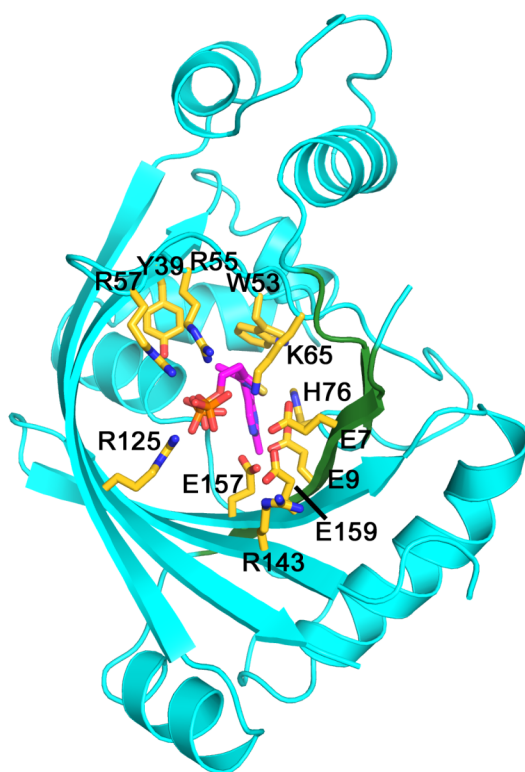


**Université de Liège**  
Faculté de Médecine  
Giga-Neurosciences

**Unité de Bioénergétique, Excitabilité et Plasticité Cérébrale**  
Promoteur : Docteur Lucien BETTENDORFF

# Mécanisme catalytique et structure des enzymes de la superfamille CYTH

*De la 25-kDa thiamine triphosphatase de mammifère à la découverte de tripolyphosphatases spécifiques de bactéries*



**David DELVAUX**

Licencié en Sciences Biochimiques





Comme le disait feu le poète et philosophe Paul Valéry : « Un homme seul est toujours en mauvaise compagnie ». Il est bien sûr absurde d'imaginer que l'aboutissement d'une thèse de doctorat dans de bonnes conditions ne soit dû qu'au travail d'une seule personne. Même si la vie nous réserve parfois de mauvaises surprises, j'estime avoir eu la chance d'être entouré, tant sur le plan privé que professionnel, par des personnes exceptionnelles. Ces quelques remerciements sont donc pour vous :

J'adresse mes premiers remerciements au Docteur Lucien Bettendorff pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat dans son unité. Par son calme, sa sérénité et sa grande connaissance scientifique, il m'a permis de franchir certains obstacles qui, parfois, me paraissaient insurmontables. Ses « bonnes ondes » ont su me venir en aide aux moments opportuns. Une HPLC récalcitrante ? Un spectro défectueux ? Une éclaboussure de  $^{32}\text{P}$  ? Pas de panique, il suffit que Lucien impose ses mains pour te faire oublier ton chagrin... Plus sérieusement, je pense que sans avoir l'air d'y toucher, il est devenu une référence dans le domaine du métabolisme cellulaire. C'est un honneur pour moi de l'avoir côtoyé durant mes quatre années de thèse.

Une autre personne à qui je dois beaucoup est le Dr. Pierre Wins. J'aimerais lui dédier la chanson écrite par les Scorpions lors de la chute du mur de Berlin intitulée « The Winds of Change » que j'ai rebaptisée pour l'occasion « The Wins of Change ». En effet, grâce à sa connaissance étendue de la littérature, le Dr. Wins réussi à faire tomber les barrières qui séparent les décennies de recherche scientifique et à remettre au goût du jour les découvertes ayant fait la gloire du siècle passé. Il est un puits de science qui jamais ne tarit et qui jamais ne te laisse dans l'oubli. Durant mon doctorat, il a répondu avec enthousiasme à chacune de mes sollicitations. Pour ces raisons, je lui suis infiniment reconnaissant.

J'ai aussi une attention particulière pour le Dr. Ilca Margineanu qui, au-delà des conseils judicieux qu'elle m'a prodigués pour faire avancer mon travail, m'a permis d'aborder l'éducation d'Oscar avec un oeil rempli de fraîcheur. Elle est la grand-mère que tout enfant rêverait d'avoir et sa petite fille Anna Sophia a beaucoup de chance de pouvoir compter sur elle. Je la remercie pour toute l'attention qu'elle a portée à mon travail et à mon rôle de papa.

Je remercie le Professeur Thierry Grisar. Sa faculté à transmettre son amour pour le cerveau et son fonctionnement est tout à fait exceptionnelle. Espérons que les futurs étudiants auront la chance de pouvoir compter sur des Professeurs de cette trempe.

Je remercie Marjo et Tiz. Ce fût un réel plaisir de travailler avec elles. Je pense que la diversité de nos caractères a permis de créer une très bonne ambiance dans notre petite équipe. Je leur souhaite beaucoup de bonheur dans leurs (nombreux) projets futurs.

Merci aussi à Laurence (alias Sue pour les intimes) pour sa complicité et sa disponibilité.

Je remercie Le Docteur Bernard Lakaye et son acolyte Bernard Coumans de m'avoir enseigné les bases théoriques et techniques de la biologie moléculaire. Elles furent sans aucun doute une des clé de la réussite de mon travail. Aussi, je ne les remercierais jamais assez pour le soutien de notre merveilleuse équipe du Standard de Liège qui fait la fierté de notre belle principauté. Ce fut un réel plaisir de faire et défaire les matchs du week-end avec vous.

Je remercie Nath de m'avoir véhiculé du temps où elle arpentait encore les vertes vallées sprimontoises.

Merci aussi à Greg, Julie, Sophie, Coraline, Arlette pour leur bonne humeur et pour leur contribution à la bonne ambiance de travail qui règne dans notre unité.

Je remercie également les Docteurs Fî Beukelaers, Fî Kroonen et le bientôt Docteur JeanFî Defourny pour les moments de bonne humeur passés en votre compagnie. Nombreux sont les souvenirs impérissables, passés en votre compagnie, que j'emmène dans mes cartons. Nos joutes verbales rouches contre mauves, au cours desquelles Beuky nous clouait souvent le bec, resteront dans les annales.

Merci à Lari, son attention pour le baptême d'Oscar et notre mariage nous a été droit au cœur.

Je remercie les Professeurs Moonen, Balthazart, Schoenen, Seutin et les Docteurs Malgrange, Franzen, Nguyen, Leprince, Multon, Thiry, Cornil, Charlier, Parent et Bakker.



Je tiens à remercier le Professeur Bernard Rogister d'avoir accepté d'être le président de mon jury ainsi que les autres membres du jury pour avoir pris le temps de lire ma thèse. Je remercie particulièrement le Docteur Benaïssa El Moualij pour l'intérêt qu'il a porté à mes recherches et pour son énorme enthousiasme.

Je remercie aussi tous les autres membres du Giga Neurosciences. J'ai eu un réel plaisir de côtoyer : Jan, Marie-Laure, Mo, Jess, Jess, Juliette, Benja, Nico, Emerence, Noémie, Lau (alias Queen Mum), Sophie, Laurence, Priscilla, Rosalie, Pat de culture, Neville, Cédric, Renaud, Linda, Dorothée, Murielle, Alexandra, Jeanine, Dominique, Philippe, Olivier, Bertrand, Mélanie, Céline, Quentin, Sylvain, Karen, Aurore, Christelle, Mélissa, Alice, Sabrina, Sabine, Linda, Audrey, Alex.

Je voudrais également remercier Paulette Charlier, Valérie Gabélica, Frédéric Kerff, Murty, André Matagne, Edwin De Pauw et Vladimir Lunin. Je considère l'opportunité d'avoir pu collaborer avec des chercheurs de cette qualité comme une réelle chance, sans laquelle mon travail aurait perdu une bonne partie de sa valeur.

Mes derniers remerciements vont à ma famille et à ma belle-famille. Merci à mon papa d'être là pour Oscar, Sarah et moi. C'est avec plaisir que je lui dévoile le fruit de mes efforts. Merci également à ma grande sœur Sarah et à mes frangins Mumu et Nico, j'espère que vous êtes aussi fière de moi que moi de vous. Je voudrais également remercier Coline, Hélène, André et Martine pour leur soutien.

Un remerciement n'est pas suffisant pour exprimer la reconnaissance que j'éprouve envers Sarah, mon épouse. Elle m'a offert, en mettant Oscar au monde et en acceptant de devenir ma femme, les plus beaux cadeaux dont un homme puisse rêver. Rien n'aurait été possible sans son soutien.



*Je dédie cette thèse à ma maman qui pour toujours est dans mon cœur*



## Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase
AD	Maladie d'Alzheimer (« Alzheimer disease »)
AK	Adénylate kinase
A <sub>Th</sub> DP	Adénosine thiamine diphosphate
A <sub>Th</sub> TP	Adénosine thiamine triphosphate
c <sub>PPP</sub> i	Trimétaphosphate cyclique
DMEM Medium)	Milieu Eagle modifié par Dulbecco (« Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FBS	Sérum foetal bovin (« Fetal Bovine Serum »)
Gp <sub>4</sub>	Guanosine 5'-tétraphosphate
GST	Glutathion-S-transférase
HEPES	Acide n-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthane] sulfonique
HPLC Liquid Chromatography »)	Chromatographie liquide à haute performance (« High Performance
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani
MOPS	Acide 3-[N-morpholino] propane sulfonique
MS	Spectrométrie de Masse (« Mass Spectrometry »)
NTP	Nucléoside triphosphate
OGDH	Oxoglutarate déshydrogénase
P <sub>4</sub>	Tétraphosphate inorganique
PDH	Pyruvate déshydrogénase
P <sub>i</sub>	Phosphate inorganique
PolyP	Polyphosphate inorganique
PPPase	Triphosphatase inorganique
PPPi	Triphosphate inorganique
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-Page	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant
TCA	Acide trichloroacétique
TD	Déficiencia en thiamine (« Thiamine Deficiency »)
TEV Protéase Protease»)	Protéase du virus de la mosaïque du tabac (« Tobacco Etch Virus
ThDP	Diphosphate de thiamine
ThMP	Monophosphate de thiamine
ThTP	Triphosphate de thiamine
ThTPase	Thiamine triphosphatase
ThTR1	Transporteur de la thiamine à haute affinité (« Thiamin Transporter 1)
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
TTM	Triphosphate tunnel metalloenzyme



## INTRODUCTION

<b>1. Aperçu historique de la découverte de la thiamine et de son rôle dans le métabolisme</b>	<b>4</b>
<b>2. Structure de la thiamine et de ses dérivés phosphorylés</b>	<b>5</b>
<b>3. Métabolisme de la thiamine et de ses dérivés</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Transport de la thiamine</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Synthèse et transport mitochondrial du diphosphate de thiamine</b>	<b>6</b>
<b>3.3 Synthèse du triphosphate de thiamine</b>	<b>7</b>
<b>3.4 Hydrolyse enzymatique du triphosphate de thiamine</b>	<b>9</b>
<b>4. Rôle fondamental du diphosphate de thiamine dans le métabolisme énergétique</b>	<b>10</b>
<b>5. La superfamille de protéines CYTH : la 25-kDa ThTPase et ses orthologues</b>	<b>11</b>
<b>6. Distribution du ThTP dans différents organismes et tissus</b>	<b>12</b>
<b>7. Rôles possibles du triphosphate de thiamine et des thiamine triphosphatases</b>	<b>14</b>
<b>8. Rôle particulier des dérivés de la thiamine dans le système nerveux</b>	<b>15</b>
<b>8.1 Sensibilité particulière du système nerveux à la carence en thiamine</b>	<b>15</b>
<b>8.2 Implication de la carence en ThDP dans les maladies neurodégénératives</b>	<b>17</b>

## MATERIEL ET METHODES

<b>1 Matériel</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Solvants et réactifs</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Les milieux de culture</b>	<b>20</b>
1.2.1 Le milieu LB	20
1.2.2 Le milieu 2xYT	20
<b>1.3 Les enzymes</b>	<b>21</b>
1.3.1 L'ADN polymérase Pfu	21
1.3.2 L'enzyme DpnI	21
1.3.3 L'enzyme TEV protéase	22
<b>1.4 Les souches de bactéries</b>	<b>22</b>
1.4.1 La souche d'E. coli DH5 $\alpha$	22
1.4.2 La souche d'E. coli BL21 DE3	22
<b>1.5 Le thermocycleur</b>	<b>23</b>
<b>1.6 L'équipement FRENCH Pressure Cell Press</b>	<b>23</b>
<b>1.7 Le système ÄKTApurifier</b>	<b>24</b>
<b>2 Méthodes</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Synthèse et purification du ThTP</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Surexpression et purification de NeuTTM et de la mThTPase</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Cristallisation, enregistrement des résultats, résolution des structures et docking</b>	<b>25</b>
2.3.1 Cristallisation, collecte des données et détermination de la structure de NeuTTM	25

2.3.2	Cristallisation, collecte des données et détermination de la structure du complexe hThTPase-PPPi26	
2.3.3	Docking du ThTP dans la structure de la ThTPase	26
<b>2.4</b>	<b>Spectrométrie de masse native en électrospray et tamis moléculaire</b>	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Mutagenèse dirigée par PCR</b>	<b>27</b>
<b>2.6</b>	<b>Détermination de l'activité phosphohydrolase</b>	<b>29</b>
<b>2.7</b>	<b>Détermination de l'activité enzymatique dans un gel non-dénaturant</b>	<b>29</b>
<b>2.8</b>	<b>Manipulation des cellules HEK293</b>	<b>29</b>
2.8.1	Culture cellulaire	29
2.8.2	Construction d'un vecteur exprimant la hThTPase couplée à l'EGFP en cellules eucaryotes	29
2.8.3	Transfection transitoire	31
2.8.4	Analyse de la localisation de l'EGFP par fluorescence	32
<b>2.9</b>	<b>Expression du gène de la 25kDa ThTPase dans des lignées cellulaires par w-RT-PCR</b>	<b>32</b>
<b>2.10</b>	<b>Identification de partenaires protéiques de la mThTPase (« Pulldown assay »)</b>	<b>33</b>

## RESULTATS

<b>1.</b>	<b><i>Structure et mécanisme catalytique de la 25-kDa ThTPase de mammifère</i></b>	<b>34</b>
<b>1.1</b>	<b>Background</b>	<b>34</b>
1.1.1	Découverte et caractérisation moléculaire de la 25-kDa ThTPase de mammifères	34
1.1.2	Modification chimique de résidus d'acides aminés	35
<b>1.2</b>	<b>Résultats</b>	<b>37</b>
1.2.1	Clonage, surexpression et purification de la 25-kDa ThTPase de mammifère	37
1.2.2	Relation structure-fonction de la 25-kDa ThTPase	43
<b>1.3</b>	<b>Conclusion</b>	<b>59</b>
<b>2.</b>	<b><i>Sur la piste du rôle physiologique de la 25-kDa ThTPase</i></b>	<b>60</b>
<b>2.1</b>	<b>Background</b>	<b>60</b>
<b>2.2</b>	<b>Localisation subcellulaire de la EGFP-hThTPase dans des lignées cellulaires</b>	<b>61</b>
<b>2.3</b>	<b>Mise en évidence d'interactions entre la mThTPase et des protéines de cerveau de souris</b>	<b>64</b>
<b>2.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>65</b>
<b>3.</b>	<b><i>NeuTTM, une enzyme bactérienne qui appartient à la superfamille CYTH et qui hydrolyse spécifiquement le tripolyphosphate inorganique</i></b>	<b>66</b>
<b>3.1</b>	<b>Background</b>	<b>66</b>
<b>3.2</b>	<b>Clonage, expression et purification de NeuTTM</b>	<b>68</b>
<b>3.3</b>	<b>Propriétés structurales de la protéine recombinante</b>	<b>69</b>
<b>3.4</b>	<b>Spécificité et propriétés cinétiques</b>	<b>71</b>
<b>3.5</b>	<b>Effet de différents activateurs et inhibiteurs de NeuTTM recombinante</b>	<b>76</b>
<b>3.6</b>	<b>Étude des complexes enzymatiques formés par NeuTTM en présence ou non de PPPi et/ou de différents cations par spectrométrie de masse</b>	<b>80</b>
<b>3.7</b>	<b>Mise en évidence de l'activité de NeuTTM sous forme de monomère ou dimère par électrophorèse en conditions non-dénaturantes</b>	<b>84</b>
<b>3.8</b>	<b>Mutagenèse dirigée</b>	<b>86</b>



3.9 Conclusion	91
4. <i>Ygif, l'orthologue CYTH de E. coli</i>	92
4.1 Clonage, surexpression et purification d'Ygif	92
4.2 Spécificité et propriétés cinétiques d'Ygif recombinante	93
4.3 Conclusion à propos d'Ygif	96
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	97
PERSPECTIVES	106
BIBLIOGRAPHIE	107
ANNEXE I	
ANNEXE II	



# INTRODUCTION



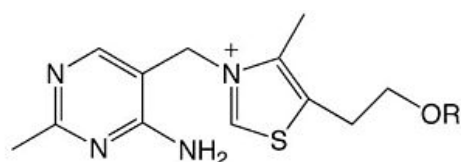
## **1. Aperçu historique de la découverte de la thiamine et de son rôle dans le métabolisme**

La thiamine fut découverte à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle en recherchant pourquoi le son du riz guérissait des poulets nourris au riz poli, qui présentaient un syndrome polynévritique analogue au béri-béri. Il s'avéra que seule l'enveloppe des grains contenait la vitamine qui fut, par la suite, isolée par C. Funk (1911), cristallisée par Janssen et Donath (1926) et synthétisée par Williams et Cline (1936). Dès cette époque, la thiamine était donc considérée nécessaire au bon fonctionnement du système nerveux et était également appelée aneurine (vitamine antinévritique).

Le rôle fondamental de la thiamine dans le métabolisme énergétique fut suggéré dès 1929 : les auteurs montrèrent que des homogénats de cerveau de pigeons carencés métabolisaient plus lentement le glucose, et que l'oxydation de celui-ci était stimulée par l'addition de thiamine (Kinnersley et Peters, 1929 ; Gavrilescu et Peters, 1931). Quelques années plus tard, Lohmann et Schuster (1937) démontrèrent que le composé responsable de ces effets est le dérivé diphosphorylé de la thiamine (ThDP) plutôt que la thiamine libre. A la suite de cette découverte, il fut démontré que le ThDP était un coenzyme requis pour la décarboxylation oxydative du pyruvate produit par la glycolyse. Il est également requis pour la décarboxylation non-oxydative du pyruvate dans la fermentation alcoolique des levures. L'étude de cette réaction a permis, dès les années 60, de préciser le mécanisme catalytique impliquant le ThDP dans la décarboxylation des oxoacides (Breslow, 1962). On démontra à la même époque que le ThDP est également un coenzyme requis pour la décarboxylation oxydative de l'oxoglutarate (Koike et Koike, 1976), et donc indispensable pour le fonctionnement du cycle de Krebs. Enfin, il fut démontré que le ThDP est aussi le coenzyme de la transcétolase, une enzyme clé du cycle des pentoses phosphate. Ces travaux ont permis de comprendre dans les grandes lignes le rôle essentiel du ThDP dans le métabolisme oxydatif. La complexe question de la sensibilité particulière du système nerveux à la carence en thiamine, ainsi que la vulnérabilité sélective de certaines régions du cerveau, restait cependant assez mal comprise.

## 2. Structure de la thiamine et de ses dérivés phosphorylés

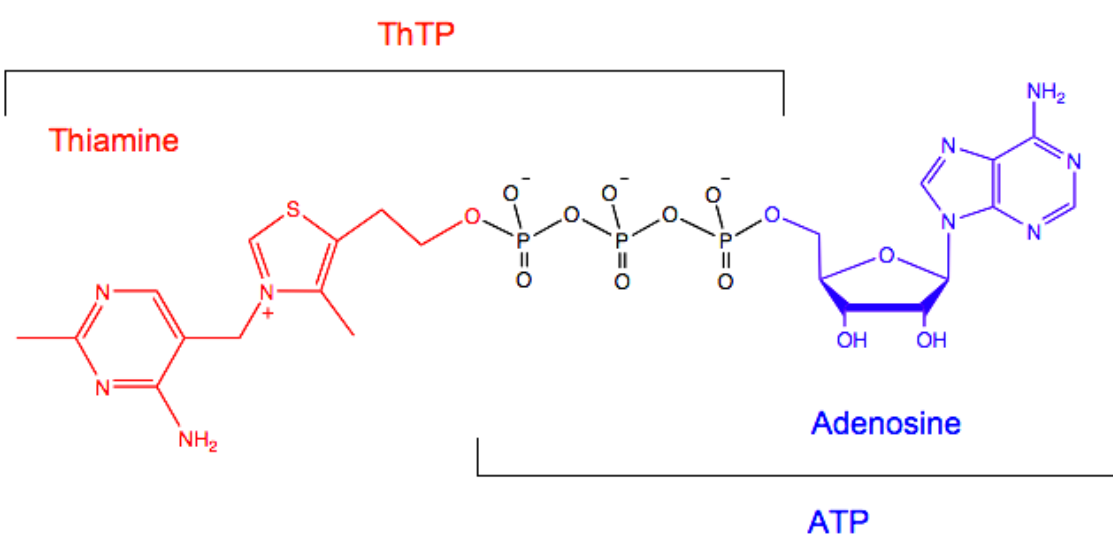
La thiamine est constituée de deux hétérocycles substitués, un noyau pyrimidine et un noyau thiazole, reliés par un pont méthylène. Le groupement hydroxyéthyle porté par le cycle thiazole peut être phosphorylé pour générer les différents dérivés de la thiamine (fig. 1).



R = H	Thiamine
R = PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	ThMP
R = P <sub>2</sub> O <sub>6</sub> <sup>3-</sup>	ThDP
R = P <sub>3</sub> O <sub>9</sub> <sup>4-</sup>	ThTP

**Figure 1. Structure de la thiamine et de ses dérivés phosphorylés.** ThMP, thiamine monophosphate ; ThDP, thiamine diphosphate ; ThTP, thiamine triphosphate.

Récemment un nouveau dérivé de la thiamine a été découvert dans notre laboratoire, il s'agit de l'adénosine thiamine triphosphate (fig 2, Bettendorff *et al.*, 2007). Lorsqu'on regarde la partie gauche de la molécule, on voit qu'elle est identique au ThTP alors que la partie droite est identique à l'ATP.



**Figure 2. Structure de l'adénosine thiamine triphosphate ou ATP thiaminylé (AThTP, Bettendorff *et al.*, 2007).**

### **3. Métabolisme de la thiamine et de ses dérivés**

#### **3.1 Transport de la thiamine**

Chez les mammifères, l'absorption de la thiamine contenue dans l'alimentation se fait au niveau de l'intestin grêle. Vu la faible concentration en thiamine présente dans le chyle, son absorption nécessite des transporteurs de haute affinité. Parmi ceux-ci, les transporteurs THTR1 et THTR2 ont été caractérisés. Le transport de la thiamine à travers les bordures en brosse de l'intestin se fait via THTR1, un transporteur qui sature à des concentrations micromolaires en thiamine et qui est inhibé par des analogues de la thiamine tels que la pyrithiamine et l'amprolium. Le transporteur THTR2 quant à lui est saturé à des concentrations nanomolaires en thiamine (Said *et al.*, 2004). Des cellules de l'intestin humain en culture (Caco2) possèdent les deux types de transporteurs, tous deux fonctionnels (Said *et al.*, 2004), ce qui suggère qu'ils sont capables de faire entrer la thiamine dans les cellules à des concentrations physiologiques (0,1-2,0  $\mu\text{M}$ ). Les transporteurs THTR1 et THTR2 semblent être exprimés dans tous les types cellulaires, y compris les neurones.

#### **3.2 Synthèse et transport mitochondrial du diphosphate de thiamine**

La thiamine est rapidement phosphorylée en ThDP dans le cytosol par la thiamine pyrophosphokinase (Nosaka *et al.*, 1993 ; Nosaka *et al.*, 1999). Le ThDP peut à son tour entrer dans la mitochondrie via un transporteur appelé SLC25A19 (Labay *et al.*, 1999 ; Lindhurst *et al.*, 2006). La mutation du gène qui code pour ce transporteur provoque une microcéphalie létale caractérisée par un retard dans le développement du cerveau et une acidification cellulaire due à une accumulation d'oxoglutarate. De plus, les embryons de souris KO pour ce gène n'ont pas de ThDP détectable dans la mitochondrie et leur taux de létalité après 13 jours de vie embryonnaire est de 100%.

La majeure partie du ThDP est mitochondriale (90 à 95% du ThDP total), une partie importante étant liée aux complexes enzymatiques PDH et OGDH, dont le ThDP est un

coenzyme lié. Dans le cytoplasme, la concentration en ThDP est généralement  $< 10^{-4}$  M et une partie est à la transcétolase (TK). Le ThDP libre a un turnover rapide (1 à 2 h), alors que le ThDP lié aux apoenzymes (PDH, OGDH et TK) a un turnover lent (17 h) (Bettendorff, 1995). Le ThDP libre dans le cytosol peut être hydrolysé en ThMP par des ThDPases dont la spécificité est faible et qui n'ont pas été caractérisées d'un point de vue moléculaire. Le ThMP n'a pas de rôle physiologique connu à l'heure actuelle. Ce composé peut être hydrolysé en thiamine et phosphate inorganique par des phosphatases non spécifiques (surtout la phosphatase alcaline dans le cerveau).

### **3.3 Synthèse du triphosphate de thiamine**

Durant de longues années, le mécanisme de synthèse du triphosphate de thiamine est resté mystérieux, faisant l'objet d'hypothèses contradictoires.

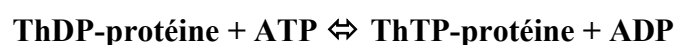
L'hypothèse la plus naturelle est que la synthèse du ThTP serait réalisée à partir de ThDP et d'ATP selon la réaction



catalysée par une kinase du ThDP (ThDP-ATP phosphotransférase). Une enzyme catalysant cette réaction a été purifiée partiellement à partir de foie de rat (Voskoboev et Luchko, 1980) et complètement à partir de levure (Voskoboev *et al.*, 1987). Son activité est cependant très faible et il a été suggéré que le produit formé n'était pas du ThTP mais de l'AThTP (Makarchikov, *communication personnelle*). En effet, ce dernier composé peut être synthétisé par une enzyme soluble selon la réaction :



On a également proposé un mécanisme dans lequel le précurseur n'est pas du ThDP libre mais du ThDP lié à une protéine extraite de foie de rat (Nishino *et al.*, 1983) :





Ce mécanisme n'a jamais été confirmé. Le fait que la transcétolase est probablement la seule protéine cytoplasmique liant le ThDP va à l'encontre de cette hypothèse, car cette enzyme n'a aucun rapport avec la synthèse du ThTP (Voskobev et Chernikevich, 1985).

Quelques années plus tard, il a été démontré que, dans les muscles squelettiques, du ThTP pouvait être synthétisé par l'adénylate kinase de type 1 (AK1, myokinase) (Shikata *et al.*, 1989) selon la réaction :



Cependant, cette réaction est très lente et les souris KO pour AK1 présentent des taux normaux en ThTP (Makarchikov *et al.*, 2002a), indiquant que la synthèse du ThTP chez les mammifères n'est généralement pas due à l'AK1. Comme il existe 5 isoformes de l'AK chez les mammifères, on ne peut toutefois pas exclure la possibilité que l'une des autres isoformes soit responsable de la synthèse du ThTP. Il était donc intéressant d'étudier la réaction chez *E. coli* qui ne possède qu'une seule forme d'adénylate kinase.

L'inactivation de l'adénylate kinase chez ces bactéries aboutit à une chute rapide et dramatique de la concentration intracellulaire en ATP, mais aussi à une forte augmentation du ThTP (Gigliobianco *et al.*, 2008). Ces résultats ne sont pas en faveur d'une implication de l'adénylate kinase dans la synthèse du ThTP en conditions physiologiques. Ils semblent indiquer que l'ATP n'est pas requis pour la synthèse du ThTP. Une observation importante est que, si les bactéries intactes sont capables d'accumuler rapidement du ThTP dans des conditions particulières de privation d'acides aminés (Lakaye *et al.*, 2004), aucune synthèse rapide n'a pu être observée avec des extraits solubles d'*E. coli*. Il apparaît que, *in vivo*, la synthèse du ThTP est catalysée par un mécanisme qui n'implique pas une enzyme cytosolique soluble (ThDP kinase ou adénylate kinase).

Des travaux récents menés dans notre laboratoire ont permis de clarifier le mécanisme par lequel le ThTP est synthétisé dans le cerveau de rat (Gangolf *et al.*, 2010) : la synthèse de ce composé est mitochondriale et se fait via un mécanisme chimiosmotique. La synthèse se ferait à partir de ThDP et P<sub>i</sub> (l'énergie étant fournie par la force protonomotrice créée par la chaîne respiratoire) et serait catalysée par l'ATP synthase F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>. Par ailleurs, il est apparu que l'enzyme qui synthétise le ThTP chez *E. coli* est également l'ATP synthase F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, via un

mécanisme chimiosmotique analogue à celui décrit dans les mitochondries (Gigliobianco *et al.*, soumis à publication).

### **3.4 Hydrolyse enzymatique du triphosphate de thiamine**

Dans les tissus de mammifères, la concentration en ThTP est régulée par une thiamine triphosphatase soluble (ThTPase) (Lakaye *et al.*, 2002). Cette enzyme (un monomère de 25-kDa) a une spécificité presque absolue pour le ThTP mais ne semble avoir une activité décelable que chez les mammifères. Elle a été clonée, surexprimée chez *E. coli* et caractérisée après purification (Lakaye *et al.*, 2002). La plupart des organismes possèdent aussi une ThTPase membranaire, mais celle-ci n'a pas encore été purifiée et caractérisée (Barchi and Braun, 1972 ; Bettendorff *et al.*, 1987).

La figure 3 résume ce qui est connu à l'heure actuelle à propos du métabolisme du ThTP. Tout semble indiquer que chez les mammifères, cette molécule est synthétisée dans la mitochondrie par l'ATP synthase et qu'elle peut être libérée dans le cytoplasme par échange avec le phosphate inorganique (Gangolf *et al.*, 2010). Dans le cytosol, la concentration en ThTP est maintenue très basse par la 25-kDa ThTPase cytosolique.

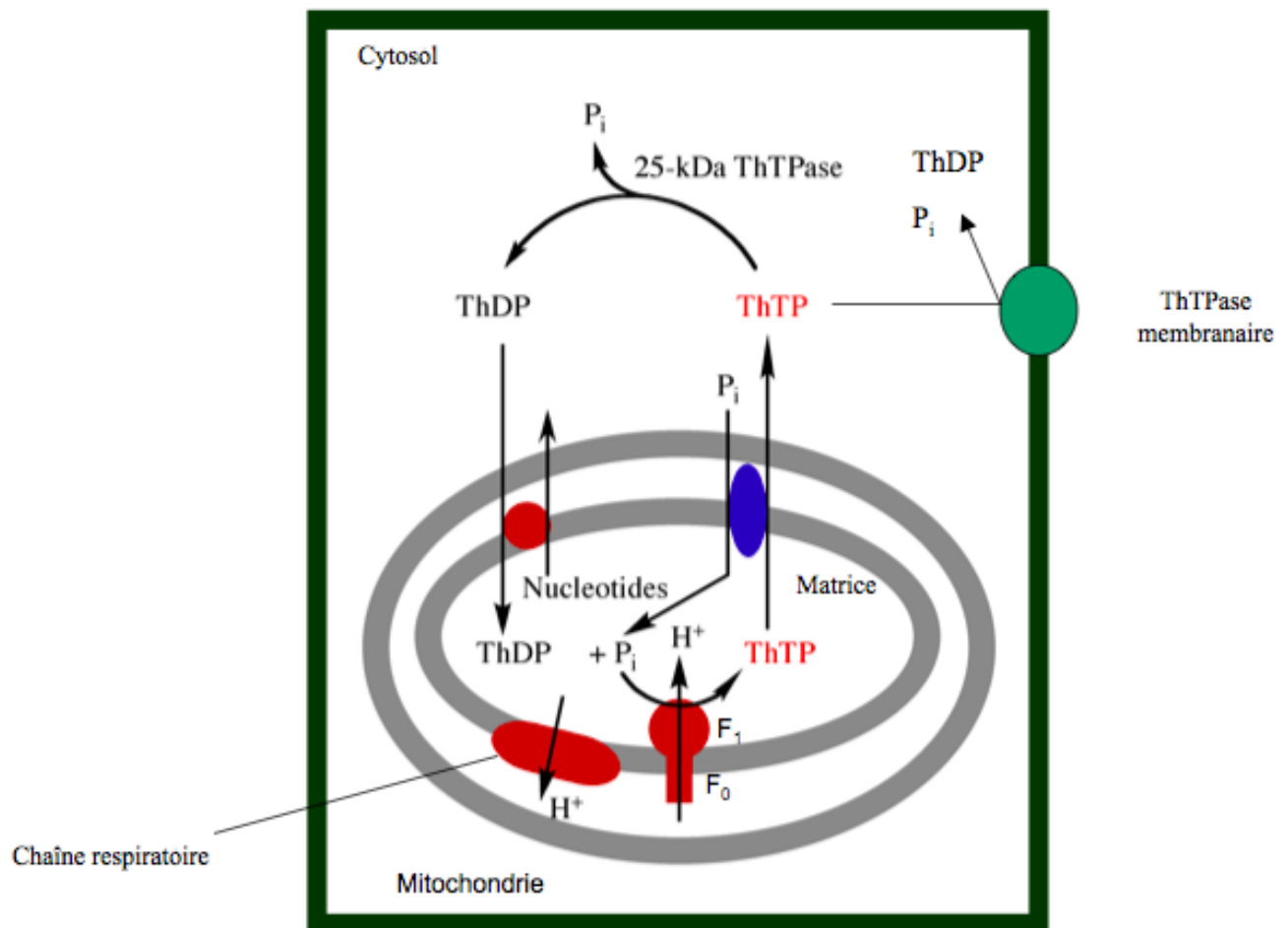


Figure 3. Métabolisme du ThTP dans une cellule de cerveau de mammifère.

#### 4. Rôle fondamental du diphosphate de thiamine dans le métabolisme énergétique

Le ThDP est le cofacteur de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique parmi lesquelles on retrouve la pyruvate déshydrogénase (PDH) et l'oxoglutarate déshydrogénase (OGDH). Ces deux enzymes catalysent des étapes essentielles nécessaires au cycle de Krebs et l'on comprend donc aisément que le ThDP est indispensable au catabolisme oxydatif de substrats énergétiques comme le glucose. Le cycle de Krebs est le principal pourvoyeur de molécules à haut potentiel réducteur telles que NADH ou FADH<sub>2</sub>. Dès lors, si le ThDP fait défaut dans les mitochondries, le pompage des protons par les complexes de la chaîne respiratoire, faute de substrats réducteurs en suffisance, est ralenti. Cela entraîne une diminution conséquente des phosphorylations oxydatives. Dans de telles conditions, la cellule est en déficit énergétique. Or, le bon fonctionnement cérébral nécessite une grosse dépense énergétique. D'autre part, dans les astrocytes et neurones, le bon fonctionnement du cycle de

Krebs est également indispensable à la synthèse de neurotransmetteurs (fig. 4). Il est donc évident qu'un déficit en ThDP affectera fortement le fonctionnement du cerveau.

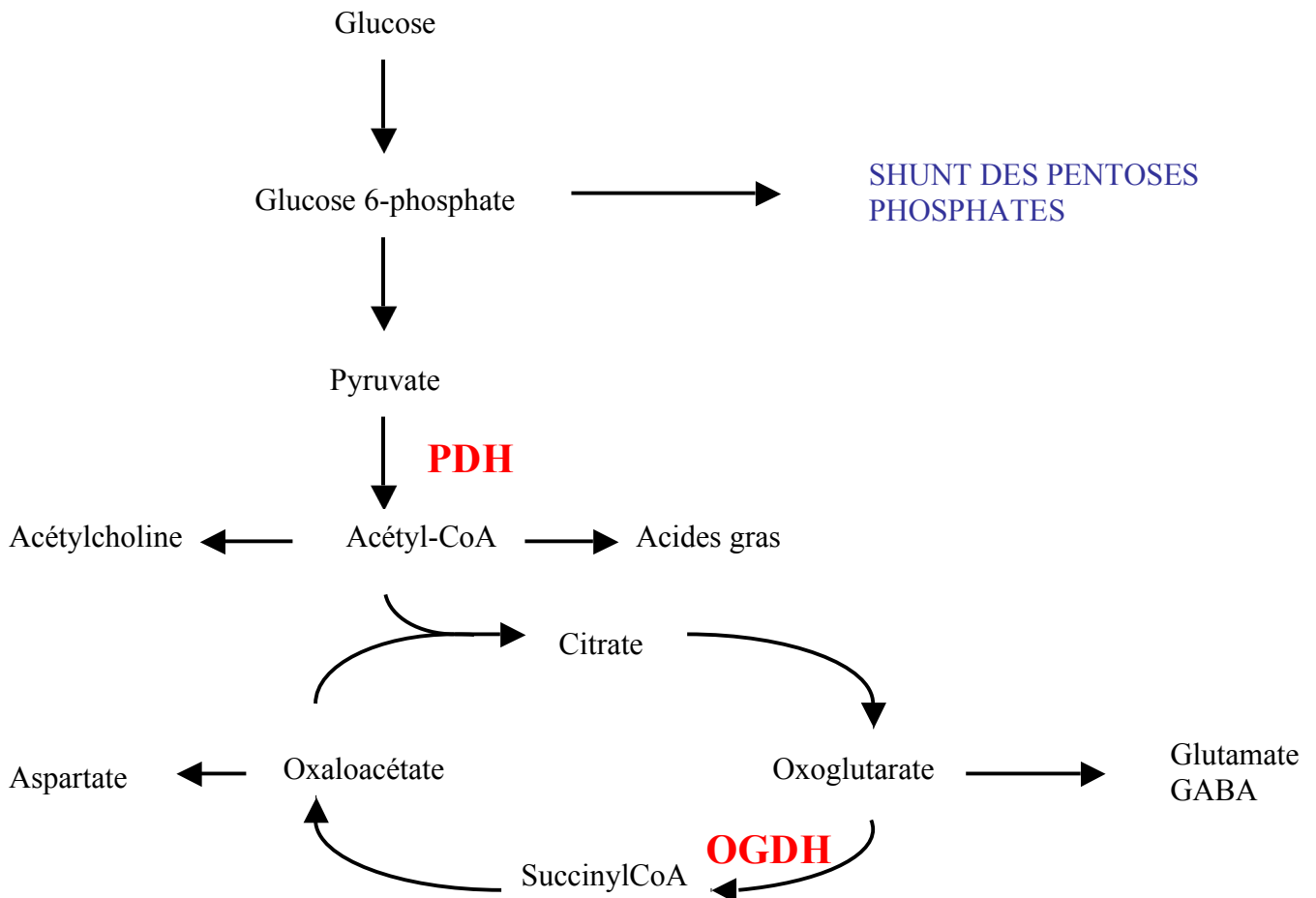


Figure 4. Rôle des complexes de la déshydrogénase du pyruvate (PDH) et de la déshydrogénase de l'oxoglutarate (OGDH) dans la synthèse des neurotransmetteurs (Butterworth *et al.*, 1991).

## 5. La superfamille de protéines CYTH : la 25-kDa ThTPase et ses orthologues

La 25-kDa ThTPase ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines de mammifères. On a constaté d'autre part que les orthologues de la ThTPase sont présents dans le génome de nombreuses espèces animales. Les homologies de séquences sont particulièrement frappantes dans la branche évolutive qui va des coelentérés (anémone de mer) aux vertébrés en passant par l'oursin et l'amphibien.

Dès la publication de la séquence de la hThTPase (Lakaye *et al.*, 2002), Iyer et Aravind ont effectué une étude bioinformatique montrant que la 25-kDa ThTPase appartient à une vaste superfamille de protéines qu'ils ont appelée CYTH en référence aux « membres fondateurs » qui sont la protéine *cyaB* d'*Aeromonas hydrophila* (qui possède une activité adénylate cyclase) et la hThTPase. Des représentants de la superfamille CYTH ont été trouvés dans tous les règnes (archées, bactéries, champignons, plantes et animaux) mais peu d'entre eux ont été caractérisés sur le plan fonctionnel. Ces protéines présentent souvent une structure en tonneau (ou en « tunnel »), ont comme substrat des composés triphosphorylés et fixent des cations bivalents ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) requis pour l'activité enzymatique. C'est pourquoi on les désigne aussi sous le nom de « triphosphate tunnel métalloenzymes », TTM. Chez les vertébrés et l'anémone de mer, il a été démontré que les extraits de tissus, tout comme la protéine TTM lorsqu'elle est purifiée sous forme recombinante, ont une activité ThTPasique significative, avec des propriétés enzymatiques identiques (pH optimum, activation par le  $Mg^{2+}$ , inhibition par le  $Ca^{2+}$ , ..., Czerniecki *et al.*, résultats non publiés). Dans des extraits de tissus de poisson, aucune activité ThTPasique soluble n'a jamais été mise en évidence, ce qui suggère que la 25-kDa ThTPase n'est pas suffisamment active ou pas suffisamment exprimée pour exercer le rôle physiologique de ThTPase. Chez les oiseaux, non seulement on ne décele pas d'activité ThTPasique soluble, mais on ne trouve pas d'orthologues de la 25-kDa ThTPase. On doit donc conclure que, jusqu'à présent, seuls les mammifères possèdent une enzyme cytosolique capable d'hydrolyser efficacement le ThTP.

## 6. Distribution du ThTP dans différents organismes et tissus

Le ThTP est présent chez tous les organismes en faible quantité (en général 0,1 à 1% de la thiamine totale). En effet, on le retrouve de la bactérie à l'homme, en passant par les champignons et les plantes (Makarchikov *et al.*, 2003). Chez les bactéries cultivées en milieu riche (Luria-Bertani en aérobiose), on ne détecte que des quantités infimes de ThTP. Cependant, lorsqu'elles sont transférées dans un milieu minimum (M9) dépourvu d'acides aminés contenant une source de carbone assimilable tel que le glucose ou le pyruvate, elles peuvent accumuler transitoirement de grandes quantités de ce composé, jusqu'à 20 à 50% de la thiamine totale (Lakaye *et al.*, 2004 ; Gigliobianco *et al.* 2008).

Certains tissus d'animaux ont des contenus très élevés en ThTP. C'est le cas des muscles squelettiques de cochon (Egi *et al.*, 1986) et de poulet (Miyoshi *et al.*, 1990), ainsi que des organes électriques de poisson (Eder et Dunant, 1980 ; Bettendorff *et al.*, 1987). Ceci s'expliquerait par la richesse de ces tissus en AK1 et par l'absence d'une ThTPase soluble chez ces espèces (Makarchikov *et al.*, 2002). En effet, cette enzyme ne semble exister ni chez les poissons (Hashitani et Cooper, 1972), ni chez les oiseaux (Makarchikov *et al.*, 2003) et adopte une conformation inactive chez le cochon (Szyniarowski *et al.*, 2005).

Etant donné que le ThTP était considéré comme la forme « neuroactive » de la thiamine (Cooper et Pincus, 1979), les études se sont particulièrement intéressées à la présence éventuelle du ThTP dans différents types cellulaires et différentes parties du système nerveux. Les travaux antérieurs à 1980 sont sujets à caution car les méthodes de dosage du ThTP (et des composés thiaminiques en général) étaient peu fiables avant le développement des techniques HPLC, surtout pour les dérivés peu abondants comme le ThTP. Le réexamen, à l'aide des techniques récentes, du contenu en ThTP de divers organismes, tissus et types cellulaires (Makarchikov *et al.*, 2003) a montré que le ThTP est ubiquitaire (on le retrouve dans pratiquement tous les organismes de la bactérie à l'homme). Aussi, il n'est généralement pas plus abondant dans le système nerveux que dans les autres tissus. Un élément qui rend ces études difficiles est que, dans le cerveau adulte des rongeurs (particulièrement la souris), la 25-kDa ThTPase est très active et, par conséquent, le cerveau contient très peu de ThTP. Il est donc difficile de le doser dans les différentes régions, par exemple dans la région diencephalique qui est particulièrement lésée quand les animaux sont carencés. Jusqu'à présent, la seule donnée en faveur d'un rôle « neuroactif » du ThTP est que, dans des cultures primaires de cellules de cerveau de rat embryonnaire, le ThTP est 5 fois plus abondant dans les neurones que dans les astrocytes (Bettendorff *et al.*, 1991). Ce résultat pourrait suggérer que dans les neurones, la 25-kDa ThTPase est moins active que les cellules gliales, mais des études sur des cerveaux adultes suggèrent que l'activité est plus forte dans les neurones (Czerniecki *et al.*, 2004). Enfin, il faut signaler l'abondance du ThTP dans les organes électriques de poissons (Eder et Dunant, 1980 ; Bettendorff *et al.*, 1987). Cette accumulation dans les électrocytes semble liée à l'abondance de l'adénylate kinase et à l'absence de 25-kDa ThTPase active.

## **7. Rôles possibles du triphosphate de thiamine et des thiamine triphosphatases**

Comme nous l'avons déjà signalé, un rôle du ThTP a été proposé par Cooper et ses collaborateurs dans les années 60-70. Itokawa et Cooper (1969) ont suggéré une déphosphorylation globale des dérivés de la thiamine lorsqu'un nerf est stimulé de manière répétitive. En accord avec cette idée, Bettendorff *et al.* (1989) ont montré que le rapport [ThTP]/ [ThMP] diminue dans la région occipitale chez le babouin photosensible après stimulation lumineuse intermittente.

D'autres observations suggèrent que le ThTP pourrait être impliqué dans une nouvelle voie de signalisation cellulaire. En effet, il augmente la perméabilité aux ions Cl<sup>-</sup> dans des vésicules membranaires préparées à partir de cerveau de rat (Bettendorff *et al.*, 1993a) et active des canaux anioniques à haute conductance dans des patchs excisés de cellules de neuroblastome (Bettendorff *et al.*, 1993b). Puisque ces canaux restent activés après élimination du ThTP, cette activation pourrait être due à une phosphorylation. On sait également que dans l'organe électrique de torpille, le ThTP peut phosphoryler la rapsyne, qui est une protéine associée au récepteur à l'acétylcholine (Nghiem *et al.*, 2000). Cette protéine post-synaptique est indispensable à l'agglomération des récepteurs de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire. Cette phosphorylation se fait sur un résidu histidine, ce qui est un processus majeur de régulation chez les procaryotes, mais est moins bien documenté chez les mammifères.

De manière inattendue, c'est chez la bactérie *E. coli* que les données expérimentales suggèrent un rôle physiologique du ThTP de manière plus convaincante. En effet, il a été montré dans notre laboratoire (Lakaye *et al.*, 2004) que le ThTP était produit en quantité importante ( $\geq 20\%$  de la thiamine totale) en réponse à une privation d'acides aminés. La réponse est rapide mais transitoire (le ThTP disparaît après quelques heures). Cette réponse est supprimée chez les bactéries qui surexpriment la hThTP. Dans ces conditions, la croissance des bactéries est perturbée. Le ThTP apparaît donc comme un signal impliqué dans l'adaptation rapide des bactéries à un stress spécifique. Dans ce sens, la production du ThTP fait penser à celle de l'alarmone ppGpp, qui apparaît aussi en réponse à la privation d'acides aminés mais de façon encore beaucoup plus rapide.

L'ensemble de ces résultats donnent à penser que, chez les procaryotes comme les eucaryotes, le ThTP pourrait jouer un rôle de messenger intracellulaire ou signal impliqué dans certaines adaptations métaboliques à des conditions de stress.

## **8. Rôle particulier des dérivés de la thiamine dans le système nerveux**

### **8.1 Sensibilité particulière du système nerveux à la carence en thiamine**

La carence en thiamine affecte tous les tissus mais plus particulièrement le système nerveux et le cœur. Dans le passé, la carence en thiamine provoquait une maladie fréquente chez la population d'Extrême-Orient se nourrissant principalement de riz poli, appelée le béri-béri. Ce syndrome affectait préférentiellement le système nerveux périphérique, avec polynévrite et paralysie progressive des membres inférieurs. Bien que cette maladie ait pratiquement disparu, la carence en thiamine reste relativement fréquente chez les alcooliques chroniques. Dans ce cas, c'est surtout le système nerveux central qui est affecté, même si des polynévrites sont souvent présentes également. Le syndrome aigu de la carence en thiamine des alcooliques est l'encéphalopathie de Wernicke, qui est caractérisée par des épisodes de confusion, hallucination, allodynie et nystagmus. Plus rarement, on observe une insuffisance cardiaque avec œdème. Le syndrome peut être réversible si le patient est rapidement traité (arrêt complet de l'alcool et doses élevées de thiamine et autres vitamines du groupe B). Mais si ces épisodes sont trop fréquents ou traités avec retard, la maladie évolue vers une psychose irréversible due à des lésions du thalamus et des corps mamillaires (le cortex étant largement épargné). C'est le syndrome de Korsakoff, principalement caractérisé par l'amnésie antérograde, de l'apathie, des fabulations et de la désorientation. La figure 5 montre quelles sont les régions lésées dans le syndrome de Korsakoff.

Le lien entre l'alcoolisme et le syndrome de Wernicke-Korsakoff est probablement explicable par la mauvaise alimentation des alcooliques, mais aussi au fait que l'éthanol diminue l'absorption intestinale de la thiamine et peut inhiber la pyrophosphokinase (Laforenza *et al.*, 1990).



