



HAL
open science

Etude de l'ATPase Ca²⁺ du réticulum sarco/endoplasmique : Mise au point d'une nouvelle méthode de purification de SERCA1a de lapin exprimée chez *S. cerevisiae* permettant sa cristallisation et applications au mutant E309Q-Etude d'une autre isoforme, SERCA3a

Marie Habets Jidenko

► **To cite this version:**

Marie Habets Jidenko. Etude de l'ATPase Ca²⁺ du réticulum sarco/endoplasmique : Mise au point d'une nouvelle méthode de purification de SERCA1a de lapin exprimée chez *S. cerevisiae* permettant sa cristallisation et applications au mutant E309Q-Etude d'une autre isoforme, SERCA3a. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. NNT : . tel-00011204v2

HAL Id: tel-00011204

<https://theses.hal.science/tel-00011204v2>

Submitted on 23 Jun 2006

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

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

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Biochimie

Ecole Doctorale « Signalisations cellulaires, Endocrinologie, Reproduction »

Présentée et soutenue publiquement par

HABETS JIDENKO Marie

le 13 décembre 2005

ETUDE DE L'ATPASE Ca^{2+} DU RETICULUM SARCO/ENDOPLASMIQUE

MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE METHODE DE PURIFICATION DE SERCA1A DE LAPIN
EXPRIMEE CHEZ *S. CEREVISIAE* PERMETTANT SA CRISTALLISATION ET APPLICATIONS AU
MUTANT E309Q

ETUDE D'UNE AUTRE ISOFORME, SERCA3A

Directeur de thèse : M. LE MAIRE Marc

JURY

Mme MUS-VETEAU Isabelle (Rapporteur)

Mr POPOT Jean-Luc (Rapporteur)

Mme PEBAY-PEYROULA Eva (Examineur)

Mme ENOUF Jocelyne (Examineur)

Mr GHAZI Alexandre (Examineur)

Mme JAXEL Christine (Examineur)

Mr le MAIRE Marc (Examineur)

Cette thèse a été réalisée au CEA de Saclay, dans le Service de Biophysique des Fonctions Membranaires, dirigé par Marc Lutz puis par Bruno Robert. Je les remercie de m'avoir accueillie au sein de leur unité. Grâce au financement de ma thèse par une bourse CEA, je suis consciente d'avoir pu mener à bout ce travail dans bonnes conditions, aussi bien professionnelles que personnelles, chose encore trop rare pour les jeunes doctorants français à l'heure actuelle.

Je tiens à remercier particulièrement Mme Isabelle Mus-Veteau et Mr Jean-Luc Popot d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie également Mme E. Pebay-Peyroula, Mme J. Enouf et Mr A. Ghazi, d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse un grand merci à ceux qui ont été mes deux directeurs de thèse : Christine Jaxel et Marc le Maire. Certains étudiants ont du mal à trouver un « bon » encadrant de thèse, j'estime avoir eu la chance d'en avoir eu deux ! Christine, merci pour ton encadrement au jour le jour, pour m'avoir transmis tout ton savoir-faire, notamment en biologie moléculaire, pour tes conseils, pour ta rigueur, ta disponibilité... Marc, merci de m'avoir fait partager ton recul, ta connaissance et ton savoir-faire sur l'ATPase Ca^{2+} et les protéines membranaires et d'avoir toujours été très disponible en dépit de ton emploi du temps parfois chargé ! Merci à tous les deux de m'avoir permis de m'ouvrir vers l'extérieur, en me faisant participer à des ateliers GDR, ou à des congrès, en m'envoyant au Danemark, en me proposant et me soutenant dans des collaborations.

Différentes collaborations m'ont permis de m'enrichir à la fois scientifiquement et humainement. J'ai eu la chance de pouvoir partir à plusieurs reprises travailler dans un laboratoire étranger. Merci à Jesper Møller et Poul Nissen de l'Université de Aarhus d'avoir accepté de m'accueillir dans leurs laboratoires. Merci également à tous les autres membres de leurs deux équipes pour leur accueil sympathique, en particulier Bitten, Rikke, Anne Marie et Claus. Thanks for your hearty welcome, your help and friendship! It would be really a pleasure to see you again...

Je voudrais également remercier ceux qui m'ont permis d'approcher les SERCAs par un versant « biologie cellulaire ». Merci à Jocelyne Enouf de m'avoir transmis des cellules HEK et des anticorps spécifiques SERCA3. Merci surtout pour ses conseils concernant l'interprétation des résultats que nous avons pu avoir sur SERCA3, ses encouragements et sa très grande gentillesse. Un merci tout particulier à Jean Marc Verbavatz et à son équipe, Renée, Isabelle et Mathieu, qui m'ont fait découvrir les différentes techniques de

microscopie, et sans qui tout le travail présenté sur la localisation cellulaire de SERCA3a n'aurait pu être fait : je garderai un très bon souvenir des moments passés avec vous et des discussions, scientifiques ou non, que nous avons échangées.

Je tiens à remercier les autres membres du laboratoire pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir de manière informelle ou lors des réunions de laboratoire. Ces réunions ont pour moi été l'occasion de présenter mes travaux, d'écouter les présentations des autres membres du laboratoire et de participer à des discussions scientifiques enrichissantes. Merci donc en particulier à Philippe Champeil, Martin Picard, Guillaume Lenoir, Cédric Montigny et Stéphane Orłowski.

Merci à toutes les personnes, chercheurs d'autres équipes, étudiants, personnels administratifs, qui ont contribué à ce que je me sente à l'aise au laboratoire grâce à leur bonne humeur et à leur sympathie: Solenne, Martin, Véronica, Maité, Milena, David, Carole, Aurélie, Pauline et pleins d'autres qui, je l'espère, se reconnaîtront et ne m'en voudront pas de ne pas les citer...

Ce manuscrit marque la fin de ma thèse, et par-là même, officiellement, la fin de mon statut d'étudiant. A cette occasion, j'ai une pensée particulière pour les enseignants que j'ai pu rencontrer au cours de ma scolarité, du primaire aux études supérieures, qui m'ont permis d'en arriver là, en me donnant le goût des études, mélange complexe de curiosité, de réflexion, d'envie de savoir... Je leur dédis cette thèse, en particulier à Mr Sorret, en espérant prendre dignement leur suite devant mes futurs étudiants...

Et pour finir, je voudrais remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenue et guidée, sans chercher à influencer mes choix. Mille mercis d'avoir permis que je devienne ce que je suis. Un grand merci également à Nicolas pour son soutien de tous les jours, parfois malgré la distance...

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	5
ABREVIATIONS.....	11
Chapitre I : Introduction.....	15
I.1 Introduction générale.....	17
I.2 Les SERCAs	20
I.2.1 Les SERCAs, des protéines de la famille des ATPases dites de type P	20
I.2.1.1 Généralités sur la famille des ATPases de type P	20
I.2.1.2 Présentation des quelques membres de la famille des ATPases de type P rencontrés dans les cellules de Mammifères.....	23
I.2.2 Présentation des différentes isoformes de la famille SERCA	25
I.2.2.1 Les isoformes SERCA1	25
I.2.2.2 Les isoformes SERCA2	26
I.2.2.3 Les isoformes SERCA3	27
I.2.3 Les caractéristiques fonctionnelles des SERCAs	32
I.2.3.1 Présentation du cycle catalytique.....	32
I.2.3.2 Différences fonctionnelles entre les différentes isoformes SERCAs...35	
I.2.4 Les caractéristiques structurales des SERCAs et les relations structure/fonction.....	41
I.2.4.1 Caractéristiques structurales générales	41
I.2.4.2 Les relations structure/fonction	45
I.3 Expression et purification de protéines membranaires d'Eucaryotes supérieurs .53	
I.3.1 Les différents systèmes d'expression utilisés pour des protéines membranaires d'Eucaryotes supérieurs.....	54
I.3.1.1 Utilisation d'un système procaryote, <i>E. coli</i>	54
I.3.1.2 Utilisation d'un système eucaryote simple : les levures	56
I.3.1.3 Utilisation de cellules d'insectes.....	58
I.3.1.4 L'ovocyte de xénope	60

I.3.1.5 Les cellules de Mammifères	60
I.3.1.6 Les systèmes d'expression <i>in vitro</i>	61
I.3.1.7 Comparaison de ces systèmes pour l'expression hétérologue de SERCA1a	63
I.3.2 Une étape supplémentaire par rapport aux protéines solubles : la solubilisation.....	69
I.3.3 Les systèmes de purification	75
I.3.3.1 Affinité de la protéine d'intérêt pour un anticorps ou pour un ligand....	76
I.3.3.2 Chromatographie d'affinité de métal immobilisé (IMAC : Immobilized- Metal Affinity Chromatography)	78
I.3.3.3 Le système avidine-biotine.....	80
I.3.3.4 Quelques variations possibles lors de la purification d'une protéine membranaire.....	83
I.4 Objectifs de mon travail de thèse.....	88
Chapitre II : Techniques utilisées : principes et protocoles	91
II.1 Clonage des gènes d'intérêt dans un vecteur navette et transformation de ce vecteur chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
II.1.1 Description du vecteur navette utilisé	93
II.1.2 Préparation des constructions chez <i>E. coli</i>	95
II.1.2.1 Stratégies choisies pour le clonage des différentes SERCA étudiées :95	
II.1.2.2 Réalisation, amplification et séquençage des constructions plasmidiques :	98
II.1.3 Transformation de <i>S. cerevisiae</i> par le vecteur navette.....	101
II.1.3.1 Présentation de la souche de levure utilisée :	101
II.1.3.2 Transformation des levures :	104
II.2 Expression et purification des SERCAs.....	105
II.2.1 Mini expression :	105
II.2.2 Maxi expression :	106
II.2.3 Fractionnement	106
II.2.4 Solubilisation et Cinétique de solubilisation.....	109

II.2.5 Purification par le système « avidine » :	109
II.2.6 Purification par gel filtration en HPLC.....	110
II.3 Analyses biochimiques.....	111
II.3.1 Analyses par SDS-PAGE et western blots.....	111
II.3.2 Dosage des protéines totales :.....	113
II.3.3 Mesures de la quantité de détergent présent dans un échantillon	113
II.3.3.1 Utilisation du comptage en liquide de scintillation	114
II.3.3.2 Suivi du devenir d'un détergent au cours d'un passage sur colonne de gel filtration en HPLC ou dans les étapes expérimentales suivantes.....	114
II.3.4 Reconstitution de l'ATPase en liposomes	114
II.3.4.1 Ajout de lipides EYPC/EYPA	115
II.3.4.2 Reconstitution en liposomes de DOPC.....	115
II.3.5 Mesure d'activité ATPasique :	116
II.3.6 Mesure du transport de calcium	118
II.4 Biologie cellulaire et microscopie.....	119
II.4.1 Culture des cellules HEK	119
II.4.2 Observation de la localisation de SERCA en immunohistochimie	120
II.4.2.1 Préparation des cellules ou du tissu.....	120
II.4.2.2 Observations au microscope à fluorescence ou au microscope confocal.	120
II.5 Cristallographie :	122
II.5.1 Principe de la détermination de la structure 3D de protéines par cristallographie aux rayons X.	122
II.5.2 Préparation en vue de l'obtention de cristaux de SERCA.....	125
Chapitre III : Résultats et Discussions	127
III.1 Mise au point d'une nouvelle technique de purification de SERCA1a	129
III.1.1 Insertion d'un domaine accepteur de biotine.....	129
III.1.2 Expression dans la levure <i>S. cerevisiae</i>	130
III.1.3 Traitement des membranes avant passage sur colonne de chromatographie	132

III.1.3.1	Addition d'une étape de décapage.....	132
III.1.3.2	Solubilisation	134
III.1.4	Purification grâce à une chromatographie d'affinité.....	135
III.1.4.1	Fixation sur la résine.....	135
III.1.4.2	Elution	138
III.1.4.3	Propriétés de l'ATPase purifiée	141
III.1.5	Optimisation de la purification grâce à l'ajout d'une étape de chromatographie d'exclusion par la taille en HPLC.....	146
III.1.6	Comparaison par rapport à la purification « histidine ».....	147
III.1.7	Discussion:	148
III.2	Essais de cristallisation sur l'ATPase sauvage purifiée et sur le mutant E309Q	151
III.2.1	Echange de détergent au cours de l'étape de purification par HPLC	151
III.2.2	Préparation de l'échantillon pour les essais de cristallisation	152
III.2.3	Obtention de cristaux de l'ATPase sauvage.....	154
III.2.4	Essais de cristallisation du mutant E309Q.....	154
III.2.4.1	Purification du mutant E309Q.....	154
III.2.4.2	Essais de cristallisation du mutant E309Q	157
III.2.5	Discussion.....	161
III.2.5.1	Cristallisation de l'ATPase sauvage	161
III.2.5.2	Essais de cristallisation du mutant	162
III.3	Etude de l'isoforme SERCA3.....	167
III.3.1	Essais d'expression et de purification de SERCA3a de rat.....	167
III.3.1.1	Expression de SERCA3a de rat dans <i>S. cerevisiae</i>	167
III.3.1.2	Essai de purification de SERCA3a de rat	169
III.3.1.3	Tentatives d'amélioration de l'expression de SERCA3a de rat.	171
III.4	Localisation cellulaire.....	176
III.4.1	Analyses de cellules HEK transfectées par un vecteur d'expression contenant ou non SERCA3.....	176
III.4.2	Analyses de cellules humaines non transfectées et d'un tissu, la peau.	178

III.4.2.1 Utilisation de lignées cellulaires	178
III.4.2.2 Analyse d'un tissu humain: la peau	178
III.4.3 Discussion.....	182
III.4.3.1 Essais d'expression et de purification	182
III.4.3.2 Localisation cellulaire de SERCA3	183
Chapitre IV : Conclusions et Perspectives	187
Chapitre V : Bibliographie	193
Annexes	213
Article I	215
Article II	229
Article III.....	237

ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

ADP: adénosine diphosphate

AMPPCP: adénosine 5'-(β,γ -méthylènetriphosphate).

ARNm: ARN messenger

ATP: adénosine triphosphate

BAD: domaine accepteur de biotine

BCA: acide bicinchonique

BSA: Bovine serum albumine (albumine sérique bovine)

C₁₂E₈: octaéthylèneglycol monododécyléther.

CAPS: acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique.

COS: cellules de singes transformées par un virus SV-40 déficient au niveau de son origine de réplication

DDM: dodécyl maltoside

ddNTP: didésoxynucléotides triphosphates

DO: densité optique

DTT: dithiothréitol

E1/E2: états conformationnels de l'ATPase-Ca²⁺ de haute affinité (E1) ou de basse affinité (E2) pour le calcium

EDTA: acide éthylènediamine tétraacétique

EGTA: acide [éthylènebis-(oxyéthylènenitrilo)] tétraacétique

ER/SR: réticulum endoplasmique/réticulum sarcoplasmique

EYPA: acide phosphatidique extrait de jaune d'oeuf

EYPC: phosphatidylcholine extraite de jaune d'oeuf

g/g: gramme/gramme

HEK: cellules embryonnaires rénales humaines

HEPES: acide N-2-hydroxy éthyl piperazine-N'-2-éthanesulfonique

IP3: Inositol triphosphate
LDH: lactate déshydrogénase
LiCl: chlorure de lithium
LPC: L- α -lysophosphatidylcholine
m/v:masse/volume
MES: acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique
MNKP: Protéine de la maladie de Menkes
MOPS: acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique
MPD: 2-Methyl-2.4-Pentanediol
NADH: acide α -nicotinamide adénine dinucléotide
Ni-NTA: Ni²⁺-acide nitrilo-triacétique
PBS:solution saline tamponné par le phosphate
PBS-T : phosphate buffer saline-tween
PCR: réaction de polymérisation en chaîne
PEG: polyéthylèneglycol
PEP: phosphoénolpyruvate
Pi: phosphate inorganique
PK: pyruvate kinase
PMCA: ATPase-Ca²⁺ de la membrane plasmique
PMSF:phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride
PTD:Passe tout droit
PVDF: polyvinylidène difluoride
qsp:quantité suffisante pour
RE: réticulum endoplasmique
RMN: résonance magnétique nucléaire
ROCs: Receptor operated channels: canaux dépendant d'un récepteur
RS: réticulum sarcoplasmique
RYR: récepteur à la ryanodine.
SDS: dodécyl sulfate de sodium.
SDS-PAGE: électrophorèses dénaturantes sur gel de polyacrylamide.

SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase

SERCAi-BAD: Protéine SERCAi fusionnée à BAD

SLN: sarcolipine

SOCs: Second messenger operated channels: canaux dépendants d'un second messenger

t-butanol: *tert*-butanol

TCA: acide trichloroacétique

TES: acide 2-[[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl]amino]éthanesulfonique

TG: thapsigargine

Tris: tris(hydroxyméthyl)aminoéthane

UV: ultraviolet

VOCs: Voltage operated channels: canaux dépendants du voltage

W NDP: Protéine de la maladie de Wilson

WT: ATPase-Ca²⁺ de séquence sauvage

YSiBAD: vecteur contenant l'insert codant pour la protéine de fusion SERCAiBAD

Chapitre I : INTRODUCTION

I.1 Introduction générale

Le calcium cytoplasmique est un messager intracellulaire ubiquitaire et intervient dans de nombreuses voies de signalisation, contrôlant ainsi de nombreuses fonctions de la physiologie cellulaire. Ainsi, des variations de la concentration en calcium cytosolique peuvent réguler la transcription, modifier la fonction de certaines classes d'enzymes comme les kinases, les phosphatases ou les phospholipases, contrôler le cycle cellulaire ou encore intervenir dans la contraction musculaire. Pour que ceci soit possible, la concentration de calcium libre intracellulaire doit être finement régulée. Celle-ci est la résultante de mécanismes qui augmentent, diminuent ou tamponnent cette concentration (cf. Figure I.1-1 et pour revue voir Berridge *et al.*, 2003). Un organe jouant un rôle important dans l'homéostasie calcique est le réticulum endo- ou sarcoplasmique, principal compartiment dynamique de stockage de calcium : le calcium stocké peut être libéré dans le cytoplasme par des canaux ioniques tels que le récepteur canal IP3 ou le récepteur à la ryanodine suite à leur stimulation par des ligands spécifiques. Le stockage, quant à lui, est assuré par pompage du calcium cytoplasmique libre vers la lumière du RE/RS. Ce transport actif est assuré par les ATPases calciques du réticulum sarco(endoplasmique, désignés par l'acronyme SERCAs (*Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases*). Ces pompes jouent donc un rôle majeur dans la régulation à court terme des niveaux de calcium cytosolique libre et la compréhension des signaux calciques dépend, en partie, de la connaissance de leur fonctionnement.

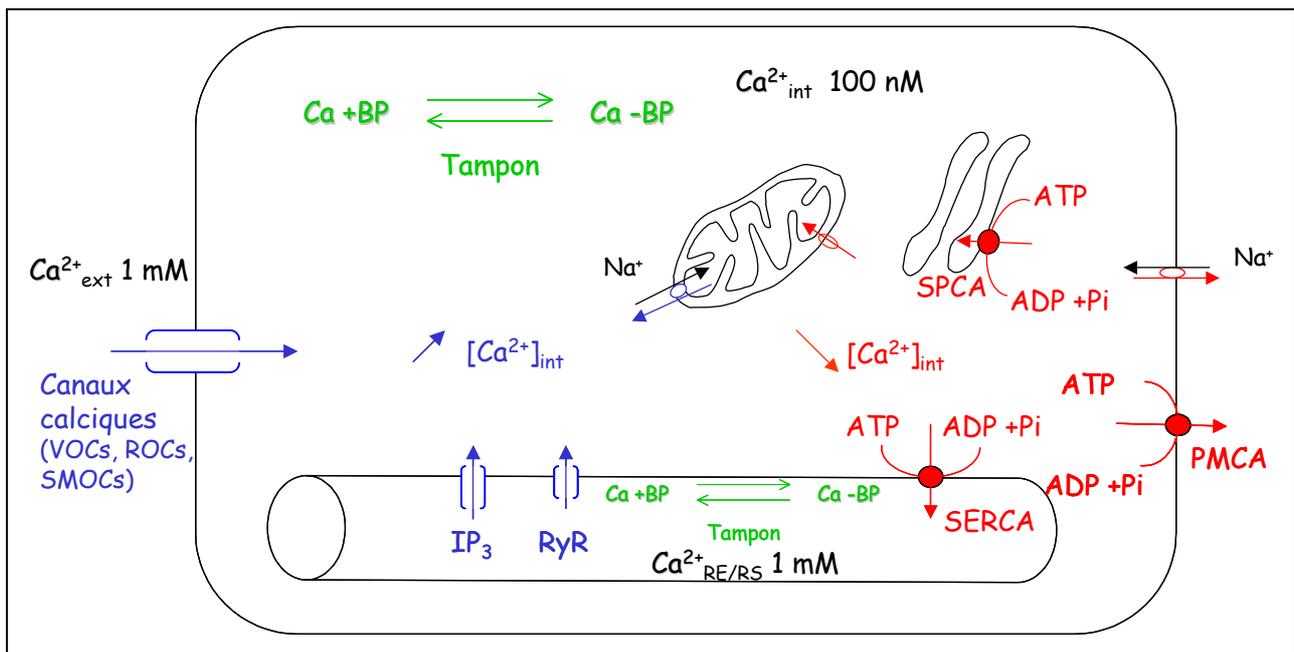


Figure I.1-1 Les principaux acteurs de l'homéostasie calcique intracellulaire

BP : « binding protein » - RIP_3 : récepteur canal de l'inositol 3 phosphate - RyR : récepteur sensible à la ryanodine - PMCA : « plasma membrane calcium ATPase » - SPCA : « Secretory pathway calcium ATPase ». \rightarrow et \rightarrow : flux de calcium \rightarrow : flux de sodium- [] canaux- ● pompe ○ échangeur

De nombreuses études ont amené à mieux connaître ces pompes. Une majorité de ces études a été réalisée sur la pompe SERCA1a. En effet, cette pompe représente 70% des protéines membranaires du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique et cette abondance en a fait un objet d'étude de choix pour comprendre le fonctionnement de toute la famille SERCA et plus généralement encore de la grande famille des ATPases de type P à laquelle les SERCAs appartiennent. L'étude de mutants a permis d'approfondir les connaissances de cette pompe. Ce type d'étude nécessite l'expression dans un système hétérologue, suivie éventuellement d'une purification de la protéine recombinante. Les systèmes d'expression hétérologue ont permis d'acquérir également quelques données fonctionnelles sur les autres isoformes SERCA.

Dans la première partie de mon introduction, je présenterai les caractéristiques générales de la famille des SERCAs. Dans une deuxième partie seront présentés les différents systèmes d'expression hétérologue et de purification de protéines membranaires d'Eucaryotes supérieurs, ainsi que leurs utilisations éventuelles pour l'étude des protéines SERCAs.

I.2 Les SERCAS

I.2.1 Les SERCAS, des protéines de la famille des ATPases dites de type P

I.2.1.1 Généralités sur la famille des ATPases de type P

Les SERCAS partagent avec d'autres ATPases la particularité de former un intermédiaire phosphorylé au cours de leur cycle catalytique. Pour cette raison, elles ont été nommées ATPases de type P. Le résidu phosphorylé est un aspartate faisant partie de la séquence consensus hautement conservée « D-K-T-G ». Les ATPases de type P sont aussi fréquemment appelées ATPases de type « E1/E2 » car au cours de leur cycle de transport, elles passent successivement par deux états conformationnels, l'un de haute affinité, E1, et l'autre de basse affinité E2 (*cf.* paragraphe I.2.3.1 page 32).

Les ATPases de type P constituent une vaste famille d'homologues et sont présentes aussi bien dans les cellules procaryotes que dans les cellules eucaryotes (*cf.* Møller *et al.*, 1996). Ces ATPases sont des protéines de la membrane plasmique ou des membranes des organites qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter un cation ou un couple de cations contre son gradient de concentration. Une grande variété de cations sont ainsi transportés : Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} .

Toutes ces ATPases possèdent une chaîne polypeptidique comprise entre 70 et 150 kDa (Kuhlbrandt, 2004). Cette chaîne polypeptidique est responsable de l'hydrolyse de l'ATP et du transport de cation. L'extrémité N-terminale de cette chaîne est située dans le cytoplasme. Certaines ATPases, comme par exemple l'ATPase Na/K, possèdent en plus de leur sous unité catalytique α , une sous unité β , impliquée dans l'adressage de la protéine à la membrane plasmique et pour le fonctionnement de l'enzyme (Kaplan, 2002).

