000 ± 1000	400 ± 200	250 ± 100
D32A*	70 ± 40	390 ± 20	800 ± 500	440 ± 90	310 ± 80
D32G	19 ± 10	56 ± 19	210 ± 80	290 ± 180	90 ± 40
D32A-S*	1,4 ± 0,4	10 ± 5	350 ± 40	1700 ± 300	55 ± 10
D32G-S	0,07 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,27 ± 0,07	4 ± 2	0,4 ± 0,1

Tableau 3 : Constantes de dissociation macroscopiques du NAD(P) pour les 4 sites des GAPDH de *B. stearotherophilus* sauvage et mutées, déterminées par atténuation de fluorescence

Les valeurs indiquées sont des moyennes exprimées en μM ± la déviation standard. La constante de dissociation moyenne est calculée par la relation $\overline{K} = (K_1 K_2 K_3 K_4)^{1/4}$.

* Valeur tirée de l'article 2

IV. EXISTE-T-IL UNE RELATION ENTRE L'EFFICACITÉ ENZYMATIQUE, L'AFFINITÉ POUR LE COFACTEUR ET LA TRANSITION APO→HOLO ?

IVA. EFFICACITÉ ENZYMATIQUE ET AFFINITÉ

L'efficacité enzymatique k_{cat}/K_M des différentes GAPDH (tableau II de l'article 2 p. 91 et tableau 4 p. 77) est généralement corrélée à l'affinité de l'enzyme pour le cofacteur, mesurée par les constantes de dissociation K_1 , K_2 et \bar{K} (tableau IV de l'article 2 p. 92 et tableau 3 p. 75). Les triples mutations D32A-S et D32G-S entraînent une inversion de la spécificité de cofacteur en faveur du NADP, les enzymes mutées étant 2 et 4 fois plus efficaces avec le NADP qu'avec le NAD, respectivement. C'est pour le mutant D32G-S que les valeurs maximales d'efficacité enzymatique et d'affinité sont observées, mais avec un rapport k_{cat}/K_M demeurant 33 et 55 fois inférieur à celui de l'enzyme glycolytique sauvage avec le NAD et de l'enzyme chloroplastique avec le NADP, respectivement. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les mutations provoquent un changement de l'étape limitante de la réaction.

IVB. ETAPE LIMITANTE ET TRANSITION APO→HOLO

L'analyse du mécanisme enzymatique des GAPDH sauvage et mutées en S et D32A-S nous a conduit à proposer (article 2) que ces mutations affectent l'étape limitante de la réaction, qui serait associée au relargage du NADH pour l'enzyme sauvage, et à la liaison du cofacteur oxydé à l'acylenzyme pour les mutants (figure 15 p. 37). Ce changement pourrait résulter d'une isomérisation conformationnelle incomplète de l'enzyme.

IVB1. Mesure de la bande de Racker

Nous avons utilisé l'intensité de cette bande d'absorption comme sonde indicatrice du bon positionnement du cofacteur dans le site protéique et donc de l'efficacité de la transition conformationnelle apo→holo. En effet, la bande de Racker résulte d'une interaction entre la Cys149 et le cycle pyridinium du NAD(P) (cf Introduction §IVC3 p. 36). Le fait que la liaison du NADP au mutant S ne provoque qu'un changement conformationnel partiel et que la bande de Racker correspondante ne soit qu'à 55% de sa valeur maximale suggérerait qu'il existe une corrélation entre changement conformationnel et intensité de la bande de Racker. Nous avons donc utilisé la mesure de la bande de Racker avec le NAD et le NADP pour évaluer les effets des mutations sur cette transition conformationnelle.

Enzyme	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
D32G D32G-S	Paramètres cinétiques en présence de NAD		
	0,4 1,3	6 6	15 5
D32G D32G-S	Paramètres cinétiques en présence de NADP		
	2,1 0,9	22 19	10,5 21

Tableau 4 : Paramètres cinétiques pour le NAD et le NADP des GAPDH de *B. stearothermophilus* mutées D32G et D32G-S

La vitesse initiale de la réaction est mesurée à 22°C, dans le tampon Ferdinand (triéthanolamine 40 mM, K₂HPO₄ 50 mM, EDTA 0,2 mM, pH8,9). La concentration en G3P est fixe. Chaque valeur est une moyenne d'au moins 3 mesures, la déviation standard étant inférieure à 20%.

Les résultats d'une expérience typique de titration des sites de la GAPDH par la bande de Racker sont représentés figure 25 p. 79 et les valeurs moyennes du coefficient d'extinction molaire par site pour l'enzyme sauvage et 5 des mutants sont comparées à leur constante de dissociation K_1 dans le tableau 5 p. 80. Il existe une bonne corrélation entre K_1 et l'intensité de la bande de Racker, ce qui suggère que l'affinité des GAPDH, pour le NADP en particulier, serait une conséquence de l'efficacité de la transition conformationnelle apo→holo, que favoriseraient graduellement les mutations D32A, S, B-S, D32A-S et D32G-S. En effet, nous observons une augmentation de la bande de Racker de 0 à $1060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour ces différentes mutants. L'hypothèse formulée au §III quant à l'effet des résidus Thr33, Gly34 et Gly35 sur la transition conformationnelle avec le NADP ne semble guère vérifiée. En effet, la mutation B n'affecte que faiblement la bande de Racker avec le NADP, dont la valeur passe de $600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour le mutant S à $720 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour le mutant B-S.

En présence de NAD, les modifications du site du cofacteur, dans le même ordre que ci-dessus, défavoriseraient l'transition apo→holo avec des conséquences inverses sur l'affinité. Nous devons cependant admettre dans ce cas que la bande de Racker n'est pas sensible à toutes les modifications fines affectant cette transition, étant donné que les mutants D32A, S et B-S présentent une bande de Racker avec le NAD équivalente à celle de l'enzyme sauvage.

IVB2. Conséquences sur le mécanisme enzymatique

Les valeurs de la bande de Racker (tableau 5 p. 80) semblent également corrélées aux constantes de vitesse de dissociation apparentes du NAD(P)H k_{off} (tableau III article 2 p. 91) :

La mutation D32A-S provoque une augmentation du k_{off} du NAD(H) d'un facteur 4,5 et une diminution de la bande de Racker d'un facteur 2,6 alors que la mutation S affecte peu ces deux paramètres. Ceci suggère que la transition apo→holo induite par le NAD(H) sur le mutant D32A-S est moins complète que sur le mutant S (cf §IVB1), ce qui faciliterait le relargage du cofacteur et expliquerait l'augmentation du k_{off} . Dans l'hypothèse où ces résultats peuvent être transposés au complexe ternaire acylenzyme-NADH, comme nous le proposons dans l'article 2, on peut conclure que la vitesse de relargage du NADH n'est plus limitante dans le processus enzymatique, à l'inverse du type sauvage. De plus, la vitesse de l'étape suivante de liaison du NAD à l'acylenzyme (figure 15 p. 37) pourrait être ralentie par une transition apo→holo moins efficace, ce qui expliquerait qu'elle devienne limitante pour la réaction enzymatique globale.

En présence de NADP, nous pouvons appliquer le raisonnement inverse : la substitution D32A sur le mutant S favoriserait la transition apo→holo, conduisant à une conformation "plus" holo, comme le suggère l'augmentation de la bande de Racker (cf §IV). Il en résulterait une diminution de la vitesse de relargage apparente du NADPH k_{off} de 226 à 133 s^{-1} pour les mutants S et D32A-S, respectivement (tableau III article 2 p. 91). Le fait que les mutants D32A-S et D32G-S présentent une bande de Racker proche de la valeur maximale $1100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ suggère que la mesure de cette bande

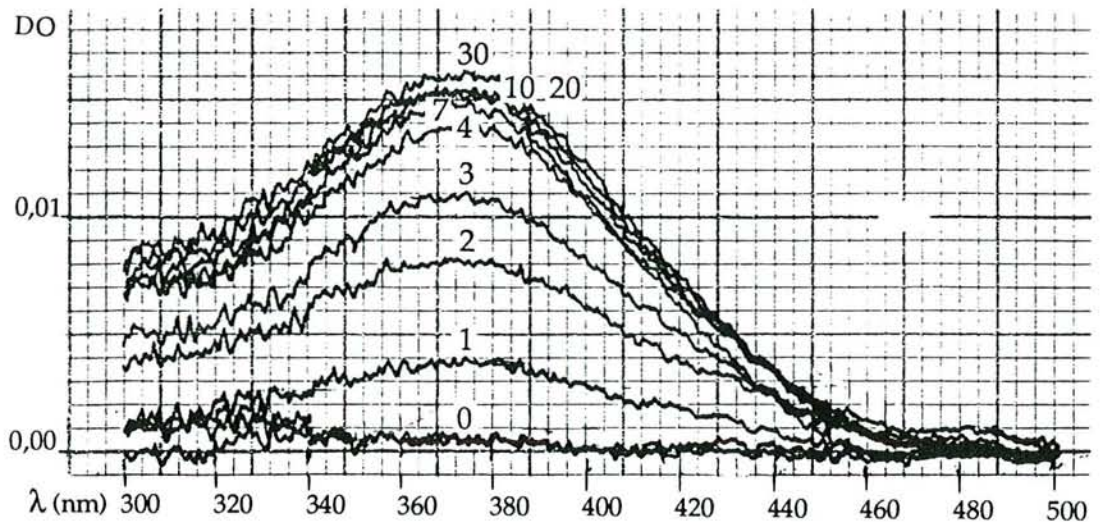


Figure 25A : Spectres d'absorption différentielle de la GAPDH de *B. stearothermophilus* D32G-S sous forme apo (0) et en présence de 1, 2, 3, 4, 7, 10, 20 et 30 moles de NADP par mole de tétramère
La concentration en protéine est de $8 \mu\text{M}$ dans cette expérience.

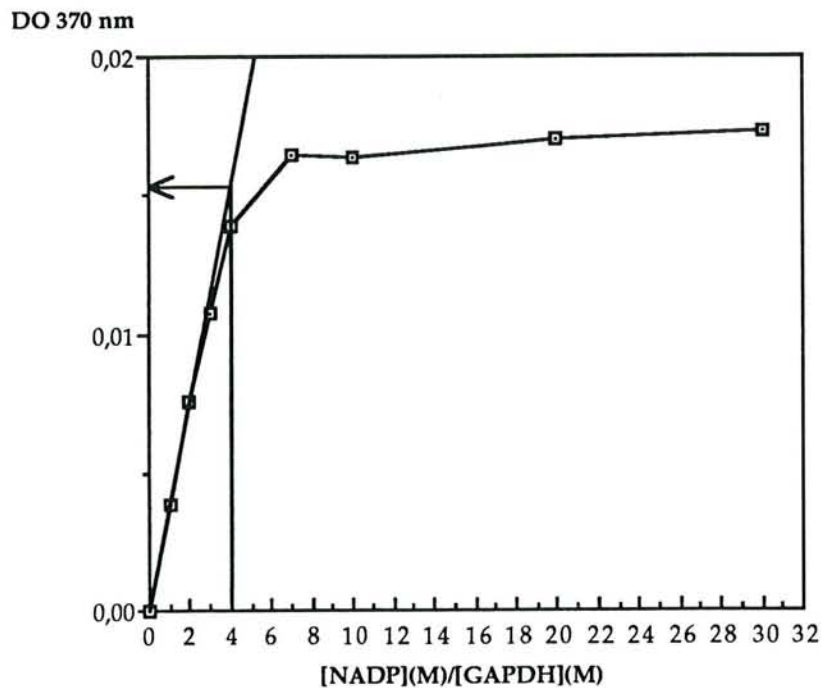


Figure 25B : Titration de la GAPDH D32G-S par le NADP, suivie par spectrophotométrie différentielle

L'intensité maximale de la bande d'absorption, vers 370 nm, est portée en fonction du nombre de moles de NADP par mole de tétramère de GAPDH. Elle augmente linéairement et présente une rupture de pente pour 1 NADP par site. Au delà, elle augmente faiblement, probablement en raison d'une liaison aspécifique du NADP. La valeur du coefficient d'extinction molaire moyen par site est calculée à partir de l'absorption extrapolée à partir de la portion linéaire de la courbe pour 4 NAD(P) par tétramère.

	NAD		NADP	
	Bande de Racker (M ⁻¹ cm ⁻¹)	K ₁ (μM)	Bande de Racker (M ⁻¹ cm ⁻¹)	K ₁ (μM)
Sauvage	1100	0,04	0	180
D32A	1100	0,27	0	70
S	1100	0,30	600	40
B-S	1100	3,5	720	30
D32A-S	430	40	1020	1,4
D32G-S	620	8,3	1060	0,07

Tableau 5 : Coefficients d'extinction molaire moyens par site de la Bande de Racker avec le NAD et le NADP pour les GAPDH de *B. stearothermophilus* sauvage et mutées, comparés à leur constante de dissociation K₁

Les valeurs de Bande de Racker sont des moyennes pour lesquelles la déviation standard est inférieure à 15%.

d'absorption ne permet pas de détecter toutes les modifications affectant l'étape de changement conformationnel associée à la liaison du NADP à l'acylenzyme, qui limiterait la vitesse globale de la réaction pour les mutants.

IVC. CONCLUSIONS

En extrapolant ces interprétations à l'ensemble des mutants étudiés, nous proposons les conclusions suivantes. Moins les contraintes électrostatiques et stériques limitant la liaison du NADP seraient importantes, plus la transition conformationnelle apo→holo serait favorisée et conduirait à une structure holo proche de celle de la GAPDH sauvage avec le NAD. En conséquence,

- . l'affinité de l'enzyme pour le NADP serait améliorée,
- . l'efficacité enzymatique avec le NADP augmenterait, dans l'hypothèse où l'étape limitante de la réaction dépendrait effectivement de la transition apo→holo associée à l'étape de fixation du NADP à l'acylenzyme.

En présence de NAD, les modifications du site de liaison du cofacteur défavoriseraient la transition apo→holo avec les conséquences sur l'affinité et l'efficacité enzymatique généralement inverses à celles observées en présence de NADP.

V. ARTICLE 1

Reprinted from *Biochemistry*, 1990, 29.

Copyright © 1990 by the American Chemical Society and reprinted by permission of the copyright owner.

Probing the Coenzyme Specificity of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases by Site-Directed Mutagenesis[†]C. Corbier,[†] S. Clermont,[†] P. Billard,[†] T. Skarzynski,[‡] C. Branlant,[†] A. Wonacott,[§] and G. Branlant^{*†}*Laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique, URA CNRS 457, Faculté des Sciences, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France, and The Blackett Laboratory, Imperial College of Science, Technology, and Medicine, Prince Consort Road, London SW7 2BZ, England**Received January 24, 1990; Revised Manuscript Received March 26, 1990*

ABSTRACT: By combining our knowledge of the crystal structure of the glycolytic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the sequence of the photosynthetic NADP-dependent GAPDH of the chloroplast, two particular amino acid residues were predicted as the principal determinants of differing coenzyme specificity. By use of site-directed mutagenesis, the amino acids Leu 187 and Pro 188 of GAPDH from *Bacillus stearothermophilus* have been replaced with Ala 187 and Ser 188, which occur in the sequence from the chloroplast enzyme. The resulting mutant was shown to be catalytically active not only with its natural coenzyme NAD but also with NADP, thus confirming the initial hypothesis. This approach has not only enabled us to alter the coenzyme specificity by minimal amino acid changes but also revealed factors that control the relative affinity of the enzyme for NAD and NADP.

The NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)¹ (EC 1.2.1.13) from chloroplasts, which is involved in photosynthetic assimilation of CO₂ through the Calvin cycle (McGowan & Gibbs, 1974; O'Brien & Powls, 1976; Pupillo & Fagiani, 1979), has been shown to be closely homologous with the glycolytic enzyme from thermophilic eubacteria (EC 1.2.1.12), from which it has been proposed to have derived (Martin & Cerff, 1986). However, the thermophilic enzyme is strictly NAD-dependent, in contrast to the chloroplast enzyme, which functions with both coenzymes NAD and NADP but with a preference for NADP (Ferri et al., 1978; Cerff, 1978). The dual specificity of the chloroplast enzyme contrasts with that of many other NAD/NADP-dependent dehydrogenases, which have a marked preference for a specific coenzyme (Stryer, 1988).

Analysis of coenzyme binding in several dinucleotide-binding enzymes (Wierenga et al., 1985) showed that there is a structural homology within a $\beta\alpha\beta$ folding unit to which the ADP moiety of the coenzyme binds in a similar fashion. This fingerprint region contains amino acid sequences that are characteristic for NAD or NADP binding (Rice et al., 1984). Recently Scrutton et al. (1990) redesigned the coenzyme specificity of NADP-dependent glutathione reductase by directed mutagenesis and confirmed the set of amino acid residues that are determinants of differing coenzyme specificity.

The three-dimensional structures of both the holo and apo forms of *Bacillus stearothermophilus* GAPDH have been determined at high resolution (Skarzynski et al., 1987; Skarzynski & Wonacott, 1988), and the gene for this enzyme

has been cloned, expressed, and sequenced (Branlant et al., 1983, 1989). The coenzyme-binding domain of GAPDH contains an ADP-binding fingerprint typical of an NAD-dependent enzyme. However, the chloroplast enzyme does not show the expected sequence differences for NADP specificity, suggesting that a different mechanism is involved in the molecular recognition of NADP in GAPDH.

We have used the GAPDH structures together with the primary sequences of chloroplast enzymes to explore the molecular basis for coenzyme specificity using molecular modeling. Amino acids have been replaced by site-directed mutagenesis, and our predictions have been tested by measurements of the properties of the mutant enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Molecular modeling was carried out on an Evans & Sutherland graphics system PS300 using the program FRODO (Jones, 1978).

(a) *Mutagenesis and Isolation of Mutant Enzyme.* To produce the double mutant, a 34-base oligonucleotide was synthesized (5' CGCAAATCTTTATGGGAAGCGTCCAAAATTCGTT 3') with five mismatches as compared to the wild-type sequence (Branlant et al., 1989). The method used to generate the mutated enzyme was that previously described (Mougin et al., 1988; Soukri et al., 1989). The gene was then totally sequenced by the dideoxy method (Sanger et al., 1977) to verify that no other mutation had arisen. Production and purification of the wild-type and mutant enzymes were per-

[†] This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Nancy I, and the Medical Research Council of Great Britain.

* To whom correspondence should be addressed.

[†] Laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique.

[‡] The Blackett Laboratory.

¹ Abbreviations: GAPDH, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PIPES, piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid); G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; 1,3-dPG, 1,3-diphosphoglycerate; P_i, inorganic phosphate; NAD and NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized and reduced forms); NADP and NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized and reduced forms); 3-CAPAD, 3-(chloroacetyl)pyridine adenine dinucleotide.

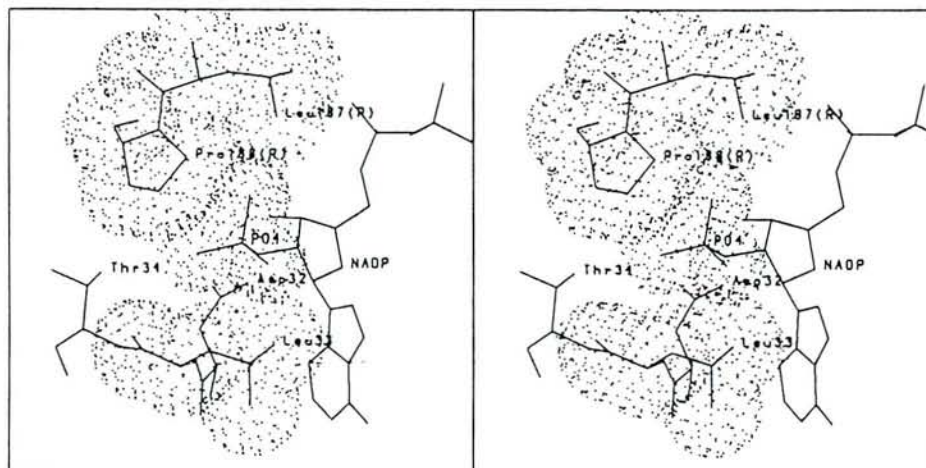


FIGURE 1: Stereoview of binding site for the adenosine moiety of NAD in the holoenzyme structure of *B. stearothermophilus* GAPDH. The van der Waals surface is shown for the 2'-phosphate of NADP and the adjacent residues. The position determined for the 2'-phosphate of NADP from model building indicates that it is in close contact with residues Leu 187 and Pro 188 from the S-loop of the adjacent related subunit as well as Leu 33.

formed as described earlier (Mougin et al., 1988).

(b) *Enzyme Assays*. Enzymic activity was measured on a Cary spectrophotometer, following appearance or disappearance of NAD(P)H at 340 nm. Initial rate measurements were performed according to Ferdinand (1964) for oxidative phosphorylation (40 mM triethanolamine, 0.2 mM EDTA, and 50 mM phosphate, pH 8.9) and with 10 mM PIPES buffer, pH 7.1, for reductive dephosphorylation. All Michaelis substrate values were determined at saturating concentrations of other ligands. Michaelis and inhibition constants were determined by Lineweaver-Burk double-reciprocal plots or Dixon plots.

(c) *Inactivation of GAPDH by 3-CAPAD*. Inactivation of wild-type and mutant GAPDH (0.17 μ M) was studied at 22 $^{\circ}$ C in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.5. The concentration of 3-CAPAD was varied over the range 6–55 μ M for wild type and 5–70 μ M for the mutant. Aliquots were withdrawn from the incubation mixture at fixed intervals and added directly to the assay mixture. The protective effect of NAD(P) on the inactivation rate was studied at 52 and 70 μ M 3-CAPAD for the wild-type and the mutant enzymes, respectively. The resulting curves were interpreted according to Kitz and Wilson (1962), Meloche (1967), and Branlant et al. (1982).

(d) *Thermal Inactivation*. Thermal inactivation experiments were carried out by incubating a solution of either wild-type or mutant apoenzyme (1 mg/mL) in 20 mM Tris and 2 mM EDTA, pH 8, over a temperature range from 40 to 90 $^{\circ}$ C. Parallel experiments were performed with saturating concentrations of NAD (2 mM) or NADP (20 mM). After 10 min of incubation, aliquots were cooled in an ice bath and residual activity was determined as described above.

RESULTS

Sequence Comparison. Comparison of the primary structure of the chloroplast and the glycolytic enzymes reveals a very high degree of sequence identity (Martin & Cerff, 1986): *B. stearothermophilus* and maize chloroplast GAPDHs are 60% identical (Branlant et al., 1989; Quigley et al., 1988). In particular, all the amino acids that are directly implicated in the catalytic mechanism and substrate specificity are conserved.

In searching for the possible causes of changed coenzyme specificity in the chloroplast enzyme, we have examined the amino acid sequence differences in the region close to the binding site for the adenosine moiety of NAD in the model

Table I: Amino Acid Sequence Alignments

(A) The S-Loop Region (Residues 178–200) of GAPDH ^a			
	180	190	200
<i>B. stearothermophilus</i>	YTNDQR	ILDLP-HKDLRR	ARAAA
maize or mustard chloroplast	G	L AS-	R
(B) Peptide 30–50 ^b			
	30	40	50
<i>B. stearothermophilus</i>	VNDLT-	DANTLA	HLLKYDSVH
maize chloroplast	I	TG-GVKQA	S TL

^aThe *B. stearothermophilus* GAPDH sequence is from Branlant et al. (1989), the maize chloroplast GAPDH sequence is from Quigley et al. (1988), and the mustard chloroplast GAPDH sequence is from Martin and Cerff (1986). ^bResidues 32–35 form a loop between β -sheet B and α -helix C (residues 36–45). The numbering of amino acid residues is according to Biesecker et al. (1977).

of the *B. stearothermophilus* holoenzyme. The structure of *B. stearothermophilus* GAPDH shows that residues 178–200 form the S-loop region, which is at the core of the tetramer, and that amino acid side chains of Leu 187 and Pro 188 lie close to the adenosine ribose of the R-axis related subunit (Figure 1). For this particular part of the sequence, the enzyme from thermophilic sources is characteristically different from the enzyme from mesophiles (Walker et al., 1980). The chloroplast enzyme shows only conservative changes (Table I) apart from residues at positions 187 and 188, where Leu and Pro are replaced by Ala and Ser. This double sequence change could easily be accommodated within the structure, since it involves no more than the deletion of side-chain atoms in hydrophobic contacts with other parts of the molecule and would not be expected to perturb the secondary or tertiary structure of the enzyme.