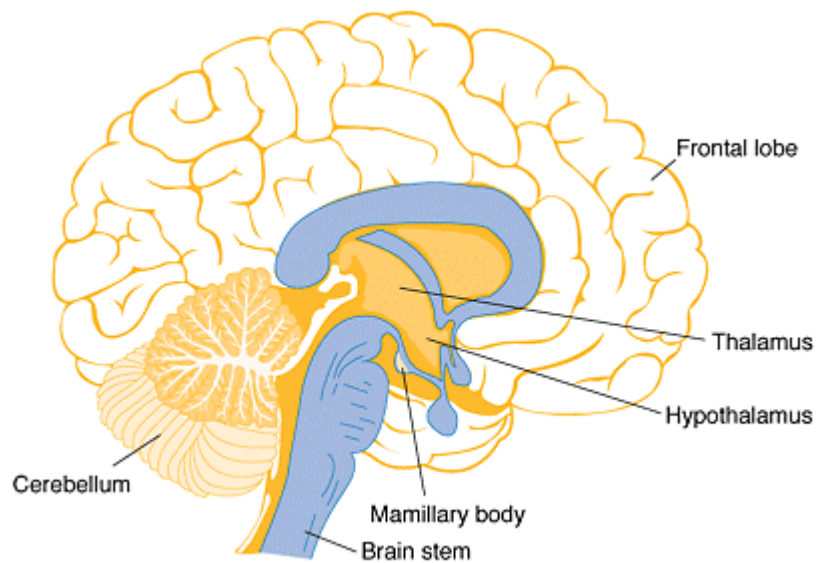


Figure 5. Régions du cerveau humain lésées dans le syndrome de Korsakoff.

Bien que, dans les pays développés, le syndrome de Wernicke-Korsakoff s'observe le plus souvent parmi une population d'alcooliques, d'autres groupes de patients sont également sujets à développer la maladie. Par exemple, les personnes peuvent être carencées en raison d'une infection par le HIV, d'une chimiothérapie ou d'une maladie métabolique qui mène à l'absorption altérée de thiamine. Ils peuvent donc développer ce genre de syndrome, qui est toutefois moins marqué que chez les alcooliques. Les patients présentant une maladie grave du rein et qui subissent régulièrement des dialyses, sont également enclins à l'encéphalopathie, et une partie substantielle d'entre eux s'est avérée souffrir d'une insuffisance en thiamine (Hung *et al.*, 2001). Il a également été montré que des patients qui reçoivent des infusions de glucose ou dextrose intraveineuses peuvent éprouver des épisodes d'insuffisance de thiamine (Ferguson *et al.*, 1997). La déficience en thiamine a été également corrélée à la formation de cryptes aberrantes, causant l'apparition du cancer du colon (Bruce *et al.*, 2003).

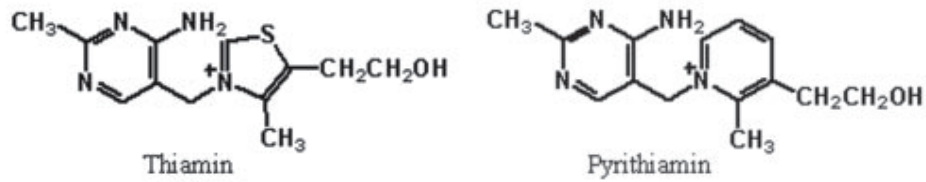
La variété et la spécificité des symptômes liés à la carence en thiamine restent difficile à interpréter. Classiquement, on admet que le principal (sinon le seul) rôle de la thiamine est d'être le précurseur du coenzyme ThDP. Comme ce dernier est impliqué dans le métabolisme de toutes les cellules, on peut se demander pourquoi la carence affecte aussi spécifiquement le système nerveux. Une première explication est que les neurones sont particulièrement dépendants du métabolisme oxydatif : non seulement la production d'ATP mais la synthèse

des principaux neurotransmetteurs (acétylcholine, glutamate, GABA) dépendent du cycle de Krebs (fig. 4). Par ailleurs, on sait que le transport de la thiamine se fait de manière plus efficace dans certains types cellulaires que d'autres. Par exemple, les hépatocytes accumulent plus rapidement la thiamine et retiennent mieux le ThDP que les neurones, ce qui peut expliquer que le système nerveux est beaucoup plus sensible que le foie à la carence. Néanmoins, ces considérations n'expliquent pas la vulnérabilité sélective de certaines régions du système nerveux. Comment expliquer, par exemple, qu'une carence chronique d'origine alimentaire affecte surtout le système nerveux périphérique et parfois le cœur (polynévrites et insuffisance cardiaque dans le béribéri) alors qu'une carence liée à l'alcoolisme provoque des lésions du diencephale.

Ces questions non résolues ont amené divers auteurs, dès les années 40-50, à considérer que la thiamine ou des dérivés autres que le ThDP avaient un rôle de neurorégulateur. Il a été notamment suggéré que la thiamine pouvait être libérée par certaines terminaisons nerveuses après stimulation. Ces données (revues par Itokawa, 1996) n'ont cependant pas permis de progresser beaucoup dans la compréhension d'un rôle particulier de la thiamine dans l'excitabilité nerveuse ou la transmission synaptique. On peut cependant penser que certaines lésions particulières liées à la carence en thiamine ne sont pas uniquement dues au déficit en ThDP mais pourraient être dues à la disparition d'autres dérivés, par exemple le ThTP.

### **8.2 Implication de la carence en ThDP dans les maladies neurodégénératives**

L'encéphalopathie de Wernicke et le syndrome de Korsakoff sont directement liés à une carence en thiamine. En effet, des rats et des souris traités à la pyrithiamine (un substrat analogue de la thiamine, inhibiteur de la thiamine pyrophosphokinase et du transport de la thiamine, fig. 6) développent des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteints de la maladie de Wernicke et Korsakoff (Liu *et al.*, 2006).



**Figure 6. Comparaison entre la thiamine et la pyriithiamine.**

Dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Mastrogiacomo *et al.*, 1993) ou la maladie de Parkinson (Gibson *et al.*, 2003 ; Bunik *et al.*, 2007), on a démontré une diminution des enzymes ThDP-dépendantes ainsi qu'une perturbation du métabolisme des dérivés phosphorylés de la thiamine dans le cerveau des patients. Les niveaux en ThDP sont réduits chez les patients Alzheimer (Mastrogiacomo *et al.*, 1996) ainsi que chez les personnes atteintes de la dégénérescence du lobe frontal de type non-Alzheimer (Bettendorff *et al.*, 1997).



# OBJECTIFS



Lorsque nous avons entrepris notre recherche, le métabolisme et le rôle du ThTP restaient encore très mystérieux, surtout chez les eucaryotes. Les travaux antérieurs concernaient surtout l'enzyme qui hydrolyse spécifiquement le ThTP, appelée 25-kDa ThTPase de mammifère. La caractérisation moléculaire de cette enzyme avait été réalisée dans notre laboratoire en 2002. Toutefois, la structure, le mécanisme catalytique et la localisation cellulaire restaient à éclaircir.

En parallèle avec les études structurales effectuées aux USA par l'équipe de John Markley, nous avons décidé d'entreprendre une étude approfondie du mécanisme catalytique des 25-kDa ThTPases humaine et de souris. Nous avons envisagé une approche pluridisciplinaire et entamé une collaboration avec, d'une part M. Murty et V. Gabelica pour la spectrométrie de masse (Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Université de Liège) et, d'autre part, avec F. Kerff et P. Charlier pour la cristallographie des protéines (Centre d'Ingénierie des Protéines, Université de Liège). A partir des données structurales, nous avons entrepris d'identifier, par mutagenèse dirigée, les résidus essentiels à l'interaction entre le substrat (et activateurs) et le site actif. Il s'agissait également d'identifier les résidus impliqués directement dans le mécanisme catalytique.

Nous avons également réalisé des études de localisation cellulaire de la hThTPase en la clonant dans un plasmide permettant son expression en cellules eucaryotes, sous forme de protéine fusion avec l'EGFP. Nous avons aussi tenté de mettre en évidence l'existence d'interactions entre la mThTPase et d'autres partenaires protéiques.

Par ailleurs, au début de nos travaux, on savait que la 25-kDa ThTPase de mammifères appartenait à une vaste superfamille de protéines (les CYTH), mais seulement un petit nombre de ces protéines avaient été caractérisées sur le plan fonctionnel. Leur rôle biologique restait, en général, mal défini. D'autre part, nous voulions savoir si des enzymes de cette famille hydrolysaient le ThTP chez les procaryotes. Nous avons donc caractérisé une protéine bactérienne, appelée *NeuTTM*, dont la structure présentait des similitudes avec la 25-kDa ThTPase.





MATERIEL

&

METHODES



# **1 Matériel**

## **1.1 Solvants et réactifs**

Toutes les solutions ont été préparées à l'aide d'eau Milli-Q (Millipore S.A. / N.V., Brussels, Belgium). Les solvants utilisés pour la chromatographie (qualité HPLC) proviennent de Biosolve (Valkenwaard, The Nederland). Les cocktails d'inhibiteurs de protéases proviennent de Roche Applied Science. L'EDTA, l'ATP, l'ITP, le GTP et la guanosine 5'-tétraphosphate (Gp<sub>4</sub>) proviennent de Sigma-Aldrich. Le tétraphosphate (initialement de chez Sigma) nous a été gracieusement offert par le Dr. Eric Oldfield du Département de Chimie de l'Université de l'Illinois, A110 CLSL 600 South Mathews Ave. Urbana, IL 61801. Le plasmide pET 15b contenant la séquence de *NeuTTM* avec une séquence 6 histidines du côté N-terminal nous a été gracieusement offert par le Dr. A. Savchenko (Université de Toronto, Département de Recherche Médicale Banting et Best, C.H. Best Institute, Toronto, Ontario, Canada). Le plasmide pVP16 contenant le gène de la mThTPase avec une séquence 8His-MBP en N-terminal a été acheté au « Centre for Eukaryotic Structural Genomic » (Department of Biochemistry University of Wisconsin-Madison).

## **1.2 Les milieux de culture**

### **1.2.1 Le milieu LB**

Pour préparer 500 ml de ce milieu, il faut 5 g de tryptone, 2,5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl. Il est nécessaire d'ajouter 1,5% d'agar (7,5 g dans 500 ml) pour obtenir un milieu gélosé. Il faut également ajouter 1,25 ml d'ampicilline 100 mM pour obtenir un milieu de sélection, mais cet ajout ne se fait qu'après autoclave du milieu, pour éviter que l'antibiotique ne soit dégradé pendant celle-ci.

### **1.2.2 Le milieu 2xYT**

Pour la préparation de 500 ml de ce milieu enrichi, il faut partir de 8 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 2,5 g de NaCl. Le pH final doit être de  $7,0 \pm 0,2$  à 25°C. Ce milieu sera principalement utilisé pour la surexpression de protéines.

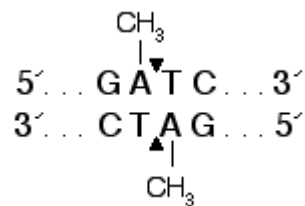
### 1.3 Les enzymes

#### 1.3.1 L'ADN polymérase Pfu

La Pfu polymérase est, comme son nom l'indique, une enzyme extraite de l'archéobactérie *Pyrococcus furiosus*. Elle est capable de synthétiser le brin complémentaire d'une séquence d'ADN d'intérêt de 5' vers 3'. Comme la Taq polymérase, elle est thermostable mais contrairement à cette dernière, la Pfu possède une activité exonucléase 3'-5' qui permet de corriger les erreurs de répllication de l'ADN. Sa température optimale d'activité se situe entre 72 et 78°C.

#### 1.3.2 L'enzyme DpnI

L'enzyme de restriction DpnI reconnaît une séquence palindrome de 4 paires de bases (fig. 7) et clive celle-ci en laissant des bouts francs. Néanmoins, elle ne reconnaît que les séquences dont l'adénine est méthylée. Sa température optimale d'activité est de 37°C.



**Figure 7. Site de restriction reconnu par DpnI.**

### 1.3.3 L'enzyme TEV protéase

L'enzyme TEV protéase est une protéase du virus de la mosaïque du tabac (TEV) qui reconnaît une séquence d'acides aminés : Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser. L'enzyme coupe entre la glutamine (Gln) et la sérine (Ser). Dans une protéine fusion, cette séquence d'acides aminés est placée entre celle de la protéine d'intérêt et le tag afin d'éliminer ce dernier. Vu la rareté de cette séquence, les chances que la protéine soit clivée à un autre endroit dans sa séquence sont relativement faibles.

## 1.4 Les souches de bactéries

### 1.4.1 La souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$

La souche *E. coli* DH5 $\alpha$  transforme avec une grande efficacité. Elle possède des gènes *recA1* et *endA1* mutés. La première mutation réduit le nombre de recombinaisons de l'ADN cloné, et donc augmente la stabilité des plasmides insérés. La seconde a pour effet d'éliminer la digestion non spécifique de l'endonucléase I. La souche DH5 $\alpha$  est donc utilisée pour le clonage d'ADN.

### 1.4.2 La souche d'*E. coli* BL21 DE3

La souche de bactérie BL21 DE3, dérivant de la souche non pathogène K12, a la particularité de détenir des protéases VII mutées, qui n'accomplissent plus la protéolyse des protéines exprimées. De plus, elle possède une déficience en protéase Lon, qui s'occupe en temps normal de lyser les protéines dénaturées et étrangères à la cellule. Ces caractéristiques font que la souche BL21 DE3 est utilisée pour la surexpression de protéines recombinantes.

## 1.5 Le thermocycleur

On se sert d'un thermocycleur T3000 (Biometra, fig. 8) pour réaliser et contrôler les réactions d'amplification d'ADN par polymérisation en chaîne (PCR). Il va servir à amener les échantillons d'ADN à amplifier aux différentes températures correspondant aux étapes de la PCR et de maintenir celles-ci avec précision jusqu'à passer à l'étape suivante. Il convient d'adapter la température d'élongation en fonction de la polymérase utilisée.



**Figure 8. T3000 Thermocycler**

## 1.6 L'équipement FRENCH Pressure Cell Press

La FRENCH Pressure Cell Press (Thermo Spectronic, fig. 9) est un instrument qui sert à rompre la membrane des bactéries en les faisant passer d'un cylindre où la pression est élevée à l'extérieur (pression atmosphérique), ce qui provoque l'explosion des bactéries et la libération des protéines cytosoliques.



**Figure 9. La presse de FRENCH**

## 1.7 Le système ÄKTApurifier

Le dispositif de chromatographie liquide rapide de protéines (FPLC) ÄKTApurifier (Amersham Biosciences, fig. 10) est utilisé pour purifier des protéines de façon automatisée.



**Figure 10. Système FPLC ÄKTApurifier.**

## 2 Méthodes

### 2.1 Synthèse et purification du ThTP

Les études cinétiques, cristallographiques et spectrométriques de la 25-kDa ThTPase nécessitent des quantités conséquentes de ThTP, nous avons dès lors adapté la méthode précédemment mise au point au laboratoire (Bettendorff *et al.*, 2003) afin d'optimiser les rendements de synthèse et de purification de ce composé. D'autre part, nous avons amélioré le protocole de synthèse de purification de l'AThTP et de l'AThDP, d'autres dérivés de la thiamine étudiés au laboratoire. Nous avons également étudié certaines propriétés physico-chimiques de ces composés. Les résultats sont présentés dans l'annexe I (Frédérich, Delvaux *et al.*, 2009, Annexe I).

## **2.2 Surexpression et purification de *NeuTTM* et de la mThTPase**

Des bactéries *E. coli* BL21(DE3) compétentes ont été transformées avec le plasmide pET15b contenant la séquence de *NeuTTM* avec une queue de 6 histidines en N-terminal ou le plasmide pVP16 contenant la séquence de la mThTPase contenant une queue 8His-MBP également en N-terminal. Les bactéries transformées ont poussé une nuit à 37°C dans 2-20 ml (en fonction du volume dans lequel l'induction est réalisée ultérieurement) de milieu LB contenant 500 µg/ml d'ampicilline. Ensuite, les bactéries sont cultivées dans des volumes qui varient de 50 ml à 4 l de milieu 2XYT jusqu'à atteindre un  $A_{600nm}$  entre 0,6 et 0,8. L'expression de la protéine est induite avec de l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (1 mM). Après 3 heures d'incubation à 37°C, la suspension bactérienne est suspendue dans du tampon de liaison (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ou Hepes, 0,5 M NaCl, 30 mM imidazole pH 7,5). Après deux ou trois cycles dans la Presse de French, le lysat est centrifugé 30 minutes à 50 000 g. La protéine taggée est purifiée grâce à un système FPLC (ÄKTA Purifier, Amersham Biosciences) couplé à une colonne HisTrap™ FF 1 ou 5 ml (GE, Healthcare) en fonction du volume de surnageant à purifier, dans les tampons mentionnés ci-dessus. L'enzyme est éluée dans le tampon d'élution (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ou Hepes, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazole pH 7,5). L'enlèvement du tag 6His de *NeuTTM* ou 8His-MBP de la mThTPase est réalisé en incubant 1 mg de protéine taggée purifiée avec 200 unités d'AcTEV™ protéase (Invitrogen). Après deux heures à température ambiante, le mélange est purifié à nouveau sur colonne HisTrap pour éliminer le tag et la protéase (qui est aussi His-tagagée). La protéine non taggée est récupérée dans les premières fractions dans le tampon adéquat en fonction de la technique utilisée pour l'étude de la protéine.

## **2.3 Cristallisation, enregistrement des résultats, résolution des structures et docking**

### **2.3.1 Cristallisation, collecte des données et détermination de la structure de *NeuTTM***

Voir matériel et méthodes annexe II.



### 2.3.2 Cristallisation, collecte des données et détermination de la structure du complexe hThTPase-PPPi

Différentes conditions de trempage et de co-cristallisation ont été testées afin d'obtenir la structure de la ThTPase en complexe avec le ThTP, l'ATP et le PPPi. Malgré tous les tests réalisés, seule la structure du complexe hThTPase-PPPi a pu être obtenue. Le cristal utilisé pour obtenir les données de diffraction de rayons X a été obtenu par co-cristallisation avec la méthode de la goutte suspendue dans les conditions suivantes : solution de protéine concentrée à 9,8 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 40 mM à pH 6,5 contenant 200 mM d'EDTA ; solution réservoir contenant 200 mM de sulfate d'ammonium dans un tampon citrate 100 mM à pH 4,2. La goutte était composée de 2,5 µl de solution de protéine, 2µl de solution du réservoir, de 0,5 µl d'éthylène glycol 50% et de 2 µl de solution contenant le PPPi à 100 mM.

Les données de diffraction de rayons X ont été enregistrées sur la ligne de lumière FIP-BM30a de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). Le cristal du complexe hThTPase-PPPi appartient au groupe d'espace P21 avec les paramètres de maille suivant :  $a = 46,39$ ,  $b = 63,53$ ,  $c = 70,95$ ,  $\beta = 108,75$ . Le programme XDS (Kabsh 1993) a été utilisé pour l'intégration des données et la suite de programmes CCP4 pour la mise à échelle et la combinaison des données. Les phases initiales ont été obtenues par remplacement moléculaire à l'aide du programme AMoRe (Navaza) en utilisant la structure de code PDB 3BHD comme modèle. Les cycles d'affinement et de construction de la structure ont ensuite été effectués avec les programmes respectifs Refma5 (Murshudov *et al.*, 1997) et Coot (Emsley et Cowtan, 2004).

Les coordonnées et les facteurs de structure correspondant au complexe hThTPase-PPPi ont été déposés dans la Protéin Data Bank et le code 3TVL lui a été attribué.

### 2.3.3 Docking du ThTP dans la structure de la ThTPase

La structure cristallographique de la hThTPase disponible dans la Protein Data Bank (code PDB 3BHD) et la structure du complexe hThTPase-PPPi ont été utilisées afin d'obtenir

la meilleure conformation du ThTP dans le site actif de cette enzyme. Chacun des deux monomères qui composent ces deux structures a été préparé de la manière suivante : les molécules d'eau et les molécules autres que la protéine (citrate, PPPi,...) ont été retirées du fichier PDB et les atomes d'hydrogène polaires et les charges de Gasteiger ont été ajoutées via le programme AutoDock Tools. Les charges de Gasteiger ont également été ajoutées au fichier décrivant le ThTP et les atomes d'hydrogène non polaires ont été fusionnés avec leur atome porteur.

Le docking proprement dit a été réalisé avec le programme AutoDock Vina (Trott et Olson, 2010) dans une boîte centrée sur le site actif ayant les dimensions suivantes : 19x21x16Å. Les paramètres par défaut ont été utilisés, à l'exception de l'« exhaustiveness » qui a été augmentée à 100 afin de maximiser les chances d'obtenir les solutions profondément enfouies dans le site actif. La meilleure solution a été obtenue avec le monomère A du complexe hThTPase-PPPi pour laquelle l'énergie de liaison est de -8.9 kcal/mol (fig. 20).

#### **2.4 Spectrométrie de masse native en électrospray et tamis moléculaire**

Voir matériel et méthodes annexe II. L'étude de la 25-kDa ThTPase par spectrométrie de masse a été menée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour *NeuTTM*.

#### **2.5 Mutagenèse dirigée par PCR**

Les mutations ponctuelles ont été introduites par la méthode « QuickChange » à partir du plasmide contenant les séquences codantes pour *NeuTTM* ou la mThTPase. Leurs séquences ont été amplifiées avec deux amorces mutagéniques et la Pfu DNA polymérase (Promega). L'ADN source est éliminé par digestion avec DpnI (Promega) pendant 2 h à 37°C. L'ADN est ensuite introduit dans des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$  compétentes et les clones sont isolés. La présence de la mutation est vérifiée par séquençage (Plateforme Genotranscriptomique, Giga, Université de Liège). Les séquences des oligonucléotides sont données dans le Tableau 1 et 2.

**Tableau 1. amorces utilisées pour la mutagenèse du gène codant pour NeuTTM contenu dans le pET15b.**

Amorces	Séquences
K8A	Sens : 5'-CCGAGATCGAACGCGC <u>G</u> CATTCTCGTGGCAACTT-3' Antisens : 5'-AAGTTGCCACGAGAAATG <u>C</u> CGTTCGATCTCGG-3'
K85A	Sens : 5'-GCGGCGTGTAGAGG <u>C</u> CAACCCGGTACAGTG-3' Antisens : 5'-CACTGTACCGGGT <u>G</u> CCTCTACACGCCGC-3'
Y28F	Sens : 5'- CCGCTCCGTCAGGGCT <u>T</u> TCTGACCACCCCCACAG-3' Antisens : 5'- CTGTGGGGGTGGTCAGAA <u>A</u> AGCCCTGACGGAGCGG-3'
K52R	Sens : 5'- GAATATTCATGACGCTGAG <u>A</u> TCCGAGGGTGGATTA-3' Antisens : 5'- TAATCCACCCTCGGAT <u>C</u> TCAGCGTCATGAAATATTC-3'

**Tableau 2. amorces utilisées pour la mutagenèse du gène codant pour mThTPase contenu dans le pVP16.**

Amorces	Séquences
K11A	Sens : 5'-TGAAGTGGAGCGAGCGTTCGCTCCAGG-3' Antisens : 5'-CCTGGAGCGAACGCTCGCTCCACTTCA-3'
D37A	Sens : 5'-GTCACCTTCCGAGCCACATACTATGATAC-3' Antisens : 5'-GTATCATAGTATGTGGCTCGGAAGGTGAC-3'
Y39A	Sens : 5'-CTTCCGAGACACAGCCTATGATACCTCTG-3' Antisens : 5'-CAGAGGTATCATAGGCTGTGTCTCGGAAG-3'
K65A	Sens : 5'-GGATGGGAGCTCGCATGTCCTGGAGTAA-3' Antisens : 5'-TTACTCCAGGACATGCGAGCTCCCATCC-3'
W53A	Sens : 5'-GCTGTCTGACCACGCGCTGCGACAACGA-3' Antisens : 5'-TCGTTGTCGCAGCGCGTGGTCAGACAGC-3'
Y79A	Sens : 5'-ACCTCACAATGAGGCTGTGGAAGTCACA-3' Antisens : 5'- TGTGACTTCCACAGCCTCATTGTGAGGT-3'
E81A	Sens : 5'-AATGAGTATGTGGCAGTCACATCGGA-3' Antisens : 5'-TCCGATGTGACTGCCACATACTCATT-3'
D145A	Sens : 5'-CTCAGCTCACAATAGCCTTGATTTCAGCGG-3' Antisens : 5'- CCGCTGAATCCAAGGCTATTGTGAGCTGAG-3'
D147A	Sens : 5'-TCACAATAGACTTGGCTTCAGCGGACTTCGGC-3' Antisens : 5'-GCCGAAGTCCGCTGAAGCCAAGTCTATTGTGA-3'
K193	Sens : 5'-GAGGCACCAGCCGCGCTCATGGTATACC-3' Antisens : 5'- GGTATACCATGAGCGCGGCTGGTGCCTC-3'

## **2.6 Détermination de l'activité phosphohydrolase**

Le milieu d'incubation standard (100 µl) contient du tampon à une concentration de 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 0,5 mM en substrat (PPPi, ThTP,...) et 20 µl d'enzyme à la concentration adéquate. La réaction est stoppée par l'ajout de 1 ml de réactif du phosphate (Lanzetta *et al.*, 1979). L'absorbance est lue à 635 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante et comparée à une courbe standard pour estimer la quantité de phosphate libéré. Les tampons utilisés aux différentes valeurs de pH sont : Na-MES (pH 6,0-7,0), Na-MOPS (pH 7,0-7,5), Na-HEPES (pH 7,5-8,0), Na-TAPS (pH 8,0-9,0), Na-CHES (pH 9,0-10,0) et Na-CAPS (pH 10,0-10,5).

## **2.7 Détermination de l'activité enzymatique dans un gel non-dénaturant**

Voir matériel et méthodes annexe II.

## **2.8 Manipulation des cellules HEK293**

### **2.8.1 Culture cellulaire**

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre (Cell star, Greiner Bio-one) à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont maintenues dans 10 ml de milieu de culture contenant 90% de DMEM (GIBCO, Invitrogen corporation) additionné de 10% de sérum de veau foetal (Greiner Bio-One). Les cellules sont récoltées dans un milieu frais avant la confluence et remises en culture après dilution appropriée.

### **2.8.2 Construction d'un vecteur exprimant la hThTPase couplée à l'EGFP en cellules eucaryotes**

Afin de déterminer la localisation cellulaire de la ThTPase dans des cellules en culture, nous avons inséré le gène de la ThTPase humaine (hThTPase) dans le plasmide pcDNA5 (Invitrogen, fig. 11) permettant l'expression en cellules eucaryotes d'une protéine fusionnée à l'EGFP.

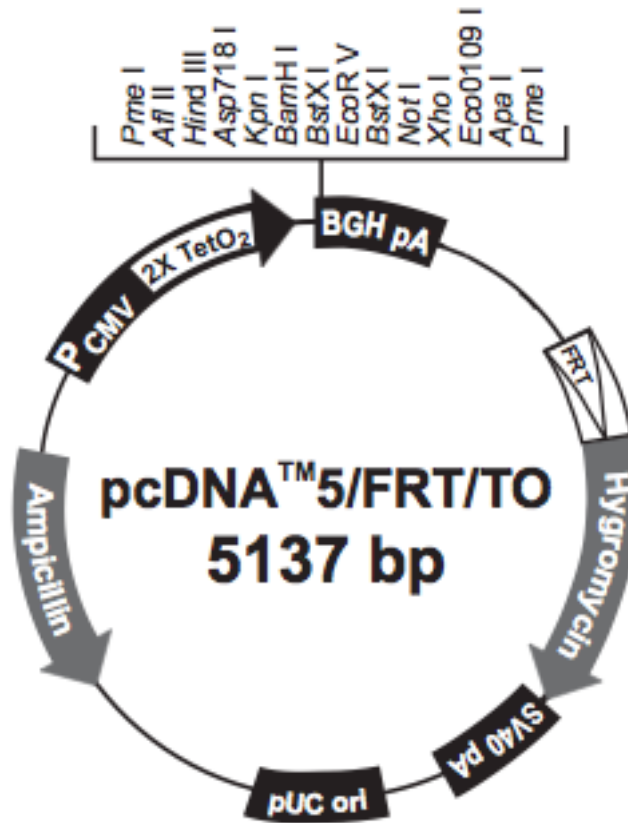


Figure 11. Schéma du pcDNA5/FRT/TO

Dans un premier temps, la séquence codante de la ThTPase humaine est amplifiée en utilisant le protocole standard de PCR à partir du plasmide de production pGEX-5X1 contenant cette séquence en utilisant les amorces sens : 5'-TTCTCGAGCATGGCCAGGGCTTGATT-3' et antisens : 5'-AAGGGCCCCTAGCCCAGGCAGTGGTC-3'. Le codon d'initiation et le codon stop sont mis en gras. Les séquences soulignées correspondent au site de restriction pour XhoI dans l'amorce sens et pour ApaI dans l'amorce antisens qui, sont également présents dans le pcDNA5, ce qui va permettre d'y insérer le gène de la hThTPase. Après amplification, le gène est introduit par clonage TA dans le vecteur pGEM-T (Promega). Des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$  compétentes sont transformées puis sélectionnées sur boîtes. Après isolation de l'ADN

plasmidique, la présence du gène de la hThTPase est vérifiée par digestion BstZ1 qui possède deux séquences de restriction de part et d'autre du site d'insertion dans le pGEM-T. Ensuite les plasmides sont envoyés au séquençage pour s'assurer qu'aucune mutation n'a été introduite lors de la PCR (bien que cette éventualité soit très peu probable en utilisant la Pfu polymérase qui possède une activité capable de corriger les mauvais appariements entre les bases en les enlevant dans le sens 3'-5'). Le fragment d'intérêt est libéré du pGEM-T par digestion ApaI et XhoI et purifié sur gel d'agarose pour éliminer le plasmide (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche). Le vecteur pcDNA5 est également digéré par ApaI et XhoI pour former les bouts collants correspondants. Afin d'empêcher le vecteur de se refermer, celui-ci est incubé 30 minutes à 37°C avec la phosphatase alcaline thermosensible (TSAP) qui enlève les groupements phosphate en 5' de l'ADN et empêche donc une liaison de se reformer. Par la suite, le mélange est incubé 15 minutes à 74°C pour inactiver la TSAP (Promega). Le gène d'intérêt est ensuite inséré dans le plasmide par ligation à l'aide de la T4 DNA ligase (Promega). A nouveau, la construction est utilisée pour transformer des DH5 $\alpha$  compétentes et, après sélection sur boîte LB/ampicilline, l'ADN plasmidique est isolé. Par digestion ApaI, KpnI puis migration sur gel d'agarose, les constructions potentiellement correctes sont sélectionnées puis envoyées au séquençage.

### 2.8.3 Transfection transitoire

Avant transfection, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre qui sont déposées dans des boîtes 24 puits avant d'être traitées à la polyornithine (0,1 mg/ml) (Sigma) pendant 1 h à température ambiante et à la laminine (5  $\mu$ g/ml) (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) pendant 2 h à 37°C. Les cellules sont ensuite déposées sur les lamelles coatées à une densité de 100 000 cellules/ml et cultivées dans 500  $\mu$ l de milieu de culture à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont à 50-80% de confluence, elles sont transfectées en utilisant un ratio 3 : 1, à savoir 3  $\mu$ l agent de transfection (FuGENE, Roche) 1  $\mu$ g de plasmide. Pour une lamelle, 3  $\mu$ l de FuGENE sont mixés à 50  $\mu$ l de milieu DMEM sans sérum. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante de ce mélange, 1  $\mu$ g de plasmide y est ajouté pour une incubation de 15 minutes supplémentaires. Les cellules sont ensuite mises en présence du mélange et la culture est maintenue de 24 à 72 h à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Après ce délai, les cellules sont fixées à la

paraformaldéhyde 4% dans du PBS (NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 mM ; pH 7,3) pendant 10 minutes à température ambiante.

#### 2.8.4 Analyse de la localisation de l'EGFP par fluorescence

Après 3 rinçages au PBS, les lamelles sur lesquelles sont accrochées les cellules transfectées sont montées sur lame dans du milieu « Vectashield hard set medium » contenant du DAPI (diamino-4'6-phenylindol-2 dichlorhydrate) (Vector Laboratories). Ce dernier est un agent intercalant de l'ADN permettant d'émettre une fluorescence bleue à 456 nm lorsqu'il est excité par une lumière violette à 372 nm. Lorsque l'EGFP est excitée avec une lumière ayant une longueur d'onde de 488 nm, celle-ci émet une fluorescence intrinsèque verte à 507 nm, ce qui permet de la localiser soit seule ou sous forme de protéine fusion dans les différents compartiments subcellulaires.

### 2.9 Expression du gène de la 25kDa ThTPase dans des lignées cellulaires par w-RT-PCR

L'ARN total est extrait des cellules en utilisant le kit d'extraction Insta-Pure (Eurogentec). L'ARN total (5 µg) est rétrotranscrit en ADNc dans un volume final de 20 µl en utilisant 2 µg d'amorces « random » (Promega). Le gène de la ThTPase est ensuite amplifié par PCR en utilisant le mélange suivant : 1 µl cDNA, 5 µl d'amorces 10 µM, 0,5 µl (2,5 Unités) Go Taq DNA Polymérase dans un volume final de 50 µl. La PCR se déroule de la sorte : 5 minutes à 95°C et 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C, avec une étape finale de 5 minutes à 72°C. Les produits d'amplification sont visualisés par marquage au bromure d'éthidium après électrophorèse sur gel d'agarose 1%. La séquence du produit d'amplification est ensuite confirmée par séquençage après insertion dans le vecteur pGEMT (Giga séquençage, Université de Liège).

## **2.10 Identification de partenaires protéiques de la mThTPase (« Pulldown assay »)**

Pour déterminer si la 25-kDa ThTPase peut interagir avec d'autres protéines, nous avons utilisé le kit « ProFound™ Pull-Down PolyHis Protein : Protein Interaction Kit » (Thermo scientific). Le principe est de lier la mThTPase qui possède une séquence de 8 histidines et de la protéine liant le maltose (MBP) du côté N-terminal (voir chapitre suivant) à des billes de cobalt sur colonne. L'expression de la protéine est induite dans 5 ml de bactéries *E. coli* de la souche BL21DE3. Elles sont ensuite lysées par deux passages dans la presse de French et centrifugées à 30 000 g. Le surnageant est transféré sur une colonne composée de la résine couplée aux billes de cobalt. Après 5 lavages dans la solution de liaison décrite au point 2.2, un surnageant de cerveau de souris est passé sur la colonne qui est ensuite soumise à 3 lavages supplémentaires dans la solution de liaison. La ThTPase liée à la colonne et les protéines en interaction avec elle sont éluées avec une solution concentrée en imidazole (point 2.2). Les protéines contenues dans l'éluat sont séparées par page SDS sur gel de polyacrylamide. L'expérience contrôle est réalisée en parallèle et consiste à lier la séquence de la 8His-MBP à la colonne. Les bandes qui sont présentes avec la ThTPase mais pas dans le contrôle sont isolées et envoyées en spectrométrie de masse (GIGA proteomics facility). Après réduction et alkylation, le contenu des bandes est digéré à la trypsine. Les peptides résultants sont analysés par LC-ESI-MSMS.



# RESULTATS



### **3. NeuTTM, une enzyme bactérienne qui appartient à la superfamille CYTH et qui hydrolyse spécifiquement le tripolyphosphate inorganique**

#### **3.1 Background**

En 2002, Iyer et Aravind ont observé que les domaines catalytiques de la 25-kDa hThTPase et de l'adénylate cyclase d'*Aeromonas hydrophila* (CyaB) définissaient une nouvelle superfamille de domaines qui, selon eux, peuvent lier les « phosphates organiques ». Cette superfamille a été appelée CYTH en référence aux deux premières lettres de CyaB et de la ThTPase. La présence de séquences codant pour des orthologues de ces enzymes a été démontrée dans tous les règnes biologiques, ce qui suggère que CYTH est une ancienne famille de protéines et qu'un de ses représentants devait exister chez le dernier ancêtre commun universel de toute forme de vie cellulaire. Il a été proposé que ce domaine enzymatique puisse jouer un rôle central à l'interface entre le métabolisme des nucléotides et des polyphosphates (Iyer et Aravind, 2002), mais ce rôle reste à l'heure actuelle non défini pour la plupart des enzymes de cette famille. En utilisant des alignements multiples et des prédictions de structures secondaires, Iyer et Aravind ont montré que le site catalytique de ces enzymes forme un nouveau type de structure composée de feuillets  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  contenant 6 résidus acides et 4 résidus basiques conservés. Au moins 4 résidus acides (généralement des glutamates) permettent de chélater le cation divalent requis pour la catalyse, comme dans le cas de certaines adénylyl cyclases, DNA polymérases et phosphohydrolases (Iyer et Aravind 2002 ; Aravind et Koonin, 1998 ; Tesmer *et al.*, 1999). Les structures de plusieurs enzymes de la famille de CYTH ont été obtenues (fig. 30). Parmi celles-ci, on retrouve notamment celle de la 25-kDa ThTPase de souris (Song *et al.*, 2008), celle de la protéine YpAC4 qui est l'adénylate cyclase de type IV de *Yersinia pestis* (PDB 2FJT, Gallagher *et al.*, 2006), celle de la RNA triphosphatase de levure Cet1 (PDB 1D8H, Bisailon et Bougie, 2003), celle de la protéine PF0863 appartenant à *Pyrococcus furiosus* (PDB 1YEM et 2DC4) dont la fonction n'est à l'heure actuelle pas connue et également celle de la protéine NeuTTM (PDB 2FBL). On remarque que la structure ouverte de la mThTPase, obtenue ici par RMN et qui correspond à la forme libre (non liée au substrat) de l'enzyme en solution, présente des similitudes avec la structure de NeuTTM. Nous avons donc formulé

l'hypothèse que cette enzyme pouvait être une ThTPase soluble bactérienne, un type d'enzyme qui n'a jamais été mis en évidence dans un organisme procaryote.

Dans le génome *d'E.coli*, il existe également une séquence codant pour une enzyme qui possède la signature CYTH (Iyer et Aravind, 2002), mais celle-ci n'a jamais été étudiée d'un point de vue cinétique ou structural. La protéine s'appelle Ygif et est répertoriée comme étant une adénylate cyclase potentielle, par analogie avec CyaB. Il est important de noter que les adénylates cyclases de type IV qui ont été caractérisées (celles de *A. hydrophila* et *Y. pestis*) sont peu actives dans les conditions « physiologiques » usuelles : l'activité n'est substantielle qu'à température élevée et pH très alcalin (Sismeiro *et al.*, 1998 ; Smith *et al.*, 2006). On peut donc douter de la signification physiologique de cette activité adénylate cyclase.

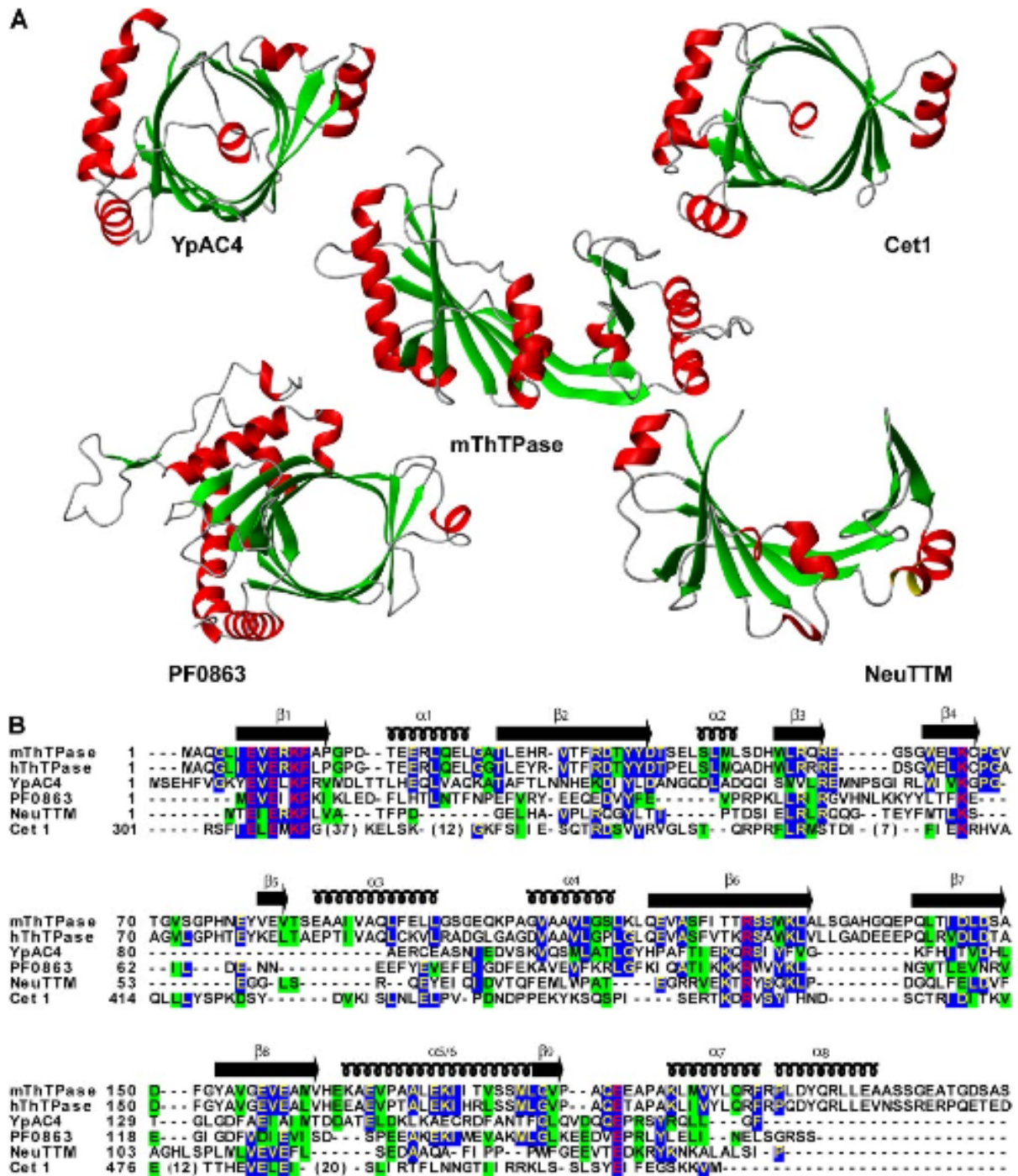
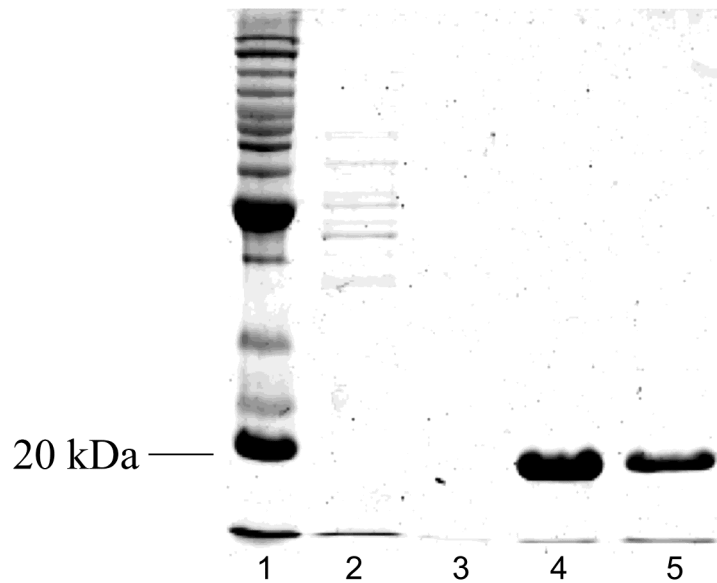


Figure 30. Comparaison des structures primaires et tertiaires de certaines enzymes de la famille CYTH (d'après Song *et al.*, 2008).

### 3.2 Clonage, expression et purification de NeuTTM

La séquence codante du gène de *NeuTTM* a été clonée dans le vecteur d'expression pET15b modifié pour permettre la production d'une protéine possédant une queue poly-

histidine du côté N-terminal. Après purification, la pureté de la protéine a été vérifiée par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (fig. 31).

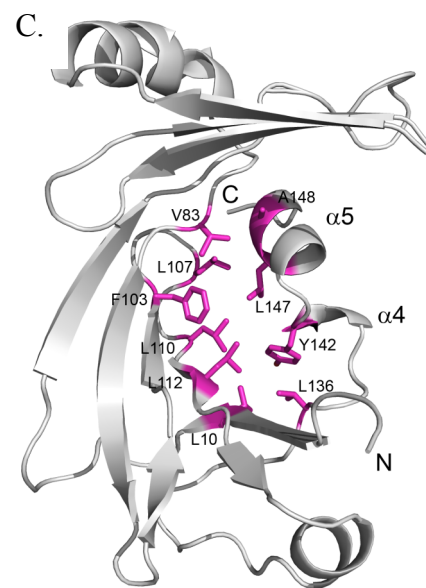
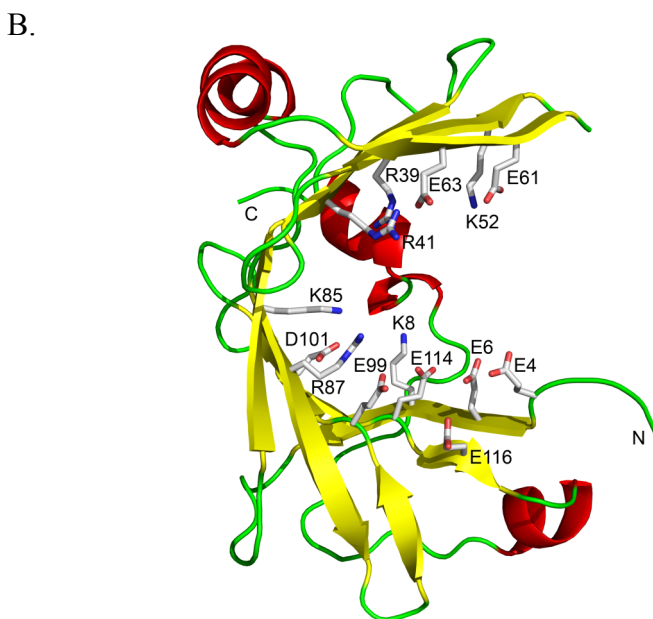
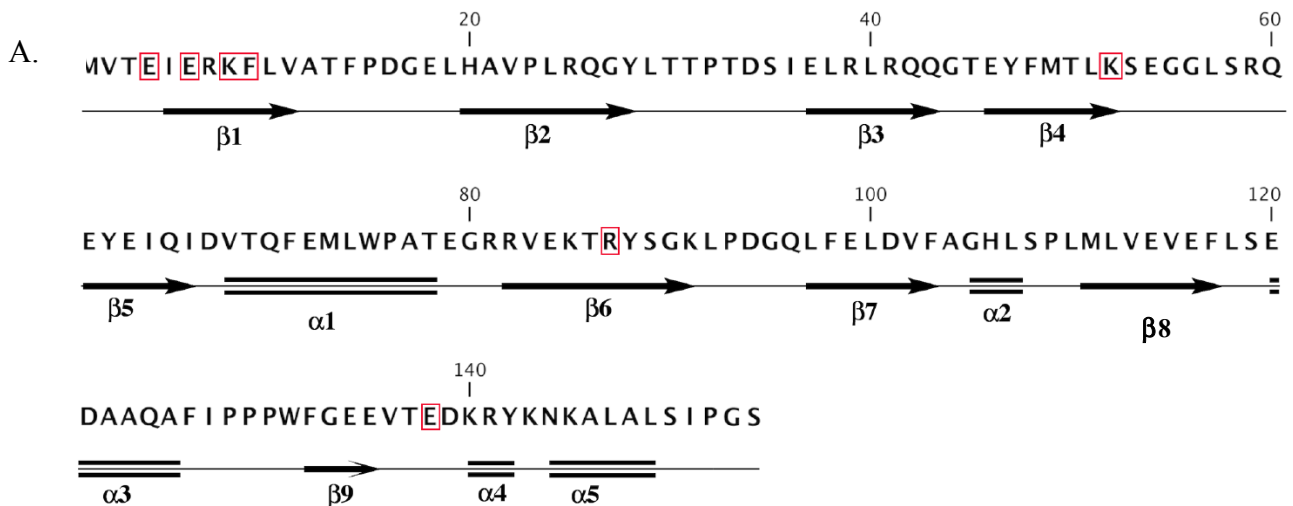


**Figure 31. SDS-PAGE après purification de la 6HIS-NeuTTM sur colonne de Nickel.** Ligne 1, marqueur de poids moléculaire BenchMark™. Ligne 2 et 3, contenu des fractions durant le lavage de la colonne dans le tampon de liaison. Ligne 4 et 5, contenu des fractions durant l'élution avec un tampon contenant une forte concentration en imidazole. Ceci montre que toute la protéine d'intérêt est récupérée durant l'élution et qu'elle est très peu contaminée par d'autres protéines parasites.

La queue poly-histidine de la protéine peut ensuite être enlevée par clivage à l'aide de la TEV protéase, ce qui augmente fortement le pouvoir catalytique ( $k_{cat}$ ) de l'enzyme. Pour la cristallisation de l'enzyme, celle-ci a été produite sous forme sélénée.

### 3.3 Propriétés structurales de la protéine recombinante

La séquence et la structure secondaire de l'enzyme sont données dans la figure 32.



**Figure 32. Structure de NeuTTM** (A) Séquence en acides aminés et éléments de structure secondaire de la protéine. Les résidus entourés sont conservés chez toutes les protéines de la famille CYTH connues. (B) Représentation en « cartoon » du monomère de *NeuTTM*. Les chaînes latérales des résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison au substrat et/ou la catalyse sont représentées en lignes. (C) Cette représentation souligne la stabilisation de la structure de l'enzyme sous forme relativement rigide par des interactions hydrophobes entre d'une part des résidus hydrophobes des feuillets  $\beta 7$  et  $\beta 8$  et, d'autre part, la boucle  $\alpha 4$  et l'hélice  $\alpha 5$ . Le monomère *NeuTTM* est sous forme de représentation « cartoon » en gris et les résidus qui forment le patch hydrophobe et stabilisent le corps protéique sont représentés en lignes magenta (Les données cristallographiques ont été obtenues par A. Savchenko *et al.*).