En 1998, Palmgren et Axelsen, ont aligné les séquences de 159 ATPases de type P et ont proposé un classement phylogénétique (*cf.* Figure I.2-1) (Palmgren et Axelsen, 1998). Selon cette classification, les SERCAS font partie des ATPases de type II, plus

précisément des sous-groupes IIA. Les ATPases regroupées dans ce sous-groupe, ainsi que celles regroupées dans le sous-groupe IIB (comme les ATPases Ca^{2+} de la membrane plasmique ou PMCA) sont impliquées dans le transport de calcium. Le groupe IIC est représenté par l'ATPase Na/K ou l'ATPase H/K. Il est très proche du groupe IIA d'un point de vue évolutif, plus proche que ne l'est le sous-groupe IIB, ce qui peut paraître paradoxal, les deux sous-groupes IIA et IIB transportant le même ion Ca^{2+} (cf. Møller *et al.*, 1996). La présence d'une sous-unité régulatrice β en plus de l'unité α semble être un des points communs entre les ATPases de type IIC (cf. Kaplan, 2002). Les ATPases de type I sont impliquées dans le transport, qu'il s'agisse d'import ou d'export, de métaux de transition tels que le zinc ou le cuivre. Les ATPases de type III sont des ATPases- H^+ des membranes plasmiques des microorganismes et des plantes, relativement proches du point de vue séquence des ATPases Ca^{2+} de type IIB (Møller *et al.*, 1996). Les ATPases de groupes IV et V sont moins connues. Il a été suggéré que les ATPases de type P IV transportent des lipides tels que la phosphatidylsérine, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine (pour revue voir Paulusma et Oude Elferink, 2005). Aucune spécificité n'a été attribuée aux ATPases de type V à ce jour, mais tout comme les ATPase de types IV, elles se distinguent par leur présence exclusive dans les organismes eucaryotes (Palmgren et Axelsen, 1998)

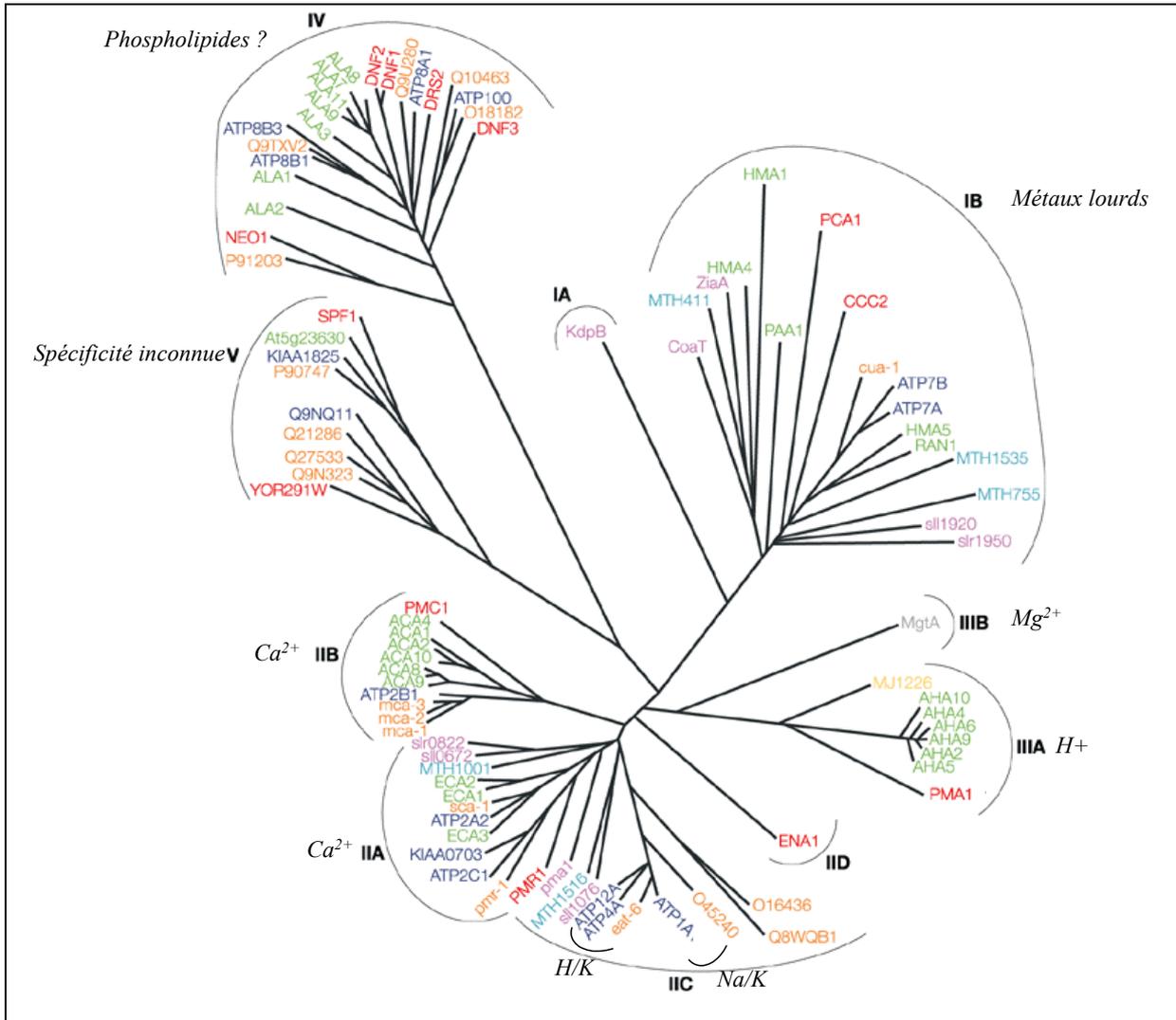


Figure I.2-1 Arbre phylogénétique de 159 ATPases de type P (d'après Palmgren et Axelsen, 1998 et Kuhlbrandt, 2004)

La spécificité de transport de chaque groupe est notée en italique. Le point d'interrogation indique que la spécificité du groupe est encore controversée. Le nom de chaque branche correspond au nom de la protéine, au locus du gène ou au code d'accès à la séquence d'ADN. Le code couleur correspond à différentes espèces : en vert : *Arabidopsis thaliana*; orange, *Caenorhabditis elegans*; gris : *Escherichia coli*; bleu foncé : *Homo sapiens*; bleu clair : *Methanobacterium thermoautotrophicum*; jaune, *Methanococcus jannaschii*; violet, *Synechocystis PCC6803*; et rouge, *Saccharomyces cerevisiae*

Actuellement plus de 300 ATPases de type P sont connues (voir <http://www.patbase.kvl.dk/>)

I.2.1.2 Présentation des quelques membres de la famille des ATPases de type P rencontrés dans les cellules de Mammifères.

a) Les ATPases Na/K

L'ATPase Na/K a été la première ATPase de type P identifiée en 1957 par Jens SKOU (Skou, 1957). Pour cette identification et ses 40 années de travail sur l'ATPase Na/K, Jens SKOU a reçu le prix Nobel de chimie en 1997 (le Maire, 1997).

Cette ATPase de type IIC, présente uniquement chez les organismes eucaryotes supérieurs, exporte 3 ions sodium en parallèle à l'import de 2 ions potassium au cours de son cycle catalytique. Elle est impliquée dans la régulation du volume cellulaire et en maintenant les concentrations de Na⁺ et de K⁺ de part et d'autre des membranes, est impliquée, entre autre, dans le potentiel de membrane. De plus, le gradient chimique de Na⁺ est utilisé par divers transporteurs secondaires pour le transport de solutés ou nutriments (pour revue sur la biochimie des ATPases Na/K, voir Kaplan, 2002).

La sous-unité α de cette pompe est composée d'environ 1000 acides aminés. Chez l'Homme, il a été identifié 4 isoformes de cette sous-unité, codées par les gènes ATP1A1 à ATP1A4. Des mutations dans l'isoforme alpha2 sont associées à la migraine hémiparétique (Segall *et al.*, 2005) et des mutations de l'isoforme alpha3 à la dystonie-parkinsonisme de début rapide (de Carvalho Aguiar *et al.*, 2004). Outre la sous-unité β déjà mentionnée, les ATPase Na/K peuvent être régulées par des protéines possédant toute la séquence commune FxYD (pour revue sur ces protéines, voir par exemple Geering *et al.*, 2003).

b) Les ATPases H/K

Les ATPases H/K sont des ATPases de type IIC. Tout comme les ATPase Na/K, elles sont donc composées d'une sous-unité α catalytique et d'une sous-unité β dont la fonction reste mal connue. Chez l'humain, 2 gènes sont connus coder pour ces ATPases.

Le gène *ATP4A* code pour l'ATPase H/K dite gastrique qui, en excréant deux protons en échange de deux ions potassium, intervient dans l'acidification de la poche

stomacale (Møller *et al.*, 1996). Elle a également été identifiée dans les cellules rénales (Kraut *et al.*, 2001).

Le gène *ATP12A* code pour l'ATPase H/K dite non gastrique. Cette ATPase est sensible à la ouabaine et il a été suggéré qu'elle transporte parfois un ion Na^+ , fonctionnant alors comme pompe Na/K (Grishin et Caplan, 1998).

c) Les ATPases Cu

Deux ATPases Cu sont connues dans les cellules humaines. Ces ATPases de type IB sont codées par les gènes *ATP7A* et *ATP7B*. Ces protéines sont respectivement appelées protéine de Menkes (MNKP) et protéine de Wilson (WNKP), en référence aux maladies engendrées par des mutations dans chacun de ces gènes. Dans certains tissus, les deux ATPase Cu sont présentes mais dans ce cas le rôle précis de chaque protéine reste mal compris. La maladie de Menkes est caractérisée par des symptômes neurologiques, notamment des retards de développement et un retard mental. Cette maladie est due à un défaut d'assimilation du cuivre alimentaire, qui reste piégé au niveau des cellules intestinales. La maladie de Wilson est due à une accumulation de cuivre dans certains tissus, notamment le foie ou le cerveau, ce qui engendre entre autre une cirrhose du foie et des désordres neurologiques (Portmann et Solioz, 2005 ; Lutsenko *et al.*, 2005a; Lutsenko *et al.*, 2005b).

d) Les ATPases Ca^{2+} :

Actuellement, trois types d'ATPases Ca^{2+} ont été identifiées dans les cellules de mammifères : les ATPases Ca^{2+} du réticulum ou SERCA, les ATPases Ca^{2+} trouvées au niveau de la membrane plasmique ou PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPases), et les ATPases Ca^{2+} trouvés dans les membranes golgiennes ou SPCA (Secretory Pathway Ca^{2+} ATPases). Ces trois familles d'ATPases sont toutes multi-géniques.

Les PMCA sont codées par 4 gènes différents et les ARN messagers de plus de 20 isoformes résultant de l'épissage alternatif de ces gènes ont été détectés chez l'humain (Guerini, 1998). Les ATPase de cette famille assurent le pompage du calcium hors de la cellule et sont régulées par des phosphorylations et la calmoduline (Møller *et*

al., 1996 ; Guerini, 1998). L'invalidation des gènes correspondant chez la souris montre que *PMCA2* joue un rôle important dans les phénomènes d'audition et dans l'équilibre. Des perturbations de ces deux fonctions sont également observées comme conséquence de mutation de ce gène (Shull, 2000).

Les ATPases SPCA sont codées chez l'humain par les gènes *ATP2C1* et *ATP2C2*. Elles peuvent pomper à la fois les ions Ca^{2+} et les ions Mn^{2+} . La levure *S. cerevisiae* possède une protéine homologue, Pmr1p. Une invalidation de ce gène chez la levure entraîne de nombreuses perturbations dans les fonctions du Golgi, entre autres des glycosylations incomplètes ou de mauvais adressages. De nombreuses études laissent supposer que ces pompes jouent également un rôle dans la signalisation calcique cellulaire (pour revue, voir Van Baelen *et al.*, 2004). Des mutations inactivant au moins un des allèles du gène *ATP2C1* provoquent la maladie de Hailey-Hailey, maladie de la peau caractérisée par des érosions et des lésions de la peau au niveau des articulations. Ces symptômes sont dus à une perte d'adhérence des kératinocytes (pour revue , voir Missiaen *et al.*, 2004).

La description des SERCAs fait l'objet du paragraphe suivant.

I.2.2 Présentation des différentes isoformes de la famille SERCA

Les protéines de la famille SERCA sont codées par 3 gènes différents : *ATP2A1*, *ATP2A2* et *ATP2A3*. Comme nous allons le voir ci-dessous, chacun de ces gènes peut lui-même être à l'origine de différents variants d'épissage.

I.2.2.1 Les isoformes SERCA1

La structure primaire de SERCA1a a été déterminée en 1985 par clonage de son ADNc (MacLennan *et al.*, 1985). Il s'agit d'une protéine de 994 acides aminés et d'une masse molaire de 110 kDa. Les deux isoformes a et b de l'ATPase SERCA1 ne diffèrent que par leur extrémité C-terminale. L'isoforme SERCA1b est néonatale alors que l'isoforme SERCA1a est retrouvée chez le sujet adulte (Brandl *et al.*, 1986; Brandl *et al.*, 1987). L'expression fonctionnelle des deux protéines dans les cellules COS n'a pas

permis de révéler des différences fonctionnelles et la raison pour laquelle ces 2 isoformes existent reste obscure (Maruyama et MacLennan, 1988).

Chez l'adulte, l'ATPase SERCA1a est très abondante dans le réticulum sarcoplasmique puisqu'elle représente 70 à 80 % des protéines membranaires. De ce fait, on peut la purifier relativement facilement et cela a grandement contribué à l'étude de son fonctionnement. En outre, à ce jour, c'est la seule ATPase de type P pour laquelle la structure tridimensionnelle à haute résolution est connue. Ses propriétés fonctionnelles et structurales seront détaillées dans les parties I.2.3 et I.2.4.

Un gène *ATP2A1* défectueux peut être à l'origine d'une maladie héréditaire, la maladie de Brody. Les symptômes qui caractérisent cette pathologie sont une altération de la relaxation musculaire (induite par l'exercice), une rigidité corporelle et des crampes musculaires durant l'effort (Odermatt *et al.*, 1996).

I.2.2.2 Les isoformes SERCA2

En 1986, Brandl et ses collaborateurs ont montré l'existence d'un deuxième gène codant pour une ATPase Ca^{2+} du réticulum (Brandl *et al.*, 1986). Il est actuellement connu que le gène *ATP2A2* code pour 3 isoformes SERCA2, distinctes par leur partie C-terminale (*cf.* Figure I.2-2).

S2a : YLEP/AILE (997 aa)
S2b : YLEP/GKECVQPATKSCSFSACTDGISWPFVLLIMPLVIWVYSTDTNFSDMFWS (1042 aa)
S2c : YLEP/VLSSEL (999 aa)

Figure I.2-2 Comparaison de la séquence C-terminale des 3 protéines SERCA2 humaines (d'après Gelebart *et al.*, 2003).

L'isoforme SERCA2a est principalement exprimée dans les fibres musculaires cardiaques où elle représente l'isoforme SERCA majoritaire. Son expression est également détectée dans d'autres tissus, comme dans les cellules musculaires lisses ou dans les cellules pancréatiques épithéliales (Gelebart *et al.*, 2003).

L'isoforme SERCA2b a été détectée dans toutes les cellules testées à ce jour. La séquence C-terminale de cette isoforme contient un domaine transmembranaire additionnel, ce qui fait que l'extrémité C-terminale de SERCA2b se trouve dans le réticulum. Il a été proposé que la calréticuline interagirait avec ce domaine et par là même, modulerait l'activité de SERCA2b (Shull, 2000).

L'ARN messenger SERCA2c a été trouvé dans des lignées cellulaires épithéliales, mésenchymateuses ou hématopoïétiques. L'ARNm et la protéine SERCA2c ont été détectés dans les monocytes, avec une régulation de leur niveau d'expression au cours des phases de différenciation (Gelebart *et al.*, 2003).

Des études d'inactivation du gène codant pour les isoformes SERCA2 chez la souris ont montré qu'il était impossible d'obtenir des souris homozygotes SERCA2^{-/-}, démontrant que ce gène joue un rôle vital, probablement du fait du caractère ubiquitaire de l'isoforme SERCA2b (Shull, 2000).

Au moins 120 mutations du gène ATP2A2 ont été référencées comme entraînant une maladie génétique de la peau, la maladie de Darier, caractérisée par une hyperkératose (Hovnanian, 2004).

I.2.2.3 Les isoformes SERCA3

Un troisième gène codant pour l'ATPase Ca²⁺ du réticulum a été découvert chez le rat en 1989 par Burk et ses collaborateurs (Burk *et al.*, 1989). L'équipe de Enouf a mis en évidence l'existence d'une troisième pompe dans les cellules humaines dès 1991 (Papp *et al.*, 1991; Papp *et al.*, 1992), mais c'est en 1996 que le gène *ATP2A3* humain a été identifié et cloné (Dode *et al.*, 1996). Depuis, il a été montré qu'il existait chez l'homme 6 variants d'épissage différents (*cf.* Figure I.2-3). Pour chaque ARNm différent, la protéine correspondante a pu être détectée dans au moins un type cellulaire (Kovacs *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002; Bobe *et al.*, 2004). La distribution tissulaire de ces isoformes varie (*cf.* Figure I.2-4) et des différences de propriétés biochimiques ont pu être mises en évidence (*cf.* I.2.3.2 page 35). Toutefois, le rôle physiologique de chacune

de ces isoformes reste une énigme, d'autant que SERCA2b est toujours exprimée dans les cellules où les différentes isoformes SERCA3 ont été détectées.

Isoformes SERCA3 chez l'humain	
h3a:	HMH/EEMSQK (999 aa)
h3b:	HMH/ACLYPGLLRTVSQAWSRQPLTTSWTPDHTGRNEPEVSAGNRVESPVCTSD (1043 aa)
h3c:	HMH/ACLYPGLLRTVSQAWSRQPLTTSWTPDHTGLASKK (1029 aa)
h3d:	HMH/ACLYPGLLRTVSQAWSRQPLTTSWTPDHTGARDTTASSRCQSCSEREEAGKK (1044 aa)
h3e:	HMH/ACLYPGLLRTVSQAWSRQPLTTSWTPDHTGLASLGQGHHSIVLSSELLREGGSREEMSQK (1052 aa)
h3f:	HMH/GPGTQHRLAVRAAQRGRKQGRNEPEVSAGNRVESPVCTSD (1033 aa)
Isoformes SERCA3 chez la souris	
m3a:	HMD/EKKDLK (999 aa)
m3b:	HMD/GVLGTFMQARSRQLPTTSRTPYHTGKKGPEVNPGRGESPVWPSD (1038 aa)
m3c:	HMD/GVLGTFMQARSRQLPTTSRTPYHTGLASWKKRT (1026 aa)
Isoformes SERCA3 chez le rat	
r3a:	HVD/EKKDLK (999 aa)
r3b/c:	HVD/GVLETFMQAWCKQPLPGPHTTRGWLPGCHFNQWEQTEEFVFIQERWTVSGLGPEKKARERLGLVSAAS (1061 aa)

Figure I.2-3 Partie C-terminale des différentes isoformes SERCA3 connues chez l'humain, la souris et le rat (d'après Bobe *et al.*, 2004)

*Les séquences présentées ici débutent à l'acide aminé 991 (H). En dehors des variations indiquées ci-dessus pour la partie C-terminale, 49 acides aminés, répartis dans toute la séquence, sont différents entre SERCA3 humain et SERCA3 de rat (Dode *et al.*, 1996)*

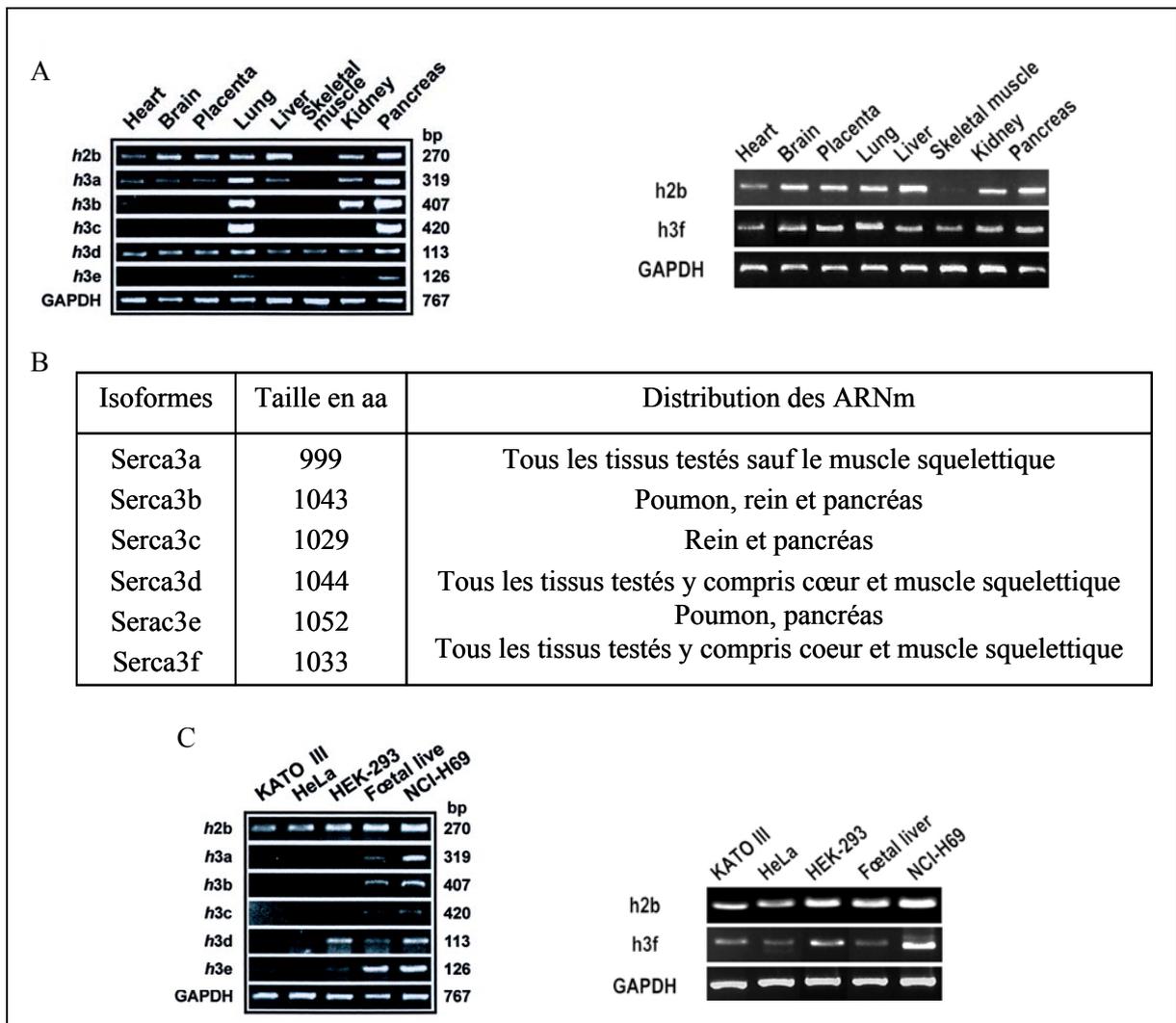


Figure I.2-4 Distribution des ARNm des isoformes SERCA3 dans différents tissus humains et dans quelques lignées cellulaires (d'après Martin *et al.*, 2002; Bobe *et al.*, 2004)

A-Expression des variants d'épissage SERCA3a-f (h3a-f) dans différents tissus. B- Bilan des résultats présentés en A. C- Expression des variants d'épissage SERCA3a-f (h3a-f) dans différentes lignées cellulaires. Dans les figures A et C : Pour comparaison, l'expression de SERCA2b et de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, enzyme ubiquitaire) a également été analysée. Le nombre de cycles de PCR utilisés peut varier d'une isoforme à l'autre mais est invariant pour une isoforme donnée.

Comme le suggèrent les quelques essais réalisés sur des lignées cellulaires (cf. Figure I.2-4 C), il est probable qu'au sein d'un même tissu, la distribution cellulaire des différentes isoformes SERCA3 soit différente. Si elles sont exprimées dans la même cellule, une hypothèse serait que la distribution des différentes SERCA3 et de SERCA2b varie à l'échelle subcellulaire (voir discussion de la partie III.3 du chapitre « Résultats et Discussions »).

Une différence d'expression des différentes isoformes SERCA3 est également observée suivant l'état de différenciation cellulaire. Ceci a été montré lors de l'étude des lignées hématopoïétiques (cf. Figure I.2-5).

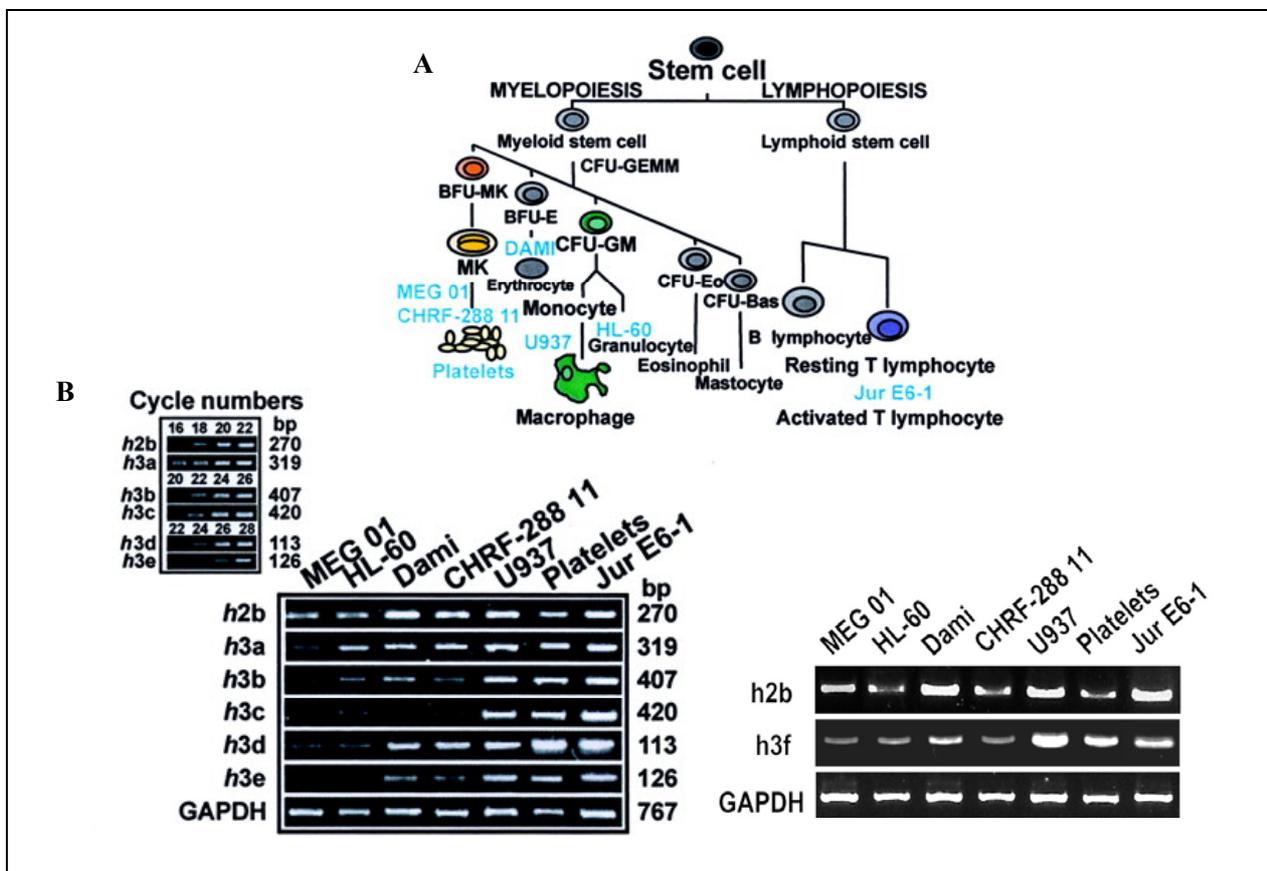


Figure I.2-5 Présence des ARNm des isoformes SERCA3 dans différentes cellules de la lignée hématopoïétique (extraits de Martin *et al.*, 2002; Bobe *et al.*, 2004).