One initially surprising feature of the sequence of the chloroplast enzyme is the conservation of the negatively charged residue Asp 32, which in common with other NAD-binding sites is directly involved in the specific binding of the adenosine ribose through hydrogen bonds with both hydroxyl groups of the ring. Replacement of NAD by NADP as coenzyme, which involves the addition of a phosphate group at the 2'-position of the ribose ring, would bring together these two negatively charged groups and create an energetically

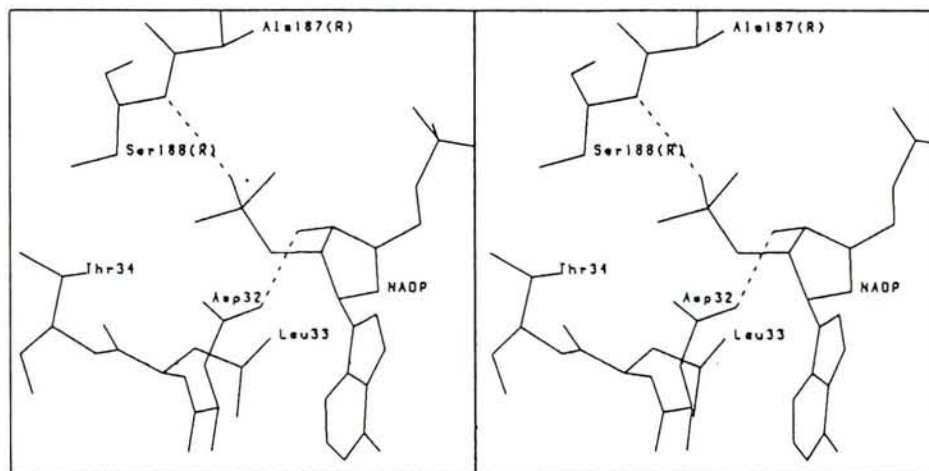


FIGURE 2: Stereoview of the proposed binding of NADP to the mutant enzyme with Leu 187 Ala and Pro 188 Ser. Note the hydrogen bond from the main-chain NH of Ser 188 to the 2'-phosphate of NADP. A water molecule (not shown) can be accommodated in the space previously occupied by the proline and leucine side chains.

unfavorable interaction. However, an important feature of the structure is the presence of hydrogen bonds to the carboxylate group of Asp 32 from the main-chain NH groups at the carboxy-terminal ends of the adjacent strands of β -sheet that make up the $\beta\alpha\beta$ motif of the ADP-binding fold (Wierenga et al., 1985). For the apoenzyme, the NH groups involved are from residues 8 and 34, while for the holoenzyme, as a consequence of the coenzyme-binding domain movement and the accompanying conformational change of the main-chain residues 33–36 (Skarzynski & Wonacott, 1988), the hydrogen bond switches from the peptide NH of residue 34 to that of 33. Thus the carboxylate of Asp 32 is not only held in place by hydrogen bonds from the ends of the β -sheet but also changed in character, since in the presence of a bound ribose group with a full complement of hydrogen bonds the negative charge of the carboxyl group will be delocalized and effectively neutralized. Thus the energetic penalty due to repulsion of like charges when NADP replaces NAD as coenzyme will be much reduced. Nonetheless, with NADP bound the loss of the potential hydrogen bond to the 2'-hydroxyl of the ribose will require an alternative hydrogen-bond proton donor if this is not to result in reduced affinity for NADP.

Molecular Modeling. In our initial model-building study the additional 2'-phosphate group of NADP was added with appropriate geometry to the *B. stearothermophilus* model of NAD bound to the protein in the holoenzyme structure. Although the adenine ribose is partially solvent accessible, the phosphate group is restricted stereochemically to a position in which it is in close contact with Leu 33 and with Pro 188 and Leu 187 from the *R*-axis related subunit (see Figure 1). The hydrophobic environment would be most unfavorable for the binding of the phosphate group and would mitigate against binding of NADP to the holo form of the enzyme. The substitution of Leu 187 and Pro 188 by the side chains of alanine and serine not only relieves the steric hindrance with the 2'-PO₄ but also provides a more hydrophilic site in which hydrogen bonds can be formed with the serine hydroxyl or main-chain NH, which would lead to increased specificity for NADP (see Figure 2). In other NADP-dependent enzymes, such as glutathione reductase (Scrutton et al., 1990), the binding site for the 2'-PO₄ contains two arginine residues, which neutralize the charge and provide specificity. There are no charges in sequence for the chloroplast enzyme that could provide a similar interaction, and none of the existing arginine or lysine residues can be brought close enough to the 2'-phosphate for

Table II: Kinetic Parameters of Wild-Type and Mutant GAPDH^a

substrate or inhibitor	K_m (10^{-3} M)	K_i^b (10^{-3} M)	k_{cat}^c (s^{-1})
(A) Wild-Type (<i>B. stearothermophilus</i>) GAPDH			
NAD	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.01	280
G3P	0.8 ± 0.1		
P _i	18 ± 5		
1,3-dPG	0.016 ± 0.005		420
NADH	0.012 ± 0.003		
NADP		2 ± 0.1	
(B) Mutant (Leu 187 Ala, Pro 188 Ser) GAPDH			
NAD	0.35 ± 0.05	0.20 ± 0.02	280
G3P	1.5 ± 0.2		
P _i	33 ± 5		
NADP	7.1 ± 0.6	1.0 ± 0.1	58
G3P	0.15 ± 0.01		
P _i	400 ± 10		
NADH	0.040 ± 0.006		290
1,3-dPG	0.033 ± 0.005		
NADPH	0.34 ± 0.06		35
1,3-dPG	0.032 ± 0.005		

^aThe reaction was performed at 22 °C in 40 mM triethanolamine and 0.2 mM EDTA buffer, pH 8.9, for the oxidative phosphorylation and in 10 mM PIPES buffer, pH 7.1, for the reductive dephosphorylation. Each value represents the average of three determinations. ^b K_i values were determined by using NADH as the varied coenzyme. ^cVariations of the k_{cat} values were below 10%. Note that the pH-rate profiles in the forward and reverse reactions were found to be similar for wild-type and mutant GAPDH, using NAD(H) as coenzyme. Similar pH-rate profiles were also observed for the mutant enzyme, using NADP(H) as coenzyme (curves not shown).

a direct interaction to occur. Thus the dual specificity cannot arise through a switch of side-chain conformation of positively charged residues.

We also examined the possibility of binding NADP to the native apoenzyme, using the position of bound ADP (unpublished results) as a starting model. In this "open" conformation state of the enzyme there is no apparent steric hindrance to the addition of a phosphate group to the 2'-hydroxyl of the ribose ring. However, the presence of this phosphate would interfere with the normal conformational changes associated with coenzyme binding, which leads to the "closed" holoenzyme state.

Properties of the Mutant Enzyme. The catalytic properties of the purified mutant enzyme are compared with those of the wild-type enzyme in Table II. The mutations have very little effect on the kinetic parameters of the enzyme using NAD(H)

Table III: Dissociation Constants of 3-CAPAD, NAD, and NADP for Wild-Type and Mutant GAPDH from *B. stearothermophilus*^a

	K_i (μM)		k (min^{-1})	
	wild type	mutant	wild type	mutant
3-CAPAD	11 ± 1	28 ± 2	0.33 ± 0.04	0.24 ± 0.03
NAD	0.8 ± 0.1	2.8 ± 0.2		
NADP	1100 ± 180	350 ± 30		

^aThe reaction was performed at 22 °C in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.5. Experimental conditions: GAPDH, 0.17 μM ; 3-CAPAD, 6–55 and 5–70 μM for wild-type and mutant enzyme, respectively. For more details, see Materials and Methods. In all cases, the 3-CAPAD inactivation process exhibited pseudo-first-order kinetics until more than 80% of the GAPDH activity was lost. Inactivation rate constants (k) and dissociation constants (K_i) of 3-CAPAD were deduced from curves representing the double-reciprocal plot of k'_{app} versus 3-CAPAD concentration. NAD(P) dissociation constants were determined from plots of $(k'_{\text{app}})^{-1}$ versus NAD(P) concentration at a fixed concentration of 3-CAPAD.

as the coenzyme (Table II). This strongly suggests that the mode of NAD binding is unaffected by the mutations, including the precise positioning of the nicotinamide ring. This point was confirmed by examining the "Racker band" (Racker & Krinsky, 1952), which is sensitive to changes at the active site. Mougin et al. (1988) showed that the formation of a charge-transfer transition in GAPDH involved the essential residue Cys 149 and the pyridinium ring of NAD, acting as an electron donor and electron acceptor, respectively. The Racker band was found to be the same for the wild-type and the mutant enzyme ($\epsilon_{360} = 1100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; curves not shown), indicating that no significant change has occurred in the location and orientation of the nicotinamide group in the active site.

With the mutant enzyme the values of K_m for NAD and NADH are increased 2.3-fold and 3.3-fold, respectively (see Table II). To test whether this is a direct consequence of a lower affinity for both coenzymes, two additional experimental investigations were carried out. First, the inhibition constant K_i for NAD can be determined by using 3-(chloroacetyl)-pyridine adenine dinucleotide (3-CAPAD) as an affinity labeling probe by measuring the protection against inactivation afforded by the coenzyme (Branlant et al., 1982). NAD dissociation constants of 0.8 μM and 2.8 μM were determined at pH 8.5 for the wild-type and mutant GAPDH, respectively (Table III). As already observed (Branlant et al., 1982), these values correspond closely to those of the NAD-binding sites of low affinity. Second, an inhibition constant for NAD can be determined from steady-state rate measurements, with NAD acting as a competitive inhibitor against NADH in the reaction with 1,3-dPG. As shown in Table II, K_i values of 0.10 mM and 0.20 mM were determined for the wild-type and mutant enzymes. The apparent discrepancy in the two sets of K_i values can be explained by the fact that in the former experiment K_i is a measure of the affinity of NAD for the apoenzyme, while in the latter K_i would represent the affinity of NAD for the acyl enzyme intermediate (Malhotra & Bernhard, 1989). In both instances the affinity of NAD for the mutant GAPDH is reduced by a factor of 2 to 3 relative to that for the wild-type enzyme. This difference in affinity is also observed for 3-CAPAD where dissociation constants of 11 μM and 28 μM were determined for the wild-type and the mutant enzymes, respectively (Table III).

Our prediction of the crucial role of residues Leu 187 and Pro 188 in affecting productive NADP binding was confirmed in that the mutant was found to be catalytically functional with NADP as a coenzyme (Table IIB). However, the kinetic properties of the mutant enzyme with NADP(H) are markedly

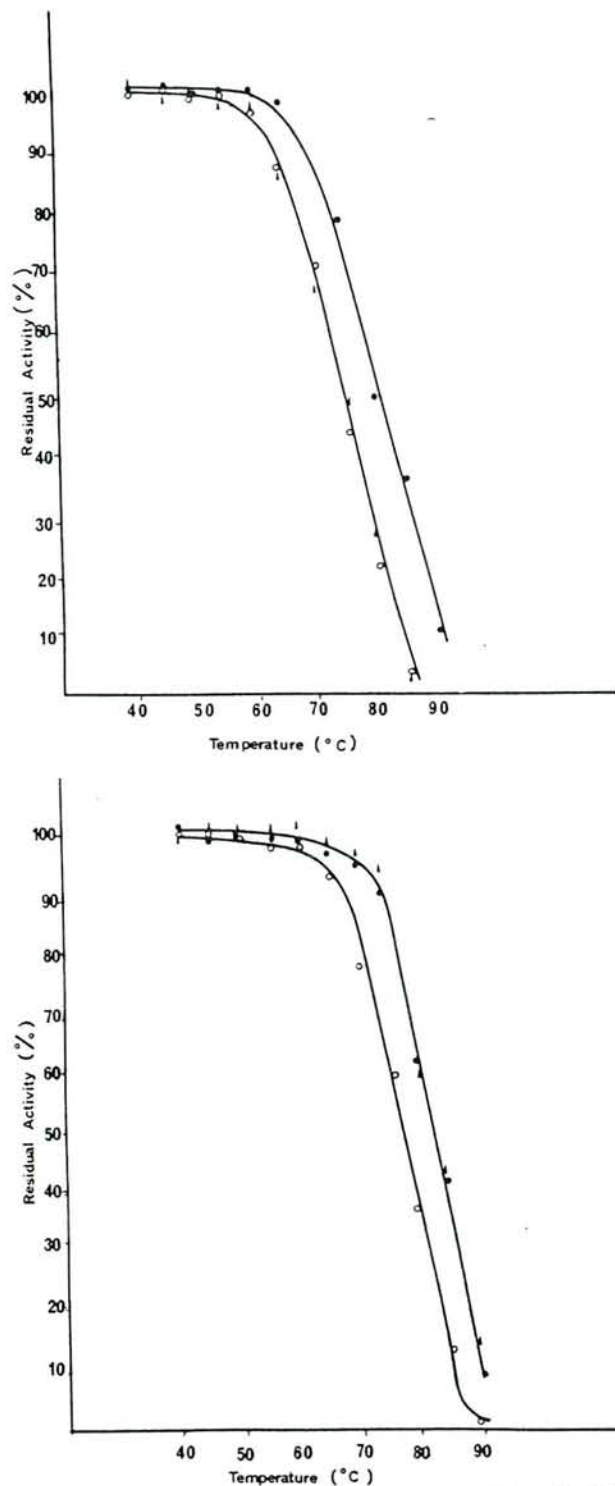


FIGURE 3: Thermal inactivation of *B. stearothermophilus* GAPDH: (○) apoenzyme, (●) enzyme with 2 mM NAD, and (▲) enzyme with 20 mM NADP. (a) Wild-type enzyme; (b) mutant enzyme. 100 μL of enzyme solutions (1 mg/mL in 20 mM Tris and 2 mM EDTA, pH 8) was heated for 10 min at various temperatures and cooled in ice. The remaining enzyme activity was then determined as described under Materials and Methods.

different from those with NAD(H). First, the K_m values for the phosphorylated coenzymes are increased 20-fold relative to that for NAD and 9-fold relative to that for NADH. Second, the enzyme activity is reduced with both G3P and 1,3-dPG. Third, while both NAD and NADP protect the mutant enzyme against thermal inactivation to the same degree, only NAD protects the wild-type GAPDH (Figure 3), implying that protection is associated with the presence of

Coenzyme Specificity of GAPDHs

catalytic activity and must involve the apo-holo structural transition. The presence of an equivalent Racker band with NADP (curve not shown) also suggests that the nicotinamide moiety is bound equivalently in the active site, and differences, if any, must be confined to the adenosine portion of the coenzyme. Finally, the dissociation constants of NADP for the mutant and wild-type enzyme were determined as 0.35 mM and 1.1 mM, respectively, by 3-CAPAD titration (Table III), while steady-state kinetic measurements with NADH as coenzyme provide values of K_i for NADP of 1 mM for the mutant and 2 mM for the wild-type enzyme (Table II). Both experiments show that NADP binds to the wild-type enzyme, even though it is unable to play a catalytically functional role, while the mutation increases the affinity for NADP, by a factor of 2 to 3 depending on the state of the enzyme.

At present, we are unable to account for the large changes in the substrate K_m values for G3P and inorganic phosphate (P_i) with NADP as coenzyme (see Table IIB), but similar properties are observed for the chloroplast enzyme (Ferri et al., 1978).

DISCUSSION

Studies using NAD as the coenzyme show that the mutant behaves essentially the same as the wild-type enzyme except that K_i and K_m are both increased. This can almost certainly be ascribed to the loss of hydrophobic contacts between NAD and the side chain of Leu 187. The properties of the mutant enzyme with NADP as coenzyme require more explanation. The larger values of K_i and K_m for NADP relative to NAD are not surprising since the enforced proximity of the 2'-phosphate of NADP to the carboxylate of Asp 32 will not be fully compensated and the carboxyl group will have one unsatisfied hydrogen bond. The 4-fold lower k_{cat} with NADP could be due to the additional phosphate interfering with the full conformational change from the apo structure, in which the subunit is in an open conformation allowing coenzyme binding, to the holo structure, in which the coenzyme is almost buried. This conformational change is responsible for optimizing the relative disposition of the catalytic groups and ion-binding ligands in the active site (Skarzynski & Wonacott, 1988). Indeed, the weak inhibitory effect of NADP on the catalytic activity of yeast GAPDH (Yang & Deal, 1969) and the K_i measurements for *B. stearothermophilus* (Table IIA) show that NADP binds weakly to GAPDH but cannot attain a catalytically active state. The equivalent Racker band with NADP and NAD and the similar thermal protection for NAD and NADP both argue that NADP binding to the mutant induces a full conformational transition that leads to a fully active holoenzyme state. The fact that the K_m and K_i of the mutant enzyme for NADP are higher than those of the chloroplast GAPDH by about 2 orders of magnitude (Ferri et al., 1978; Cerff, 1978) indicates a tighter binding of NADP to the chloroplast enzyme than to the mutant GAPDH.

Inspection of the model of the *B. stearothermophilus* enzyme shows that residues Asp 32, Leu 33, and Thr 34 contribute to the formation of the adenosine-binding site (Skarzynski & Wonacott, 1988). During the binding of NAD, the loop consisting of residues 33–36 changes conformation so that Leu 33 moves into contact with the adenine ring. In the chloroplast enzyme sequences, Leu 33 is replaced by a threonine and the resulting favorable side-chain conformation places the hydroxyl group close to the 2'-phosphate of NADP, while the side chain maintains a hydrophobic contact with the adenine ring. This change is likely to further enhance the binding of NADP.

Other differences between the chloroplast and glycolytic

GAPDHs have been examined. The model of the *B. stearothermophilus* structure shows that removal of the side chains of Thr 34 and Asp 36 by replacement with glycines and the change of Leu 40 to alanine would, in the absence of a conformational change, create a hole adjacent to residue Asp 32, which would be accessible to the solvent. This would permit hydrogen-bond formation with the carboxylate oxygen to which the O2' of the ribose of NAD is normally hydrogen bonded. In addition, the removal of the side chains of Thr 34 and Asp 36 not only gives the peptide loop 32–36 more flexibility but also leaves a space that could be filled by movement of the loop during NADP binding. Further mutagenesis studies are underway to confirm these points.

In summary, by combining the knowledge of the sequence of the chloroplast enzyme with the three-dimensional structure of *B. stearothermophilus* GAPDH, it has been possible to predict the principal residues responsible for the altered coenzyme specificity. This has been confirmed by the use of site-directed mutagenesis. The mutated GAPDH from *B. stearothermophilus* (from Leu 187 and Pro 188 to Ala 187 and Ser 188) has been shown to be capable of catalysis not only with its natural coenzyme NAD but also with NADP. We have therefore been able to confer dual specificity by minimal changes in protein sequence and with little change in the properties of the enzyme with NAD. The site for binding of the 2'-phosphate contrasts with that of the NADP-specific enzymes in having no positively charged residues associated with the phosphate group; instead the phosphate is bound within a hydrophilic pocket formed from groups on the protein that provide hydrogen-bonding donors.

The ability to alter coenzyme specificity is likely to be of value for NAD-dependent dehydrogenases of industrial importance, such as formate dehydrogenase (Hummel & Kula, 1989), since that would provide an effective route for regeneration of NADPH in addition to NADH.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Bayeul, E. Habermacher, and J. P. Declé for efficient technical help and Dr. J. F. Biellmann for a generous gift of 3-CAPAD.

Registry No. NAD, 53-84-9; NADP, 53-59-8; NADH, 58-68-4; NADPH, 53-57-6; G3P, 591-57-1; 1,3-dPG, 1981-49-3; P_i , 14265-44-2; 3-CAPAD, 39938-03-9; L-Leu, 61-90-5; L-Pro, 147-85-3; L-Ala, 56-41-7; L-Ser, 56-45-1; NAD-dependent GAPDH, 9001-50-7; NADP-dependent GAPDH, 37250-87-6.

REFERENCES

- Biesecker, G., Harris, J. I., Thierry, J. C., Walker, J. E., & Wonacott, A. J. (1977) *Nature* 266, 328–333.
- Branlant, G., Eiler, B., Wallen, L., & Biellmann, J. F. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 519–524.
- Branlant, G., Flesch, G., & Branlant, C. (1983) *Gene* 25, 1–7.
- Branlant, C., Oster, T., & Branlant, G. (1989) *Gene* 75, 145–155.
- Cerff, R. (1978) *Phytochemistry* 17, 2061–2067.
- Ferdinand, W. (1964) *Biochem. J.* 92, 578–585.
- Ferri, G., Comerio, G., Iadarola, P., Zapponi, M. C., & Speranza, M. L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 19–31.
- Harris, J. I., & Perham, R. N. (1968) *Nature* 219, 1025–1028.
- Hummel, W., & Kula, M. R. (1989) *Eur. J. Biochem.* 184, 124–128.
- Jones, T. A. (1978) *J. Appl. Crystallogr.* 11, 268–272.
- Kitz, R., & Wilson, I. B. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3245–3249.
- Malhotra, O. P., & Bernhard, S. A. (1989) *Biochemistry* 28, 124–128.

7106

- Martin, W., & Cerff, R. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 323-331.
- McGowan, R. E., & Gibbs, M. (1974) *Plant Physiol.* 54, 312-319.
- Meloche, H. P. (1967) *Biochemistry* 6, 2273-2280.
- Mougin, A., Corbier, C., Soukri, A., Wonacott, A. J., Branlant, C., & Branlant, G. (1988) *Protein Eng.* 2, 45-48.
- O'Brien, M. J., & Powls, R. (1976) *Eur. J. Biochem.* 63, 155-161.
- Pupillo, P., & Fagiani, R. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 581-592.
- Quigley, F., Martin, W., & Cerff, R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2672-2676.
- Racker, E., & Krimsky, I. (1952) *J. Biol. Chem.* 198, 731-743.
- Rice, D. W., Schulz, G. E., & Guest, J. R. (1984) *J. Mol. Biol.* 174, 483-496.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467.
- Scrutton, N. S., Berry, A., & Perham, R. N. (1990) *Nature* 343, 38-43.
- Skarzynski, T. E., & Wonacott, A. J. (1988) *J. Mol. Biol.* 203, 1097-1118.
- Skarzynski, T. E., Moody, P. C. E., & Wonacott, A. J. (1987) *J. Mol. Biol.* 193, 171-187.
- Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A. J., Branlant, C., & Branlant, G. (1989) *Biochemistry* 28, 2586-2592.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, Freeman, New York.
- Walker, J. E., Wonacott, A. J., & Harris, J. I. (1980) *Eur. J. Biochem.* 108, 581-586.
- Wierenga, R. K., De Maeyer, M. C. H., & Hol, W. G. J. (1985) *Biochemistry* 24, 1346-1357.
- Yang, S. T., & Deal, W. C., Jr. (1969) *Biochemistry* 8, 2806-2813.

Determinants of Coenzyme Specificity in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase: Role of the Acidic Residue in the Fingerprint Region of the Nucleotide Binding Fold[†]

S. Clermont,[†] C. Corbier,[†] Y. Mely,[‡] D. Gerard,[§] A. Wonacott,^{||} and G. Branlant^{*‡}

Laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique, Université de Nancy I, URA CNRS 457, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex, France, Laboratoire de Biophysique, Faculté de Pharmacie, URA CNRS 491, 74 Route du Rhin, BP 24, 67401 Illkirch Graffenstaden Cedex, France, and Protein Structure Group, Glaxo Group Research Limited, Greenford Road, Greenford, Middlesex UB6 OHE, U.K.

Received April 22, 1993; Revised Manuscript Received June 11, 1993*

ABSTRACT: On the basis of the three-dimensional structure of the glycolytic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and of sequence comparison with the photosynthetic NAD(P)-dependent GAPDH of the chloroplast, a series of mutants of GAPDH from *Bacillus stearothermophilus* have been constructed. The results deduced from kinetic and binding studies suggest that the absence of activity of the wild-type GAPDH with NADP as a cofactor is the consequence of at least three factors: (1) steric hindrance, (2) electrostatic repulsion between the charged carboxyl group of Asp32 and the 2'-phosphate, and (3) structural determinants at the subunit interface of the tetramer. The best value for k_{cat}/K_M and K_D for NADP was observed for the D32A-L187A-P188S mutant. This triple mutation leads to a switch in favor of NADP specificity but with a k_{cat}/K_M ratio 50- and 80-fold less than that observed for the wild type with NAD and for the chloroplast GAPDH with NADP, respectively. Substituting the invariant chloroplast Thr33-Gly34-Gly35 for the *B. stearothermophilus* Leu33-Thr34-Asp35 residues on the double mutant Ala187-Ser188 does not improve significantly the affinity for NADP while substituting Ala32 for Asp32 on the double mutant does. Clearly, other subtle adjustments in the adenosine subsite are needed to reconcile the presence of the carboxylate group of Asp32 and the 2'-phosphate of NADP. Kinetic studies indicate a change of the rate-limiting step for the mutants. This could be the consequence of an incomplete apo-holo transition. The results taken all together suggest that it is difficult from a rationale to predict all the structural determinants that are implicated in determining specificity for a coenzyme. Comparative studies of the binding properties of various mutants suggest an essential role of position 32 and more generally of the adenosine subsite for revealing negative or positive cooperativity in GAPDH. Furthermore, it is suggested that a correct positioning of the pyridinium ring is necessary but not sufficient for inducing cooperativity.

A number of proteins including NAD(P)¹ dehydrogenases, kinases, or aminoacyl transfer RNA synthetases exhibit common structural features known as the Rossmann fold domain (Rossmann et al., 1975). This nucleotide binding domain consists of an α,β structure with a central parallel β sheet flanked on each side by a layer of α helices. Sequence analysis led Wierenga et al. (1985, 1986) to propose the existence of a fingerprint of 11 specific positions in NAD dehydrogenases including (see Table I) (a) an invariant GXGXXG sequence which extends from the C-terminal end

of the first β strand to the N-terminal end of the following α helix, (b) a hydrophobic core composed of six small residues, and (c) an acidic residue, usually Asp, at the C-terminus of the second β strand, which hydrogen bonds to the hydroxyl groups of the adenine ribose. Although most NAD-linked dehydrogenases possess this fingerprint structure, some contain small variations (Wierenga et al., 1986; Bork & Grunwald, 1990; Teller et al., 1992).

A consensus sequence has also been proposed for NADP binding proteins in which the third glycine of the NAD fingerprint is replaced by an alanine (Hanukoglu & Gutfinger, 1989) and which usually includes a positively charged residue in the neighborhood of the C-terminus of the $\beta\alpha\beta$ motif. Again this fingerprint is not unequivocally correlated with NADP specificity (Benachenhou & Baldacci, 1991; Loeber et al., 1991; Teller et al., 1992; Kumar et al., 1992; Stelandre et al., 1992). The role of a positively charged residue would be to confer specificity for NADP and to discriminate against NAD by interacting specifically with adenosine 2'-phosphate. Thus the C-terminal region of the second β strand seems to be crucial in determining specificity for coenzyme and controlling the relative affinity of dehydrogenases for NAD and NADP. Several recent studies argue in favor of this interpretation. First, the substitution of the invariant Asp residue of three different NAD dehydrogenases, namely, lactate dehydrogenase (Feeny et al., 1990) and alcohol dehydrogenases from

[†] This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Nancy I, and the Institut de Biotechnologie de Nancy.

* To whom correspondence should be addressed.

[†] Laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique.

[‡] Laboratoire de Biophysique.

[§] Glaxo Group Research Limited.

* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, August 15, 1993.