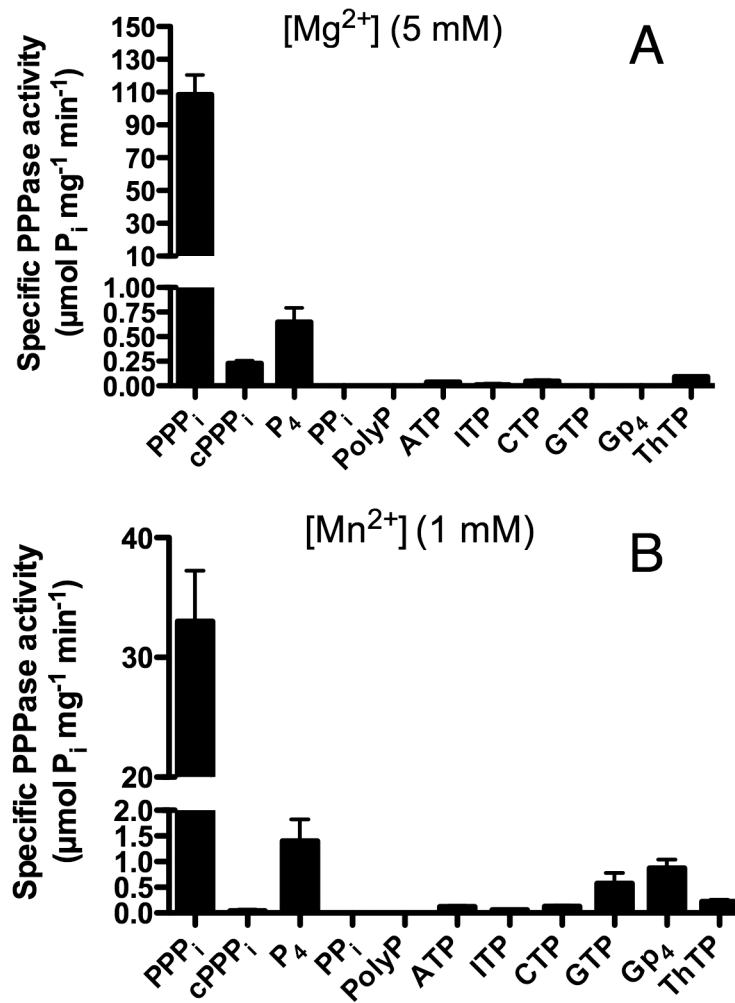
Bien que *NeuTTM* ait été classée dans les « triphosphate tunnel metalloenzymes », les données cristallographiques suggèrent plutôt une structure ouverte, comme c'est le cas pour la

mThTPase en l'absence de substrat. Dans le cas de *NeuTTM*, la structure tertiaire est en feuillets  $\beta$  antiparallèles (« $\beta$ -barrel ») comme dans les autres TTM. Cependant, il semble que l'hélice  $\alpha 5$  et la boucle  $\alpha 4$ , qui sont situées dans la fente, empêchent la formation d'une structure en tunnel (fig. 32C). Plusieurs résidus, dont la chaîne latérale projette vers l'intérieur de la fente, peuvent jouer un rôle important dans la liaison au substrat et à l'ion métallique et/ou dans la catalyse. Dans le cas de l'enzyme *CthTTM*, qui possède une grande similarité avec *NeuTTM*, une analyse mutationnelle détaillée a permis de mettre en évidence quels étaient les résidus essentiels pour conserver une activité catalytique maximale (Keppetipola, N., *et al.*). Il en ressort que quatre glutamates (E4, E6, E114, E116 et peut-être E61 et E63) semblent lier l'ion  $Mg^{2+}$  alors que R41 (et R87 ?) interagissent probablement avec les groupements phosphorylés du substrat. Selon Keppetipola et ses collaborateurs, dans l'enzyme *CthTTM*, la lysine numéro 8 forme une liaison hydrogène avec le carboxyl en position C-terminale des hélices  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ . L'analyse détaillée de la structure de *NeuTTM* soulève néanmoins quelques questions quant à l'existence d'une telle interaction. En effet, alors que la distance entre l'azote de la chaîne latérale de la lysine 8 (K8NZ) et l'oxygène situé sur le carboxyl terminal de la tyrosine 142 (Y142O) est favorable à la formation d'une telle liaison (2,9 Å), l'angle N...O-C est de 117 degrés, ce qui est loin d'être la position idéale. De plus, une molécule d'eau est localisée à 3,5 Å du groupement C-terminal de Y142 avec un angle O...O-C de 172 degrés. Ceci fait de la molécule d'eau un partenaire plus probable que K8NZ pour la formation d'une liaison hydrogène avec le groupement carboxyl de Y142.

### **3.4 Spécificité et propriétés cinétiques**

Contrairement à ce qui était attendu, seulement une très faible activité ThTPasique a pu être détectée, ce qui indique que contrairement à son orthologue de mammifère, *NeuTTM* n'est pas une ThTPase native (fig. 33).





**Figure 33. Spécificité de substrat de la NeuTTM His-tagée recombinante.** La spécificité a été testée en présence de (A) 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9,7) ou (B) 1 mM MnCl<sub>2</sub> (pH 10,4). Le milieu d'incubation contient soit 50 mM Na-CHES (pH 9,7) ou 50 mM Na-CAPS (pH 10,4), 0,5 mM en substrat, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9,7) ou 1 mM MnCl<sub>2</sub>. L'incubation se fait à 37 °C. (moyenne ± écart type, n = 2 - 6)

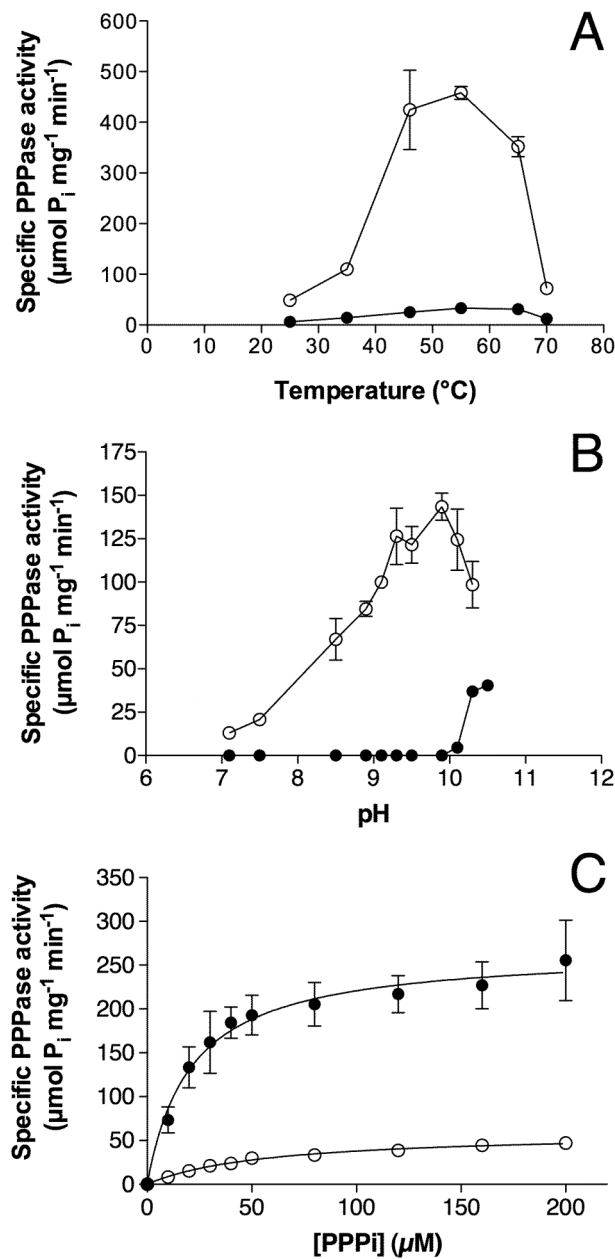
Sachant que l'ATP et les autres nucléosides triphosphates sont hydrolysés par de nombreuses enzymes de la famille TTM (Gong *et al.*, 2006 ; Keppetipola *et al.*, 2007), nous avons testé l'activité nucléoside triphosphatase de NeuTTM. En présence de Mg<sup>2+</sup>, cette activité est tout à fait négligeable alors qu'en présence de Mn<sup>2+</sup>, l'enzyme hydrolyse faiblement les NTPs, en particulier le GTP.

Contrairement aux NTPs, le PPPi, en présence de Mg<sup>2+</sup> comme activateur, est un très bon substrat pour NeuTTM. L'enzyme montre également une forte préférence pour le PPPi

linéaire comparé au cyclique (cPPPi) et au tétraphosphate linéaire (P<sub>4</sub>). Le polyphosphate à longue chaîne (65 ± 5 résidus phosphate) n'est quant à lui pas du tout hydrolysé. Le Gpppp ou Gp<sub>4</sub> n'est que très peu hydrolysé, ce qui constitue une grosse différence avec l'enzyme *CthTTM* (Sismeiro *et al.*, 1998). L'éventualité d'une activité adénylate cyclase de *NeuTTM* a également été vérifiée en incubant l'enzyme avec de l'ATP en présence de MgCl<sub>2</sub> ou de MnCl<sub>2</sub> à différents pH. Il en est ressorti que l'enzyme ne possède pas une telle activité car l'apparition d'AMP cyclique n'a jamais pu être mise en évidence en HPLC. Le pic d'ATP diminue légèrement mais on retrouve une augmentation identique du pic d'ADP, indiquant que ceci est dû à une hydrolyse de l'ATP. Jusqu'à maintenant, la seule démonstration d'une CYTH bactérienne pourvue d'une activité adénylate cyclase est l'enzyme CyaB AC2 d'*Aeromonas hydrophila* et son homologue de classe IV appartenant à *Yersinia pestis* (ref Gallagher et al., 2006 ; Gallagher et al., 2011 ; Smith *et al.*, 2006).

La figure 34 montre les propriétés cinétiques générales de *NeuTTM* en tant que PPPase. La température optimale est de 50-55 °C (fig. 34A) et l'optimum de pH se situe autour de 9,7 (fig. 34B). La stabilité thermique et l'optimum de pH alcalin sont aussi des caractéristiques d'autres enzymes de la superfamille CYTH, notamment les deux membres fondateurs CyaB-AC2 (Sismeiro *et al.*, 1998) et la 25-kDa ThTPase humaine.

Comme le Mn<sup>2+</sup> est un bon substituant du Mg<sup>2+</sup> pour certains membres de la famille (ref Gong et al., 2006 ; Keppetipola et al., 2007 ; Gong et al., 2003 ; Ho et al., 1998 ; Bisailon et Shuman, 2001), l'effet de celui-ci a été testé pour déterminer s'il peut remplacer Mg<sup>2+</sup> comme activateur de *NeuTTM*. Il a été démontré que le Mn<sup>2+</sup> était un très mauvais substituant pour du Mg<sup>2+</sup> à toutes les températures testées et dans une gamme de pH de 7 à 10 (fig. 34A et B). Lorsqu'on entre dans une gamme de pH très alcalin (10-10,5), on remarque que l'activité dépendante du Mn<sup>2+</sup> devient significative.



**Figure 34. Propriétés cinétiques de NeuTTM avec le PPPi comme substrat.** La concentration en PPPi est de 0,5 mM (A) Dépendance de l'activité en fonction de la température en présence de 5 mM en MgCl<sub>2</sub> à pH 9,7 (○) ou 0,8 mM MnCl<sub>2</sub> à pH 10,4 (●). (B) Dépendance vis-à-vis du pH en présence de 10 mM MgCl<sub>2</sub> (○) ou 1 mM MnCl<sub>2</sub> (●) à 37 °C (Les courbes sont réalisées par régression non linéaire de l'équation de Michaelis-Menten équation, n = 3). Les tampons utilisés aux différentes valeurs de pH sont donnés dans « Matériel et Méthodes » (moyenne ± écart type).

Les paramètres cinétiques ( $K_m$ ,  $k_{cat}$  et efficacité catalytique) ont été déterminés avec différentes préparations enzymatiques et dans différentes conditions. Les constantes de

Michaelis-Menten de *NeuTTM* sauvage His-tagagée ont été mesurées à partir d'enzyme sauvage fraîchement purifiée. A pH 9,7 et 37 °C, le  $K_m$  pour le PPPi est de  $21 \pm 3 \mu\text{M}$  et le  $V_{\text{max}}$  de  $240 \pm 30 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  en présence de 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Dans de telles conditions, le substrat est essentiellement sous forme de complexe  $[\text{Mg}^{2+}\text{-PPPi}]$ . En effet, la constante de dissociation du complexe est basse ( $K_{\text{diss}} \sim 1,6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ). Le  $k_{\text{cat}}$  dans de telles conditions est égal à  $76 \text{ s}^{-1}$  (en considérant le poids moléculaire de l'enzyme égal à 19 kDa pour un monomère). L'efficacité catalytique de *NeuTTM* en tant que triphosphatase est donc élevée avec un  $k_{\text{cat}}/K_m = 3,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . A pH neutre,  $k_{\text{cat}}/K_m$  est 10 fois plus bas ( $3,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ceci reste cependant une efficacité catalytique suffisante pour pouvoir considérer que *NeuTTM* est une authentique triphosphatase inorganique (PPPase). Cette hypothèse est renforcée par le fait que le  $k_{\text{cat}}$  de l'enzyme non taggée est encore supérieur ( $7900 \text{ s}^{-1}$  à 50°C et pH 9,7, voir tabl. 4). Cette valeur est supérieure de deux ordres de grandeur au  $k_{\text{cat}}$  de *CthTTM* pour ses meilleurs substrats PPPi et Gp<sub>4</sub> (Keppetipola *et al.*, 2007 ; Jain et Shuman, 2008). On peut dès lors imaginer que chez *N. europaea*, le rôle physiologique de *NeuTTM* est la dégradation du PPPi. Aucune conclusion formelle quant au rôle biologique de telles enzymes ne pourra cependant être tirée tant que la preuve de l'existence de PPPi chez *Nitrosomonas* ou tout autre organisme n'aura pas été apportée.

**Tableau 4. Paramètres cinétiques du sauvage et des mutants *NeuTTM* recombinants (Moyenne  $\pm$  écart type, n = 3-4)**

Préparation enzymatique	Substrat	Conditions	$K_{m,\text{app}}$	$V_{\text{max}}$	$k_{\text{cat}}$	$k_{\text{cat}}/K_m$
			$\mu\text{M}$	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}/\text{M}^{-1}$
WT His-tagagée	PPPi	50 °C, pH 9.7	$40 \pm 15$	$910 \pm 70$	288	$7,2 \cdot 10^6$
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				
		37 °C, pH 9.7	$21 \pm 3$	$240 \pm 30$	76	$3,6 \cdot 10^6$
	[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM					
		37 °C, pH 7.1	$58 \pm 5$	$60 \pm 2$	19	$0,33 \cdot 10^6$
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				
	ATP	50 °C, pH 8.1	$800 \pm 120$	$1.2 \pm 0.2$	0.36	$0,45 \cdot 10^3$
		[Mn <sup>2+</sup> ] = 10 mM				
WT Non taggée	PPPi	50 °C, pH 9.7	$100 \pm 20$	$25,000 \pm 2000$	7900	$79 \cdot 10^6$
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				

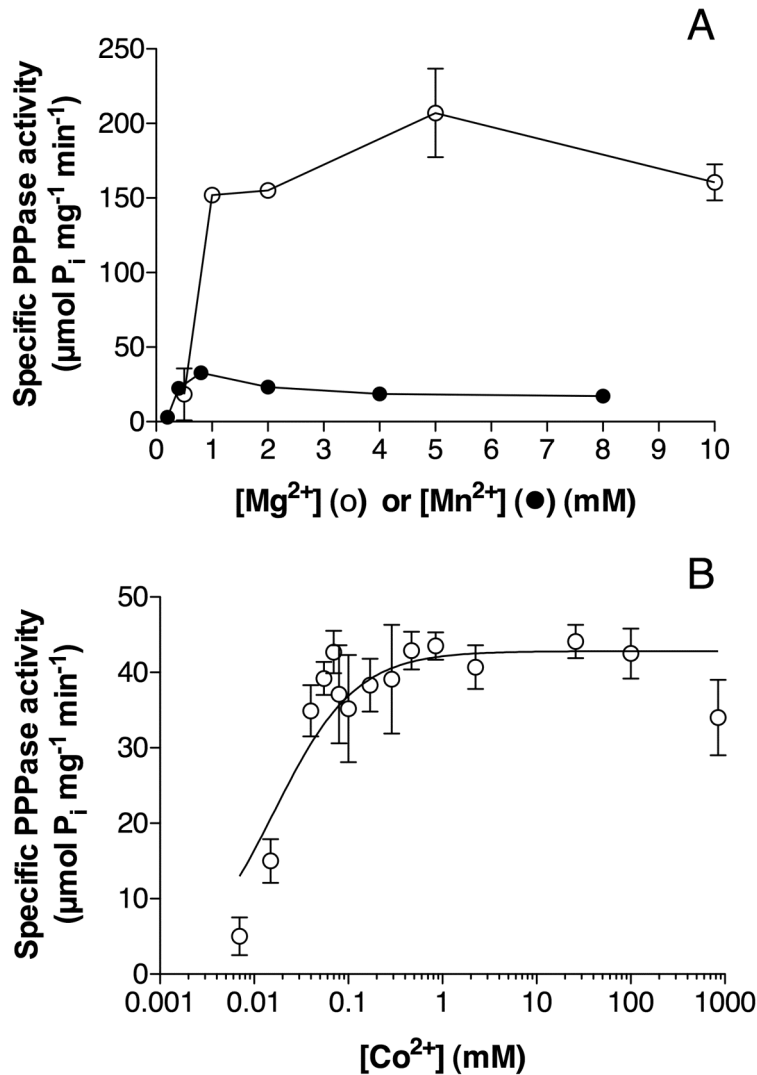
## *Résultats NeuTTM-Ygif*

K8A His-tagagée	PPP <sub>i</sub>	50 °C, pH 9.7 [Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM	390 ± 30	2800 ± 500	887	2,3 10 <sup>6</sup>
	PPP <sub>i</sub>	37 °C, pH 9.7 [Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM	280 ± 55	235 ± 30	74	0,19 10 <sup>6</sup>
	ATP	50 °C, pH 10.1 [Mn <sup>2+</sup> ] = 10 mM	1200 ± 500	12.5 ± 3.2	3.96	3,3 10 <sup>3</sup>
K85A His-tagagée	PPP <sub>i</sub>	50 °C, pH 9.7 [Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM	720 ± 60	65 ± 7	21	29 10 <sup>3</sup>
	PPP <sub>i</sub>	37 °C, pH 9.7 [Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM	2600 ± 400	33 ± 3	10	4 10 <sup>3</sup>
K52R His-tagagée	PPP <sub>i</sub>	37 °C, pH 9.7 [Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM	191 ± 8	3.1 ± 0.1	0.98	5,1 10 <sup>3</sup>
	Y28F	37 °C, pH 9.7 [Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM	44 ± 8	2.6 ± 0.2	0.82	19 10 <sup>3</sup>

### 3.5 Effet de différents activateurs et inhibiteurs de *NeuTTM* recombinante

Comme l'indique le nom « triphosphate tunnel métalloenzymes », l'activité des TTM est fortement dépendantes des cations métalliques divalents. Communément aux autres enzymes CYTH, l'activité PPPasique de *NeuTTM* requiert absolument un cation divalent, avec une activité maximale en présence de l'ion Mg<sup>2+</sup> à des concentrations comprises entre 2 et 10 mM (fig. 35A). Comme mentionné précédemment, l'ion Mn<sup>2+</sup> est un moins bon activateur (fig. 35A), mais la moitié de l'activation maximale est obtenue à une concentration de 0,4 mM, ce qui correspond à une concentration en Mn<sup>2+</sup> libre très faible.

Nous avons également testé l'ion Co<sup>2+</sup>, qui, comme Mn<sup>2+</sup>, est un bon activateur pour plusieurs TTM's (Ho *et al.*, 1998). A pH optimum (9,5-9,7), Co<sup>2+</sup> est un meilleur activateur que Mn<sup>2+</sup>. Cependant, l'activité maximale ne vaut que 10% de celle mesurée en présence de 5 mM Mg<sup>2+</sup> (fig. 35B). La concentration de Co<sup>2+</sup> libre correspondant à la moitié de l'activation maximale est très basse (entre 50-100 nM), ce qui indique que l'affinité pour Co<sup>2+</sup> est encore plus élevée que pour Mn<sup>2+</sup>.

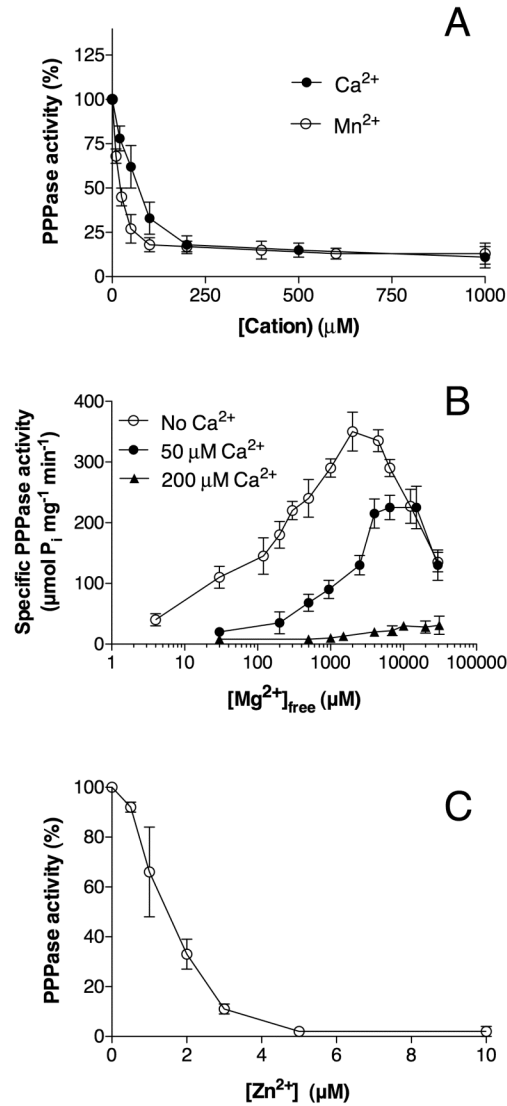


**Figure 35. Activité PPPasique de NeuTTM en présence de cations divalents.** (A) Dépendance de l'activité PPPasique vis-à-vis de la concentration totale en Mg<sup>2+</sup> (O) et Mn<sup>2+</sup> (●). L'incubation est réalisée en présence de 50 mM Na-CHES (Mg<sup>2+</sup>, pH 9,7) ou Na-CAPS (Mn<sup>2+</sup>, pH 10,4) à 37°C. (B) Effet d'une augmentation de la concentration en Co<sup>2+</sup> (Co<sup>2+</sup> libre estimé en considérant un K<sub>diss</sub> = 8 nM pour le complexe Co-PPPi) sur l'activité PPPasique. Conditions d'expérience : PPPi 0,5 mM ; Na-CHES 50 mM, pH 9,5, 45°C (Moyenne ± écart-type).

Comme cela a déjà été démontré pour d'autres enzymes CYTH comme Cet1 (Ho *et al.*, 1998) et la 25-kDa ThTPase (Lakaye *et al.*, 2004), Ca<sup>2+</sup> n'a pas d'effet activateur mais un effet inhibiteur en présence de Mg<sup>2+</sup> (fig. 36A) : avec un IC<sub>50</sub> compris entre 50 et 100 μM en présence de 5 mM Mg<sup>2+</sup>. A pH < 10, Mn<sup>2+</sup> est également un bon inhibiteur en présence de Mg<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub> ~ 40 μM). Comme le Mn<sup>2+</sup> est aussi un activateur (bien que beaucoup moins efficace), l'inhibition par ce cation en présence de Mg<sup>2+</sup> n'est pas complète. Les courbes

montrant l'activation par des concentrations croissantes de  $Mg^{2+}$  sont déplacées vers la droite en présence de  $Ca^{2+}$  (fig. 36B), suggérant que le calcium exerce son effet inhibiteur, au moins partiellement, par compétition avec l'ion  $Mg^{2+}$ . Nous avons finalement testé l'effet inhibiteur du zinc. Il a été démontré précédemment que celui-ci inhibe fortement la 25-kDa ThTPase de mammifères (Lakaye *et al.*, 2004).  $Zn^{2+}$  inhibe l'activité PPPasique de NeuTTM à des concentrations très faibles ( $IC_{50} = 1,5 \mu M$ ) (fig. 36C). L'effet inhibiteur de  $Zn^{2+}$  n'est que peu affecté par la concentration de l'activateur  $Mg^{2+}$ , suggérant que les deux cations ne sont pas en compétition pour le même site. Ceci est également le cas pour la 25-kDa thiamine triphosphatase. Ces données s'accordent avec la supposition que les ions  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  partagent le même site de liaison, alors que l'ion  $Zn^{2+}$  se fixe à un site « allostérique » périphérique.

$Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  sont aussi inhibiteurs mais avec un  $IC_{50}$  supérieur, respectivement de 10  $\mu M$  et 20  $\mu M$ .



**Figure 36. Inhibition de NeuTTM par les cations divalents.** (A) Inhibition par Ca<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup> en présence de Mg<sup>2+</sup>. Le milieu d'incubation contient : PPPi 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Na-Ches 50 mM pH 9,7 et la température d'incubation est de 37 °C. (B) Effet de l'augmentation en Mg<sup>2+</sup> (concentration calculée en Mg<sup>2+</sup> libre) sur l'activité PPPasique de NeuTTM en présence d'ions Ca<sup>2+</sup> à 50 °C. Le milieu d'incubation contient : PPPi 0,5 mM, Na-Ches 50 mM pH 9,7. (C) Effet de la concentration en Zn<sup>2+</sup> (ZnSO<sub>4</sub>) sur l'activité PPPasique de NeuTTM. Le milieu d'incubation PPPi 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Na-Ches 50 mM pH 9,7 à 37 °C. (Moyenne ± écart-type).



### 3.6 Étude des complexes enzymatiques formés par NeuTTM en présence ou non de PPPi et/ou de différents cations par spectrométrie de masse

Les données cristallographiques obtenues par diffraction des rayons X montrent que le cristal de la protéine est un dimère (Lunin *et al.*, 2005). Les spectres de masse en électrospray de l'enzyme His-tagagée concentrée ont été récoltés (concentration totale en monomère 10  $\mu$ M) dans 100 mM en acétate ammonique, pH 6,5 (fig. 37). L'enzyme est un mélange de monomères (noté M) et de dimères (noté  $M_2$ ), le dimère étant plus abondant. Le dimère se dissocie facilement en phase gazeuse quand le voltage augmente de 50 V à 150 V. Ceci suggère que les ponts salins ne sont pas prévalents à l'interface de dimérisation. Cette observation est confirmée par les données cristallines qui montrent que cette interface est principalement composée de résidus d'acides aminés hydrophobes parmi lesquels on retrouve L29, L38, L40, L51, L74, I36, I64 et I66 (fig. 38), ce qui explique la labilité du dimère en électrospray.

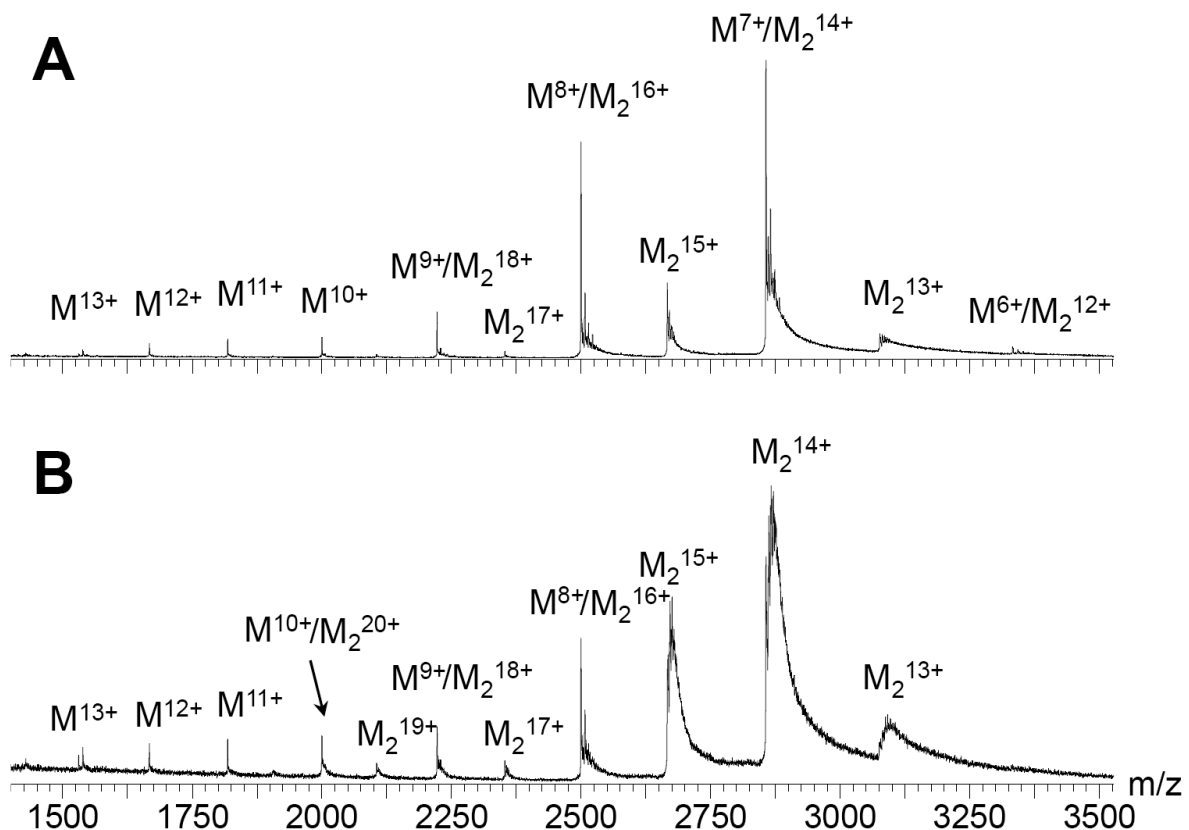
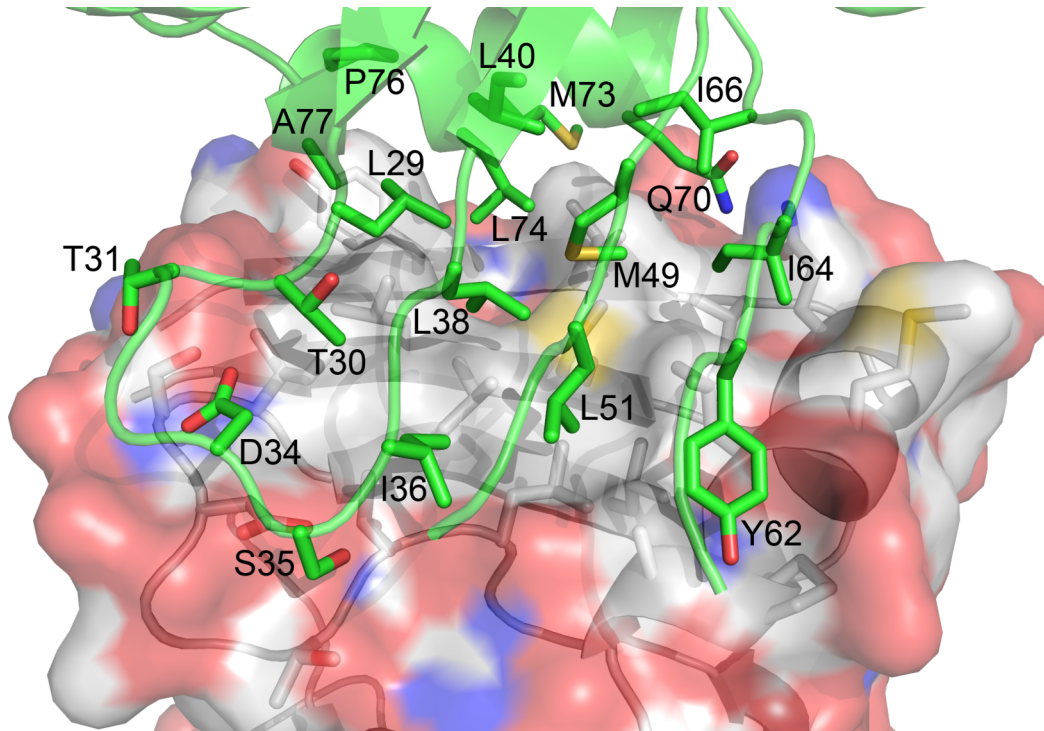


Figure 37. Spectre de masse de NeuTTM recombinante His-tagagée en l'absence de substrat et de cations divalents. M = monomère (masse théorique = 19 987,4 Da) et  $M_2$  = dimère (masse théorique = 39 974,8 Da). (A) Spectre enregistré en conditions drastiques (Voltage = 150 V) : le dimère est partiellement dissocié mais la

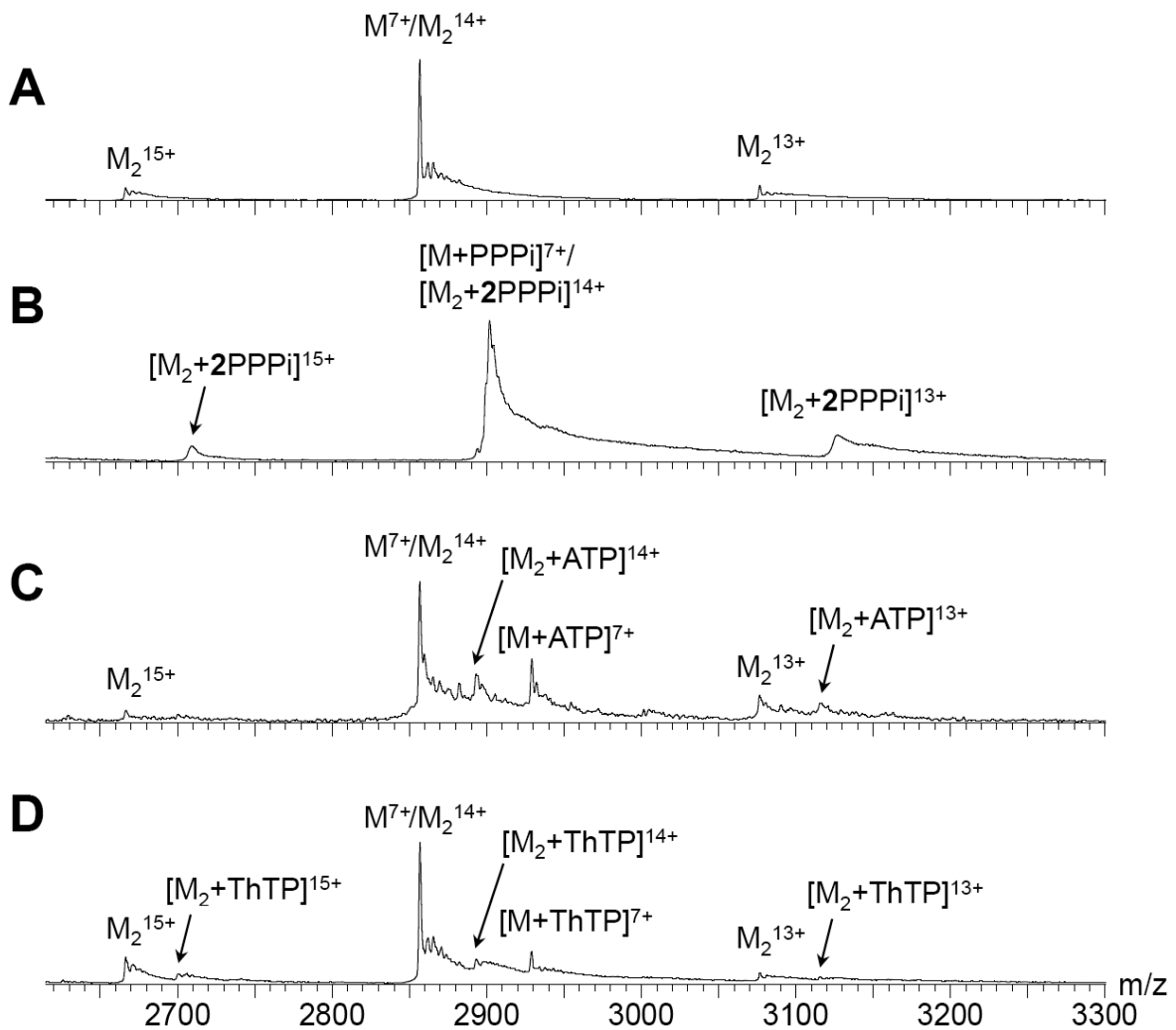
précision sur la masse est supérieure. (B) Spectre de masse obtenu en conditions plus douces (Voltage = 50 V), celui-ci montre que le dimère est la plus abondante des espèces en solution. La concentration en protéines est de 10  $\mu$ M dans 100 mM acétate ammonique (100 mM, pH 6,5, données obtenues par M. Murty, V. Gabelica et E. DePauw).



**Figure 38. Interface de dimérisation de *NeuTTM*.** Le monomère A est représenté en « cartoon » (Ruban vert et atomes de carbone verts), alors que la surface du monomère B est représentée en gris semi transparent (atomes de carbone gris). Pour les deux monomères, les atomes d'oxygène sont colorés en rouge, les atomes d'azote sont représentés en bleu et les atomes de soufre en jaune. Les résidus formant l'interface de dimérisation sont représentés en lignes et indiqués pour le monomère A (Données obtenues par A. Savchenko *et al.*).

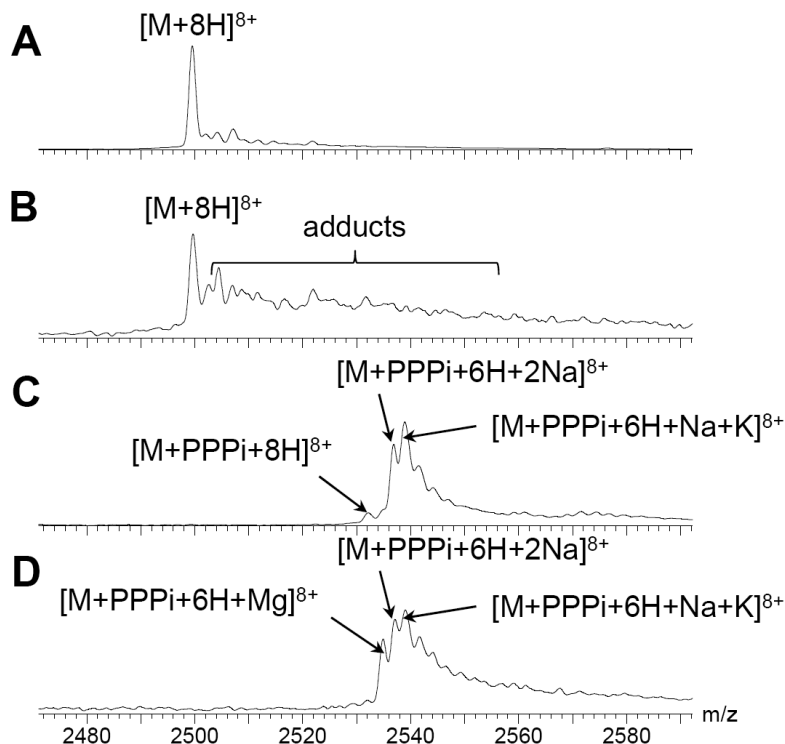
Nous avons ensuite étudié les complexes formés par *NeuTTM* et différents substrats seuls (PPPi, ATP et ThTP) ou en présence de  $Mg^{2+}$ . Dans tous les cas, le substrat reste étroitement lié à *NeuTTM*, quel que soit le voltage, grâce aux interactions ioniques dans ce complexe. La figure 9 montre les spectres de masse de *NeuTTM* seule (fig. 39A) et du mélange binaire avec PPPi (fig. 39B), ATP (fig. 39C) ou ThTP (fig 39D). Avec le PPPi, à la concentration utilisée (10  $\mu$ M *NeuTTM* et 25  $\mu$ M PPPi), le pic de protéine libre n'est plus résolu (limite du bruit de fond). La concentration de protéine libre peut donc être estimée inférieure à 8,5% de la concentration totale en protéine. Cela suggère que la constante de

dissociation du complexe monomère-substrat est inférieure à 1,5  $\mu\text{M}$ . Le dimère de protéine contient deux molécules de PPPi. Cela contraste fortement avec la situation en présence d'ATP et de ThTP où la protéine libre est prédominante et aussi bien le monomère que le dimère ne lie qu'une molécule de substrat. Le  $K_d$  déduit de l'intensité des pics pour les complexes monomère-substrat est au minimum de 90  $\mu\text{M}$ . Ceci concorde avec la haute valeur du  $K_m$  ( $800 \pm 120 \mu\text{M}$ ) mesurée pour l'activité ATPasique de NeuTTM (tabl. 4).



**Figure 39. Spectre de masse (100 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , pH 6,5) montrant la haute spécificité de NeuTTM pour le PPPi par rapport à l'ATP et le ThTP.** (A) Spectre de la protéine seule concentrée à 10  $\mu\text{M}$ . (B) 10  $\mu\text{M}$  en protéine et 25  $\mu\text{M}$  PPPi. (C) 20  $\mu\text{M}$  en protéine et 50  $\mu\text{M}$  ATP. (D) 10  $\mu\text{M}$  en protéine et 25  $\mu\text{M}$  ThTP (Données obtenues par M. Murty, V. Gabelica et E. De Pauw).

La figure 40 montre les spectres de masse de l'état monomérique chargé 8+ en présence de différents mélanges avec  $Mg^{2+}$  et/ou PPPi. Le spectre de la protéine seule est représenté principalement par un pic de rapport  $m/z = 2499,4$  (fig. 40A), qui reste prédominant quand la protéine est mélangée avec  $Mg^{2+}$  en excès de 10 fois (fig. 40B). Aussi bien le monomère que le dimère lient le  $Mg^{2+}$  avec une affinité modérée. Nous avons également testé un mélange binaire de la protéine avec  $Mn^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  (pas montré) et le résultat suggère une plus haute affinité pour le  $Zn^{2+}$  (avec plusieurs sites de liaison) que pour  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ . Ceci concorde avec le fait que NeuTTM est inhibée par des concentrations micromolaires en  $Zn^{2+}$  (fig. 36C). Une analyse plus détaillée de la masse des complexes [NeuTTM-PPPi] en l'absence de cations divalents montre qu'ils se lient spécifiquement à deux cations monovalents (les intensités des pics sans et avec un cation monovalent étant insignifiantes). La figure 10C montre l'existence de complexes avec deux ions  $Na^+$ , ceux-ci proviennent de la préparation de tripolyphosphate qui est sous forme de sel pentasodique. Un complexe [NeuTTM-PPPi- $Na^+$ - $K^+$ ] est aussi détecté, avec  $K^+$  probablement présent dans la préparation d'enzyme.



**Figure 40. Identification détaillée des complexes de NeuTTM dans des mélanges binaires et ternaires avec  $MgCl_2$  (0,1 mM) et/ou PPPi (25  $\mu$ M).** Les spectres ont tous été enregistrés dans 100 mM d'acétate ammonique (pH 6,5) à un voltage de 150 V pour une détermination plus précise de la masse de chaque complexe. (A) NeuTTM seule à un état de charge 8+. Le pic principal correspond à l'absorption de 8 protons et quelques adduits de sodium et potassium sont détectés. (B) NeuTTM en mélange binaire avec  $Mg^{2+}$ . L'intensité des pics

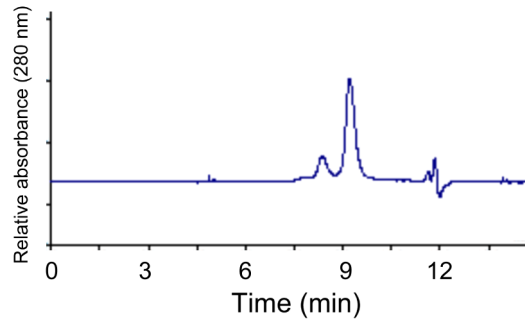
d'adduits non résolus augmente mais l'enzyme entièrement protonée reste le pic le plus intense. (C) *NeuTTM* en mélange binaire avec le PPPi. L'enzyme entièrement protonée est mineure et les complexes majeurs contiennent deux cations monovalents. (D) *NeuTTM* en mélange ternaire avec PPPi et  $Mg^{2+}$ . Le complexe enzyme-substrat lié à un cation  $Mg^{2+}$  est clairement détecté (Données obtenues par M. Murty, V. Gabelica et E. De Pauw).

Finalement, les propriétés des complexes ternaires (supposés être catalytiquement actifs) de *NeuTTM* avec le substrat PPPi et l'activateur  $Mg^{2+}$  ont été étudiées. Pour empêcher une trop forte hydrolyse du PPPi, le spectre a été enregistré juste après avoir mélangé *NeuTTM* avec l'activateur  $Mg^{2+}$  et le PPPi. Malgré la forte concentration en enzyme, l'activité PPPasique est faible à la température de la pièce et pH 6,5 (fig. 34) et l'hydrolyse complète du PPPi dans de telles conditions devrait probablement prendre plus que quelques secondes. Avec  $MgCl_2$  (0,1 mM) en présence de PPPi, le complexe [*NeuTTM*-PPPi] acquiert un cation  $Mg^{2+}$  plutôt que deux cations monovalents (fig. 40D). Le pic d'enzyme libre n'est plus observable. Nous pouvons donc conclure que le complexe [ $Mg$ -PPPi] (qui est le vrai substrat) lie le site actif de l'enzyme avec une forte affinité, le  $K_d$  étant du même ordre de grandeur que pour le PPPi libre ( $< 1,5 \mu M$ ).

Par ailleurs, il est clair que la nécessité de la présence d'un  $Mg^{2+}$  activateur n'est pas simplement due au fait que ce cation lie le PPPi. Bien que le vrai substrat soit plus que probablement le complexe [ $Mg$ -PPPi], l'activateur métallique divalent doit aussi se lier à un site spécifique sur la protéine. Les résultats de spectrométrie de masse (fig. 40D) suggèrent que l'enzyme ne peut lier qu'un seul ion  $Mg^{2+}$  avec une affinité appréciable. La même conclusion a été avancée par Song *et al.* (2008) pour la 25-kDa ThTPase de souris. Bien que Iyer et Aravind proposent que les protéines CYTH peuvent lier deux activateurs métalliques divalents, ceci n'est probablement pas une règle générale pour cette superfamille.

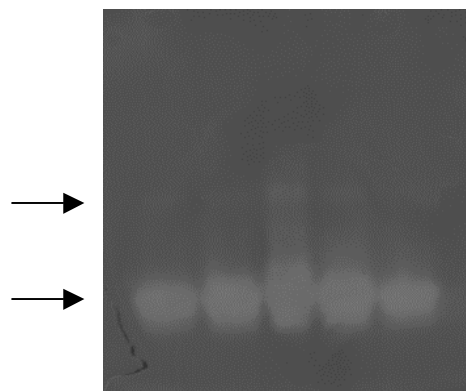
### **3.7 Mise en évidence de l'activité de *NeuTTM* sous forme de monomère ou dimère par électrophorèse en conditions non-dénaturantes**

En accord avec les résultats obtenus par spectrométrie de masse, deux pics de masse approximative de 20 et 40 kDa ont été obtenus sur tamis moléculaire (fig. 41).



**Figure 41. Séparation du monomère et du dimère de NeuTTM sur tamis moléculaire couplé à un dispositif HPLC.** La colonne TSK (G3000W, 30 x 0,75 cm, 7 mm) est équilibrée avec un tampon contenant 20 mM Hepes-Na (pH 6,8) et 200 mM NaCl, la vitesse d'écoulement étant de 0,5 ml/min. Un volume de 20 µl de solution protéique (1,75 mg/ml) est injecté sur la colonne et les deux pics sont collectés pour déterminer l'activité enzymatique.

L'activité spécifique du monomère et du dimère sont respectivement de 245 et 169  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  avec 0,5 mM PPPi à 50°C., montrant que l'activité catalytique n'est que peu affectée par la dimérisation. Ceci est également confirmé par la mise en évidence de l'activité enzymatique sur gel de polyacrylamide non-dénaturant (fig. 42). De plus, lorsque le monomère et le dimère sont récupérés après séparation sur colonne, puis réinjectés, tous deux sont purs, ce qui démontre qu'il n'y a pas d'interconversion rapide entre les deux formes. Ceci suggère simplement que la dimérisation peut être due à un artéfact associé à la purification de l'enzyme sans aucune signification physiologique.



**Figure 42. Détermination de l'activité PPPasique de NeuTTM dans un gel non dénaturant.** Les bandes actives sont colorées en blanc. La flèche du haut montre la bande correspondant au dimère et celle du bas au monomère.

### 3.8 Mutagenèse dirigée

Les mutations en alanine des résidus K8 et K85 ont été choisies car les résidus homologues sont importants pour l'activité catalytique et la spécificité de substrat de l'enzyme *CthTTM* très proche de *NeuTTM* : en effet, la structure primaire possède 73 positions de chaînes latérales identiques (Keppetipola *et al.*, 2007).