A-Schéma rappelant l'hématopoïèse. *B*- Expression des variants d'épissage SERCA3a-f (h3a-f) dans différentes lignées cellulaires. Pour comparaison, l'expression de SERCA2b et de la GAPDH a également été analysée. Le nombre de cycles de PCR utilisés peut varier d'une isoforme à l'autre mais est invariant pour une isoforme donnée.

Par ailleurs, une étude de Gelebart *et al.*, 2002 montre qu'au sein de lignées cellulaires cancéreuses issues d'un même organe, le colon, l'expression des protéines SERCA3, toutes isoformes confondues, varie i) suivant le type cellulaire et ii) suivant l'état de différenciation cellulaire. Dans la même étude, les auteurs montrent par une analyse *in situ* que SERCA3 est exprimée dans les cellules épithéliales du colon sain mais n'est pas détectée dans les cellules de carcinomes du colon.

Un autre degré de complexité, non observé pour SERCA1 et SERCA2, est l'existence d'isoforme espèce-spécifique : ainsi, à l'exception de l'isoforme SERCA3a, les isoformes SERCA3 humaines n'ont pas d'homologues chez la souris ou le rat (*cf.* Figure I.2-3 page 28).

Les souris pour lesquelles le gène codant pour SERCA3 a été invalidé montrent un défaut de la relaxation des muscles lisses de la trachée ou de l'endothélium (Liu *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 1999). Dans ces travaux, il est montré que le défaut de relaxation serait épithélium-dépendant et impliquerait un défaut de signalisation de la voie « NO ». Ces résultats suggèrent que SERCA3 jouerait un rôle dans cette voie de signalisation.

Chez l'homme, des mutations au niveau du gène ATP2A3 ont été détectées chez des patients souffrant de diabète de type II, suggérant que le gène ATP2A3 contribue à la susceptibilité génétique à développer un diabète de type II (Varadi *et al.*, 1999).

Nous venons de voir que parmi les différents tissus, les différentes lignées cellulaires, les différents stades de différenciation, il existait chez l'homme au moins 6 différentes isoformes SERCA3, ou, si on tient compte des variants des gènes *ATP2A1* et *2*, au moins 11 isoformes SERCA. Une hypothèse expliquant l'existence de toutes ces isoformes SERCA est que les différences d'expression des SERCAs entre tissus permettraient à chaque type cellulaire d'avoir une régulation du signal calcique qui lui serait propre. La multiplicité d'isoformes pourrait également constituer un moyen pour la cellule de réguler finement le signal calcique, temporellement mais aussi spatialement si on émet l'hypothèse que ces différentes isoformes n'aient pas la même localisation intracellulaire. Nous allons voir que cette hypothèse est renforcée par la différence de propriétés fonctionnelles observées pour les différentes isoformes.

I.2.3 Les caractéristiques fonctionnelles des SERCAs

I.2.3.1 Présentation du cycle catalytique.

Fin des années 50, Ebashi met en évidence qu'un facteur influençant la relaxation musculaire est présent au niveau des vésicules de réticulum de muscle squelettique (Ebashi, 1958). Début des années 60, Hasselbach et Makinose ont mis en évidence le transport actif de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à l'intérieur de vésicules de réticulum sarcoplasmique par une ATPase de la membrane de ces vésicules (Hasselbach et Makinose, 1961). Le mécanisme par lequel le Ca^{2+} est transporté a depuis fait l'objet de recherches intensives (pour revue, voir par exemple MacLennan *et al.*, 1997 ou Møller *et al.*, 2005). Dès 1973, la connaissance du fonctionnement de l'ATPase localisée dans ces vésicules du réticulum permettait à Makinose de proposer un premier schéma pour décrire le transport de Ca^{2+} (cf. Figure I.2-6 A).

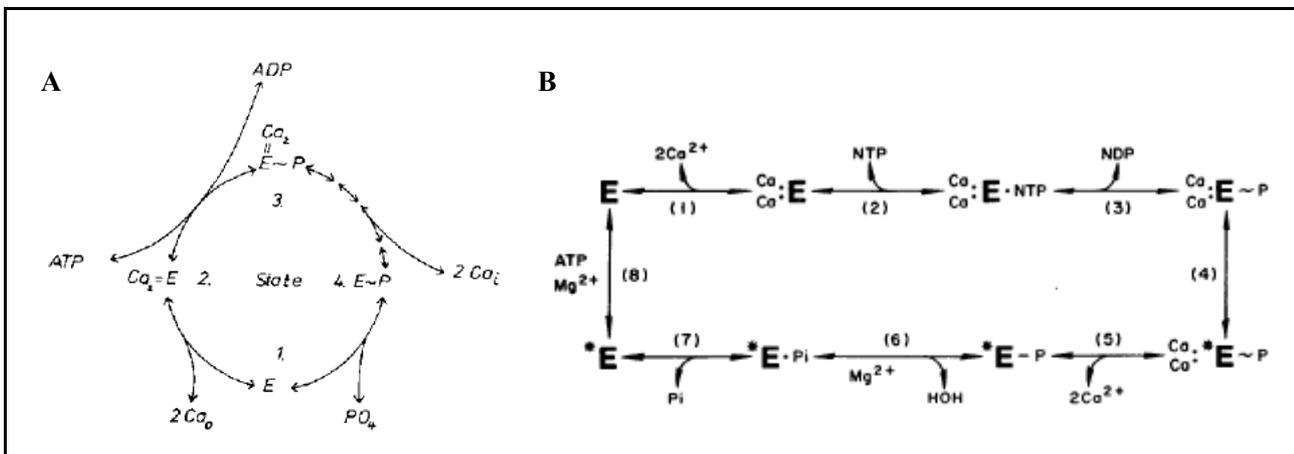


Figure I.2-6 Cycle de transport de Ca^{2+} par l'ATPase du réticulum sarcoplasmique proposé par Makinose, 1973 (A) puis de Meis et Vianna, 1979 (B)

Ce schéma, toujours valable aujourd'hui, montre que 2 ions Ca^{2+} sont transportés vers le lumen du réticulum grâce à l'énergie dégagée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. De plus, il rend compte qu'au cours de ce cycle se forme un intermédiaire

phosphorylé et que la fixation de Ca^{2+} est un pré-requis pour la phosphorylation par l'ATP (bien que ceci ait été prouvé plus tard, voir plus loin).

Quelques années plus tard, de Meis et Vianna, 1979 ont proposé une réactualisation du cycle catalytique proposé par Makinose (*cf.* Figure I.2-6 B) : leur modèle, appelé modèle E1/E2 (initialement E/E*) propose l'existence de deux conformations de l'ATPase. La conformation E1 aurait les sites Ca^{2+} ouverts du côté cytosolique et pourrait être phosphorylée par l'ATP, entraînant la formation de l'intermédiaire E1PCa_2 , qualifié de ADP-sensible car pouvant former une molécule d'ATP à partir d'ADP. Dans l'autre conformation, les sites Ca^{2+} font face au lumen et l'ATPase peut être phosphorylée par le P_i ce qui conduit à la forme E2P, ADP-insensible. Les formes E1 et E2 sont en équilibre et la transition E2- E1 doit précéder ou est simultanée à la fixation de Ca^{2+} du côté cytoplasmique. Ce modèle sert toujours de base à la description du cycle catalytique des SERCAS, même si maintenant E1 et E2 ne symbolisent plus chacune une seule conformation mais plutôt un ensemble d'intermédiaires conformationnels caractérisés respectivement par de hautes ou basses affinités pour le Ca^{2+} .

En 1980, Inesi a proposé que la fixation des Ca^{2+} soit séquentielle et que la fixation du premier Ca^{2+} induirait un changement de conformation de l'enzyme permettant au deuxième Ca^{2+} de se fixer avec une meilleure affinité (Inesi *et al.*, 1980). L'hypothèse d'un mécanisme séquentiel pour la fixation du calcium a été renforcée par des expériences de mesures de dissociations du calcium ; cependant, la coopérativité observée peut être interprétée d'une autre manière : elle pourrait s'expliquer par un modèle où les 2 sites sont indépendants et équivalents, mais présents sur une seule des 2 formes E1 ou E2 (Tanford *et al.*, 1985). Si d'une part les 2 formes E1 et E2 sont en équilibre et que d'autre part seule la forme E1 est capable de fixer le Ca^{2+} , la fixation du premier Ca^{2+} sur E1 va permettre d'augmenter le rapport E1/E2 et par conséquent d'augmenter l'affinité apparente avec laquelle le deuxième Ca^{2+} se fixe à l'enzyme. Par ailleurs, il a été mis en évidence que la dissociation d'un des 2 Ca^{2+} est suffisante pour que l'ATPase- Ca^{2+} perde sa réactivité vis-à-vis de l'ATP. La fixation des 2 Ca^{2+} est donc

nécessaire à la formation de l'intermédiaire phosphorylé $E1PCa_2$ (Petithory et Jencks, 1988).

L'hydrolyse de l'ATP conduit à la formation d'un intermédiaire phosphorylé $E1PCa_2$, dit de « haute énergie ». Cet intermédiaire est ainsi qualifié car il est possible de reformer une molécule d'ATP à partir de cet intermédiaire phosphorylé et d'ADP. La phosphorylation induit l'occlusion des 2 ions Ca^{2+} fixés: les Ca^{2+} ne sont plus échangeables, ni du côté cytosolique, ni du côté luminal du réticulum sarcoplasmique. Cet état occlus a été suggéré dès 1980, quand il a été observé que la dissociation du Ca^{2+} à partir de l'enzyme phosphorylée était bloquée (Dupont, 1980). Alors qu'en présence de $MgATP$, la durée pendant laquelle les Ca^{2+} sont occlus est brève, le complexe $CrATP$ (entre l'ATP et le chrome (III)) ou $AlF_4^- -ADP$ peut être utilisé comme analogue du substrat pour stabiliser l'état occlus pendant plusieurs heures (Serpensu *et al.*, 1982, Troullier *et al.*, 1992). Cette occlusion est suivie d'une transition $E1PCa_2 \rightarrow E2P$ au cours de laquelle les sites de haute affinité disparaissent pour laisser place à des sites de moindre affinité qui s'ouvrent vers le lumen du SR, permettant la dissociation du Ca^{2+} . La dissociation séquentielle des Ca^{2+} dans le lumen du SR a été proposée par G. Inesi (Inesi, 1987).

Après la dissociation luminale du Ca^{2+} , le dérivé phosphorylé est converti en une forme $E2P$ à partir de laquelle il est impossible de reformer de l'ATP. Cette forme, dite « ADP-insensible », réagit avec l'eau, ce qui conduit à l'hydrolyse de la liaison acylphosphate ($E2P \rightarrow E2$). La phosphorylation par le P_i , correspondant à la transition inverse $E2 \rightarrow E2P$, a été décrite en 1973 (Masuda et de Meis, 1973). Cette réaction requiert la présence de Mg^{2+} et l'absence de Ca^{2+} .

L'existence d'un couplage entre le transport actif de Ca^{2+} à l'intérieur du SR et l'expulsion de H^+ dans le cytoplasme, au même titre que le couplage existant entre l'expulsion de 3 Na^+ et l'import de 2 K^+ pour l'ATPase Na/K , a été difficile à mettre en évidence, principalement en raison du fait que les vésicules de SR isolées sont relativement perméables aux protons. La preuve directe du contre-transport de H^+ a été apportée après reconstitution de l'ATPase Ca^{2+} dans des liposomes dont la perméabilité passive aux ions H^+ est faible (Cornelius et Møller, 1991).

Toutes ces données fonctionnelles permettent de proposer un schéma de cycle catalytique plus détaillé, mais non dénué d'incertitude (cf. Figure I.2-7).

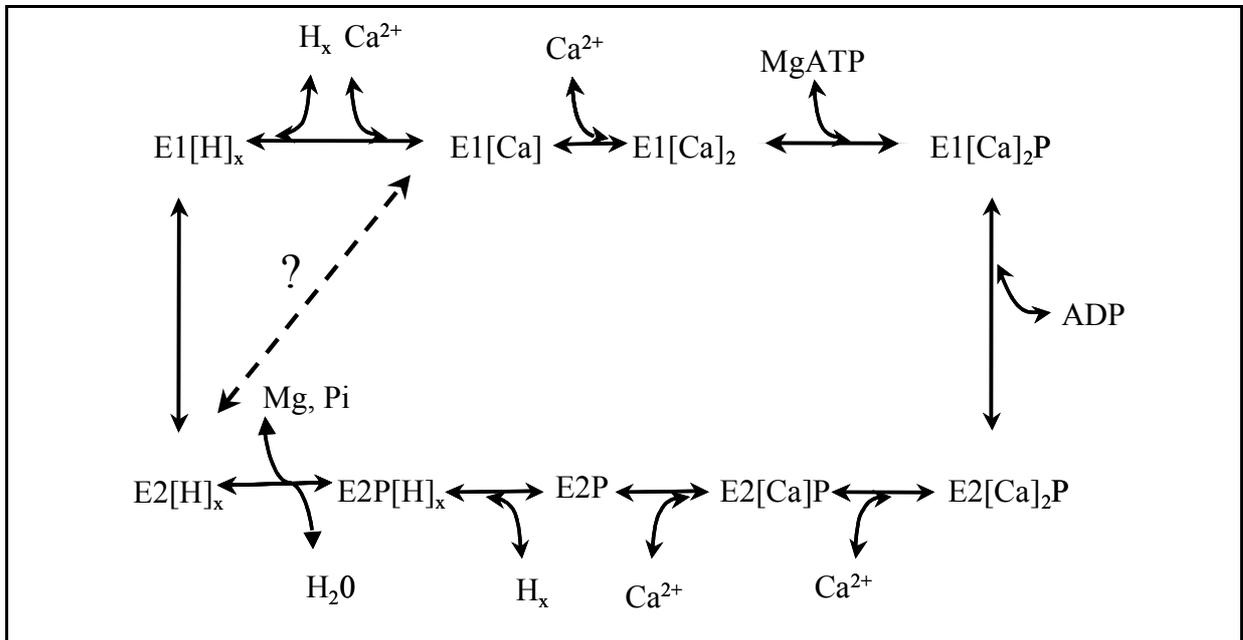


Figure I.2-7 Cycle catalytique détaillant le transport de Ca^{2+} par SERCA.

Ce cycle n'est pas dénuée de toute incertitude. Le point d'interrogation fait notamment référence à une hypothèse selon laquelle le changement de conformation E2-E1 serait concomitant à la liaison du calcium (Møller et al., 2005).

I.2.3.2 Différences fonctionnelles entre les différentes isoformes SERCAs.

Le cycle catalytique décrit sur la Figure I.2-7 s'applique pour toutes les isoformes SERCAs. Par ailleurs, les protéines de cette famille partagent la caractéristique d'être inhibée irréversiblement par la thapsigargine (Lytton *et al.*, 1991). Toutefois, chaque sous-famille d'isoformes, si ce n'est chaque variant d'épissage, se distingue par des propriétés biochimiques particulières. Ces différences fonctionnelles peuvent être intrinsèques à l'isozyme en elle-même. Par ailleurs différents régulateurs

de l'activité des SERCAs ajoutent un degré de complexité dans les différences de propriétés entre les différentes isoformes.

a) Des propriétés intrinsèques différentes suivant les isoformes.

L'expression hétérologue des différentes isoformes dans des cellules de mammifères, type COS ou HEK (voir I.3.1.5 page 60) a permis un certain nombre de comparaisons fonctionnelles.

Lytton et ses collaborateurs ont comparé dans une même étude les trois isoformes après leur surexpression dans les cellules COS (Lytton *et al.*, 1992). Leurs travaux montrent que i) SERCA2b a un « turnover » moins élevé que les autres isoformes étudiées, donc un cycle catalytique plus lent (*cf.* Figure I.2-8B), ii) l'affinité pour le calcium de SERCA3a de rat est réduite par rapport à SERCA1 ou SERCA2 mais pas l'affinité pour l'ATP (*cf.* Figure I.2-8C et D) iii) le pH optimal pour SERCA3a de rat est plus basique que celui des autres isoformes étudiées (*cf.* Figure I.2-8E)

En 2002, Dode et ses collaborateurs ont montré que les différences observées par Lytton et ses collaborateurs se retrouvaient pour les isoformes SERCA3a, b et c humaines après leur surexpression dans des cellules de mammifères (Dode *et al.*, 2002). Des expériences complémentaires leur ont permis, en outre, de préciser que, comparativement à SERCA1a, les étapes de déphosphorylation de l'intermédiaire E2P et de la dissociation du Ca^{2+} à partir de E1Ca_2 étaient plus rapides, alors que la transition $\text{E2} \rightarrow \text{E1Ca}_2$ était plus lente. Les auteurs suggèrent également que les isoformes SERCA3 seraient moins inhibées par la concentration calcique luminale que SERCA1 au profit d'une augmentation d'affinité des sites protons.

Les différences entre les isoformes SERCA3 semblent plus subtiles. D'après Dode et ses collaborateurs, il y aurait une corrélation entre la longueur de la queue C-terminale et la rapidité de l'étape de déphosphorylation, donc l'accumulation possible de Ca^{2+} dans le réticulum. Les expériences réalisées par Martin *et al.* (2002) et Bobe *et al.* (2004) montrent effectivement des variations de propriétés entre les isoformes SERCA3 humaines mais ne rejoignent pas Dode et ses collaborateurs dans leurs conclusions quant aux relations structure /fonctions.

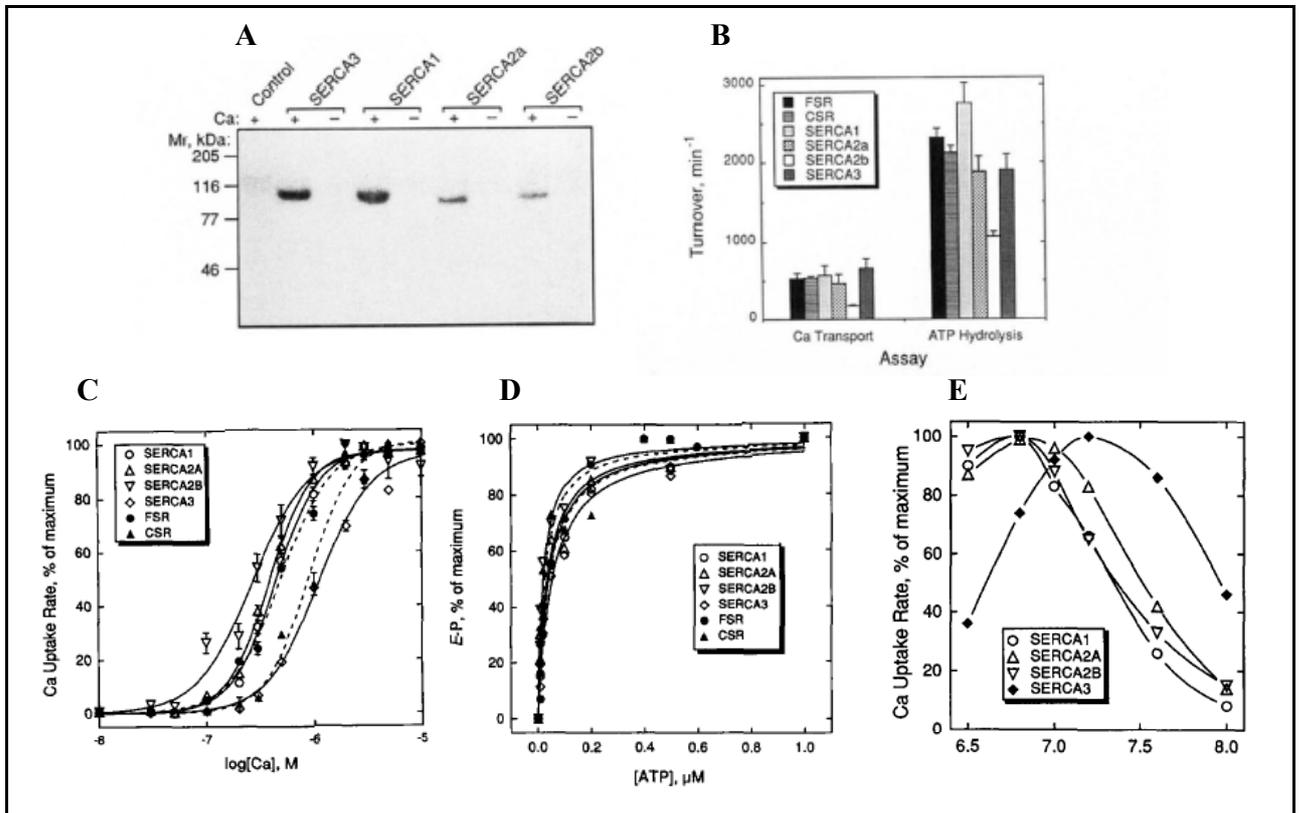


Figure I.2-8 : Comparaison fonctionnelle des isoformes SERCA1a, SERCA2a et SERCA2b de lapin et SERCA3a de rat après expression hétérologue dans des cellules COS (extrait de Lytton *et al.*, 1992).

A-Formation d'intermédiaire phosphorylé à partir de 5μg de microsomes préparés à partir de cellules COS exprimant l'isoforme SERCA indiqué **B**-Turnover des différentes enzymes, normalisé d'après les résultats obtenus en *A*. **C**-Dépendance en Ca²⁺ pour l'activité de transport de calcium. **D**-Dépendance en ATP de la formation de l'intermédiaire EIP **E**-Dépendance par rapport au pH du transport de Ca²⁺. FSR et CSR : réticulum sarcoplasmique respectivement de fibres rapides du muscle squelettique de lapin et de muscle cardiaque de chien.

b) Différences dans la modulation de l'activité par des facteurs extrinsèques.

Il est connu que deux protéines à 1 segment transmembranaire régulent des protéines SERCA : le phospholamban et la sarcolipine. Le phospholamban non phosphorylé est capable de modifier le cycle catalytique de SERCA1 et SERCA2 en se liant réversiblement à ces deux isoformes. Une des séquences impliquées dans cette interaction avec le phospholamban est absente chez les isoformes SERCA3. L'absence d'expression de phospholamban dans les fibres rapides du muscle squelettique exclut toute interaction avec l'isoforme SERCA1 dans des conditions physiologiques. Par contre, son abondance dans les cellules du muscle cardiaque lui permettent de jouer le rôle de modulateur de SERCA2a et par conséquent, indirectement, de la contraction dans le muscle cardiaque (Wuytack *et al.*, 2002). La sarcolipine (SLN) a une extrémité C-terminale plus courte que le phospholamban mais la séquence en acides aminés du domaine transmembranaire est bien conservée entre les deux peptides, suggérant un rôle important de ces résidus dans l'interaction avec les SERCAS. La SLN est fortement exprimée dans les fibres rapides du muscle squelettique, fibres au sein desquelles l'ATPase SERCA1a est elle aussi fortement exprimée. La SLN est également exprimée dans le muscle cardiaque et les fibres lentes du muscle squelettique bien qu'à un niveau beaucoup faible que dans le muscle squelettique rapide (pour revue voir MacLennan *et al.*, 2003)

Les isoformes SERCA2 peuvent être phosphorylées par la calmoduline kinase au niveau de leur résidu sérine 38. Certaines équipes ont montré que cette phosphorylation augmente la vitesse de transport du calcium. Les isoformes SERCA1 et SERCA3 ne possèdent pas cette sérine 38 (East, 2000).