[†] Abbreviations: GAPDH, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NAD and NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized and reduced form); NADP and NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized and reduced form); *B. stearothermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*; *E. coli*, *Escherichia coli*; 3-CAPAD, 3-(chloroacetyl)pyridine adenine dinucleotide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; TES, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid; Tris, *N*-tris(hydroxymethyl)aminomethane; D32A, Asp32 → Ala; D32N, Asp32 → Asn; D32E, Asp32 → Glu; S, Leu187 → Ala-P188 → Ser; B, Leu33 → Thr-Thr34 → Gly-Asp35 → Gly; K_M , Michaelis constant; k_{cat} , catalytic constant; P_i , inorganic phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate.

Table I: Sequence Alignment of NAD-Dependent *B. stearothermophilus* and Dual NAD(P)-Dependent Chloroplastic GAPDHs^a

coenzyme specificity	source	1	10	20	30	40
NAD	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	AUKUGINGFG	RIGANUFRAA	LKH---PDIEUUA	UNDLTDANT-	L
		βββββ	αααααααααα		ββββββ	αααα
NAD(P)	<i>Nicotiana tabacum</i> (gene A)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLOUIA	INDTGGUKQ-	A
NAD(P)	<i>Zea mays</i> (gene A)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGRGDSPLDUIA	INDTGGUKQ-	A
NAD(P)	<i>Zea mays</i> (pseudogene)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGRGDSPLDUIA	INDTGGUKQ-	A
NAD(P)	<i>Pisum sativum</i> (gene A)	KQLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLOUIA	INDTGGUKQ-	A
NAD(P)	<i>Spinacia oleracea</i> (gene A)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLOUUU	INDTGGUKQ-	A
NAD(P)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (gene A)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLOIIA	INDTGGUKQ-	A
NAD(P)	<i>Nicotiana tabacum</i> (gene B)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLOUUU	UNDSSGUKH-	A
NAD(P)	<i>Pisum sativum</i> (gene B)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLEUIU	UNDSSGUKN-	A
NAD(P)	<i>Spinacia oleracea</i> (gene B)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLOUUU	UNDSSGUKS-	A
NAD(P)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (gene B)	KLKVAINGFG	RIGANFLRCH	HGR-KDSPLEUUU	UNDSSGUKN-	A

^a The numbering for the amino acid sequence was according to Biesecker et al. (1977). The consensus amino acids which sign the $\beta\alpha\beta$ fold in NAD-dependent GAPDHs are illustrated in boldface. The secondary structure of the $\beta\alpha\beta$ fold is indicated under the *B. stearothermophilus* GAPDH sequence on the basis of its crystalline structure (β , β strand; α , α helix; nothing, loop). References for sequences are *B. stearothermophilus*, Branlant et al. (1989); *Nicotiana tabacum*, Shih et al. (1986); *Zea mays*, Quigley et al. (1988–1989); *Pisum sativum*, Brinkmann et al. (1989) and Liaud et al. (1990); *Spinacia oleracea*, Brinkmann et al. (1989) and Ferri et al. (1990); *Arabidopsis thaliana*, Shih et al. (1991).

Drosophila (Chen et al., 1991) and yeast (Fan et al., 1991) with serine, asparagine, and glycine, respectively, led to mutants catalytically more efficient with NADP and with equal or lower efficiency with NAD than the wild-type enzymes. Second, the mutation of Arg198 of NADPH-specific glutathione reductase to Met substantially decreased activity with NADPH, while it increased the activity with NADH (Scrutton et al., 1990). However, six further mutations within the $\beta\alpha\beta$ unit were necessary to create a glutathione reductase that used NADH substantially more efficiently than NADPH. Thus, the presence of negatively or positively charged residues is probably a key factor contributing to the relative specificity of NAD or NADP as cofactor, but other factors including steric and conformational constraints are certainly also involved. This is the case for the tetrameric NAD-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Bacillus stearothermophilus* where two substitutions located outside the $\beta\alpha\beta$ fold structure but close to the adenosine ribose of the R-axis-related subunit produced a mutant that is active with NADP as a cofactor (Corbier et al., 1990a). Similarly, the absence of activity with Asp38→Leu and Asp38→Arg mutants from *Drosophila* alcohol dehydrogenase could be interpreted in part as a consequence of steric hindrance which in turn perturbs the conformation of the active site (Chen et al., 1991).

No high-resolution three-dimensional structures are yet available for dehydrogenases that exhibit dual-coenzyme specificity. However, sequence alignment of dual-coenzyme dehydrogenases such as glutamate dehydrogenase (Teller et al., 1992, and references cited therein) and GAPDH (Table I) reveals the presence of structural features specific of a $\beta\alpha\beta$ fold with a consensus sequence GXGXXG and an acidic residue at the C-terminus of the second β strand. This signature had previously been regarded as indicative of specificity for NAD.

GAPDH is a good model for addressing this question. First, the three-dimensional structures of both the holo and apo forms of GAPDH from *B. stearothermophilus* have been determined at high resolution and contain the ADP binding fingerprint typical of NAD-dependent dehydrogenases with the invariant Asp residue at position 32, at the C-terminus of the second β strand (Skarzynski et al., 1987; Skarzynski & Wonacott, 1988). Second, GAPDH from chloroplast shows

dual-coenzyme specificity, with a preference for NADP² and is homologous to *B. stearothermophilus* GAPDH with 55% sequence identity (Martin & Cerff, 1986). Third, replacement of amino acids Leu187 and Pro188 of GAPDH from *B. stearothermophilus* by Ala and Ser (herein referred to as S) from the homologous chloroplast GAPDH conferred activity with NADP (Corbier et al., 1990a).

In order to investigate the contribution of Asp32 to coenzyme specificity in GAPDH from *B. stearothermophilus*, a series of mutants have been constructed in which Asp32 has been replaced. These have been combined with other mutations around the adenosine binding pocket, including the S mutant. This paper describes the enzymatic and cofactor binding properties of these mutants.

MATERIALS AND METHODS

(a) *Mutagenesis and Isolation of Mutated Enzymes.* Site-directed mutagenesis and production and purification of wild-type and mutant *B. stearothermophilus* enzymes were performed as described earlier (Mougin et al., 1988). GAPDH concentrations were determined spectrophotometrically, using a molar extinction coefficient of $1.17 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $1.31 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the apo- and holoenzymes, respectively. Enzyme concentrations are expressed either in molarity (M), i.e., tetramer concentration, or in normality (N), i.e., subunit concentration.

(b) *Enzyme Assays.* Assays were performed with a Cary or a Kontron Uvikon spectrophotometer, following the appearance of NAD(P)H at 340 nm. Initial rate measurements were carried out in 40 mM triethanolamine buffer, 0.2 mM EDTA, and 50 mM K_2HPO_4 , pH 8.9 (Ferdinand, 1964). Apparent Michaelis constants were determined at the saturation concentration of inorganic phosphate (P_i). Glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) concentrations were chosen to allow maximum reaction rate while avoiding substrate inhibition.

² Little kinetic data are so far available for the chloroplastic GAPDHs. Cerff (1978) reported results for chloroplast GAPDH from *Sinapis alba* showing that NAD and NADP were competitive inhibitors of NADPH in the reductive dephosphorylation step with K_i constants of 1.2 and 0.048 mM, respectively. Ferri et al. (1978) determined the following constants on spinach chloroplast GAPDH: for NAD, $k_{\text{cat}} = 22 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 0.2 \text{ mM}$, and $k_{\text{cat}}/K_M = 110 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$; for NADP, $k_{\text{cat}} = 47 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 0.04 \text{ mM}$, and $k_{\text{cat}}/K_M = 1175 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

Michaelis constants were deduced from nonlinear regression data analysis.

(c) *Inactivation of GAPDH by 3-(Chloroacetyl)pyridine Adenine Dinucleotide (3-CAPAD)*. Experimental conditions were the same as those described previously (Corbier et al., 1990a,b) except that TES was used instead of phosphate buffer. The presence of phosphate ion was shown to decrease drastically the inactivation kinetic constant and the binding affinity of NADP. This could be due to the occupancy of the two anion binding sites of GAPDH by phosphate ion, which in turn would decrease the alkylation rate of Cys149, and to a competition between phosphate and the 2'-phosphate of NADP, which would increase the apparent K_D constant of NADP.

(d) *Spectrofluorometric Measurements*. Determination of NAD(P) binding affinities at 22 °C was performed as previously described for the *Escherichia coli* enzyme (Corbier et al., 1990b). In short, quenching of tryptophan fluorescence by NAD(P) was used to monitor the binding of NAD(P) to both wild-type and mutant enzymes. Fluorescence measurements were performed with a Perkin-Elmer MPF 66 spectrofluorometer. Excitation and emission wavelengths were set at 295 or 298 and 330 or 350 nm, respectively. Fluorescence intensities were corrected for the screening effect due to the absorption of NAD(P) and for Raman emission by subtracting the buffer emission spectrum.

Making the reasonable assumption that the binding of NAD(P) to each enzyme subunit gave an identical fluorescence decrease, the average number ν of moles of NAD(P) bound per mole of enzyme could be obtained using $\nu = n(I_F - I_{FO}) / (I_{FT} - I_{FO})$, where I_F is the fluorescence measured for any added NAD(P) concentration while I_{FO} and I_{FT} correspond to the fluorescence intensities of the apoprotein and the holoenzyme [with its n coenzyme binding sites saturated with NAD(P)], respectively. The concentration x of free NAD(P) was calculated using $x = [\text{NAD(P)}]_t - n[\text{E}]_t$, where $[\text{NAD(P)}]_t$ and $[\text{E}]_t$ represent respectively the total NAD(P) and enzyme concentrations. Finally, ν and x were fitted to the Adair-Klotz equation by a nonlinear least-squares procedure allowing the determination of the macroscopic dissociation constants K_i :

$$\nu = \frac{\frac{x}{K_1} + \frac{2x^2}{K_1K_2} + \dots + \frac{nx^n}{K_1K_2\dots K_n}}{1 + \frac{x}{K_1} + \frac{x^2}{K_1K_2} + \dots + \frac{x^n}{K_1K_2\dots K_n}}$$

In the case of low-affinity species, it was necessary to use high NAD(P) concentrations which led to the appearance of an additional quenching of fluorescence probably due to a nonspecific binding of NAD(P) to the enzyme. This additional fluorescence decrease was also observed for high-affinity species in the presence of a high molar excess of NAD(P) and was shown to vary linearly with the NAD(P) concentration. Thus the fluorescence F associated with the saturation of the specific coenzyme binding sites could be easily computed from the measured fluorescence F_m by $F = F_m + a[\text{NAD(P)}]$, where a is the slope deduced from the experiments made with the high-affinity species. All calculations and curve fitting were carried out using SAS computer procedures.

Due to the low accuracy of the K_3 and K_4 determinations, the cooperative behavior of the subunits of the GAPDH to coenzyme binding was estimated from the ratio of macroscopic dissociation constants K_2/K_1 . Only a K_2/K_1 ratio significantly greater than 2.7 is indicative of anticooperativity. Indeed, if we consider a system where all n subunits are identical and

independent with a microscopic dissociation constant k , macroscopic constants are calculated using $K_i = i/(n - i + 1)k$. As a consequence, if $n = 4$, anticooperative behavior will only be significant if $K_2/K_1 > 2.7$.

(e) *Stopped-Flow Kinetic Measurements*. Fast kinetic measurements were carried out on a Biologic Instruments (SFM3) stopped-flow apparatus with a tungsten lamp as light source. The continuously measured absorbance was digitized and directly stored on a Tandon microprocessor. An average of at least five runs was performed for each determination of the rate constants. Data were analyzed with the Biokine software using nonlinear regression analysis. The dead time of the apparatus (under the conditions employed) was shown to be 1.4 ms by measuring the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by ascorbic acid (Tomomura et al., 1978).

Analysis of the Rate of the First Turnover of the Reaction. In the absence of P_i , acyl enzyme hydrolysis becomes rate limiting, allowing the measurement of the rate of NAD(P)H production during the first turnover of the reaction (Corbier et al., 1990b). Progress curves for the reaction of wild-type and mutant enzymes with G3P and NAD(P) were recorded at 340 nm and 25 °C. The concentrations of the reactants were 20 μM enzyme, 1 mM G3P, and 5 mM NAD(P). Both syringes contained 50 mM Tris and 2 mM EDTA buffer, pH 8.

Determination of the NAD(P)H Dissociation Rate from the Binary Complex GAPDH-NAD(P)H. The rate of NADH dissociation from GAPDH was measured by mixing a solution of the GAPDH-NADH binary complex with a trapping NADH solution containing lactate dehydrogenase and pyruvate. The decrease in NADH concentration was monitored by the decrease of absorbance at 340 nm. If the rate of NADH oxidation by lactate dehydrogenase (390 s^{-1} in our experimental conditions) is higher than the rate of NADH releasing from GAPDH, then the resulting progress curves could be decomposed into two exponentials: the first one will represent the titration of the excess of free NADH that is rapidly oxidized by the coupled system ($k = 390 \text{ s}^{-1}$), and the second one will correspond to the titration of NADH that dissociates from the binary complex GAPDH-NADH. A similar approach was used to determine the rate of NADPH dissociation from mutants: in this case, the trapping solution contained glutathione reductase (the rate of NADPH oxidation is 310 s^{-1} in our experimental conditions) and oxidized glutathione. In both experiments, GAPDH and NAD(P)H concentrations were adjusted so that at least three of the four sites were occupied with NAD(P)H (as checked by the amplitude of the second phase).

RESULTS

Justification of Mutations. Choice of amino acid substitutions was based on the complementary approaches of sequence comparison (see Table I) around residues 33–40 and molecular modeling (Corbier et al., 1990a, and discussion therein).

Steady-State Kinetic Analysis of Wild Type and Mutants. The kinetic parameters for wild type and various mutants are summarized in Table II. All the mutants have increased apparent Michaelis constants (K_M) for NAD with the following order: wild type $< S < D32A < D32A-S = B-S < D32E < D32N$; all except the D32E mutant revealed activity with NADP. A quite different order is observed for the apparent K_M value for NADP: $D32A-S < B-S < D32N < S = D32A$. No correlation is observed between the variation of K_M and k_{cat} values. Generally, the k_{cat}/K_M ratio is considered to be the most meaningful measure of enzyme substrate specificity

Determinants of Coenzyme Specificity in GAPDH

Table II: Kinetic Parameters of Wild-Type and Mutant GAPDHs^a

	NAD			NADP		
	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
wild type	0.1	70	700		ND ^c	
D32E	0.9	61	68		ND	
D32A	0.5	70	140	7.1	2	0.3
S ^b	0.4	70	175	7.1	15	2
D32N	2.8	22	8	3.6	14	4
B-S	0.8	80	100	2.7	18	7
D32A-S	0.8	7	9	1.3	18	14

^a The reaction was performed at 22 °C in 40 mM triethanolamine, 50 mM K₂HPO₄, and 0.2 mM EDTA buffer, pH 8.9. Each value is the average of at least three determinations. The standard deviation is below 20%. ^b From Corbier et al. (1990a). ^c ND, activity not detectable.

(Fersht, 1985). From this point of view, all mutations have a large effect on NAD specificity, especially for D32N and D32A-S mutants. Nevertheless, D32A-S mutation provides an enzyme more specific for NADP than NAD, although catalytic efficiency with NADP is 50-fold smaller than that of the wild type with NAD.

Effect of the Mutations on the Rate-Limiting Step. The fact that catalytic parameters k_{cat} and apparent K_M with NAD(P) were modified by mutations raised the question whether the rate-limiting step is the same for the wild type (Trentham, 1971a,b; Corbier et al., 1990b) and mutants and thus whatever the coenzyme used.

Two dual-coenzyme-specific mutants were chosen to address these questions: the S mutant, more specific for NAD than NADP (with k_{cat}/K_M values of 175 and 2, respectively), and the D32A-S mutant, more specific for NADP than NAD (k_{cat}/K_M values of 14 and 9, respectively).

In the absence of P_i, at pH higher than 8, fast kinetic experiments showed a burst of NAD(P)H production at a rate of 700–800 s⁻¹ for both mutants, similar to that observed with the wild type with NAD as a coenzyme (curves not shown). These results indicate that the rate-limiting step process takes place after the hydride-transfer step. Therefore, the limiting step could only be associated with either (a) NAD(P)H release from the acyl enzyme intermediate, (b) NAD(P) binding to the acyl enzyme intermediate, or (c) the phosphorylating step. The fact that the maximal velocity was not dependent on the chemical nature of the acyl enzyme acceptor, i.e., phosphate or arsenate, excluded hypothesis c (data not shown). Hypothesis a was tested using an electron chemical [phenazine methosulfate and 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Abdallah & Biellmann, 1980] or enzymatic (cytochrome *c* reductase) relay system. Unfortunately, both systems were shown to oxidize NAD(P)H far too slowly to allow determination of the NAD(P)H dissociation rate (data not shown).

Thus, only the NAD(P)H dissociation rate from binary complexes GAPDH–NAD(P)H was determined using lactate dehydrogenase and glutathione reductase as NADH and NADPH trapping systems, respectively. This approach was used successfully for malate dehydrogenase (Lodola et al., 1978). As indicated in Table III, the NADH dissociation rate from wild-type GAPDH is similar to the k_{cat} value, i.e., 70 s⁻¹. If the limiting step is assumed to be NADH release from the acyl enzyme intermediate as already postulated (Trentham, 1971a,b; Liu & Huskey, 1992), this would indicate a similar rate of NADH release for both binary and ternary complexes.

As shown in Table III, coenzyme dissociation rate constants for S and D32A-S mutants are estimated to 117 and 298 s⁻¹

Table III: Dissociation Rate Constant of NAD(P)H from the Binary Complex Formed with Wild-Type, S, and D32A-S GAPDHs^a

	NADH (s ⁻¹)	NADPH (s ⁻¹)
wild type	67	ND ^b
S	117	226
D32A-S	298	133

^a For NADH dissociation rate determination, a solution of 60 μM lactate dehydrogenase and 20 mM pyruvate was rapidly mixed with an equal volume of NADH and GAPDH, 30 μM and 30 μN for wild type, 80 μM and 40 μN for the S mutant, and 40 μM and 40 μN for the D32A-S mutant, respectively. The rate of oxidation of free NADH by lactate dehydrogenase was shown to be 390 s⁻¹. For NADPH dissociation rate determination, a solution of 50 μM glutathione reductase and 4 mM oxidized glutathione was mixed with an equal volume of 50 μM NADPH and 30 μN S or D32A-S mutants. The rate of oxidation of free NADPH by glutathione reductase was shown to be 310 s⁻¹. Both syringes contained 50 mM Tris and 2 mM EDTA buffer, pH 8.2, with the ionic strength adjusted to 0.15 M. In the same buffer, in the presence of 50 mM K₂HPO₄, the k_{cat} value of the wild type is 70 s⁻¹. The standard deviation is below 5%. ^b ND, not determined.

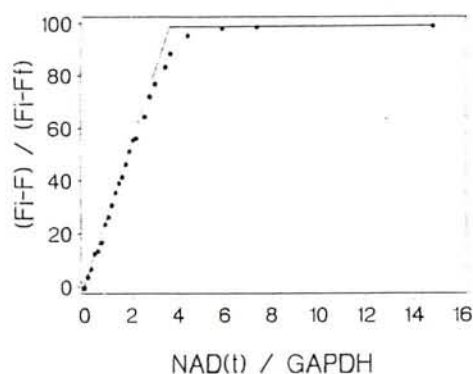


FIGURE 1: NAD binding curve of wild-type GAPDH. The enzyme concentration was 13.5 μM in 100 mM Tris–0.2 mM EDTA, pH 8. The fluorescence intensity F monitored at 330 nm was expressed as $(F_1 - F)/(F_1 - F_0)$, where F_1 and F_0 represent the fluorescence intensity in the absence of NAD and in the presence of a great molar excess of NAD, respectively. Typically the F_1/F_0 ratio is about 0.63 for wild-type and various mutant GAPDHs.

for NADH and 226 and 133 s⁻¹ for NADPH, respectively. These rates are greater than the k_{cat} values, i.e., 70 and 7 s⁻¹ for NADH and 15 and 18 s⁻¹ for NADPH. Assuming the same hypothesis as for the wild type, such results suggest that the limiting rate for both mutants would not be NAD(P)H release from the acyl enzyme intermediate and argue in favor of a limiting step associated with NAD(P) binding (which could include a limiting conformational transition step) to the acyl enzyme entity.

Binding of NAD(P) to Wild-Type and Mutant GAPDHs. To determine whether K_M values for NAD(P) could be considered as indicative of the affinity constant for the different mutants tested, two additional experimental approaches were taken.

First, the binding of NAD(P) was studied by measuring the quenching of the GAPDH tryptophan fluorescence intensity observed upon coenzyme binding. The *B. stearothermophilus* GAPDH contains two Trp residues at positions 84 and 310 (Branlant et al., 1989). Absorption and fluorescence spectra of native and mutant GAPDHs were similar (curves not shown), and the maximum emission wavelength of native and mutant enzymes was 330 nm. Due to its positioning within the active site, Trp310 is believed to be the highest emitting fluorescent probe on the basis of phosphorescence studies (Gabellieri & Strambini, 1989). As shown in Figure 1, the binding of NAD to the wild-type enzyme under our experimental conditions was stoichiometric with a

Table IV: NAD(P) Macroscopic Dissociation Constants to Wild-Type and Mutant GAPDHs^a

	K_1 (μM)	K_2 (μM)	K_3 (μM)	K_4 (μM)	\bar{K} (μM)	K_2/K_1
(A) Macroscopic Dissociation Constants of NAD						
wild type	0.04 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.45 ± 0.2	1.3 ± 0.6	0.26 ± 0.07	4.7 ± 0.65
S	0.30 ± 0.06	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.1	19 ± 1	1.5 ± 0.2	2.7 ± 1.2
D32A	0.27 ± 0.08	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.2	500 ± 200	3.0 ± 0.8	3.7 ± 1
B-S	3.5 ± 1	13 ± 2	800 ± 700	800 ± 700	70 ± 30	3.7 ± 0.6
D32N	19 ± 3	31 ± 2	180 ± 30	1400 ± 200	110 ± 10	1.6 ± 0.2
D32A-S	40 ± 20	300 ± 100	1700 ± 900	420 ± 90	300 ± 100	7.5 ± 0.6
D32E	130 ± 30	5.1 ± 0.8	50 ± 10	300 ± 100	60 ± 10	0.04 ± 0.01
(B) Macroscopic Dissociation Constants of NADP						
wild type	180 ± 10	360 ± 80	1400 ± 900	400 ± 100	440 ± 90	2 ± 0.5
S	40 ± 20	150 ± 70	2000 ± 1000	400 ± 200	250 ± 100	3.8 ± 3.6
D32A	70 ± 40	390 ± 20	800 ± 500	440 ± 90	310 ± 80	5.6 ± 0.9
B-S	30 ± 5	80 ± 10	3000 ± 1000	700 ± 300	270 ± 60	2.7 ± 0.5
D32N	67 ± 9	150 ± 30	200 ± 100	700 ± 200	190 ± 50	2.2 ± 0.4
D32A-S	1.4 ± 0.4	10 ± 5	350 ± 40	1700 ± 300	55 ± 10	7.1 ± 5.6

^a Binding experiments and data analysis were performed as indicated in Materials and Methods. Dissociation constants are expressed as means ± standard deviation. The dissociation constants above 200 μM are only indicative. The dissociation constants of NADP to the D32E mutant are not given because of too low affinities. \bar{K} is the overall macroscopic dissociation constant given by $\bar{K} = (K_1 K_2 K_3 K_4)^{1/4}$.

plateau for one NAD per site. Moreover, in these conditions the fluorescence decrease was clearly linear, validating the assumption that the binding of NAD to each enzyme subunit induced the same fluorescence decrease. Due to limitation in protein material and experimental conditions, very low binding constants ($K_1 > 200 \mu\text{M}$) could not be evaluated accurately. For these reasons, the low K_3 and K_4 binding constants of several mutants for NAD(P), and the resulting overall macroscopic dissociation constant \bar{K} , should be taken only as indicative. Therefore, cooperative properties will be discussed on the basis of the K_1 and K_2 values and the corresponding ratio K_2/K_1 . The results obtained for mutant GAPDHs are summarized in Table IV [NAD(P) binding to D32E is not considered]. Thus, K_1 and K_2 constants for NAD binding increased by factors up to 1000 and 1580, respectively, with the following binding sequence: wild type < S \approx D32A \ll B-S < D32N < D32A-S. The order for NADP binding is almost the reverse, except for D32N, K_1 and K_2 values decreasing by factors of up to 130 and 36, respectively. Clearly, the D32A-S mutation provides the best affinity for NADP. Apart from the D32E mutant, the other mutants have a K_2/K_1 ratio around 2.7. This indicates that they exhibit no cooperativity or slight anticooperative behavior with either NAD or NADP at least for the first two subunits. Nevertheless, it appears that position 32 is of crucial importance to cooperativity with NAD. While wild type and D32A mutants show slight anticooperativity, D32N abolishes it whereas the D32E mutation provides strong positive cooperativity.

As further indication of coenzyme binding, the dissociation constant K_D for NAD(P) was determined using 3-CAPAD as an affinity-labeling probe by measuring the protection against inactivation afforded by the coenzyme binding (Corbier et al., 1990a,b; Branlant et al., 1982). The deduced K_D value provides a measure of macroscopic binding and overcomes the experimental limitations of the fluorescence quenching at high concentrations of coenzyme. The NAD and NADP dissociation constants K_D for the three mutants, D32A, S, and D32A-S (Table V), varied in a manner similar to that for K_1 , K_2 , or \bar{K} determined by fluorescence studies, indicating a consistent interpretation of the experimental data. It is important to note that the constants, i.e., K_1 , K_2 , \bar{K} , K_D , and K_M , tend to show the same trends.