Nous avons trouvé que contrairement au mutant K8A de *CthTTM*, l'homologue chez *NeuTTM* reste fortement actif avec le PPPi comme substrat et en présence de  $Mg^{2+}$  comme activateur. Comme le  $K_m$  et le  $k_{cat}$  sont tous les deux augmentés (tabl. 4), l'efficacité catalytique est peu différente de celle mesurée pour la WT. Ceci constitue une grande différence avec *CthTTM* où la mutation de cette lysine abolit presque totalement l'activité PPPasique tout en stimulant l'activité ATPasique. Dans leur étude de la *CthTTM*, Keppetipola *et al.* avaient postulé que K8 forme une liaison hydrogène avec le squelette carboné de l'extrémité C-terminale des hélices  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ , stabilisant ainsi la structure ouverte des huit feuillets  $\beta$  en tonneau qui constituent le site de liaison au substrat. La substitution de K8 par une alanine est censée empêcher l'interaction entre le feuillet  $\beta 1$  et les hélices  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ , rendant la conformation moins rigide. Nos résultats suggèrent qu'une telle liaison hydrogène n'est pas requise pour maintenir la structure rigide de l'enzyme. De plus, avec ce mutant, l'ATP reste un mauvais substrat, comme dans le cas de l'enzyme sauvage (tabl. 4). Même en présence de  $Mn^{2+}$  comme activateur, l'efficacité catalytique est inférieure de 3 ordres de grandeur à ce qui est obtenu en présence PPPi. Une conformation très rigide ne semble pas nécessaire pour une haute activité PPPasique de *NeuTTM*, c'est-à-dire que K8 n'est pas impliqué dans la stabilisation de la conformation de l'enzyme. Il faut noter que Keppetipola *et al.* ont basé leur hypothèse sur la similarité de séquence avec *NeuTTM* et que la structure de *CthTTM* n'est pas connue. K85 est localisé dans le bas de la fente, où est supposé se trouver le site catalytique, près des résidus arginines (R39, R41 et R87) qui sont supposés lier électrostatiquement les groupements phosphorylés du substrat. Dans le cas de *CthTTM*, le résidu K87, qui est homologue du K85 de *NeuTTM*, est essentiel pour la catalyse.

Chez *NeuTTM*, le mutant K85A est 10 fois moins actif que l'enzyme sauvage, mais les conditions optimales d'activité sont essentiellement les mêmes (pH 9,7, 50 °C). Le mutant est également moins actif avec l'ATP qu'avec le PPPi comme substrat. Ce mutant est également

beaucoup moins actif avec l'ATP qu'avec le PPPi comme substrat. L'extrapolation du  $V_{\max}$  donne une valeur de  $k_{\text{cat}}$  autour de  $21 \text{ s}^{-1}$  (à  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en présence de  $5 \text{ mM Mg}^{2+}$  (tabl. 4), ce qui correspond à une diminution du  $k_{\text{cat}}$  de 14 fois par rapport à l'enzyme non mutée dans les conditions optimales. Par ailleurs, le  $K_m$  du mutant K85A pour le PPPi est égal à  $720 \text{ }\mu\text{M}$  (à  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), donc au moins 10 fois supérieur au  $K_m$  de l'enzyme sauvage. Il faut cependant remarquer qu'on arrive difficilement à obtenir une concentration saturante en substrat, ce qui engendre une incertitude sur le  $K_m$  et le  $V_{\max}$ . Il apparaît que la mutation K85A diminue significativement l'efficacité catalytique de l'enzyme, mais le  $k_{\text{cat}}$  reste relativement élevé. On ne peut donc pas conclure que K85 est vraiment un résidu essentiel pour la catalyse.

Une autre conséquence de la mutation K85A est que l'effet des cations divalents est fortement altéré. En effet, contrairement à l'enzyme sauvage, le mutant K85A est plus fortement activé par  $\text{Mn}^{2+}$  que par  $\text{Mg}^{2+}$  et l'effet inhibiteur de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  est moins prononcé (tabl. 5). De plus,  $\text{Zn}^{2+}$  peut remplacer le  $\text{Mn}^{2+}$  comme activateur, en étant cependant moins efficace. Il semble dès lors que lorsque la charge positive de la chaîne latérale en position 85 n'est plus présente, la conformation de la protéine permet l'accès à des cations de tailles supérieures au  $\text{Mg}^{2+}$  dans le site activateur. Ceci suggère que K85 agit comme un résidu conférant la spécificité vis-à-vis du cation, assurant que le plus petit et le plus physiologique des cations, c'est-à-dire  $\text{Mg}^{2+}$ , soit le seul à accéder au site activateur de l'enzyme. Ces résultats suggèrent donc que K85 n'est pas impliqué directement dans la catalyse mais plutôt que ce résidu joue un rôle important (bien qu'apparemment non essentiel) dans l'orientation de la molécule de PPPi lors de la formation du complexe enzyme-substrat. Il est également important pour la liaison de l'ion  $\text{Mg}^{2+}$ .

**Tableau 5. Activité PPPasique du mutant His-taggé K85A NeuTTM en présence de différentes concentrations en PPPi et cations divalents. Les incubations sont réalisées à  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 9,7 (n = 3-4).**

[PPPi]	Cation bivalent	Concentration libre	Activité spécifique
<i>mM</i>		<i>mM</i>	<i><math>\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}</math></i>
0.5	$\text{Mg}^{2+}$	2	$4,0 \pm 0.3$
	$\text{Mg}^{2+}$	5	$4,2 \pm 0.3$
	$\text{Mn}^{2+}$	1	$6,0 \pm 2.5$
	$\text{Mn}^{2+}$	4	$18 \pm 4$



	Co <sup>2+</sup>	2	0,8 ± 0.6
	Zn <sup>2+</sup>	1	2,0 ± 0.5
	Zn <sup>2+</sup>	4	10 ± 2
2	Mg <sup>2+</sup>	2	27 ± 6
	Mg <sup>2+</sup>	5	55 ± 4
	Mn <sup>2+</sup>	1	80 ± 9
	Mn <sup>2+</sup>	4	70 ± 6
	Co <sup>2+</sup>	2	18 ± 6
	Zn <sup>2+</sup>	1	22 ± 7
	Zn <sup>2+</sup>	4	27 ± 5

Comme K8 et K85 ne semblent pas être essentiels pour la catalyse, nous avons suspecté que K52, qui est très fortement conservée au sein de la famille CYTH (Iyer et Aravind, 2002 ; Aravind et Koonin, 1998), pouvait jouer un rôle essentiel. De plus, cette lysine est homologue à K65 de la 25-kDa ThTPase de mammifère dont nous avons démontré le rôle essentiel (voir chapitre précédent). Chez *CthTTM*, la mutation de K52 résulte en une perte de 90 à 99% de l'activité, en fonction du substrat et de l'activateur utilisé (Keppetipola *et al.*, 2007). Chez *NeuTTM*, la mutation K52R résulte en la diminution du  $V_{max}$  de deux ordres de grandeur et le  $K_m$  apparent est fortement augmenté (tabl. 4, fig. 43). L'efficacité catalytique de ce mutant est donc plus de 1000 fois inférieure à celle de l'enzyme sauvage. L'ion  $Mn^{2+}$  n'induit pas une activation significative de ce mutant. Il apparaît donc que contrairement au mutant K85A, la spécificité pour l'ion activateur ne change pas. Le fait que la mutation de cette lys-52 hautement conservée diminue fortement l'efficacité catalytique de l'enzyme suggère que ce résidu joue un rôle important dans le mécanisme catalytique.

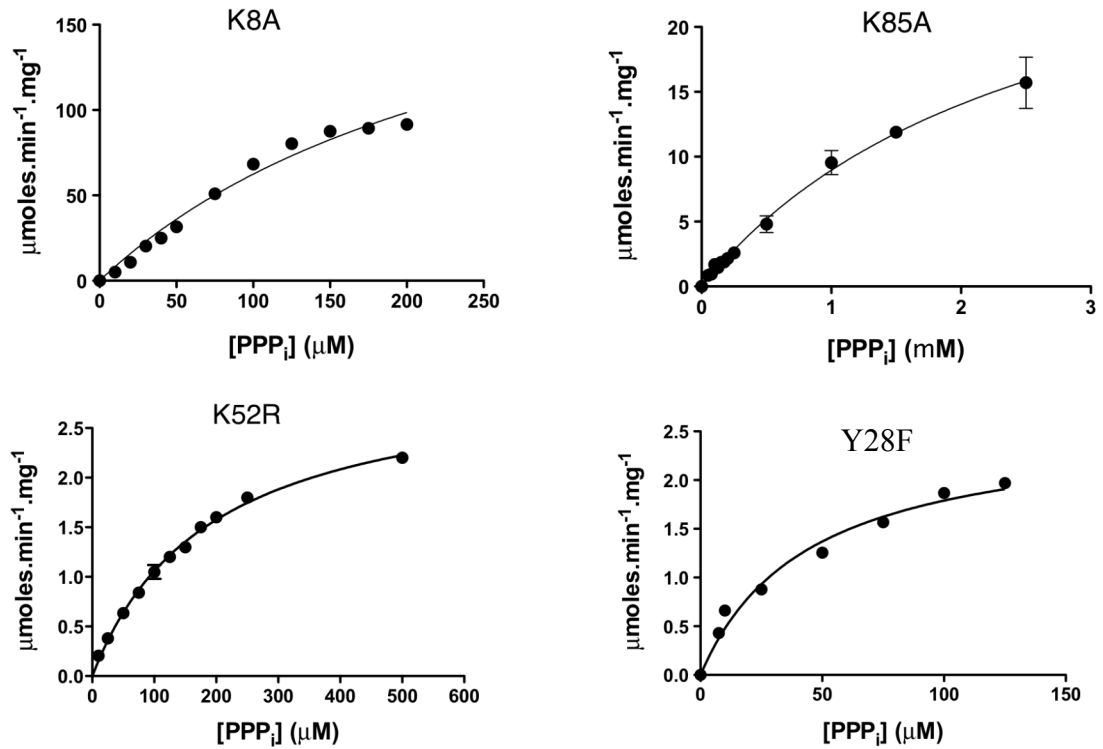
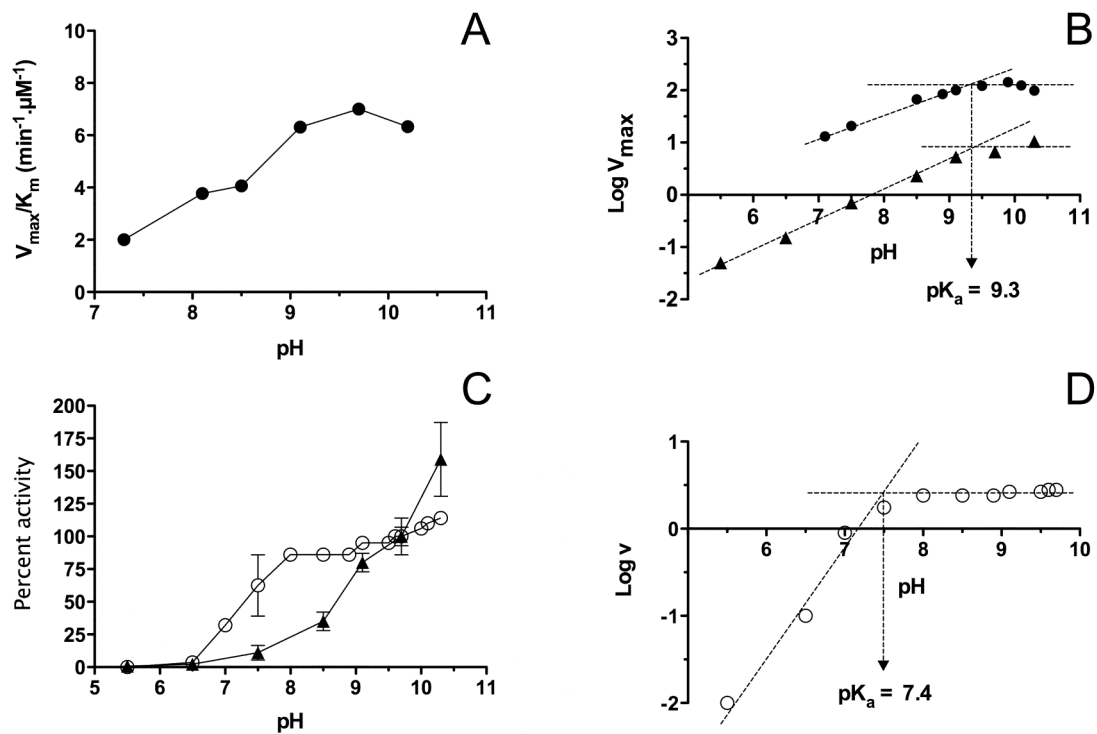


Figure 43. Dépendance de l'activité PPPase vis-à-vis de la concentration en substrat des mutants *NeuTTM*. L'enzyme est incubée en présence de 5 mM  $Mg^{2+}$  à 37 °C. Les courbes ont été obtenues par régression non linéaire de l'équation de Michaelis-Menten ( $n = 3$ ).

Une propriété récurrente de *NeuTTM*, aussi bien que des autres enzymes de la famille CYTH, est leur forte activation à des pH alcalins (fig. 34B). Afin de déterminer si cette diminution d'activité aux valeurs de pH les plus bas n'est pas due à une moins bonne liaison du substrat à l'enzyme, nous avons réalisé le graphique de  $V_{max}/K_m$  en fonction du pH (fig. 44A). Nos résultats ont montré que le  $K_m$  varie très peu en fonction du pH et le profil obtenu est similaire à celui de la figure 34B. Nous avons ensuite utilisé le graphique de Dixon-Webb qui représente  $\text{Log } V_{max}$  en fonction du pH pour estimer la valeur du  $pK_a$  des principaux résidus responsables de la diminution d'activité entre pH 9,7 et 7,0. Le  $pK_a$  de l'enzyme sauvage est estimé à 9,3 (fig. 44B). La même valeur a été trouvée pour le mutant K52R. Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse que l'activité catalytique dépend d'une seule étape de déprotonation dont le  $pK_a$  est proche de 9,3. Cela peut correspondre à une base générale qui forme un  $OH^-$  en enlevant un proton de l'eau. Cet  $OH^-$  peut ensuite attaquer un des phosphores du  $PPP_i$ .

Comme le profil de pH est très peu affecté par la mutation K52R, la diminution d'activité entre 9,7 et 7,0 ne peut être imputée à la protonation du groupe aminé de ce résidu. Ceci suggère l'implication d'un autre résidu capable d'interagir avec K52 et agissant comme base générale au cours de la catalyse. Si l'on se réfère à la structure cristalline (fig. 32B), seuls trois résidus sont susceptibles d'interagir avec K52 : Y28, E37 et E61. Il est cependant très peu probable, voire impossible que le groupement carboxylique d'un résidu glutamate ait un  $pK_a$  aussi alcalin. Y28 représente dès lors le meilleur candidat pour jouer le rôle de base générale (le groupement hydroxyle de la tyrosine a un  $pK_a$  voisin de 10). Il faut également noter que ce résidu est analogue à Y39 de la ThTPase de mammifère dont nous avons démontré le rôle fondamental précédemment (chapitre précédent). Dans le cas de *NeuTTM*, la mutation Y28F provoque une forte diminution de l'activité enzymatique ( $\sim 2,6 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  à  $100 \mu\text{M}$  PPPi, comparé à  $200 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  pour l'enzyme sauvage). Par ailleurs, une propriété étonnante de ce mutant est que malgré un début de saturation à de faibles concentrations en substrat, l'activité augmente de façon continue jusqu'à une concentration en PPPi de 1 mM sans atteindre la saturation. La figure 43 D ne montre pas la situation lorsque les concentrations en PPPi sont plus hautes car elles empêchent d'observer le fléchissement initial et elles s'écartent plus que probablement de la situation physiologique. Cette observation est la même quel que soit le pH entre 7,0 et 9,0. Il est donc difficile d'estimer raisonnablement les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  de ce mutant. Le pH optimum de Y28F est déplacé vers des valeurs plus basses comparé à l'enzyme sauvage et au mutant K52R (fig. 44B et C). Nous avons porté en graphique Log v en fonction du pH pour une concentration de PPPi égale à  $100 \mu\text{M}$  (fig. 44D). Il est clair qu'il y a un déplacement important du profil de pH avec un optimum déplacé vers les valeurs plus basses, et le graphique de Dixon-Webb permet d'estimer une valeur de  $pK_a$  proches de 7,4. Ce  $pK_a$  apparent n'est que très peu affecté par la concentration en PPPi. Cette valeur peut refléter le  $pK_a$  d'un groupement carboxyl d'un des glutamates avoisinant (E37 ou E61), qui peuvent également jouer le rôle de base générale, en étant cependant moins efficace que Y28. Ceci peut expliquer pourquoi le mutant Y28F atteint une activité appréciable lorsque le PPPi est en large excès.

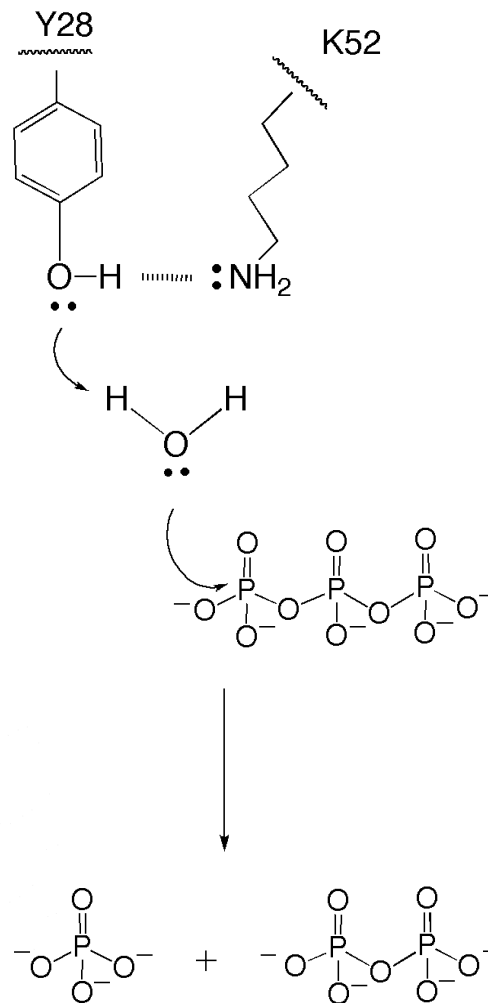
Ces résultats suggèrent que Y28 exerce un rôle important dans la catalyse enzymatique en formant probablement une dyade catalytique avec K52. Nous avons montré d'autre part que Y28 est responsable, du moins en partie, de l'optimum de pH particulièrement alcalin.



**Figure 44. Dépendance au pH de NeuTTM sauvage et des mutants Y28F et K52R.** (A)  $V_{max}/K_m$  en fonction du pH pour l'enzyme sauvage. (B) Dépendance au pH du  $\text{Log } V_{max}$  de NeuTTM sauvage (●) et du mutant K52R (▲). (C) Les activités des mutants Y28F (○) et K52R (▲) sont représentées en % des valeurs respectives obtenues à pH 9,7 (100%), la concentration en PPPi est de 0,1 mM. (D) Dépendance au pH de  $\text{Log } v$  du mutant Y28F en présence de 0,1 mM de PPPi. Dans tous les cas, la réaction se déroule en présence de 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  à 37 °C et les contrôles en absence d'enzyme ont été soustraits (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3-6$ ).

### 3.9 Conclusion

Nos résultats permettent de proposer un mécanisme pour l'hydrolyse du PPPi par NeuTTM. L'hypothèse est que le couple Y28-K52 forme une dyade catalytique où l'azote nucléophile de K52 est lié via un pont hydrogène à l'oxygène du groupement phénolate de Y28. Ce dernier peut jouer le rôle de base générale qui enlève un proton de l'eau. L' $\text{OH}^-$  résultant peut à son tour attaquer un phosphore du PPPi (fig. 45).



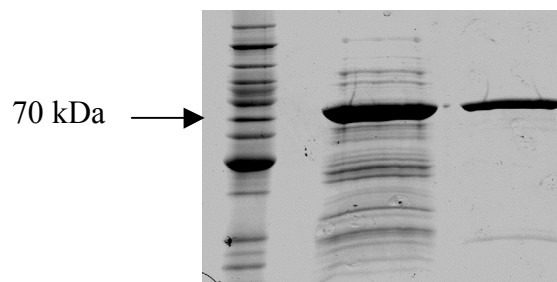
**Figure 45. Mécanisme catalytique proposé pour l'hydrolyse du PPPi par NeuTTM.** Il est probable que la paire K52-Y28 forme la dyade catalytique de NeuTTM. Le mécanisme le plus simple et le plus plausible est une catalyse acide-base sans formation d'un intermédiaire acyl-enzyme covalent.

## 4. Ygif, l'orthologue CYTH de *E. coli*

### 4.1 Clonage, surexpression et purification d'Ygif

La séquence codante d'Ygif a été amplifiée à partir de 1 µg d'ADN génomique par 35 cycles PCR dénaturation (94°C, 20 s), hybridation (64°C, 30 s) et élongation (72°C, 90 s) en utilisant la Pfu polymérase et les amorces sens (5'-TTTGATCCATGGCTCAGGAAATCGAATTAAAG-3') et antisens (5'-TTTGCGGCCGCTTAACGTTTTCCGCTGTGCAACC-3'). Le fragment est ensuite incubé

en présence de Taq polymérase et de dATP pour ajouter une queue polyA. Le fragment PCR de 1,3 kb est ensuite inséré dans le vecteur pGEM-T (Promega) par clonage TA. Les plasmides issus de différentes colonies sont ensuite séquencés afin de déterminer quels sont ceux ayant incorporé l'insert. Ce dernier est ensuite libéré par digestion BamHI, NotI et inséré dans le vecteur pGEX-4T2 (GE Lifescience). La construction finale est utilisée pour transformer des bactéries compétentes BL21DE3 dans lesquelles est induite l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée à la GST, qui est par la suite purifiée sur une colonne à laquelle est fixé du glutathion (fig. 46).



**Figure 46. Purification de la protéine fusion GST-Ygif.** Ligne 1, Marqueur de poids moléculaire. Ligne 2, Surnageant bactérien après surexpression

#### **4.2 Spécificité et propriétés cinétiques d'Ygif recombinante**

Nous avons d'abord étudié la spécificité de la GST-Ygif purifiée. Comme dans le cas de *NeuTTM*, l'enzyme hydrolyse de façon très spécifique le PPPi en présence de  $Mg^{2+}$  (fig. 47).

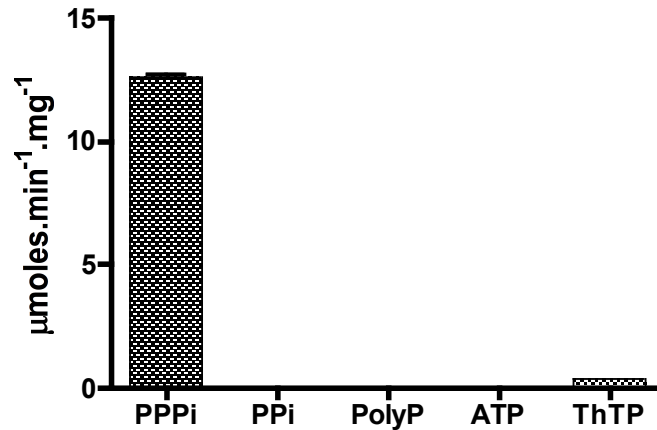


Figure 47. Spécificité pour le substrat de la GST-Ygif. Les conditions d'incubation sont les suivantes : MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Na-TAPS 50 mM pH 8.5, 0,5 mM en substrat à 37 °C (n = 2).

Nous avons ensuite mesuré les constantes cinétiques d'Ygif (fig. 48). Le  $K_m$  et le  $V_{max}$  pour le PPPi sont respectivement de 281  $\mu\text{M}$  et de 27,4  $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  ( $k_{cat} = 33 \text{ s}^{-1}$ ). Bien que ces constantes reflètent une efficacité catalytique moindre ( $k_{cat}/K_m = 12 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}/\text{M}^{-1}$ ) que celle de NeuTTM ( $k_{cat}/K_m = 7,2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}/\text{M}^{-1}$  pour NeuTTM His-tagagée), elle n'en est pas pour le moins appréciable, d'autant plus qu'il faut tenir compte du fait que le tag GST peut interférer avec le bon fonctionnement de l'enzyme (c'est notamment le cas avec la hThTPase, Lakaye *et al.*, 2002).

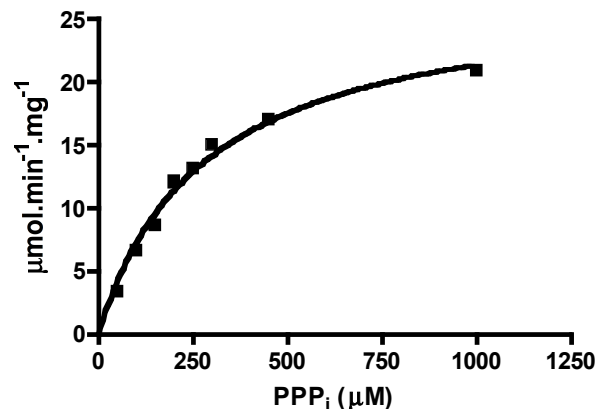
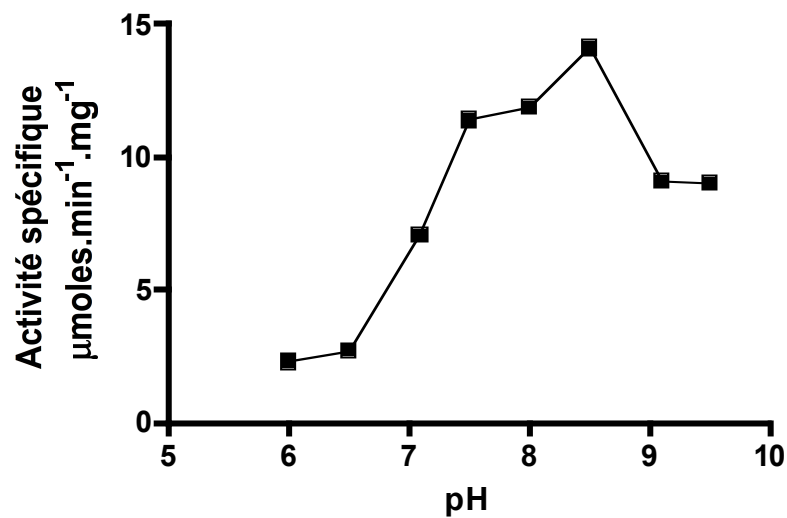


Figure 48. Activité spécifique d'Ygif en fonction de la concentration en PPPi. Conditions d'incubation : MgCl<sub>2</sub> 5mM, Na-TAPS 50 mM pH 8,5, 37 °C (n = 2).

Comme le montre la figure 49, le pH optimum d'Ygif est de 8,5. Par ailleurs, lorsque la séquence d'Ygif est comparée avec celle de la 25-kDa ThTPase et de NeuTTM, on se rend

compte que Y39 est strictement conservé par rapport à la ThTPase et est l'homologue de Y28 chez *NeuTTM*. La séquence d'Ygif contient aussi K69 qui est l'homologue de K65, de la ThTPase et de K52 de *NeuTTM*. On peut donc imaginer que la paire K69-Y39 pourrait former une dyade catalytique tout comme pour les deux autres enzymes. L'absence de structure disponible nous empêche toutefois d'affirmer que ces deux résidus sont positionnés de façon à pouvoir former une dyade.



**Figure 49. Profil de pH d'Ygif.** Conditions d'incubation : 0,5 mM en PPPi, 5 mM MgCl<sub>2</sub> à 37 °C (n = 2).

Une autre propriété commune d'Ygif avec la ThTPase et *NeuTTM* est son activation par l'ion Mg<sup>2+</sup>. L'allure hyperbolique de la courbe (fig. 50) permet d'estimer une constante d'activation K<sub>A</sub> égale à EC<sub>50</sub> ~ 1,3 mM, ce qui est comparable aux valeurs obtenues pour la ThTPase et *NeuTTM*.



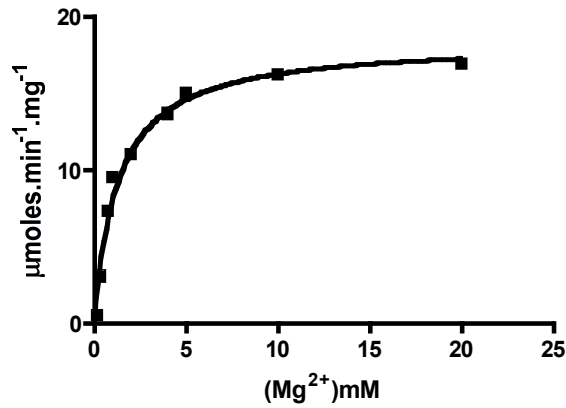


Figure 50. Activité spécifique d'Ygif en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub>. L'incubation est réalisée en présence de 0,5 mM PPPi, Na-TAPS 50 mM pH 8,5 37°C (n =2).

Enfin, nous avons montré que tout comme la ThTPase et NeuTTM, Ygif est fortement inhibée par des concentrations en Ca<sup>2+</sup> < 1 mM (IC<sub>50</sub> ~ 90 μM, fig. 51).

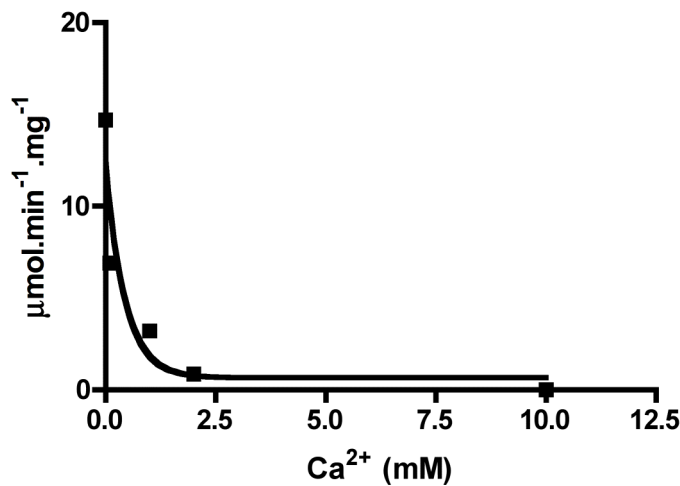


Figure 51. Inhibition d'Ygif par Ca<sup>2+</sup>. Conditions d'incubation : 0,5 mM PPPi, MgCl<sub>2</sub>, 5 mM, Na-TAPS 50 mM pH 8,5 à 37 °C (n = 2).

#### 4.3 Conclusion à propos d'Ygif

Nous avons donc caractérisé une protéine d'*E.coli* qui, jusqu'à nos travaux, n'avait aucune fonction connue. Cette protéine, tout comme son analogue NeuTTM, hydrolyse spécifiquement le PPPi en présence de magnésium. Enfin, nous avons montré qu'Ygif possède des caractéristiques communes avec la ThTPase et NeuTTM.



DISCUSSION GENERALE

/

CONCLUSION



**25-kDa ThTPase, NeuTTM et Ygif : nouvelles perspectives concernant l'activité enzymatique des membres de la famille CYTH et leur mécanisme catalytique.**

La première et la plus importante partie de notre travail concerne une enzyme soluble, cytosolique, hydrolysant spécifiquement le triphosphate de thiamine (ThTP). Elle fut découverte dans des extraits de cerveau de rat par Hashitani et Cooper en 1972, mais elle ne fut purifiée que 20 ans plus tard par Makarchikov et Chernikevich (1992). Son séquençage et sa caractérisation moléculaire ont ensuite été réalisés dans notre laboratoire (Lakayet *et al.*, 2002). La 25-kDa ThTPase est un monomère qui ne possède aucune homologie de séquence avec d'autres protéines de mammifères, mais qui appartient à une vaste superfamille de protéines appelées CYTH, qui comprend des orthologues chez pratiquement tous les organismes où on les a cherchés. Toutefois, c'est seulement chez les mammifères que ces protéines ont une activité ThTPasique spécifique, avec une haute efficacité catalytique.

Une première étude des propriétés catalytiques de la hThTPase a été réalisée dans notre laboratoire (Lakaye *et al.*, 2004) mais, en l'absence de données structurales détaillées, elle n'a pas permis d'identifier les résidus d'acides aminés importants pour la catalyse. La structure cristalline de la hThTPase liée au citrate et au  $\text{SO}_4^{2-}$  et la structure RMN de la mThTPase libre ou en complexe ternaire avec le ThTP et le  $\text{Mg}^{2+}$  n'ont été obtenues que quelques années plus tard. Celles-ci nous ont permis d'avoir une idée plus précise des résidus d'acides aminés susceptibles d'intervenir dans la catalyse. Nous avons dans un premier temps sélectionné par alignement de séquences, les résidus d'acides aminés que l'on retrouve chez la plupart des ThTPases appartenant aux différents organismes chez qui la séquence de cette enzyme a été mise en évidence. Plus récemment, nous avons obtenu, en collaboration avec Frédéric Kerff et Paulette Charlier (CIP, Ulg), un cristal du complexe hThTPase-PPPi sur lequel le docking de la molécule de ThTP a pu être réalisé. Cette structure nous a permis d'affiner encore davantage notre idée du complexe enzyme-susstrat. C'est ainsi qu'il a été démontré que le résidu W53, qui est probablement un résidu crucial dans l'évolution des enzymes de la famille CYTH dans l'acquisition de l'activité ThTPase, forme une interaction hydrophobe avec le cycle thiazole de la partie thiamine du ThTP.

Nos résultats suggèrent aussi que l'hydrolyse du ThTP par la 25-kDa ThTPase dépend de la paire K65-Y39 qui forme la dyade catalytique.

Nous avons également démontré que les glutamates 37 et 147 sont indispensables au bon positionnement des arginines 57, 125 et de la lysine 193, sans qui l'interaction avec la partie triphosphate est beaucoup moins efficace. Les mutations D37A et D147A provoquent en effet une forte diminution de l'efficacité catalytique.

Hormis la 25-kDa ThTPase de mammifère, la famille CYTH compte aussi parmi ses membres des protéines bactériennes. C'est notamment le cas de *NeuTTM*, une protéine de 20-kDa qui appartient à *Nitrosomonas europaea*, une bactérie Gram-négative qui tire son énergie de l'oxydation de l'ammoniaque en nitrite et qui vit dans les sols, les eaux usées et les zones polluées par l'ammoniaque. La structure cristalline de *NeuTTM* avait été publiée quelques années plus tôt et, contrairement à la plupart des protéines CYTH qui ont une structure en tonneau (ou tunnel fermé), celle-ci se présente comme une fente ouverte, avec les résidus catalytiques situés vers l'intérieur, comme c'est le cas pour la mThTPase libre (non liée au substrat) en solution. Nous avons donc soupçonné que *NeuTTM* pouvait être une ThTPase bactérienne, mais nous avons trouvé que *NeuTTM* hydrolyse le PPPi de façon très spécifique et que le mécanisme catalytique dépend, tout comme dans le cas de la 25-kDa ThTPase, d'une dyade catalytique formée par la paire K52-Y28 (qui sont les résidus analogues à K65 et Y39 de la ThTPase). Par ailleurs, *NeuTTM* présente de nombreuses propriétés communes avec la 25-kDa ThTPase. C'est notamment le cas de la dépendance absolue de l'activité vis-à-vis d'un cation divalent activateur dont le plus efficace est le  $Mg^{2+}$ . En présence de ce dernier, le  $Ca^{2+}$  et le  $Mn^{2+}$  inhibent *NeuTTM* de façon compétitive alors que le  $Zn^{2+}$ , qui est également inhibiteur, semble agir plutôt de manière non compétitive. On retrouve les mêmes propriétés chez la 25-kDa ThTPase (Lakaye *et al.*, 2004).

Le génome d'*E. coli* contient aussi la séquence codant pour une CYTH appelée Ygif et répertoriée dans les bases de données comme étant une adénylate cyclase. Nous avons cloné, surexprimé et purifié cette protéine de 40-kDa (dont seule la première partie contient la séquence d'une CYTH) sous forme de protéine fusionnée à la GST. Nous avons démontré que cette enzyme hydrolyse également le PPPi de façon très spécifique en présence de  $Mg^{2+}$ . A nouveau, le calcium est un très bon inhibiteur de cette enzyme. Une autre propriété commune de la 25-kDa ThTPase, de *NeuTTM* et d'Ygif est d'avoir un pH optimum alcalin, ce qui s'explique pour les deux premières citées par la nature des 2 résidus (lysine-tyrosine) qui forment la dyade catalytique ont une chaîne latérale avec un  $pK_a$  alcalin. Chez Ygif, les résidus K69 et Y39 sont les homologues des résidus formant la dyade catalytique de la

ThTPase et *NeuTTM* et peuvent donc potentiellement jouer le même rôle. Nous ne disposons cependant pas des données cristallographiques ou cinétiques permettant de confirmer cette hypothèse.

Récemment la structure de l'adénylate cyclase de type IV de *Yersinia pestis* avec un analogue de l'ATP possédant un groupement méthylène à la place de l'oxygène entre les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  ( $\alpha$ ,  $\beta$ -méthylène adénosine-5'-triphosphate ou AMP-C-P-P) a été obtenue (Gallagher et al., 2011). Cette enzyme catalyse la formation d'AMP cyclique en présence de  $Mn^{2+}$ . Il s'agit, avec la structure du complexe hThTPase-PPPi que nous avons obtenue, des deux seules structures cristallines de protéines CYTH obtenues avec un substrat phosphorylé dans le site actif. En comparant ces structures, on se rend compte que dans la cavité de l'adénylate cyclase, l'AMP-C-P-P est orienté de façon inverse au ThTP dans le site actif de la solution de docking que nous avons obtenue. A titre d'illustration, la figure 52 montre un modèle théorique de la position de l'ATP dans la solution de docking hThTPase-ThTP à la manière dont il se place dans la cavité de l'adénylate cyclase. Le groupement adénine se situe à l'opposé du cycle thiamine. Ce résultat n'est cependant pas surprenant car les résidus catalytiques des deux enzymes n'attaquent pas la même liaison. En effet, alors que l'adénylate cyclase attaque la liaison entre les phosphates  $\alpha$ - $\beta$ , la 25-kDa ThTPase attaque la liaison  $\beta$ - $\gamma$  et, si on considère la position absolue de ces liaisons, on remarque qu'elles ne diffèrent que très peu l'une de l'autre.

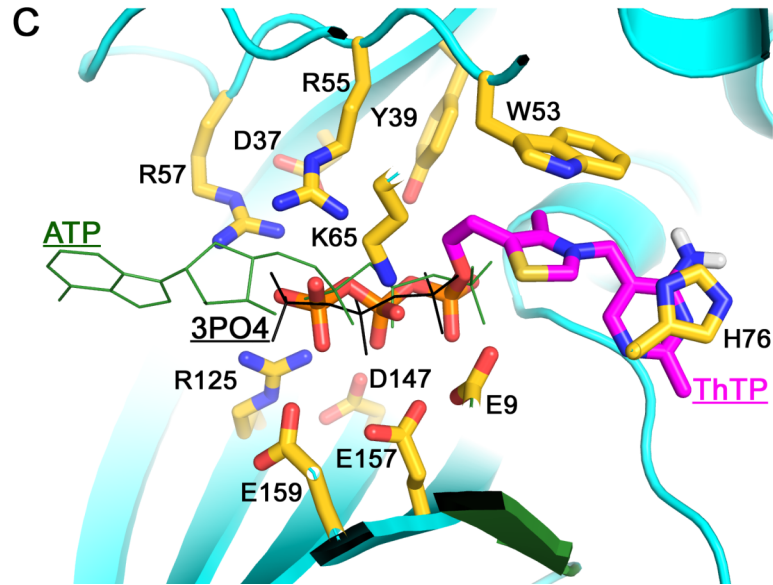


Figure 52. Comparaison de la position absolue de l'ATP par rapport au ThTP dans le site catalytique de la hThTPase.

La structure du complexe formé par l'adénylate cyclase de *Yersinia pestis* (ypAC-IV) avec l'AMP-C-P-P (un analogue non hydrolysable de l'ATP) et le  $Mn^{2+}$  permet d'observer la position des résidus conservés dans le site actif de cette enzyme (fig. 53). On remarque que K76 et Y45 (qui sont les homologues de K65 et Y39 de la 25-kDa ThTPase, fig 54) sont placés idéalement pour catalyser l'attaque entre les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans le cas présent, ces deux résidus semblent cependant trop éloignés pour interagir ensemble, ce qui peut être expliqué par le fait que la structure a été obtenue en présence de  $Mn^{2+}$ . Ce cation divalent induit, dans le cas de *NeuTTM* et de la 25-kDa ThTPase, une conformation différente que celle en présence de  $Mg^{2+}$ . Le  $Mn^{2+}$  est d'une part un moins bon activateur de ces deux enzymes et d'autre part, en sa présence, *NeuTTM* et ThTPase sont moins spécifiques qu'en présence de  $Mg^{2+}$ . L'alignement de la séquence de ypACIV avec celles d'autres CYTH (dont celle de la hThTPase, fig. 54) permet d'identifier les résidus conservés de l'adénylate cyclase. La structure du complexe ternaire entre ypACIV, l'AMP-C-P-P et  $Mn^{2+}$  montre la position de ces résidus par rapport au substrat. E12 et E136, qui sont respectivement les homologues de E9 et E157 de la ThTPase, permettent la coordination du cation divalent activateur. L'absence chez ypACIV de l'homologue à E159 et la position de E10 (homologue à E7) qui n'interagit pas avec le cation divalent peuvent expliquer le changement de spécificité pour l'ion activateur par rapport à la ThTPase et *NeuTTM* (pour qui le meilleur activateur est  $Mg^{2+}$ ). On



remarque aussi que R63 et R113, les homologues de R57 et R125, interagissent avec les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$ .

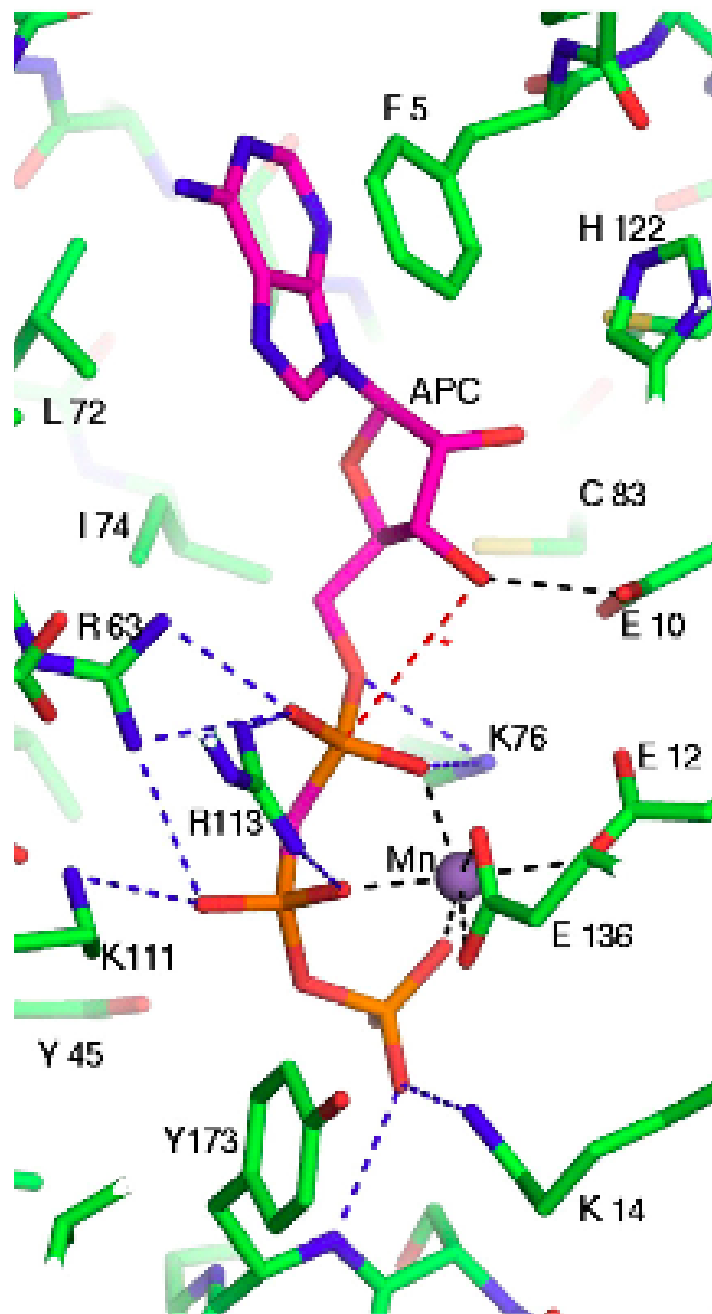


Figure 53. Structure du site actif ypAC-IV en complexe avec l'AMP-C-P-P et le Mn<sup>2+</sup>.

Il est intéressant de constater qu'alors que ypAC-IV catalyse une réaction différente de la 25-kDa ThTPase et que le substrat n'est pas orienté de la même façon dans le site actif, une partie des résidus sont essentiels pour les deux enzymes. On peut donc imaginer que, malgré

les activités différentes, le mécanisme catalytique des enzymes de la famille CYTH est conservé.

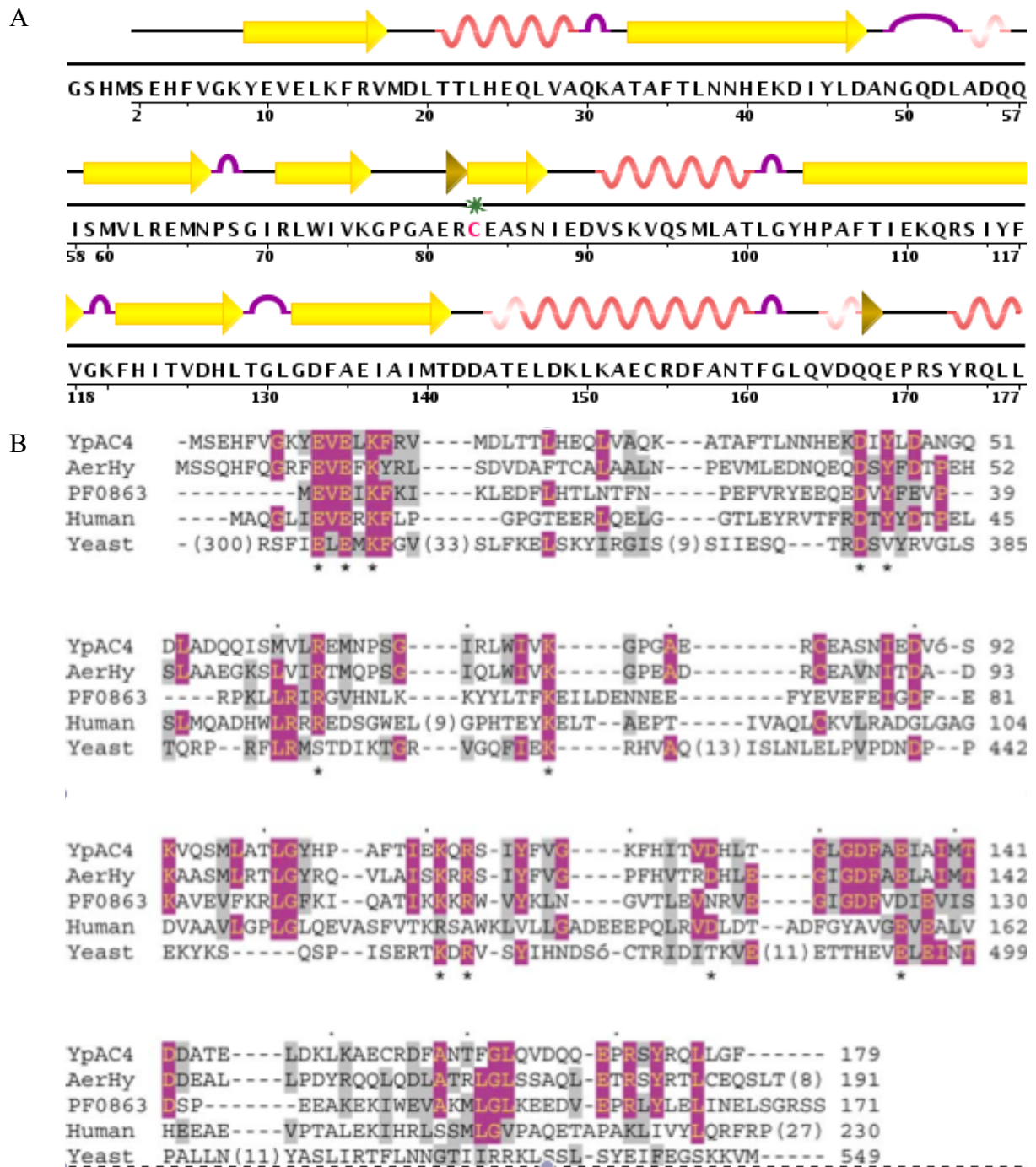


Figure 54. Séquence de *ypAC-IV*. (A) Relation entre la structure primaire et la structure secondaire. (B) Alignement de la séquence d'*ypACIV* avec les séquences d'autres CYTH dont celle de la hThTPase.

### **Rôle hypothétique de la 25-kDa ThTPase de mammifère**

L'activité ThTPasique semble intimement liée au degré de différenciation cellulaire, que ce soit en culture ou dans les tissus de mammifères. Nos travaux ont permis de mettre en évidence que dans les cellules HEK la 25-kDa ThTPase se localise préférentiellement dans le noyau. Ces cellules, bien qu'elles soient dérivées de tissu rénal humain, ont un pattern d'expression protéique qui s'apparente plutôt à des neurones immatures. Dans les cellules de cerveau, l'activité ThTPasique est majoritairement cytosolique et est plus importante dans les neurones que dans les astrocytes, chez qui la protéine se localise davantage dans le noyau. On peut donc imaginer que lorsqu'un précurseur neuronal se différencie, l'augmentation de l'activité ThTPasique soit due à la translocation de la 25-kDa ThTPase du noyau vers le cytoplasme. Il existe des exemples connus de translocation de protéines durant la différenciation. C'est le cas, par exemple, de la prohibitine qui est une protéine impliquée dans la croissance cellulaire, la différenciation, le vieillissement et l'apoptose. Elle est surexprimée dans de nombreux types de cellules cancéreuses (Shi *et al.*, 2009). Par ailleurs, le facteur Id2, qui est un inhibiteur des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice et de la protéine suppresseur de la tumeur du rétinoblastome, est sujette elle aussi à translocation du noyau vers le cytoplasme (où elle est séquestrée par la protéine ENH) durant la différenciation cellulaire (Lasorella et Iavarone, 2006). Id2 actif empêche la différenciation et stimule le cycle cellulaire et la tumorigenèse dans le système nerveux. Dans le cas présent, la translocation de la protéine dans le cytoplasme l'empêche d'exercer son rôle de régulateur transcriptionnel, ainsi que son rôle de stimulateur du cycle cellulaire, ce qui induit la différenciation cellulaire. Il est donc possible que la 25-kDa ThTPase soit, tout comme ses deux protéines, impliquée dans la régulation du cycle et de la différenciation cellulaire, ce qui expliquerait pourquoi elle subit une translocation du noyau vers le cytoplasme durant la différenciation.