Les protéines SERCAS peuvent également être différentiellement régulées par le stress oxydant. Différentes études ont notamment montré que les isoformes pouvaient être différemment modulées par le NO. L'équipe de Grover a démontré en 2003 que l'isoforme SERCA3a était moins inhibée que l'isoforme SERCA2b par le peroxy-nitrite,

agent donneur de NO (*cf.* Figure I.2-9A)(Grover *et al.*, 2003). Ces résultats sont à relier aux travaux publiés par la même équipe quelques mois plus tard (*cf.* Figure I.2-9B). Les auteurs montrent que le transport de Ca^{2+} dans les microsomes de cellules endothéliales des artères coronariennes de porc (où SERCA3 est abondante) était moins inhibé que dans les microsomes des cellules des muscles lisses des mêmes artères (dans lesquelles SERCA2b est l'isoforme majoritaire) (Schmidt *et al.*, 2004).

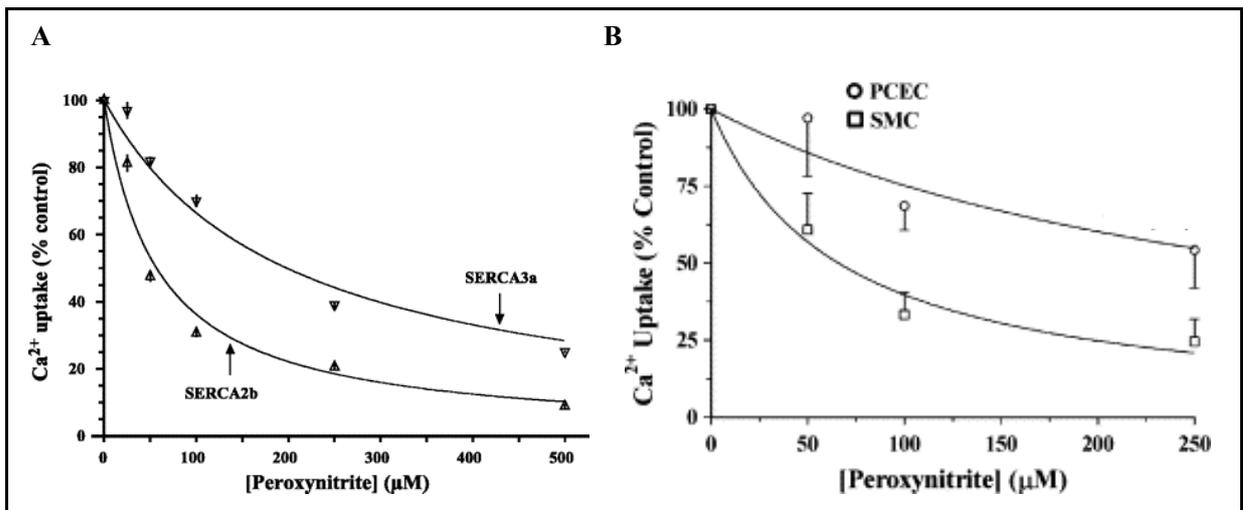


Figure I.2-9 Effets de concentrations croissantes de peroxy-nitrite sur le transport de Ca^{2+}

A- Dans des microsomes préparés à partir de cellules HEK surexprimant SERCA2b ou SERCA3a (extrait de Grover *et al.*, 2003) ou *B-* Dans des microsomes préparés à partir des cellules endothéliales (PCEC) ou de muscles lisses (SMC) des artères coronariennes de porc (extrait de Schmidt *et al.*, 2004).

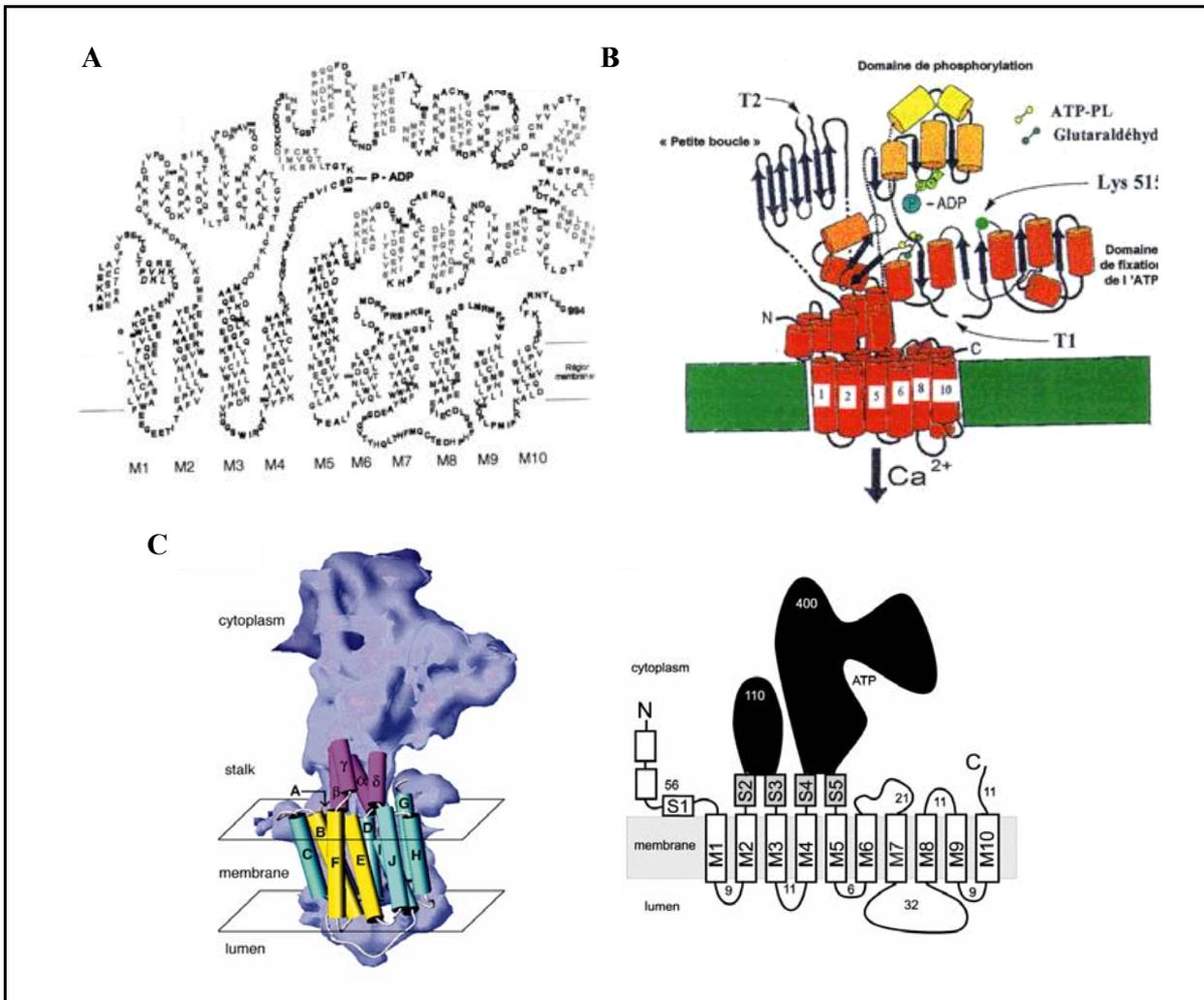


Figure I.2-10 Organisation structurelle de SERCA déduite des analyses biochimiques ou de la cryomicroscopie électronique

A-Modèle topologique de SERCA1a (d'après MacLennan et al., 1992). B-Modèle de structure tertiaire de SERCA1a (d'après Green et Stokes, 1992).C- Modèle structural (8Å) et topologique (d'après Zhang et al., 1998).

I.2.4 Les caractéristiques structurales des SERCAs et les relations structure/fonction.

I.2.4.1 Caractéristiques structurales générales

Avant la publication de la première structure à haute résolution de SERCA1a par Toyoshima *et al.* en 2000, des connaissances sur la structure avaient été acquises à la fois par des études théoriques, comme l'analyse des profils hydrophatiques par exemple, ou par des approches expérimentales, comme l'utilisation de la protéolyse ménagée ou d'anticorps spécifiques d'une séquence peptidique (*cf.* le Maire *et al.*, 1990 ou Danko *et al.*, 2001, pour revue, voir Møller *et al.*, 1996). Toutes ces études ont permis de proposer le modèle présenté Figure I.2-10.

Par ailleurs, des travaux sur la cristallisation de l'ATPase ont débuté dès 1983 (Buhle *et al.*, 1983). La reconstruction de la structure tridimensionnelle à partir de cristaux bidimensionnels a permis à Zhang et ses collaborateurs d'obtenir une résolution de 8 Å (Zhang *et al.*, 1998). La structure à basse résolution ainsi que le modèle topologique proposé sont présentés Figure I.2-10.

En 2000, l'équipe de Toyoshima publiait la structure haute résolution (2,6 Å) de l'ATPase SERCA1a (Toyoshima *et al.*, 2000). Sur cette structure, quatre domaines se distinguent : un domaine transmembranaire et trois domaines cytoplasmiques. Deux de ces domaines cytoplasmiques, le domaine A (pour « actuator domain ») et le domaine P (« phosphorylation domain ») sont connectés au domaine transmembranaire. Le troisième domaine, le domaine N (« nucleotide domain ») est relié au domaine P (*cf.* Figure I.2-11).

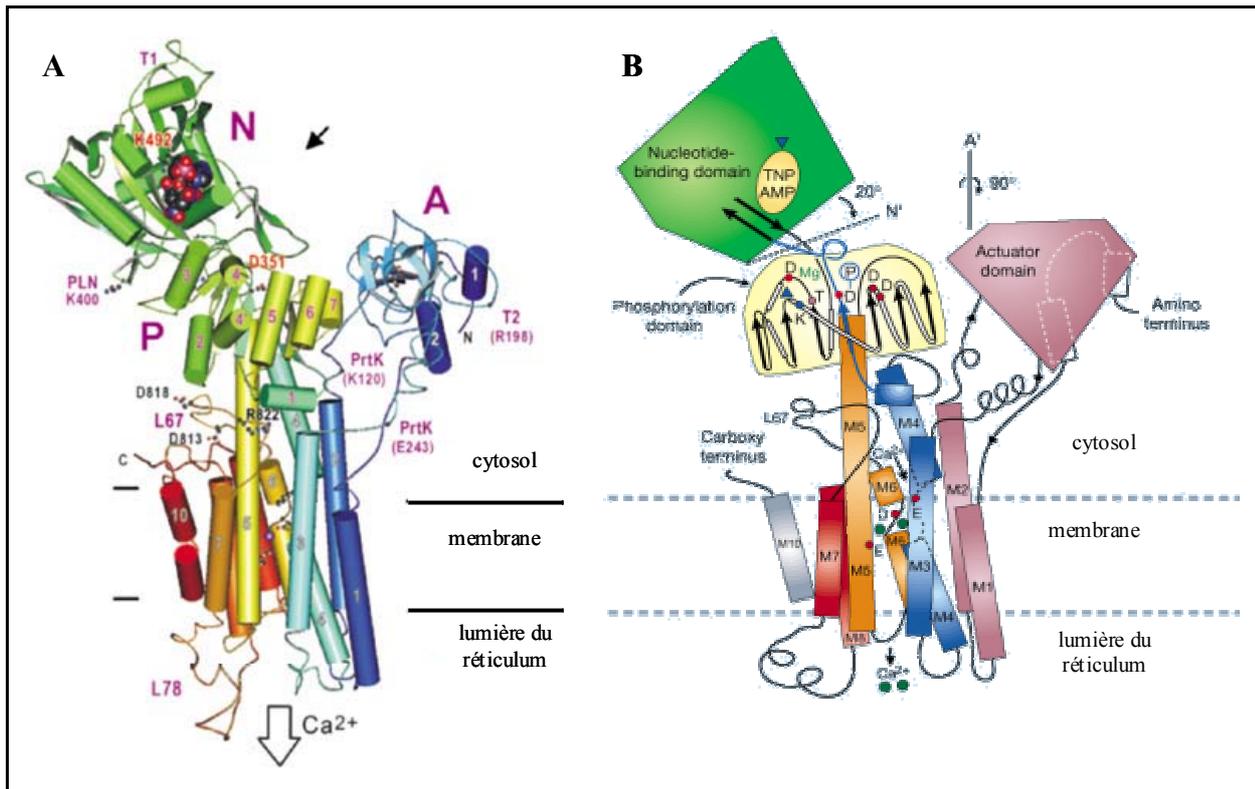


Figure I.2-11 Structure tertiaire de SERCA1a (d'après Toyoshima *et al.*, 2000 et MacLennan et Green, 2000)

A : Structure à 2.6 Å proposé par Toyoshima et al en 2000 B : Vue d'ensemble de la structure tridimensionnelle (MacLennan et Green, 2000) N « nucleotide binding domain » : domaine de liaison du nucléotide - A « actuator domain » ; domaine de transduction- P « phosphorylation domain » : domaine de phosphorylation.

Le domaine A est constitué des acides aminés N-terminaux et de la boucle cytoplasmique reliant les hélices M2 et M3. Il contient le site TGES hautement conservé parmi les ATPases de type P. Le domaine A est relié aux domaines transmembranaires par de longues séquences sans structure définie, suggérant une flexibilité importante de ce domaine. Ce fait sera confirmé par la position très différente de ce domaine dans les différentes conformations obtenues par la suite (voir paragraphe I.2.4.2b)).

Le domaine P est construit de deux parties, séparées par un large insert composant le domaine N. La partie N-terminale du domaine P est reliée à l'hélice M4 et contient l'asparate 351, résidu transitoirement phosphorylé au cours du cycle

catalytique et qui est conservé chez toutes les ATPases de type P. La partie C-terminale du domaine P est relié à l'hélice M5.

Comme son nom le suggère, le domaine N renferme le site de liaison du nucléotide, c'est-à-dire le site où va se fixer l'ATP. Il est constitué des acides aminés 360 à 604 qui forment une excroissance à partir du domaine P. Il renferme la séquence Lys397-Asp-Asp-Lys-Pro-Val, site d'interaction avec le phospholamban (absente de SERCA3, cf. I.2.3.2)

Le domaine transmembranaire comprend 10 hélices α dont la longueur et l'inclinaison par rapport au plan de la membrane varient. Les hélices M2 et M5 sont très longues (50 à 60 Å) et d'un seul tenant, par opposition à M4, M6 et M10 qui sont interrompues au centre de la membrane. Notons que cette interruption de M6 a été démontrée par une étude RMN sur le segment isolé en détergent avant que la structure de l'ATPase ne soit publiée, l'interruption de M4 étant prédite (Soulie *et al.*, 1999). L'hélice M5, qui va de la face luminale au centre du domaine P, apparaît comme un élément structural déterminant pour le fonctionnement de l'enzyme puisqu'elle connecte le domaine transmembranaire aux domaines cytoplasmiques et aux domaines de la lumière du réticulum. En 2003, des études ont montré que ce segment isolé, étudié en RMN, présentait une région flexible, proche des sites de fixation de liaison du calcium de cette hélice (Asn768 et Glu771, cf. paragraphe I.2.4.2a) (Nielsen *et al.*, 2003).

En parallèle à ces études structurales et aux études fonctionnelles évoquées dans la partie I.2.3, de nombreuses études ont été menées pour comprendre les relations structure/fonction.

I.2.4.2 Les relations structure/fonction

a) Apport des études fonctionnelles de mutants, exemple de l'étude des sites de fixation du calcium.

Dès que la structure primaire de SERCA1 a été connue, l'étude de mutants a débuté grâce à leur expression dans différents systèmes hétérologues (voir section suivante), à commencer par des expressions dans les cellules COS (Maruyama et MacLennan, 1988). En 1995, Andersen a publié une revue signalant les 250 mutations testées et pointant 40-50 résidus importants pour la fonction de l'ATPase (Andersen, 1995, pour revue plus récente, voir également Wuytack *et al.*, 2002). Toutes ces études ont permis de mettre en relation des résidus et des régions topologiques avec une fonction (*cf.* Figure I.2-12). Notons que tous les résidus critiques sont conservés chez toutes les isoformes SERCA (Poch *et al.*, 1998).

Figure I.2-12 Résidus critiques pour le fonctionnement de SERCA1 (extrait de Wuytack *et al.*, 2002 (voir ci-contre))

*Les résidus dont les mutations résultent à des dysfonctionnements de la pompe sont signalés par un symbole particulier (autre qu'un cercle). La relation entre type d'effet et le symbole utilisé est indiquée dans l'encart. Les chiffres indiqués dans les cadres font références aux différents articles traitant de ces mutations (1. Daiho T et al. J Biol Chem 1999; 274: 23910; 2. Andersen JP, Vilsen B. Acta Physiol Scand 1992; 146: 151; 3. Vilsen B, Andersen JP. J Biol Chem 1992; 267: 25739; 4. Sørensen TL et al. J Biol Chem 2000; 275: 5400; 5. Ma H et al. Biochemistry 1999; 38: 15522; 6. Andersen JP et al. J Biol Chem 2001; 276: 23312; 7. Vilsen B et al. J Biol Chem 1989; 264: 21024; 8. Clarke DM et al. J Biol Chem 1990; 265: 6262; 9. Clarke DM et al. Nature 1989; 339: 476; 10. Vilsen B et al. J Biol Chem 1991; 266: 18839; 11. Andersen JP, Vilsen B. J Biol Chem 1992; 267: 19383; 12. Andersen JP et al. J Biol Chem 1992; 267: 2767; 13. Vilsen B, Andersen JP. FEBS Lett 1992; 306: 247; 14. Clarke DM et al. J Biol Chem 1993; 268: 18359; 15. Chen L et al. J Biol Chem 1996; 271: 10745; 16. Rice WJ, MacLennan DH. J Biol Chem 1996; 271: 31412; 17. Strock C et al. J Biol Chem 1998; 273: 15104; 18. Vilsen B, Andersen JP. Biochemistry 1998; 37: 10961; 19. Zhang Z et al. Biochemistry 2000; 39: 8758; 20. Menguy T et al. J Biol Chem 2002; 277: 13016; 21. Zhang Z et al. FEBS Lett 1993; 335: 261; 22. Zhang Z et al. J Biol Chem 1995; 270: 16283; 23. Maruyama K, MacLennan DH. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 3314; 24. Maruyama K et al. J Biol Chem 1989; 264: 13038; 25. McIntosh DB et al. J Biol Chem 1999; 274: 25227; 26. Clausen JD et al. J Biol Chem 2001; 276: 35741; 27. McIntosh DB et al. J Biol Chem 1996; 271: 25778; 28. Hua S et al. Biochemistry 2002; 41: 2264; 29. Clarke DM et al. J Biol Chem 1990; 265: 22223; 30. Vilsen B et al. J Biol Chem 1991; 266: 16157; 31. Vilsen B et al. Acta Physiol Scand 1992; 146: 279; 32. Sørensen TL et al. J Biol Chem 2000; 275: 28954; 33. Andersen JP, Sørensen T. Biochim Biophys Acta 1996; 1275: 118; 34. Andersen JP et al. Ann NY Acad Sci 1997; 834: 333; 35. Sørensen T et al. J Biol Chem 1997; 272: 30244; 36. Andersen JP. J Biol Chem 1995; 270: 908; 37. Adams P et al. Biochem J 1998; 335: 131; 38. Andersen JP. FEBS Lett 1994; 354: 93; 39. Andersen JP, Vilsen B. J Biol Chem 1994; 269: 15931; 40. Falson P et al. J Biol Chem 1997; 272: 17258; 41. Menguy T et al. J Biol Chem 1998; 273: 20134; 42. Zhang Z et al. J Biol Chem 2001; 276: 15232.) (d'après Wuytack *et al.*, 2002).*

Six résidus importants pour la fixation de calcium ont été identifiés par mutagenèse dirigée dès 1989 (Clarke *et al.*, 1989). Cette proposition était basée sur le fait que la mutation de chacun de ces résidus abolissait le transport de Ca^{2+} , la phosphorylation de l'enzyme par l'ATP et qu'il n'était plus possible d'inhiber la phosphorylation de l'ATPase par le Pi en présence de Ca^{2+} . Ces résidus sont situés sur 4 régions transmembranaires, à l'époque hypothétiques, différentes (E309 sur M4 ; E771 sur M5 ; N796, T799, D800 sur M6 ; E908 sur M8). L'hypothèse était que les groupements carboxylate (pour les résidus glutamate), carboxyamide (pour les résidus asparagine) ou hydroxyle (pour le résidu thréonine) de ces composés interviendraient comme ligands pour former des sites de liaisons de haute affinité. Un postulat de cette hypothèse était que les hélices M4, M5, M6 et M8 s'organisent pour rapprocher spatialement ces résidus.

Des études ultérieures ont permis d'affiner les caractéristiques de chacun des 6 mutants cités : ainsi, il a été montré que pour les mutants E309Q et N796A, l'inhibition par le Ca^{2+} de la phosphorylation par le Pi est observée pour des concentrations de Ca^{2+} peu différentes ($\text{Ca}_{1/2}$ égal à environ 10 μM) à celles nécessaires pour inhiber la phosphorylation de l'enzyme sauvage ($\text{Ca}_{1/2}$ égal à environ 1 μM). De plus, il était impossible de former le dérivé phosphorylé à partir de l'ATP pour ces mutants (Andersen et Vilsen, 1992; Andersen et Vilsen, 1994). Ces résultats ont permis aux auteurs de suggérer que les chaînes latérales de ces deux résidus seraient impliquées dans la formation du site de fixation du deuxième calcium, autorisant donc la fixation d'un premier calcium à des concentrations proches de celles autorisant la fixation de calcium pour l'enzyme sauvage. D'un autre côté, les mutants E771Q, T799A, et E908A peuvent être phosphorylés par l'ATP à de fortes concentrations de Ca^{2+} (supérieures au millimolaire) et leur phosphorylation par le Pi est inhibée pour des concentrations de Ca^{2+} supérieures au millimolaire (Andersen et Vilsen, 1992; Andersen et Vilsen, 1994). Andersen et Vilsen ont proposé que ces résidus seraient impliqués dans la formation du site de liaison du premier calcium. Enfin, le mutant D800N ne ressemble à aucun autre puisque la concentration de Ca^{2+} nécessaire pour la phosphorylation par l'ATP est supérieure à 10 mM alors que 0,5 mM de Ca^{2+} suffisent à inhiber la phosphorylation par

le Pi. Les caractéristiques intermédiaires du mutant D800A suggéraient que le résidu Asp800 pourrait contribuer à la fixation de Ca^{2+} au niveau des deux sites (Andersen et Vilsen, 1992; Andersen et Vilsen, 1994).

Les travaux de Maclennan et Coll puis de Andersen et Vilsen ont été confirmés de façon remarquable par la structure de l'ATPase à haute résolution (*cf.* Figure I.2-13). Parmi les autres acides aminés impliqués dans la fixation du Ca^{2+} dans la structure E1Ca₂ (Toyoshima *et al.*, 2000), les résidus Val304, Ala305 et Ile307 ne pouvaient être détectés par mutagenèse dirigée puisqu'ils n'interviennent pas par leur chaîne latérale. Au total, seul le résidu Asn768 n'avait pas été identifié au préalable par mutagenèse dirigée, comme un des sites importants de liaison du Ca^{2+} .