The K_D values of 3-CAPAD itself were also determined and are shown to vary in the same way as with NAD, not surprising since 3-CAPAD is a coenzyme analogue of NAD

Table V: Dissociation Constants of 3-CAPAD, NAD, and NADP to Wild-Type and Mutant GAPDHs from *B. stearothermophilus* As Determined by Affinity Labeling with 3-CAPAD^a

	k (min^{-1})	$K_D(3\text{-CAPAD})$ (μM)	$K_D(\text{NAD})$ (μM)	$K_D(\text{NADP})$ (μM)
wild type	3.5	22	0.9	35
D32A	3.2	28	0.6	57
S	2.5	25	1.1	36
D32A-S	2.8	423	126	3.4

^a Inactivation of apo wild-type (0.8 μN), D32A (1.2 μN), S (0.8 μN), and D32A-S (5 μN) mutants was studied at 22 °C in 0.1 M TES and 0.2 mM EDTA buffer, pH 8.4. The concentrations of 3-CAPAD used were a function of the K_D values (between 0.5 and 5 of the K_D value). In all cases, the 3-CAPAD inactivation process followed pseudo-first-order kinetics. Inactivation rate constants (k) and dissociation constants (K_D) of 3-CAPAD were determined from curves representing the double-reciprocal plot of the apparent inactivation rate k_{app} versus 3-CAPAD concentration. NAD(P) dissociation constants were determined from plots of k_{app}^{-1} versus NAD(P) concentration at a fixed concentration of 3-CAPAD, i.e., 12, 23, 58, and 106 μM for the wild-type, D32A, S, and D32A-S mutants, respectively. The resulting curves were interpreted according to Kitz and Wilson (1969), Meloche (1967), and Branlant et al. (1982).

which is chemically modified on the pyridinium ring (Biellmann et al., 1973). The magnitude of the rate constant for the alkylation (k) is probably determined primarily by the position of the chloromethyl group relative to Cys149. For wild-type and mutated GAPDHs, k values are closely similar, showing that, prior to inactivation, the orientation of the chloromethyl group and the Cys149 side chain is similar in the wild-type and mutant enzyme binary complexes.

DISCUSSION

Analysis of the structural differences observed between the apo and holo-GAPDH structures has led to the proposal of a mechanism which accounts for the conformational changes associated with NAD binding (Skarzynski & Wonacott, 1988). According to this mechanism, the ADP moiety of NAD can first bind to GAPDH in the apo conformation. Domain closure, which is postulated to be required for productive binding of the nicotinamide moiety, would also generate improved interactions at the adenosine subsite. The holo structure model shows that the acidic residue Asp32 is involved in the specific binding of the adenosine ribose through hydrogen bonds with both hydroxyl groups of the ring. Moreover, the carboxylate group is also held in place by hydrogen bonds from the main-chain NH groups of residues 8 and 33 situated

Determinants of Coenzyme Specificity in GAPDH

at the carboxy-terminal ends of the adjacent strands of the β sheet that form the $\beta\alpha\beta$ motif of the ADP binding fold (Skarzynski & Wonacott, 1988).

The absence of activity with GAPDH from *B. stearothermophilus* with NADP as a cofactor was previously postulated to be the consequence of at least three factors (Corbier et al., 1990a): (1) steric hindrance; the activity of the S mutant from *B. stearothermophilus* with NADP supported this hypothesis (Corbier et al., 1990a); (2) the presence of the charged carboxyl group as Asp32 which would generate strong electrostatic repulsion of the 2'-PO₄; (3) the absence of hydrophilic amino acids at the adenosine subsite whose role would be to stabilize the binding of NADP by hydrogen bonds with the 2'-PO₄.

Our results clearly show that steric factors are indeed one of the principal determinants of coenzyme specificity. Replacing Leu187-Pro188 by Ala-Ser (S mutation) in the D32A mutant results in a significant increase of the affinity for NADP. In contrast, D32A or S mutations give only low affinity for NADP. For the D32A-S and D32A mutants, we found a 50- and 40-fold decrease in the K_1 and K_2 values, respectively, while factors of only 2.5 for K_1 and 1 for K_2 are observed between wild type and the D32A mutant. These results support our previous molecular modeling (Corbier et al., 1990a) which showed that NADP could fit the coenzyme binding pocket of the holoenzyme only if steric hindrance is relieved for the 2'-PO₄ group. On the contrary, NAD shows the opposite behavior; that is, the more space that is available, the weaker its binding. Thus, replacing Leu187-Pro188 by Ala-Ser in the D32A mutant results in a drastic reduction in the affinity for NAD. For the S and D32A-S mutants we observe a 130- and 380-fold decrease in the K_1 and K_2 values, respectively, whereas only a factor of 7.5 for K_1 and 4 for K_2 is observed between wild type and the S mutant. Mutational effects are qualitatively additive, but their magnitude is not readily predicted. This is illustrated well by the behavior of the D32A-S mutant which binds NADP efficiently but NAD poorly while D32A and S mutants individually bind NAD quite well but NADP weakly (see Tables II, IV, and V).

An electrostatic repulsive contribution also intervenes in determining the cofactor specificity of GAPDH. Recent crystallographic studies of the S mutant at pH 6.9 showed that the 2'-PO₄ of NADP is positioned outside the adenosine subsite so as to minimize unfavorable interaction with Asp32, which is presumed to remain negatively charged. Only a single hydrogen bond between Asp32-OD1 and NADP-O3' atoms remains (Wonacott, unpublished observations). Our binding and kinetic studies done at pH higher than 8 are in agreement with these results. First, no NADP activity is detected with the D32E mutant, while good activity is still observed with NAD. Second, dual-coenzyme specificity is observed with the D32N mutant where replacement of Asp32 by Asn could be considered as a conservative mutation with a steric bulk largely unaltered. Here both cofactors bind to the mutant but with a low affinity, which suggests that the Asp residue is present as a carboxylate, with its negative charge localized within the adenosine subsite.

Our results partly contradict the fact that the Asp32 residue is invariant in all chloroplast GAPDHs which are dual-coenzyme specific. Our previous molecular modeling study (Corbier et al., 1990a) assigned a possible specific role to the invariant residues Thr33 (chloroplast gene A) or Ser33 (chloroplast gene B), Gly34, and Gly35, which are Leu, Thr, and Asp, respectively, in the GAPDH from *B. stearothermophilus* (Corbier et al., 1990a) (Table I). On the one hand, the presence of Thr or Ser at position 33 is expected to

increase the hydrophilicity of the adenosine subsite while the presence of residues Gly34 and Gly35 would give the peptide loop 32-36 more flexibility and hence potential space for the 2'-PO₄ of NADP. The combined mutations, i.e., L33T-T34G-D35G (B mutations) carried out on the S mutant, however, do not improve significantly the affinity for NADP while substituting Ala32 for Asp32 on the double mutant does. Other subtle adjustments in the adenosine subsite are therefore needed to reconcile the presence of the carboxylate group of Asp32 and the 2'-phosphate of NADP. The conversion of an NAD glycolytic GAPDH into an efficient chloroplast GAPDH² in which an aspartate residue is retained at position 32 requires further investigation.

Recent studies based on structural considerations and sequence homology in both NADP and dual-specific glutamate dehydrogenases, most of which possess a conserved acidic residue located at the C-terminus of the $\beta\alpha\beta$ motif, have led Baker et al. (1992) to suggest the existence of two distinct classes of NADP dehydrogenases which could be differentiated by their preference for either the monobasic or dibasic 2'-phosphate. In the case of the monobasic form, one of the phosphate oxygen atoms is protonated and could act as a hydrogen bond donor to the carboxyl group of Asp. Dual-specific GAPDH and glutamate dehydrogenase are suggested to belong to the latter class (Baker et al., 1992). An NMR titration study of the 2'-PO₄ of NADP (Ehrlich & Colman, 1992) bound to chloroplast GAPDH and a comparative study with dual-coenzyme-specific mutant GAPDHs would be very informative in the above regard.

Analysis of the different kinetic steps suggests that the limiting step for the wild type is associated with NADH release from the acyl enzyme intermediate as already postulated by Trentham (1971a,b). This behavior seems to be different for the S and D32A-S mutants. The limiting rate is most likely associated to the NAD(P) binding to the acyl enzyme intermediate which could lead to a partial apo-holo transition of the ternary complex. Recent crystallographic studies carried out on the binary complex S mutant-NADP support this interpretation. A rotation of the coenzyme domain relative to the catalytic domain of only 1.5° (Wonacott, unpublished observation) was observed instead of 4.3° observed for NAD binding to the wild type (Skarzynski & Wonacott, 1988). (However, the full apo-holo transition is not precluded during the formation of the active ternary complex of GAPDH-cofactor-substrate). Incomplete conformational holo transition could explain the low catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) and higher K_D values of mutants toward NAD and NADP since only the full inherent binding energy is available when the transition is complete. The best value for k_{cat}/K_M and K_D for NADP was observed for the D32A-S mutant. On this triple mutation there is a switch in favor of NADP specificity, but with a k_{cat}/K_M ratio 50-fold less than that observed for the wild type with NAD.

Comparison of the K_2/K_1 ratios for NAD binding to D32X mutants (Asn, Glu) suggests that position 32 could play an essential role for cooperative behavior. Replacing Asp32 by Glu reveals positive cooperativity for the first two subunits. This was not expected and remains to be explained at the molecular level. The results support the hypothesis of a predominant role of the adenosine subsite in revealing cooperative properties provided a right positioning of the nicotinamide moiety of NAD as already suggested (Schlessinger & Levitski, 1974; Schlessinger et al., 1975; Henis & Levitski, 1977, 1980; Glöggler et al., 1982). All the mutants seem to bind the pyridinium ring in a fashion similar to that of the NAD in the wild type. There are three arguments in favor

of this hypothesis. First, the total fluorescence quenching of GAPDH in the presence of NAD(P) versus apoGAPDH is similar for all mutants, suggesting a similar positioning of the pyridinium ring toward Trp310 in all mutants. Second, the positioning of the nicotinamidium moiety of NADP bound to the S mutant superimposes well with that of the NAD in the wild-type structure (Wonacott, unpublished results). Third, the inactivation rate of GAPDH by 3-CAPAD is similar for the wild type, D32A, S, and D32A-S mutants, thus indicating a similar orientation of the alkylating function situated at the C3 position of the pyridinium toward Cys149. However, cooperative properties are depending on the nature of the mutations. This strongly suggests that (1) a partial efficient binding of the adenosine ring does not prevent a correct positioning of the pyridinium ring and (2) a correct positioning of the pyridinium ring is necessary but not sufficient for inducing cooperativity.

As mentioned above, other mutagenesis studies have probed NAD(P) specificity (Chen et al., 1991; Fan et al., 1991; Feeny et al., 1990; Scrutton et al., 1990; Nishiyama et al., 1993; Bocanegra et al., 1993). Clearly, all the reports support the idea that many residues contribute to binding and specificity for the NAD(P) coenzyme and that the same mutation introduced in the adenosine subsite of different dehydrogenases can give quite different effects on the binding and the catalytic constants. Therefore, it is difficult from a rationale to predict all the structural factors that could be implicated in determining specificity for a coenzyme. This is particularly the case for GAPDH where specificity also depends on structural determinants situated at subunit interfaces of the tetramer. Only structural data on the mutants with both cofactors bound can reveal the precise role of the amino acid residues which influence coenzyme specificity.

ACKNOWLEDGMENT

We thank E. Habermacher, J. P. Declé, and S. Boutserin for efficient technical help and Dr. J. F. Biellmann for a generous gift of 3-CAPAD.

REFERENCES

- Abdallah, M. A., & Biellmann, J. F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 112, 331–333.
- Baker, P. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Rob, A., & Stillman, T. J. (1992) *J. Mol. Biol.* 228, 662–671.
- Benachenhou, N., & Baldacci, G. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 230, 345–352.
- Biellmann, J. F., Branlant, G., Foucaud, B., & Jung, M. (1973) *FEBS Lett.* 40, 29–32.
- Biesecker, G., Harris, J. I., Thierry, J. C., Walker, J. E., & Wonacott, A. J. (1977) *Nature* 266, 328–333.
- Bocanegra, J. A., Scrutton, N. S., & Perham, R. N. (1993) *Biochemistry* 32, 2737–2740.
- Bork, P., & Grunwald, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* 191, 347–358.
- Branlant, G., Eiler, B., Wallen, L., & Biellmann, J. F. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 519–524.
- Branlant, C., Oster, T., & Branlant, G. (1989) *Gene* 75, 145–155.
- Brinkmann, H., Cerff, R., Salomon, M., & Soll, J. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13, 81–94.
- Cerff, R. (1978) *Phytochemistry* 17, 2061–2067.
- Chen, Z., Lee, W. R., & Chang, S. H. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202, 263–267.
- Corbier, C., Clermont, S., Billard, P., Skarzynski, T., Branlant, C., Wonacott, A., & Branlant, G. (1990a) *Biochemistry* 29, 7101–7106.
- Corbier, C., Mougou, A., Mely, Y., Adolph, H. W., Zeppezauer, M., Gerard, D., Wonacott, A., & Branlant, G. (1990b) *Biochimie* 72, 545–554.
- Ehrlich, R. S., & Colman, R. F. (1992) *Biochemistry* 31, 12524–12531.
- Fan, F., Lorenzen, J. A., & Plapp, B. V. (1991) *Biochemistry* 30, 6397–6401.
- Feeny, R., Clarke, A. R., & Holbrook, J. J. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 667–672.
- Ferdinand, W. (1964) *Biochem. J.* 92, 578–585.
- Ferri, G., Comerio, G., Iaradola, P., Zapponi, M. C., & Speranza, M. L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 19–31.
- Ferri, G., Stoppini, M., Meloni, M. L., Zapponi, M. C., & Iaradola, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1041, 36–42.
- Fersht, A. (1985) in *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed., pp 311–346, W. H. Freeman, New York.
- Gabellieri, E., & Strambini, G. B. (1989) *Biophys. Chem.* 33, 257–264.
- Glöggler, K. G., Balasubramanian, K., Beth, A. H., Park, J. H., & Trommer, W. E. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 706, 197–202.
- Hanukoglu, I., & Gutfinger, T. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180, 479–486.
- Henis, Y. I., & Levitzki, A. (1977) *J. Mol. Biol.* 117, 699–716.
- Henis, Y. I., & Levitzki, A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5055–5059.
- Kitz, R., & Wilson, I. B. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3245–3249.
- Kumar, A., Shen, P. S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G., & Samuelson, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10188–10192.
- Liaud, M. F., Zhang, D. X., & Cerff, R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8918–8922.
- Liu, L., & Huskey, W. P. (1992) *Biochemistry* 31, 6898–6903.
- Lodola, A., Shore, J. D., Parker, D. M., & Holbrook, J. J. (1978) *Biochem. J.* 175, 987–998.
- Loeber, G., Infante, A. A., Maurer-Fogy, I., Krystek, E., & Dworkin, M. B. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3016–3021.
- Martin, W., & Cerff, R. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 323–331.
- Meloche, H. P. (1967) *Biochemistry* 6, 2273–2280.
- Mougou, A., Corbier, C., Soukri, A., Wonacott, A., Branlant, C., & Branlant, G. (1988) *Protein Eng.* 2, 45–48.
- Nishiyama, M., Birktoft, J. J., & Beppu, T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 4656–4660.
- Quigley, F., Martin, W. F., & Cerff, R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2672–2676.
- Quigley, F., Brinkmann, H., Martin, W. F., & Cerff, R. (1989) *J. Mol. Evol.* 29, 412–421.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Bränden, C. I., & Banaszak, L. J. (1975) *Enzymes (3rd Ed.)* 11, 61–102.
- Schlessinger, J., & Levitzki, A. (1974) *J. Mol. Biol.* 82, 547–561.
- Schlessinger, J., Steinberg, I. Z., & Levitzki, A. (1975) *J. Mol. Biol.* 91, 523–528.
- Scrutton, N. S., Berry, A., & Perham, R. N. (1990) *Nature* 343, 38–43.
- Shih, M. C., Lazar, G., & Goodman, H. M. (1986) *Cell* 47, 73–80.
- Shih, M. C., Heinrich, P., & Goodman, H. M. (1991) *Gene* 104, 133–138.
- Skarzynski, T., & Wonacott, A. J. (1988) *J. Mol. Biol.* 203, 1097–1118.
- Skarzynski, T., Moody, P. C. E., & Wonacott, A. J. (1987) *J. Mol. Biol.* 193, 171–187.
- Stelandre, M., Bosseloir, Y., De Bruyn, J., Maes, P., & Content, J. (1992) *Gene* 121, 79–86.
- Teller, J. K., Smith, R. J., Mc Pherson, M. J., Engel, P. C., & Guest, J. R. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206, 151–159.
- Tonomura, B., Nakatani, H., Oh Nishi, M., Yamaguchi-Itto, J., & Hiromi, K. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 370–378.
- Trentham, D. R. (1971a) *Biochem. J.* 122, 59–69.
- Trentham, D. R. (1971b) *Biochem. J.* 122, 71–77.
- Wierenga, R. K., De Maeyer, M. C. H., & Hol, W. G. J. (1985) *Biochemistry* 24, 1346–1357.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P., & Hol, W. G. J. (1986) *J. Mol. Biol.* 187, 101–107.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Le rôle des résidus de la signature P1-P7	95
II. La reconnaissance du NADP	98
III. Conclusions.....	107
IV. Perspectives	110

L'objectif du travail présenté dans cette thèse était de répondre aux questions suivantes : quels sont les facteurs moléculaires responsables de la spécificité de cofacteur des oxydoréductases à NAD(P) et, en particulier, ceux responsables de la dualité de cofacteur NAD et NADP de certaines déshydrogénases. C'est dans ce but que nous avons choisi la GAPDH phosphorylante, strictement NAD-spécifique, comme modèle d'investigation. Dans le cadre de cette discussion, nous essayerons de replacer les résultats obtenus dans le contexte des connaissances actuelles sur les oxydoréductases à spécificité de cofacteur stricte d'une part, à dualité de spécificité de cofacteur, d'autre part. Nous tracerons, enfin, quelques perspectives d'études complémentaires sur les GAPDH qui découlent de notre travail.

I. LE RÔLE DES RÉSIDUS DE LA SIGNATURE P1-P7

IA. LA STRUCTURE DE TYPE I : UN DÉTERMINANT DE LA NAD-SPÉCIFICITÉ

La comparaison des structures primaires et tridimensionnelles d'enzymes liant le NAD et le FAD suggérait qu'en position P7, la chaîne latérale d'un résidu Asp ou Glu participe à la fixation du cofacteur (cf Introduction §IA2a p.7). Nos résultats sur la GAPDH glycolytique strictement NAD-dépendante montrent en effet que ce résidu est un déterminant de la NAD-spécificité, toute mutation en P7 affectant l'efficacité enzymatique k_{cat}/K_M et l'affinité de l'enzyme pour le NAD (K_1 , K_2 ou K) d'un facteur au moins 5. Cet effet doit être essentiellement la conséquence de la perte de l'énergie de liaison des deux liaisons H entre P7 et les hydroxyles en 2' et 3' du ribose de l'adénosine. En effet, la mesure des constantes de dissociation K_1 ou K permet d'estimer que l'effet des mutations D32A, D32G et D32N sur l'énergie libre de liaison ΔG est de l'ordre de 1,2, 4 et 3,5 kcal/mol, respectivement, ce qui correspond à l'énergie d'au moins une liaison H. D'autres études sur des déshydrogénases strictement NAD-spécifiques (ADH de levure (Fan *et al.*, 1991), de drosophile (Chen *et al.*, 1991), LDH (Feeney *et al.*, 1990), dihydroptéridine réductase (Matthews *et al.*, 1991 ; Grimshaw *et al.*, 1992)) conduisent à des résultats analogues sur l'efficacité enzymatique et confirment la généralité de cette hypothèse.

De plus, l'analyse des structures d'oxydoréductases possédant un repliement de Rossmann avait permis à Baker *et al.* (1992b) de montrer que P7 était inclus dans un réseau de liaisons H avec le NAD et P2 (le motif structural de type I, figure 5 p. 11), qui dépendrait de la présence d'une Gly en P6. Ce motif pourrait être également un déterminant de la spécificité de reconnaissance du NAD. La résolution récente de la structure d'un mutant de la Glutathione Réductase (GRS), strictement NADP-dépendante, dans lequel l'Ala en P6 est remplacée par une Gly et la Val en P7 par un Glu, révèle effectivement que le NAD est lié selon une structure de type I alors que l'enzyme sauvage fixe

le NADP selon une structure de type II (Mittl *et al.*, 1993). De plus, la mutation Ala→Gly en P6 permet d'améliorer l'efficacité enzymatique avec le NAD (Scrutton *et al.*, 1990) alors que la mutation inverse sur la Lipoamide Déshydrogénase (LIP), une enzyme strictement NAD-dépendante dont la structure tridimensionnelle est très semblable (tableau 1 p. 4bis) diminue fortement cette efficacité (Bocanegra *et al.*, 1993). La présence d'une Gly en P6 permettrait donc la structuration de type I du site du cofacteur, assurant ainsi le bon positionnement de l'Asp ou du Glu en P7 pour la liaison du NAD (figure 5 p. 11).

IB. LE RÉSIDU ACIDE EN P7 : UN ANTIDÉTERMINANT NADP DES OXYDORÉDUCTASES STRICTEMENT NAD-DÉPENDANTES

Le remplacement du résidu acide en P7 par un résidu neutre (Ala, Asn ou Gly) dans la GAPDH NAD-spécifique permet de générer un mutant actif avec le NADP (tableau II, article 2 p. 91 et tableau 4 p. 77). C'est le cas également d'autres déshydrogénases strictement NAD-dépendantes comme l'ADH de levure (Fan *et al.*, 1991) ou de drosophile (Chen *et al.*, 1991). Inversement, l'efficacité enzymatique de l'ADH NADP-dépendante de *Thermoanaerobium brockii* est altérée par la substitution Gly→Asp en P7 (Zhang *et al.*, 1993). Ces résultats sont corroborés par le fait que le résidu acide en P7 des enzymes strictement NAD-dépendantes des familles de la FNR (Correll *et al.*, 1993) des oxydoréductases à disulfure (Mittl *et al.*, 1993) (tableau 6 p. 97) et de la MDH (Nishiyama *et al.*, 1993) est systématiquement remplacé par un résidu différent de Asp ou Glu dans leurs homologues strictement NADP-dépendantes. La présence d'un Asp ou d'un Glu en cette position apparaît donc comme un antidéterminant pour une liaison productive du NADP aux déshydrogénases strictement NAD-dépendantes. Néanmoins, sa mutation seule ne suffit généralement pas à transformer une enzyme NAD-spécifique en une enzyme NADP-spécifique efficace (à l'exception de l'ADH de drosophile (Chen *et al.*, 1991)). Ceci implique donc l'existence d'autres déterminants de spécificité NADP.

L'étude de plusieurs autres mutants de la GAPDH nous a permis de préciser le rôle de P7 au niveau de ses effets électrostatiques sur la liaison du NADP. L'étude des propriétés cinétiques des mutants D32E et D32N suggère que le résidu Asp existe sous la forme carboxylate dans la GAPDH sauvage. En effet, le mutant D32E n'est actif qu'avec le NAD, alors que le mutant D32N, où l'Asp est remplacé par un résidu isostère neutre, est actif avec le NAD et le NADP (tableau II article 2 p. 91). L'analyse cristallographique du complexe S-NADP confirme cette hypothèse. Dans cette structure, le groupement 2'-phosphate est orienté vers le solvant et la distance entre les atomes OD2 de l'Asp32 et AO2' du ribose est supérieure de 0,6 Å à la distance correspondante dans la GAPDH sauvage, révélant une répulsion électrostatique (figure 23 p. 72).

Enzyme	Résidus du site du 2'-phosphate	Localisation dans la structure		Référence
DOMAINE DU NADP A REPLIEMENT DE ROSSMANN			Nature de P7	
OXYDOREDUCTASES A NADP				
Dihydrofolate réductase (DHFR)	Arg43 Thr63 His64(NH) Gln65	boucle β_A - α_B boucle β_B - α_C : P8 P9 P10	Leu	Adams <i>et al.</i> , 1989 (<i>E. coli</i>) Huang <i>et al.</i> , 1990 (Homme)
FLAVOENZYMES				
Oxydoréductases à disulfure				
Glutathione réductase- (GRS)	Arg218 His219 Arg224	boucle β_B - α_C : P8 P9 P14	Val/Ile/ Tyr	Scrutton <i>et al.</i> , 1990
Thiorédoxine réductase	Arg176	boucle β_B - α_C : P8	His	
Trypanothione réductase	Tyr221 Arg222 Arg228	P7 boucle β_B - α_C : P8 P9	Tyr	
Réductase mercurique	Arg365 Ser366	boucle β_B - α_C : P8 P9	Ala/Gln	
Famille de la FNR				
Ferrédoxine NADP réductase (FNR)	Ser234 Arg235 Lys244 Tyr246	P7 boucle équivalente à β_B - α_C : P8 P17 P19	Ser	Sem & Kasper, 1993 Aliverti <i>et al.</i> , 1991
TONNEAUX ($\alpha\beta$)₈				
Aldose réductase (ADS)	Lys262 Val264(NH) Thr265 Ser263 Arg268	boucle β_8 - α_8 " " " Hélice α_8		Bohren <i>et al.</i> , 1991
AUTRES				
Isocitrate déshydrogénase (ICD)	Arg292 Tyr345 Tyr391 Arg395	2 nd e sous-unité du dimère boucle β_D - α_I α_L α_L		

Tableau 6 : Les sites de liaison du 2'-phosphate du NADP dans les oxydoréductases

La description des sites est extraite des références citées dans le tableau 1 p. 4 et 4bis pour les enzymes à repliement de Rossmann, dans le texte de l'Introduction pour les autres types de structures. Les résidus participent à la liaison du 2'-phosphate via leur chaîne latérale ou leur groupement NH peptidique (noté NH). Le rôle des résidus indiqués en gras a été testé par mutagenèse dirigée (références citées dans ce tableau). Les résidus immédiatement consécutifs à P7 sont numérotés P8, P9... La nature de P7 peut être variable suivant l'origine de l'enzyme.