Comme nous l'avons montré, il semble que la 25-kDa ThTPase puisse interagir avec la fructose 1,6-bisphosphate aldolase C qui est exprimée presque exclusivement dans les cellules de Purkinje du cervelet. Cette partie du cerveau est fortement stimulée par la sensation de faim. Outre son rôle dans la catalyse de la réaction réversible de l'hydrolyse du fructose 1,6-bisphosphate, il semble que l'aldolase C interagisse avec la phospholipase D. Cette dernière pourrait être impliquée dans la régulation des sensations de faim et de satiété via la voie mTOR. Il semble dès lors possible que le couple ThTPase/ThTP soit impliqué dans la réponse

cellulaire lors de la privation de nourriture. Dans certaines conditions de stress, la voie mTOR pourrait, via la phospholipase D et l'aldolase C, inhiber la ThTPase, ce qui permettrait l'accumulation de ThTP. Il est possible que celui-ci induise une réponse cellulaire via l'activation d'une voie de signalisation ou qu'il agisse directement sur l'activité d'une ou plusieurs enzyme(s) impliquée(s) dans le métabolisme.

Il est de bon ton de parler ici au conditionnel car bien que nos résultats aient ouvert la voie à certaines investigations, quantités de travaux sont encore nécessaires avant d'arriver à une conclusion formelle quant au rôle de la 25-kDa ThTPase et de son substrat, le ThTP.

### **Rôle et signification physiologique possible des tripolyphosphatases inorganiques spécifiques et du PPPi**

Nous avons démontré que la protéine *NeuTTM* présente dans *N. europaea* est une phosphohydrolase qui possède une très haute spécificité, affinité et efficacité catalytique pour le PPPi. Cette étude représente également la première caractérisation d'une tripolyphosphatase spécifique. D'autres enzymes capables d'hydrolyser le PPPi ont été caractérisées précédemment mais dans la plupart des cas, il s'agit d'exopolyphosphatases qui, en plus du PPPi, hydrolysent d'autres substrats comme les polyphosphates à longue chaîne ou le GP<sub>4</sub> (Wurst et Kornberg, 1994 ; Fang *et al.*, 2004 ; Tammenkoski *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, seule une enzyme a été décrite comme étant strictement spécifique pour le PPPi : c'est un dimère de 40-kDa qui a été purifié à partir de *N. crassa*, mais dont la séquence n'est pas connue. *NeuTTM* appartient à la superfamille de protéines CYTH et était renseignée comme une protéine possédant une activité hypothétique de phosphatase ou d'adénylate cyclase par analogie avec la protéine *CyaB* de *A. hydrophila* (Sismeiro *et al.*, 1998). Cependant, il semble maintenant clair qu'il est impossible de prédire les propriétés fonctionnelles, des enzymes de la famille CYTH, à partir de leur structure primaire ou même de leur structure tertiaire. Il s'avère que le domaine CYTH est fonctionnellement polyvalent et est caractérisé par sa faculté de lier les composés triphosphorylés et de catalyser l'hydrolyse ou d'autres transformations en présence d'un cation activateur.

La haute activité hydrolytique, affinité et spécificité de *NeuTTM* (et dans une moindre mesure d'Ygif) pour le PPPi amènent la question de savoir quel est le rôle biologique de cette enzyme et de son substrat. A propos du PPPi, la littérature est très peu documentée à l'heure

actuelle. Chez *E. coli*, il a été démontré que le PPPi peut être produit par clivage enzymatique de la désoxyguanosine triphosphate (Kornberg *et al.*, 1958). Le PPPi est aussi un intermédiaire enzymatique dans la réaction de formation de ptérides, un pigment de l'œil de la drosophile (Switchenko, 1984). Il est aussi un intermédiaire de la réaction de synthèse enzymatique de la S-adénylméthionine mais dans ce cas, il n'est pas libéré dans le cytosol.

Par ailleurs, comme le ThTP (Nghiem *et al.*, 2000), le PPPi est un donneur alternatif de phosphate pour la phosphorylation de protéines *in vitro* (Tsutsui, 1986). Il est donc possible que le PPPi agisse comme un signal intracellulaire.

Contrairement aux polyphosphates inorganiques à longue chaîne (>10 groupements phosphoryl), l'existence du PPPi et des autres polyphosphates à chaîne courte n'a jamais été démontrée dans aucuns organismes (exceptés dans les acidocalcisomes qui sont des organelles de certains protozoaires riches en polyphosphate, Moreno *et al.*, 2000). Le problème est qu'à l'heure actuelle, aucune méthode de détection pour le PPPi n'est suffisamment sensible pour le détecter. Les polyphosphates à longue chaîne sont plus facilement détectables et il a été démontré que chez *E. coli*, ils s'accumulent en réponse à différents stress cellulaires. Ils peuvent aussi jouer le rôle de réserve d'énergie ou de chélateur de cations divalents. La démonstration d'un tel rôle pour le PPPi ne pourra être réalisée que lorsqu'une méthode de détection assez sensible aura été développée.



# PERSPECTIVES





Nous ne sommes qu'au début de la compréhension du rôle de la 25-kDa ThTPase et du ThTP. Bien que les possibilités quant aux futures recherches sur ce sujet soient nombreuses, diverses, variées et plus intéressantes les unes que les autres, certaines questions me semblent prioritaires à creuser.

Dans un premier temps, il est évident que la confirmation de l'interaction entre la 25-kDa ThTPase et l'aldolase C par co-immunoprécipitation est indispensable.

Une expérience assez simple pourrait confirmer l'implication éventuelle du ThTP et de la ThTPase dans la réponse à l'absence de certains nutriments durant des temps plus ou moins prolongés. Pour se faire, il suffit de comparer les niveaux de ThTP dans le cervelet de différents groupes de souris, durant le jeun complet ou en enlevant spécifiquement un seul type de nutriment (acides aminés, acides gras, glucoses), par rapport à un groupe contrôle.

L'obtention d'une souris KO conditionnelle pour la 25-kDa ThTPase pourrait apporter bon nombre de réponses quant aux rôles de la ThTPase et du ThTP dans les tissus différenciés. Il serait intéressant de cibler uniquement les neurones matures et d'observer l'effet d'une augmentation du ThTP dans différentes conditions. Une autre possibilité serait de cibler uniquement les neurones du cervelet exprimant l'aldolase C et de voir l'effet d'une privation de nourriture sur la survie de ces neurones en mettant en évidence le nombre de cellules apoptotiques et nécrotiques chez des souris WT et KO.

Plutôt que d'utiliser un KO complet du gène de la ThTPase, il serait aussi intéressant de ne muter qu'un résidu essentiel à l'activité de l'enzyme comme K65 par exemple. Ceci permettrait de voir si l'hydrolyse du ThTP par la 25-kDa ThTPase est indispensable à la cellule ou si cette activité ne représente pas le rôle principal de cette enzyme.

Enfin, beaucoup de choses restent à découvrir sur le rôle de *NeuTTM*, d'*Ygif* et sur le rôle de leur substrat. En effet, on ne connaît à l'heure actuelle aucun rôle potentiel du PPPi et des PPPases que sont *NeuTTM* et *Ygif*. Nous avons entrepris une collaboration avec Anne-Catherine Servais et Marianne Filet (Chimie Médicale, Ulg) pour essayer de déterminer le contenu en PPPi des bactéries par électrophorèse capillaire. Une fois mise au point, cette méthode constituera une avancée majeure dans la compréhension des conditions dans lesquelles cette molécule s'accumule.



# BIBLIOGRAPHIE



- Aravind L., & Koonin E.V. (1998) A novel family of predicted phosphoesterases includes *Drosophila* prune protein and bacterial RecJ exonuclease. *Trends in biochemical sciences* **23**, 17-19.
- Barchi R.L., & Braun P.E. (1972) A membrane-associated thiamine triphosphatase from rat brain. Properties of the enzyme. *J Biol Chem.* **23**, 7668-7673.
- Bettendorff L. (1995) Thiamine homeostasis in neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* **26**, 295-302
- Bettendorff L., Michel-Cahay C., Grandfils C., De Rycker C., Schoffeniels E. (1987) Thiamine Triphosphate and Membrane-Associated Phosphatases in Electric Organ of *Electrophorus electricus*. *J. of Neurochemistry.* **49**, 495-502.
- Bettendorff L., Schoffeniels E., Naquet R., Silva-Barrat C., Riche D., Ménini C. (1989) Phosphorylated thiamine derivatives and cortical activity in the baboon *Papio papio*: effect of intermittent light stimulation. *J Neurochem.* **53**, 80-87.
- Bettendorff L., Peeters M., Jouan C., Wins P., Schoffeniels E. (1991) Determination of thiamin and its phosphate esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic method. *Anal Biochem.* **198**, 52-59.
- Bettendorff L., Peeters M., Wins P., Schoffeniels E. (1993a) Metabolism of thiamine triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. *J Neurochem.* **60**, 423-434.
- Bettendorff L., Mastrogiacomo F., Wins P., Kish S.J., Grisar T., Ball M.J. (1997) Low thiamine diphosphate levels in brains of patients with frontal lobe degeneration of the non-Alzheimer's type. *J Neurochem.* **69**, 2005-2010.
- Bettendorff L., Wirtzfeld B., Makarchikov A.F., Mazzucchelli G., Frédérick M., Gigliobianco T., Gangolf M., De Pauw E., Angenot L., Wins P. (2007) Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nat Chem Biol.* **3**, 211-212.
- Bisailon M., & Shuman S. Structure-function analysis of the active site tunnel of yeast RNA triphosphatase. (2001) *J Biol Chem* **276**, 17261-17266.
- Bisailon M., & Bougie I. (2003) Investigating the role of metal ions in the catalytic mechanism of the yeast RNA triphosphatase. *J Biol Chem.* **278**, 33963-33971.
- Bruce W.R., Furrer R., Shangari N., O'Brien P.J., Medline A., Wang Y. (2003) Marginal dietary thiamin deficiency induces the formation of colonic aberrant crypt foci (ACF) in rats. *Cancer Lett.* **202**, 125-129.
- Breslow R. (1962) The mechanism of the thiamine action : predictions from model experiments. *Ann N Y Acad Sci.* **98**, 445-452.
- Bunik V.I., Schloss J.V., Pinto J.T., Gibson G.E., Cooper A.J. (2007) Enzyme-catalyzed side reactions with molecular oxygen may contribute to cell signaling and neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.* **32**, 871-891.
- Burstein Y., Walsh K.A., Neurath H. (1974) Evidence of an essential histidine residue in thermolysin. *Biochemistry* **13**, 205-210.
- Butterworth R.F., Gaudreau C., Vincelette J., Bourgault A.M., Lamothe F., Nutini A.M. (1991) Thiamine deficiency and wernicke's encephalopathy in AIDS. *Metab Brain Dis* **6** : 207-212
- Cooper J.R., & Pincus J.H. (1979) The role of thiamine in nervous tissue. *Neurochem Res.* **4**, 223-39.
- Czerniecki J., Chanas G., Verlaet M., Bettendorff L., Makarchikov A.F., Leprince P., Wins P., Grisar T., Lakaye B. (2004) Neuronal localization of the 25-kDa specific thiamine triphosphatase in rodent brain. *Neuroscience* **125** : 833-840.

- Delbrassine F. (2008) Etude du mécanisme catalytique de la thiamine triphosphatase par mutagenèse dirigée. Travail de fin d'étude.
- Delvaux D., Murty M.R., Gabelica V., Lakaye B., Lunin V.V., Skarina T., Onopriyenko O., Kohn G., Wins P., De Pauw E., Bettendorff L. (2011) A specific inorganic triphosphatase from *Nitrosomonas europaea* : structure and catalytic mechanism. *J Biol Chem.* **286**, 34023-34035.
- Eder L., & Dunant Y. (1980) Thiamine and cholinergic transmission in the electric organ of Torpedo. I. Cellular localization and functional changes of thiamine and thiamine phosphate esters. *J Neurochem.* **35**, 1278-1286.
- Egi Y., Koyama S., Shikata H., Yamada K., Kawasaki T. (1986) Content of thiamin phosphate esters in mammalian tissues--an extremely high concentration of thiamin triphosphate in pig skeletal muscle. *Biochem Int.* **12**, 385-390.
- Egorov S. N., & Kulaev, I.S. (1976) Isolation and properties of tripolyphosphatase from *Neurospora crassa* *Biokhimiya* **41**, 1958-1967.
- Emsley P., & Cowtan K. (2004) Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**, 2126-2132.
- Fang J., Ruiz F.A., Docampo M., Luo S., Rodrigues J.C., Motta L. S., Rohloff P., Docampo R. (2007) Overexpression of a Zn<sup>2+</sup>-sensitive soluble exopolyphosphatase from *Trypanosoma cruzi* depletes polyphosphate and affects osmoregulation. *J. Biol. Chem.* **282**, 32501-32510.
- Ferguson R.K., Soryal I.N., Pentland B. (1997) Thiamine deficiency in head injury: a missed insult? *Alcohol Alcohol.* **32**, 493-500.
- Frédérich M., Delvaux D., Gigliobianco T., Gangolf M., Dive G., Mazzucheli G., Elias B., De Pauw E., Angenot L., Wins P., Bettendorff L. (2009) Thiaminylated adenine nucleotides. Chemical synthesis, structural characterization and natural occurrence. *FEBS J.* **276**, 3256-3268.
- Funk C. (1911) On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. *J Physiol.* **43**, 395-400.
- Gallagher D.T., Smith N.N., Kim S.K., Heroux A., Robinson H., Reddy, P.T. (2006) Structure of the class IV adenylyl cyclase reveals a novel fold. *J. Mol. Biol.* **362**, 114-122.
- Gallagher D.T., Kim S.K., Robinson H., and Reddy P.T. (2011) Active-site structure of class IV adenylyl cyclase and transphyletic mechanism. *J Mol Biol* **405**, 787-803
- Gangolf M., Wins P., Thiry M., El Moulaj B., Bettendorff L. (2010) Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is Coupled to the respiratory chain. *J Biol Chem.* **285**, 583-594.
- Gavrilescu N., & Peters A. (1931) Biochemical lesions in vitamin B deficiency. *Biochem J.* **25**, 1397-1400.
- Gibson G.E., Kingsbury A.E., Xu H., Lindsay J.G., Daniel S., Foster O.J., Lees A.J., Blass J.P. (2003) Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease. *Neurochem Int.* **43**, 129-135.
- Gigliobianco T., Lakaye B., Makarchikov A.F., Wins P., Bettendorff L. (2008) Adenylate kinase-independent thiamine triphosphate accumulation under severe energy stress in *E. coli*. *BMC Microbiol.* **8**, 16.
- Gong C., Martins A., Shuman, S. (2003) Structure-function analysis of *Trypanosoma brucei* RNA triphosphatase and evidence for a two-metal mechanism. *J Biol Chem* **278**, 50843-50852.
- Gong C., Smith P., Shuman S. (2006) Structure-function analysis of *Plasmodium* RNA triphosphatase and description of a triphosphate tunnel metalloenzyme superfamily that includes Cet1-like RNA triphosphatases and CYTH proteins. *RNA* **12**, 1468-1474.

- Hashitani Y., & Cooper J. R. (1972) The partial purification of thiamine triphosphatase from rat brain. *J Biol Chem.* **247**, 2117-2119.
- Ho, C. K., Pei, Y., and Shuman, S. (1998) Yeast and viral RNA 5' triphosphatases comprise a new nucleoside triphosphatase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 34151-34156.
- Hung S.C., Hung S.H., Tarng D.C., Yang W.C., Chen T.W., Huang T.P. (2001) Thiamine deficiency and unexplained encephalopathy in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* **38**, 941-947.
- Itokawa Y. (1995) Thiamine and nervous system : an historical sketch. *Metab Brain Dis.* **11**, 1-7.
- Itokawa Y., & Cooper J.R. (1969) Thiamine release from nerve membranes by tetrodotoxin. *Science.* **166**, 759-761.
- Iyer L. M., & Aravind, L. (2002) The catalytic domains of thiamine triphosphatase and CyaB-like adenylyl cyclase define a novel superfamily of domains that bind organic phosphates. *BMC Genomics* **3**, 33.
- Jain R., & Shuman S. (2008) Polyphosphatase activity of CthTTM, a bacterial triphosphate tunnel metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* **283**, 31047-31057.
- Jansen B.C.P., & Donath W.F. (1926) On the isolation of antiberiberi vitamin. *Proc Kon Ned Akad Wet.* **29**, 1390.
- Kim J.H., Lee S., Kim J.H., Lee T.G., Hirata M., Suh P.G., Ryu S.H. (2002) Phospholipase D2 directly interacts with aldolase via PH domain. *Biochemistry* **41**, 3414-3421.
- Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from date crystals initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst.* **26**, 795-800.
- Keppetipola N., Jain R., Shuman S. (2007) Novel Triphosphate Phosphohydrolase Activity of *Clostridium thermocellum* TTM, a Member of the Triphosphate Tunnel Metalloenzyme Superfamily. *J Biol Chem.* **282**, 11941-11949.
- Kinnersley H.W., & Peters R.A. (1929) Observations upon carbohydrate metabolism in birds : The relation between the lactic acid content of the brain and the symptoms of opisthotonus in rice-fed pigeons. *Biochem J.* **23**, 1126-1136.
- Koike M., et Koike K., (1976) Structure, assembly and function of mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *Adv. Biophys.* **9**, 182-227.
- Kornberg, S. R., Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., and Kornberg, A. (1958) Enzymatic cleavage of deoxyguanosine triphosphate to deoxyguanosine and tripolyphosphate. *J. Biol. Chem.* **233**, 159-162.
- Labay V., Raz T., Baron D., Mandel H., Williams H., Barrett T., Szargel R., McDonald L., Shalata A., Nosaka K., Gregory S., Cohen N. (1999) Mutations in SLC19A2 cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia associated with diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet.* **22**, 300-304.
- Laforenza U., Mazzarello P., Patrini C., Poloni M., Casadei G.P., Rindi G. (1990) Different distribution of thiaminpyrophosphatase activity in neuronal and glial cell enriched fractions from human and rat brain: an isoelectric focusing investigation. *Basic Appl Histochem.* **34**, 111-117
- Lakaye B., Makarchikov A.F., Antunes A.F., Zorzi W., Coumans B., De Pauw E., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. (2002) Molecular characterization of a specific thiamine triphosphatase widely expressed in mammalian tissues. *J Biol Chem.* **277**, 13771-13777.
- Lakaye B., Wirtzfeld B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. (2004) Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *J Biol Chem.* **279**, 17142-17147.

- Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S., Candia, O.A., (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem.* **100**, 95-97.
- Lasorella A., & Iavarone A. (2006) The protein ENH is a cytoplasmic sequestration factor for Id2 in normal and tumor cells from the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 4976-4981.
- Lindhurst M.J., Fiermonte G., Song S., Struys E., De Leonardis F., Schwartzberg P.L., Chen A., Castegna A., Verhoeven N., Mathews C.K., Palmieri F., Biesecker L.G. (2006) Knockout of Slc25a19 causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 15927-15932.
- Liu J.Y., Timm D.E., Hurley T.D. (2006) Pyriithiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *J Biol Chem.* **281**, 6601-6607.
- Lohmann K., & Schuster P. (1937) Co-carboxylase is a pyrophosphoric ester of vitamin B1. *Naturwissenschaften.* **25**, 26.
- Lunin V.V., Skarina T., Onopriyenko O., Binkowski T.A., Joachimiak A., Edwards A.M., Savchenko A. (2005) *Protein Data Bank 2FBL.*
- Makarchikov A.F., & Chernikevich I.P. (1992) Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain *Biochim Biophys Acta.* **1117**, 326-332.
- Makarchikov A.F., Wins P., Janssen E., Wieringa B., Grisar T., Bettendorff L. (2002a) Adenylate kinase 1 knockout mice have normal thiamine triphosphate levels. *Biochim Biophys Acta.* **1592**, 117-121.
- Makarchikov A.F., Luchko T.A., Bettendorff L., Lakaye B., Wins P. (2002b) Study of role of ionogenic amino-acid residues in catalytic activity of thiamine triphosphatase from bovine kidney by means of chemical modifications. *News of Biomedical Science* **3**, 66-70.
- Makarchikov A.F., Lakaye B., Gulyai I.E., Czerniecki J., Coumans B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. (2003) Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. *Cell Mol Life Sci.* **60**, 1477-1488.
- Makarchikov A.F., Brans A., Bettendorff L. (2007) Thiamine diphosphate adenylyl transferase from *E. coli*: functional characterization of the enzyme synthesizing adenosine thiamine triphosphate. *BMC Biochem.* **8**, 17.
- Mastrogiacomo F., Bergeron C., Kish S.J. (1993) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **6**, 2007-2014.
- Mastrogiacomo F., Bettendorff L., Grisar T., Kish S.J. (1996) Brain thiamine, its phosphate esters, and its metabolizing enzymes in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **39**, 585-591.
- Moreno B., Urbina, J. A., Oldfield E., Bailey B.N., Rodrigues C.O., Docampo R. (2000) <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. Evidence for high levels of condensed inorganic phosphates. *J. Biol. Chem.* **275**, 28356-28362.
- Miles E.W. (1977) Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* **47**, 431-442.
- Miyoshi K., Egi Y., Shioda T., Kawasaki T. (1990) Evidence for in vivo synthesis of thiamin triphosphate by cytosolic adenylate kinase in chicken skeletal muscle. *J Biochem (Tokyo).* **108**, 267-270.
- Murshudov G. N., Vagin A. A., Dodson E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **53**, 240-255.
- Nghiêm H.O., Bettendorff L., Changeux J.P. (2000) Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *FASEB J.* **14**, 543-554.



- Nishino K., Itokawa Y., Nishino N., Piros K., Cooper J.R. (1983) Enzyme system involved in the synthesis of thiamin triphosphate. I. Purification and characterization of protein-bound thiamin diphosphate: ATP phosphoryltransferase. *J Biol Chem.* **258**, 11871-11871.
- Nosaka K., Kaneko Y., Nishimura H., Iwashima A. (1993) Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, THI80, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **268**, 17440-17447.
- Nosaka K., Onozuka M., Nishino H., Nishimura H., Kawasaki Y., Ueyama H. (1999) Molecular cloning and expression of a mouse thiamin pyrophosphokinase cDNA. *J Biol Chem.* **274**, 34129-34133.
- Perez Mato I., Sanchez del Pino M.M., Chamberlin M. E., Mudd S. H., Mato J. M., Corrales F. J. (2001) Biochemical basis for the dominant inheritance of hypermethioninemia associated with the R264H mutation of the MAT1A gene. A monomeric methionine adenosyltransferase with tripolyphosphatase activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 13803-13809.
- Riordan J.F., Wacker W.E., Vallee B.L. (1965). "Buried" tyrosyl residues and the activity of trypsin. *Nature* **208**, 1209-1211.
- Said H.M., Balamurugan K., Subramanian V.S., Marchant J.S. (2004) Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. *Am. J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **286** : 491-498.
- Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenovirus and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J.* **16**, 869-871.
- Shi S.L., Li Q.F., Liu Q.R., Xu D.H., Tang J., Liang Y., Zhao Z.L., Yang L.M. (2009) Nuclear matrix protein, prohibitin, was down-regulated and translocated from nucleus to cytoplasm during the differentiation of osteosarcoma MG-63 cells induced by ginsenoside Rg1, cinnamic acid, and tanshinone IIA (RCT). *J Cel Biochem.* **108**, 926-934.
- Shikata H., Egi Y., Koyama S., Yamada K., Kawasaki T. (1989) Properties of the thiamin triphosphate-synthesizing activity catalyzed by adenylate kinase (isoenzyme 1). *Biochem Int.* **18**, 943-949.
- Shoun H., & Beppu T.A. (1982) Histidine residue in p-hydroxybenzoate hydroxylase essential for binding of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem* **257**, 3422-3428.
- Sismeiro O., Trotot P., Biville F., Vivares C., Danchin, A. (1998) *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *Journal of bacteriology* **180**, 3339-3344.
- Smith N., Kim S. K., Reddy P.T., Gallagher D.T. (2006) Crystallization of the class IV adenylyl cyclase from *Yersinia pestis* *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **62**, 200-204.
- Song J., Bettendorff L., Tonelli M., Markley J.L. (2008) Structural basis for the catalytic mechanism of mammalian 25-kDa thiamine triphosphatase. *J Biol Chem* **283**, 10939-10948.
- Switchenko, A. C., Primus, J. P., and Brown, G. M. (1984) Intermediates in the enzymic synthesis of tetrahydrobiopterin in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 754-760.
- Szyniarowski P., Lakaye B., Czerniecki J., Makarchikov A.F., Wins P., Margineanu I., Coumans B., Grisar T., Bettendorff L. (2005) Pig tissues express a catalytically inefficient 25-kDa thiamine triphosphatase: insight in the catalytic mechanisms of this enzyme. *Biochim Biophys Acta.* **1725**, 93-102.
- Hamamura M., Hirata N., Sawada K., Shuto T., Shimazoe T., Terada Y., Fukukami Y. (2008) Reversal of the expression pattern of Aldolase C mRNA in Purkinje cells and Ube 1x mRNA in Golgi cells by a dopamine D1 receptor agonist injections in the methamphetamine sensitized-rat cerebellum. *J Neural Transm.* **115**, 959-971.
- Hawkes R., & Leclerc N. (1989) Purkinje cell axon collateral distributions reflect the chemical compartmentation of the rat cortex. *Brain Res.* **476**, 279-290.

- Tammenkoski M., Koivula K., Cusanelli E., Zollo M., Steegborn C., Baykov A.A., Lahti, R. (2008) Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. *Biochemistry* **47**, 9707-9713.
- Tataranni P.A., Gautier J.F., Chen K., Uecker A., Bandy D., Salbe A.D., Pratley R.E., Lawson M., Reiman E.M., Ravussin E. (1999) Neuroanatomical correlates of hunger and satiation in humans using positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **13**, 4569-4574.
- Tesmer J. J., Sunahara R. K., Johnson, R. A., Gosselin, G., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1999) Two-metal-Ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* **285**, 756-760
- Trott O., Olson A.J. (2010) AutoDock Vina : improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* **31**, 455-461.
- Tsutsui, K. (1986) Tripolyphosphate is an alternative phosphodonor of the selective protein phosphorylation of liver microsomal membrane. *J. Biol. Chem.* **261**, 2645-2653.
- Vallee B.L., Riordan J.F., Johansen J.T., Livingston, D.M. (1972) Spectro-chemical probes for protein conformation and function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **36**, 517-531.
- Voskoboev A.I., et Luchko V.S. (1980) Isolation and radiometric determination of rat liver ATP: thiamine diphosphate phosphotransferase activity. *Vopr Med Khim.* **26**, 564-568.
- Voskoboev A.I., Chernikevich I.P. (1985) Biosynthesis of thiamine triphosphate and identification of thiamine diphosphate-binding proteins in the rat liver hyaloplasm. *Biokhimiia.* **50**, 1421-1427.
- Voskoboev A.I., Chernikevich I.P., Luchko V.S. (1987) Studies on thiamine diphosphate kinase (EC 2.7.4.15) from brewer's yeast: purification and some properties. *Vopr Med Khim.* **46**, 3-13.
- Williams R.R., & Cline J.K. (1936) Synthesis of vitamin B1. *J Am Chem Soc.* **58**, 1505-1505.
- Wurst H., & Kornberg A. (1994) A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J Biol. Chem.* **269**, 10996-11001.
- Xu L., Salloum D., Medlin P.S., Saccena M., Yellen P., Perrella B., Foster D.A. (2011) Phospholipase D mediates nutrient input to mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem.* **286**, 25477-25486.

# ANNEXE I



# Thiaminylated adenine nucleotides

## Chemical synthesis, structural characterization and natural occurrence

Michel Frédérick<sup>1,\*</sup>, David Delvaux<sup>2,\*</sup>, Tiziana Gigliobianco<sup>2</sup>, Marjorie Gangolf<sup>2</sup>, Georges Dive<sup>3</sup>, Gabriel Mazzucchelli<sup>4</sup>, Benjamin Elias<sup>5</sup>, Edwin De Pauw<sup>4</sup>, Luc Angenot<sup>1</sup>, Pierre Wins<sup>2</sup> and Lucien Bettendorff<sup>2</sup>

1 Laboratory of Pharmacognosy, Université de Liège, Belgium

2 GIGA-Neurosciences, Université de Liège, Belgium

3 Center for Protein Engineering, Université de Liège, Belgium

4 Physical Chemistry, GIGA-Research, Université de Liège, Belgium

5 Organic and Medicinal Chemistry, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

### Keywords

adenosine thiamine diphosphate; adenosine thiamine triphosphate; cofactor; metabolism; nucleotides

### Correspondence

L. Bettendorff, GIGA-Neurosciences, University of Liège, Bât. B36, Tour de Pathologie 2, étage +1, Avenue de l'Hôpital, 1, B-4000 Liège 1 (Sart-Tilman), Belgium  
Fax: +32 4 366 59 53  
Tel: +32 4 366 59 67  
E-mail: l.bettendorff@ulg.ac.be

\*These authors contributed equally to this work

(Received 12 February 2009, revised 2 April 2009, accepted 6 April 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07040.x

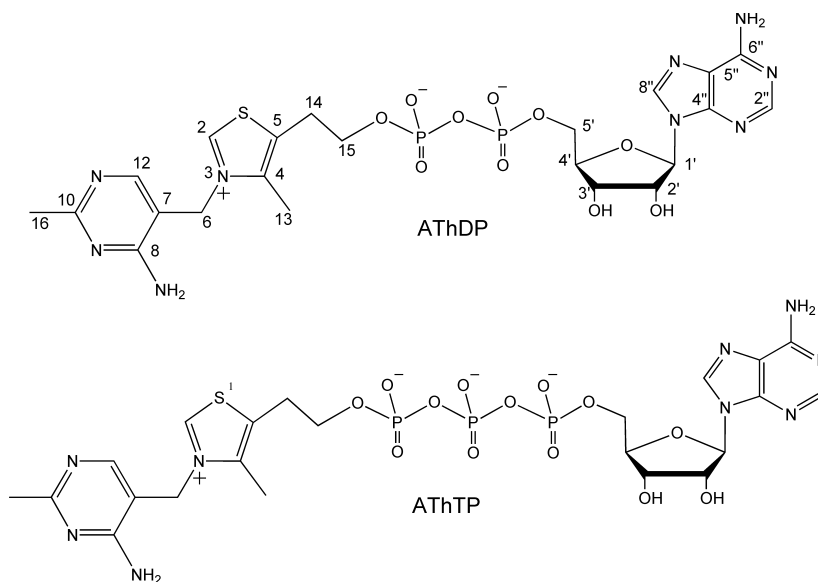
Thiamine and its three phosphorylated derivatives (mono-, di- and triphosphate) occur naturally in most cells. Recently, we reported the presence of a fourth thiamine derivative, adenosine thiamine triphosphate, produced in *Escherichia coli* in response to carbon starvation. Here, we show that the chemical synthesis of adenosine thiamine triphosphate leads to another new compound, adenosine thiamine diphosphate, as a side product. The structure of both compounds was confirmed by MS analysis and <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR, and some of their chemical properties were determined. Our results show an upfield shifting of the C-2 proton of the thiazolium ring in adenosine thiamine derivatives compared with conventional thiamine phosphate derivatives. This modification of the electronic environment of the C-2 proton might be explained by a through-space interaction with the adenosine moiety, suggesting U-shaped folding of adenosine thiamine derivatives. Such a structure in which the C-2 proton is embedded in a closed conformation can be located using molecular modeling as an energy minimum. In *E. coli*, adenosine thiamine triphosphate may account for 15% of the total thiamine under energy stress. It is less abundant in eukaryotic organisms, but is consistently found in mammalian tissues and some cell lines. Using HPLC, we show for the first time that adenosine thiamine diphosphate may also occur in small amounts in *E. coli* and in vertebrate liver. The discovery of two natural thiamine adenine compounds further highlights the complexity and diversity of thiamine biochemistry, which is not restricted to the cofactor role of thiamine diphosphate.

Thiamine (vitamin B1) is an essential compound for all known life forms. In most cell types, the well-characterized cofactor thiamine diphosphate (ThDP) is the major thiamine compound. Thiamine monophosphate (ThMP), for which no physiological function has been determined thus far, and unphosphorylated thiamine

account for only a few percent of the total thiamine content. Thiamine triphosphate (ThTP) is generally a minor compound ( $\leq 1\%$  of total thiamine) but it is present in most organisms studied to date [1]. Its role remains enigmatic, but it has been found that ThTP phosphorylates certain proteins in electric organs and

### Abbreviations

AThDP, adenosine thiamine diphosphate; AThTP, adenosine thiamine triphosphate; P<sub>i</sub>, inorganic phosphate; Thc, thiochrome; ThDP, thiamine diphosphate; ThMP, thiamine monophosphate; ThTP, thiamine triphosphate; ThTPase, thiamine triphosphatase.



**Fig. 1.** Expanded structural formulas of adenosine thiamine diphosphate (AThDP, thiaminylated ADP) and adenosine thiamine triphosphate (AThTP, thiaminylated ATP).

brain [2]. This might be part of a new cellular signaling pathway. In *Escherichia coli*, ThTP is synthesized in response to amino acid starvation in the presence of glucose [3,4]. Under special conditions of stress (very low intracellular ATP, but glucose present), *E. coli* may produce very high amounts of ThTP (60% of total thiamine) [4]. However, the mechanism of its synthesis remains unknown.

Recently, we discovered the existence of a fourth natural thiamine derivative, adenosine thiamine triphosphate (AThTP) or thiaminylated ATP (Fig. 1). This compound has been found in a variety of organisms from bacteria to mammals [5]. Like ThTP, AThTP is generally a minor compound, but in *E. coli*, it may be produced in higher amounts (up to 15% of total thiamine) in response to carbon starvation. It seems likely that in bacteria, ThTP and AThTP act as signals (or alarmones) in response to different conditions of cellular stress. Some data were recently obtained concerning the metabolism of AThTP in *E. coli*. Its synthesis appears to be catalyzed by a soluble ThDP adenylyl transferase according to the reaction  $\text{ThDP} + \text{ATP}(\text{ADP}) \rightleftharpoons \text{AThTP} + \text{PP}_i(\text{P}_i)$ . This enzyme seems to be a high molecular mass (355 kDa) multisubunit complex requiring  $\text{Mg}^{2+}$  ions for activity [6].

In a previous report [5], we showed that AThTP could be chemically synthesized by condensation of ThDP and AMP in the presence of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. Using this procedure, we found that the mixture obtained after synthesis contained, in addition to AThTP, a new compound that was identified as adenosine thiamine diphosphate (thiaminylated ADP; AThDP) (Fig. 1). As for AThTP, there was no previ-

ous mention of AThDP in the scientific literature, but the existence of this compound has been reported in at least two patents [7,8]. In the Kyowa Hakko Kogyo Co, Ltd patent [7] it was claimed that some bacteria, such as *Corynebacterium glutamicum*, are able, in the presence of adequate precursors (adenine, adenosine, thiamine, ThMP), to accumulate large amounts of AThDP (erroneously called thiamine adenine dinucleotide in the patent) in the extracellular medium. A method for the chemical synthesis of AThDP, using *P*<sup>2</sup>-diphenyl *S*-benzoylthiamine *o*-diphosphate as precursor, has also been described [8]. It is therefore of interest to better characterize these compounds.

Here, we report the chemical synthesis of AThTP and AThDP, their purification and their physico-chemical characterization using positive ESI-MS, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR (Table 1), as well as molecular modeling. We also show that the two compounds can be detected in *E. coli* under different culture conditions. Furthermore, significant amounts of both compounds are also detectable in eukaryotic cells, including several mammalian tissues and cultured cells. Thus, thiamine adenine nucleotides may be more widespread than initially thought and may have physiological roles both in prokaryotes and eukaryotes.

## Results

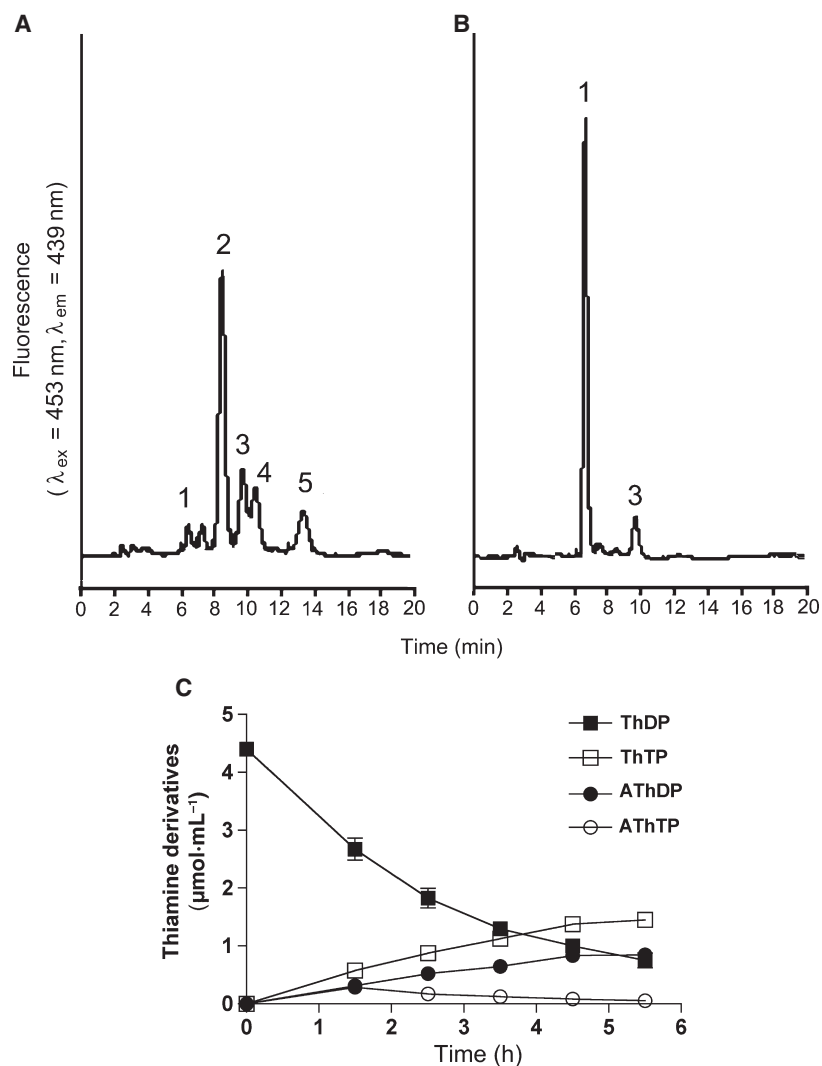
### Chemical synthesis and purification of AThDP and AThTP

We have previously shown that the condensation of ThDP and AMP by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide leads to the synthesis of AThTP [5]. Here, this reaction

**Table 1.**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR data of thiamine diphosphate (ThDP), adenosine thiamine diphosphate (ThDP), thiamine triphosphate (ThTP) and adenosine thiamine triphosphate (AThTP) recorded at 500/125/202.5 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$  at pH 7.4 and 25 °C. TMS and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  were used as references. ThDP was a commercial preparation (Sigma-Aldrich), and ThTP, AThDP and AThTP were synthesized as described in Experimental procedures. nd, not determined; s, singlet; bs, broadened singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiplet.

Position	ThDP			AThDP			ThTP			AThTP		
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$
2	9.55 (s)	154.50	9.18 (s)	nd	155.68	9.55 (s)	9.14 (s)	153.25				
4		143.21		143.13	143.14			143.18				
5		135.58		135.02	135.8			134.92				
6	5.49 (s)	50.16	5.19 (s)	50.87	49.84	5.38 (s)	5.17 (s)	50.93				
7		105.86		103.70	106.32			103.66				
8		162.61		161.43	162.85			161.42				
10		164.68		168.90	163.22			169.24				
12	7.93 (s)	147.62	7.93 (s)	157.03	144.31	7.84 (s)	7.90 (s)	156.80				
13	2.52 (s)	11.10	2.49 (s)	11.16	11.05	2.44 (s)	2.48 (s)	11.20				
14	3.28 (t, 5.4 Hz)	27.56 (d, 8.2 Hz)	3.14 (t, 5.4 Hz)	27.41 (nd)	27.52 (d, 8.2 Hz)	3.22 (t, 5.2 Hz)	3.15 (dd, 4.8 and 5.1 Hz)	27.38 (d, 7.8 Hz)				
15	4.15 (m)	64.64 (d, 5.6 Hz)	4.08 (m)	64.78 (d, 6 Hz)	64.92 (d, 5.3 Hz)	4.11 (m)	4.10 (dd, 5.1 and 5.8 Hz)	64.80 (d, 5.5 Hz)				
16	2.55 (s)	21.72	2.38 (s)	23.93	21.20	2.52 (s)	2.32 (s)	23.81				
1'			6.02 (d, 5.6 Hz)	86.55			6.01 (d, 5.9 Hz)	86.61				
2'			4.75 (m)	73.69			4.69 (t, 5.6 Hz)	74.11				
3'			4.44 (t, 4.7 Hz)	70.27			4.46 (t, 4.9 Hz)	70.26				
4'			4.33 (bs)	83.80 (d, 10.1 Hz)			4.32 (bs)	83.82 (d, 9.2 Hz)				
5'			4.14 (m)	65.39 (d, 5.3 Hz)			4.17 (m)	65.26 (d, 5.2 Hz)				
2''			8.09 (s)	152.73			8.08 (s)	152.62				
4''				149.20				148.75				
5''				118.69				118.13				
6''				nd				155.11				
8''			8.43 (s)	139.50			8.41 (s)	139.89				
P-1			-11.40 (d, 20.2 Hz)									-13.13 (d, 18.7 Hz)
P-2			-10.79 (d, 20.2 Hz)									-24.70 (t, 18.7 Hz)
P-3			-									-12.91 (d, 18.7 Hz)

**Fig. 2.** Composition of the reaction medium during the condensation of ThDP or ThMP with AMP in the presence of *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide. (A) Chromatographic separation of the reaction mixture using the substrates ThDP and 5'-AMP after 90 min at room temperature (1, ThMP; 2, ThDP; 3, ThTP; 4, ThTP; 5, AThTP). (B) Chromatographic separation of the reaction mixture using the substrates ThMP and 5'-AMP after 90 min at room temperature. (C) Composition of the reaction mixture as a function of time for the condensation of ThDP and AMP in the presence of *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ , error bars are also given). In all cases, 0.7 mmol of each precursor (5'-AMP, ThMP, ThDP) were dissolved in 0.7 mL tributylamine and 750  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. To start the synthesis, 5  $\mu$ L of this mixture were diluted with 1 mL of a mixture containing 500  $\mu$ L dimethylsulfoxide, 450  $\mu$ L pyridine and 0.15 g *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (in 50  $\mu$ L pyridine). Aliquots were taken at different time intervals, diluted 2000 times and analyzed by HPLC after derivatization to thiochrome derivatives.

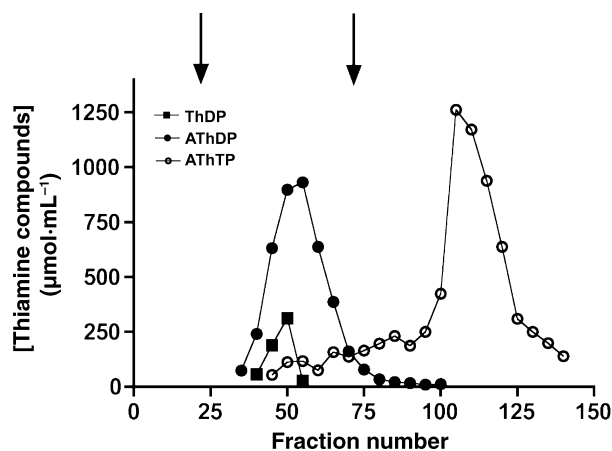


has been further characterized with respect to the kinetics and composition of the reaction medium. In particular, we show that other side products, which have been unambiguously identified, are also formed during synthesis. Indeed, as shown in Fig. 2A, synthesis of AThTP (peak 5) is accompanied by the appearance of two other compounds in the reaction medium: AThDP (peak 3) and ThTP (peak 4). The small ThMP peak (peak 1) is essentially a contamination present in the commercially available ThDP used as the precursor (peak 2). However, AThTP synthesis proceeds through an optimum and after 3 h an accumulation of ThTP and AThDP is observed (Fig. 2C), although the amount of AThTP is much lower.

The presence of AThDP was further confirmed by the condensation of ThMP and AMP in the presence of *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (Fig. 2B), which mostly leads to the formation of AThDP. However,

the yield of AThDP synthesis according to this latter synthetic procedure is low: after 2 h, < 10% of the ThMP is converted to AThDP. Therefore, we routinely synthesized both compounds by condensing ThDP and AMP in the presence of *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide for 2 h. To purify AThDP and AThTP, large-scale synthesis was performed using an (AMP)/(ThDP) ratio of 1.5 rather than 1, because this resulted in higher yields of AThTP. After 2 h, thiamine derivatives were precipitated with diethyl ether and dissolved in water. ThTP, AThDP and AThTP were purified using several chromatographic steps. All thiamine phosphate derivatives, except ThTP [9], were retained on a AG 50W-X8 cation-exchange resin and eluted with ammonium acetate (0.2 M; pH 7.0). After lyophilization, the residue was dissolved in water and layered on a column filled with the anion-exchange resin AG-X1 equilibrated in water (Fig. 3). AThDP was eluted in 0.25 M





**Fig. 3.** Separation of thiamine derivatives on an AG-X1 resin equilibrated in water. The arrows indicate the addition of ammonium acetate (pH 5.0) at 0.25 and 0.5 M, respectively. The concentrations of the different thiamine compounds were measured by HPLC after derivatization to thiochrome derivatives.

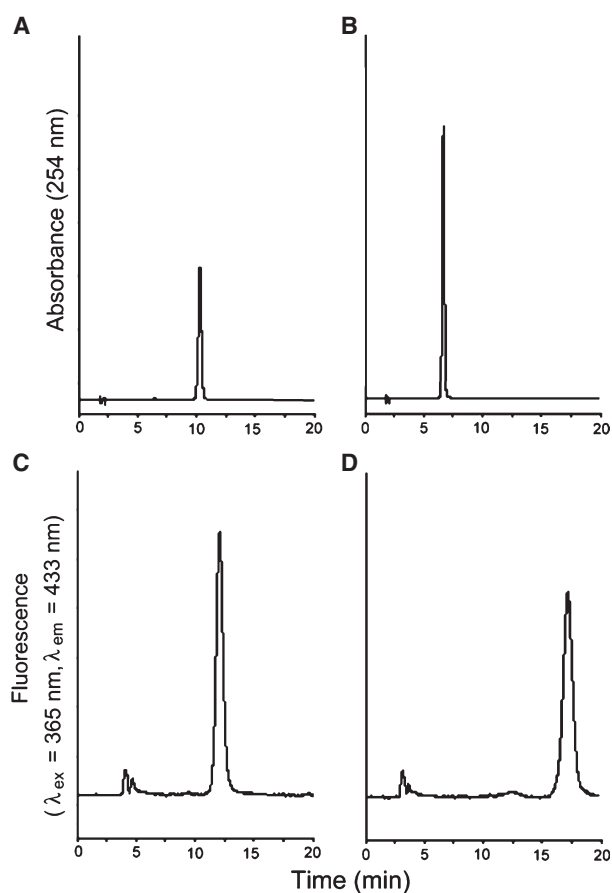
**Table 2.** Purification of chemically synthesized adenosine thiamine diphosphate (AThDP) and adenosine thiamine triphosphate (AThTP).

	AThDP		AThTP	
	μmol	%	μmol	%
Synthesis	720	100	802	100
AG 50W-X8	610	85	644	80
AG-X1	83	13.6	48	5.9
Polaris C <sub>18</sub>	38	5.3	22	2.7

ammonium acetate (pH 7.0) followed by 0.5 M ammonium acetate for the elution of AThTP. Both compounds were further purified on a Polaris C<sub>18</sub> HPLC column. The total yield was 5.3% for AThDP and 2.7% for AThTP (Table 2). The purity of the two preparations was checked by HPLC using UV and, after derivatization, fluorescence detection (Fig. 4).