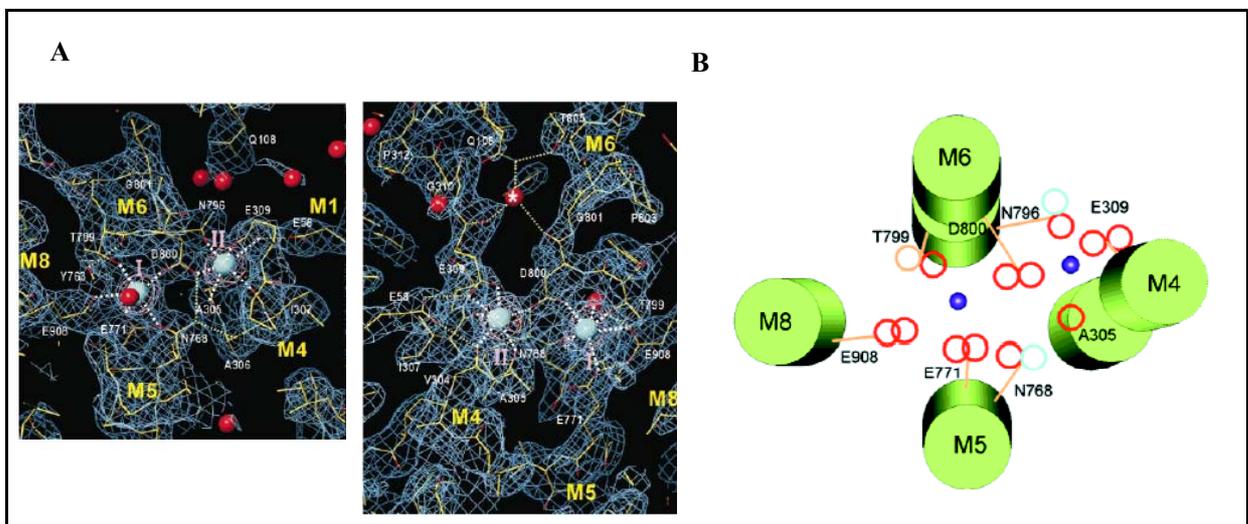


Figure I.2-13 Organisation spatiale des sites calcium

*A-Détail de la région transmembranaire au niveau des sites de fixation de calcium dans la structure 1EUL, observée par la face cytoplasmique (à gauche) ou parallèlement à la membrane (à droite) (Toyoshima *et al.*, 2000) B- Représentation schématique des acides aminés et des hélices transmembranaires participant à l'organisation des sites Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2000). Les hélices M4 et M6 sont respectivement interrompues au niveau des résidus Glu309 et Asp800. Les atomes d'oxygène sont représentés par des cercles rouges et les atomes d'azote par des cercles bleus. Le groupement alkyle de l'acide aminé Thr799 est représenté par un cercle orange. Les sphères bleues correspondent aux atomes de Ca^{2+} . Les hélices transmembranaires sont vues de la face cytoplasmique.*

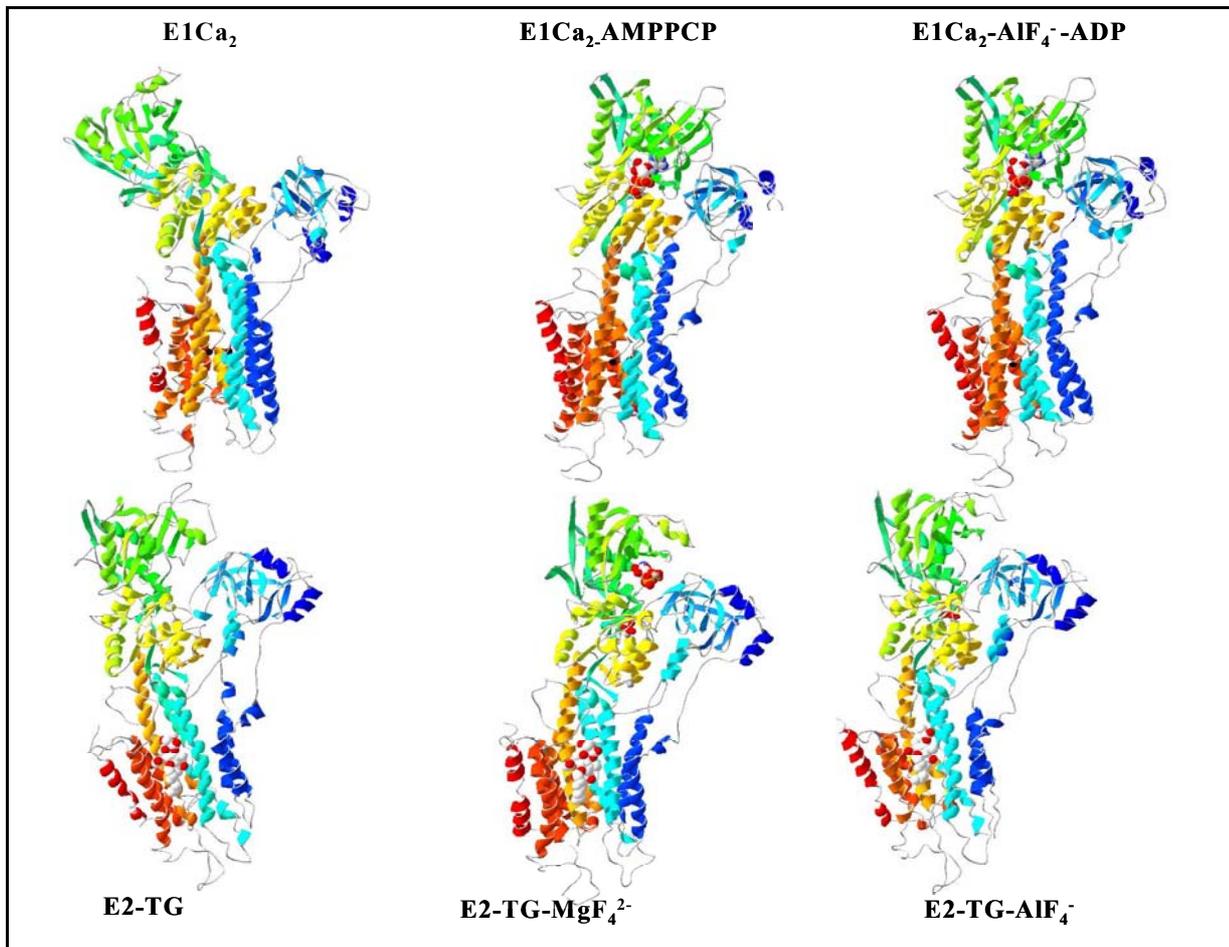


Figure I.2-14 Présentation des modèles structuraux obtenus pour différents états conformationnels de SERCA1a (d'après un schéma de Martin Picard, communication personnelle)

Ces différents modèles ont été obtenus en utilisant des conditions de cristallisation différentes. Les structures E1 ont été obtenues en présence de Ca²⁺ et les structures E2 en présence d'un inhibiteur, la thapsigargine (TG). L'AMP-PCP est un analogue non hydrolysable de l'ATP. L'AlF₄⁻ et le MgF₄²⁻ sont des analogues du phosphate inorganique. Les différents modèles sont extraits de Toyoshima et al., 2000; Toyoshima et Nomura, 2002; Olesen et al., 2004; Sørensen et al., 2004; Toyoshima et Mizutani, 2004; Toyoshima et al., 2004

b) Apport des différentes structures tridimensionnelles

L'utilisation des conditions de cristallisation différentes, d'inhibiteurs ou d'analogues de substrat a permis au groupe de Toyoshima et au groupe de Poul Nissen d'obtenir des cristaux et des informations structurales sur d'autres états conformationnels de SERCA1a de lapin.

En 2002, Toyoshima a publié un modèle structural obtenu à partir de cristaux formés en présence de thapsigargine (TG), inhibiteur maintenant l'enzyme dans un état conformationnel E2 (structure E2-TG sur la Figure I.2-14, Toyoshima et Nomura, 2002). En 2004, l'équipe de Poul Nissen a publié la structure à moins de 3 Å de l'ATPase i) en présence de Ca^{2+} et d'AMP-PCP, analogue non hydrolysable de l'ATP (structure E1Ca₂-AMPPCP sur la Figure I.2-14, supposée mimer l'étape de transition correspondant à la fixation de l'ATP ii), en présence de Ca^{2+} , d'ADP et d' AlF_4^- , analogue du phosphate ADP, (structure E1Ca₂- AlF_4^- -ADP, supposée mimer l'étape de transition d'hydrolyse de l'ATP) iii) en absence de Ca^{2+} et en présence d' AlF_4^- -thapsigargine (structure E2-TG- AlF_4^- supposée mimée l'état de transition E2P) (Olesen *et al.*, 2004; Sørensen *et al.*, 2004). Parallèlement l'équipe de Toyoshima publiait également la structure de l'ATPase en présence de Ca^{2+} et d'AMP-PCP ou d' AlF_4^- -ADP puis en absence de Ca^{2+} et en présence de MgF_4^{2-} -thapsigargine (structure E2-TG- MgF_4^{2-} décrite comme mimant également l'étape de transition supposée mimée l'état de transition E2P) (Toyoshima et Mizutani, 2004; Toyoshima *et al.*, 2004). Les 6 différentes structures qui résultent de tous ces travaux, y compris la première structure de 2000, sont présentées sur la Figure I.2-14. Les modèles présentés sur cette figure ne sont pas tous alignés et mais sont présentés dans le même code couleur. Il est possible de se rendre compte que les domaines cytoplasmiques effectuent de larges mouvements au cours du cycle catalytique. Le but de cette partie n'est pas de référencer les nombreux changements conformationnels ayant lieu, ceux-ci étant décrits par les auteurs eux-mêmes, mais plutôt de mettre en avant comment ces structures peuvent apporter des réponses à des questions posées par l'étude fonctionnelle.

L'une de ces questions concerne l'occlusion des 2 Ca^{2+} après phosphorylation de l'enzyme. Comme signalé plus haut, ce phénomène a été mis en évidence expérimentalement dès 1980 (Dupont, 1980) et peut être stabilisé par AlF_4^- (Troullier *et al.*, 1992). La structure obtenue en présence de cet inhibiteur apporte des éléments de réponse quant au mécanisme permettant l'occlusion. En effet, la Figure I.2-15 montre que dans la conformation $\text{E1Ca}_2\text{-AlF}_4^-$ -ADP, supposée mimer l'étape de transition d'hydrolyse de l'ATP, le domaine M1 est séparé en deux hélices. L'inclinaison de l'hélice la plus cytoplasmique vient former un « chapeau » au-dessus des deux ions calcium. Ceci contribue très probablement à empêcher leur dissociation du côté cytoplasmique, et donc à former l'état occlus.

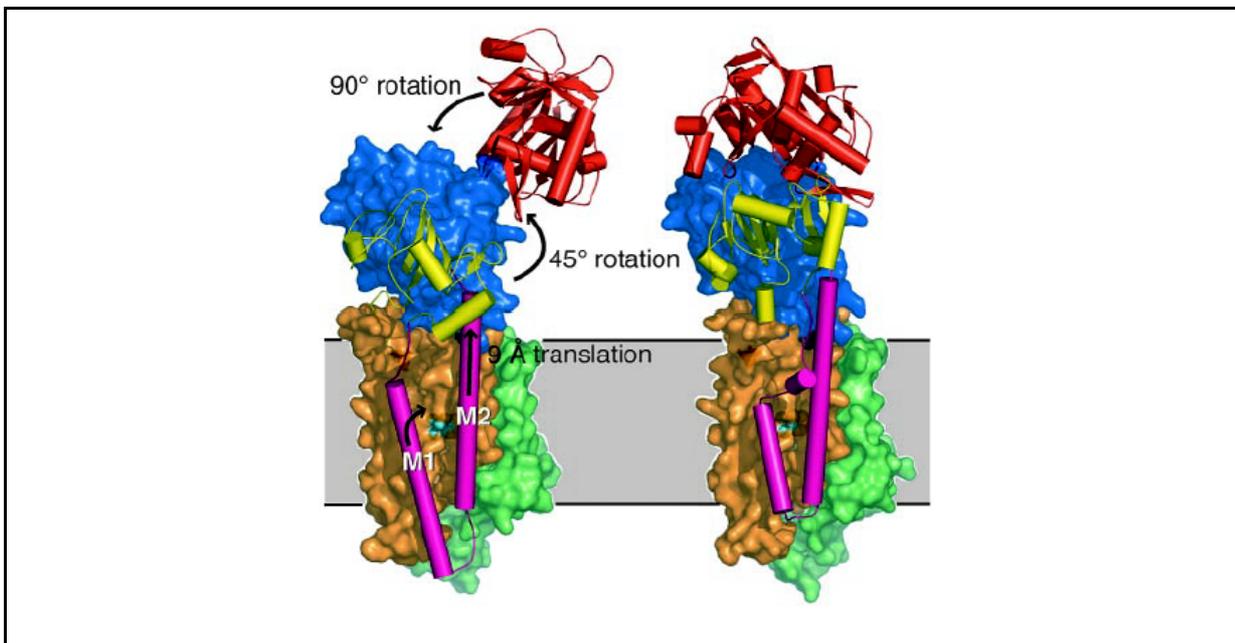


Figure I.2-15 Changement conformationnel entre la forme E1Ca_2 et la forme $\text{E1Ca}_2\text{-AlF}_4^-$ -ADP (extrait de Sørensen *et al.*, 2004)

A gauche, structure E1Ca_2 , à droite, structure $\text{E1Ca}_2\text{-AlF}_4^-$ -ADP. Les deux structures ont été alignées sur les domaines transmembranaires M7-M10. Les ions Ca^{2+} sont en turquoise.

L'analyse détaillée des six structures a fourni d'autres éléments de réponse ou parfois de simples pistes permettant de formuler de nouvelles hypothèses. La

comparaison des structures E2-TG et E2-TG- AlF_4^- laisse notamment penser que l'enzyme passe par un état où les protons, ions contre-transportés, sont occlus (Olesen *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'analyse de l'orientation des chaînes latérales des acides aminés impliqués dans les sites de fixation du calcium, donnent des éléments de réponse, permettant d'expliquer que certaines conformations présentent une haute affinité et d'autres une basse affinité. En effet, dans les formes E2, ces chaînes ne sont pas dans l'alignement supposé favorable observé dans les formes E1Ca₂ (pour plus d'informations sur la compréhension des relations structure/fonction qu'ont apporté les structures tridimensionnelles publiées, se référer à la revue de Møller *et al.*, 2005).

L'apport indéniable de ces modèles structuraux ne doit pas faire oublier les artefacts existants, d'une part du fait des conditions de cristallisation, d'autre part, du fait de l'utilisation des inhibiteurs ou des analogues. Cette réserve est illustrée par la structure obtenue en présence de Ca^{2+} et d'AMP-PCP. L'AMP-PCP est un analogue non hydrolysable de l'ATP. Il est donc supposé que la structure obtenue en présence d'AMP-PCP est un modèle de l'état de transition où les deux calciums sont fixés et où l'ATP est présent au niveau du site de fixation du nucléotide. Il s'avère que cette structure ne diffère pas de celle obtenue en présence d' $\text{AlF}_4^- + \text{ADP}$, supposée être un modèle de l'étape de transition de l'hydrolyse de l'ATP (Sørensen *et al.*, 2004). Dans cette structure les deux Ca^{2+} semblent occlus (*cf.* Figure I.2-15). Or les études fonctionnelles réalisées par les mêmes auteurs montrent qu'en présence d'AMP-PCP les ions Ca^{2+} ne sont pas occlus, contrairement aux expériences réalisées en présence d' AlF_4^- . Des expériences biochimiques complémentaires indiquent que, contrairement à la forme E1Ca₂- AlF_4^- -ADP, la structure en présence d'AMP-PCP serait fluctuante. Les conditions de cristallisation auraient donc figé la forme AMP-PCP dans une conformation donnée. Picard *et al.* appuient cette hypothèse en montrant que les conditions de cristallisation, notamment la forte concentration en Ca^{2+} de la préparation protéique utilisée, stabiliserait en effet la conformation dans laquelle les ions Ca^{2+} sont occlus (Picard *et al.*, 2005). Ces observations illustrent parfaitement le danger qu'il peut y avoir à interpréter des structures sans les données fonctionnelles associées.

Nous venons de voir comment les nombreuses données fonctionnelles accumulées depuis plus de trente ans sont complétées par les données structurales, enrichies récemment par les modèles de structures tridimensionnelles de différents états de transition du cycle catalytique.

Pour compléter les connaissances acquises sur les relations structure/fonction, il serait intéressant de connaître la structure d'autres états de transition. Il reste en effet plusieurs zones d'incertitudes dans la description du fonctionnement des SERCAS (Møller *et al.*, 2005). L'utilisation d'autres analogues est envisageable, mais il serait très intéressant de pouvoir analyser la structure de mutants. Cependant, l'obtention de cristaux nécessite des préparations protéiques pures, homogènes et concentrées et ces caractéristiques sont difficiles à obtenir pour des protéines membranaires, en particulier après leur expression dans un système hétérologue. Or, ce passage est obligatoire pour l'étude de mutants de SERCA1a, et plus généralement pour l'étude de protéines membranaires mammaliennes plus faiblement exprimées de manière endogène.

La partie suivante expose les différentes stratégies utilisées pour l'expression et la purification de protéines membranaires mammaliennes.

I.3 Expression et purification de protéines membranaires d'Eucaryotes supérieurs

Les protéines membranaires représentent 20 à 30% de la totalité des phases ouvertes de lectures des génomes séquencés (Wallin et Vonheijne, 1998). Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions basales de toutes cellules, notamment par leur importance dans les phénomènes de transduction du signal et de production d'énergie. De ce fait, elles sont les cibles privilégiées de nombreuses drogues. Au-delà de l'apport fondamental pour la compréhension du fonctionnement d'une cellule, la connaissance de la fonction et de la structure de nombreuses protéines membranaires serait un véritable atout pour la production de nouvelles drogues.

Le nombre de protéines membranaires dont la structure à l'échelle atomique est connue est limité : Sur environ 25 000 structures publiées (*cf.* <http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>), 96 correspondent à des structures de protéines membranaires différentes (différence entre espèces incluses ; valeur indiquée par http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html, dernière mise à jour le 7 septembre 2005, voir également <http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>). Parmi ces protéines membranaires, seules 18 appartiennent à des organismes eucaryotes pluricellulaires. A l'exception du canal potassique de rat (Long *et al.*, 2005), ces protéines sont toutes naturellement abondantes dans l'organisme hôte (par exemple : SERCA1a de lapin dans la membrane du réticulum sarcoplasmique des fibres du muscle squelettique (Toyoshima *et al.*, 2000; Sørensen *et al.*, 2004), l'ADP/ATP translocase dans les mitochondries de cœur de bœuf (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Pour la première fois en août 2005, il a été montré qu'il était possible d'obtenir la structure de protéines d'organismes eucaryotes pluricellulaires après expression hétérologue : l'équipe de Mackinnon a publié la structure jusqu'alors inconnue d'un canal potassique de rat après son expression hétérologue chez la levure (Long *et al.*, 2005) et il sera présenté dans cette thèse le travail ayant permis l'obtention de la structure de SERCA1a de lapin après son expression hétérologue dans la levure (Jidenko *et al.*, 2005). Les 78 autres protéines

membranaires, appartenant à des organismes unicellulaires sont soit naturellement abondantes dans l'organisme hôte (par exemple SERCA (*cf.* partie précédente) ou l'ADP/ATP translocase (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003), soit surexprimée dans l'organisme hôte, soit surexprimée chez un autre organisme unicellulaire, en général *E. coli* (par exemple : MsbA, un transporteur ABC surexprimé dans son organisme d'origine, *E. coli* (Chang et Roth, 2001), le cytochrome *b6f* isolé des thylakoides d'une souche modifiée de son organisme hôte, *Chlamydomonas reinhardt* (Stroebel *et al.*, 2003), ou encore un canal potassique voltage-dépendant d'une archéobactérie surexprimé chez *E. coli* (Jiang *et al.*, 2003). Le faible pourcentage de protéines membranaires dont la structure est connue, et plus encore, parmi celles ci, le faible pourcentage de structures correspondant à des protéines d'Eucaryotes supérieurs (> 19%) reflètent un problème sous-jacent : la difficulté de surexprimer puis de purifier les protéines membranaires, en particulier d'organisme pluricellulaire, limite l'étude de leur structure.

Différents systèmes d'expression hétérologue couplés à différentes techniques de purification ont permis l'étude biochimique *in vitro* de nombreuses protéines membranaires (voir par exemple pour revue Mus-Veteau, 2002), y compris les ATPases de type P ; la prochaine partie présente les principaux systèmes d'expression utilisés.

I.3.1 Les différents systèmes d'expression utilisés pour des protéines membranaires d'Eucaryotes supérieurs.

I.3.1.1 Utilisation d'un système procaryote, *E. coli*

La bactérie *Escherichia coli* a été abondamment utilisée pour l'expression hétérologue de protéines solubles (pour revue, voir Hockney, 1994) et présente à première vue de nombreux avantages. Le principal est que cet organisme a un temps de génération faible (20 min), ce qui permet d'obtenir rapidement de grandes quantités de biomasse et ce, à faible coût. De plus, la biologie moléculaire de cet organisme est bien connue : il existe de nombreuses souches modifiées, de nombreux vecteurs d'expression sont disponibles, il est simple et rapide de tester différentes constructions.

L'utilisation d'*E. coli* comme système hétérologue pour l'expression de protéines membranaires d'Eucaryotes a donné lieu à quelques résultats positifs. C'est le cas par exemple d'un récepteur couplé aux protéines G, le récepteur de la neurotensine du rat (Tucker et Grisshammer, 1996), du transporteur d'oxoglutarate bovin ou de l'ADP/ATP translocase bovine (Miroux et Walker, 1996). Toutefois les exemples de réussite restent rares et l'attractivité de ce système est compensée par la difficulté à y surexprimer des protéines membranaires, d'autant plus si la conservation de l'activité biologique est souhaitée. Le plus souvent, il est tout simplement impossible d'obtenir une surexpression, l'expression de la protéine étant toxique pour la bactérie. Miroux et Walker (Miroux et Walker, 1996) ont proposé une méthode de criblage qui leur a permis de sélectionner des souches d'*E. coli* mutantes, dans lesquelles il leur a été possible de produire de grandes quantités de différentes protéines membranaires, d'origine eucaryote ou procaryote.

En cas de taux d'expression correct, le principal problème rencontré est l'accumulation des protéines membranaires surexprimées dans des corps d'inclusions. Dans ces structures, les protéines sont en général inactives et retrouver une conformation active après purification n'est pas chose aisée (Mus-Veteau, 2002; Sarramegna *et al.*, 2003), même si quelques succès sont à noter (voir par exemple le transporteur d'oxaloglutarate (Fiermonte *et al.*, 1993)). Il faut noter que le problème rencontré avec les corps d'inclusions n'est pas l'apanage des protéines membranaires et a également été rencontré pour les protéines solubles (Hockney, 1994). L'équipe de de Gier (Drew *et al.*, 2001) a proposé une méthode de criblage de l'expression des protéines membranaires dans *E. coli* en fusionnant la GFP en C-terminal de la protéine membranaire en question. Si la GFP se retrouve dans les corps d'inclusion, elle n'est pas correctement repliée et ne fluoresce pas. Par contre, si la protéine de fusion est exprimée à la membrane, la GFP peut adopter une conformation correcte et une fluorescence pourra être observée. Ce système permet de détecter les protéines membranaires qui pourraient être surexprimées facilement dans *E. coli* mais n'apporte aucune solution en cas de taux d'expression trop faible.

En conclusion, le succès de la surexpression d'une protéine membranaire d'Eucaryotes fonctionnelle dans le système *E. coli* est loin d'être garanti. Toutefois, les méthodes proposées par l'équipe de Miroux et de Gier proposent des solutions très intéressantes qui peuvent éviter de négliger trop rapidement ce système.

I.3.1.2 Utilisation d'un système eucaryote simple : les levures

Différents types de levures sont utilisés pour l'expression hétérologue de protéines membranaires : la plus courante est *Saccharomyces cerevisiae* mais on trouve également des exemples d'expression hétérologue de protéines membranaires chez *Schizosaccharomyces pombe* ou *Pichia pastoris*. Les levures sont des organismes unicellulaires eucaryotes simples. Le génome des espèces citées précédemment est au moins partiellement connu et est modifiable grâce aux techniques de biologie moléculaire actuelle. Les levures présentent un temps de génération qui reste faible (autour de 2h), elles se cultivent dans des milieux simples et peu chers et cette culture peut se faire à grande échelle dans des fermenteurs. Par ailleurs, les levures sont capables de réaliser des transformations post-traductionnelles comme les phosphorylations, des additions d'acides gras (isoprénylations, myrostylations) ou encore des glycosylations, même si les sucres ajoutés sont majoritairement des mannoses ce qui n'est pas le cas dans les cellules d'Eucaryotes supérieurs (cf. Cereghino et Cregg, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Elle apparaît donc comme un intermédiaire entre les systèmes procaryotes et les systèmes eucaryotes plus complexes.

Le succès de *S. cerevisiae* est indéniable : c'est un organisme dont la biologie moléculaire est connue, dont le génome est séquencé entièrement depuis 1997, dont de nombreuses souches mutantes sont disponibles et qui est couramment utilisée en laboratoire, que ce soit pour l'expression de protéines ou pour d'autres études, comme l'étude en système double hybride. *P. pastoris* peut présenter des avantages. C'est une levure méthylotrophe, c'est-à-dire pouvant croître avec comme unique source de carbone du méthanol. Les milieux de culture pour cette levure sont extrêmement simples (glycérol ou méthanol, biotine, sels et oligoéléments). Par ailleurs, cette levure

peut atteindre des densités cellulaires très importantes en fermenteur (pour revue voir Cereghino et Cregg, 2000 ou Macauley-Patrick *et al.*, 2005). A l'inverse des deux levures citées précédemment qui sont des levures dites bourgeonnantes, *S. pombe* est une levure fissipare. Sa biologie moléculaire présente de nombreuses caractéristiques qui la rapprochent davantage des Eucaryotes supérieurs par rapport à ses deux consoeurs. Parmi ces avantages, ceux qui pourraient avoir une importance pour l'expression de certaines protéines sont la possibilité d'intégrer des galactoses dans les chaînes glycosylées et la possibilité d'isoprénylation (pour revue voir Giga-Hama et Kumagai, 1999).

Il existe de nombreux vecteurs d'expression commercialisés pour ces trois souches de levures. Ce sont des vecteurs navettes permettant de réaliser les constructions chez *E. coli*. Chez *P. pastoris*, les vecteurs d'expression s'intègrent dans l'ADN génomique. Obtenir une souche présentant plusieurs copies du gène d'intérêt est donc plus difficile qu'avec les vecteurs de type épisomal utilisés chez *S. cerevisiae* ou *S. pombe*. Pour ces trois souches de levures, il existe des promoteurs inductibles, permettant de retarder la production de la protéine hétérologue. Les promoteurs des gènes *GAL* chez *S. cerevisiae* ou *AOX1* chez *P. pastoris* sont inductibles par la présence respectivement de galactose et de méthanol (*cf.* chapitre « Techniques utilisées » paragraphe II.1.3.1 et Cereghino et Cregg, 2000). Chez *S. pombe*, les promoteurs qualifiés d'inductibles tels que celui du gène *NMT1*, sont des promoteurs induits par l'absence d'une substance, ici la thiamine, ce qui est plus difficile à contrôler (Giga-Hama et Kumagai, 1999).

Ces systèmes ont permis l'expression de différentes ATPases de type P d'origine mammalienne: SERCA1a (Centeno *et al.*, 1994, Lenoir *et al.*, 2002), l'ATPase Na/K (Pedersen *et al.*, 1996), l'ATPase Cu (Portmann et Solioz, 2005) et l'ATPase Ca/Mn (Ton *et al.*, 2002) ont été exprimées chez *S. cerevisiae*. *P. pastoris* a également été utilisée pour exprimer l'ATPase Na/K (Strugatsky *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2005). A ma connaissance, aucune littérature ne met en avant l'utilisation de *S. pombe* comme système d'expression pour une ATPase de type P mammalienne. Cette levure a toutefois

été utilisée avec succès pour d'autres protéines membranaires (Giga-Hama et Kumagai, 1999).