IC. LE CAS DES ENZYMES À DUALITÉ DE COFACTEUR

Aucune structure tridimensionnelle d'enzyme à dualité de spécificité NAD(P) n'est actuellement connue. Cependant, vu les taux d'identité de séquence primaire élevés au sein des deux familles des GDH (Teller *et al.*, 1992) et des GAPDH, les structures tridimensionnelles de la GDH de *Clostridium symbiosum* (*C. symbiosum*)(figure 26B p. 99) et de la GAPDH glycolytique, strictement NAD-dépendantes, peuvent être utilisées comme modèles d'étude pour les GDH de vertébrés et les GAPDH chloroplastiques, respectivement, qui présentent une dualité de spécificité. Ces dernières possèderaient donc un repliement de Rossmann, avec en P6 une Gly et en P7 un Asp ou un Glu (tableau I article 2 p. 89 pour les GAPDH, et figure 26A p. 99 pour les GDH). Ceci suggère fortement que ces enzymes lient le NAD au niveau du motif structural de type I décrit au §IA2b de l'Introduction (p. 9), comme c'est le cas pour la plupart des oxydoréductases strictement NAD-dépendantes, expliquant ainsi comment le NAD se fixe de façon productive (cf §IA).

Néanmoins, contrairement aux enzymes strictement NAD-dépendantes, le résidu acide en P7 ne peut plus être considéré comme un antidéterminant de la liaison du NADP. La reconnaissance du NADP implique donc l'existence d'un site de liaison adapté au 2'-phosphate, suffisamment large pour accepter ce groupement et possédant des éléments structuraux capables de le stabiliser dans le site enzymatique, en présence d'un résidu acide en P7.

II. LA RECONNAISSANCE DU NADP

IIA. LES EFFETS STÉRIQUES

Nous avons prouvé par mutagenèse dirigée sur la GAPDH glycolytique NAD-dépendante l'importance des effets stériques sur l'affinité du NADP, les résidus en positions 187 et 188 apparaissant comme l'un de ces déterminants "stériques" majeurs. Ces résidus sont situés dans la S-loop, qui constitue un élément crucial de la structure des GAPDH. En effet, elle se situe au cœur du tétramère et participe à l'interface R grâce à de nombreux contacts hydrophobes et liaisons H, et est donc impliquée dans la stabilité de la structure quaternaire de l'enzyme. Elle participe également au site enzymatique, au niveau du site de reconnaissance anionique "Pi", via le résidu Arg195, et au site de liaison du cofacteur de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe R. Ainsi, elle pourrait être impliquée dans les interactions responsables du phénomène de coopérativité. Néanmoins, ni la détermination des 4 constantes de dissociation du NAD par fluorescence sur le mutant S, ni l'étude de la liaison d'analogues du NAD par résonance paramagnétique électronique (Beth *et al.*, 1984), ni l'interprétation des structures tridimensionnelles de S-loop, très semblables dans l'apo et dans

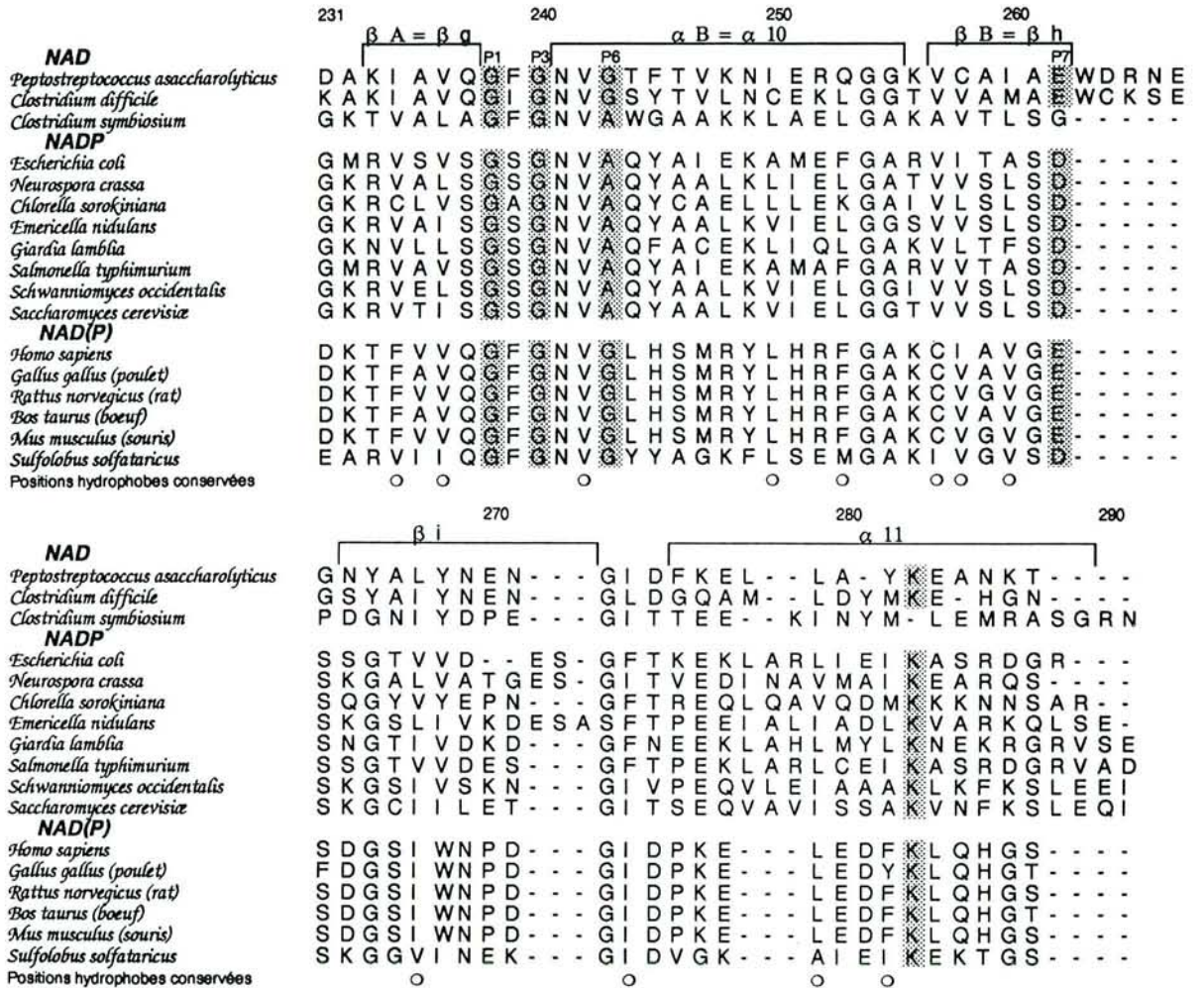


Figure 26A : Alignement des séquences de Glutamate déshydrogénases dans la région du motif $\beta_A\alpha_B\beta_B$ réalisé suivant la méthode des clusters hydrophobes (HCA) (d'après Eyschen, 1992)

Les séquences sont extraites de la banque de données Swissprot. La numérotation correspond à celle de la GDH de *C. symbiosium* (Teller *et al.*, 1992). Les positions hydrophobes conservées utilisées pour aligner les séquences sont indiquées.

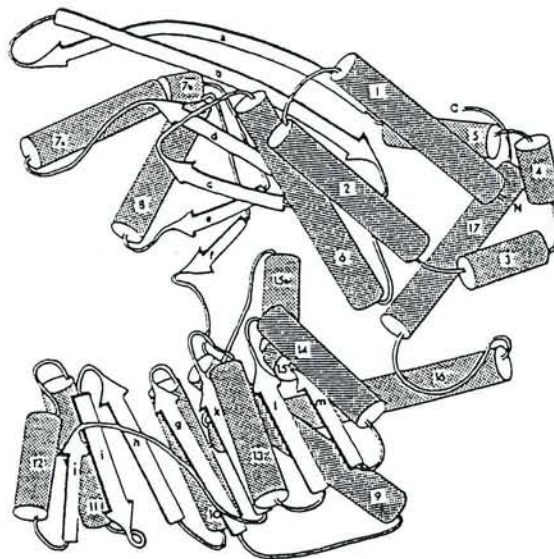


Figure 26B : Structure d'une sous-unité de la Glutamate déshydrogénase de *C. symbiosium* (d'après Baker *et al.*, 1992a)

l'holostructure (Skarszynski *et al.*, 1987), n'ont permis d'identifier la nature de ces interactions au niveau de l'interface R.

L'alignement des séquences de GAPDH de la S-loop montre une forte conservation de la Pro188 dans les GAPDH non chloroplastiques NAD-dépendantes et permet de distinguer deux groupes d'enzymes : les GAPDH d'origine procaryote (sauf *E. coli*) et chloroplastiques d'une part, et les GAPDH d'origine eucaryote et d'*E. coli* d'autre part, qui présentent une Ser supplémentaire insérée dans l'alignement entre les résidus consécutifs 188 et 190 de *B. stearothermophilus* (figure 27 p.101)(la séquence primaire de cette GAPDH ne possède pas de résidu numéroté 189). La superposition des structures tridimensionnelles des GAPDH de *B. stearothermophilus* et d'*E. coli* montre qu'en fait les S-loop ne sont pas structurellement équivalentes, la Pro188 d'*E. coli* se situant en une position intermédiaire à Leu187 et Pro188 chez *B. stearothermophilus* (figure 28 p.102). Ces analyses soulèvent le problème de la généralité du rôle de la Pro188 comme antidéterminant NADP. Des résultats préliminaires sur un mutant Pro188→Ser de la GAPDH d'*E. coli* semblent confirmer que l'existence d'un résidu à chaîne latérale peu encombrante en position 188 constitue l'une des modalités de reconnaissance du NADP par les GAPDH chloroplastiques.

Ces résidus 187 et 188 sont des déterminants de type "quaternaire". C'est un cas unique parmi les oxydoréductases présentant un repliement de Rossmann. Seule l'ICD possède un déterminant de spécificité NADP (l'Arg292) appartenant à la seconde sous-unité de son dimère (tableau 6 p. 97). Dans les familles à spécificité de cofacteur stricte, comme celle de la FNR (Correll *et al.*, 1993), des oxydoréductases à disulfure (Mittl *et al.*, 1993), et de la MDH (Nishiyama *et al.*, 1993), la comparaison des structures primaires et/ou tertiaires montre que c'est dans la région C-terminale du brin β_B que les enzymes NAD-dépendantes contiennent des résidus hydrophobes et volumineux (Pro, Ile, Met, Phe, Leu) susceptibles de gêner la liaison du groupement 2'-phosphate et dont le rôle dépendrait de la structure tertiaire de la protéine.

L'étude de mutants du résidu 32 suggère l'importance générale des effets stériques dans le site de l'adénosine pour la spécificité de cofacteur. L'affinité croissante pour le NADP de mutants dans lesquels le site de liaison potentiel du 2'-phosphate est de moins en moins encombré pourrait s'expliquer par l'existence d'un réseau de molécules d'eau bien structuré liant de façon indirecte le 2'-phosphate à la protéine.

Dans le cas du mutant D32G-S, dont l'affinité pour le NAD est supérieure à celle des mutants D32A-S et D32G, le positionnement du cofacteur dans un site de grand volume pourrait être également ajusté par des interactions indirectes impliquant des molécules d'eau. En revanche, pour tous les autres mutants, nous avons montré que l'affinité et l'efficacité enzymatique vis-à-vis du NAD étaient réduites, ce qui pourrait expliquer pourquoi les GAPDH chloroplastiques sont moins efficaces avec le NAD qu'avec le NADP.

	180	190	200
Bactéries			
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Y T N D Q R I L D L P - H K - -	D L R R A R A A A E S I I	
<i>Bacillus subtilis</i>	Y T N D Q Q I L D L P - H K - -	O Y R R A R A A A E N I I	
<i>Bacillus megaterium</i>	Y T N D Q Q I L D L P - H K - -	O Y R R A R A A A E N I I	
<i>Escherichia coli gapA</i>	T T A T Q K T V D G P S H K - -	D W R G G R G A S Q N I I	
<i>Escherichia coli gapB</i>	A M H D Q Q V I D A Y - H P - -	D L R R T R A A S Q S I I	
<i>Thermus aquaticus</i>	Y T N D Q R L L D L P - H K - -	D L R R A R A A A I N I I	
<i>Zymomonas mobilis</i>	F T N D Q R I L D Q I - H S - -	D L R R A R T A S A S M I	
<i>Thermotoga maritima</i>	Y T N D Q R V L D L P - H K - -	D L R R A R A A A V S I I	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Y T N D Q N T L D G P - H R K G	O F R R A R A A A V S I I	
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Y T G D Q R L H D A P - H R - -	D L R R A R A A A V N I V	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Y T G D Q P T L D T M - H K - -	D L Y R A R A A A L S M I	
Champignons			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	I T A T Q K T V D G P S H K - -	D W R G G R T A S G N I I	
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Y T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R G A A Q N I I	
<i>Aspergillus nidulans</i>	Y T A T Q K V V D G P S A K - -	D W R G G R T A A T N I I	
<i>Ustilago maydis (huílacoche)</i>	T T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R A A A A N I I	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	M T A T Q K T V D G P S H K - -	D W R G G R T A S G N I I	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M T A T Q K T V D G P S H K - -	D W R G G R T A S G N I I	
<i>Cryptosporidia parasitica</i>	Y T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R T A A Q N I I	
<i>Podospora anserina</i>	Y T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R G A A Q N I I	
<i>Glomerella cingulata</i>	Y T A T Q K T V H G P S A K - -	D W R G G R T A A Q N I I	
<i>Phytophthora infestans</i>	V T A T Q K T V D G P S K K - -	D W R G G R G A C F N I I	
<i>Curvularia lunata</i>	Y T A T Q K V V D G P S A K - -	D W R G G R T A A Q N I I	
<i>Schizophyllum commune</i>	T T A T Q K T V D G P S H K - -	D W R G G R S V N N I I	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	T T A T Q K T V D G P S N K - -	D W L G G R S V N N I I	
<i>Agaricus bisporus (gene 1)</i>	T T A T Q K T V D A P A K K - -	D W R S G R S V T N I I	
<i>Agaricus bisporus (gene 2)</i>	T T A T Q K T V D G P S H K - -	D W R G G R G V G N I I	
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	Y T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R T A A Q N I I	
Protozoaires			
<i>Schistosoma mansoni</i>	F T A T Q K V V D G P S S K - -	L W R D G R G A M Q N I I	
<i>Trypanosoma brucei (cytosolique)</i>	T T A T Q K T V D G P S O K - -	D W R G G R G A A Q N I I	
<i>Trypanosoma brucei (glycosomal)</i>	Y T A T Q K T V D G V S V K - -	D W R G G R A A A V N I I	
<i>Trypanosoma cruzi (glycosomal)</i>	Y T A T Q K T V D G V S V K - -	D W R G G R A A A V N I I	
<i>Leishmania mexicana</i>	T T A T Q K T V D G P S L K - -	D W R G G R G A S Q N I I	
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	V T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A G Q N I I	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	V T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A G Q N I I	
<i>Giardia Lamblia</i>	V T A T Q L P V D G P S K K - -	D W R G G R S C G A N V I	
<i>Entamoeba histolytica</i>	T T A T Q K T V D G P S G K - -	D W R A G R C A C A N I I	
Animaux			
<i>Homarus americanus</i>	V T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R G A A Q N I I	
<i>Sus scrofa domestica (porc)</i>	I T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A A Q N I I	
<i>Drosophila melanogaster</i>	T T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A A Q N I I	
<i>Drosophila hydei</i>	T T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A C Q N I I	
<i>Rattus norvegicus (rat)</i>	I T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A A Q N I I	
<i>Mus musculus (souris)</i>	I T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A A Q N I I	
<i>Gallus gallus (poulet)</i>	I T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A A Q N I I	
<i>Homo sapiens</i>	I T A T Q K T V D S P S G K - -	L W R G G R G A A Q N I I	
<i>Cricetus griseus (hamster)</i>	I T A T Q K T V D G P S G K - -	L W R D G R G A A Q N I I	
Plantes (cytosoliques)			
<i>Antirrhinum majus</i>	I T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R A A S F N I I	
<i>Sinapis alba (moutarde)</i>	I T A T Q K T V D G P S M K - -	O W R G G R A A S F N I I	
<i>Nicotiana tabacum (tabac)</i>	L T A T Q K T V D G P S M K - -	O W R G G R A T S F N I I	
<i>Zea mays (maïs)</i>	I T A T Q K T V D G P S A K - -	O W R G G R A A S F N I I	
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	M T A T Q K T V D G P S M K - -	D W R G G R A A S F N I I	
<i>Hordeum vulgare</i>	M T A T Q K T V D G P S S K - -	D W R G G R A A S F N I I	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	I T A T Q K T V D G P S M K - -	O W R G G R A A S F N I I	
<i>Pinus sylvestris</i>	I T A T Q K T V D G P S N K - -	O W R G G R G A G F N I I	
<i>Persea hybrida</i>	M T A T Q K T V D G P S A K - -	D W R G G R A A S F N I I	
<i>Ranunculus acer</i>	M T A T Q K T V D G P S S K - -	O W R G G R A A S F N I I	
<i>Magnolia liliflora</i>	I T A T Q K T V D G P S S K - -	O W R G G R A A S F N I I	
<i>Petroselinum crispum</i>	I T A T R K T V D G P S M K - -	D W R G G R A A S F N I I	
Plantes (chloroplastiques)			
<i>Sinapis alba (moutarde) (gene A)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Nicotiana tabacum (tabac) (gene A)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Zea mays (maïs) (gene A)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Zea mays (maïs) (pseudogene)</i>	Y T G G Q R L L D A S - H T - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Pisum sativum (petit pois) (gene A)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Spinacia oleracea (épinard) (gene A)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Arabidopsis thaliana (gene A)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Nicotiana tabacum (tabac) (gene B)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Pisum sativum (petit pois) (gene B)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Spinacia oleracea (épinard) (gene B)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Arabidopsis thaliana (gene B)</i>	Y T G D Q R L L D A S - H R - -	D L R R A R A A A L N I V	
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Y T G D Q R L L D A G - H R - -	D L R R A R S A A L N I V	

Figure 27 : Alignement des séquences de GAPDH dans la région de la S-loop

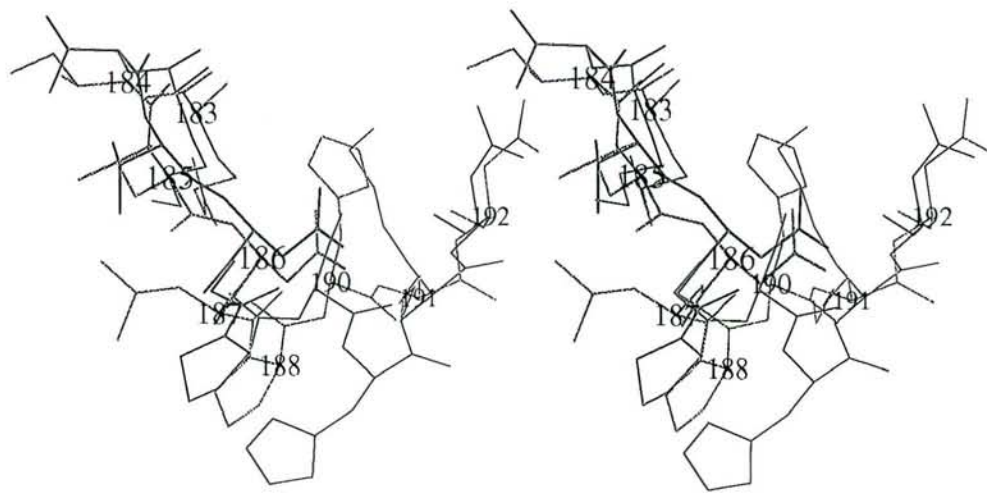


Figure 28 : Vue stéréoscopique de la superposition des structures tridimensionnelles des GAPDH de *B. stearothermophilus* (en bleu) et d'*E. coli* (en rouge) au niveau des résidus 183 à 192 de la S-loop (d'après Olivier-Deyris, 1994).

Seuls les résidus de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sont numérotés.

IIB. LE CARACTÈRE PHYSICOCHIMIQUE DU SITE DU 2'-PHOSPHATE

Les sites de liaison protéiques des groupements phosphates de substrats ou cofacteurs, comme par exemple les sites des phosphates nucléotidiques en 5' décrits en Introduction, présentent des propriétés physicochimiques convergentes mises en évidence par Chakrabarti (1993) dans une étude exhaustive des sites de reconnaissance anionique des protéines de la PDB :

- les ligands les plus fréquents du phosphate sont les groupements NH peptidiques, les chaînes latérales de résidus basiques et hydroxylés,
- le site possède fréquemment des résidus Gly,
- les groupements phosphates sont préférentiellement liés à l'extrémité N-terminale d'une hélice α .

Essayons d'analyser par quel type d'environnement protéique le groupement 2'-phosphate du NADP pourrait être stabilisé.

IIB1. Un site à caractère cationique?

En admettant que le squelette peptidique de la GAPDH chloroplastique soit parfaitement superposable à celui de l'enzyme de *B. stearothermophilus*, deux types d'hypothèses peuvent être avancées. D'une part, le 2'-phosphate pourrait interagir avec la chaîne latérale chargée positivement d'un résidu basique spécifique à l'enzyme chloroplastique. Cependant, le seul résidu de ce type dans l'environnement du cofacteur, la Lys38 (tableau I article 2 p. 89), est situé à plus de 10Å du site potentiel du 2'-phosphate. D'autre part, la stabilisation du 2'-phosphate pourrait dépendre du recrutement d'un résidu basique conservé dans les deux types de GAPDH, dont la chaîne latérale s'orienterait spécifiquement vers ce groupement dans l'enzyme chloroplastique, mais qui, dans le cas des enzymes strictement NAD-dépendantes, ne pourrait jouer ce rôle en raison de l'existence d'antidéterminants de spécificité NADP comme la Pro188. En effet, la modélisation du NADP sur l'holostructure de l'enzyme de *B. stearothermophilus* suggère qu'une interaction indirecte pourrait se former entre la chaîne latérale de l'Arg183 (un résidu de la S-loop dont le caractère basique est fortement conservé dans les GAPDH) et le 2'-phosphate, via l'atome d'oxygène peptidique du résidu 188 (figure 29 p. 104). Cependant, dans la structure du mutant S avec le NADP, les résidus 188 et 183 sont effectivement liés entre eux (c'est d'ailleurs déjà le cas dans l'holoenzyme sauvage avec NAD), mais 188 ne l'est pas avec le 2'-phosphate (figure 23 p. 72). De plus, la simulation des mutations B-S suggérait également la possibilité d'une interaction indirecte entre la chaîne latérale de l'Arg77 (résidu existant dans les deux types d'enzymes) et l'atome AO2' du NADP via l'oxygène O γ de la Thr33 (figure 24 p. 73), mais qui s'est révélée peu importante voire inexistante vu l'effet relativement faible de la mutation B sur l'affinité de l'enzyme de *B. stearothermophilus* avec le NADP. Ces interactions ne peuvent cependant pas être totalement exclues pour la GAPDH chloroplastique, les conformations des squelettes peptidiques des deux types d'enzymes n'étant probablement pas strictement identiques. Seule l'étude des propriétés de la GAPDH

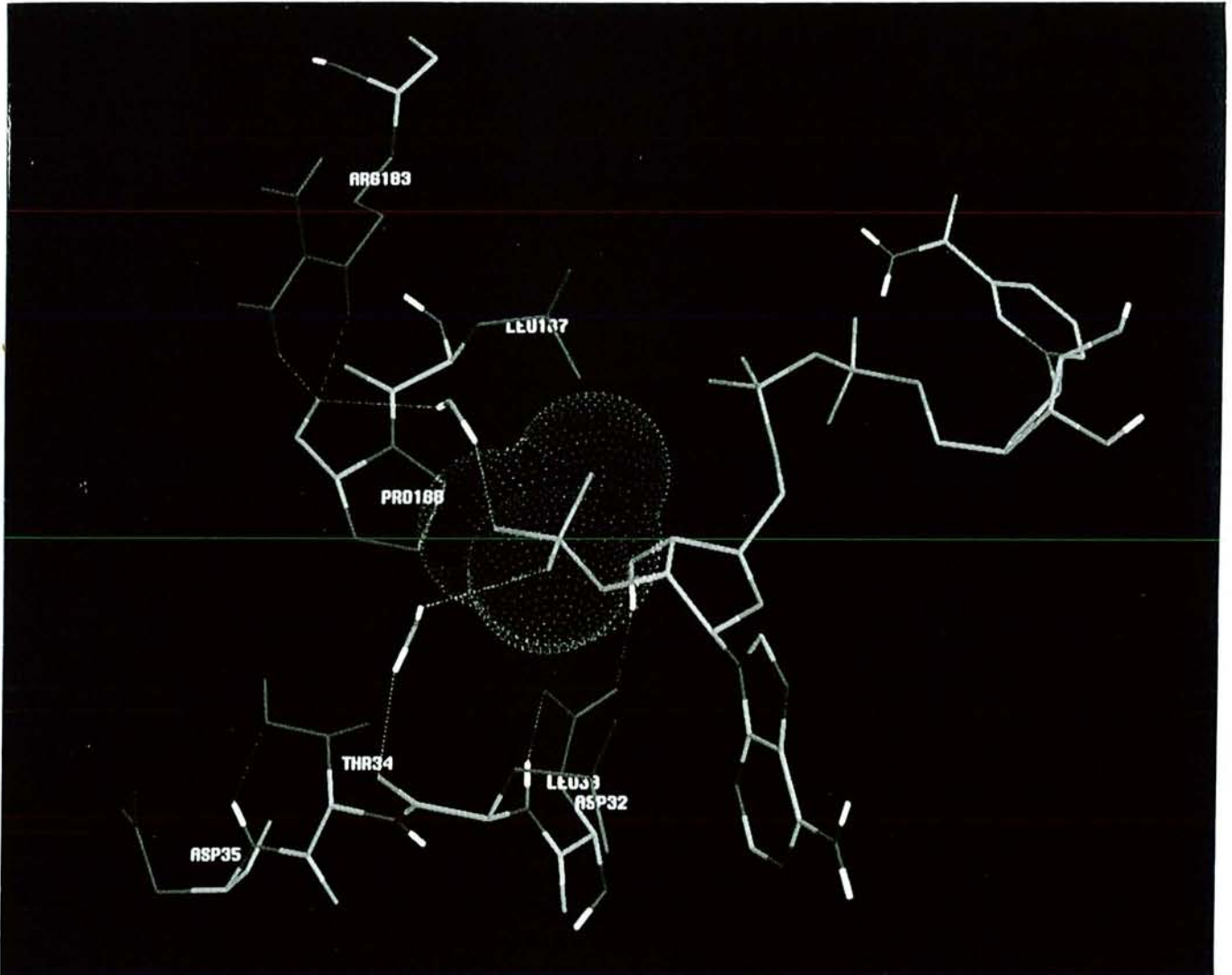


Figure 29 : Simulation de la liaison du NADP à la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous forme holo

Le NADP et les chaînes principales des acides aminés sont représentés en couleurs atomiques conventionnelles (C, vert, O, rouge, N, bleu, P, rose, H, blanc). Seuls les atomes d'hydrogène polaires sont représentés. Les chaînes latérales des acides aminés sont en bleu foncé.

chloroplastique, voire la détermination de sa structure tridimensionnelle et de son complexe avec le NADP pourront révéler si ces interactions jouent un rôle effectif dans la liaison du NADP grâce à des ajustements conformationnels locaux spécifiques. Dans ce cas, elles impliqueraient donc des résidus situés en des positions spécifiques à la GAPDH, dont le rôle dépendrait de la structure tertiaire, en 77, ou quaternaire, en 183 et 188. Tous les autres résidus basiques conservés de la S-loop (Lys191, Arg194, Arg195, Arg197) (figure 27 p.101) ou de la région N-terminale de β_B (His42, Lys45) sont situés au minimum à 10Å du site potentiel du 2'-phosphate.