### Physicochemical characterization of chemically synthesized AThDP and AThTP using MS, NMR, fluorometry and molecular modeling

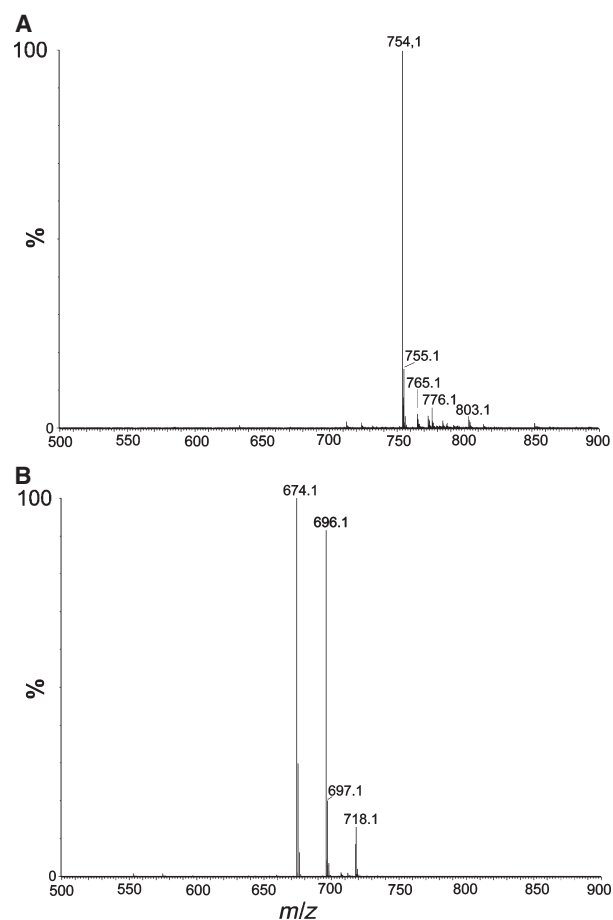
Both fractions were analyzed by positive ESI-MS (Fig. 5). As expected, the AThTP fraction contained a major cation with a  $m/z$  ratio of 754.1, as described previously [5]. In the AThDP fraction, the major peak had a  $m/z$  ratio of 674.1, as expected for AThDP (crude formula C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>S<sup>+</sup>, parent ion M<sup>+</sup>) with an average molecular mass of 674.5 Da (exact monoisotopic mass 674.1 Da). As for AThTP [5], ESI-MS/MS fragmentation of AThDP gave three main



**Fig. 4.** Analysis of chemically synthesized AThDP (A,C) and AThTP (B,D) by HPLC. The AThDP and AThTP preparations were analyzed on a Polaris C<sub>18</sub> HPLC column by UV detection (254 nm) (A,B) and on a PRP-1 column by fluorescence detection after derivatization to thiochrome derivatives (C,D) as described in Experimental procedures.

peaks:  $m/z$  553.1 (a fragmentation product of AThDP obtained by loss of the pyrimidinium moiety, M<sup>+</sup> – 121 – pyrimidinium),  $m/z$  348.1 (corresponding to AMP) and  $m/z$  257.1. We were unable to assign the latter ion, which is obtained after fragmentation of both AThTP and AThDP and probably results from a molecular rearrangement.

NMR data for AThTP and AThDP, together with those for ThTP and ThDP, are listed in Table 1. They are clearly in accordance with the presence in AThDP and AThTP of a thiamine and an adenine moiety, as compared with thiamine and adenosine NMR data. The presence of three linked phosphates in AThTP is confirmed by three phosphorous signals in the <sup>31</sup>P-NMR spectrum (two doublets and one triplet, as expected). Oddly, in AThDP, the two phosphates seemed to be equivalent, as only one signal was detected on the spectrum. However, the possibility that



**Fig. 5.** Positive-ion ESI MS of chemically synthesized AThTP (A) and AThDP (B). The compounds were diluted at a concentration of 150  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ /acetonitrile (50:50 v/v). The second major peak of  $m/z$  696.1 in (B) represents the Na adduct of AThDP.

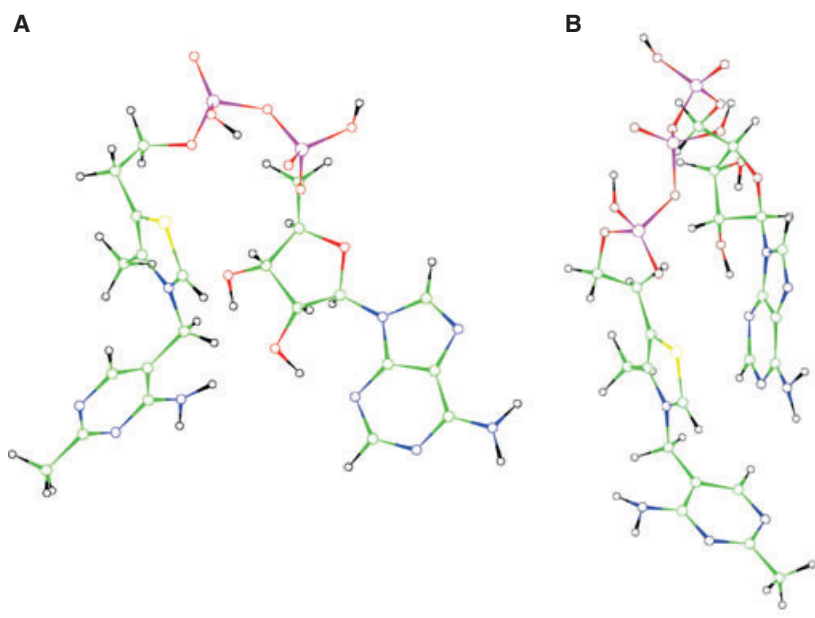
the molecule is adenosine thiamine monophosphate could be excluded on the basis of the molecular mass (Fig. 5). The linkage (C-15-triphosphate-C-5') between the thiamine moiety and the adenine moiety of the molecule was proven by the presence of  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  coupling constants for C-14 and C-15 and for C-5' and C-4'.

We place special emphasis on the C-2 proton of the thiazolium ring which is required for the catalytic activity of ThDP [10]. This proton is particularly labile and is completely exchanged with deuterium within a few minutes [11]. The experimental shift was 9.61, 9.55 and 9.55 p.p.m. respectively for ThMP, ThDP and ThTP (pH 7.4), values higher than expected for aromatic protons (in general 7.5–8.5 p.p.m.). In AThDP and AThTP, we saw a decrease in the shift (9.14/9.18 p.p.m.) compared with ThMP, ThDP or ThTP, indicating a modification of the electronic envi-

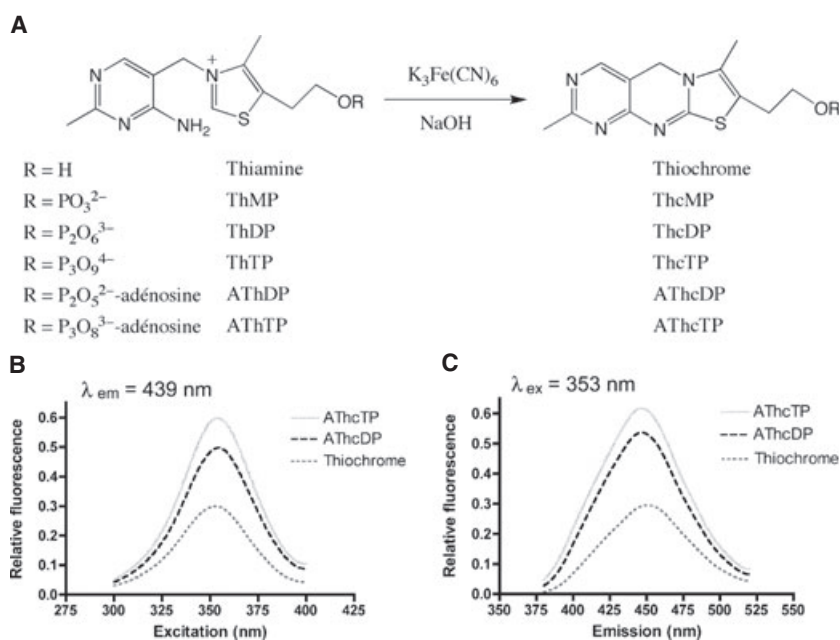
ronment of the C-2 proton, probably as a consequence of a through-space interaction with the adenine moiety. This would suggest a U-shaped folding of AThDP and AThTP.

Molecular modeling was applied on a model of the free (without influence of the environment) molecules without any counterion. The phosphate groups are neutralized by hydrogens and the whole system bears a positive charge because of the thiazolium fragment. Calculations showed that a U-folded conformation is energetically accessible for both di- and triphosphorylated derivatives. A possible structure for each derivative is shown in Fig. 6. In this conformation, the C-2 proton is embedded in the closed environment formed by the aromatic adenine and aminopyrimidine rings. Such a folded structure for adenylated thiamine derivatives is not in favor of a cofactor role that requires a highly reactive C-2 proton [10].

Like free thiamine, AThDP and AThTP can be readily oxidized to highly fluorescent thiochrome (Thc) derivatives. AThcDP and AThcTP gave practically identical fluorescence spectra with an optimum of 353 nm for excitation and 439 nm for emission (Fig. 7). However, when we compared the fluorescence properties of AThcDP and AThcTP with those of nonadenylated thiochromes (Thc, ThcMP, ThcDP and ThcTP, which have roughly the same fluorescence) [12,13], we found some interesting differences. First, the optimum emission wavelength was slightly lower for AThcDP and AThcTP than for thiochrome (439 versus 443 nm; Fig. 7C). More importantly, we observed that AThcDP and AThcTP solutions gave peaks with areas approximately twice as large as thiochrome solutions of the same molarity. These differences were confirmed by comparing the fluorescence of thiochromes obtained before and after the enzymatic hydrolysis of AThTP and AThDP. We have previously shown that complete hydrolysis of AThTP by bacterial membranes yields ThMP as the sole thiamine-containing product [5]. When we incubated synthetic AThDP with a membrane fraction obtained by centrifuging sonicated *E. coli*, we also observed hydrolysis of this compound with ThMP as product. In these experiments we found that after derivatization, the fluorescence ratios AThcDP/ThcMP and AThcTP/ThcMP were, respectively,  $2.1 \pm 0.1$  and  $2.4 \pm 0.3$ , in agreement with a higher fluorescence for adenine thiochrome derivatives than other thiochrome derivatives. The higher fluorescence of adenylated thiochrome derivatives may be caused by either a higher quantum yield for the latter compounds or higher self-quenching in nonadenylated thiochromes. The first possibility seems unlikely because an interaction between



**Fig. 6.** Proposed 3D structures of free (no influence of the environment) AThDP (A) and AThTP (B). The phosphate groups are neutralized by hydrogens and the whole system carries a positive charge caused by the thiazolium fragment. The calculations were performed using the B3LYP functional [33] with the polarized double  $\zeta$  basis set 6-31G(d) [34] and the GAUSSIAN 03 suite of programs [35]. The structures shown represent true energy minima.



**Fig. 7.** Derivatization reaction of thiamine derivatives to thiochrome derivatives (A) and fluorescence excitation (B) and emission (C) spectra of thiochrome derivatives of thiamine, AThDP and AThTP.

adenosine and thiamine moieties, as suggested above, would probably lead to decreased, rather than increased fluorescence. A more probable explanation would be self-quenching in thiochrome, ThcMP, ThcDP and ThcTP, caused by stacking of the molecules; this is possible because of the planar structure of the conjugated thiochrome part. In adenosine thiamine derivatives, because of the U-shaped structure, such stacking would be unlikely to occur.

### Is AThDP a natural compound?

AThTP has only very recently been shown to occur naturally in bacteria where it accumulates during carbon starvation [5]. Concerning AThDP, to date, there is no reference to the compound in the scientific literature. However, it was mentioned in at least two patents in 1969 and 1970 [7,8], but no further data have become available since then. It was claimed [7] that some

bacteria (*Corynebacterium ammoniagenes* or *C. glutamicum*) are able to synthesize AThDP in the presence of suitable precursors (thiamine, ThMP, adenine, adenosine) added to the medium. Under these conditions, the inventors reported that the bacteria accumulated large amounts of AThDP ( $0.5\text{--}1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in the culture medium. It was not clear whether AThDP was synthesized inside the bacteria and then excreted or whether it was synthesized in the periplasmic space and then diffused into the fermentation liquor. We repeated these experiments with *C. glutamicum* and *E. coli*, but we did not observe any accumulation of AThDP inside or outside the bacteria. Because of the poor description of the methods used in the patent and the lack of any description of the compound synthesized, it is difficult to draw a conclusion concerning the reasons for our failure to reproduce these results. We were also unable to find any mention of AThDP in subsequent patents and any reference to this compound in the peer-reviewed literature.

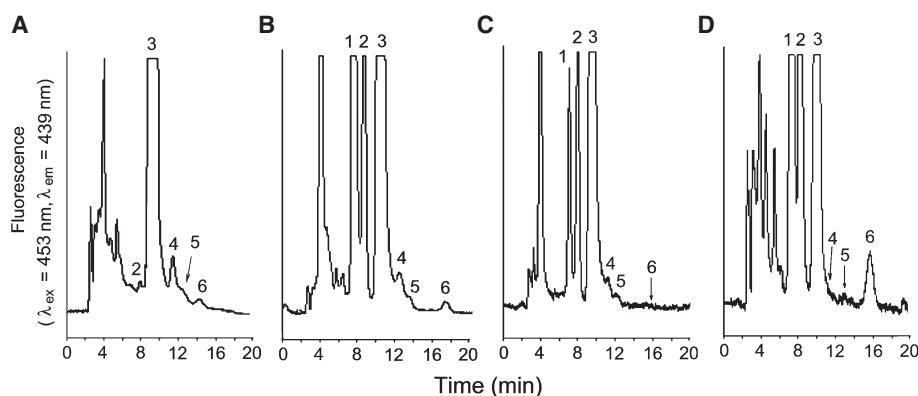
However, in *E. coli*, we observed a transient appearance of AThDP, when the bacteria grown overnight were diluted in Luria–Bertani medium (Fig. 8A). The amounts observed were quite variable, ranging from a few  $\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  of protein to  $\sim 50\text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  of protein, representing a maximum of 2–3% of total thiamine. For comparison, much larger amounts of AThTP could be observed in *E. coli* under conditions of carbon starvation, i.e. when the bacteria were transferred to a minimal medium without a carbon source. Under these conditions, AThTP slowly accumulates and, after a few hours, reaches a maximum corresponding to  $\sim 10\text{--}15\%$  of total thiamine [5]. Concerning AThDP, to date, we have no evidence that its appearance might be linked to some kind of cellular stress.

We then looked for the presence of adenylated thiamine compounds in eukaryotes. We have previously shown that AThTP may be detected in small amounts in yeast, the roots of plants and in several organs in the rat [5]. In the mouse, significant amounts of AThDP were found in the liver (Fig. 8B), although it was below the limits of detection in the brain, heart, kidney and skeletal muscle (Table 3). We also found very small amounts (near the detection limit) of AThDP in quail liver (Fig. 8C), but not in other quail tissue (brain, heart, skeletal muscle). In contrast to mouse tissues, AThTP was never observed in any quail tissues. ThTP, however, was found in relatively high amounts in quail brain (4.6% of total thiamine) and skeletal muscle (1.9% of total thiamine) [1], in small amounts in quail heart (0.15% of total thiamine, this study, not shown), and was hardly detectable in quail liver ( $\leq 0.1\%$  of total thiamine) (Fig. 8C).

In cultured mammalian cells, we found significant amounts of AThTP in 3T3 mouse fibroblasts (Fig. 8D and Table 4), but these cells contained no detectable amounts of AThDP or ThTP. In contrast to 3T3 fibroblasts, Neuro2a neuroblastoma cells contained significant amounts of ThTP but no AThTP. AThDP was not found in any of these cell lines, although it seemed that the commercially available Dulbecco's modified Eagle's medium contained a small amount ( $< 0.01\%$  of thiamine) of this compound.

## Discussion

In a recent study [5], we reported the presence in *E. coli* of a new type of nucleotide containing a vitamin part, i.e. AThTP or thiaminylated ATP. We called



**Fig. 8.** Occurrence of adenylated thiamine compounds in several organisms: *E. coli* (A), mouse liver (B), quail liver (C) and cultured 3T3 fibroblasts (D). Bacteria were grown overnight in Luria–Bertani medium and diluted to an absorbance of 0.2–0.4. The sample was taken after 1 h. Mice and quails were decapitated and the livers homogenized in 5 vol. of 12% trichloroacetic acid. Thiamine derivatives were determined by HPLC on a PRP-1 column after transformation to thiochrome derivatives as described in Experimental procedures. The arrows indicate the expected elution times, when the signal was too small to be quantified. 1, ThMP; 2, thiamine; 3, ThDP; 4, AThDP; 5, ThTP; 6, AThTP.

**Table 3.** Thiamine derivatives in mouse tissues. The results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). AThDP, adenosine thiamine diphosphate; AThTP, adenosine thiamine triphosphate; ThDP, thiamine diphosphate; ThMP, thiamine monophosphate; ThTP, thiamine triphosphate; nd, not detected.

Tissue	Thiamine	ThMP	ThDP	AThDP	ThTP	AThTP
	pmol·mg <sup>-1</sup> of protein					
Brain	3.4 $\pm$ 1.2	16.1 $\pm$ 2.3	60 $\pm$ 13	nd	0.07 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.1
Skeletal muscle	2 $\pm$ 1	3.4 $\pm$ 0.5	9 $\pm$ 3	nd	0.15 $\pm$ 0.03	0.2 $\pm$ 0.1
Heart	1.7 $\pm$ 0.2	31 $\pm$ 13	361 $\pm$ 63	nd	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
Kidney	7 $\pm$ 2	50 $\pm$ 31	416 $\pm$ 54	nd	1.2 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.1
Liver	53 $\pm$ 36	252 $\pm$ 170	798 $\pm$ 257	0.9 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.2

**Table 4.** Thiamine derivatives in several eukaryotic cells lines. The results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n$  is indicated in parentheses). AThDP, adenosine thiamine diphosphate; AThTP, adenosine thiamine triphosphate; ThDP, thiamine diphosphate; ThMP, thiamine monophosphate; ThTP, thiamine triphosphate; nd, not detected.

Cell line	Thiamine	ThMP	ThDP	AThDP	ThTP	AThTP
	pmol·mg <sup>-1</sup> of protein					
Neuro2a (mouse) (4)	22 $\pm$ 9	28 $\pm$ 10	293 $\pm$ 146	nd	2.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.5
3T3 (mouse) (6)	80 $\pm$ 30	2 $\pm$ 1	94 $\pm$ 14	nd	nd	2.1 $\pm$ 0.3
LN-18 (human) (7)	64 $\pm$ 8	4 $\pm$ 1	48 $\pm$ 1	nd	nd	3 $\pm$ 1

this compound adenosine thiamine triphosphate to emphasize its close metabolic relationship with thiamine metabolism. Indeed, the intracellular concentrations of these derivatives are orders of magnitude lower than those of conventional adenine nucleotides such as AMP, ADP, ATP or NAD<sup>+</sup>.

AThTP was synthesized chemically [5], using a method previously published for the synthesis of ThTP and nucleoside triphosphates [9]. In this study, the reaction was optimized and we found that, along with AThTP, some side products were also synthesized. These were mainly ThTP and another adenosine-containing thiamine compound that was identified as AThDP by MS analysis and <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR. The mechanism by which the side products AThDP and ThTP are formed from ThDP and AMP in the presence of excess *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (Fig. 2A) is unclear. Our results suggest that, at least in solution, both adenine thiamine compounds should adopt a U-folded structure leading to a through-space interaction between the adenine and thiamine rings.

The important question, however, is whether the diphosphate analog exists as a natural compound. Here we show that AThDP can indeed be detected in some cell types, both prokaryotic and eukaryotic (in particular liver). This suggests that thiaminylated adenine nucleotides might represent a new family of signaling molecules. These findings are reminiscent of the earlier discovery of diadenosine oligophosphates, which were thought to be a novel class of signaling molecules [14–

16]. In prokaryotes, diadenosine tetraphosphate and other members of this family were considered as pleiotropic alarmones produced in response to heat shock or oxidative stress [17]. Our previous results [5] suggested that in *E. coli*, AThTP is a kind of alarmone produced in response to carbon starvation. The enzymatic synthesis of AThTP requires a new type of enzyme (a ThDP adenylyl transferase) that we partially characterized [6], whereas the synthesis of diadenosine oligophosphates is catalyzed by a completely different mechanism involving aminoacyl-tRNA synthetase [18].

The finding that vertebrate tissues (especially the liver) contain adenylylated thiamine compounds may lead us to re-examine and in some cases question the validity of earlier reports concerning the exact ThTP content of some tissues or the enzymatic mechanisms of ThTP synthesis. For example, several authors [19–22] have claimed that the rat liver had a ThTP content several times higher than the brain. From our data (see Fig. 8B and Table 3), we suspect that peaks corresponding to AThDP and AThTP may have been mistakenly been considered as indicating the presence of ThTP. This would be particularly true in chromatographic methods in which ThTP is eluted first, close to the void volume of the column, increasing the chance of overlap with other compounds such as the here-described adenylylated thiamine derivatives. Note that, whereas in mice brain, ThTP is hardly detectable and a significant AThTP peak is observed, the reverse is true in rat brain [5].



Likewise, synthesis of 'ThTP' by soluble enzyme preparations from rat liver [23] and yeast [24] has been reported but, in our laboratory, no synthesis of ThTP was ever observed with soluble preparations, except, unspecifically, with adenylate kinase [4], as reported previously by Kawasaki and coworkers [25,26]. The reason for the discrepancies may be that the authors who described a soluble ThDP kinase [23,24] actually measured the appearance of adenylated thiamine derivatives but not authentic ThTP. Indeed, we recently reported that AThTP synthesis was catalyzed by a soluble enzyme from *E. coli* or pig brain [6], whereas the synthesis of ThTP seems to require the presence of intact cells or organelles [27].

In higher organisms, the mechanism of synthesis and degradation of AThDP and AThTP, as well as the possible roles of those compounds, will require further investigation, but our findings emphasize the complexity of thiamine metabolism and further illustrate the concept that the biological role of thiamine derivatives is far from being restricted to the coenzyme role of ThDP [28–31].

## Experimental procedures

### Determination of thiamine compounds by HPLC

Thiamine compounds, including AThTP and AThDP, were determined by HPLC using a PRP-1 column, as described previously, after transformation to fluorescent thiochrome derivatives [5,32]. Prior to analysis, an 80- $\mu$ L aliquot was oxidized with 50  $\mu$ L of 4.3 mM potassium ferricyanide in 15% NaOH. AThTP and AThDP were also quantified using UV detection (254 nm, 535 HPLC detector; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) after separation on a 5- $\mu$ m Polaris C<sub>18</sub> column (150  $\times$  4.6 mm; Varian Benelux, Middelburg, the Netherlands). The mobile phase was composed of 50 mM ammonium acetate adjusted to pH 7.0 and 5% methanol. The flow rate was 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. All solutions were prepared using milli-Q water (Millipore S.A./N.V., Brussels, Belgium) and all the solvents used for HPLC were of HPLC grade (Biosolve, Valkenswaard, the Netherlands).

### Chemical synthesis and purification of AThDP and AThTP

AThTP was synthesized by modification of a previously published method [9] for the synthesis of ThTP and nucleoside triphosphates. All products and solvents were from Sigma-Aldrich NV/SA (Bornem, Belgium). Preliminary tests were made using either 0.7 mmol ThDP (acid form) and 0.7 mmol 5'-AMP (acid form) or 0.7 mmol ThMP (acid form) and 0.7 mmol 5'-AMP. The compounds were

dissolved in 700  $\mu$ L tributylamine and 750  $\mu$ L H<sub>2</sub>O and mixed until a translucent, slightly viscous, solution was obtained. We diluted 5  $\mu$ L of this mixture in 500  $\mu$ L dimethylsulfoxide mixed with 450  $\mu$ L pyridine and finally added 0.15 g *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (dissolved in 50  $\mu$ L pyridine) to start the synthesis. The reaction was allowed to proceed at room temperature and aliquots were taken at different time intervals, diluted 2000 times in water and analyzed by HPLC. Three main compounds (ThTP, AThDP and AThTP) appeared in the mixture.

For purification of the compounds, the synthesis was made on a larger scale: 2.25 mmol ThDP (acid form), 3.5 mmol 5'-AMP (acid form), 3.5 mL (14.5 mmol) tributylamine and 3 mL H<sub>2</sub>O were mixed and dissolved in 500 mL dimethylsulfoxide and 445 mL pyridine. Finally, 45 g *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (dissolved in 15 mL pyridine) was added and the mixture was incubated for 2 h at room temperature. Addition of 3 L diethyl ether to the mixture led to the precipitation of synthesized compounds. The suspension was centrifuged (1000 g, 10 min) and the precipitate was dissolved in 40 mL H<sub>2</sub>O. This solution was applied on a column (8  $\times$  2.5 cm) filled with AG 50W-X8 cation-exchange resin (H<sup>+</sup> form; Bio-Rad Laboratories, Nazareth Eke, Belgium) equilibrated in water (pH 4.5 with HCl). The column was washed with 100 mL H<sub>2</sub>O and 8-mL fractions were collected (flow rate 2 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>). During this step, ThTP was eluted [9]. All other thiamine derivatives were eluted with 480 mL (60  $\times$  8 mL fractions) ammonium acetate (0.2 M, pH 7.0). Fractions 20–60 were pooled (320 mL) and lyophilized. The powder was dissolved in 25 mL H<sub>2</sub>O and layered on a column (8  $\times$  2.5 mL) filled with AG-X1 resin (Cl<sup>-</sup> form; Bio-Rad). The resin was washed with 120 mL H<sub>2</sub>O during which the yellow form was eluted. Residual ThDP and some AThDP were also eluted at this stage. AThDP was eluted with 250 mL ammonium acetate (0.25 M, pH 7.0). The fractions containing AThDP were pooled and lyophilized. AThTP was eluted with 500 mL ammonium acetate (0.5 M, pH 7.0) and lyophilized. The residue was dissolved in 3 mL H<sub>2</sub>O and filtered on a Millex-GP filter unit (0.22  $\mu$ m, dia. 25 mm; Millipore). Aliquots of 100  $\mu$ L of the pool were then purified on a Polaris C<sub>18</sub> HPLC column. The mobile phase consisted of 50 mM ammonium acetate and 5% methanol in water and the flow rate was 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. AThTP was eluted with a retention time of 7 min, and AThDP was eluted after 14 min. The peaks were collected, lyophilized and used for MS analysis and NMR.

### Identification of AThTP and AThDP by ESI tandem MS

Experiments were performed on a Micromass Q-TOF Ultima Global apparatus (Waters Corp., Zellik, Belgium) operated in nano-ESI positive ion mode. The synthesized

compounds were injected at a concentration of 150  $\mu\text{M}$  in 50% water/50% acetonitrile. The source parameters were: capillary voltage, 1.8 kV; cone voltage, 100 V; RF lens 1, 90 V; source temperature, 80 °C; collision energy, 6 eV. The fragmentation pattern of the  $m/z$  674.1 was obtained with 30 V acceleration voltage.

### Characterization of AThDP and AThTP by $^1\text{H-NMR}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ and $^{31}\text{P-NMR}$

One-dimensional  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  and  $^{31}\text{P-NMR}$  spectra were recorded at 25 °C (pH 7.4) on a Bruker Avance 500 spectrometer (Bruker Belgium S.A./N.V., Brussels, Belgium) operating at a proton NMR frequency of 500.13 MHz, using a 5-mm probe and a simple pulse-acquire sequence (30° pulses for  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  and 90° pulse for  $^{13}\text{C}$ ). Several 2D spectra were also recorded using standard Bruker parameters. NMR data for ThDP, AThDP, ThTP and AThTP are presented in Table 1.

### Determination of fluorescence characteristics of thiochrome derivatives of AThDP and AThTP

Fluorescence excitation (emission set at 439 nm) and emission (excitation set at 353 nm) spectra were taken using a SFM 25 fluorescence spectrophotometer (Kontron Instruments, Milan, Italy). One milliliter of a 10  $\mu\text{M}$  thiamine, AThDP or AThTP solution was mixed with 500  $\mu\text{L}$  of 4.3 mM potassium ferricyanide in 15% NaOH and the spectra were taken immediately. AThDP and AThTP could be hydrolyzed by a crude membrane preparation from *E. coli* as described earlier [5].

### Molecular modeling

All calculations were performed at the quantum chemistry level using the B3LYP functional [33] with the polarized double  $\zeta$  basis set 6-31G(d) [34] and the GAUSSIAN 03 suite of programs (Gaussian Inc, Wallingford, CT, USA, 2004). All the degrees of freedom of the geometry have been fully optimized. Several extended and folded conformations have been generated and located as true energy minima.

### Bacterial cultures

*E. coli* (strain BL 21) were grown in Luria–Bertani medium as previously described [5]. *C. glutamicum* were from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM-No. 1412, Braunschweig, Germany) and grown in MMTG medium (glucose 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; tryptone 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; yeast extract 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , NaCl 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and methionine 0.2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at 30 °C (250 r.p.m.). The bacteria were then incubated in a medium containing glucose (100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), urea (6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),

$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), yeast extract (10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and biotin (30  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) as described in Sankyo Company, Ltd [8]. After 48 h at 30 °C, ThMP (2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and adenosine (2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added and thiamine derivatives were determined by HPLC in the fermentation liquor after 24 h after protein precipitation by 12% trichloroacetic acid. Similar experiments were performed with *E. coli* in Luria–Bertani medium with either thiamine, ThMP, adenine or adenosine as substrates for AThDP synthesis.

### Eukaryotic cell culture

Different established cell lines (mouse fibroblast 3T3, human malignant glioma cell line LN-18 and mouse neuroblastoma cell line Neuro2a) were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air, 5%  $\text{CO}_2$ , in 10-cm Petri dishes in 10 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (Neuro2a, 3T3) or RPMI (LN-18) supplemented with fetal bovine serum (10%) and penicillin (100  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Cells were subcultured to a fresh culture dish every 2–3 days. At the third day of culture, the medium was discarded and the cells were detached with trypsin (3T3 and LN-18). After centrifugation at 4000  $g$  for 4 min, the pellets were resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid 12%. After centrifugation (5000  $g$ , 3 min), the trichloroacetic acid was extracted with diethyl ether. The pellets obtained were dissolved in 0.8 M NaOH for the protein assay.

### Presence of AThDP and AThTP in mouse and quail tissues

Mice (*Mus musculus*, C57BL6/129SvJ mixed genetic background) and quails (*Coturnix japonica japonica*) were decapitated and tissue extracts were prepared as previously described [1]. All animal experiments were made in accordance with the directives of the committee for animal care and use of the University of Liège, in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

### Acknowledgements

The authors thank the Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (FRFC) for grant 2.4558.04. G. Dive thanks the FRS-FNRS for the financial support of the high performance computing systems installed in Liège and Louvain-la-Neuve. E. de Pauw acknowledges support from the FRS-FNRS for funding of the mass spectrometry facility. G. Mazzucchelli, G. Dive, M. Frédérick and L. Bettendorff are respectively scientific research worker, research associate, senior research associate and research director at the Fonds de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS). M. Gangolf

and D. Delvaux are research fellows of respectively the FRS-FNRS and the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA). The quails were a gift from Professor J. Balthazart (Behavioral Neuroendocrinology, GIGA-Neurosciences).

## References

- Makarchikov AF, Lakaye B, Gulyai IE, Czerniecki J, Coumans B, Wins P, Grisar T & Bettendorff L (2003) Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1477–1488.
- Nghiêm HO, Bettendorff L & Changeux JP (2000) Specific phosphorylation of *Torpedo* 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *FASEB J* **14**, 543–554.
- Lakaye B, Wirtzfeld B, Wins P, Grisar T & Bettendorff L (2004) Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *J Biol Chem* **279**, 17142–17147.
- Gigliobianco T, Lakaye B, Makarchikov AF, Wins P & Bettendorff L (2008) Adenylate kinase-independent thiamine triphosphate accumulation under severe energy stress in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* **8**, 16.
- Bettendorff L, Wirtzfeld B, Makarchikov AF, Maz-zucchelli G, Frédérick M, Gigliobianco T, Gangolf M, De Pauw E, Angenot L & Wins P (2007) Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nat Chem Biol* **3**, 211–212.
- Makarchikov AF, Brans A & Bettendorff L (2007) Thiamine diphosphate adenyl transferase from *E. coli*: functional characterization of the enzyme synthesizing adenosine thiamine triphosphate. *BMC Biochem* **8**, 17.
- Kyowa Hakko Kogyo Co Ltd (1969) *Process for Preparing Thiamine Adenine Dinucleotide*. United States Patent Office No. 3,474,002.
- Sankyo Company Ltd (1970) *Process for Preparing Thiamine Derivatives*. United States Patent Office No. 3,507,854.
- Bettendorff L, NghiêM HO, Wins P & Lakaye B (2003) A general method for the chemical synthesis of gamma-<sup>32</sup>P-labeled or unlabeled nucleoside 5(-)-triphosphates and thiamine triphosphate. *Anal Biochem* **322**, 190–197.
- Breslow R (1958) On the mechanism of thiamine action. IV. 1 Evidence from studies on model systems. *J Am Chem Soc* **80**, 3719–3726.
- Chauvet-Monges AM, Rogeret C, Briand C & Crevat A (1973) NMR study of the lability of the thiazolium proton in thiamin and its polyphosphoric esters. *Biochim Biophys Acta* **304**, 748–752.
- Ishii K, Sarai K, Sanemori H & Kawasaki T (1979) Analysis of thiamine and its phosphate esters by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **97**, 191–195.
- Lewin LM & Wei R (1966) Microassay of thiamine and its phosphate esters after separation by paper chromatography. *Anal Biochem* **16**, 29–35.
- Baker JC & Jacobson MK (1986) Alteration of adenyl dinucleotide metabolism by environmental stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2350–2352.
- Miras-Portugal MT, Gualix J, Mateo J, Diaz-Hernandez M, Gomez-Villafuertes R, Castro E & Pintor J (1999) Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog Brain Res* **120**, 397–409.
- Kisselev LL, Justesen J, Wolfson AD & Frolova LY (1998) Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett* **427**, 157–163.
- Lee PC, Bochner BR & Ames BN (1983) Diadenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>P<sub>4</sub>-tetrphosphate and related adenylated nucleotides in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **258**, 6827–6834.
- Plateau P & Blanquet S (1994) Dinucleoside oligophosphates in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* **36**, 81–109.
- Ishii K, Sarai K, Sanemori H & Kawasaki T (1979) Concentrations of thiamine and its phosphate esters in rat tissues determined by high-performance liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **25**, 517–523.
- Sanemori H, Ueki H & Kawasaki T (1980) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of thiamine phosphate esters at subpicomole levels. *Anal Biochem* **107**, 451–455.
- Iwata H, Matsuda T & Tonomura H (1988) Improved high-performance liquid chromatographic determination of thiamine and its phosphate esters in animal tissues. *J Chromatogr* **450**, 317–323.
- Matsuda T, Tonomura H, Baba A & Iwata H (1989) Tissue difference in cellular localization of thiamine phosphate esters. *Comp Biochem Physiol B* **94**, 405–409.
- Voskoboev AI & Luchko VS (1980) Isolation and radiometric determination of rat liver ATP:thiamine diphosphate phosphotransferase activity. *Vopr Med Khim* **26**, 564–568.
- Chernikevich IP, Luchko V, Voskoboev AI & Ostrovsky YM (1984) Purification and properties of ATP:thiamine diphosphate phosphotransferase from brewer's yeast. *Biokhimiya* **49**, 899–907.
- Shikata H, Koyama S, Egi Y, Yamada K & Kawasaki T (1989) Cytosolic adenylate kinase catalyzes the synthesis of thiamin triphosphate from thiamin diphosphate. *Biochem Int* **18**, 933–941.
- Miyoshi K, Egi Y, Shioda T & Kawasaki T (1990) Evidence for *in vivo* synthesis of thiamin triphosphate



- by cytosolic adenylate kinase in chicken skeletal muscle. *J Biochem (Tokyo)* **108**, 267–270.
- 27 Bettendorff L, Peeters M, Wins P & Schoffeniels E (1993) Metabolism of thiamine triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. *J Neurochem* **60**, 423–434.
- 28 Bettendorff L (1994) Thiamine in excitable tissues: reflections on a non-cofactor role. *Metab Brain Dis* **9**, 183–209.
- 29 Singleton CK & Martin PR (2001) Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr Mol Med* **1**, 197–207.
- 30 Bâ A (2008) Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol* **28**, 923–931.
- 31 Bettendorff L & Wins P (2009) Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. *FEBS J* **276**, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07019.x.
- 32 Bettendorff L, Peeters M, Jouan C, Wins P & Schoffeniels E (1991) Determination of thiamin and its phosphate esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic method. *Anal Biochem* **198**, 52–59.
- 33 Becke AD (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys* **98**, 5648–5652.
- 34 Hariharan PC & Pople JA (1973) The influence of polarization functions on molecular hydrogenation energies. *Theor Chim Acta* **28**, 213–217.
- 35 Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA Jr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC *et al.* (2004) Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian, Inc., Wallingford, CT.



# ANNEXE II



A SPECIFIC INORGANIC TRIPHOSPHATASE FROM *NITROSOMONAS EUROPAEA*:  
STRUCTURE AND CATALYTIC MECHANISM\*

David Delvaux<sup>‡1</sup>, Mamidanna R.V.S. Murty<sup>§1|2</sup>, Valérie Gabelica<sup>§3</sup>, Bernard Lakaye<sup>‡3</sup>, Vladimir V. Lunin<sup>¶4</sup>, Tatiana Skarina<sup>¶</sup>, Olena Onopriyenko<sup>¶</sup>, Gregory Kohn<sup>‡</sup>, Pierre Wins<sup>‡</sup>, Edwin De Pauw<sup>§</sup> and Lucien Bettendorff<sup>‡5</sup>

From the <sup>‡</sup>GIGA-Neuroscience and the <sup>§</sup>GIGA Systems Biology and Chemical Biology, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium  
and the <sup>¶</sup>Banting and Best Department of Medical Research, University of Toronto, Toronto, Ontario, M5G 1L6, Canada

Running head: A specific inorganic triphosphatase from *Nitrosomonas europaea*

Address correspondence to L. Bettendorff, Unit of Bioenergetics and cerebral excitability, GIGA-Neurosciences, University of Liège, avenue de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 366 59 67, Fax: + 32 4 366 59 53, Email: L.Bettendorff@ulg.ac.be

The CYTH superfamily of proteins is named after its two founding members, the CyaB adenylyl cyclase from *Aeromonas hydrophila* and the human 25-kDa thiamine triphosphatase. Because these proteins often form a closed  $\beta$ -barrel, they are also referred to as “Triphosphate Tunnel Metalloenzymes” (TTM). Functionally, they are characterized by their ability to bind triphosphorylated substrates and divalent metal ions. These proteins exist in most organisms and catalyze different reactions, depending on their origin. Here we investigate structural and catalytic properties of the recombinant TTM protein from *Nitrosomonas europaea* (*NeuTTM*), a 19-kDa protein. Crystallographic data show that it crystallizes as a dimer and that, in contrast to other TTM proteins, it has an open  $\beta$ -barrel structure. We demonstrate that *NeuTTM* is a highly specific inorganic triphosphatase, hydrolyzing tripolyphosphate (PPP<sub>i</sub>) with high catalytic efficiency in the presence of Mg<sup>2+</sup>. These data are supported by native mass spectrometry analysis showing that the enzyme binds PPP<sub>i</sub> (and Mg-PPP<sub>i</sub>) with high affinity ( $K_d < 1.5 \mu\text{M}$ ), while it has a low affinity for ATP or thiamine triphosphate. In contrast to *Aeromonas* and *Yersinia* CyaB proteins, *NeuTTM* has no adenylyl cyclase activity, but it shares several properties with other enzymes of the CYTH superfamily, e.g. heat-stability, alkaline pH optimum and inhibition by Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions. We suggest a catalytic mechanism involving a catalytic dyad formed by K52 and Y28. The present data provide the first characterization of a new type of phosphohydrolase (unrelated to pyrophos-

phatases or exopolyphosphatases), able to hydrolyze inorganic triphosphate with high specificity.

A large number of phosphohydrolases are able to hydrolyze triphosphorylated compounds, generally nucleoside triphosphates such as ATP or GTP. However, in 2002, we achieved the molecular characterization of a mammalian enzyme that specifically hydrolyzed thiamine triphosphate (ThTP<sup>6</sup>), a compound unrelated to nucleotides (1). This 25-kDa soluble thiamine triphosphatase (ThTPase), which is involved in the regulation of cytosolic ThTP concentrations (2), has near absolute specificity for ThTP (it does not hydrolyze nucleotides) and a high catalytic efficiency. No sequence homology with other known mammalian proteins could be found.

Shortly thereafter, Iyer and Aravind (3) observed that the catalytic domains of human 25-kDa ThTPase (1) and CyaB adenylyl cyclase (AC2) from *Aeromonas hydrophila* (4) define a novel superfamily of domains that, according to these authors, should bind “organic phosphates”. This superfamily was called “CYTH” (CYaB-THiamine triphosphatase), and the presence of orthologs was demonstrated in all three superkingdoms of life. This suggested that CYTH is an ancient family of proteins, and that a representative must have been present in the last universal common ancestor (LUCA) of all extant life forms. It was proposed (3) that this enzymatic domain might play a central role at the interface between nucleotide and polyphosphate metabolism, but this role remains largely undefined: in fact, the two structurally

and enzymatically characterized members of the superfamily, AC2 and mammalian 25-kDa ThTPase, are likely to be secondary acquired activities, while other prokaryotic CYTH proteins would have performed more ancient and fundamental roles in organic phosphate and/or polyphosphate metabolism (3).

Using multiple alignments and secondary structure predictions, Iyer and Aravind showed that the catalytic core of CYTH enzymes contained a novel  $\alpha + \beta$  scaffold with 6 conserved acidic and 4 basic residues. At least 4 of the acidic residues (generally glutamate) are likely to chelate divalent cations required for catalysis, as is the case for adenylyl cyclases, DNA polymerases and some phosphohydrolases (3,5,6).

More recently and independently of those bioinformatic studies, Shuman and coworkers pointed out that RNA triphosphatases of fungi and protozoa exhibit striking similarities with bacterial and archaeal proteins of unknown function that belong to the CYTH superfamily (7). Although the primary structure conservation is low, the active site folds of the Cet1 RNA triphosphatase from *S. cerevisiae* (8) and of several prokaryotic CYTH proteins are remarkably similar: in both cases, an eight-strand antiparallel  $\beta$ -barrel forms a topologically closed tunnel, and triphosphorylated substrates, as well as divalent cation activators, bind in the hydrophilic cavity. Therefore, Shuman and coworkers called these proteins “Triphosphate Tunnel Metalloenzymes” (TTM). They assumed that TTM was a larger superfamily including Cet1-like and CYTH proteins (7).

However, it is not established that all members of the CYTH superfamily exhibit the closed tunnel conformation. For instance, the 25-kDa mouse ThTPase has an open cleft structure when free in solution, while the enzyme-ThTP complex has a more closed, tunnel-like conformation (9). This suggests that the CYTH domain may be a versatile fold, both structurally and functionally.

Despite the presence of orthologs in most organisms, the general significance of CYTH enzymes remains a matter of conjecture. In unicellular eukaryotes, the essential role of RNA triphosphatases in RNA capping is clearly defined. But, like ThTPase activity in mammals, this is probably a secondary adaptation. In bacteria, two CYTH proteins, from *A. hydrophila* (4) and *Yersinia pestis* (10,11) are considered as a particular class of adenylyl

cyclases (“class IV”, CyaB), but this enzyme activity was found to be significant only under rather extreme conditions (50-60 °C and pH around 10). In addition, a more efficient class I adenylyl cyclase is also present in *A. hydrophila* (4) and *Y. pestis* (11). Archaeal and bacterial CYTH proteins have since been annotated as hypothetical (CyaB-like) adenylyl cyclases.

However, a bacterial CYTH ortholog from *Clostridium thermocellum* was recently shown to be completely devoid of adenylyl cyclase activity (12). The enzyme, which was characterized by Shuman and coworkers in considerable detail (12,13) had a rather broad substrate specificity. It hydrolyzed guanosine 5'-tetrphosphate (Gp<sub>4</sub>), inorganic triphosphate (tripolyphosphate, PPP<sub>i</sub>) and to a lesser extent nucleoside triphosphates and long-chain polyphosphates (12,13).

In 2005, we obtained the three-dimensional crystal structure of the *Nitrosomonas europaea* CYTH ortholog (*NeuTTM*), the hypothetical protein NE1496 (Protein Data Bank 2FBL (14) and, although, labeled as a TTM (12), it rather exhibits a C-shaped cup conformation, or incomplete  $\beta$ -barrel.

Because of the structural similarities between *NeuTTM* and mouse 25-kDa ThTPase (open cleft rather than closed tunnel), we considered the possibility that ThTP might be a good substrate for *NeuTTM*. Indeed, in *E. coli*, ThTP may be involved in responses to environmental stress (15), but no specific bacterial ThTPase has been characterized so far. However, the present data show that *NeuTTM* is actually devoid of significant ThTPase activity (as well as of adenylyl cyclase activity) but that *NeuTTM* has a strong preference and high affinity for PPP<sub>i</sub>. Furthermore, we show that two residues that are highly conserved in CYTH proteins (K52 and Y28) are important for catalysis. This is the first characterization of a specific tripolyphosphatase (PPPase), raising the question of the existence and possible role of PPP<sub>i</sub> in living cells.

## MATERIALS AND METHODS

*Materials*—Sodium tripolyphosphate (PPP<sub>i</sub>), sodium cyclic triphosphate (trimetaphosphate, cPPP<sub>i</sub>), polyphosphate (sodium phosphate glass, 65 ± 5 residues), ATP, ITP, GTP and guanosine 5'-tetrphosphate (Gp<sub>4</sub>, Tris salt) were from Sigma. Thiamine triphosphate (ThTP) was synthesized and purified as previously described (16). Tetrphosphate (P<sub>4</sub>) (initially from Sigma) was a gift from Dr. Eric Oldfield, Department of

Chemistry, University of Illinois, A110 CLSL 600 South Mathews Ave. Urbana, IL 61801. The pET15b vector for the expression of *NeuTTM* as a His-tag fusion protein was a gift from Dr. A. Savchenko, University of Toronto, Banting and Best Department of Medical Research, C.H. Best Institute, Toronto, Ontario, Canada).

*Overexpression and purification of NeuTTM*—BL21(DE3) *E. coli* cells were transformed with a pET15b plasmid containing the sequence of *NeuTTM* with a 6 His sequence at the N-terminal side of the gene. Transformed bacteria were grown overnight at 37 °C in 2 ml LB medium containing 500 µg/ml ampicillin. Then the bacteria were cultured in 50-200 ml of 2XYT medium containing 250 µg/ml ampicillin until  $A_{600}$  reached 0.6-0.8. Expression of the fusion protein was induced with isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (1 mM). After 3 hours incubation at 37 °C, the bacterial suspension was centrifuged 15 min at 8000 g (4 °C). Bacteria were suspended in modified binding buffer (20 mM HEPES instead of phosphate buffer, 0.5 M NaCl, 30 mM imidazole pH 7.5). After two cycles with a French press disruptor, the lysate was centrifuged 30 min at 50,000 g. The tagged protein was purified on a FPLC system (ÄKTA™ Purifier, Amersham Biosciences) coupled to a 5 ml HisTrap™ FF column (GE Healthcare) in the above-mentioned buffer. *NeuTTM* was then eluted in eluting buffer (20 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH adjusted to 7.5 with HCl 6N). Removal of the His-tag was achieved by incubating 1 mg of the purified protein with 200 units of AcTEV™ protease (Invitrogen). After 2 hours at room temperature, the mixture was purified on the HisTrap column to remove the released tag as well as the protease (also His-tagged). The purified untagged *NeuTTM* was recovered in the first fractions.

*Crystallization, data collection and structure solution*—For crystallographic purposes, the *NeuTTM* gene was expressed as a selenomethionine-substituted protein using standard M9 high yield growth procedure according to the manufacturer's instructions (Shanghai Medicilon; catalog number MD045004-50), with *E. coli* BL21(DE3) codon plus cells.

Crystals for the *NeuTTM* data collection were obtained with hanging drop vapor diffusion using a 24-well Linbro plate. 1 ml of well

solution was added to the reservoir and drops were made with 1 µl of well solution and 1 µl of protein solution. The crystals were grown at 20 °C using 3.5 M sodium formate as a precipitation agent and 0.1 M Bis-Tris propane buffer pH 7.0.

The *NeuTTM* crystal was briefly dipped into a 5-µl drop of cryoprotectant solution (3.8 M sodium formate, 0.2 M NaCl, 4% sucrose, 4% glycerol, 4% ethylene glycol and 0.1 M Bis-Tris propane buffer pH 7.0) before flash-freezing in liquid nitrogen. Data collection was performed at the 19-ID beamline at the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory. One dataset was collected using 0.97959 Å wavelength. Data were indexed and processed with the HKL-2000 package (17).

Intensities were converted into structure factors and 5% of the reflections were flagged for  $R_{\text{free}}$  calculations using programs F2MTZ, Truncate, CAD and Unique from the CCP4 package of programs (CCP4, 1994). The program BnP (18) was used for the determination of the Se atoms positions and phasing. ARP/wARP package (19) was used to build initial model of the protein. Refinement and manual correction was performed using REFMAC5 (20) version 5.5.0109 and Coot (21) version 0.6. The final model included two protein chains (from residue 4 to residue 153 4-153 in chain A and from residue -1 to residue 153 in chain B), three molecules of ethylene glycol, 8 sodium ions and 324 water molecules. The MOLPROBITY method (22) was used to analyze the Ramachandran plot and root mean square deviations (rmsd) of bond lengths and angles were calculated from ideal values of Engh and Huber stereochemical parameters (23). Wilson B-factor was calculated using CTRUNCATE version 1.0.11 (CCP4, 1994). The figures were created using Pymol (<http://www.pymol.org>). The data collection and refinement statistics are shown in Table 1.

*Native Electrospray Mass spectrometry*—Electrospray mass spectrometry experiments in native conditions (100 mM ammonium acetate aqueous solution, pH 6.5) were carried out on a Q-TOF Ultima Global mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) with the electrospray source in the positive ion mode. The source tuning settings were as follows: capillary = 3 kV, source pirani pressure = 3.3 mbar, cone voltage = 40 V, source temperature = 40 °C, desolvation temperature = 60 °C, collision energy = 10 V. The RF lens 1 voltage was varied from 50 V



(soft conditions to preserve the protein dimer) to 150 V (harder conditions to achieve a better desolvation and higher accuracy in the protein mass determination).

**Molecular sieve**—A TSK column (G3000SW, 30 x 0.75 cm, 7 mm, Tosoh, Bioscience GmbH, 70567, Stuttgart, Germany) was used in 20 mM HEPES-Na (pH 6.8) and 200 mM NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min.