Les levures semblent donc être des hôtes intéressants pour l'expression de protéines membranaires. Des problèmes liés à l'utilisation des levures comme système hôte peuvent toutefois être notés : un taux d'expression trop fort de protéines étrangères peut être létal mais l'utilisation des promoteurs inductibles a permis de contourner ce problème (Schultz *et al.*, 1987, Pedersen *et al.*, 1996). La composition en lipides des membranes de levures diffèrent également par rapport aux cellules eucaryotes supérieures, notamment par la présence d'ergostérol plutôt que de cholestérol, or, la composition en lipides de l'environnement membranaire d'une protéine peut modifier sa fonctionnalité (Cohen *et al.*, 2005). Par ailleurs, pour les protéines glycosylées, la différence de système de glycosylation peut altérer la fonction de la protéine.

I.3.1.3 Utilisation de cellules d'insectes

Les cellules d'insectes possèdent les équipements enzymatiques leur permettant d'effectuer les modifications post-traductionnelles semblables à celles des Vertébrés, même si une analyse détaillée des glycoprotéines exprimées dans des cellules d'insectes a montré des différences dans la taille et la structure des oligosaccharides par rapport à celle des glycoprotéines de mammifères. Ainsi, les glycoprotéines de mammifères exprimées dans les cellules de lépidoptères *Sf9*, sont incomplètes car les chaînes oligosaccharidiques sont plus courtes (Devauchelle, [http://www.univ-montp1.fr / biotech/ Baculovirus/BaculoContenu.htm](http://www.univ-montp1.fr/biotech/Baculovirus/BaculoContenu.htm) , version du 30/11/2000). Le temps de doublement des populations de cellules est de 16 à 24 heures. La plupart des lignées de cellules d'insectes peuvent croître en tapis cellulaire ou en suspension: la densité cellulaire varie de 2×10^6 à 5×10^6 cellules/ml et cette densité peut être augmentée dans des bioréacteurs sous réserve de l'ajout d'agent protégeant du cisaillement lié à l'agitation (Devauchelle et Cérutti,).

Les cellules d'insectes les plus couramment utilisées pour l'expression hétérologue de protéines membranaires sont les cellules *Sf9*. L'expression hétérologue en cellules *Sf9* nécessitent leur infection par des virus. Les Baculovirus sont des virus à ADN double brin encapsulés infectant spécifiquement les cellules d'insectes. La taille de la nucléocapside de ces virus est flexible, autorisant l'introduction de fragments d'ADN de grande taille dans le génome du baculovirus. La technologie visant à la production de baculovirus recombinant est connue (voir par exemple Pharmingen, 1999) ce qui permet d'infecter des cellules d'insectes avec un virus recombinant ayant intégré le gène d'intérêt dans son génome. Le gène d'intérêt, intégré au génome du baculovirus est généralement sous contrôle d'un promoteur fort, généralement celui de la polyhédrine, composant de la nucléocapside. Sous contrôle de ce promoteur, le gène va s'exprimer tardivement, ce qui est un avantage quand le produit est toxique pour la cellule.

Ce système d'expression a été utilisé avec un certain succès pour plusieurs ATPases de type P : pour SERCA (Skerjanc *et al.*, 1993; Miras *et al.*, 2001), pour différentes isoformes de PMCA (Preiano *et al.*, 1996; Guerini *et al.*, 2003), pour l'ATPase Na/K (Hu *et al.*, 2000), pour l'ATPase Cu (Tsivkovskii *et al.*, 2002) ainsi que pour l'ATPase H/K (Klaassen *et al.*, 1993).

Le système baculovirus/cellules d'insectes semble avoir fait ses preuves pour l'expression de nombreuses protéines. Il peut permettre d'obtenir un fort pourcentage de protéines membranaires exprimées, mais cette quantité apparente peut se faire au détriment de l'activité (voir l'expression de SERCA1a décrite dans Miras *et al.*, 2001 et discutée plus loin, paragraphe I.3.1.7). Ses faiblesses sont un temps de génération de 24h, et une culture en milieu complexe et cher. Par ailleurs, pour l'instant, il n'y a pas de lignée stable : à la fin de son cycle, le baculovirus tue les cellules. Des études sont en cours pour intégrer d'un fragment d'ADN du baculovirus dans le génome cellulaire, ce qui conduirait à un système d'expression permanent et stable et dont les taux de production seraient aussi élevés qu'avec le baculovirus (Devauchelle et Cérutti,)

Un autre type de cellules d'Insectes, les cellules Schneider 2 issues de la drosophile, a été également été utilisé pour la production de récepteurs couplés aux protéines G (Tota *et al.*, 1995; Perret *et al.*, 2003). Ces lignées cellulaires peuvent être

transfectées de manière stable par le gène d'intérêt, celui-ci pouvant être placé sous un promoteur inductible par le sulfate de cuivre (CuSO_4). L'équipe de Pattus a comparé pour l'expression hétérologue du récepteur humain aux opioïdes mu, l'utilisation des cellules *Sf9* infectées par le baculovirus et les cellules *Sf9* ou Schneider 2 transfectées de manière stable (Kempf *et al.*, 2002; Perret *et al.*, 2003). Les auteurs montrent que le taux d'expression de ce récepteur dans les lignées Schneider 2 sont plus élevés que dans les lignées *Sf9* stables, mais restent 3-4 fois moins élevés que lors de l'utilisation de cellules *Sf9* infectées. Toutefois, il faut noter que les auteurs n'avaient pas essayé d'optimiser le système Schneider 2.

I.3.1.4 L'ovocyte de xénope

L'ovocyte de xénope présente l'avantage d'être une grande cellule (~1 mm de diamètre) facilement manipulable. Il est possible d'injecter dans cette cellule des ADNc ou des ARNm du gène d'intérêt, qui sera alors exprimé.

Cette technique nécessite une injection séparée ovocyte par ovocyte et ne se prête donc pas à l'expression de protéines à grande échelle. Toutefois, ce système peut être utile pour étudier la fonction d'une protéine membranaire, notamment pour les protéines adressées à la membrane plasmique qui pourront être étudiées par la technique de patch clamp.

L'ATPase H/K a été étudié dans ce système, l'ovocyte servant alors de « vésicules géantes » permettant l'accumulation de l'ion transporté, le Rb, analogue de l'ion K (Codina *et al.*, 1996). Des mutants de la sous-unité α de l'ATPase Na/K ont également été étudiés grâce à ce système (Crambert *et al.*, 2004).

I.3.1.5 Les cellules de Mammifères

Un des avantages majeur en faveur de l'expression en cellules de mammifères est que la protéine à étudier se trouvera dans un environnement très similaire à son environnement naturel, notamment en terme de composition lipidique des membranes ou de glycosylation. Les protéines d'intérêt peuvent être exprimées par deux approches :

une transfection transitoire ou la formation de lignées stables. Ces technologies sont maîtrisées, mais la formation de lignées stables est un procédé de longue haleine (plusieurs mois). Par ailleurs, des protéines homologues endogènes peuvent être présentes : si ce phénomène peut se retrouver également dans les autres systèmes précédemment cités, il est omniprésent ici, ce qui impose de toujours travailler également sur des cellules transfectées avec un vecteur non recombinant.

Ces cellules ont été abondamment utilisées pour exprimer des ATPases de type P d'origine mammalienne. Ainsi, ont été exprimées dans des cellules COS-1, les SERCA (voir par exemple : Maruyama et MacLennan, 1988; Zhang *et al.*, 2001 pour SERCA1, Lytton *et al.*, 1992 ; Dode *et al.*, 2002 pour des comparaisons entre les différentes isoformes), les PMCA (Preiano *et al.*, 1996) ; l'ATPase Na/K (Toustrup-Jensen et Vilsen, 2002) ; dans des cellules HEK, SERCA (Bober *et al.*, 2004) ou l'ATPase H/K (Asano *et al.*, 1996) ; dans des cellules CHO, l'ATPase Cu⁺ (Voskoboinik *et al.*, 2001).

Les références citées ci-dessus illustrent que les cellules de mammifères ont permis de nombreuses études fonctionnelles de protéines sauvages ou de mutants. Toutefois, de nombreuses limites à leur utilisation pour des expressions à grande échelle sont à signaler: le temps de génération de cellules de mammifères est long, de l'ordre de 48h, leur culture est délicate et utilise des milieux complexes et chers. Par ailleurs, il existe généralement une dépendance d'ancrage au flacon de culture qui limite le volume de culture possible. Pour certaines lignées récentes, cette dépendance n'existe plus.

I.3.1.6 Les systèmes d'expression *in vitro*

Le principe de l'expression *in vitro* des protéines est d'introduire l'ADN codant pour la protéine d'intérêt dans un milieu réactionnel contenant tous les éléments nécessaires pour qu'ait lieu la transcription et la traduction de la protéine (*cf.* Figure I.3-1A). Actuellement, toute la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle est apportée par l'utilisation de lysats cellulaires (*E. coli*, cellules de germe de blé ou réticulocytes de lapin). Deux types de systèmes sont disponibles commercialement : un premier où tous les composants, y compris la protéine nouvellement traduite, sont

mélangés (méthode en « batch ») et un deuxième où la synthèse de la protéine a lieu dans un compartiment séparé d'un réservoir par une membrane semi-perméable (cf. Figure I.3-1B). L'utilisation de ce dernier système permet d'avoir une réserve des substrats essentiels et de diluer les réactifs potentiellement inhibiteurs.

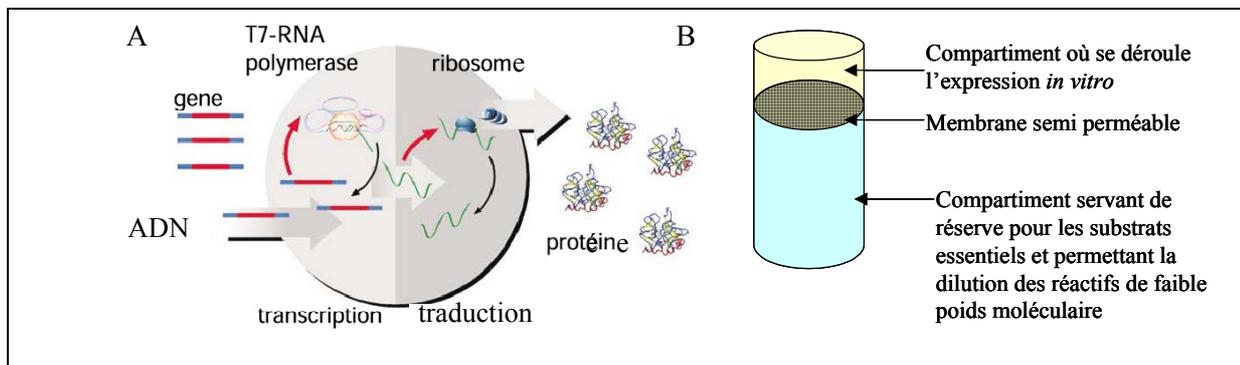


Figure I.3-1 : Présentation du système d'expression *in vitro*.

A-Principe du système d'expression in vitro B-Schématisation d'un module d'expression utilisant une membrane semi-perméable (emprunté à Roche).

Depuis 2004, les systèmes d'expression acellulaire ont été utilisés avec succès pour les productions de protéines membranaires (Berrier *et al.*, 2004 ; Klammt *et al.*, 2004 ; Elbaz *et al.*, 2004 ; Ishihara *et al.*, 2005). Une des étapes nécessaires dans l'adaptation de ce système à l'expression de protéines membranaires a été de tester sa compatibilité avec l'utilisation de détergents, agents permettant la solubilisation de la protéine (cf. paragraphe I.3.2) . Il a été montré que certains détergents inhibent la synthèse ; c'est le cas par exemple du désoxycholate ou du *n*-octyl- β -D-glucoside (Berrier *et al.*, 2004). Les résultats obtenus, que ce soit avec des protéines d'origine bactérienne (par exemple un canal potassique, Berrier *et al.*, 2004 ou une petite protéine ABC, Elbaz *et al.*, 2004) ou d'origine mammalienne (un récepteur couplé aux protéines G, Ishihara *et al.*, 2005), sont prometteurs : 1 à 2 mg de protéines sont produites dans un 1 mL de milieu réactionnel, et les protéines produites semblent être fonctionnelles.

Ces systèmes, certes onéreux, offrent une flexibilité incomparable, par rapport aux systèmes cellulaires, pour manipuler les paramètres d'expression. Ils permettent d'éviter d'être en présence de protéines homologues endogènes et également d'envisager la production de protéines toxiques. Il faut noter qu'ils ne dispensent pas d'une étape de purification ultérieure. Par ailleurs, le contexte acellulaire est peut-être plus difficile à adapter pour une protéine membranaire. Il semblerait que les membranes présentes dans les lysats permettent l'expression de protéines membranaires (Elbaz *et al.*, 2004). Cependant, l'utilisation de détergents ou l'ajout de liposomes semblent suffire pour obtenir de bons rendements.

I.3.1.7 Comparaison de ces systèmes pour l'expression hétérologue de SERCA1a

Les paragraphes précédents illustrent le vaste choix offert pour exprimer une protéine membranaire. Je propose ici de regarder plus en détails les résultats obtenus pour SERCA1a, cette protéine étant non seulement mon sujet d'étude mais aussi une des ATPases de type P dont l'expression a été testée dans toutes les catégories de système d'expression exceptés les systèmes d'expression *in vitro* (mais peut-être n'est-ce qu'une question de temps !). (Le système *E. coli* a été testé sans succès dans notre laboratoire (Fuentes *et al.*, résultats non publiés)).

Le plus ancien système d'expression hétérologue de SERCA1 est sans aucun doute le système en cellules de mammifères. En 1988, Maruyama et MacLennan (Maruyama et MacLennan, 1988) transfectent des cellules COS-1 avec l'ADNc des isoformes SERCA1a et SERCA1b. Ils obtiennent des fractions microsomales contenant 5% d'ATPases. Le rendement global est toutefois faible puisqu'ils n'obtiennent que 100 μ g de protéines microsomales totales à partir de 5 boîtes de pétri de 10cm. Toutefois, les SERCAs exprimées sont actives et le système permet de mesurer le transport de calcium ou la phosphorylation de l'ATPase. Les auteurs ont ainsi pu pour la première fois étudier la conséquence fonctionnelle de mutations dans l'ATPase. Ce travail a ouvert la voie vers l'étude de nombreux mutants (voir entre autres Clarke *et al.*, 1989, Zhang *et al.*, 2001) ou à d'autres isoformes SERCA (voir par exemple Dode *et al.*, 2002 ou Lytton *et al.*,

1992). Dans l'article de Zhang *et al.* (2000), les auteurs ont optimisé le système, notamment en augmentant le nombre de cellules transfectées grâce à l'utilisation des vecteurs adénovirus et en utilisant un promoteur plus fort. Les fractions microsomales qu'ils ont obtenues contenaient de 10-15% de SERCA, ce qui a permis aux auteurs de réaliser des mesures de fixation de calcium (voir également Strock *et al.*, 1998).

Un autre système d'expression a été proposé en 1993 par Skerjanc et ses collaborateurs (Skerjanc *et al.*, 1993) : les auteurs ont utilisé les cellules d'insectes *Sf9* transfectées avec un baculovirus recombinant. Pour un litre de culture, c'est-à-dire 50 flacons de 20 mL de monocouches de cellules, les auteurs obtiennent 3mg d'ATPase dans l'homogénat total ou 1,5mg d'ATPase dans la fraction microsomale, ce qui correspond à 1 à 2% des protéines totales de cette fraction. Cette méthode a permis aux auteurs de purifier la protéine recombinante et un mutant, E309Q, en présence d'un détergent ($C_{12}E_8$) et de phospholipides, grâce à l'utilisation d'un anticorps (*cf.* I.3.3.1). En 2001, Miras et ses collaborateurs (Miras *et al.*, 2001) ont utilisé le même système en l'améliorant sensiblement. Dans des essais préliminaires, SERCA représentait 24% des protéines membranaires mais était peu active. Finalement, en faisant varier les conditions de culture des cellules, les auteurs ont trouvé que l'addition de $45\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de glucose dans le milieu permettait d'obtenir des fractions membranaires renfermant 6% de SERCA, dont 1/3 était active. Le rendement final obtenu est de 6mg de SERCA membranaire pour un litre de culture. Cette procédure a permis aux auteurs de purifier la protéine recombinante grâce à son affinité pour le composant Red120 (*cf.* I.3.3.1).

Le système le plus récemment mis au point est l'expression de SERCA dans la levure. En 1994, Centeno *et al.* ont exprimé SERCA dans la levure *S. cerevisiae* (Centeno *et al.*, 1994) : les auteurs ont placé l'ADNc de SERCA sous contrôle d'un promoteur inductible par le galactose, ce qui leur a permis d'obtenir des lignées stables de levures recombinantes. Après préculture en milieu contenant du glucose, les levures étaient cultivées en présence de galactose. Ce protocole a permis aux auteurs d'obtenir environ 1mg de SERCA par litre de culture, ce qui représente 0,1% des protéines totales dans l'extrait brut. Les auteurs ont remarqué un enrichissement de la fraction correspondant aux membranes plasmiques puisque l'ATPase représente alors 0,3% des protéines

totales. Ce faible taux d'expression a toutefois permis aux auteurs de purifier la protéine grâce à l'utilisation d'un anticorps (*cf.* paragraphe I.3.3.1). Au cours d'une expérience parallèle, l'ADNc de SERCA était sous contrôle d'un promoteur constitutif (P_{PMA1}) : les auteurs se sont rendus compte que l'expression de SERCA induisait la mort des cellules. Ce protocole a été amélioré sur plusieurs points quelques années plus tard (Lenoir *et al.*, 2002) : l'ADNc est toujours placé sous contrôle d'un promoteur inductible par le galactose mais *i)* les auteurs ont utilisé un promoteur hybride *GAL10-CYC1*, plus fort que le promoteur *GAL10* *ii)* les auteurs ont modifié la souche de levure pour augmenter la quantité d'activateur de transcription Gal4p disponible lors de l'induction. L'utilisation du vecteur pYEDP60, contenant le gène *ADE2* a permis la croissance des levures en milieu riche. L'induction de l'expression de la protéine a lieu plus tardivement, permettant de limiter un éventuel effet toxique de la protéine. Ce protocole a permis d'augmenter d'environ 10 fois la quantité de levures récoltées. Parallèlement, le protocole d'induction a été optimisé : par deux inductions successives, les auteurs ont amélioré le pourcentage de SERCA exprimée. Cette double optimisation a permis aux auteurs d'obtenir 25 mg de SERCA par litre de culture dans le lysat total, et 5-6mg de SERCA dans la fraction membranaire dite légère. Ces membranes, correspondant au réticulum endoplasmique et aux vésicules de sécrétion, contiennent une protéine SERCA active, contrairement aux fractions membranaires dites lourdes, correspondant aux membranes plasmiques et aux mitochondries (voir Lenoir, 2003). A partir de ces membranes, les auteurs ont pu purifier environ 1 mg de protéines (*cf.* paragraphe I.3.3.2b)). Il faut noter qu'une autre équipe au Brésil a également exprimé SERCA dans *S. cerevisiae* (Reis *et al.*, 1999). Reis et ses collaborateurs ont notamment testé l'effet de constructions chimériques sur l'expression de SERCA. Ces constructions sont placées sous contrôle d'un promoteur thermosensible. Le meilleur résultat a été obtenu en plaçant les 88 premiers résidus de la H⁺ ATPase de la levure ou une étiquette histidine à l'extrémité N-terminale de SERCA : les auteurs ont ainsi obtenu 850 µg d'ATPase par litre de culture. Toutefois ces constructions ne semblent pas avoir été utilisées pour étudier l'ATPase.

En conclusion (*cf.* Tableau I.3-1): les systèmes d'expression en cellules de mammifères ont été abondamment utilisés pour étudier toute une série de mutations de SERCA1a, toutefois, la faible quantité de cellules pouvant être cultivées limite l'utilisation de ce système à l'étude de la fonction. Les expressions en utilisant les cellules d'insectes ou *S. cerevisiae* ont toutes deux donné des résultats similaires (Miras *et al.*, 2001; Lenoir *et al.*, 2002) ; toutefois, la culture de levures est plus aisée et moins onéreuse.

Les différents systèmes d'expression peuvent être également comparés pour d'autres ATPases de type P. Le Tableau I.3-2 présente quelques résultats obtenus pour d'autres ATPases de type P, notamment pour l'ATPase Na/K dont l'expression a été testée dans les différents systèmes. Les résultats obtenus sont similaires à ceux qui ont pu être observés pour SERCA. Notons de surcroît le rendement très intéressant obtenu par Parcej et Eckhardt-Strelau (2003) puis Long *et al.* (2005) pour l'expression d'un canal potassique de rat dans *P. pastoris*: En utilisant un fermenteur pour la culture de *P. pastoris*, ils obtiennent en effet 250g de levures par litre de culture ce qui leur permet d'obtenir environ 2000 mg de protéines membranaires et de purifier environ 25 mg de sous unités Kv1.2 pure à 75% par litre de levures.

Les taux d'expression pour différentes ATPase de type P obtenus dans différents systèmes ont permis aux auteurs d'envisager leur purification. Une étape préalable est de solubiliser la protéine membranaire, étape qui peut parfois se révéler être limitante.

ATPase	Origine	Expression		Solubilisation	Première étape de purification			Purification additionnelle			Références
		Hôte	rendement		système	rendement	pureté	système	rendement	pureté	
SERCA1a	lapin	COS-1	5% des PM ¹	-	-	-	-	-	-	-	Maruyama et MacLennan, 1988
SERCA1a	poulet	COS-1	10% des PM	-	-	-	-	-	-	-	Zhang <i>et al.</i> , 2000
SERCA1	lapin	<i>Sf9</i>	1-2% PM 3mg/L	C12E8 (+ PL ²)	Anticorps (+PL)	375µg/L	< 30% ³	-	-	-	Skerjanc <i>et al.</i> , 1993
SERCA	lapin	<i>Sf9</i>	6% PM (mais 1/3 d'active) 6 mg/L	C12E8 (+ PL)	His (+PL)	0 (trop peu de fixation)		-	-	-	Miras <i>et al.</i> , 2001
					Red 120 (+PL)	2 mg/L	26%				
SERCA	lapin	<i>S.cerevisiae</i>	0,3% PM 1mg/L	C12E8	Anticorps (+PL)	ND	ND	-	-	-	Centeno <i>et al.</i> , 1994
SERCA wt 6His-N ^{al} 4	lapin	<i>S.cerevisiae</i>	1-2% PM 300µg/L 3-6% 500µg/L	-	-	-	-	-	-	-	Reis <i>et al.</i> , 1999
SERCA	lapin	<i>S.cerevisiae</i>	2% PM ⁵ 5.5mg/L	DDM (C12E8 et LPC) ⁶	His (+PL)	1 mg/L de culture	50-60%	Red 120	0.28mg/L de culture	70%	Lenoir <i>et al.</i> , 2002

Tableau I.3-1 Bilan de quelques essais d'expression et purification de l'ATPase SERCA

¹PM : Protéines membranaires ² (+PL) : addition de phospholipides ³estimation personnelle, contamination par l'anticorps - ⁴6His-N^{al} : addition d'une étiquette 6 His en N-terminal. -⁵ uniquement fractions microsomales-⁶ détergent testé mais non choisi

ATPase	Origine	Expression		Solubilisation	Première étape de purification			Purification additionnelle			Références
		Hôte	rendement		système	rendement	pureté	système	rendement	pureté	
Na/K	porc	<i>S. cerevisiae</i>	10-15 pmol O /mg PM ¹	SDS	-	-	-	-	-	-	Pedersen <i>et al.</i> , 1996
Na/K	mouton	<i>Sf9</i>	16- 20pmol/mg	-	-	-	-	-	-	-	Hu <i>et al.</i> , 2000
Na/K	rat	COS-1	30-60 pmol O /mg PM	-	-	-	-	-	-	-	Toustrup-Jensen et Vilsen, 2003
Na/K	porc	<i>P. pastoris</i>	25-30 pmol O /mg PM	DDM (Fos choline et C12E8) ²	His (+PL) ³	ND	30-50%	Exclusion par la taille	ND	70%	Cohen <i>et al.</i> , 2005
Cu	humaine	<i>S. cerevisiae</i>	ND	DDM	His	ND	10-20	Echangeuse d'anions	0.3mg/L	75%	Portmann et Solioz, 2005
PMCA	humaine	<i>Sf9</i>	ND (forte)	Triton X-100	L ⁴ (calmoduline) (+PL)		ND (>90%)				Guerini <i>et al.</i> , 2003

Tableau I.3-2 : Bilans de quelques essais d'expression et de purification d'ATPases de type P

¹ O/mg PM : fixation de ouabaine par mg de protéines membranaires-² détergents testés mais non choisis-³ (+ PL) : addition de phospholipides-⁴

L : ligand.

I.3.2 Une étape supplémentaire par rapport aux protéines solubles : la solubilisation.