Dans la famille des GDH, l'alignement des séquences primaires par la méthode HCA des clusters hydrophobes (Eyshen, 1992) met en évidence la quasiconservation du résidu Lys283 (figure 26A p. 99) entre les GDH strictement NAD, NADP-dépendantes et à dualité de cofacteur. L'étude par mutagenèse dirigée d'une GDH strictement NADP-dépendante a permis de montrer que ce résidu était effectivement impliqué dans la liaison du NADP par des interactions ioniques, et n'avait par ailleurs aucun rôle dans la liaison du NAD (Haeffner-Gormley *et al.*, 1992). Dans l'hypothèse raisonnable où cette interaction existe également chez les GDH à dualité de cofacteur, le mode de liaison du 2'-phosphate serait alors comparable à celui des oxydoréductases strictement NADP-dépendantes, dans lesquelles le site de liaison du 2'-phosphate comprend systématiquement des acides aminés basiques, avec au minimum une Arg, et souvent des acides aminés hydroxylés (Tyr, Ser, Thr) (tableau 6 p. 97).

L'étude de mutants de certains résidus basiques de la DHFR, de la GRS, de la FNR et de l'ADS (tableau 6 p. 97) a permis de montrer leur importance pour la spécificité enzymatique vis-à-vis du NADP. En aucun cas ces mutations ne permettent à ces enzymes d'acquiescer la spécificité pour le NAD. De plus, les mutations inverses sur les enzymes NAD-dépendantes de la famille de la GRS (la LIP (Bocanegra *et al.*, 1993)) et de l'ICD (l'IPMDH (Miyasaki & Oshima, 1994)) modifient principalement l'efficacité enzymatique avec le NADP. Ces résidus constituent donc des déterminants essentiels de la spécificité de cofacteur des oxydoréductases strictement NADP-dépendantes. Dans les enzymes à repliement de Rossmann, ils sont généralement situés dans la région de la boucle β_B - α_C (tableau 6 p. 97).

IIB2. Un site polaire mais non ionique?

En introduisant une Ser en 188 et une Thr en 33, nous avons exploré l'hypothèse que le groupement 2'-phosphate soit stabilisé par liaison H avec des chaînes latérales hydroxylées (figure 24 p. 73). Sa charge serait alors répartie sur ces liaisons, celle de l'Asp32 étant elle-même délocalisée sur un réseau de liaisons H incluant la Phe8 (P2), la Leu33 et le 3'OH du ribose du NADP (cf Introduction §IVC1a p. 31), réduisant ainsi la répulsion électrostatique entre les deux. Les propriétés des mutants S et B-S ainsi que la détermination de la structure du complexe S-NADP ne permettent pas de confirmer l'existence de ces interactions dans la GAPDH chloroplastique.

IIB3. La présence de Glycines dans le site

Il n'était pas non plus déraisonnable de penser que les Glycines 34 et 35 de la GAPDH chloroplastique favorisaient la liaison du 2'-phosphate, vu leur localisation dans la boucle β_B - α_C . En plus de leur intervention au niveau de la transition conformationnelle apo→holo, proposée dans l'article 1, ces résidus auraient pu améliorer l'accessibilité de ligands protéiques du site du cofacteur (groupements peptidiques ou chaînes latérales hydroxylées ou cationiques) au 2'-phosphate. Cependant, nos résultats sur le mutant B-S de la GAPDH NAD-dépendante n'ont pas apporté de réponse claire concernant l'enzyme chloroplastique.

IIB4. Conséquences sur la forme acidobasique du NADP lié

Comment peut-on alors expliquer que la GAPDH chloroplastique fixe efficacement le 2'-phosphate du NADP dans l'environnement de l'Asp32, alors que nous avons montré qu'il pouvait exister une répulsion électrostatique entre les deux dans les déshydrogénases NAD-dépendantes?

Baker *et al.* (1992b) ont suggéré que le 2'-phosphate du NADP se lie sous sa forme monoanionique aux enzymes possédant une signature P1-P7 de type I, ce qui permettrait de réduire cette répulsion électrostatique. Des résultats préliminaires de détermination par RMN (^{31}P) du pKa du 2'-phosphate du NADP lié aux GAPDH mutées vont dans le sens de cette hypothèse (Eyshen, communication personnelle). En effet, ce pKa serait supérieur d'au moins une unité dans les mutants S (7,7) et B-S (6,8) par rapport aux mutants D32A-S (<5,6) et D32G-S (<5,7), suggérant que, à pH physiologique, la liaison de la forme monoanionique est favorisée sur les enzymes possédant en P7 le résidu acide Asp32.

Par contre, dans le cas des déshydrogénases strictement NADP-dépendantes, l'environnement positif du site aurait pour effet de stabiliser la forme dianionique du 2'-phosphate en abaissant son pKa par rapport au NADP non lié. De nombreuses études utilisant les spectroscopies RAMAN (sur la DHFR (Zheng *et al.*, 1993)) et RMN (sur la DHFR (Feeney *et al.*, 1975), sur l'ICD (Mas & Colman, 1984 ; Ehrlich & Colman, 1992)) ou des méthodes cinétiques (sur l'ADS (Liu *et al.*, 1993)) soutiennent cette interprétation.

III. CONCLUSIONS

Il est possible de déduire de l'analyse précédente les traits généraux de la reconnaissance du cofacteur par les enzymes à spécificité stricte : la structure de type I serait un déterminant essentiel de la liaison du NAD, un résidu acide en P7 bloquant la liaison productive du NADP. Les oxydoréductases strictement NADP-dépendantes lieraient le 2'-phosphate du NADP sous forme dianionique, au niveau d'un site composé de déterminants cationiques situés généralement dans la boucle β_B - α_C .

Dans le cas des enzymes à dualité de spécificité, GDH de vertébrés et GAPDH chloroplastiques, la liaison du NAD semble assurée par une structure de type I. En revanche, les modalités de liaison du NADP apparaissent liées à des déterminants particuliers, la Lys283 dans la GDH ou des déterminants quaternaires dans la GAPDH. Il ne semble donc pas possible de dégager des caractéristiques générales de la reconnaissance des cofacteurs à ce type d'enzyme, car elle dépend probablement de facteurs structuraux fins et spécifiques de l'enzyme, que les comparaisons de structures primaires ou tertiaires ne permettent pas de prévoir. Par exemple, Hurley *et al.* (1991b) ont montré que l'ensemble des différences entre l'ADH humaine et de cheval, pourtant identiques à 86% en séquence primaire, conduisait à de subtils ajustements du positionnement des résidus dans le site de liaison du NAD, en particulier de l'hélice α_B , qui pourraient rendre compte d'un facteur 50 entre les constantes de dissociation du NADH des deux enzymes. Par ailleurs, Bajorath *et al.* (1991) suggèrent que 30% des effets de polarisation électronique du NADP lors de sa liaison à la DHFR provienne de résidus n'appartenant pas au site du cofacteur. Une hypothèse pour la GAPDH chloroplastique serait que le champ électrostatique global généré par l'ensemble de la structure dans le site du cofacteur favorise la liaison du 2'-phosphate à proximité de l'Asp32.

Cependant, l'interprétation des données concernant la spécificité de cofacteur à partir des constantes k_{cat} , K_M et des constantes de dissociation de mutants ne doit pas se faire sans prendre certaines précautions. Par exemple, la constante catalytique k_{cat} correspond à la vitesse de l'étape limitante du mécanisme enzymatique. Or, cette étape est spécifique de chaque enzyme et sa nature peut changer en fonction de la mutation, rendant l'interprétation de la comparaison des k_{cat} des enzymes mutées et sauvage aléatoire. De plus, la constante de Michaelis K_M n'est pas une constante d'équilibre thermodynamique et ne reflète donc pas nécessairement l'affinité réelle de la protéine pour le cofacteur. C'est pourquoi nous avons déterminé à la fois les constantes k_{cat} , K_M , les constantes de dissociation du cofacteur, et caractérisé l'étape limitante de la réaction catalysée par les GAPDH de type sauvage et mutées. Nos résultats suggèrent effectivement un changement de l'étape limitante du mécanisme réactionnel des GAPDH mutées qui, associée au relargage du cofacteur réduit du complexe ternaire pour le type sauvage, deviendrait associée à l'étape de fixation du cofacteur oxydé à l'acylenzyme pour les mutants. De plus, il est apparu que l'affinité réelle de l'enzyme pour le cofacteur d'une part, la constante K_M et l'efficacité enzymatique k_{cat}/K_M d'autre

part n'étaient pas directement liées : ceci est particulièrement évident pour le mutant D32G-S dont l'affinité pour le NADP est comparable à celle de l'enzyme sauvage pour le NAD, alors que son efficacité enzymatique est inférieure d'un facteur 33. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature est donc limitée par le fait que la plupart des données bibliographiques concerne essentiellement la détermination des constantes k_{cat} et K_M .

L'étude de la structure tridimensionnelle du complexe mutant S/NADP et la mesure de la bande de Racker nous a conduits à utiliser cette bande d'absorption comme sonde indicatrice de la transition apo→holo. Le fait que l'affinité des différents mutants pour le NAD(P) soit corrélée à l'intensité de cette bande suggère effectivement que le changement conformationnel associée à la liaison du cofacteur à l'apoenzyme est particulièrement altérée pour les mutants D32A-S et D32G-S avec le NAD et pour les enzymes de type sauvage et mutées D32A, S et B-S avec le NADP. Dans le cas du mutant D32G-S, dont la bande de Racker et l'affinité vis-à-vis du NADP sont proches de celles de l'enzyme sauvage avec le NAD, des résultats préliminaires sur la structure tridimensionnelle du complexe binaire confirment que le NADP induit effectivement un changement conformationnel totale sur ce mutant.

La caractérisation de l'étape limitante de la réaction catalysée par les mutants repose sur la transposition à l'acylenzyme des résultats des mesures de k_{off} et de bande de Racker effectués sur l'apoenzyme. Or la présence du groupement 3-phosphoglycéroyl est susceptible de modifier la transition apo→holo, d'autant plus que cette dernière pourrait également s'accompagner d'un changement de site du groupement phosphate du substrat (Corbier *et al.*, 1994). C'est ce qui pourrait expliquer l'apparente contradiction entre la valeur quasi optimale de la bande de Racker du mutant D32G-S avec le NADP et son efficacité enzymatique faible, révélant vraisemblablement un changement de l'étape limitante de la réaction.

Un changement conformationnel analogue existe probablement lors de la liaison du NAD(P) à la GAPDH chloroplastique. Modifier la spécificité de cofacteur d'une enzyme strictement NAD-dépendante ne se limite donc pas seulement à identifier des déterminants structuraux stabilisant la liaison du groupement 2'-phosphate, mais également les facteurs moléculaires permettant au site du cofacteur d'effectuer les mouvements associés à la transition conformationnelle. L'étude du mutant B-S de la GAPDH, réalisé dans cette optique, met en évidence qu'il existe d'autres déterminants "de transition apo→holo" que les résidus 33, 34 et 35. Elle montre également que la valeur prédictive de la modélisation des structures mutées, effectuée sur la forme holo de la GAPDH, est limitée par ce problème.

Néanmoins, des éléments structuraux du site de l'adénosine doivent être déterminants pour assurer l'efficacité de la transition apo→holo. En effet, le mutant D32E présente une coopérativité positive pour la liaison du NAD, alors qu'elle est négative pour l'enzyme sauvage. Or, selon le modèle de l'asymétrie induite, ce phénomène impliquerait la transmission d'un message d'une sous-unité à l'autre, probablement médiée par la transition apo→holo, à laquelle participent en particulier les résidus Asp32 et Leu33 par des mouvements importants (cf §IVC1b de l'Introduction).

La mutation D32E est donc susceptible d'altérer cette transition. Cette région n'intervenant pas dans les interactions entre sous-unités, le mécanisme conduisant à une diminution progressive de l'affinité des 4 sites pour le NAD reste à élucider. Cependant, nous pouvons rapprocher ce résultat de la propriété de coopérativité positive de la GAPDH de levure à 40°C interprétée selon le modèle symétrique concerté (Kirchner, 1971), qui pourrait s'appliquer au mutant D32E, à l'opposé de la GAPDH de *B. stearothermophilus* de type sauvage. Néanmoins, l'étude du phénomène de coopérativité de ce mutant par la technique de fluorescence s'est révélée être difficilement reproductible, et devrait être complétée par la mesure directe de la liaison du NAD par la technique de dialyse à l'équilibre.

Divers arguments structuraux semblent montrer l'existence d'une transition analogue chez d'autres oxydoréductases à NAD ou NADP. La liaison du cofacteur à l'ADH (Eklund *et al.*, 1984), la FDH (Lamzin *et al.*, 1994) ou la DHFR (Bystroff & Kraut, 1991), comme à la GAPDH, provoque une rotation relative globale des deux domaines, celui du cofacteur et le domaine catalytique, avec des remaniements conformationnels locaux, en particulier dans le site de liaison de l'adénosine au niveau de la région C-terminale du brin β_B et de P7 (dans le cas de l'ADH, la FDH et la GAPDH). Dans le cas d'enzymes NADP-dépendantes, le site de l'adénosine et du 2'-phosphate pourraient également se révéler déterminants dans le mécanisme de la transition conformationnelle, comme dans la DHFR (Bystroff & Kraut, 1991), la 6-phosphogluconate déshydrogénase (Berdis & Cook, 1993) ou l'ICD (Seery & Farrell, 1990 ; Farrell *et al.*, 1990).

IV. PERSPECTIVES

Les différents points que nous venons de discuter ouvrent plusieurs pistes d'études complémentaires :

Le rôle des résidus de la signature P1-P7 sur la spécificité NADP demande à être précisé. En effet, bien que la plupart des enzymes strictement NADP- dépendantes fixent le NADP au niveau d'une structure de type II, des expériences de mutagenèse dirigée semblent indiquer que cette structure n'est pas un déterminant de l'activité enzymatique avec le NADP (Scrutton *et al.*, 1990 ; Bocanegra *et al.*, 1993). De plus, il existe au moins un exemple d'enzyme strictement NAD-dépendante liant le NAD au niveau d'un motif structural de type II : la GDH de *C. symbiosium* (Baker *et al.*, 1992a, 1992b) (figure 26A p. 99). La mutation Gly→Ala en P6, introduite dans la GAPDH dans le but de créer une structure de liaison du cofacteur de type II, permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, qui n'est d'ailleurs pas prévue par la modélisation.

Les GAPDH glycolytiques d'archéobactéries méthanogènes, qui présentent une dualité de cofacteur, pourraient reconnaître le NADP selon des modalités différentes de celles des GAPDH chloroplastiques, puisque le résidu en P7 ne serait pas un Asp mais une Lys. Des expériences de mutagenèse de ce résidu sont en cours au laboratoire pour étudier sa participation au site du NADP de la GAPDH de *Methanothermus fervidus*.

Dans le but d'identifier les facteurs moléculaires fins spécifiques de la GAPDH chloroplastique, il semble maintenant nécessaire d'aborder l'étude des caractéristiques de la liaison du NAD et du NADP à cette enzyme, à savoir son affinité réelle, par les techniques de fluorescence ou de marquage d'affinité, la transition apo→holo, par la mesure de la bande de Racker, la nature mono ou dianionique du 2'-phosphate du NADP lié, par spectroscopie RMN (^{31}P) ou RAMAN (en collaboration avec le laboratoire du Pr Callender, New York). L'ensemble de ces propriétés pourront ainsi être comparées à celles de la GAPDH glycolytique NAD-dépendante et de ses mutants. Ces expériences impliquent préalablement la mise au point d'un système d'expression permettant de produire la GAPDH chloroplastique en grandes quantités à partir de son gène cloné, en collaboration avec l'équipe du Dr Martin (Braunschweig).

Enfin, seule la détermination de la structure tridimensionnelle de différents mutants de la GAPDH glycolytique de *B. stearothermophilus* liés avec du NAD(P) permettra d'affiner l'interprétation de nos résultats en termes structuraux plus précis, en particulier :

- . L'affinité de certains mutants pour le NAD ou NADP, D32G-S par exemple, peut-elle s'expliquer par l'existence d'un réseau de molécules d'eau bien structuré au niveau du site de l'adénosine ?

- . Peut-on déduire de la comparaison des structures de plusieurs mutants la nature des déterminants structuraux responsables de l'efficacité de la transition apo→holo avec le NADP ?

D'autre part, la validité de la mesure de la bande de Racker comme sonde indicatrice de cette transition est-elle confirmée sur des mutants autres que S ?

. L'interprétation de la bande de Racker demande par ailleurs à être précisée. En effet, l'intensité de ce transfert de charge devrait dépendre du positionnement de la fonction thiolate de la Cys149 par rapport au pyridinium du cofacteur. Or, la détermination de la structure du complexe S/NADP à 2,7Å de résolution suggère que le positionnement de ce cycle est peu affecté par rapport à l'holostructure, alors que la bande de Racker est réduite d'un facteur 2. Deux hypothèses pourraient expliquer cette apparente contradiction : soit l'existence de 2 populations en solution, l'une de type sauvage qui serait sélectionnée lors de la cristallisation et l'autre dans laquelle le positionnement du pyridinium serait altérée, soit la résolution insuffisante du modèle de la structure du mutant S avec le NADP.

. L'analyse de la structure de mutants partiellement saturés en NAD(P), comme cela a été fait sur la GAPDH de type sauvage (Leslie & Wonacott, 1984), pourrait apporter des éléments supplémentaires sur le mécanisme moléculaire du phénomène de coopérativité.

. Enfin, l'étude de la structure de mutants dont le processus catalytique est fortement ralenti au niveau de l'étape de phosphorylation devrait permettre d'obtenir un modèle de la structure du complexe ternaire acylenzyme-cofacteur, dans le but d'analyser la nature de la transition apo→holo sur l'acylenzyme et d'étudier son rôle au niveau du mécanisme et de l'efficacité enzymatique .

La détermination de la structure tridimensionnelle des mutants B-S, D32A-S et D32G-S, en collaboration avec les laboratoires de radiocristallographie des Drs Dideberg (IBS, Grenoble) et Aubry (Nancy), devrait nous apporter des éléments de réponse à certaines de ces questions.

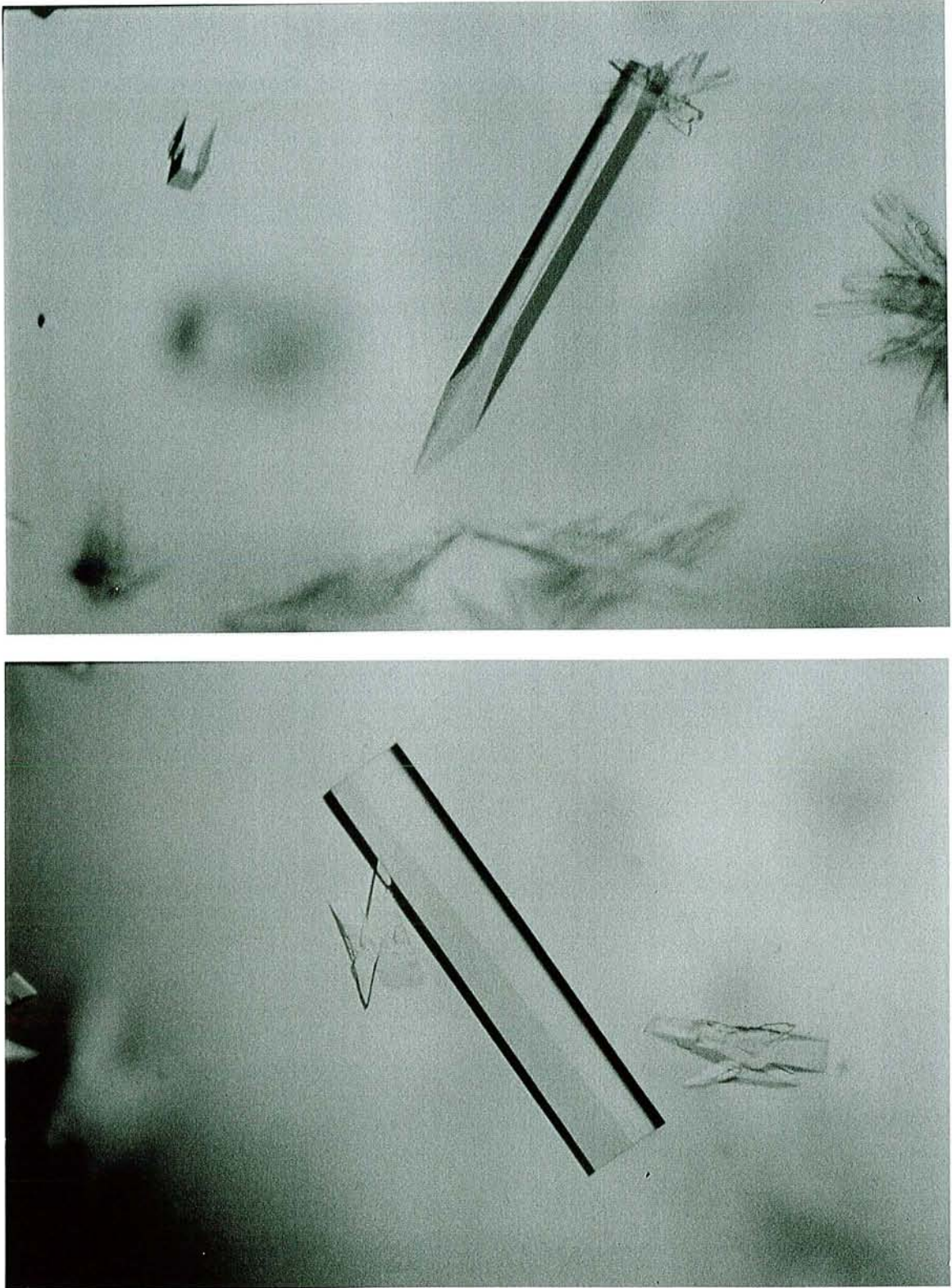


Figure 30 : Cristal du mutant B-S de la GAPDH de *B. stearothermophilus* en complexe binaire avec le NADP

Ces cristaux, apparus en 1 semaine environ, mesurent $0,2 \times 0,3 \times 0,1$ mm, appartiennent au groupe d'espace orthorhombique $P2_12_12$ et diffractent les rayons X à une résolution de $3,5 \text{ \AA}$. Des expériences de cristallogénèse ultérieures ont permis d'obtenir des cristaux diffractant à plus haute résolution.