**Site-directed mutagenesis of NeuTTM**—Point mutations were introduced by the QuickChange method. The expression plasmid containing the coding sequence of NeuTTM was amplified with two mutagenic primers and Pfu DNA polymerase (Promega). Template DNA was removed by digestion with DpnI (Promega) for 2 h at 37 °C. The DNA was then introduced into *E. coli* cells and single clones were isolated. The presence of the mutations was checked by DNA sequencing (Genotranscriptomics Platform, GIGA, University of Liège). The sequences of the oligonucleotides used are given in Supplemental Table S1.

**Determination of phosphohydrolase activities**—The standard incubation medium (100 µl) contained 50 mM buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PPP<sub>i</sub> and 20 µl of the enzyme at the adequate concentration. The mixture was incubated at 37 or 50 °C, the reaction was stopped by addition of 1 ml phosphate reagent (24). The absorbance was read at 635 nm after 30 min and compared with a standard curve to estimate the released inorganic phosphate. When P<sub>4</sub> was the substrate, the absorbance was read after only 15 min, as acid hydrolysis was rapid in the phosphate reagent. The buffers used for incubation at different pH values were: Na-MES (pH 6.0-7.0), Na-MOPS (pH 7.0-7.5), Na-HEPES (pH 7.5-8.0), Na-TAPS (pH 8.0-9.0), Na-CHES (pH 9.0-10.0) and Na-CAPS (pH 10.0-10.5).

**Determination of in-gel enzyme activities**—In-gel activities were measured as described (25). The gel was colored in phosphate precipitation reagent (1% w/v ammonium heptamolybdate, 1% w/v triethylamine, 1 N HNO<sub>3</sub>).

**Determination of ATP, ADP and cAMP**—Purified NeuTTM was incubated under standard assay conditions with ATP (0.1 mM). The

reaction was stopped by addition of 12% trichloroacetic acid. After extraction of the acid with 3 x 1.5 ml diethyl ether, nucleotides were determined by HPLC using UV detection (26).

**Statistical analyses**—Data analysis was done with Prism 5 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA) using nonlinear fitting to the Michaelis-Menten equation.

## RESULTS

**Cloning, overexpression and purification of NeuTTM**—The ORF for NeuTTM was subcloned in the pET15b vector, modified to allow the expression of N-terminal His-tag fusion proteins. The latter was purified as described in Materials and Methods. The protein obtained after elution from the HisTrap column was essentially pure as judged by SDS-PAGE (Supplemental Fig. S1). This polyHis fusion protein could be subsequently cleaved by TEV protease, which considerably increased the triphosphatase activity of the enzyme (see below). For crystallization, NeuTTM was expressed as selenomethionine-substituted protein.

**Structural properties of NeuTTM**—The sequence and secondary structure elements are given in Fig. 1A. Crystallographic data shows that NeuTTM, like 25-kDa ThTPase (9), has an open cleft structure in the absence of bound substrate (Fig. 1B). Several residues projecting into the cleft have been indicated. They seem to be important for substrate and metal binding and/or catalytic activity as, in the case of the closely related CthTTM, extensive mutational analysis (12) has revealed that most of these homologous residues are required for full PPPase activity. Four glutamate residues (E4, E6, E114, E116 and possibly E61 and E63) are supposed to be required for Mg<sup>2+</sup> (or Mn<sup>2+</sup>) binding while R39 and R41 (and possibly R87) probably interact with substrate phosphoryl groups. According to Keppetipola *et al.* (12), K8, in CthTTM, would form a hydrogen bond with a backbone carbonyl at the break of the C-terminal α4-α5 helix. However, the analysis of the crystal structure of NeuTTM leaves the existence of such a hydrogen bond under question. While the distance between K8NZ and Y142O is 2.9 Å, the angle N...O-C is 117 degrees, which is rather far from the ideal geometry. Also, there is a water molecule (W429) located 3.5 Å away from the Y142 carbonyl oxygen with the angle O...O-C of 172 degrees, which makes this water molecule



a more likely partner for a hydrogen bond with the Y142 carbonyl than K8NZ.

It seems that the  $\beta$ -sheets are prevented from closing into a complete  $\beta$ -barrel by the insertion of a broken C-terminal helix ( $\alpha 4$  and  $\alpha 5$ ) into one end of the fold. Such a conformation is stabilized by hydrophobic interactions conferring a relatively rigid structure to *NeuTTM* (Fig. 1C).

*Specificity and kinetic properties of recombinant NeuTTM*—In contrast to what we expected, only a slight ThTPase activity could be detected, indicating that, unlike its mammalian counterpart, *NeuTTM* is not a genuine ThTPase (Fig. 2).

As ATP and other NTPs were hydrolyzed by a number of enzymes of the TTM family (7,12), we tested these compounds as potential substrates for *NeuTTM*. Nucleoside triphosphatase activity was negligible in the presence of  $Mg^{2+}$ , but a small activity was observed in the presence of  $Mn^{2+}$ , in particular with GTP (Fig. 2).

By contrast to NTPs,  $PPP_i$  was a very good substrate for *NeuTTM* with  $Mg^{2+}$  as activator (Fig. 2, Table 2). The enzyme had a strong preference for linear  $PPP_i$  compared to cyclic  $PPP_i$  (c $PPP_i$ ) and to the linear  $P_4$ . The longer chain polyphosphate (containing  $65 \pm 5$  phosphate residues) was not hydrolyzed either. Likewise, guanosine 5'-tetraphosphate (Gpppp or  $Gp_4$ ), which is a good substrate for *CthTTM* (13), was not significantly hydrolyzed. The *NeuTTM* adenylyl cyclase activity was also checked by incubating the enzyme with ATP plus  $MgCl_2$  or  $MnCl_2$  at different pH values, but in all cases we did not detect the appearance of a cAMP peak by HPLC. Hence, *NeuTTM* appears to be devoid of adenylyl cyclase activity. Note that the closely related *Clostridium thermocellum* CYTH protein (*CthTTM*) was also devoid of any such activity (12). So far, the only bacterial CYTH proteins with significant (albeit low) adenylyl cyclase activity are the CyaB enzyme AC2 from *A. hydrophila* (4) and the homologous class IV adenylyl cyclase from *Y. pestis* (10,11,27).

General kinetic properties of *NeuTTM* PPPase are displayed in Fig. 3. The optimal temperature was 50-55 °C (Fig. 3A) and the optimum pH was around 9.7 (Fig. 3B). Thermal stability and alkaline pH optimum are characteristic features of several other enzymes of the CYTH superfamily, notably the founding

members CyaB-AC2 (4) and human 25-kDa ThTPase (28).

As  $Mn^{2+}$  is a good substituent for  $Mg^{2+}$  in several TTM members (7,12,29-31), we tested the possible activating effects of  $Mn^{2+}$  ions on *NeuTTM* PPPase activity. We found that it was a very poor substituent for  $Mg^{2+}$  at all temperatures tested and in the pH range 7-10 (Fig. 3A, B). However, there was a significant  $Mn^{2+}$ -dependent activity at very alkaline pH (10.0-10.5) (Fig. 3B).

Kinetic parameters ( $K_m$ ,  $k_{cat}$  and catalytic efficiency) were determined with different enzyme preparations and under different experimental conditions (Table 2). Using a freshly prepared His-tagged purified preparation, Michaelis-Menten kinetics were obtained (Fig. 3C). At pH 9.7 and 37 °C,  $K_m$  was  $21 \pm 3 \mu M$  and  $V_{max}$   $240 \pm 30 \mu mol \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  in the presence of 5 mM  $Mg^{2+}$ . Under such conditions, the substrate is essentially under the form of a  $[Mg^{2+}\text{-}PPP_i]$  complex, as  $K_d$  for the dissociation of the complex is low ( $\sim 1.6 \cdot 10^{-6}$  M). The calculated  $k_{cat}$  was  $76 \text{ s}^{-1}$  under these conditions (assuming a molecular mass of 19 kDa for the monomeric enzyme with one catalytic site). The catalytic efficiency of *NeuTTM* triphosphatase activity is thus very high with  $k_{cat}/K_m = 3.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . At neutral pH,  $k_{cat}/K_m$  is about 10 times lower ( $3.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), but this is still high enough to consider that *NeuTTM* may be a genuine specific inorganic triphosphatase (PPPase). This is all the more plausible as  $k_{cat}$  was even higher for the untagged enzyme (up to  $7900 \text{ s}^{-1}$  at 50 °C and pH 9.7, see Table 2). This is two orders of magnitude higher than  $k_{cat}$  values obtained for *CthTTM* with its best substrates,  $PPP_i$  and  $Gp_4$  (12,13). This raises the possibility that, in *N. europaea*, the physiological function of *NeuTTM* might be the degradation of  $PPP_i$ . It should be emphasized, however that any firm conclusion concerning the biological role of this enzyme awaits the demonstration of the presence of inorganic triphosphate in *Nitrosomonas* or any other cell types.

*Effects of different activators and inhibitors on recombinant NeuTTM*—As their name suggests, enzymes from the TTM family are highly dependent on divalent metal cations. In common with other CYTH enzymes, *NeuTTM* PPPase had an absolute requirement for divalent metal ions, the highest activity being found with  $Mg^{2+}$  ions in the concentration range 2-10 mM (Fig. 4A). As already mentioned,  $Mn^{2+}$  was less

effective as an activator (Fig. 4A), but half-maximum activation was obtained at 0.4 mM  $\text{Mn}^{2+}$ , which corresponds to a very low concentration of free  $\text{Mn}^{2+}$ .

We also tested the activating effect of  $\text{Co}^{2+}$ , which, like  $\text{Mn}^{2+}$ , is a good activator for several TTM enzymes (30). At optimal pH (9.5-9.7),  $\text{Co}^{2+}$  was a better activator than  $\text{Mn}^{2+}$ , though the maximum activity was less than 10% of the one measured in the presence of 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (Fig. 4B). The concentration of free  $\text{Co}^{2+}$  corresponding to half-maximum activation was extremely low (about 30-50 nM), indicating that the affinity of the binding site for  $\text{Co}^{2+}$  is even higher than for  $\text{Mn}^{2+}$ .

As already reported for other CYTH enzymes such as Cet1 (30) and 25-kDa ThTPase (28),  $\text{Ca}^{2+}$  had no activating effect, but it was a potent inhibitor in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  (Fig. 5A):  $\text{IC}_{50}$  was 50-100  $\mu\text{M}$  in the presence of 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ .  $\text{Mn}^{2+}$  was also a potent inhibitor in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ , at least at pH < 10 ( $\text{IC}_{50}$  ~40  $\mu\text{M}$ ). As  $\text{Mn}^{2+}$  is also a weak activator, the inhibition by  $\text{Mn}^{2+}$  in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  was not complete. The curves showing the activating effect of increasing concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  were shifted to the right in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 5B), suggesting that the latter ion exerts its inhibitory effect, at least partially, by competition with  $\text{Mg}^{2+}$ . We finally tested the effect of  $\text{Zn}^{2+}$ , which has been shown to be a potent inhibitor of mammalian 25-kDa ThTPase (28).  $\text{Zn}^{2+}$  inhibited *NeuTTM* PPPase in the lower micromolar range ( $\text{IC}_{50}$  ~1.5  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 5C). In contrast to  $\text{Ca}^{2+}$ , the inhibitory effect of  $\text{Zn}^{2+}$  was only marginally affected by the concentration of the activator  $\text{Mg}^{2+}$  (data not shown), suggesting that the two cations do not compete for the same binding site. This was also the case for 25-kDa ThTPase (28). Those data are in agreement with the assumption that  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  may share a common binding site, while  $\text{Zn}^{2+}$  may bind to a peripheral "allosteric" site.

In addition to  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions were also inhibitory but with higher  $\text{IC}_{50}$  values, 10 and 20  $\mu\text{M}$  respectively.

*Structural and binding properties of the NeuTTM protein analyzed by native mass spectrometry*—We first investigated the ability of the 19-kDa recombinant *NeuTTM* to dimerize in solution. The X-ray diffraction data already suggested that the protein crystallized as a dimer (14). We carried out electrospray mass spectrometry of the concentrated His-tagged

protein (total monomer concentration 10  $\mu\text{M}$ ) in 100 mM ammonium acetate, pH 6.5 (Fig. 6) and found that the protein was a mixture of monomer (noted M) and dimer (noted  $\text{M}_2$ ) forms, the dimer being more abundant. The dimer dissociated easily in the gas phase when the RF lens 1 voltage was increased from 50 V to 150 V. This suggests that salt bridge interactions are not prevailing at the dimerization interface. Indeed, the diffraction data show that the interface is mainly composed of hydrophobic amino acids, among which are L29, L38, L40, L51, L74, I36, I64 and I66 (Supplemental Fig. S2), and this explains the lability of the dimers in electrospray.

We then studied the complexes of *NeuTTM*, with substrates alone (PPP<sub>i</sub>, ATP and ThTP) in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ . In all cases, the substrates remained tightly bound to *NeuTTM* at all voltages, in line with ionic interactions in these complexes. Fig. 7 shows the mass spectra of *NeuTTM* alone (Fig. 7A), and of the binary mixture of with PPP<sub>i</sub> (Fig. 7B), ATP (Fig. 7C) and ThTP (Fig. 7D). With PPP<sub>i</sub>, at the concentrations used (10  $\mu\text{M}$  *NeuTTM* and 25  $\mu\text{M}$  PPP<sub>i</sub>), the peak of the free protein is not distinguishable from the noise. It can therefore be estimated that the concentration of free protein is less than 8.5% of the total protein concentration. This means that the dissociation constant for the monomer-substrate complex under conditions stated above must be lower than 1.5  $\mu\text{M}$ . Moreover, the protein dimers contain exclusively two PPP<sub>i</sub> molecules, as seen from the uneven charge states 15+ and 13+. This strongly contrasts with ATP and ThTP, where the free protein is predominant, and both the monomer and dimer bind one molecule of substrate on average. From the peak intensities, the  $K_d$  of the monomer-substrate complex is estimated to be at least 90  $\mu\text{M}$  for ATP and ThTP. This is in agreement with the high  $K_m$  value ( $800 \pm 120 \mu\text{M}$ ) measured for ATPase activity of *NeuTTM* (Table 2).

Figure 8 shows the mass spectra of charge state 8+ of the protein monomer in different mixtures with  $\text{Mg}^{2+}$  and/or PPP<sub>i</sub>. The protein alone shows a peak at  $m/z = 2499.4$  (Fig. 8A), that remains predominant when the protein is mixed with a 10-fold excess of  $\text{Mg}^{2+}$  (Fig. 8B). We found that both monomers and dimers bind  $\text{Mg}^{2+}$  with moderate affinity. We also tested binary mixtures of the protein with  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , and the results suggest a higher affinity for  $\text{Zn}^{2+}$  (with multiple binding sites) than for  $\text{Mg}^{2+}$

and  $Mn^{2+}$  (data not shown). This is in agreement with the finding that the PPPase activity of *NeuTTM* is inhibited by micromolar concentrations of  $Zn^{2+}$  (Fig. 5C).

A more detailed analysis of the masses of the [*NeuTTM*- $PPP_i$ ] complexes in the absence of divalent cations revealed that they specifically take up two monovalent cations (the peak intensities of the complexes with zero and one monovalent cations being insignificant). Data from Fig. 8C show the presence of a complex with two  $Na^+$  ions. The latter presumably originate from the tripolyphosphate preparation, which is in the form of a pentasodium salt. A [*NeuTTM*- $PPP_i$ - $Na^+$ - $K^+$ ] complex was also detected, with  $K^+$  possibly originating from the protein preparation.

Finally, we investigated the properties of the ternary complexes (supposed to be catalytically active) of *NeuTTM*, with the substrate  $PPP_i$  and the activator  $Mg^{2+}$ . In order to avoid appreciable hydrolysis of  $PPP_i$ , the spectra were recorded immediately after mixing the protein with  $Mg^{2+}$  and  $PPP_i$ . In spite of the high enzyme concentration, PPPase activity is low at room temperature and pH 6.5 (see Fig. 3) and complete hydrolysis of  $PPP_i$  under the present conditions would probably take more than a few seconds. With  $MgCl_2$  (0.1 mM) in addition to  $PPP_i$ , the [enzyme- $PPP_i$ ] complex took up one  $Mg^{2+}$  ion rather than two monovalent cations (Fig. 8D). No free enzyme was observed. We can therefore assume that the [ $Mg$ - $PPP_i$ ] complex (which is the true substrate) binds to the active site with high affinity,  $K_d$  being of the same order of magnitude than for free  $PPP_i$  (<1.5  $\mu M$ ).

On the other hand, it is clear that the requirement for an activating  $Mg^{2+}$  ion is not simply due to the fact that it binds to  $PPP_i$ . Although the true substrate is likely to be the [ $Mg^{2+}$ - $PPP_i$ ] complex, the divalent metal activator must also bind to a specific site on the protein, as full enzyme activity requires the presence of millimolar free  $Mg^{2+}$  in the incubation medium (Fig. 4A and 5B) This was also shown to be the case for RNA triphosphatase from *Trypanosoma* (29) and it is probably a general feature of CYTH proteins (3). In the case of *NeuTTM*, the metal ion presumably interacts with the carboxyl groups of Glu4, Glu6, Glu114 and Glu116 (see Fig. 1).

There is no evidence from the present data that the protein might bind more than one  $Mg^{2+}$  ion with appreciable affinity. The same

conclusion was reached by Song et al. (9) for the 25-kDa mouse ThTPase. Although Iyer and Aravind (3) suggested that CYTH proteins may bind two divalent metal activators, this is probably not a general rule for this superfamily of proteins.

*In-gel activity of NeuTTM under non-denaturing conditions*—In agreement with mass spectrometric data, two peaks of approximately 20 and 40 kDa were obtained after separation on a size exclusion column (Supplemental Fig. S3). The specific activities of the monomer and the dimer were respectively 245 and 169  $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$  with 0.5 mM  $PPP_i$  at 50 °C, suggesting that the catalytic activity was not much changed by dimerization. This was also confirmed by in-gel activity determination after polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing conditions and incubation under optimal conditions (Supplemental Fig. S4). Furthermore, when the monomer and the dimer were separated on the size exclusion column and then reinjected, both appeared pure, suggesting that no rapid conversion between the two forms occurs. These results suggest that dimerization may simply be an artifact associated with enzyme purification and without physiological significance.

*Site-directed mutagenesis*—Alanine mutation of K8 and K85 were chosen because homologous residues were reported to be important for catalytic activity and substrate specificity of the closely related *CthTTM* (12). Indeed, the primary structures of *CthTTM* and *NeuTTM* have 73 positions of side-chain identity (12).

We found that, in contrast to the K8A mutant of *CthTTM*, the K8A mutated *NeuTTM* remained highly active with  $PPP_i$  as substrate and  $Mg^{2+}$  as activator, with a catalytic efficiency close to that of the recombinant wild-type enzyme, as both  $K_m$  and  $k_{cat}$  were increased (Table 2). This is an important difference with *CthTTM*. Indeed, Keppetipola *et al.* (12) found that the corresponding K8A mutation in *CthTTM* nearly completely abolished the PPPase activity of the enzyme, while strongly stimulating its ATPase activity. According to (12), K8 would form a hydrogen bond with a backbone carbonyl at the break of the C-terminal helices  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ , stabilizing the open structure of the eight-stranded  $\beta$ -barrel where the substrate binds. Substituting K8 by alanine would prevent this specific interaction between the  $\beta 1$  strand and  $\alpha 4$ - $\alpha 5$  helices, making the conformation less

rigid. Our own data do not suggest that such a H-bond is required to maintain a rigid structure. Furthermore, with the mutated K8A enzyme, ATP remains a poor substrate (Table 2), even with  $Mn^{2+}$  as activator, the catalytic efficiency being 3 orders of magnitude lower than with  $PPP_i$ . The present results suggest that either a very rigid conformation is not essential for a high and specific PPPase activity of *NeuTTM* or that K8 is not involved in the stabilization of the enzyme conformation. Note that Keppetipola *et al.* (12) made their assumption on the basis of sequence similarities with *NeuTTM*, and that the three-dimensional structure of *CthTTM* is not known.

K85 is located at the bottom of the cleft that is supposed to contain the catalytic site, close to the arginine residues (R39, R41 and R87) that are thought to bind the substrate phosphoryl groups electrostatically. In the case of the very similar *CthTTM* protein, the K87 residue, which is homologous to K85 in *NeuTTM*, has been found to be essential for catalysis, but the authors did not determine  $K_m$  and  $V_{max}$  (12).

The K85A mutant of *NeuTTM* was about ten times less active than the non-mutated enzyme, but the optimal conditions for activity were essentially the same, *i. e.* pH 9.7, temperature  $\sim 50$  °C. The mutant was also much less active with ATP than with  $PPP_i$  as substrate. The extrapolated  $V_{max}$  value yielded a  $k_{cat}$  around  $21\text{ s}^{-1}$  (at 50 °C) in the presence of 5 mM  $Mg^{2+}$  (Table 2), which is 14 times lower than  $k_{cat}$  measured under the same optimal conditions for the non-mutated enzyme. On the other hand, the  $K_m$  for  $PPP_i$  was 1 or 2 orders of magnitude higher than for the non-mutated *NeuTTM*. Note that due to the high  $K_m$ , it was not possible to use saturating substrate concentrations, increasing the uncertainty on both  $K_m$  and  $V_{max}$ . While the catalytic efficiency of the enzyme appears to be rather strongly decreased by the K85A mutation, it cannot be concluded that K85 is really essential for catalysis as  $k_{cat}$  remains relatively high.

Another important consequence of the K85A mutation is that the effects of divalent cations are profoundly altered: in contrast to the non-mutated enzyme, the K85A mutant is more strongly activated by  $Mn^{2+}$  than by  $Mg^{2+}$  and the inhibitory effects of  $Ca^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  are less pronounced (Supplemental Table S2). Actually,  $Zn^{2+}$  can even replace  $Mn^{2+}$  as activator, though it is less effective. It thus appears that deleting the positive charge of the side chain at position

85 alters the protein conformation in such a way that cations larger than  $Mg^{2+}$  become better activators. This suggests that K85 may act as a “discriminator” residue, ensuring that the smaller and more physiological  $Mg^{2+}$  ion is the specific activator. Taken together the data suggest that K85 is not directly involved in catalysis and is more likely to play an important (though not essential) role to properly orient the  $PPP_i$  molecule in the enzyme-substrate complex. It is also important for the specificity of  $Mg^{2+}$  binding.

As neither K8 nor K85 appear to be essential residues for catalysis, we suspected that K52, which is highly conserved in CYTH proteins (3,9), might play a more essential role. In *CthTTM*, mutation of K52 resulted in the loss of 90 to 99% of the activity, depending on the substrate or activator used (12). In *NeuTTM*, the conservative K52R mutation resulted in a decreased  $V_{max}$  by about two orders of magnitude (Table 2) and, as the apparent  $K_m$  is strongly increased (Supplemental Table S5), the catalytic efficiency is at least 1000 times lower than that of the non-mutated enzyme.  $Mn^{2+}$  did not induce a significant activation of this mutant. Thus, in contrast to K85A, the specificity for activating ions does not appear to be changed.

The fact that this conservative mutation strongly decreases the catalytic efficiency of the enzyme suggests that this highly conserved lysine residue plays an important role in the catalytic mechanism.

A puzzling property of *NeuTTM*, as well as other enzymes of the CYTH protein family, is their strong activation at alkaline pH (Fig. 3B). In order to check that this pH profile was not due to impaired binding of the substrate at lower pH, we plotted  $V_{max}/K_m$  as a function of pH (Fig. 9A). Our results show that the  $K_m$  does not change much with pH and the profile obtained is quite similar to the activity *versus* pH profile (Fig. 3B). We used the Dixon-Webb plot  $\text{Log } V_{max}$  *versus* pH to estimate the  $pK_a$  value for the main residue responsible for activity decrease between 9.7 and 7.0. As shown in Fig. 9B, the estimated  $pK_a$  was close to 9.3 for the non-mutated enzyme. The same value was found for the K52R mutant. These data are in agreement with the proposal that the catalytic activity depends on a single deprotonation step with  $pK_a \sim 9.3$ . This may correspond to a general base that removes a proton from water; the resulting  $OH^-$  would attack a phosphorus atom of the  $PPP_i$  substrate.



As the pH-rate profile remains largely unaffected by K52R mutation, the decrease of activity between 9.7 and 7.0 cannot be ascribed to protonation of the K52 amino group. This suggests the involvement of another residue able to interact with K52 and acting as a general base in the hydrolytic mechanism. According to the crystal structure (Fig. 1B), only three residues are in a position to interact easily with K52: Y28, E37 and E61 (see also supplemental Fig. S6). Obviously, the carboxyl groups of glutamate residues could hardly exhibit such an alkaline  $pK_a$  and we suspected that the residue acting as the general base was Y28 ( $pK_a$  for the hydroxyl group of free tyrosine is  $\sim 10.0$ ). Indeed, the conservative mutation Y28F results in a strong loss of enzyme activity ( $\sim 2.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  at  $100 \mu\text{M PPP}_i$ , compared to  $\sim 200 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  for the non-mutated enzyme, Fig. 3C). Surprisingly, however, the activity continuously increased when  $[\text{PPP}_i]$  was raised up to 1 mM (the highest testable concentration with our method) with no tendency to saturation (Supplemental Fig. S5). This lack of saturation was observed at all pH values tested from 7.0 to 0.9 (data not shown). Thus, the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  could not be estimated with this mutant enzyme. The pH optimum of the Y28F mutant is shifted to lower values compared to the non-mutated (Fig. 3B) and the K52R mutant (Fig. 9C). We plotted the Log of the specific activity versus pH at  $37^\circ\text{C}$  for  $[\text{PPP}_i] = 100 \mu\text{M}$  (Fig. 9D). It is obvious that there is an important shift in pH-rate profile towards lower pH values and the Dixon-Webb plot yielded a  $pK_a$  value  $\sim 7.4$ . This apparent  $pK_a$  was not strongly affected by changes in  $\text{PPP}_i$  concentration (not shown).

This value might possibly reflect the  $pK_a$  of the carboxyl group of a neighboring glutamate (E37 or E61) that might also act as a general base, albeit less efficiently than Y28. This would explain that the activity of the Y28F mutant still reaches relatively high values when  $\text{PPP}_i$  is in large excess (Supplemental Fig. S5).

Taken together, those data suggest that Y28 plays an important role in *NeuTTM* catalysis (possibly forming a catalytic dyad with K52) and is, at least partially, responsible for the unusual high pH optimum of the enzyme.

The relatively slight decrease in activity at  $\text{pH} \geq 10$  could result from a number of possibilities, *e. g.* charge alterations involving unidentified residues in or near the active site, or destabilization of the protein structure.

In the model shown in Fig. 10, we hypothesize that a catalytic dyad is formed by the Y28-K52 pair, the nucleophilic nitrogen of K52 being hydrogen-bonded with the phenolate oxygen of Y28. The latter would act as the general base that removes a proton from water and the resulting  $\text{OH}^-$  attacks a phosphorus atom of the substrate  $\text{PPP}_i$  (Fig. 10A). Alternatively, Y28 might act as a nucleophile to directly attack the  $\gamma$ -phosphorus atom of  $\text{PPP}_i$  (Fig. 10B). In the latter case, we would expect a covalent phosphotyrosyl intermediate to be formed, which would be unusual for a hydrolase. When the catalytic mechanism involves a phosphoenzyme intermediate, the activity is generally inhibited by sodium orthovanadate acting as a transition state inhibitor. We tested the effect of sodium orthovanadate on the non-mutated *NeuTTM*  $\text{PPPase}$  activity, but we found no inhibition at concentrations up to 2 mM. However, the activity was very sensitive to fluoride with an  $\text{IC}_{50}$  as low as  $30 \pm 10 \mu\text{M}$  for NaF (results not shown). Fluoride is a well-known inhibitor of acid phosphatases, but millimolar concentrations are required. However, inorganic pyrophosphatases are sensitive to fluoride at concentrations lower than 1 mM. In family I pyrophosphatases, where fluoride inhibition involves rapid and slow phases (32), there is much evidence that catalysis proceeds by direct phosphoryl transfer to water rather than via a phosphoryl enzyme intermediate (33,34). The structure of the F<sup>-</sup>-inhibited complex has shown a fluoride ion replacing the nucleophilic water molecule (35). In family II pyrophosphatases, which belong to the DHH phosphoesterase superfamily (as defined by (5)), the  $\text{IC}_{50}$  for fluoride inhibition was even lower than for *NeuTTM* ( $\sim 12 \mu\text{M}$ ) (36). In any case, fluoride is believed to act as an analogue of hydroxide (37). The detailed mechanism of  $\text{PPP}_i$  hydrolysis by *NeuTTM* requires further investigation, but the lack of effect of vanadate and the strong inhibitory effect of fluoride argue against the existence of a covalent phosphoenzyme intermediate. Therefore, the model proposed in Fig. 10 seems to be the simplest and the most plausible.

## DISCUSSION

The present data demonstrate that the hypothetical protein NE1496, present in *N. europaea* (*NeuTTM*), is a functional phosphohydrolase with surprisingly high specificity, affinity and catalytic efficiency for

PPP<sub>i</sub>. This is also the first molecular characterization of a specific tripolyphosphatase. Several enzymes hydrolyzing PPP<sub>i</sub> have been characterized previously, but they are mainly exopolyphosphatases that, in addition to PPP<sub>i</sub>, hydrolyze other substrates such as, for instance, long chain polyphosphates or Gp<sub>4</sub> (38-40). So far, only one enzyme was reported to be strictly specific for PPP<sub>i</sub> hydrolysis: it was purified from *N. crassa* and found to be a dimer of 40 kDa subunits (41). Its sequence remains unknown and, unlike *NeuTTM*, it does not appear to have a high affinity for PPP<sub>i</sub>.

*NeuTTM* belongs to the superfamily of CYTH proteins (3) and was first referred to as a hypothetical protein with putative phosphatase or CyaB-like adenylyl cyclase activity by analogy with the *A. hydrophila* CYTH protein (4). However, it has become clear that the functional properties of CYTH proteins cannot be predicted from primary or even three-dimensional structure. In fact, the CYTH domain is a functionally versatile protein fold, characterized mainly by its ability to bind triphosphate compounds and catalyze their hydrolysis or other chemical transformations in the presence of divalent metal ion activators. Members of the CYTH superfamily exist in archaea, but none has been functionally characterized so far. In bacteria, two CYTH orthologs were shown to have an adenylyl cyclase activity (4,11,27) but, under physiological conditions, this activity is low and its biological significance is not established. *CthTTM*, the ortholog from *C. thermocellum* hydrolyzes PPP<sub>i</sub> with a relatively good turnover ( $k_{\text{cat}} = 3 \text{ s}^{-1}$ ), but it also hydrolyzes other substrates such as Gp<sub>4</sub> ( $k_{\text{cat}} = 96 \text{ s}^{-1}$ ) and, to a lesser extent, nucleoside triphosphates and long chain polyphosphates. (12,13). Thus, its possible physiological function remains undefined. In contrast, a clear biological role has been demonstrated for the CYTH orthologs of fungi and protozoa, which catalyze the first step of RNA capping in these organisms (7). In pluricellular eukaryotes, only the mammalian 25-kDa ThTPase has been characterized (1,9,28). Like *NeuTTM*, the latter enzyme is characterized by a high specificity and a high catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_m = 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for the bovine ThTPase (1)). On the basis that all known CYTH proteins hydrolyze triphosphates and that PPP<sub>i</sub> is the simplest triphosphate compound conceivable, PPPase activity might well be the primitive enzymatic activity in the CYTH protein family, which later evolved to hydrolyze more complex

organic substrates such as RNA or ThTP in eukaryotes.

It should be pointed out that a high affinity for PPP<sub>i</sub> was already demonstrated in the case of yeast RNA triphosphatases, where PPP<sub>i</sub> is a potent competitive inhibitor, albeit a poor substrate (29,42,43).

The present data show that, despite low sequence similarity and profound structural differences, *NeuTTM* and 25-kDa ThTPase have several kinetic properties in common, *i. e.* requirement for Mg<sup>2+</sup>, inhibition by Ca<sup>2+</sup> by competition with Mg<sup>2+</sup>, allosteric inhibition by Zn<sup>2+</sup>, alkaline pH optimum and an optimal temperature around 50-60 °C. *A. hydrophila* and *Y. pestis* CyaB-like adenylyl cyclases are also Mg<sup>2+</sup>-dependent and have high pH and temperature optima (4,11,27). Although more detailed investigations are required, most of these features may possibly be functional signature properties of CYTH enzymes.

Our results shed some light on the particular conformation of the *NeuTTM* protein and the relationship between structural and kinetic properties of the enzyme. The open cleft structure (incomplete β-barrel) is in contrast to the closed tunnel conformation of other TTM proteins (7). It appears to be rather rigid and to be stabilized by hydrophobic interactions between the antiparallel β strands and the broken C-terminal α4-α5 helix (Fig. 1C). Hence, in contrast to mammalian 25-kDa ThTPase (9), *NeuTTM* is probably unable to form a tunnel-like structure, even when a substrate is bound. This is in line with the very different substrate specificities of the two enzymes.

We propose a catalytic mechanism (Fig. 10) in which the hydroxyl group of Y28 hydrogen-bonded to the nucleophilic nitrogen of K52 acts as a nucleophile, attacking a water molecule to form OH<sup>-</sup>. K52 was also considered essential in the enzymatic activity of *CthTTM* (12).

To our knowledge, this is the first lysine-tyrosine dyad proposed for a hydrolase. Such a mechanism strongly contrasts with the classical serine-histidine dyad observed in many phosphatases.

Catalytic dyads based on tyrosyl and lysyl residues seem to be rare (44), nevertheless such a catalytic dyad has been suggested for the enol-keto tautomerization step of the NADP<sup>+</sup>-dependent malic enzyme (45). In that enzyme, the K→R and Y→F mutations resulted in a decrease in  $k_{\text{cat}}$  by two orders of magnitude as we observed here.

In the crystal structure described here, the distance between K52 and Y28 is 7.4 Å (Supplemental Fig. S6), too much for a hydrogen bond between these two residues. However, as shown for ThTPase, the binding of the substrate induces an important conformational change (9). Such a conformational change in *NeuTTM* might bring the two residues close enough for an interaction.

Four glutamate residues, E4, E6, E114 and E116 protrude from the bottom into the catalytic cleft. They are part of the CYTH consensus sequence and are thought to be involved in Mg<sup>2+</sup> binding (3,12). Our data show that the enzyme substrate complex binds only one Mg<sup>2+</sup> ion (Fig. 8B). We may thus consider the possibility that this Mg<sup>2+</sup>, as well as probably K85, stabilize and orient the substrate PPP<sub>i</sub> towards the catalytic dyad projecting from the ceiling of the cleft (Fig. 1B).

Concerning the quaternary structure, it is worth pointing out that *NeuTTM* crystallizes as a dimer (14) and can also form dimers in solution. However, our results suggest that dimerization is probably not of physiological significance for *NeuTTM*. This is in contrast to yeast RNA triphosphatases Cet1 from *S. cerevisiae* and Pet1 from *Schizosaccharomyces pombe*, where dimerization is important for thermal stability and *in vivo* function (46).

The high affinity and specificity of *NeuTTM* for PPP<sub>i</sub> raises the question of the possible biological roles of both PPP<sub>i</sub> and the enzymes able to synthesize it. For PPP<sub>i</sub>, there are so far very few data concerning its enzymatic synthesis. In *E. coli*, it was shown long ago that PPP<sub>i</sub> can be produced by enzymatic cleavage of deoxyguanosine triphosphate (47). On the other hand, it is well known that PPP<sub>i</sub> is formed as an intermediate in the enzymatic synthesis of S-adenosylmethionine but, in this case, it is not released in the cytosol (48). It was also shown that PPP<sub>i</sub> is an intermediate in naturally occurring pterins in *Drosophila melanogaster* (49).

Like ThTP (50), PPP<sub>i</sub> was shown to be an alternative phosphate donor for protein phosphorylation *in vitro* (51) and therefore, like

cAMP and possibly ThTP (15), PPP<sub>i</sub> might act as an intracellular signal.

However, in contrast to inorganic polyP of higher molecular weight (>10 phosphoryl residues), PPP<sub>i</sub> and other very short chain polyphosphates have never been reported to exist in any organism (except in acidocalcisomes, specific organelles rich in calcium and polyphosphates in some protozoans (52)). In all likelihood, this is simply due to the present lack of sensitive and specific detection methods. For polyphosphates of longer chain (15-750 residues), the problem was overcome thanks to sensitive assay methods (53). In *E. coli*, polyphosphates play an important role in the response to various forms of environmental stress (54-56). Polyphosphates may also act as energy stores or divalent cation chelators (56). The demonstration of similar physiological roles for PPP<sub>i</sub> awaits the development of an adequate method to measure its intracellular concentration.

Hence, the present results provide the first detailed characterization of a specific PPPase with high affinity for PPP<sub>i</sub> and high catalytic efficiency. Although, it is not proven that the physiological function of the protein is to degrade PPP<sub>i</sub> *in vivo*, our study is a first step towards the understanding of the possible roles of short chain polyphosphates, which might turn out to be just as important as their long chain counterparts in cell biology.

*Acknowledgements*—Nucleic acid sequencing was performed by Véronique Dhennin, Genotranscriptomics Platform, GIGA, University of Liège, <http://www.giga.ulg.ac.be/>. We thank Dr. Eric Oldfield for the gift of tetrapolyphosphate and Dr. Ilca Margineanu for help with the manuscript and some experiments. We are grateful to Dr. Alexei Savchenko for the gift of the pET15b vector for the expression of *NeuTTM* and helpful discussion. The structure of *NeuTTM* was determined by the Midwest Centre for Structural Genomics as part of NIH Protein Structure Initiative (Grants GM074942).

## REFERENCES

1. Lakaye, B., Makarchikov, A. F., Antunes, A. F., Zorzi, W., Coumans, B., De Pauw, E., Wins, P., Grisar, T., and Bettendorff, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13771-13777
2. Gangolf, M., Czerniecki, J., Radermecker, M., Detry, O., Nisolle, M., Jouan, C., Martin, D., Chantraine, F., Lakaye, B., Wins, P., Grisar, T., and Bettendorff, L. (2010) *PLoS One* **5**, e13616

3. Iyer, L. M., and Aravind, L. (2002) *BMC Genomics* **3**, 33
4. Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C., and Danchin, A. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3339-3344
5. Aravind, L., and Koonin, E. V. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 17-19
6. Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Johnson, R. A., Gosselin, G., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1999) *Science* **285**, 756-760
7. Gong, C., Smith, P., and Shuman, S. (2006) *RNA* **12**, 1468-1474
8. Lima, C. D., Wang, L. K., and Shuman, S. (1999) *Cell* **99**, 533-543
9. Song, J., Bettendorff, L., Tonelli, M., and Markley, J. L. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 10939-10948
10. Gallagher, D. T., Smith, N. N., Kim, S. K., Heroux, A., Robinson, H., and Reddy, P. T. (2006) *J. Mol. Biol.* **362**, 114-122
11. Gallagher, D. T., Kim, S. K., Robinson, H., and Reddy, P. T. (2011) *J. Mol. Biol.* **405**, 787-803
12. Keppetipola, N., Jain, R., and Shuman, S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 11941-11949
13. Jain, R., and Shuman, S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 31047-31057
14. Lunin, V. V., Skarina, T., Onopriyenko, O., Binkowski, T. A., Joachimiak, A., Edwards, A. M., and Savchenko, A. (2005) *Protein Data Bank 2FBL*
15. Lakaye, B., Wirtzfeld, B., Wins, P., Grisar, T., and Bettendorff, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 17142-17147
16. Bettendorff, L., Nghiêm, H. O., Wins, P., and Lakaye, B. (2003) *Anal. Biochem.* **322**, 190-197
17. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. in *Methods in Enzymology* (Carter, C. W., Jr, and Sweet, R. M. eds.), Academic Press, New York
18. Weeks, C. M., Shah, N., Green, M. L., and Miller, R. (2005) *Acta Cryst.* **A61**, C152
19. Cohen, S. X., Morris, R. J., Fernandez, F. J., Ben Jelloul, M., Kakaris, M., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Kleywegt, G. J., and Perrakis, A. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2222-2229
20. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Cryst.* **D53**, 240-255
21. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Cryst.* **D60**, 2126-2132
22. Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., 3rd, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2003) *Proteins* **50**, 437-450
23. Engh, R. A., and Huber, R. (1991) *Acta Cryst.* **A47**, 193-400
24. Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., and Candia, O. A. (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 95-97
25. Simonovic, A. D., Gaddameedhi, S., and Anderson, M. D. (2004) *Anal. Biochem.* **334**, 312-317
26. Hill, M., Dupaix, A., Volfín, P., Kurkdian, A., and Arrio, B. (1987) *Meth. Enzymol.* **148**, 132-141
27. Smith, N., Kim, S. K., Reddy, P. T., and Gallagher, D. T. (2006) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 200-204
28. Lakaye, B., Makarchikov, A. F., Wins, P., Margineanu, I., Roland, S., Lins, L., Aichour, R., Lebeau, L., El Moulaj, B., Zorzi, W., Coumans, B., Grisar, T., and Bettendorff, L. (2004) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 1348-1364
29. Gong, C., Martins, A., and Shuman, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 50843-50852
30. Ho, C. K., Pei, Y., and Shuman, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34151-34156
31. Bisailon, M., and Shuman, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 17261-17266
32. Baykov, A. A., Fabrichniy, I. P., Pohjanjoki, P., Zyryanov, A. B., and Lahti, R. (2000) *Biochemistry* **39**, 11939-11947
33. Gonzalez, M. A., Webb, M. R., Welsh, K. M., and Cooperman, B. S. (1984) *Biochemistry* **23**, 797-801
34. Zyryanov, A. B., Pohjanjoki, P., Kasho, V. N., Shestakov, A. S., Goldman, A., Lahti, R., and Baykov, A. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 17629-17634
35. Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A. K., Teplyakov, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., Lahti, R., and Goldman, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 3121-3126
36. Fabrichniy, I. P., Lehtio, L., Tammenkoski, M., Zyryanov, A. B., Oksanen, E., Baykov, A. A., Lahti, R., and Goldman, A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 1422-1431
37. Briley, P. A., Eisenthal, R., and Harrison, R. (1975) *Biochem. J.* **145**, 501-507
38. Wurst, H., and Kornberg, A. (1994) *J Biol. Chem.* **269**, 10996-11001



39. Fang, J., Ruiz, F. A., Docampo, M., Luo, S., Rodrigues, J. C., Motta, L. S., Rohloff, P., and Docampo, R. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 32501-32510
40. Tammenkoski, M., Koivula, K., Cusanelli, E., Zollo, M., Steegborn, C., Baykov, A. A., and Lahti, R. (2008) *Biochemistry* **47**, 9707-9713
41. Egorov, S. N., and Kulaev, I. S. (1976) *Biokhimiya* **41**, 1958-1967
42. Gong, C., and Shuman, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15317-15324
43. Issur, M., Despins, S., Bougie, I., and Bisailon, M. (2009) *Nucleic Acids Res.* **37**, 3714-3722
44. Gutteridge, A., and Thornton, J. M. (2005) *Trends Biochem. Sci.* **30**, 622-629
45. Kuo, C. C., Lin, K. Y., Hsu, Y. J., Lin, S. Y., Lin, Y. T., Chang, G. G., and Chou, W. Y. (2008) *Biochem. J.* **411**, 467-473
46. Hausmann, S., Pei, Y., and Shuman, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30487-30496
47. Kornberg, S. R., Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., and Kornberg, A. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 159-162
48. Perez Mato, I., Sanchez del Pino, M. M., Chamberlin, M. E., Mudd, S. H., Mato, J. M., and Corrales, F. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13803-13809
49. Switchenko, A. C., Primus, J. P., and Brown, G. M. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 754-760
50. Nghiêm, H. O., Bettendorff, L., and Changeux, J. P. (2000) *FASEB J.* **14**, 543-554
51. Tsutsui, K. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2645-2653
52. Moreno, B., Urbina, J. A., Oldfield, E., Bailey, B. N., Rodrigues, C. O., and Docampo, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28356-28362
53. Ault-Riche, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., and Kornberg, A. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1841-1847
54. Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kornberg, A. (2001) *Science* **293**, 705-708
55. Brown, M. R., and Kornberg, A. (2008) *Trends. Biochem. Sci.* **33**, 284-290
56. Rao, N. N., Gomez-Garcia, M. R., and Kornberg, A. (2009) *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 605-647

## FOOTNOTES

\* This study was supported by grants 2.4558.04 and 2.4508.10 from the “Fonds de la Recherche Fondamentale Collective” (FRFC) of the F.R.S.-FNRS to Lucien Bettendorff, Edwin De Pauw, and Bernard Lakaye and the NIH Protein Structure Initiative (Grant P50-GM62413-02) to Dr. Alexei Savchenko (Banting and Best Department of Medical Research, University of Toronto, Toronto, Ontario, M5G 1L6, Canada).

<sup>1</sup> Research Fellow of the Fonds pour la formation à la Recherche dans l’Industrie et dans l’Agriculture (FRIA).

<sup>2</sup> Present address : National Centre for Mass Spectrometry, Indian Institute of Chemical Technology, Uppal Road, Tarnaka, Hyderabad-500607, India.

<sup>3</sup> Research Associates of the Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS.

<sup>4</sup> Present address : Biosciences Center, National Renewable Energy Laboratory, 1617 Cole Blvd. MS 3323 Golden, CO 80401.

<sup>5</sup> Research Director of the Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS.

<sup>6</sup> Abbreviations: AC, adenylyl cyclase; cPPP<sub>i</sub>, cyclic trimetaphosphate; Gp<sub>4</sub>, guanosine 5'-tetrakisphosphate; NTP, nucleoside triphosphate; P<sub>4</sub>, inorganic tetraphosphate, PolyP, inorganic polyphosphate; PPPase, inorganic triphosphatase; PPP<sub>i</sub>, inorganic triphosphate; ThTP, thiamine triphosphate; ThTPase, thiamine triphosphatase; TTM, triphosphate tunnel metalloenzyme.

## KEYWORDS

CYTH domain, inorganic triphosphate, tripolyphosphate, *Nitrosomonas*, polyphosphates, triphosphate tunnel metalloenzymes, thiamine triphosphatase, Mg<sup>2+</sup>, ATP.

## LEGENDS TO FIGURES

**FIGURE 1. Structure of *NeuTTM*.** (A) Amino acid sequence and secondary structure elements. The residues conserved among known CYTH proteins (9) are highlighted by red boxes. (B) Cartoon representation of the *NeuTTM* monomer. Side chains of residues probably involved in substrate and divalent cation binding and/or catalysis are rendered as sticks and are labeled. (C) Stabilization of the open  $\beta$ -barrel structure by hydrophobic interactions with  $\alpha$ -turn4 and  $\alpha$ -helix5. The *NeuTTM* monomer is shown in a cartoon representation (grey). The residues forming a hydrophobic patch that stabilizes the protein core are shown in magenta sticks and labeled.

**FIGURE 2. Substrate specificity of recombinant His-tagged non-mutated *NeuTTM*.** The specificity was tested in the presence of (A) 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 9.7) or (B) 1 mM  $\text{MnCl}_2$  (pH 10.4). The incubation medium contained either 50 mM Na-CHES (pH 9.7) or 50 mM Na-CAPS (pH 10.4), 0.5 mM substrate, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 9.7) or 1 mM  $\text{MnCl}_2$  (pH 10.4). The temperature was 37 °C. (Mean  $\pm$  SD, n = 2 - 6)

**FIGURE 3. Kinetic properties of *NeuTTM* PPPase activity.** The  $\text{PPP}_i$  concentration was 0.5 mM. (A) Dependence on temperature in the presence of 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  at pH 9.7 ( $\circ$ ) or 0.8 mM  $\text{Mn}^{2+}$  at pH 10.4 ( $\bullet$ ). (B) pH dependence in the presence of 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\circ$ ) or 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\bullet$ ) at 37 °C. (C) Dependence on substrate concentration at pH 7.1 ( $\circ$ ) and 9.7 ( $\bullet$ ) at 37 °C. The curves were drawn by non-linear regression of the Michaelis-Menten equation (n = 3). The buffers used for different pH values are given in the “Materials and Methods” section. (Mean  $\pm$  SD)

**FIGURE 4. Activation of *NeuTTM* PPPase by divalent cations.** (A) Dependence of PPPase activity on  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\circ$ ) and  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\bullet$ ) total concentration. The incubation was carried out in the presence of 50 mM Na-CHES ( $\text{Mg}^{2+}$ , pH 9.7) or Na-CAPS ( $\text{Mn}^{2+}$ , pH 10.4) at 37 °C. (B) Effect of increasing concentrations of  $\text{Co}^{2+}$  (calculated free  $\text{Co}^{2+}$  concentration assuming  $K_d = 8$  nM for the  $\text{Co-PPP}_i$  complex) on the PPPase activity. Conditions of experiment:  $\text{PPP}_i$ , 0.5 mM; Na-CHES, 50 mM, pH 9.5, 45 °C. (Mean  $\pm$  SD, n = 3)

**FIGURE 5. Inhibition of *NeuTTM* PPPase by divalent cations.** (A) Inhibition by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ . The incubation medium contained:  $\text{PPP}_i$ , 0.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, Na-CHES, 50 mM, pH 9.7 at 37 °C. (B) Effect of increasing concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  (calculated free  $[\text{Mg}^{2+}]$ ) on *NeuTTM* PPPase activity in the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions at 50 °C. The incubation medium contained:  $\text{PPP}_i$ , 0.5 mM; Na-CHES, 50 mM, pH 9.7. (C) Effect of increasing concentrations of  $\text{ZnSO}_4$  on the PPPase activity of *NeuTTM*. The incubation medium contained:  $\text{PPP}_i$ , 0.5 mM;  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM; Na-CHES, 50 mM, pH 9.7 at 37 °C. (Mean  $\pm$  SD, n = 3)

**FIGURE 6. Mass spectra of His-tagged *NeuTTM* in the absence of added substrates and divalent cations.** M = monomer (theoretical mass = 19,987.4 Da) and M<sub>2</sub> = dimer (theoretical mass = 39,974.8 Da). (A) Spectrum recorded in harsher source conditions (RF lens 1 voltage = 150 V): the dimer is partially destroyed but the mass accuracy is higher. (B) Spectrum recorded in soft source conditions (RF lens 1 voltage = 50 V), showing that the dimer is the most abundant species in solution. The protein concentration was 10 μM in 100 mM ammonium acetate (pH 6.5).