Dans le cas des protéines solubles, la protéine d'intérêt se trouve en solution dans un système aqueux. Dans le cas de protéines membranaires, la protéine à purifier se trouve dans un environnement particulier, la membrane biologique, mélange de phospholipides, de sphingolipides, de cholestérol, de protéines... Pour espérer purifier la protéine, il faut l'extraire de cet environnement, donc désolidariser cet ensemble. Le problème est que la protéine membranaire possède des zones hydrophobes exposées à sa surface, celles-là même qui sont en interaction avec la bicouche lipidique : la solution qui consisterait à simplement éliminer les phospholipides (en les dissolvant dans un solvant organique par exemple) conduirait à l'exposition de ces surfaces, ce qui, par action de l'effet hydrophobe, entraînerait les protéines à s'agréger (Tanford, 1991). L'utilisation de détergent permet de solubiliser la protéine sans exposer ces surfaces. Le principe de la solubilisation d'une protéine par un détergent est présenté dans la Figure I.3-2.

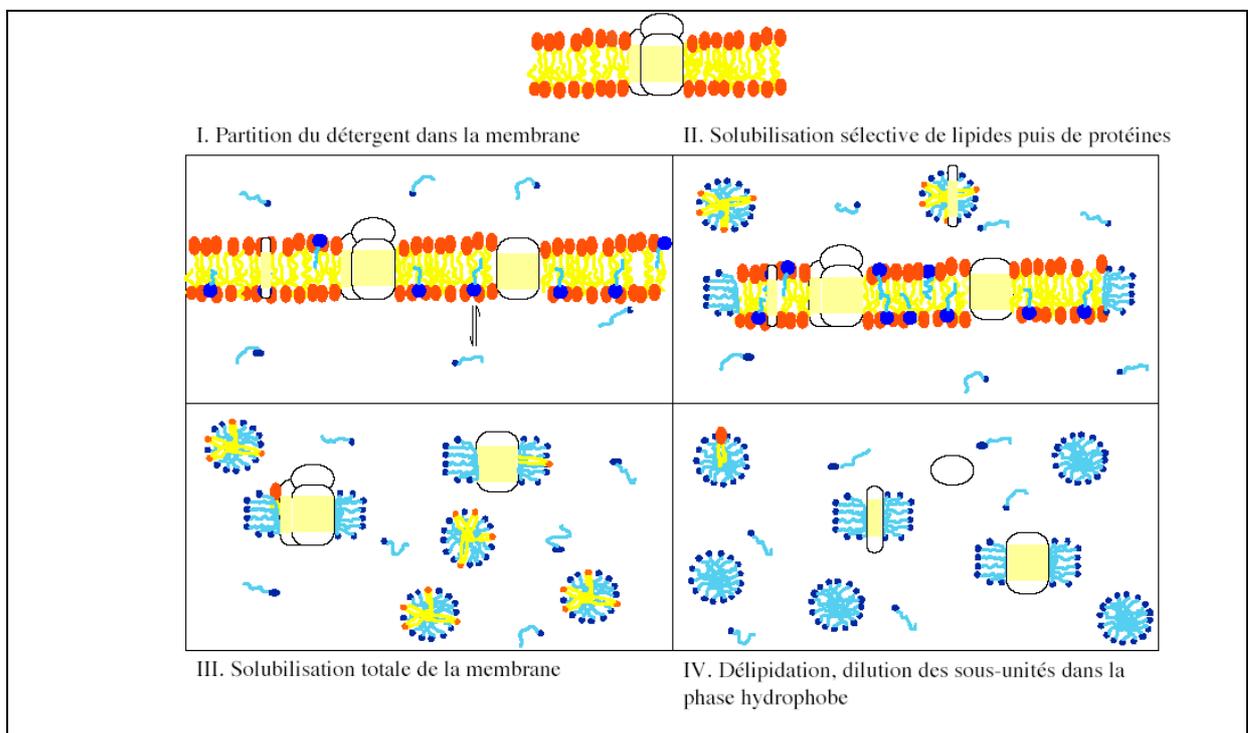


Figure I.3-2 Solubilisation d'une membrane par un détergent (emprunté à Breyton, 2004)

Il existe une grande diversité de détergents disponibles sur le marché (voir quelques exemples dans le Tableau I.3-3) et il ne semble (malheureusement) pas y avoir de règle permettant de prédire l'efficacité du détergent pour solubiliser la protéine (voir les différents détergents utilisés pour solubiliser des ATPases de type P dans le Tableau I.3-4)

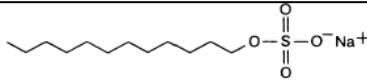
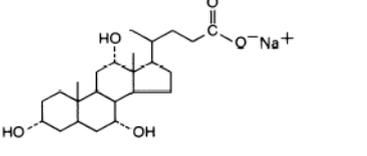
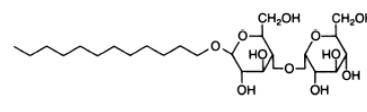
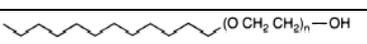
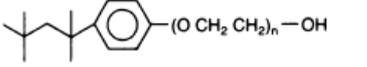
Nom du détergent	Formule	Nature du détergent	CMC (mM)	M	N
Sodium dodécyl sulfate (SDS)		Anionique	1,7-7,1	288	62-101
Acide cholique		Sel biliaire	10	409	4
Dodécyl β D-maltoside (DDM)		Non chargé	0,18	511	110-140
C ₁₂ E ₈		Non chargé	0,09	538	90-120
Triton X-100		Non chargé	0,25	625	75-165

Tableau I.3-3 Quelques détergents utilisés en biochimie des protéines membranaires et leurs propriétés (données extraites de le Maire *et al.*, 2000)

La CMC, ou concentration micellaire critique, est la concentration de détergent à laquelle commencent à se former des micelles. M est la masse moléculaire d'un monomère (en Da). N, nombre d'agrégation est le nombre moyen de monomères présent dans une micelle. Il faut noter que ces valeurs sont dépendantes des conditions de mesures (pH, température, force ionique...)

Ions transportés	ATPase exprimée chez...	Détergent utilisé pour la solubilisation	Références
Ca ²⁺ (SERCA)	Lapin (n)	C ₁₂ E ₈	le Maire <i>et al.</i> , 1976
	<i>Sf9</i> (h)	C ₁₂ E ₈	Skerjanc <i>et al.</i> , 1993, Miras <i>et al.</i> , 2001
	<i>S. cerevisiae</i> (h)	C ₁₂ E ₈	Centeno <i>et al.</i> , 1994
		DDM	Lenoir <i>et al.</i> , 2002
Na/K	Requin (n)	C ₁₂ E ₈	Esmann et Skou, 1984
	<i>S. cerevisiae</i> (h)	SDS	Pedersen <i>et al.</i> , 1996
	<i>P. pastoris</i> (h)	DDM	Cohen <i>et al.</i> , 2005
Cu ⁺	<i>S. cerevisiae</i> :	DDM	Portmann et Solioz, 2005
Ca ²⁺ (PMCA)	<i>Sf9</i>	Triton X100	Guerini <i>et al.</i> , 2003 ; Preiano <i>et al.</i> , 1996

Tableau I.3-4 : Exemples de détergents utilisés pour solubiliser des ATPases de type P, à partir de membranes natives (n) ou après expression hétérologue (h)

Pour estimer l'efficacité de solubilisation, différents critères doivent être pris en compte : la partition de la protéine dans la phase solubilisée mais aussi la conservation de l'activité de la protéine en présence du détergent. Concernant la partition de la protéine dans la phase solubilisée par rapport à la phase membranaire, il a été remarqué par plusieurs auteurs que ce phénomène était dépendant du détergent. Au laboratoire par exemple, Lenoir *et al.* (2002) ont testé la solubilisation de SERCA exprimée dans les membranes dites légères de *S. cerevisiae* avec trois détergents. Les résultats sont rappelés Figure I.3-3.

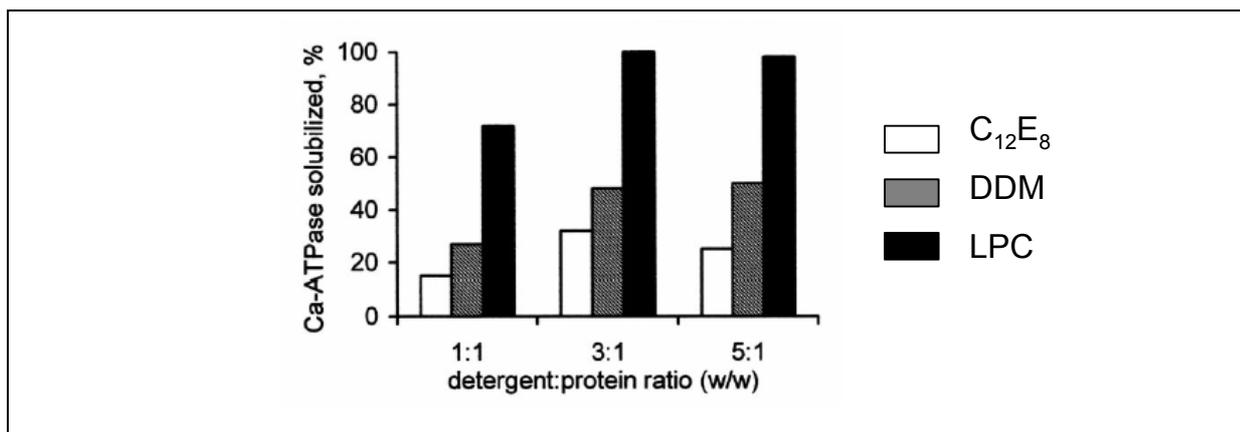


Figure I.3-3 Solubilisation de SERCA exprimée dans les membranes dites légères de *S. cerevisiae* par trois détergents différents et à des rapports détergent/protéine différents (d'après Lenoir *et al.*, 2002)

*Solubilisation à 4°C pendant 30 min de membranes dites légères de *S. cerevisiae* exprimant SERCA1a.*

Les auteurs ont montré que le DDM et la LPC étaient plus efficaces que le C₁₂E₈ pour solubiliser SERCA. Par ailleurs, ils précisent qu'alors que la LPC solubilise toutes les protéines, le DDM ne semble solubiliser que 75% d'entre elles, ce qui enrichit la fraction solubilisée en SERCA. Pour une même protéine et un même rapport détergent/protéine, l'efficacité de solubilisation par un détergent donné peut varier selon les conditions utilisées : température, composition du tampon... Miras et ses collaborateurs ont par exemple observé qu'ils obtenaient un meilleur rendement de solubilisation dans un tampon à basse force ionique (Miras *et al.*, 2001). L'équipe de Portmann (Portmann et Solioz, 2005) a fait l'observation intéressante que l'addition de cuivre dans le milieu de culture de *S. cerevisiae* 1h avant le fractionnement membranaire semblait faciliter la solubilisation ultérieure de l'ATPase Cu⁺ exprimée. Cet effet peut être dû à une meilleure conformation de la protéine dans ces conditions, ou/et à son adressage dans un compartiment membranaire différent. Au laboratoire, il a également été observé que SERCA était plus facilement solubilisée à partir des membranes dites légères qu'à partir des membranes dites lourdes (Lenoir, 2003).

Un autre paramètre à prendre en compte est la stabilité de l'activité enzymatique de la protéine en présence du détergent choisi. En effet, les détergents peuvent altérer l'activité de la protéine, et ce de différentes manières : soit en

supprimant de l'environnement immédiat de la protéine des molécules essentielles au maintien de son activité (lipides, cofacteur, sous-unités, groupe prosthétique), soit en venant directement déstabiliser la région transmembranaire de la molécule, soit en ne mimant pas suffisamment la bicouche lipidique. Ainsi dans l'exemple illustré Figure I.3-3, des tests d'activité ont permis aux auteurs de montrer que le DDM était préférable pour leur protéine (Lenoir *et al.*, 2002).

Une stratégie pour limiter l'effet déstabilisant des détergents consiste à utiliser d'autres classes de tensio-actifs. Ces molécules ont comme les détergents la propriété de présenter une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Les amphiphiles tripodes (Yu *et al.*, 2000) ont été utilisés pour solubiliser la bactériorhodopsine et il a été montré qu'ils gardaient la protéine dans une conformation correcte pendant plusieurs semaines (Bowie, 2001). Le triplement de la queue hydrophobe de cette molécule peut expliquer qu'elle soit moins déstabilisante que les détergents conventionnels qui peuvent s'insérer entre les hélices transmembranaires (*cf.* Figure I.3-4A et Tableau I.3-3). Récemment, une équipe a obtenu des cristaux diffractant à 2.5 Å de la bactériorhodopsine préparée avec ces « tripodes » (Theisen *et al.*, 2005). D'autres tensio-actifs ont été conçus par les chimistes, comme par exemple les hémifluorés (pour revue voir Gohon et Popot, 2003 et *cf.* Figure I.3-4 D) qui ont été conçus pour être de bons solvants des protéines membranaires et des mauvais solvants de lipides, les amphiphiles dérivés de sucres (ex : HECAMEG®, Roussel *et al.*, 2003, *cf.* Figure I.3-4 C). Une autre catégorie de tensio-actifs sont les polymères amphiphiles appelés amphipols: ces molécules sont des longues chaînes hydrophiles avec des ramifications hydrophobes (*cf.* Figure I.3-4 B) conçues pour entretenir une interaction très forte avec la protéine membranaire (Tribet *et al.*, 1996, Popot *et al.*, 2003). Ces molécules, non solubilisantes, présentent l'avantage de pouvoir travailler ensuite en solution aqueuse ne contenant pas ou peu de monomère de tensio-actif, ce qui est un avantage pour un certain nombre de mesures biophysiques et pourraient être un avantage dans des méthodes d'études structurales (comme la RMN par exemple, *cf.* Zoonens *et al.*, 2005). Ces polymères offrent donc une alternative très intéressante mais leur maîtrise complète reste une problématique en développement (Popot *et al.*, 2003). Par exemple, des études sur l'ATPase Ca²⁺ ont montré que l'activité de SERCA en présence des amphipols était faible comparée à celle mesurée en présence

de détergents (Champeil *et al.*, 2000, Picard *et al.*, 2005 (en préparation) voir aussi Picard *et al.*, 2004). Parmi les détergents non conventionnels, on peut également citer les lipopeptides (McGregor *et al.*, 2003). De par leur conformation (*cf.*Figure I.3-4E), ces lipopeptides semblent pouvoir mimer la bicouche lipidique autour de la protéine. Les auteurs ont montré leur capacité à solubiliser les protéines membranaires et à empêcher leur agrégation. Toutefois, les auteurs considèrent qu'étant donné le coût actuel de fabrication de telle molécule, il n'est pas envisageable de les utiliser lors de purification. Il faudrait donc utiliser d'abord un détergent classique puis effectuer un échange.

Une fois solubilisé, le complexe protéine/détergent se manipule comme une protéine soluble. Mais, mis à part avec les amphipols, il faut toujours être en présence de détergent au-dessus de sa CMC.

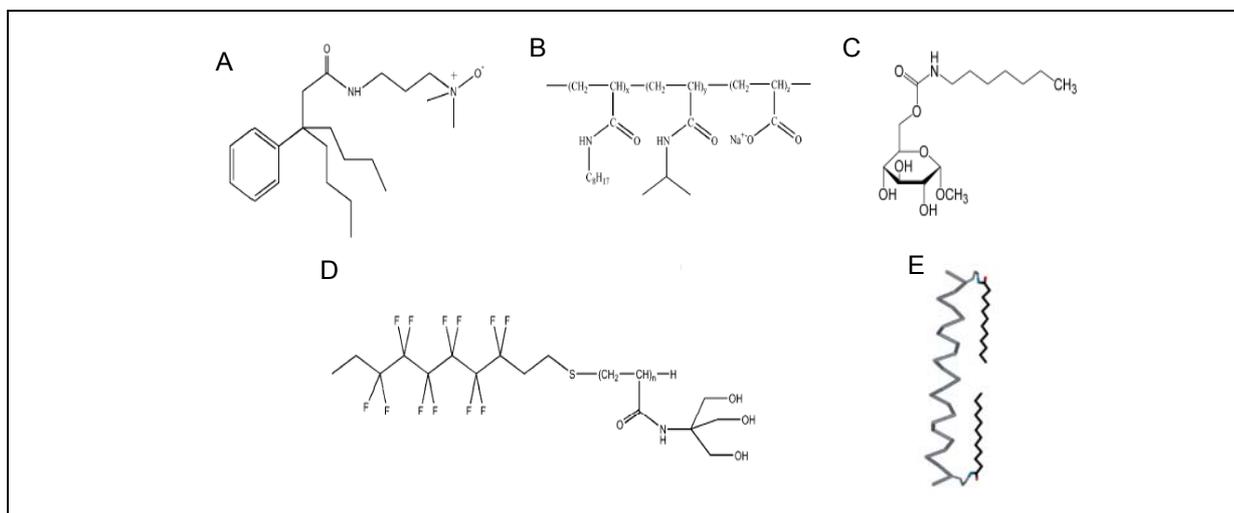


Figure I.3-4 : Exemples de tensio-actifs non conventionnels

*A- Amphiphiles tripodes, détergent ayant une partie hydrophobe volumineuse et donc probablement moins dénaturante. B- Amphipol, polymère amphiphile gardant les protéines en solution aqueuse. C- HECAMEG® (schéma emprunté à Serva.) D :Tensio-actif hémifluoré, composé d'une chaîne hydrophobe comportant des fluors mais terminée par une queue hydrogénée. E- Lipopeptide, pouvant mimer l'environnement de la bicouche lipidique en formant un anneau autour de la protéine (schéma emprunté à McGregor *et al.*, 2003). (Schémas A,B,D extraits de Gohon et Popot, 2003)*

I.3.3 Les systèmes de purification

Les systèmes utilisés pour obtenir de grandes quantités de protéines relativement pures sont généralement des chromatographies d'affinité : elles partagent donc toutes le principe de purification sur la base de liaisons réversibles entre la protéine et un ligand spécifique couplé à une matrice.

Ce ligand peut être un ligand que je qualifierais de « naturel » : un anticorps ou tout autre composé interagissant directement avec la protéine. Je présenterai quelques exemples de tels ligands utilisés pour purifier SERCA ou d'autres ATPases de type P dans une première partie.

Il est également possible d'exprimer la protéine d'intérêt sous forme d'une protéine fusionnée à une étiquette. Il existe un grand nombre d'étiquettes disponibles et commercialisées avec leur résine de chromatographie. Ces étiquettes peuvent être distinguées suivant la nature du peptide ou de la protéine de fusion et celles de leur partenaire d'interaction. Une première catégorie correspond à des protéines ou peptides de fusion qui se lient à des petites molécules : nous verrons que c'est le cas par exemple de l'étiquette histidine qui interagit avec des cations métalliques, ou encore de la GST (glutathion S-transférase) qui interagit avec le glutathion (GSH) fixé sur la résine. Une seconde classe d'étiquettes est constituée de peptides/protéines de fusion qui interagissent avec un partenaire spécifique fixé à la résine. Ce partenaire peut être un anticorps dirigé contre l'étiquette : c'est le principe par exemple de l'utilisation des étiquettes FLAG avec les résines anti-FLAG. Le partenaire peut être simplement un ligand : c'est le cas par exemple de l'avidine qui reconnaît l'étiquette BAD biotinylée. Lichty et ses collaborateurs ont publié récemment une étude comparative intéressante de différentes étiquettes pour la purification de deux protéines solubles exprimées chez *E. coli* (Lichty *et al.*, 2005). Même s'il est possible de trouver dans la littérature des exemples de purification de protéines membranaires avec différentes étiquettes (voir, par exemple l'utilisation de l'étiquette FLAG pour la purification d'un récepteur aux cannabinoïdes (Kim *et al.*, 2005) ou l'utilisation du domaine BAD pour la lactose perméase (Consler *et al.*, 1993)), la stratégie de purification la plus largement répandue

est l'utilisation d'une étiquette comportant plusieurs résidus histidine. Je détaillerai donc cette stratégie de purification. J'expliquerai également le principe de l'utilisation d'un domaine accepteur de biotine, stratégie qui a été adaptée pour la purification de SERCA durant ma thèse (voir chapitre « Résultats et Discussions »).

Même si elles sont les plus utilisées, les chromatographies d'affinité n'ont pas le monopole pour la purification de protéines membranaires. Il est également possible de purifier directement les protéines en utilisant leurs propriétés physico-chimiques : notamment en utilisant leur taille et leur forme, par exemple sur gradient de saccharose ou par chromatographie d'exclusion, leurs charges sur colonnes échanges d'ions (voir par exemple Stroebel *et al.*, 2003) qui ont utilisé cette technique comme première étape de purification, avant de réaliser une deuxième étape grâce à une étiquette histidine), ou leur hydrophobicité (Winstone *et al.*, 2005). Le plus souvent, ces techniques nécessitent toutefois un taux d'enrichissement en protéine à purifier relativement élevé. De ce fait elles sont plus fréquemment utilisées comme deuxième étape de purification. En effet, certaines stratégies de purification de protéines membranaires combinent deux purifications successives. J'évoquerai cette possibilité ainsi que d'autres variantes possibles pour une purification démarrant par une chromatographie d'affinité.

I.3.3.1 Affinité de la protéine d'intérêt pour un anticorps ou pour un ligand

Il est possible d'utiliser un anticorps spécifique de la protéine pour la purifier. La protéine A, qui interagit avec les anticorps, est utilisée pour retenir le complexe.

Skerjanc *et al.*, 1993) ont utilisé ce système pour purifier SERCA après expression en cellules d'insectes. Ils ont obtenu ainsi un rendement de 300 μ g de SERCA par litre de culture. L'inconvénient majeur est que les complexes protéine-anticorps et anticorps-Protéine A sont très stables et difficiles à dissocier dans des conditions non dénaturantes pour SERCA. Toutefois, la protéine immobilisée est active et a permis des études biochimiques. Ce principe a été également utilisé par Centeno *et al.*, 1994).

Il est possible également d'utiliser un ligand naturel de l'enzyme ou un analogue de ce ligand, couplé à une résine.

Ainsi, Preiano *et al.*, 1996) et Guerini *et al.*, 2003) ont utilisé l'interaction de leur objet d'étude, l'ATPase PMCA, et de la calmoduline pour purifier l'ATPase. Après élution par un tampon contenant de l'EGTA, ils obtiennent une protéine quasiment pure à 100%.

Pour les ATPases, une autre stratégie consiste à utiliser le réactif Red120. Ce colorant mime la triple charge négative des groupements phosphate des nucléotides triphosphate (*cf.* Figure I.3-5) et a dans un premier temps été considéré comme spécifique pour les sites de fixation de nucléotide. Même s'il a été prouvé que ce produit avait une affinité pour un grand nombre de protéines ne possédant pas de site de fixation de nucléotides, il semble pouvoir interagir avec les ATPases. Ce type de chromatographie d'affinité a été utilisé pour la première fois pour SERCA par Coll et Murphy, 1984) et a été largement utilisé depuis pour la purification de l'ATPase-Ca²⁺. En outre, Miras *et al.*, 2001) ont utilisé ce système après expression de la protéine dans des cellules *Sf9* (*cf.* paragraphe I.3.1.7). Grâce à ce système d'expression et à ce type de purification, les auteurs obtiennent 1mg de protéine active pure à environ 25%. Il faut noter que c'est cette stratégie qui a été utilisée par Toyoshima *et al.*, 2000) pour purifier l'ATPase avant de la cristalliser et d'obtenir la première structure atomique de SERCA.

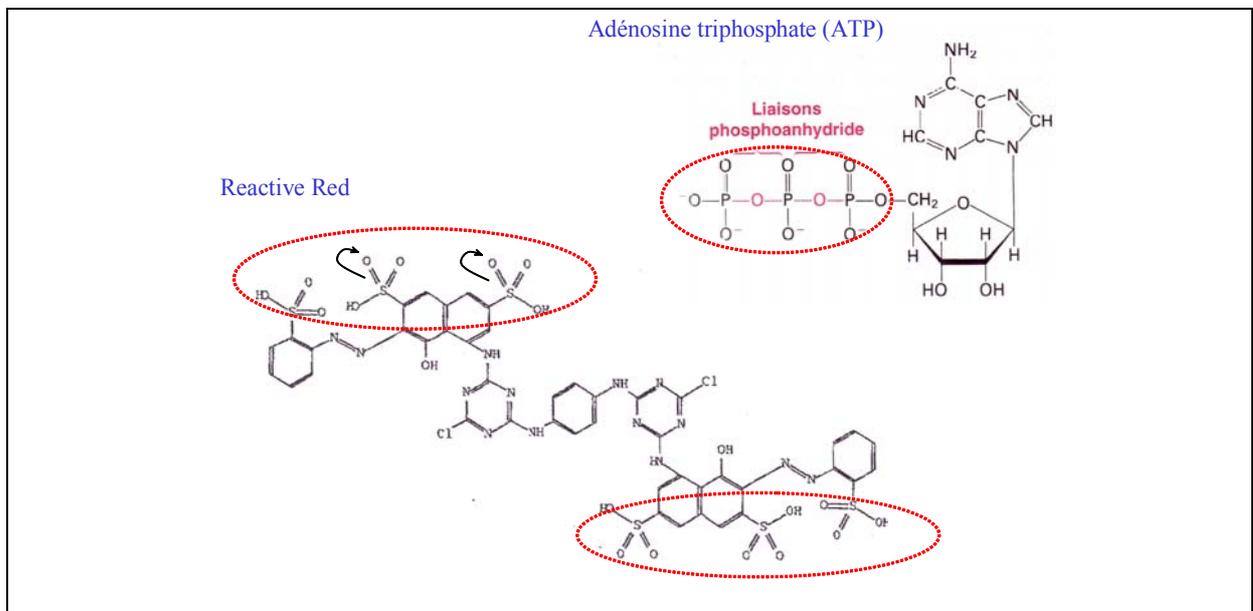


Figure I.3-5 : Structure chimique des molécules de Reactive Red et d'ATP (emprunté à Lenoir, 2003)

Les flèches courbes indiquent que les électrons de la double liaison, en se délocalisant, provoquent l'apparition de charges négatives sur les atomes d'oxygène.