BIBLIOGRAPHIE

- Abad-Zapatero, C., Griffith, J.P., Sussman, J.L. & Rossmann, M.G. (1987)**
Refined Crystal Structure of Dogfish M4 Apo-Lactate Dehydrogenase.
J. Mol. Biol. **198**, 445-467
- Adams, J., Johnson, K., Matthews, R. & Benkovic, S.J. (1989)**
Effects of Distal Point-Site Mutations on the Binding and Catalysis of Dihydrofolate Reductase from *Escherichia coli*.
Biochemistry **28**, 6611-6618
- Adams, M.J., Gover, S., Leback, R., Phillips, C. & Somers, D.O. (1991)**
The Structure of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Refined at 2.5 Å Resolution.
Acta Cryst. **B47**, 817-820
- Aliverti, A., Lübberstedt, T., Zanetti, G., Herrmann, R.G. & Curti, B. (1991)**
Probing the Role of Lysine 116 and Lysine 244 in the Spinach Ferredoxin-NADP⁺ Reductase by Site-Directed Mutagenesis.
J. Biol. Chem. **266**, 17760-17763
- Allen, G. & Harris, J.I. (1975)**
The Binding of Nicotinamide-adenine Dinucleotide to Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*.
Biochemical J. **151**, 747-749
- Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F. & McKay, D.B. (1986)**
Structure of Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3 Å resolution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 1320-1324
- Almarsson, Ö. & Bruice, T.C. (1993)**
Evaluation of the Factors Influencing Reactivity and Stereospecificity in NAD(P)H-dependent Dehydrogenase Enzymes.
J. Am. Chem. Soc. **115**, 2125-2138
- Bajorath, J., Li, Z., Fitzgerald, G., Kitson, D.H., Farnum, M., Fine, R.M., Kraut, J. & Hagler, A.T. (1991)**
Changes in the Electron Density of the Cofactor NADPH on Binding to *E. coli* Dihydrofolate Reductase.
Proteins- Struct. Funct. Genet. **11**, 263-270
- Baker, P.J., Britton, K.L., Engel, P.C., Farrants, G.W., Lilley, K.S., Rice, D.W. & Stillman, T.J. (1992a)**
Subunit Assembly and Active Site Location in the Structure of Glutamate Dehydrogenase.
Proteins - Struct. Funct. Genet. **12**, 75-86
- Baker, P.J., Britton, K.L., Rice, D.W., Rob, A. & Stillman, T.J. (1992b)**
Structural Consequences of Sequence Patterns in the Fingerprint Region of the Nucleotide Binding Fold - Implications for Nucleotide Specificity.
J. Mol. Biol. **228**, 662-671
- Banks, R.D., Blake, C.C.F., Evans, P.R., Haser, R., Rice, D.W., Hardy, G.W., Merrett, M. & Phillips, A.W. (1979)**
Sequence, Structure and Activity of Phosphoglycerate kinase - A Possible Hinge-bending Enzyme.
Nature **279**, 773-777
- Bauer, A.J., Rayment, I., Frey, P.A. & Holden, H.M. (1992)**
The Molecular Structure of UDP-Galactose 4-Epimerase from *Escherichia coli* Determined at 2.5 Å Resolution.
Proteins - Struct. Funct. Genet. **12**, 372-381

- Beijer, N.A., Buck, H.M., Sluyterman, L.A.E. & Meijer, E.M. (1990)**
 NAD⁺ and NAD⁺ Analogues in Horse Liver Alcohol Dehydrogenase - Relationship between Reactivity and Conformation Simulated with Molecular Mechanics.
 Biochim. Biophys. Acta 1039, 227-233
- Berdis, A.J. & Cook, P.F. (1993)**
 The 2'-Phosphate of NADP Is Critical for Optimum Productive Binding to 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from *Candida utilis*.
 Arch. Biochem. Biophys. 305, 551-558
- Beth, A.H., Robinson, B.H., Cobb, C.E., Dalton, L.R., Trommer, W.E., Birktoft, J.J. and Park, J.H. (1984)**
 Interactions and Spatial arrangement of spin-labeled NAD Bound to Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase - Comparison of EPR and X-ray modeling Data.
 J. Biol. Chem. 259, 9717-9728
- Biellmann, J.F., Branlant, G., Foucaud, B.Y. & Jung, M.J. (1974)**
 Preparation of 3-chloroacetylpyridine Adenine Dinucleotide : an Alkylating Analogue of NAD⁺.
 FEBS Lett. 40, 29-32
- Biesecker, G., Harris, J.I., Thierry, J.C., Walker, J.E. & Wonacott, A.J. (1977)**
 Sequence and Structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*.
 Nature 266, 328-333
- Birktoft, J.J., Rhodes, G. & Banaszak, L.J. (1989)**
 Refined Crystal Structure of Cytoplasmic Malate Dehydrogenase at 2.5-Å Resolution.
 Biochemistry 28, 6065-6081
- Bloch, W., Mc Quarrie, R.A. & Bernhard, S.A. (1971)**
 The Nucleotide and Acyl Group Content of Native Rabbit Muscle Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
 J. Biol. Chem. 246, 780-790
- Bocanegra, J.A., Scrutton, N.S. & Perham, R.N. (1993)**
 Creation of an NADP-Dependent Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex by Protein Engineering.
 Biochemistry 32, 2737-2740
- Boers, W., Oosthuizen, C. & Slater, E.C. (1971)**
 Binding of NAD⁺ and NADH to Rabbit Muscle Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
 Biochim. Biophys. Acta 250, 35-46
- Bohren, K.M., Page, J.L., Shankar, R., Henry, S.P. & Gabbay, K.H. (1991)**
 Expression of Human Aldose Reductases - Site-Directed Mutagenesis of a Critical Lysine 262.
 J. Biol. Chem. 266, 24031-24037
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. & Falkow, S. (1977)**
 Construction and Characterization of New Vehicles - II. A Multiple Purpose Cloning System.
 Gene 2, 95-113
- Borhani, D.W., Harter, T.M. & Petrash, J.M. (1992)**
 The Crystal Structure of the Aldose Reductase.NADPH Binary Complex.
 J. Biol. Chem. 267, 24841-24847

Bork, P. & Grunwald, C. (1990)

Recognition of Different Nucleotide-Binding Sites in Primary Structures Using a Property-Pattern Approach.

Eur. J. Biochem. 191, 347-358

Branlant, G., Eiler, B., Wallen, L. & Biellmann, J.-F. (1982a)

Affinity Labeling of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Sturgeon and *Bacillus stearothermophilus* by 3-chloroacetylpyridine-adenine Dinucleotide - Kinetic Studies.

Eur. J. Biochem. 127, 519-524

Branlant, G., Tritsch, D., Eiler, B. & Biellmann, J.-F. (1982b)

Properties of the Charge-transfer Transition Observed in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Sturgeon Muscle Alkylated by 3-chloroacetylpyridine-adenine Dinucleotide - Characterization of the Modified Amino Acid.

Eur. J. Biochem. 129, 437-446

Branlant, G., Eiler, B., Biellmann, J.F., Lutz, H.P. & Luisi, H.P. (1983a)

Applicability of the Induced-fit Model to Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Sturgeon Muscle - Study of the Binding of Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Nicotinamide 8-bromoadenine Dinucleotide.

Biochemistry 22, 4437-4443

Branlant, G., Flesch, G. & Branlant, C. (1983b)

Molecular Cloning of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase genes of *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*, and their expression in *Escherichia coli*.

Gene 25, 1-7

Brinkmann, H., Cerff, R., Salomon, M. & Soll, J. (1989)

Cloning and Sequence Analysis of cDNAs Encoding the Cytosolic Precursors of Subunits GapA and GapB of Chloroplast Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Pea and Spinach.

Plant Mol. Biol. 13, 81-94

Buehner, M., Ford, G.C., Moras, D., Olsen, K.W. & Rossmann, M.G. (1974)

Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

J. Mol. Biol. 90, 25-49

Bystroff, C. & Kraut, J. (1991)

Crystal Structure of Unliganded *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase - Ligand-Induced Conformational Changes and Cooperativity in Binding.

Biochemistry 30, 2227-2239

Carter, P., Bedouelle, H. & Winter, G. (1985)

Improved Oligonucleotide Site-directed Mutagenesis Using M13 Vector.

Nucleic Acid Res. 13, 4431-4443

Cerff, R. (1979)

Quaternary Structure of Higher Plant Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.

Eur. J. Biochem. 94, 243-247

Chakrabarti, P. (1993)

Anion Binding Sites in Protein Structure.

J. Mol. Biol. 234, 463-482

Charpentier, B. & Branlant, C. (1994)

The *Escherichia coli* gapA Gene is Transcribed by the Vegetative RNA Polymerase Holoenzyme E σ 70 and by the Heat Shock RNA Polymerase E σ 32.

J. Bacteriol. 176, 830-839

- Chen, Z., Lee, W.R. & Chang, S.H.** (1991)
Role of Aspartic Acid 38 in the Cofactor Specificity of Drosophila Alcohol Dehydrogenase.
Eur. J. Biochem. **202**, 263-267
- Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M.G., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J. & Eisenberg, D.** (1992)
The Crystal Structure of Diphtheria Toxin.
Nature **357**, 216-222
- Clermont, S., Corbier, C., Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A. & Branlant, G.** (1993)
Determinants of Coenzyme Specificity in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase - Role of the Acidic Residue in the Fingerprint Region of the Nucleotide Binding Fold.
Biochemistry **32**, 10178-10184
- Conway, A. & Koshland, D.E., Jr** (1968)
Negative Cooperativity in Enzyme Action - The Binding of Diphosphopyridine Nucleotide to Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
Biochemistry **7**, 4011-4022
- Corbier, C., Mouglin, A., Mely, Y., Adolph, H.W., Zeppezauer, M., Gerard, D., Wonacott, A. & Branlant, G.** (1990)
The Nicotinamide Subsite of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Studied by Site-directed Mutagenesis.
Biochimie **72**, 545-554
- Corbier, C., Michels, S., Wonacott, A.J. & Branlant, G.** (1994)
Characterization of the Two Anion-Recognition Sites of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Bacillus Stearothermophilus* by Site-Directed Mutagenesis and Chemical Modification.
Biochemistry **33**, 3260-3265
- Cori, G.T., Slein, M.W. & Cori, C.F.** (1945)
Isolation and Crystallisation of D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Rabbit Muscle.
J. Biol. Chem. **159**, 565-566
- Correll, C.C., Batie, C.J., Ballou, D.P. & Ludwig, M.L.** (1992)
Phthalate Dioxygenase Reductase - A Modular Structure for Electron Transfer from Pyridine Nucleotides to $<2\text{Fe-2S}>$.
Science **258**, 1604-1610
- Correll, C.C., Ludwig, M.L., Bruns, C.M. & Karplus, P.A.** (1993)
Structural Prototypes for an Extended Family of Flavoprotein Reductases - Comparison of Phthalate Dioxygenase Reductase with Ferredoxin Reductase and Ferredoxin.
Protein Sci. **2**, 2112-2133
- De Kok, P.M.T., Donkersloot, M.C.A., Van Lier, P.M., Meulendijks, G.H.W.M., Bastiaansen, L.A.M., Van Hooff, H.J.G., Kanters, J.A. & Buck, H.M.** (1986)
Stereoselective Hydride Uptake in Modelsystems Related to the Redox-couple NAD^+/NADH .
Tetrahedron **42**, 941-959
- De Wijlder, J.J.M., Boers, W. & Slater, E.C.** (1969)
Binding and Properties of NAD^+ in Glyceraldehydephosphate Dehydrogenase from Lobster-tail Muscle.
Biochim. Biophys. Acta **191**, 214-220

- Deng, H., Burgner, J. & Callender, R. (1991)**
Raman Spectroscopic Studies of NAD Coenzymes Bound to Malate Dehydrogenases by Difference Techniques.
Biochemistry **30**, 8804-8811
- Deng, H., Zheng, J., Sloan, D., Burgner, J. & Callender, R. (1992)**
A Vibrational Analysis of the Catalytically Important C4-H Bonds of NADH Bound to Lactate or Malate Dehydrogenase - Ground-State Effects.
Biochemistry **31**, 5085-5092
- Dimmeler, S. & Brüne, B. (1992)**
Characterization of a Nitric-Oxide-Catalysed ADP-Ribosylation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
Eur. J. Biochem. **210**, 305-310
- Edwards, M.S., Sternberg, M.J.E. & Thornton, J.M. (1987)**
Structural and Sequence Patterns in the Loops of $\beta\alpha\beta$ Units.
Prot. Eng. **1**, 173-181
- Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P. & Witholt, B. (1990)**
Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints.
J. Mol. Biol. **212**, 135-142
- Ehrlich, R.S. & Colman, R.F. (1992)**
Selectivity in the Binding of NAD(P)⁺ Analogues to NAD-Dependent and NADP-Dependent Pig Heart Isocitrate Dehydrogenases - A Nuclear Magnetic Resonance Study.
Biochemistry **31**, 12524-12531
- Eklund, H., Samama, J.-P. & Jones, T.A. (1984)**
Crystallographic Investigations of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Binding to Horse Liver Alcohol Dehydrogenase.
Biochemistry **23**, 5982-5996
- Ellis, K.J. & Morrison, J.F. (1982)**
Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-dependent Processes.
Methods Enzymol. **87**, 405-426
- Eyshen, J. (1992)**
Résonance Magnétique Nucléaire et Analyses Structurales Appliquées à l'Etude des Interactions entre la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase et son Cofacteur.
DEA Microbiologie Enzymologie Nutrition
- Fan, F., Lorenzen, J.A. & Plapp, B.V. (1991)**
An Aspartate Residue in Yeast Alcohol Dehydrogenase I Determines the Specificity for Coenzyme.
Biochemistry **30**, 6397-6401
- Farrell, H.M., Deeney, J.T., Hild, E.K. & Kumosinski, T.F. (1990)**
Stopped-flow and Steady-state Kinetic Studies of the Effects of Metabolites on the Soluble Form of NADP⁺-Isocitrate Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **265**, 17637-17643
- Feeney, J., Birdsall, B., Roberts, G.C.K. & Burgen, A.S.V. (1975)**
³¹P NMR Studies of NADPH and NADP⁺ Binding to *L. casei* Dihydrofolate Reductase.
Nature **257**, 564-566

- Feeney, R., Clarke, A.R. & Holbrook, J.J. (1990)**
A Single Amino Acid Substitution in Lactate Dehydrogenase Improves the Catalytic Efficiency with an Alternative Coenzyme.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **166**, 667-672
- Ferri, G., Comerio, G., Iaradola, P., Zapponi, M.C. & Speranza, M.L. (1978)**
Subunit Structure and Activity of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Spinach Chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta **522**, 19-31
- Ferri, G., Stoppini, M., Meloni, M.L., Zapponi, M.C. & Iaradola, P. (1990)**
Chloroplast Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (NADP) - Amino Acid Sequence of the Subunits from Isoenzyme I and Structural Relationship with Isoenzyme II.
Biochim. Biophys. Acta **1041**, 36-42
- Filman, D.J., Bolin, J.T., Matthews, D.A. & Kraut, J. (1982)**
Crystal Structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* Dihydrofolate Reductase Refined at 1.7 Å Resolution. II.Environment of Bound NADPH and Implications for Catalysis.
J. Biol. Chem. **257**, 13663-13672
- Furfine, C.S. & Velick, S.F. (1965)**
The Acylenzyme Intermediate and the Kinetic Mechanism of the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Reaction.
J. Biol. Chem. **240**, 844-855
- Ganter, C. & Plückthun, A. (1990)**
Glycine to Alanine Substitutions in Helices of Glyceraldehyde-3-phosphate Deshydrogenase : Effects on stability.
Biochemistry **29**, 9395-9402
- Ghosh, D., Weeks, C.M., Grochulski, P., Duax, W.L., Erman, M., Rimsay, R.L. & Orr, J.C. (1991)**
Three-dimensional Structure of Holo 3 α , 20 β -hydroxysteroid Dehydrogenase - A member of a Short-Chain Dehydrogenase Family.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 10064-10068
- Goldberg, J.D., Yoshida, T. & Brick, P. (1994)**
Crystal Structure of a NAD-Dependent D-Glycerate Dehydrogenase at 2 center dot 4 angstrom Resolution.
J. Mol. Biol. **236**, 1123-1140
- Grimshaw, C.E., Matthews, D.A., Varughese, K.I., Skinner, M., Xuong, N.H., Bray, T., Hoch, J. & Whiteley, J.M. (1992)**
Characterization and Nucleotide Binding Properties of a Mutant Dihydropteridine Reductase Containing an Aspartate 37-Isoleucine Replacement.
J. Biol. Chem. **267**, 15334-15339
- Grosse, F., Nasheuer, H.P., Scholtissek, S. & Schomburg, U. (1986)**
Lactate Dehydrogenase and Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase are Single Stranded DNA Binding Proteins that Affect the DNA-polymerase- α -primase complex.
Eur. J. Biochem. **160**, 459-467
- Haeffner-Gormley, L., Chen, Z.D., Zalkin, H. & Colman, R.F. (1992)**
Importance of Lysine-286 at the NADP Site of Glutamate Dehydrogenase from *Salmonella Typhimurium*.
Biochemistry **31**, 7807-7814

- Hall, M.D. & Banaszak, L.J.** (1993)
Crystal Structure of a Ternary Complex of *Escherichia coli* Malate Dehydrogenase Citrate and NAD at 1.9 Angstrom Resolution.
J. Mol. Biol. **232**, 213-222
- Hanukoglu, I. & Gutfinger, T.** (1989)
cDNA Sequence of Adrenoxin Reductase - Identification of NADP-binding Sites in Oxidoreductases.
Eur. J. Biochem. **180**, 479-484
- Harrigan, P.J. & Trentham, D.R.** (1974)
Kinetic Studies of Oxidized Nicotinamide-adenine Dinucleotide Facilitated Reactions of D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
Biochemical J. **143**, 353-363
- Harris, J.I. & Perham, R.N.** (1965)
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases - I The Protein Chains in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Pig Muscle.
J. Mol. Biol. **13**, 876-884
- Harris, J.I. & Waters, M.** (1976)
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
The Enzymes 3rd ed., **13**, 1-49
Boyer, P.D., Ed., New York, Academic Press
- Harrison, M.L., Rathinavelu, P., Arese, P., Geahlen, R.L. & P.S., L.** (1991)
Role of Band 3 Tyrosine Phosphorylation in the Regulation of Erythrocyte Glycolysis.
J. Biol. Chem. **266**, 4106-4111
- Helene, C., Brun, F. & Yaniv, M.** (1971)
Fluorescence Studies of Interactions Between *Escherichia coli* Valyl tRNA Synthetase and its Substrates.
J. Mol. Biol. **58**, 349-365
- Henis, Y.I. & Levitzki, A.** (1980)
Mechanism of Negative Cooperativity in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Deduced from Ligand Competition Experiments.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 5055-5059
- Hentze, M.W.** (1994)
Enzymes as RNA-Binding Proteins - A Role for (di)Nucleotide-Binding Domains.
Trends Biochem. Sci. **19**, 101-103
- Hol, W.G.J.** (1985)
The Role of the α -Helix Dipole in Protein Function and Structure.
Prog. Biophys. molec. Biol. **45**, 149-195
- Hoog, S.S., Pawlowski, J.E., Alzari, P.M., Penning, T.M. & Lewis, M.** (1994)
Three-Dimensional Structure of Rat Liver 3 α -Hydroxysteroid/ Dihydrodiol Dehydrogenase - A Member of the Aldo-Keto Reductase Superfamily.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 2517-2521
- Huang, S., Appleman, J.R., Tan, X., Thompson, P.D., Blakley, R.L., Sheridan, R.P., Venkataraghavan, R. & Freisheim, J.H.** (1990)
Role of Lysine-54 in Determining Cofactor Specificity and Binding in Human Dihydrofolate Reductase.
Biochemistry **29**, 8063-8069

- Huitorel, P. & Pantaloni, D. (1985)**
Bundling of Microtubules by Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and its Modulation by ATP.
Eur. J. Biochem. **150**, 265-269
- Hurley, J.H., Dean, A.M., Koshland, D.E. & Stroud, R.M. (1991a)**
Catalytic Mechanism of NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase - Implications from the Structures of Magnesium-Isocitrate and NADP⁺ Complexes.
Biochemistry **30**, 8671-8678
- Hurley, T.D., Bosron, W.F., Hamilton, J.A. & Amzel, L.M. (1991b)**
Structure of Human β 1 β 1 Alcohol Dehydrogenase : Catalytic Effects of Non-Active-Site Substitutions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 8149-8153
- Imada, K., Sato, M., Tanaka, N., Katsube, Y., Matsuura, Y. & Oshima, T. (1991)**
Three-dimensional Structure of a Highly Thermostable Enzyme, 3-Isopropylmalate Dehydrogenase of *Thermus thermophilus* at 2.2 Å Resolution.
J. Mol. Biol. **222**, 725-738
- Kant, J.A. & Steck, T.L. (1973)**
Specificity in the Association of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase with Isolated Human Erythrocyte Membranes.
J. Biol. Chem. **248**, 8457-8464
- Karplus, P.A., Daniels, M.J. & Herriott, J.R. (1991)**
Atomic Structure of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase : Prototype for a Structurally Novel Flavoenzyme Family.
Science **251**, 60-66
- Karplus, P.A. & Schulz, G.E. (1987)**
Refined Structure of Glutathione Reductase at 1.54 Å Resolution.
J. Mol. Biol. **195**, 701-729
- Karplus, P.A. & Schulz, G.E. (1989)**
Substrate Binding and Catalysis by Glutathione Reductase as Derived from Refined Enzyme : Substrate Crystal Structures at 2 Å Resolution.
J. Mol. Biol. **210**, 163-180
- Kawamoto, R.M. & Caswell, A.H. (1986)**
Autophosphorylation of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and Phosphorylation of Protein from Skeletal Muscle Microsomes.
Biochemistry **25**, 656-661
- Kelemen, N., Kellershohn, N. & Seydoux, F. (1975)**
Sturgeon Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase - Formation of Binary Complexes with Coenzymes and Substrates.
Eur. J. Biochem. **57**, 69-78
- Kirschner, K., Gallego, E., Schuster, I. & Goodall, D. (1971)**
Cooperative Binding of Nicotinamide-adenine Dinucleotide to Yeast Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
J. Mol. Biol. **58**, 29-50

- Klepp, J., Fallert-Müller, A., Grimm, K., Hull, W.E. & Rétey, J. (1990)**
Mechanism of Action of Urocanase - Specific ^{13}C -labeling of the Prosthetic NAD^+ and Revision of the Structure of its Adduct with Imidazolylpropionate.
Eur. J. Biochem. **192**, 669-676
- Klepp, J., Oberfrank, M., Retey, J., Tritsch, D., Biellmann, J.-F. & Hull, W.E. (1989)**
Nature of Coenzyme Binding by Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase - ^{13}C Studies with Oxidized [4- ^{13}C]nicotinamide adenine dinucleotide.
J. Am. Chem. Soc. **111**, 4440-4447
- Koshland, D.E., Jr, Nemethy, G. & Filmer, D. (1966)**
Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits.
Biochemistry **5**, 365-392
- Kosower, E.M. (1956)**
Additions to Pyridinium Rings - III Chemical and Biochemical Implications of Charge-Transfer Complex Intermediates.
J. Am. Chem. Soc. **78**, 3497-3501
- Kots, Y.A., Skurat, A.V., Sergienko, E.A., Bulargina, T.V. & Severin, E.S. (1992)**
Nitroprusside Stimulates the Cysteine-specific Mono(ADP-ribosylation) of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes.
FEBS Lett. **300**, 9-12
- Kramer, W., Drotsa, V., Jansen, H.W., Kramer, B., Flugfelder, M.P. & Fritz, H.J. (1984)**
The Gapped Duplex Deoxyribonucleic Acid Approach to Oligonucleotide Directed Mutation Construction.
Nucleic Acid Res. **12**, 9441
- Kraulis, P.J. (1991)**
MOLSCRIPT : a Program to Produce both Detailed and Schematic Plots of Proteins Structures.
J. Applied Crystall. **24**, 946-950
- Krebs, E.G., Rafter, G.W. and McBroom Junge, J. (1953)**
Yeast Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase II. *Yeast Protein 2.*
J. Biol. Chem. **200**, 479-492
- Krimsky, I. & Racker, E. (1955)**
Acyl Derivatives of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
Science **122**, 319-321
- Kumar, A., Shen, P.S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. & Samuelson, J. (1992)**
Cloning and Expression of an NADP^+ -Dependent Alcohol Dehydrogenase Gene of *Entamoeba Histolytica*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 10188-10192
- Kuriyan, J., Kong, X.-P., Krishna, T.S.R., Sweet, R.M., Murgolo, N.J., Field, H., Cerami, A. & Henderson, G.B. (1991)**
X-ray Structure of Trypanothione Reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4 Å Resolution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 8764-8768
- Lachaal, M., Berenski, C.J., Kim, J. & Jung, C.Y. (1990)**
An ATP-modulated Specific Association of GAPDH with Human Erythrocytes Glucose Transporter.
J. Biol. Chem. **265**, 15449-15454

- Laemmli, U.K.** (1970)
Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4.
Nature 227, 680-687
- Lamzin, V.S., Aleshin, A.E., Strokopytov, B.V., Yukhnovich, M.G., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H. & Wilson, K.S.** (1992)
Crystal Structure of NAD-Dependent Formate Dehydrogenase.
Eur. J. Biochem. 206, 441-452
- Lamzin, V.S., Dauter, Z., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H. & Wilson, K.S.** (1994)
High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase.
J. Mol. Biol. 236, 759-785
- Lantwin, C.B., Schlichting, I., Kabsch, W., Pai, E.F. & Krauthsiegel, R.L.** (1994)
The Structure of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase in the Oxidized and NADPH Reduced State.
Proteins - Struct. Funct. Genet. 18, 161-173
- Lareau, R.D. & Anderson, V.E.** (1992)
An Inquiry into the Source of Stereospecificity of Lactate Dehydrogenase Using Substrate Analogues and Molecular Modeling.
Biochemistry 31, 4174-4180
- Lenz, M. & Retey, J.** (1993)
Cloning, Expression and Mutational Analysis of the Urocanase Gene (*hutU*) from *Pseudomonas-putida*.
Eur. J. Biochem. 217, 429-434
- Leslie, A.G.W. & Wonacott, A.J.** (1984)
Structural Evidence for Ligand-Induced Sequential Conformational Changes in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
J. Mol. Biol. 178, 743-772
- Levitt, M. & Chothia, C.** (1976)
Structural Patterns in globular proteins.
Nature 261, 552-558
- Li, H. & Goldstein, B.M.** (1992)
Carboxamide Group Conformation in the Nicotinamide and Thiazole-4-carboxamide Rings- Implications for Enzyme Binding.
J. Med. Chem. 35, 3560-3567
- Lim, L.W., Mathews, F.S. & Steenkamp, D.J.** (1988)
Identification of ADP in the Iron-Sulfur Flavoprotein Trimethylamine Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 263, 3075-3078
- Lindahl, R.** (1992)
Aldehyde Dehydrogenases and Their Role in Carcinogenesis.
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27, 283-335
- Liu, L. & Huskey, W.P.** (1992)
Progress in Establishing the Rate-Limiting Features and Kinetic Mechanism of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Reaction.
Biochemistry 31, 6898-6903