**FIGURE 7. Mass spectra showing high specificity of *NeuTTM* for PPP<sub>i</sub> compared to ATP and ThTP.** (A) Spectrum of 10 μM protein alone in 100 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH = 6.5. (B) Same as (A) with 25 μM PPP<sub>i</sub>. (C) Same as (A) with 20 μM protein and 50 μM ATP. (D) Same as (A) with 25 μM ThTP instead of PPP<sub>i</sub>.

**FIGURE 8. Detailed identification of complexes of *NeuTTM* (10 μM) in binary and ternary mixtures with MgCl<sub>2</sub> (0.1 mM) and/or PPP<sub>i</sub> (25 μM).** The spectra were all recorded in 100 mM ammonium acetate (pH 6.5) at an RF lens 1 voltage = 150 V for a more accurate mass determination of each complex. (A) *NeuTTM* alone at charge state 8<sup>+</sup>. The main peak corresponds to the uptake of eight protons and few sodium or potassium adducts are detected. (B) *NeuTTM* binary mixture with Mg<sup>2+</sup>. The intensity of unresolved adducts peaks increases, but the fully protonated protein remains the most intense peak. (C) *NeuTTM* binary mixture with PPP<sub>i</sub>. The fully protonated complex is minor, and the major complexes take up two monovalent cations. (D) *NeuTTM* ternary mixture with PPP<sub>i</sub> and Mg<sup>2+</sup>. The enzyme-substrate complex with the uptake of one Mg<sup>2+</sup> is clearly detected.

**FIGURE 9. pH-dependence of non-mutated *NeuTTM* and of the Y28F and K52R mutants.** The reaction was carried out in the presence of 5 mM Mg<sup>2+</sup> at 37 °C. The control values obtained in the absence of enzyme were subtracted. (A)  $V_{\max}/K_m$  as a function of pH for the non-mutated enzyme. (B) pH-dependence of  $V_{\max}$  of non-mutated (●) and K52R-mutated (▲) *NeuTTM*. (C) The activities of Y28F (○) and K52R (▲) mutants are expressed as percentage of the respective value obtained at pH 9.7 (100%). The PPP<sub>i</sub> concentration was 0.1 mM. (D) pH-dependence of Y29F-mutated *NeuTTM*, [PPP<sub>i</sub>] = 0.1 mM). (Mean ± SD, n=3-6)

FIGURE 10. **Proposed catalytic mechanism for  $\text{PPP}_i$  hydrolysis by *NeuTTM*.** The K52-Y28 pair is considered to form a catalytic dyad. The most simple and plausible mechanism is a general acid - general base catalysis with no covalent acyl-enzyme intermediate.

**TABLE 1**

**X-ray data collection and refinement statistics.** Statistics for the highest resolution bin are in parentheses.

Data collection	
Space group	P 3 <sub>2</sub> 2 1
Unit cell (Å, °)	a= 52.28, b= 52.28, c = 252.48 α = β = 90.0 γ = 120.0
Wavelength (Å)	0.97959
Temperature (K)	100
Resolution (Å)	42.6-1.9 (1.95-1.9)
Observed reflections	32810 (2358)
$R_{\text{int}}^{\text{a}}$	0.057 (0.560)
Average redundancy	6.7 (4.9)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	20.5 (2.3)
Completeness, %	99.7 (99.0)
Refinement	
$R/R_{\text{free}}$	0.213 (0.304) / 0.270 (0.358)
Protein atoms	2424
Water molecules	324
Other atoms	20
RMSD from ideal bond length (Å) <sup>b</sup>	0.02
RMSD from ideal bond angles <sup>#</sup>	2.1°
Average B-factor for protein atoms (Å <sup>2</sup> )	30.3
Average B-factor for water molecules (Å <sup>2</sup> )	39.8
Ramachandran plot statistics (%) <sup>c</sup>	
Allowed	100
Favored	98.3
Outliers	0

<sup>a</sup>  $R_{\text{int}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum |I|$  where  $I$  is the intensity of an individual reflection and  $\langle I \rangle$  is the mean intensity of a group of equivalents and the sums are calculated over all reflections with more than one equivalent measured

<sup>b</sup> (23)

<sup>c</sup> (22)

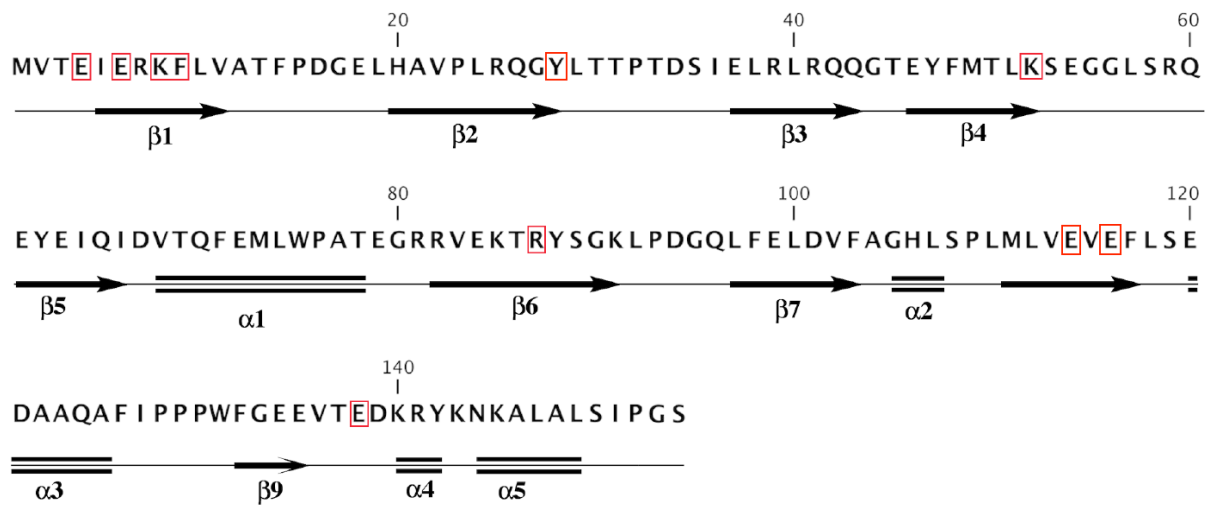
**TABLE 2**

**Kinetic parameters for non-mutated (WT) and mutated recombinant *NeuTTM*.** (Mean  $\pm$  SD, n = 3-4)

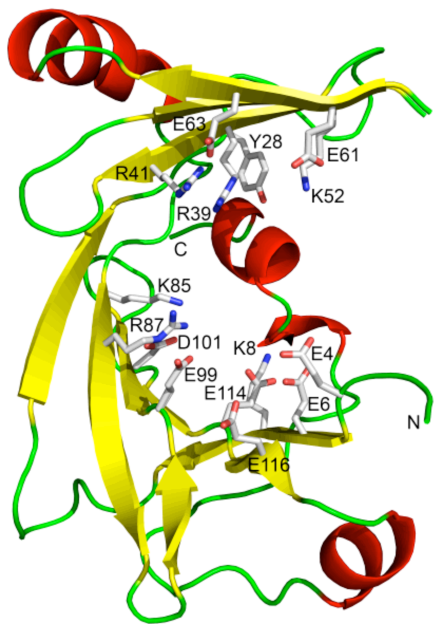
Enzyme preparation	Substrate	Conditions of experiment	$K_{m,app}$	$V_{max}$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
			$\mu M$	$\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$	$s^{-1}$	$s^{-1}/M^{-1}$
WT His-tagged	PPP <sub>i</sub>	50 °C, pH 9.7	40 $\pm$ 15	910 $\pm$ 70	288	7.2 10 <sup>6</sup>
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				
	37 °C, pH 9.7	21 $\pm$ 3	240 $\pm$ 30	76	3.6 10 <sup>6</sup>	
	[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM					
ATP	37 °C, pH 7.1	58 $\pm$ 5	60 $\pm$ 2	19	0.33 10 <sup>6</sup>	
	[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM					
WT untagged	ATP	50 °C, pH 8.1	800 $\pm$ 120	1.2 $\pm$ 0.2	0.36	0.45 10 <sup>3</sup>
		[Mn <sup>2+</sup> ] = 10 mM				
K8A His-tagged	PPP <sub>i</sub>	50 °C, pH 9.7	100 $\pm$ 20	25,000 $\pm$ 2000	7900	79 10 <sup>6</sup>
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				
	37 °C, pH 9.7	390 $\pm$ 30	2800 $\pm$ 500	887	2.3 10 <sup>6</sup>	
	[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM					
ATP	37 °C, pH 9.7	280 $\pm$ 55	235 $\pm$ 30	74	0.19 10 <sup>6</sup>	
	[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM					
K85A His-tagged	ATP	50 °C, pH 10.1	1200 $\pm$ 500	12.5 $\pm$ 3.2	3.96	3.3 10 <sup>3</sup>
		[Mn <sup>2+</sup> ] = 10 mM				
K52R His-tagged	PPP <sub>i</sub>	50 °C, pH 9.7	720 $\pm$ 60	65 $\pm$ 7	21	29 10 <sup>3</sup>
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				
K52R His-tagged	PPP <sub>i</sub>	37 °C, pH 9.7	2600 $\pm$ 400	33 $\pm$ 3	10	4 10 <sup>3</sup>
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				
K52R His-tagged	PPP <sub>i</sub>	37 °C, pH 9.7	191 $\pm$ 8	3.1 $\pm$ 0.1	0.98	5.1 10 <sup>3</sup>
		[Mg <sup>2+</sup> ] = 5 mM				

FIGURE 1. Structure of *NeuTTM*.

A



B



C

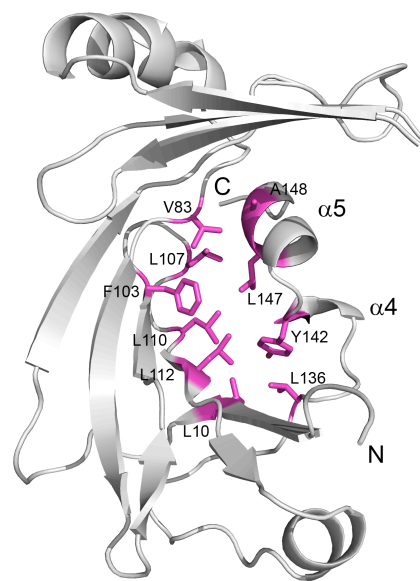


FIGURE 2. Substrate specificity of recombinant His-tagged non-mutated *Neu*TTM.

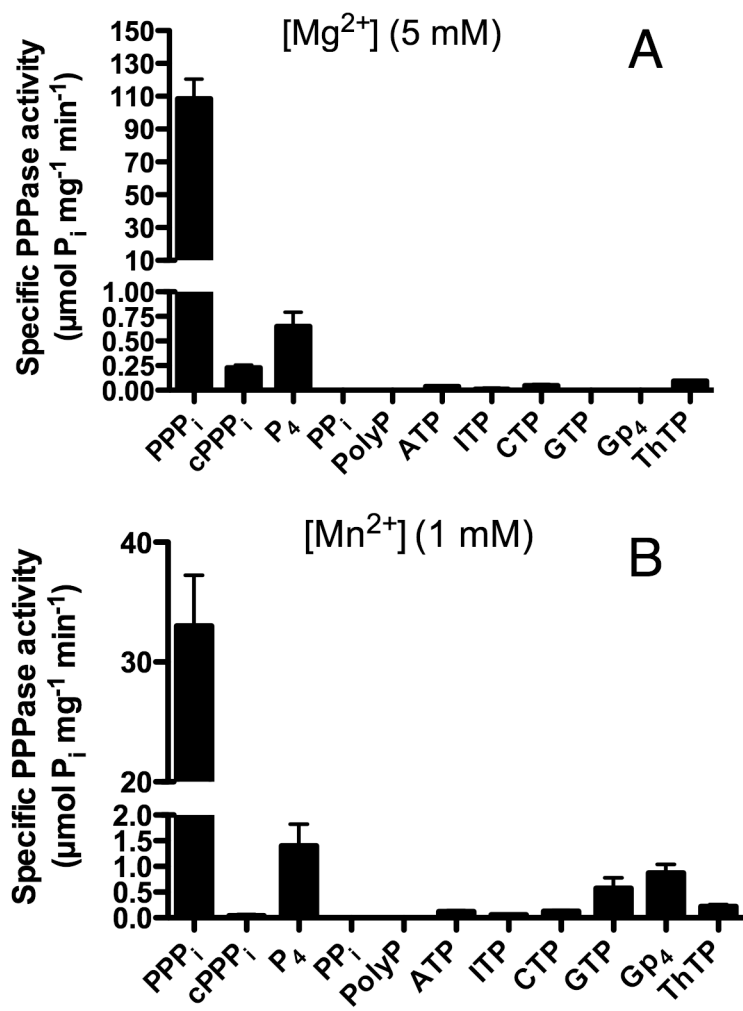




FIGURE 3. Kinetic properties of *NeuTTM* PPPase activity.

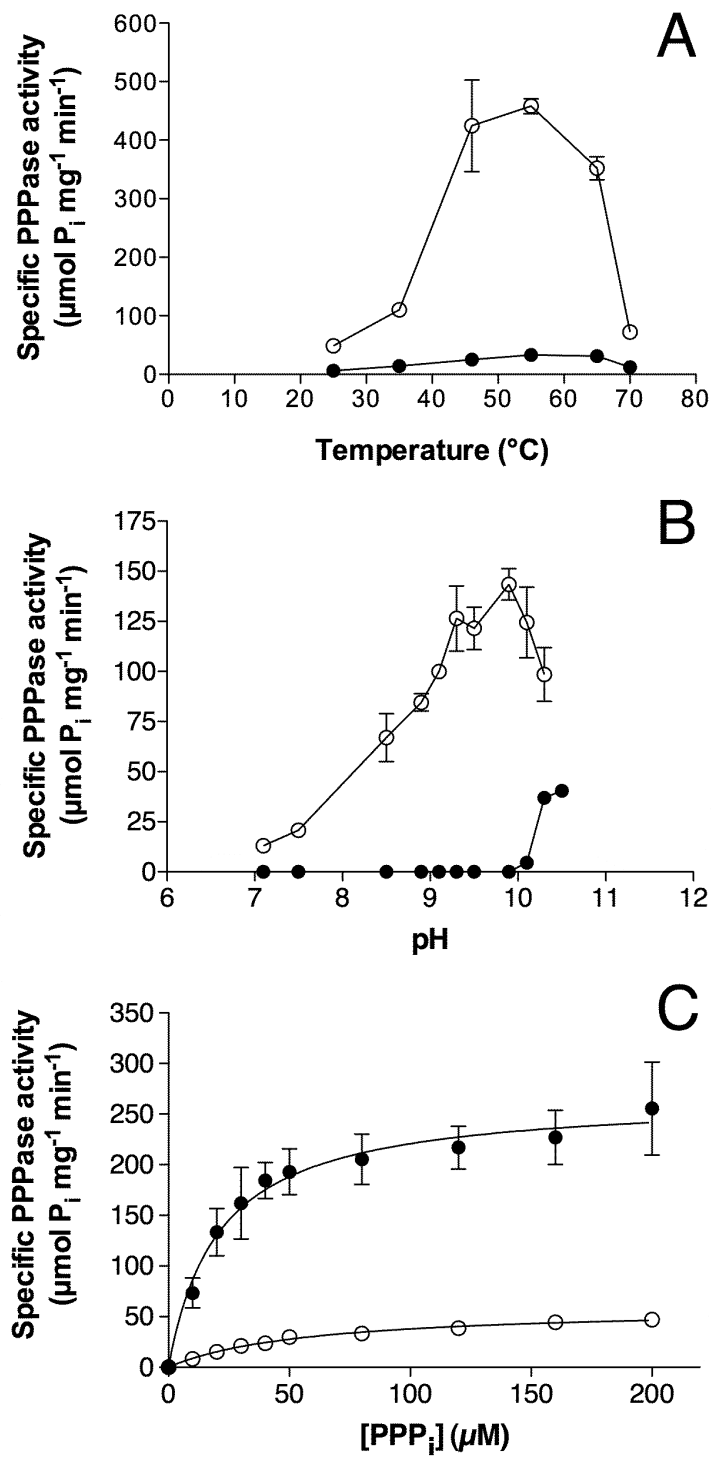


FIGURE 4. Activation of *Neu*TTM PPPase by divalent cations.

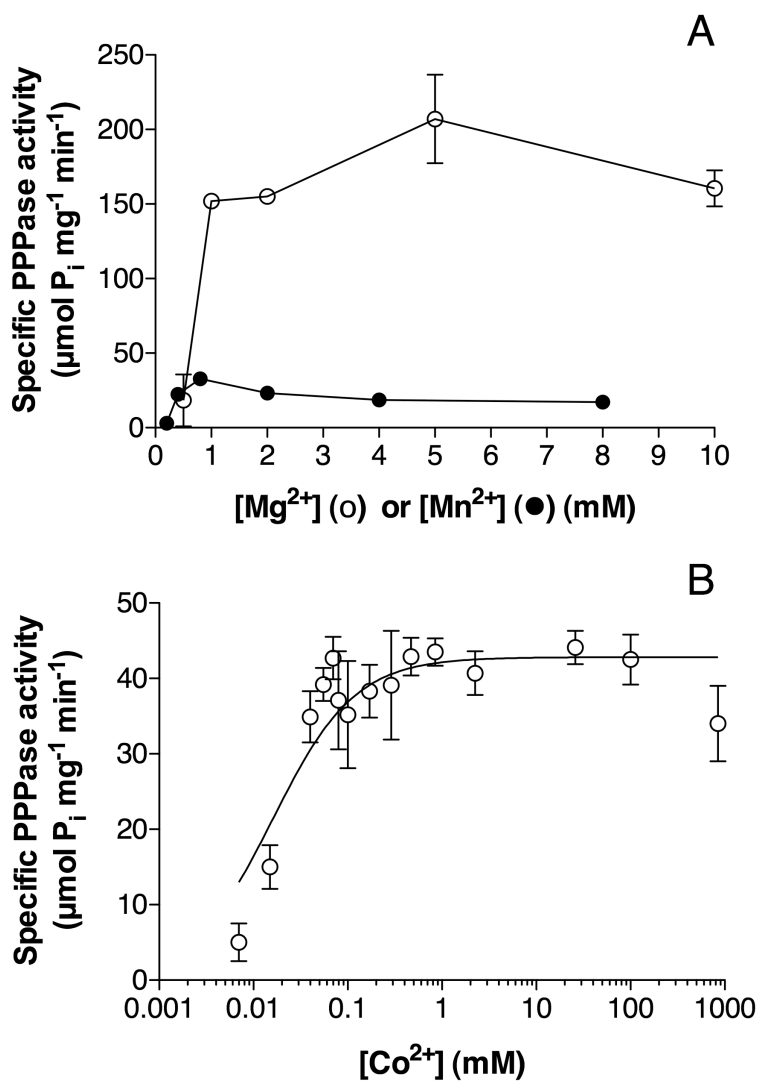


FIGURE 5. Inhibition of *NeuTTM* PPPase by divalent cations.

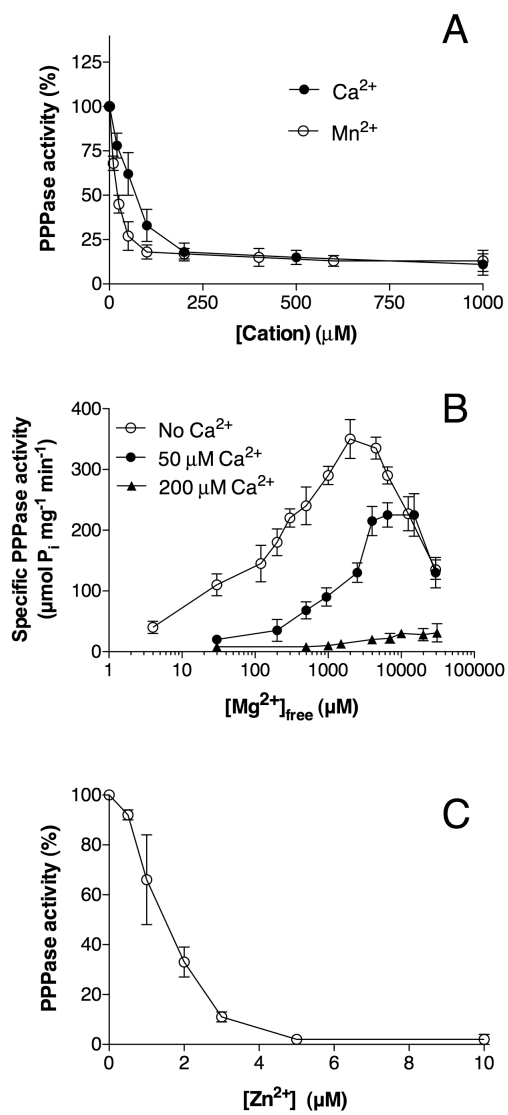


FIGURE 6. Mass spectra of His-tagged *NeuTTM* in the absence of added substrates and divalent cations.

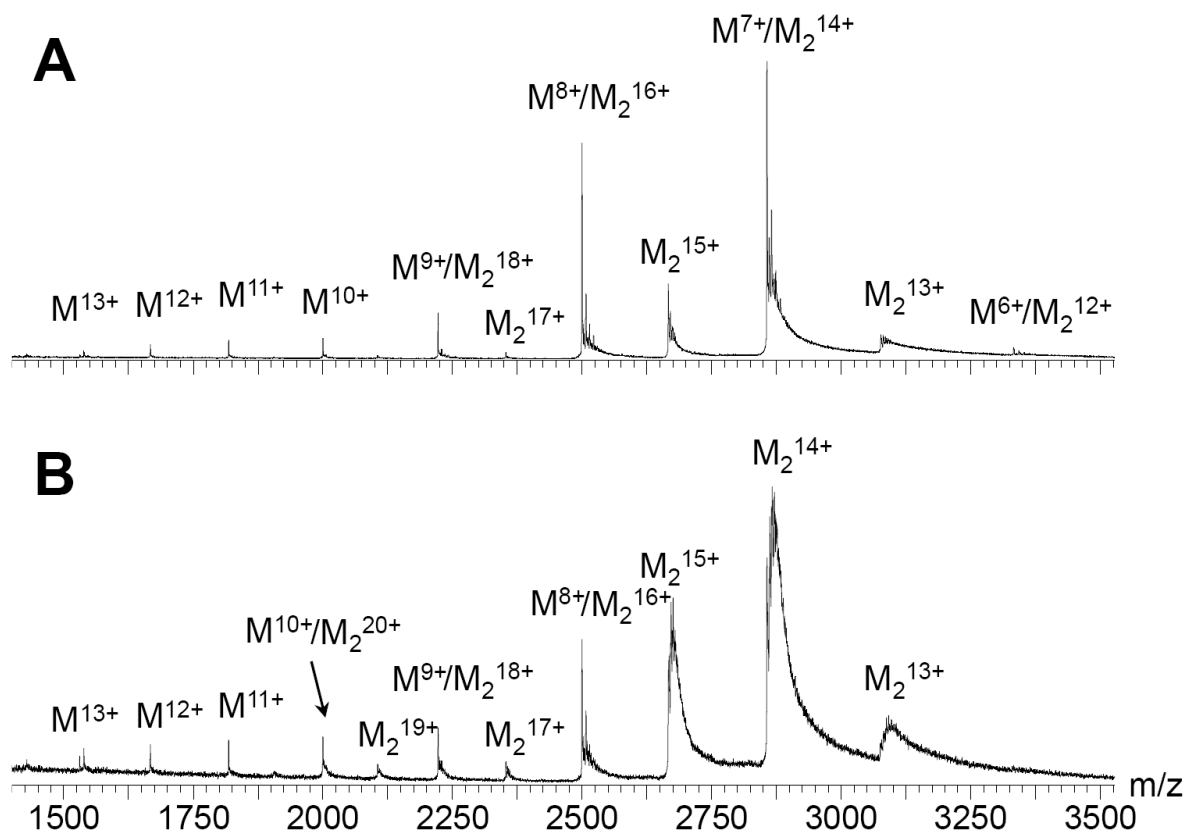


FIGURE 7. Mass spectra showing high specificity of *NeuTTM* for  $\text{PPP}_i$  compared to ATP and ThTP.

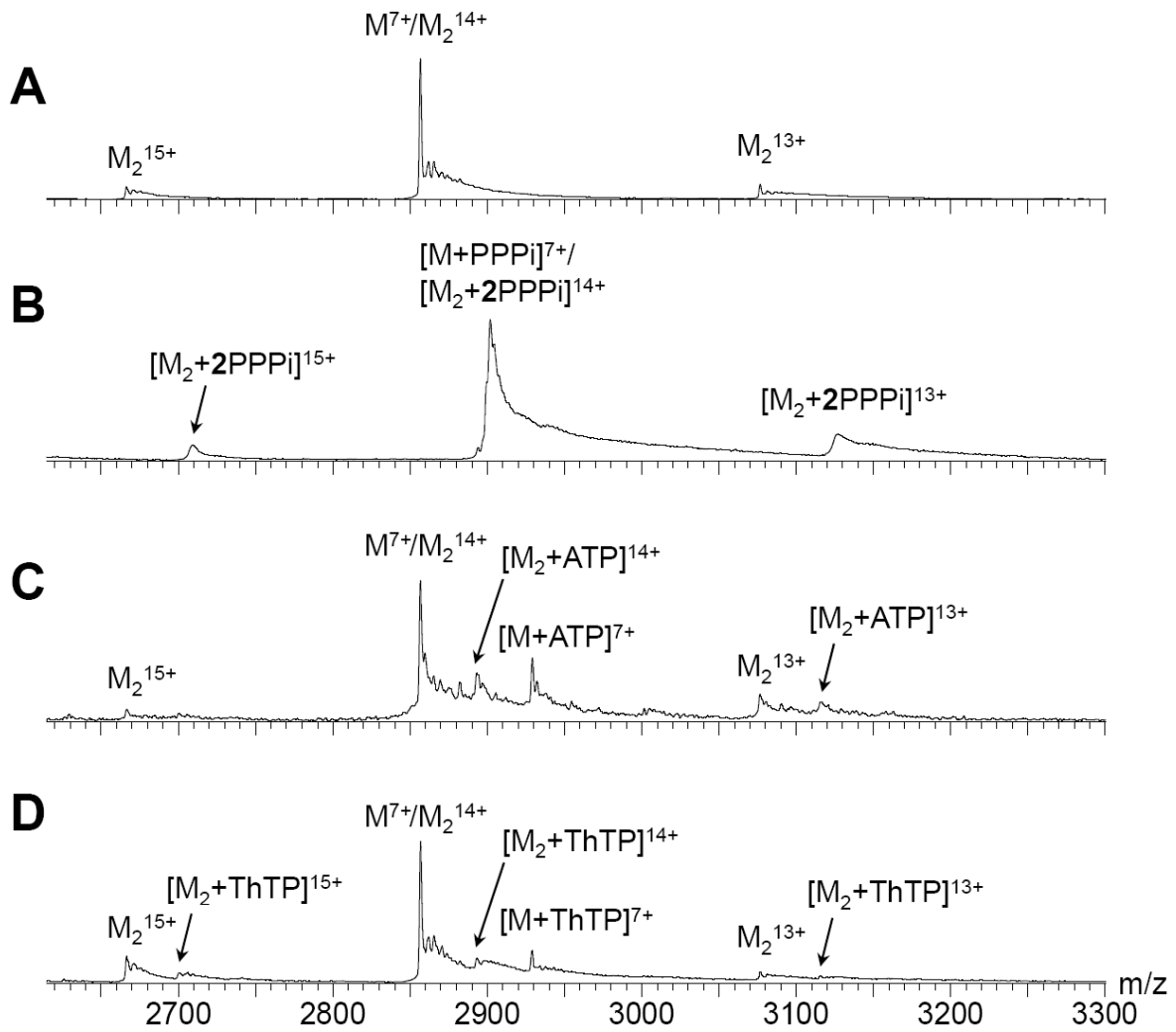


FIGURE 8. Detailed identification of complexes of *NeuTTM* (10  $\mu\text{M}$ ) in binary and ternary mixtures with  $\text{MgCl}_2$  (0.1 mM) and/or  $\text{PPP}_i$  (25  $\mu\text{M}$ ).

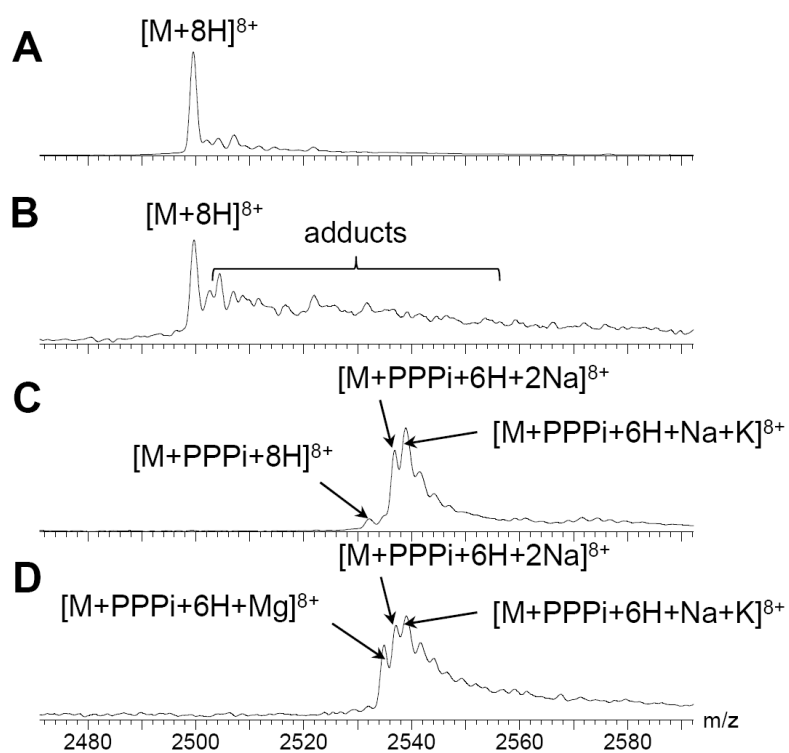


FIGURE 9. pH-dependence of non-mutated NeuTTM and of the Y28F and K52R mutants.

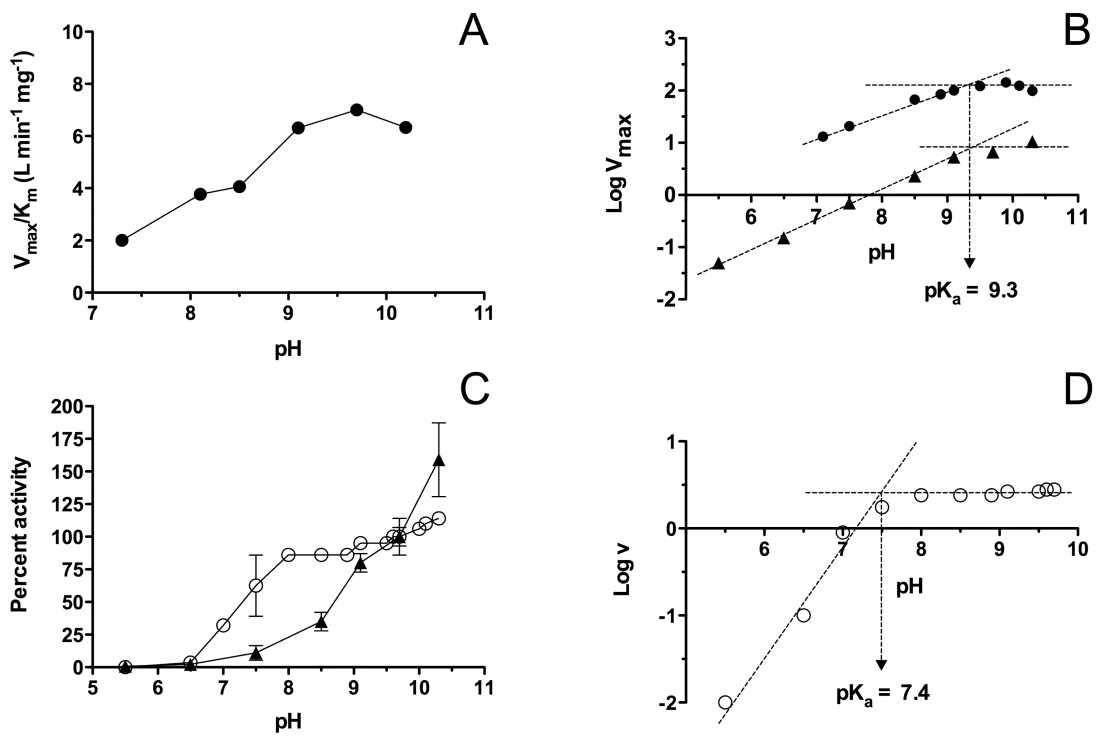
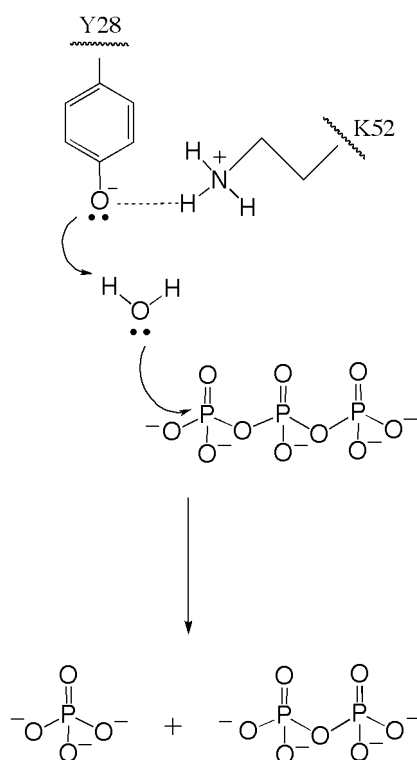


FIGURE 10. Proposed catalytic mechanism for  $\text{PPP}_i$  hydrolysis by *NeuTTM*.

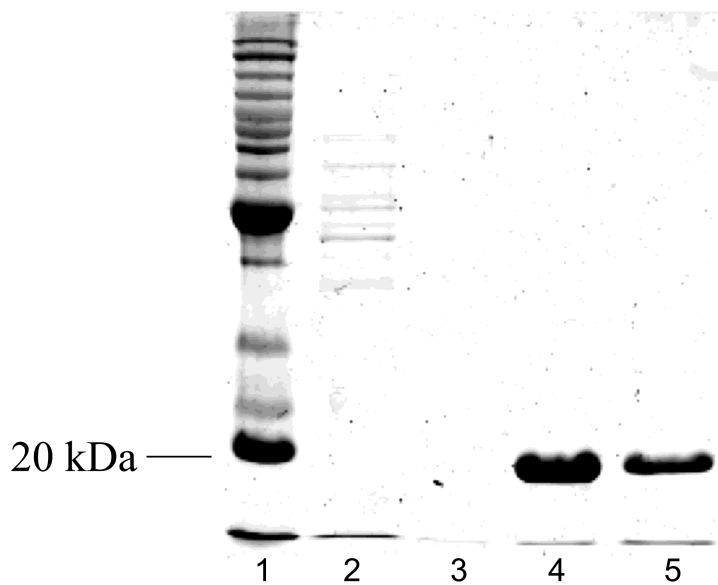




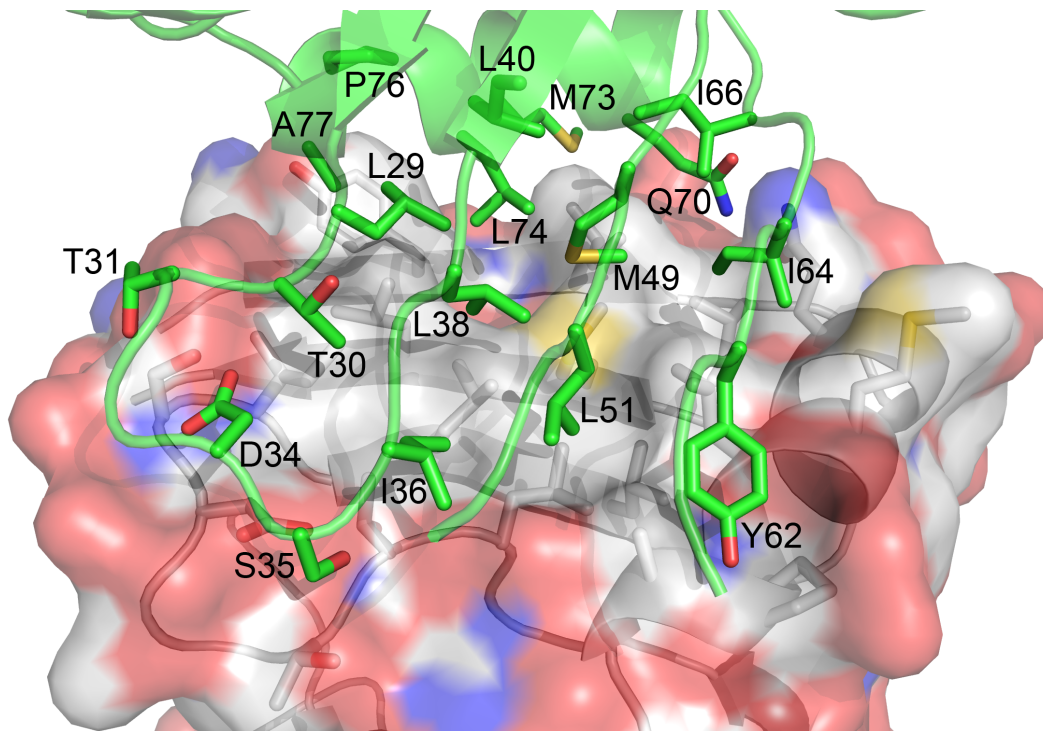
**A SPECIFIC INORGANIC TRIPHOSPHATASE FROM *NITROSOMONAS EUROPAEA*:  
STRUCTURE AND CATALYTIC MECHANISM**

**David Delvaux, Mamidanna R.V.S. Murty, Valérie Gabelica, Bernard Lakaye, Vladimir V. Lunin, Tatiana Skarina, Olena Onopriyenko, Gregory Kohn, Pierre Wins, Edwin De Pauw and Lucien Bettendorff**

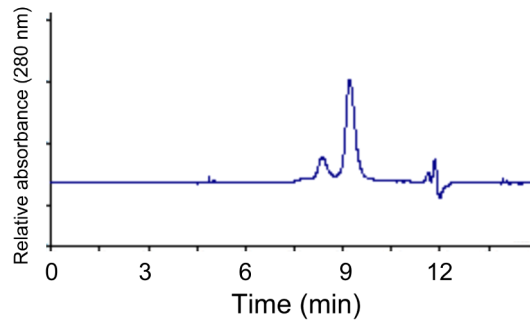
**Supplemental data**



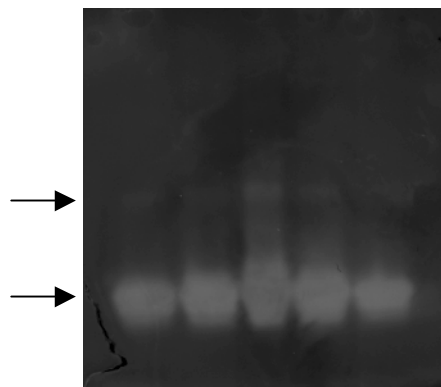
**SUPPLEMENTAL FIGURE S1. SDS-PAGE after the different purification steps of polyHis-tagged *NeuTTM*.** Lane 1, BenchMark™ Protein Ladder. Lane 2 and 3 represent the protein content of flow-through fractions that were eluted in binding buffer. Lane 4 and 5 represent the elution of His-tagged *NeuTTM* in elution buffer. It appears that almost all the protein of interest was recovered in the elution fractions and that the protein is very pure. The purification patterns of K8A, K85A, K52R and Y29F mutants were similar (not shown).



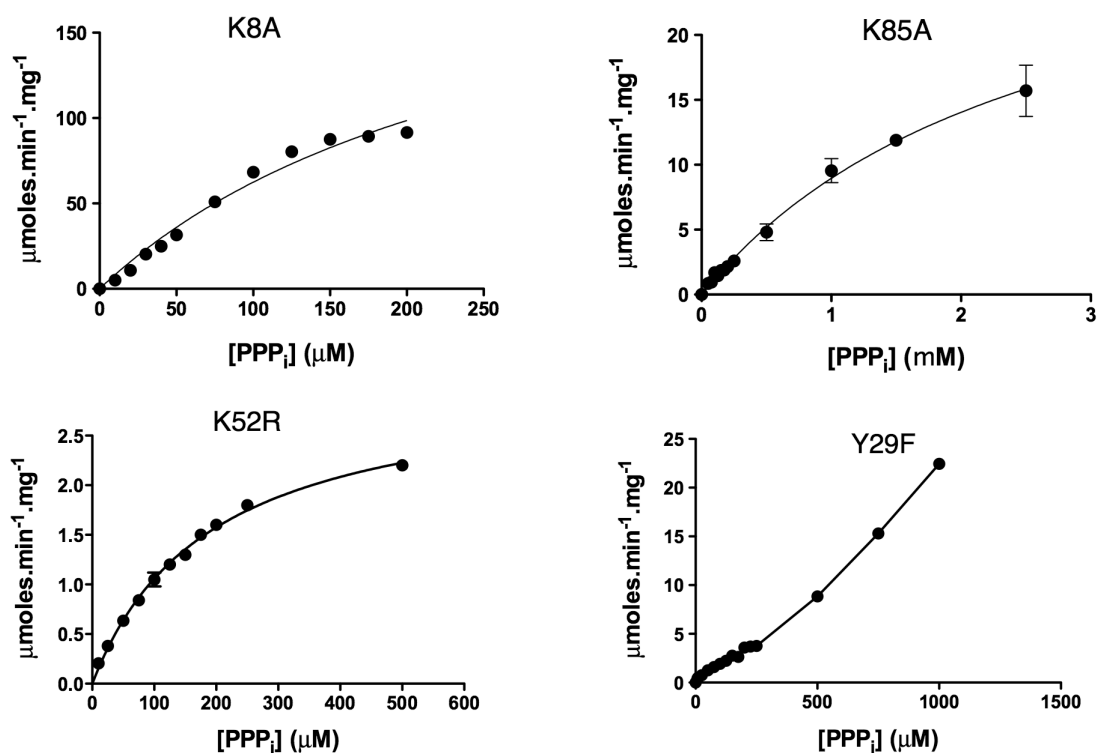
SUPPLEMENTAL FIGURE S2. **Dimerization interface of *NeuTTM***. Monomer A is shown in cartoon representation (green ribbon, green carbon atoms), while a semitransparent molecular surface is also rendered for the monomer B (grey carbon atoms). For both monomers, oxygen atoms are colored red, nitrogen atoms blue and sulfur atoms yellow. The residues forming the dimerization interface are shown as sticks for both monomers and labeled for monomer A.



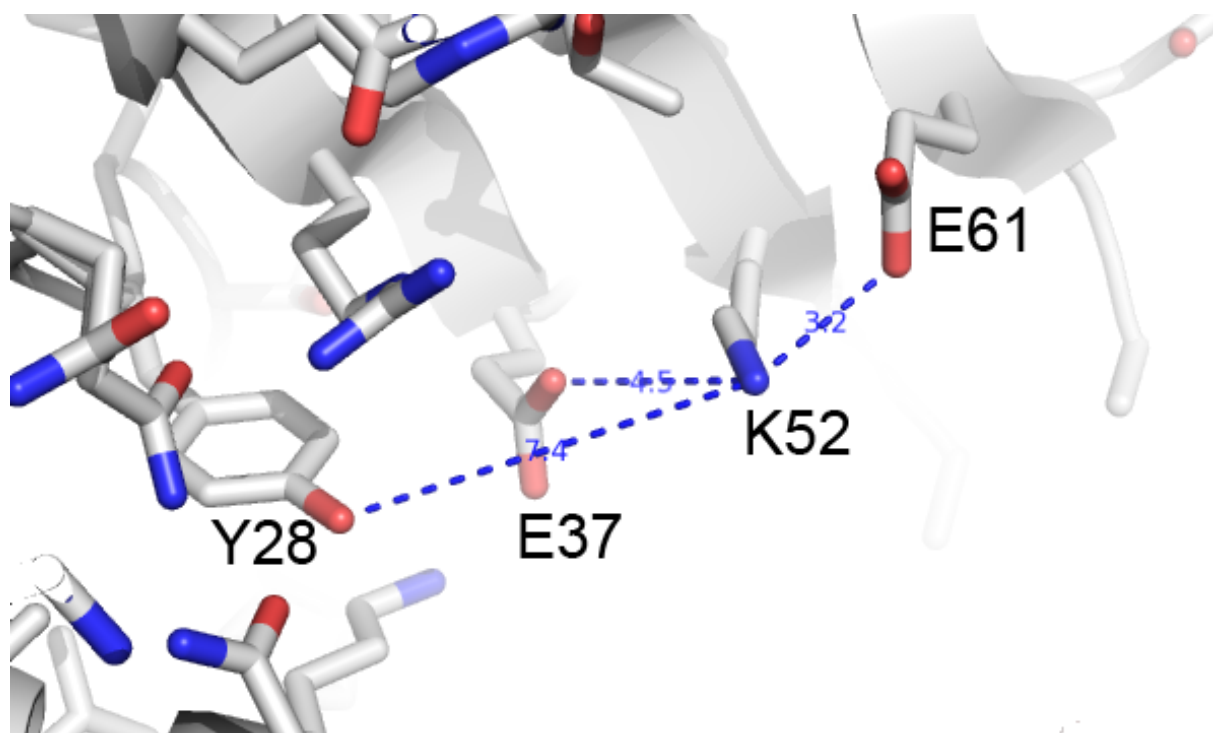
SUPPLEMENTAL FIGURE S3. **Separation of the monomer and the dimer of *NeuTTM* by size exclusion chromatography.** The TSK column (G3000SW, 30 x 0.75 cm, 7 mm) was equilibrated with 20 mM HEPES-Na (pH 6.8) and 200 mM NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min. A volume of 20  $\mu$ l of the protein solution (1.75 mg of protein / ml) were injected and the two peaks were collected for determination of enzyme activities.



SUPPLEMENTAL FIGURE S4. **In-gel activity determination of *NeuTTM* PPPase activity.** The active bands are colored in white. The higher dot shows the band corresponding to the dimer and the lower one to the monomer.



SUPPLEMENTAL FIGURE S5. **Substrate concentration-dependence of the PPPase activity in four *NeuTTM* mutants.** The enzymes were incubated at 37 °C in the presence of 5 mM Mg<sup>2+</sup> and 50 mM Na-CHES buffer, pH 9.7. The curves were obtained by non-linear regression of the Michaelis-Menten equation (n = 3) except for Y29A where a connecting line was used (n=6).



SUPPLEMENTAL FIGURE S6. The suggested catalytic dyad K52 and Y28 and the distances from K52NZ to the closest neighboring residues in the crystal structure.

### SUPPLEMENTAL TABLE S1

**Oligonucleotides used for site-directed mutagenesis.** The modified bases are in bold and underlined.

Primer	Sequence
K8A	Forward : 5'-CCGAGATCGAACG <b><u>C</u></b> CATTTCTCGTGGCAACTT-3' Reverse : 5'-AAGTTGCCACGAGAAAT <b><u>G</u></b> CGCGTTCGATCTCGG-3'
K85A	Forward : 5'-GCGGCGTGTAGAG <b><u>G</u></b> CAACCCGGTACAGTG-3' Reverse : 5'-CACTGTACCGGGTT <b><u>G</u></b> CCTCTACACGCCGC-3'
Y28F	Forward : 5'- CCGCTCCGTCAGGGCT <b><u>T</u></b> TCTGACCACCCACAG-3' Reverse : 5'- CTGTGGGGGTGGTCAGAA <b><u>A</u></b> AGCCCTGACGGAGCGG-3'
K52R	Forward : 5'- GAATATTTTCATGACGCTG <b><u>A</u></b> GATCCGAGGGTGGATTA-3' Reverse : 5'- TAATCCACCCTCGGAT <b><u>C</u></b> TCAGCGTCATGAAATATTC-3'

**SUPPLEMENTAL TABLE S2**

**PPPase activity of His-tagged K85A mutant *NeuTTM* in the presence of various concentrations of PPP<sub>i</sub> and divalent cations.** Incubations were carried out at 50 °C, pH 9.7 (n = 3-4).

[PPP <sub>i</sub> ]	Divalent cation	Divalent cation (free concentration)	Specific activity
<i>mM</i>		<i>mM</i>	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
0.5	Mg <sup>2+</sup>	2	4.0 ± 0.3
	Mg <sup>2+</sup>	5	4.2 ± 0.3
	Mn <sup>2+</sup>	1	6.0 ± 2.5
	Mn <sup>2+</sup>	4	18 ± 4
	Co <sup>2+</sup>	2	0.8 ± 0.6
	Zn <sup>2+</sup>	1	2.0 ± 0.5
	Zn <sup>2+</sup>	4	10 ± 2
2	Mg <sup>2+</sup>	2	27 ± 6
	Mg <sup>2+</sup>	5	55 ± 4
	Mn <sup>2+</sup>	1	80 ± 9
	Mn <sup>2+</sup>	4	70 ± 6
	Co <sup>2+</sup>	2	18 ± 6
	Zn <sup>2+</sup>	1	22 ± 7
	Zn <sup>2+</sup>	4	27 ± 5