- Liu, S.Q., Bhatnagar, A. & Srivastava, S.K.** (1993)
Bovine Lens Aldose Reductase - pH-Dependence of Steady-State Kinetic Parameters and Nucleotide Binding.
J. Biol. Chem. **268**, 25494-25499
- Loeber, G., Infante, A.A., Maurer-Fogy, I., Krystek, E. & M.B., D.** (1991)
Human NAD⁺-dependent Mitochondrial Malic Enzyme - cDNA Cloning, Primary Structure, and Expression in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **266**, 3016-3021
- Lottenberg, R., Broder, C.C., Boyle, M.D.P., Kain, S.J., Schroeder, B.L. & Curtis III, R.** (1992)
Cloning, Sequence Analysis, and Expression in *Escherichia coli* of a streptococcal Plasmin Receptor.
J. Bacteriol. **174**, 5204-5210
- Low, P.S., Rathinavelu, P. & Harrison, M.L.** (1993)
Regulation of Glycolysis via Reversible Enzyme Binding to the Membrane Protein, Band-3.
J. Biol. Chem. **268**, 14627-14631
- Malhotra, O.P. & Bernhard, A.** (1968)
Spectrometric Identification of an Active Site Specificity Acyl-glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **243**, 1243-1252
- Malhotra, O.P. & Bernhard, A.** (1973)
Activation of a Covalent Enzyme-Substrate Bond by Noncovalent Interaction with an Effector.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2077-2081
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J.** (1989)
Molecular Cloning.
New York, Cold spring Harbor press
- Martin, W., Brinkmann, H., Savonna, C. & Cerff, R.** (1993)
Evidence for a Chimeric Nature of Nuclear Genomes - Eubacterial Origin of Eukaryotic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 8692-8696
- Martin, W. & Cerff, R.** (1986)
Prokaryotic Features of a Nucleus-Encoded Enzyme - cDNA Sequences for Chloroplast and Cytosolic Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases from Mustard.
Eur. J. Biochem. **159**, 323-331
- Mas, M.T. & Colman, R.F.** (1984)
Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Binding of Nucleotides to NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase.
Biochemistry **23**, 1675-1683
- Mattevi, A., Obmolova, G., Sokatch, J.R., Betzel, C. & Hol, W.G.J.** (1992)
The Refined Crystal Structure of *Pseudomonas-Putida* Lipoamide Dehydrogenase Complexed with NAD⁺ at 2.45-Angstrom Resolution.
Proteins - Struct. Funct. Genet. **13**, 336-351
- Matthews, D.A., Varughese, K.I., Skinner, M., Xuong, N.H., Hoch, J., Trach, K., Schneider, M., Bray, T. & Whiteley, J.M.** (1991)
Role of aspartate-37 in determining cofactor specificity and binding in rat liver dihydropteridine reductase.
Arch. Biochem. Biophys. **287**, 234-239

- Mcdonald, B., Reep, B., Lapetina, E.G. & Vedia, L.M.Y. (1993)**
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is Required for the Transport of Nitric Oxide in Platelets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 11122-11126
- Mcdonald, L.J. & Moss, J. (1993)**
Stimulation by Nitric Oxide of an NAD Linkage to Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 6238-6241
- Melandri, B.A., Pupillo, P. & Baccarini-Melandri, A. (1970)**
D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Photosynthetic Cells. I. The Reversible Light-Induced Activation *in vivo* of NADP-Dependent Enzyme and its Relationship to NAD-Dependent Activities.
Biochim. Biophys. Acta **220**, 178-189
- Meloche, H.P. (1967)**
Bromopyruvate inactivation of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase. I. Kinetic evidence for active site specificity.
Biochemistry **6**, 2273-2280
- Messing, J., Gronenborn, B., Muller, H.B. & Hofschneider, P.H. (1977)**
Filamentous Coliphage M13 as a Cloning Vehicle : Insertion of HindIII Fragment of the lac Regulatory region in M13 Replicative form *in vitro*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 3642-3646
- Meunier, J.C. & Dalziel, K. (1978)**
Kinetic Studies of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Rabbit Muscle.
Eur. J. Biochem. **82**, 483-492
- Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J.K. & Sirover, M.A. (1991)**
A Human Nuclear Uracil DNA Glycosylase is the 37-kDa Subunit of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 8460-8464
- Michels, P.A.M., Poliszczak, A., Osinga, K.A., Misset, O., Beeumen, J.V., Wierenga, R.K., Borst, P. & Opperdoes, F.R. (1986)**
Two Tandemly Linked Identical Genes Code for the Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
Embo J. **5**, 1049-1056
- Misset, O., Beeumen, J.V., Lambeir, A.M., Van Der Meer, R. & Opperdoes, F.R. (1987)**
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Comparison of the Glycosomal and Cytosolic Isoenzymes.
Eur. J. Biochem. **162**, 501-507
- Mittl, P.R.E., Berry, A., Scrutton, N.S., Perham, R.N. & Schulz, G.E. (1993)**
Structural Differences Between Wild-Type NADP-Dependent Glutathione Reductase from Escherichia-Coli and a Redesigned NAD-Dependent Mutant.
J. Mol. Biol. **231**, 191-195
- Miyasaki, K. & Oshima, T. (1994)**
Coenzyme Specificity of 3-isopropylmalate Dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8.
Prot. Eng. **7**, 401-403

- Molina Y Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brüne, B., Di Silvio, M., Billiar, T.R. & Lapetina, E.G.** (1992)
Nitric Oxide-induced S-nitrosylation of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Inhibits Enzymatic Activity and Increases Endogenous ADP-ribosylation.
J. Biol. Chem. **267**, 24929-24932
- Möller, W. & Amons, R.** (1985)
Phosphate-Binding Sequences in Nucleotide-Binding Proteins.
FEBS Lett. **186**, 1-7
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P.** (1965)
On the Nature of Allosteric Transitions : a Plausible Model.
J. Mol. Biol. **12**, 88-118
- Moras, D., Olsen, K.W., Sabesan, M.N., Buehner, M., Ford, G.C. & Rossmann, M.G.** (1975)
Studies of Asymmetry in the Three-dimensional Structure of Lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **250**, 9137-9162
- Morgenegg, G., Winkler, G.C., Hübscher, U., Heizmann, C.W., Mous, J. & Kuenzle, C.C.** (1986)
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase is a Nonhistone Protein and a Possible Activator of Transcription in Neurons.
J. Neurochem. **47**, 54-62
- Mougin, A., Corbier, C., Soukri, A., Wonacott, A., Branlant, C. & Branlant, G.** (1988)
Use of Site-Directed Mutagenesis to Probe the Role of Cys149 in the Formation of Charge Transfer Transition in Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.
Prot. Eng. **2**, 45-48
- Murthy, M.R.N., Garavito, R.M., Johnson, J.E. & Rossmann, M.J.** (1980)
Structure of Lobster apo-D-glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase at 3.0 Å Resolution.
J. Mol. Biol. **138**, 859-872
- Nishiyama, M., Birktoft, J.J. & Beppu, T.** (1993)
Alteration of Coenzyme Specificity of Malate Dehydrogenase from *Thermus flavus* by Site-Directed Mutagenesis.
J. Biol. Chem. **268**, 4656-4660
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R.** (1980)
A Simplified Ultrasensitive Silver Stain Method for Detecting Proteins in Polyacrylamid Gel.
Anal. Biochem. **105**, 361-363
- Ohlsson, I., Nordström, B. & Bränden, C.-I.** (1974)
Structural and functional similarities within the coenzyme binding domains of dehydrogenases.
J. Mol. Biol. **89**, 339-354
- Olivier-Deyris L.** (1994)
Etude structurale de la Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase d'*E. coli*.
Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble
- Orengo, C.A., Flores, T.P., Taylor, W.R. & Thornton, J.M.** (1993)
Identification and Classification of Protein Fold Families.
Prot. Eng. **6**, 485-500
- Pai, E.F., Karplus, P.A. & Schulz, G.E.** (1988)
Crystallographic Analysis of the Binding of NADPH, NADPH Fragments, and NADPH Analogues to Glutathione Reductase.
Biochemistry **27**, 4465-4474

- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W. & Wittinghoffer, A. (1990)**
Refined Crystal Structure of the Triphosphate Conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution - Implications for the Mechanism of GTP Hydrolysis.
Embo J. **9**, 2351-2359
- Pancholi, V. & Fischetti, V.A. (1992)**
A Major Surface Protein on Group-A Streptococci Is a Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase with Multiple Binding Activity.
J. Exp. Med. **176**, 415-426
- Pancholi, V. & Fischetti, V.A. (1993)**
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase on the Surface of Group-A Streptococci Is Also an ADP-Ribosylating Enzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 8154-8158
- Patel, G.L. & Thomson, P.E. (1980)**
Immuno-reactive Helix Destabilising Protein Localized in Transcriptionally Active Regions of Drosophila Polytene Chromosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 6749-6753
- Pawluk, A., Scopes, R.K. & Griffiths-Smith, K. (1986)**
Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*.
Biochemical J. **238**, 275-281
- Perucho, M., Salas, J. & Salas, M.L. (1977)**
Identification of the Mammalian DNA Binding Protein P8 as Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
Eur. J. Biochem. **81**, 557-562
- Racker, E. & Krinsky, I. (1952)**
The Mechanism of Oxidation of Aldehydes by Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **198**, 731-743
- Rao, S.T. & Rossmann, M.G. (1973)**
Comparison of Super-Secondary Structures in Proteins.
J. Mol. Biol. **76**, 241-256
- Rondeau, J.-M., Tête-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J.-M., Barth, P., Biellmann, J.-F. & Moras, D. (1992)**
Novel NADPH-binding Domain Revealed by the Crystal Structure of Aldose Reductase.
Nature **355**, 469-472
- Rossmann, M.G., Adams, M.J., Buehner, M., Ford, G.C., Hackert, M.L., Liljas, A., Rao, S.T., Banaszak, L.J., Hill, E., Tsernoglou, D. & Webb, L. (1973)**
Molecular Symmetry Axes and Subunit Interfaces in Certain Dehydrogenases.
J. Mol. Biol. **76**, 533-537
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén, C.-I. & Banaszak, L.J. (1975)**
Evolutionary and Structural Relationships among Dehydrogenases.
The Enzymes 3rd ed., **11**, 61-102
Boyer, P.D., Ed., New York, Academic Press
- Ryazanov, A.G. (1985)**
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase is One of the Three Major RNA Binding Proteins of Rabbit Reticulocytes.
FEBS Lett. **192**, 131-134

- Ryazanov, A.G., Ashmarina, L.I. & Muronetz, V.I. (1988)**
Association of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase with Mono and Polyribosomes of Rabbit Reticulocytes.
Eur. J. Biochem. **171**, 301-305
- Sanger, F., Nickeln, S. & Coulsen, A.R. (1977)**
DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4563-4566
- Saraste, M., Sibbald, P.R. & Wittinghoffer, A. (1990)**
The P-loop - A Common Motif in ATP- and GTP-binding Proteins.
Trends in Biochemical Science **15**, 430-434
- Schiering, N., Kabsh, W., Moore, M.J., Distefano, M.D., Walsh, C.T. & Pai, E.F. (1991)**
Structure of the Detoxification Catalyst Mercuric Ion Reductase from *Bacillus sp.* strain RC607.
Nature **352**, 168-172
- Schreuder, H.A., Prick, P.A.J., Wierenga, R.K., Vriend, G., Wilson, K.S., Hol, W.G.J. & Drenth, J. (1989)**
Crystal Structure of the p-hydroxybenzoate Hydroxylase-Substrate Complex Refined at 1.9 Å Resolution - Analysis of the Enzyme-Substrate and Enzyme-Product Complexes.
J. Mol. Biol. **208**, 679-696
- Schulz, G.E., Elzinga, M., Marx, F. & Schirmer, R.H. (1974)**
Three-dimensional Structure of Adenylate Kinase.
Nature **250**, 120-123
- Schulz, G.E. (1992)**
Binding of Nucleotides by Proteins.
Curr. Op. Struct. Biol. **2**, 61-67
- Scrutton, N.S., Berry, A. & Perham, R.N. (1990)**
Redesign of the Coenzyme Specificity of a Dehydrogenase by Protein Engineering.
Nature **343**, 38-43
- Seery, V.L. & Farrell, H.M.J. (1990)**
Spectroscopic Evidence for Ligand-Induced Conformational Change in NADP⁺-Isocitrate Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **265**, 17644-17648
- Segal, H.L. & Boyer, P.D. (1953)**
The Role of Sulfhydryl groups in the Activity of D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **204**, 265-281
- Sem, D.S. & Kasper, C.B. (1993)**
Interaction with Arginine-597 of NADPH Cytochrome-P-450 Oxidoreductase Is a Primary Source of the Uniform Binding Energy Used to Discriminate Between NADPH and NADH - Appendix - Thermodynamic Interpretation of Combined Alternate Substrate/ Inhibitor, pH, and Site-Directed Mutagenesis Studies.
Biochemistry **32**, 11548-11558
- Seydoux, F., Bernhard, S., Pfenninger, O., Payne, M. & Malhotra, O.P. (1973)**
Preparation and Active Site Specific Properties of Sturgeon Muscle Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
Biochemistry **12**, 4290-4300

- Sheridan, R.P. & Venkataraghavan, R. (1992)**
A Systematic Search for Protein Signature Sequences.
Proteins - Struct. Funct. Genet. **14**, 16-28
- Shih, M.C., Lazar, G. & Goodman, H.M. (1986)**
Evidence in Favor of the Symbiotic Origin of Chloroplasts - Primary Structure and Evolution of Tobacco Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases.
Cell **47**, 73-80
- Shirakihara, Y. & Evans, P.R. (1988)**
Crystal Structure of the Complex of Phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its Reaction Products.
J. Mol. Biol. **204**, 973-994
- Simonin, F. (1992)**
Etude Structurale et Fonctionnelle du Domaine Catalytique de la Poly(ADP-ribose) Polymerase Humaine.
Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
- Simonin, F., Menissier-De Murcia, J., Poch, O., Muller, S., Gradwohl, G., Molinete, M., Penning, C., Keith, G. & De Murcia, G. (1990)**
Expression and Site-Directed Mutagenesis of the Catalytic Domain of Human Poly(ADP-ribose)polymerase in *Escherichia coli* - Lysine 893 is Critical for Activity.
J. Biol. Chem. **265**, 19249-19256
- Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., Wartna, E.S., Van Zanten, B.A.M., Witholt, B. & Hol, W.G.J. (1991)**
Crystal Structure of a Cholera Toxin-related Heat-labile Enterotoxin from *E. coli*.
Nature **351**, 371-377
- Sixma, T.K., Kalk, K.H., Vanzanten, B.A.M., Dauter, Z., Kingma, J., Witholt, B. & Hol, W.G.J. (1993)**
Refined Structure of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin, a Close Relative of Cholera Toxin.
J. Mol. Biol. **230**, 890-918
- Skarzynski, T., Moody, P.C.E. & Wonacott, A.J. (1987)**
Structure of holo-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution.
J. Mol. Biol. **193**, 171-187
- Skarzynski, T. & Wonacott, A.J. (1988)**
Coenzyme-induced Conformational Changes in Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*.
J. Mol. Biol. **203**, 1097-1118
- Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. & Nyc, J.F. (1975)**
Glutamate Dehydrogenases.
The Enzymes 3rd ed., **11**, 293-367
Boyer, P.D., Ed., New York, Academic Press
- Smith, W.W., Burnett, R.M., Darling, G.D. & Ludwig, M.L. (1977)**
Structure of the Semiquinone Form of Flavodoxin from *Clostridium MP* - Extension of 1.8 Å Resolution and some Comparisons with the Oxidized State.
J. Mol. Biol. **117**, 195-225

- Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A., Branlant, C. & Branlant, G. (1989)**
Role of the Histidine 176 Residue in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase as Probed by Site-directed Mutagenesis.
Biochemistry **28**, 2586-2592
- Stehle, T., Ahmed, S.A., Clairborne, A. & Schulz, G.E. (1991)**
Structure of NADH Peroxydase from *Streptococcus faecalis* 10C1 Refined at 2.16 Å Resolution.
J. Biol. Chem. **221**, 1325-1344
- Stehle, T., Claiborne, A. & Schulz, G.E. (1993)**
NADH Binding Site and Catalysis of NADH Peroxidase.
Eur. J. Biochem. **211**, 221-226
- Stélandre, M., Bosseloir, Y., De Bruin, J., Maes, P. & Content, J. (1992)**
Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding an NADP-dependent Alcohol Dehydrogenase in *Mycobacterium bovis* BCG.
Gene **121**, 79-86
- Stoddard, B.L., Dean, A. & Koshland, D.E. (1993)**
Structure of Isocitrate Dehydrogenase with Isocitrate, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, and Calcium at 2.5-Angstrom Resolution - A Pseudo-Michaelis Ternary Complex.
Biochemistry **32**, 9310-9316
- Stryer, L. (1988)**
Biochemistry 3rd ed.
New York, W.H. Freeman and Company
- Swindells, M.B. (1993)**
Classification of Doubly Wound Nucleotide Binding Topologies Using Automated Loop Searches.
Protein Sci. **2**, 2146-2153
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1987)**
DNA Sequence Analysis with a Modified Bacteriophage T7 DNA Polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 4767
- Teller, J.K., Smith, R.J., Mcpherson, M.J., Engel, P.C. & Guest, J.R. (1992)**
The Glutamate Dehydrogenase Gene of *Clostridium-Symbiosum* - Cloning by Polymerase Chain Reaction, Sequence Analysis and over-Expression in *Escherichia-Coli*.
Eur. J. Biochem. **206**, 151-159
- Trentham, D.R. (1971a)**
Rate-Determining Processes and the Number of Simultaneously Active Sites of D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
Biochemical J. **122**, 71-77
- Trentham, D.R. (1971b)**
Reactions of D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Facilitated by Oxidized Nicotinamide-adenine Dinucleotide.
Biochemical J. **122**, 59-69
- Tsai, I.H. & Green, H. (1973)**
Studies on a Mammalian Cell Protein (P8) with Affinity for DNA in vitro.
J. Mol. Biol. **73**, 307-316
- Tsai, I.H., Prasanna, S.N., Murthy, S.N.P. & Steck, T.L. (1982)**
Effect of Red Cell Membrane on the Catalytic of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **257**, 1438-1442

- Varughese, K.I., Skinner, M.M., Whiteley, J.M., Matthews, D.A. & Xuong, N.H. (1992)**
Crystal Structure of Rat Liver Dihydropteridine Reductase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 6080-6084
- Vollberg, T.M., Siegler, K.M., Cool, B. & Sirover, M.A. (1989)**
Isolation and Characterization of the Human Uracil DNA Glycosylase Gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 8693-8697
- Vrielink, A., Lloyd, L.F. & Blow, D.M. (1991)**
Crystal Structure of Cholesterol Oxidase from *Brevibacterium sterolicum* Refined at 1.8 Å Resolution.
J. Mol. Biol. **219**, 533-554
- Waksman, G., Krishna, T.S.R., Williams, C.H. & Kuriyan, J. (1994)**
Crystal Structure of *Escherichia coli* Thioredoxin Reductase Refined at 2 angstrom Resolution - Implications for a Large Conformational Change During Catalysis.
J. Mol. Biol. **236**, 800-816
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gay, N.J. (1982)**
Distantly Related Sequences in the α - and β -subunits of ATP Synthase, Myosin, Kinases and other ATP Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold.
Embo J. **1**, 945-951
- Weber, J.P. & Bernhardt, A. (1982)**
Transfer of 1,3-diphosphoglycerate Between Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and Phosphoglycerate Kinase via an Enzyme-substrate-enzyme Complex.
Biochemistry **21**, 4189-4194
- Weinhold, E.G., Glasfeld, A., Ellington, A.D. & Benner, S. (1991)**
Structural Determinants of Stereospecificity in Yeast Alcohol Dehydrogenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 8420-8424
- White, J.L., Hackert, M.L., Buehner, M., Adams, M.J., Ford, G.C., Lentz, P.J., Smiley, I.E., Steindel, S.J. & Rossmann, M.J. (1976)**
A Comparison of the Structures of Apo Dogfish M4 Lactate Dehydrogenase and its Ternary Complexes.
J. Mol. Biol. **102**, 759-779
- Wierenga, R.K., De Maeyer, M.C.H. & Hol, W.G.J. (1985)**
Interaction of Pyrophosphate Moieties with α -Helices in Dinucleotide-Binding Proteins.
Biochemistry **24**, 1346-1357
- Wierenga, R.K., Terpstra, P. & Hol, W.G.J. (1986)**
Prediction of the Occurrence of the ADP-binding $\beta\beta$ -fold in Proteins, Using an Amino acid Sequence Fingerprint.
J. Mol. Biol. **187**, 101-107
- Wilder, R.T., Venkataramu, S.D., Dalton, L.R., Birktoft, J.J., W.E., T. & Park, J.H. (1989)**
Catalytic Mechanism and Interactions of NAD⁺ with Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase - Correlation of EPR data and Enzymatic Studies.
Biochim. Biophys. Acta **997**, 65-77
- Wilmanns, M., Hyde, C.C., Davies, D.R., Kirschner, K. & Jansonius, J.N. (1991)**
Structural Conservation in Parallel β/α -Barrel Enzymes That Catalyze Three Sequential Reactions in the Pathway of Tryptophan Biosynthesis.
Biochemistry **30**, 9161-9169

Wilson, D.K., Bohren, K.M., Gabbay, K.H. & Quioco, F.A. (1992)

An Unlikely Sugar Substrate Site in the 1.65 Å Structure of the Human Aldose Reductase Holoenzyme Implicated in Diabetic Complications.
Science 257, 81-84

Zhang, J. & Snyder, S.H. (1992)

Nitric Oxide Stimulates Auto-ADP-Ribosylation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9382-9385

Zhang, Z.M., Djebli, A., Shoham, M., Frolow, F., Peretz, M. & Burstein, Y. (1993)

Crystal Parameters of an Alcohol Dehydrogenase from the Extreme Thermophile *Thermoanaerobium brockii*.
J. Mol. Biol. 230, 353-355

Zheng, J., Chen, Y.Q. & Callender, R. (1993)

A Study of the Binding of NADP Coenzymes to Dihydrofolate Reductase by Raman Difference Spectroscopy.
Eur. J. Biochem. 215, 9-16

Nom : CLERMONT (épouse RAHUEL)

Prénom : Sophie

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en ENZYMOLOGIE



VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 14 DEC. 1994 - u° k03

Le Président de l'Université



RÉSUMÉ

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase de type phosphorylante (GAPDH) comme enzyme modèle pour l'étude de la spécificité de cofacteur des oxydoréductases à NAD(P).

En combinant connaissance de la structure tridimensionnelle de la GAPDH glycolytique NAD-dépendante de *Bacillus stearotherophilus* et comparaisons de séquences primaires avec les GAPDH chloroplastiques NAD(P)-dépendantes, deux types de déterminants structuraux ont été proposés pour expliquer la spécificité NAD stricte de l'enzyme de *B. stearotherophilus* : les résidus L187 et P188 situés à l'interface entre deux sous-unité du tétramère, et les résidus D32, L33, T34 et D35 dont le rôle dépendrait de la structure tertiaire et situés dans la région C-terminale du motif $\beta_A\alpha\beta_B$ du repliement de Rossmann, structure impliquée dans la liaison du cofacteur.

Nous avons étudié une série de mutants de la GAPDH NAD-dépendante au niveau de la liaison du NAD et du NADP ainsi qu'au niveau catalytique. Nos résultats suggèrent que l'absence d'activité de l'enzyme de type sauvage avec le NADP proviendrait de facteurs moléculaires stériques et de la répulsion électrostatique entre le groupement 2'-phosphate du NADP et le résidu Asp32. Les triples mutations D32A-L187A-P188S (D32A-S) et D32G-L187A-P188S (D32G-S) entraînent une inversion de la spécificité de cofacteur en faveur du NADP, les enzymes mutées étant 2 et 4 fois plus efficaces avec le NADP qu'avec le NAD, respectivement. C'est pour le mutant D32G-S que les valeurs maximales d'efficacité enzymatique et d'affinité avec le NADP sont observées, mais avec un rapport k_{cat}/K_M demeurant 33 et 55 fois inférieur à celui de l'enzyme glycolytique sauvage avec le NAD et de l'enzyme chloroplastique avec le NADP, respectivement. Les substitutions L33T-T34G-D35G sur le mutant S conduisent à une faible augmentation de l'affinité et de l'efficacité catalytique avec le NADP. D'autres déterminants structuraux de la GAPDH chloroplastique interviennent donc pour rendre compatibles la présence du 2'-phosphate du NADP avec celle de D32.

L'étude du mécanisme réactionnel suggère que ces mutations au niveau du site de liaison de l'adénosine provoquent un changement de l'étape limitante de la réaction, liée à une altération de la transition conformationnelle induite par la liaison du cofacteur. Ceci pourrait avoir comme conséquence une modification des propriétés de coopérativité de fixation du NAD au tétramère, qui deviendrait positive pour le mutant D32E alors qu'elle est négative pour l'enzyme de type sauvage.

L'ensemble de nos résultats, comparés à ceux de la littérature, suggèrent que le caractère strict de la NAD-spécificité de nombreuses oxydoréductases dépend de facteurs structuraux généraux comme le résidu D32, mais aussi spécifiques à chaque type d'enzyme, comme les déterminants de type quaternaire L187 et P188 de la GAPDH. De plus, nos résultats permettent de préciser que les modalités de liaison du NAD aux déshydrogénases à dualité de cofacteur NAD et NADP, auxquelles participerait le résidu acide situé à l'extrémité C-terminale du brin β_B , sont analogues à celles des enzymes strictement NAD-dépendantes.

Mots-clés : Oxydoréductase ; GAPDH ; NAD(P) ; Spécificité de cofacteur ; Spécificité stricte et duale ; Repliement de Rossmann ; Transition apo→holo ; Mutagenèse dirigée