I.3.3.2 Chromatographie d'affinité de métal immobilisé (IMAC : Immobilized-Metal Affinity Chromatography)

a) Principe de la technique

Ce type de chromatographie utilise les liaisons de coordination qui peuvent se former entre un ion métallique et certains acides aminés donneurs d'électrons. Le tandem le plus couramment utilisé est le système Nickel (Ni^{2+}) -Histidine. Toutefois, d'autres ions métalliques de transition tels que le cuivre (II), le zinc (II), le cobalt (II) peuvent être utilisés. Les acteurs au niveau des protéines pourraient être également le glutamate, l'aspartate, la cystéine, la tyrosine, des acides aminés ayant des atomes tels que l'azote, l'oxygène ou le soufre, susceptibles d'engager un doublet non liant dans une liaison de coordination.

Les ions métalliques sont immobilisés sur la résine grâce à un composant chélatant fixé de manière covalente à celle-ci. Dans le cas du système Ni^{2+} , il s'agit de l'acide nitriloacétique (NTA) (cf. Figure I.3-6).

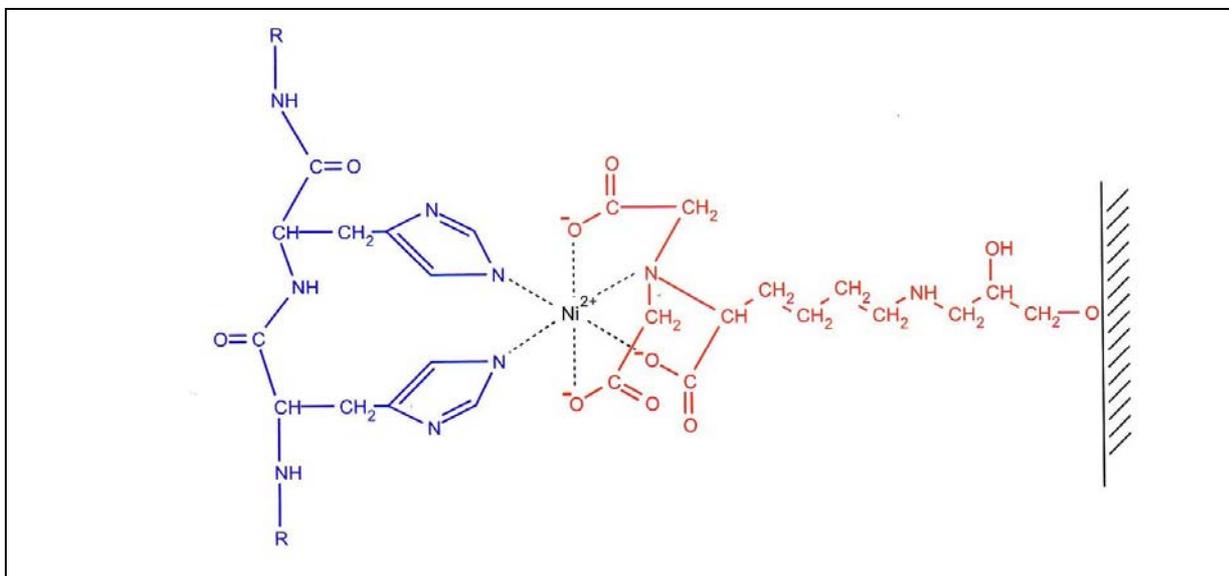


Figure I.3-6 : Interactions entre la matrice Ni-NTA et les résidus histidine de la protéine étiquetée (image empruntée à « The QIAexpressionist™ », QIAGEN)

Deux des résidus histidine de l'étiquette sont représentés en bleu alors que la phase stationnaire, l'acide nitriloacétique, est représentée en rouge.

Initialement, cette technologie était utilisée pour séparer les protéines ou les peptides exposant à leur surface des groupements formés des acides aminés cités ci-dessus. En 1988, Hochuli (Hochuli, 1988) utilise les progrès de la biologie moléculaire pour obtenir des protéines recombinantes présentant une étiquette 6 histidine en N ou C-terminal.

L'adsorption de la protéine sur le support se fait à un pH où les atomes d'azote du groupement d'imidazole sont déprotonés (pH légèrement basique pH 8). L'élution se fait par protonation en abaissant le pH, par échange de ligand en utilisant de l'imidazole ou par un chélateur plus puissant comme l'EDTA.

b) Utilisation de cette technique pour la purification de l'ATPase Ca^{2+}

Cette technique a tout d'abord été testée sur SERCA par Miras *et al.*, 2001). Toutefois, seuls 3% de leur protéine active se fixait sur la colonne NiNTA.

Le système 6His a été utilisé au laboratoire pour purifier l'ATPase Ca^{2+} (Lenoir *et al.*, 2002). Par rapport à l'équipe précédente, les auteurs ont ajouté deux glycines entre la séquence codant pour SERCA et l'étiquette 6-histidines. Avec cette construction, ils fixent plus de 80% de la protéine sur la résine. Par élution avec des quantités croissantes d'imidazole, les auteurs éluent une protéine pure à 40-50%. Leur système d'expression couplé à cette purification leur permet d'obtenir environ 800 μg de protéine purifiée à partir d'un litre de culture. Il faut toutefois noter que l'activité ATPasique spécifique de la protéine SERCA ainsi purifiée est plus faible que celle mesurée dans les mêmes conditions pour l'ATPase native (voir également Chapitre III, paragraphe III.1.6).

Il faut noter que ce système bénéficie d'un véritable engouement et a été abondamment utilisé, y compris pour des protéines membranaires et notamment pour la purification d'autres ATPases de type P. Il a été testé dans le cas de l'ATPase Cu^+ (Portmann et Solioz, 2005). Dans cette étude, l'étape de purification par NiNTA permet d'obtenir une ATPase qui n'est pure qu'à 10-20%, et qui peut donc être considérée plutôt

comme un enrichissement. Le système « His » a donné des résultats intéressants pour l'ATPase Na/K (Cohen *et al.*, 2005), permettant d'obtenir une ATPase pure à 30-50%. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé une queue de 10 résidus histidine. Dans certains cas en effet, l'augmentation du nombre de résidus à 8 ou 10 peut donner de meilleurs résultats qu'avec une étiquette 6-His en augmentant notamment l'affinité pour la résine (voir par exemple Grisshammer et Tucker, 1997) toutefois, l'élution peut s'avérer plus difficile (Mohanty et Wiener, 2004).

I.3.3.3 Le système avidine-biotine

Ce système de purification est basé sur la forte interaction entre la biotine et l'avidine ; avec un K_D de 10^{-7} pour l'avidine monomérique ou de 10^{-15} pour l'avidine tétramérique (Cronan, 1990). Cette interaction se rapproche du système antigène-anticorps.

a) Le domaine accepteur de biotine et son utilisation en tant qu'étiquette

La biotine, aussi appelée vitamine H, est une molécule synthétisée par les plantes et la plupart des Procaryotes. Elle est nécessaire à tous les organismes car elle sert, entre autre, de cofacteurs à deux classes d'enzymes du métabolisme, les carboxylases et les décarboxylases, en jouant le rôle de transporteur de groupement carboxyl. Ces enzymes possèdent une séquence reconnue par la biotine ligase (BPL : biotin protein ligase, également appelée BirA, biotin operon repressor ou biotin holoenzyme synthétase biotin -[acetyl coA carboxylase] synthétase chez *E. coli*), qui va permettre la liaison covalente de la molécule de biotine (*cf.* Figure I.3-7).

Suivant les organismes, le nombre de protéines endogènes biotinylées est variable. Ainsi, chez *E. coli*, seule la BBCP (biotin carboxyl carrier protein) de l'acétyl CoA carboxylase est biotinylée (Cronan, 1990). Chez *S. cerevisiae* il existe quatre protéines biotinylées : l'acétyl-coA carboxylase (250kDa), l'urée amidolyase (202kDa), la pyruvate carboxylase (116kDa), et une protéine récemment identifiée, Arc1p (45kDa)

(Kim *et al.*, 2004). Il faut noter que cette dernière protéine est un cofacteur de l'aminocyl ARNt synthétase et est l'unique exemple connu à ce jour de protéine biotinylée non impliquée dans des réactions de carboxylations.

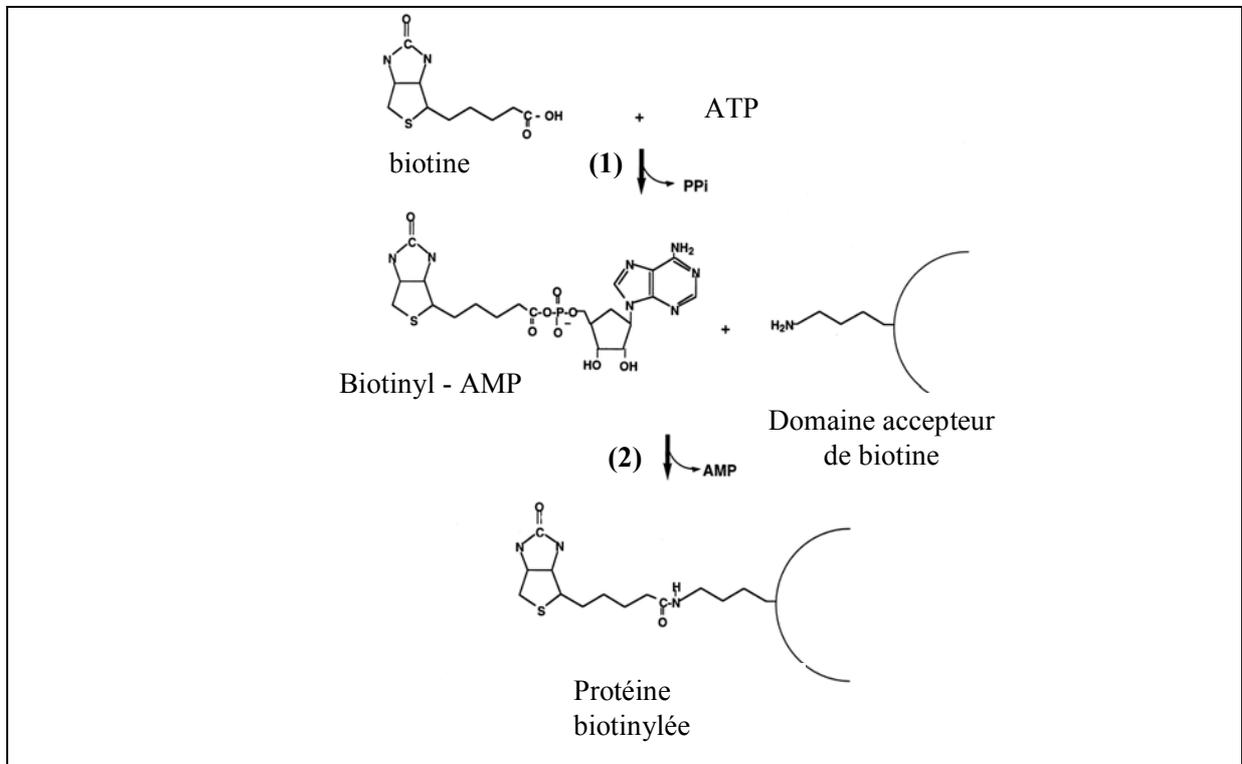


Figure I.3-7 Réaction catalysée par la biotine ligase (Chapman-Smith et Cronan, 1999)

La biotine ligase utilise l'ATP pour activer la biotine en formant l'intermédiaire réactionnel biotinyl-AMP (1) qui est alors transféré sur l'amine epsilon de l'unique lysine du domaine accepteur de biotine (BAD) (2).

Le domaine accepteur de biotine (BAD : Biotin acceptor domain) de différentes carboxylases a été utilisé comme étiquette, permettant la production de protéines de fusion biotinylées chez des bactéries ou dans la levure (Cronan, 1990). Il existe une grande similitude de séquence entre les différents domaines accepteurs de biotine de différentes espèces. Il en découle que la biotine ligase d'un organisme donné peut reconnaître et biotinyler un domaine accepteur de biotine non endogène, avec toutefois

une efficacité moins grande pour la biotinylation de domaine d'origine procaryote par la biotine ligase de cellules de mammifères (Cronan, 1990; de Boer *et al.*, 2003).

Des études ont été réalisées afin de réduire la taille de ce large domaine (environ 100 acides aminés) : l'équipe de Beckett (Beckett *et al.*, 1999) a montré qu'un peptide minimal de 23 acides aminés pouvait être reconnu par la biotine ligase de *E. coli* et être biotinylé *in vitro*. Il semblerait que ce soit plutôt les domaines entiers qui soient en général utilisés dans les essais de purification de protéines membranaires mais Tucker et Grisshammer, 1996) ont testé une étiquette accepteur de biotine de 13 acides aminés pour la purification du récepteur à la neurotensine de rat (voir paragraphe suivant).

b) Purification de protéines membranaires par le système biotine.

Différentes protéines membranaires ont été purifiées en utilisant le système biotine. Consler et ses collaborateurs (Consler *et al.*, 1993) ont été les premiers à utiliser ce système pour purifier la lactose perméase d'*E. coli*. Depuis, d'autres protéines membranaires ont été purifiées grâce à ce système, en utilisant comme hôte, soit des bactéries, soit les levures: par exemple une autre protéine bactérienne, le transporteur de citrate exprimée chez *K.pneumoniae* (Pos *et al.*, 1994), un transporteur de saccharose de plante exprimée chez *S. cerevisiae* (Stolz *et al.*, 1995), des transporteurs ABC d'origine mammalienne exprimée chez *P. pastoris* ou chez *S. cerevisiae* (Julien *et al.*, 2000; Howard et Roepe, 2003). Après fixation de la protéine de fusion sur une résine d'avidine, celle-ci est éluée avec un tampon contenant suivant les auteurs de 1 à 5 mM de biotine libre.

Pour améliorer les rendements de purification, certains groupes ont essayé d'améliorer la biotinylation de la protéine de fusion. Ainsi, Stolz *et al.*, 1995 ont montré que la biotinylation de leur protéine de fusion était augmentée par ajout de biotine dans le milieu de culture, la quantité de biotine disponible pouvant être limitante. Un autre facteur limitant en cas de surexpression trop importante peut être la biotine ligase endogène. Pour pallier cet éventuel défaut, certaines équipes réalisent une biotinylation *in vitro* de la protéine de fusion. Ainsi, Pouny et ses collaborateurs (Pouny *et al.*, 1998) ont estimé que seuls 15 à 20 % de la lactose perméase surexprimée était biotinylée. Par

ajout d'une étape de biotinylation *in vitro* par la biotine ligase de *E. coli* (BirA) purifiée, ils ont considérablement augmenté la quantité de protéine de fusion biotinylée. Une autre stratégie est la coexpression de BirA avec la protéine de fusion (de Boer *et al.*, 2003), stratégie qui se révèle être particulièrement utile dans le cas d'expression en cellule de mammifères car la biotine ligase endogène semble moins efficace pour biotinyler les domaines d'origine procaryote.

Tucker et Grisshammer, 1996) ont testé une étiquette « domaine accepteur de biotine » de 13 acides aminés pour la purification du récepteur à la neurotensine de rat après expression dans *E. coli*. Le principal problème rencontré a été un faible taux de biotinylation de la protéine de fusion (15%). Ce problème a été partiellement résolu par coexpression de la biotine ligase d'*E. coli* (BirA) : 75% de protéines de fusion se fixent alors sur la résine d'avidine.

De manière générale, les auteurs concluent que l'utilisation de cette stratégie permet l'obtention d'une fraction pure et active.

I.3.3.4 Quelques variations possibles lors de la purification d'une protéine membranaire

a) Addition de lipides durant la purification

Comme il a été décrit dans le paragraphe de solubilisation, pour permettre la purification de protéines membranaires, il faut l'ôter de son environnement naturel, la bicouche lipidique. Pour pallier les éventuels effets de la délipidation, il est possible d'ajouter des phospholipides exogènes dans les tampons utilisés au cours de la purification. Lors de la mise au point de leur système de purification de SERCA, Miras et ses collaborateurs ont montré que l'addition de phospholipides pouvait améliorer l'activité ATPasique des SERCAs exprimées dans les fractions membranaires des cellules *Sf9*, mesurée en présence de $C_{12}E_8$ (cf. Figure I.3-8), et que cet effet dépendait de la nature du phospholipide ajouté (Miras *et al.*, 2001).

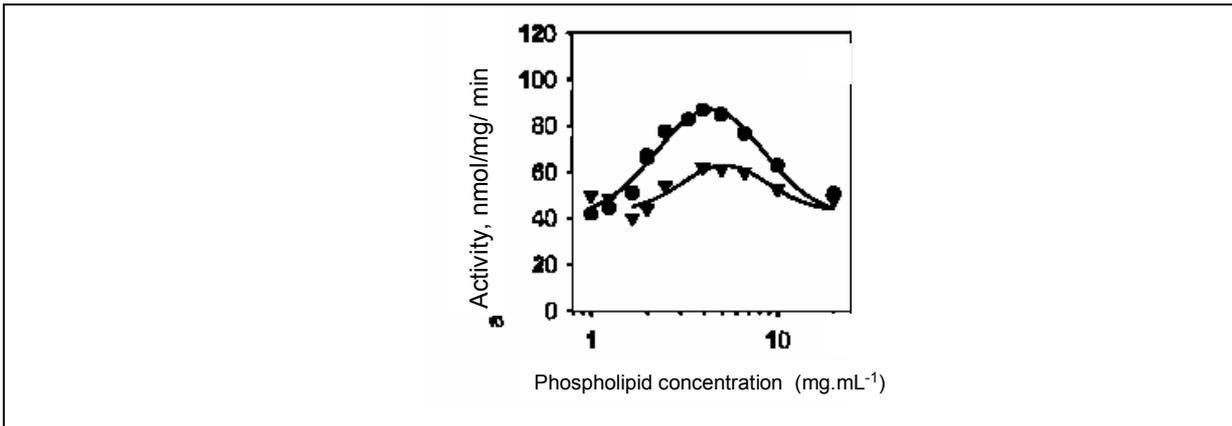


Figure I.3-8 : Effet de l'ajout de phospholipides sur l'activité ATPasique de membranes exprimant SERCA, mesurée en présence de $C_{12}E_8$ (d'après Miras *et al.*, 2001)

La mesure est effectuée à 25°C en présence de 1mg.mL⁻¹ de $C_{12}E_8$. En absence de phospholipides, l'activité est d'environ 50 nmol/mg/min. ● : phosphatidylcholine ▼ : phosphatidyléthanolamine

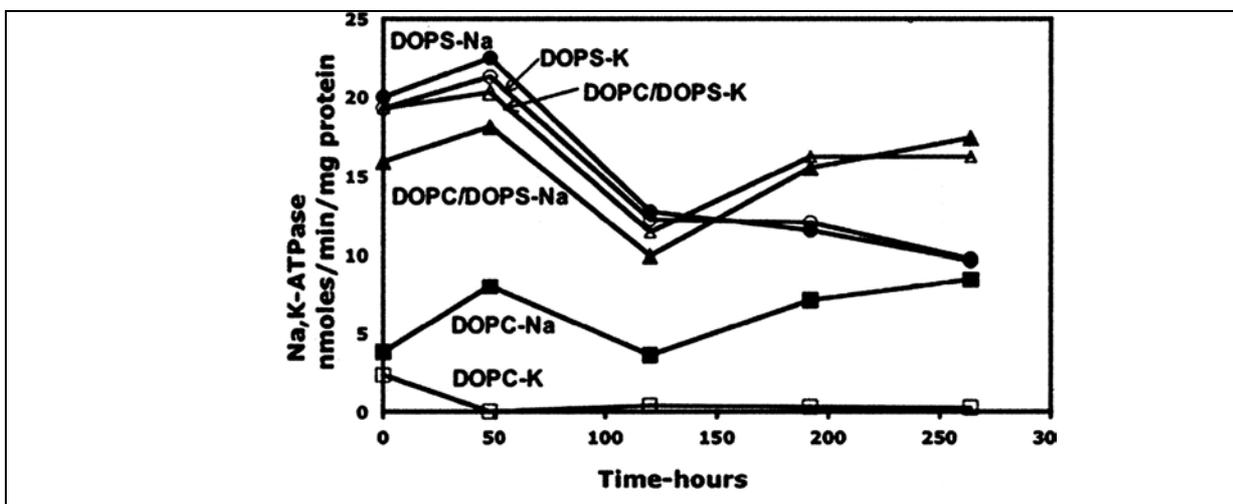


Figure I.3-9 : Conservation de l'activité de l'ATPase Na/K après purification en présence de DOPC, DOPS ou DOPC/DOPS (extrait de Cohen *et al.*, 2005)

L'ATPase purifiée par la méthode « His » en absence de lipides exogènes est inactive. Les différentes préparations sont stockées à 0°C. L'activité mesurée correspond à la formation d'intermédiaire phosphorylé à partir de [γ -³²P] ATP à 0°C.

De même, lors de la mise au point de leur protocole de l'expression de l' ATPase Na/K, Cohen *et al* (2005) ont réalisé une étude intéressante sur l'effet des lipides exogènes sur la conservation de l'activité de la protéine purifiée. Là encore, l'effet est dépendant du phospholipide ajouté (*cf.* Figure I.3-9).

b) Elimination de l'étiquette grâce à l'utilisation de protéases.

L'étude de la protéine d'intérêt purifiée sous forme de protéine de fusion peut nécessiter l'élimination de l'étiquette. L'insertion d'une séquence d'acides aminés unique susceptible d'être reconnue et coupée par des protéases spécifiques permet l'élimination de l'étiquette. Cette étape peut servir à l'élution de la protéine d'intérêt ou peut être réalisée lors d'une étape ultérieure. Différentes endoprotéases peuvent être utilisées. Citons entre autres, la thrombine, le facteur Xa, la TEV.

L'utilisation de ces protéases n'est pas sans inconvénient : tout d'abord, le choix de la séquence de coupure, et donc de la protéase utilisée, doit tenir compte de la séquence de la protéine d'intérêt, afin d'éviter toute protéolyse. Toutefois, les protéases ne sont pas totalement spécifiques et des protéolyses peuvent avoir lieu au niveau de séquence ne correspondant pas à la séquence consensus (Jenny *et al.*, 2003). Par ailleurs, la protéase se retrouve alors mélangée avec la protéine d'intérêt. La pureté de l'échantillon est donc diminuée. L'élimination de la protéase nécessitera donc une étape de purification supplémentaire. Il existe par exemple des résines de chromatographie anti-protéase (par exemple la Benzamidine Sepharose pour la thrombine). Une autre stratégie consiste à utiliser une protéase recombinante, elle-même étiquetée (stratégie utilisée avec la TEV, voir par exemple Mohanty et Wiener, 2004).

Notons que l'élimination de l'étiquette est une option plus rarement utilisée lors de l'utilisation d'une étiquette histidine, bien qu'il ait été montré que cette étiquette pouvait avoir une action délétère sur l'activité (voir, par exemple, lorsque l'étiquette est placée en N-terminal pour la purification du MscL, Berrier *et al.*, (2004). Dans le cas des

protéines solubles, elle est plus couramment utilisée pour éliminer des étiquettes de plus grosse taille, comme l'étiquette GST par exemple (pour revue, voir Jenny *et al.*, 2003).

c) Utilisation d'une deuxième étape de purification pour améliorer la pureté.

Si la pureté obtenue après la chromatographie d'affinité est jugée insuffisante, il est possible d'ajouter une deuxième étape de purification. Cette étape peut être une nouvelle chromatographie d'affinité, on parle alors de purification en tandem. La deuxième chromatographie peut utiliser un ligand naturel de la protéine. Cette stratégie a par exemple été testée par Lenoir *et al.*, (2002) : après purification de SERCA1a-6His sur colonne de nickel, ils ont utilisé la colonne Red120. Ceci leur a permis d'augmenter la pureté mais également l'activité spécifique de SERCA. Par contre cette étape entraîne une perte de 75 % de SERCA disponible (Lenoir *et al.*, 2002). Il est également possible de réaliser des chromatographies dites « en tandem » grâce à l'utilisation de deux étiquettes différentes fusionnées à la protéine.

La deuxième chromatographie peut également utiliser les propriétés chimiques de la protéine d'intérêt : cette stratégie a par exemple été utilisée par Portmann et Solioz, (2005) : après une purification « Histidine » de l'ATPase Cu, ils ont utilisé une colonne échangeuse d'ions. Cohen *et al.*, (2005) ont eux utilisés une chromatographie d'exclusion par la taille pour augmenter la pureté de leur préparation d'ATPase Na/K.

Si cette étape additionnelle permet d'augmenter la pureté de l'échantillon, elle fait aussi baisser le rendement en quantité de la purification.

Le choix d'un système d'expression et de purification n'est pas chose aisée : le système est empirique, il est difficile de prédire quel système sera le plus efficace pour aboutir à la purification de la protéine d'intérêt. De plus, ce choix peut reposer sur d'autres critères, comme la simplicité d'utilisation du système, le coût de production et de purification de la protéine, la capacité de contrôler le produit final et les modifications introduites, le temps requis pour le clonage du gène codant pour la protéine à purifier, les contraintes réglementaires... Toutefois la maîtrise de toutes ces

techniques, en parallèle avec les techniques d'analyses (biophysique, cristallographie...) a permis et continuera de permettre l'approfondissement de la connaissance à la fois de la fonction et de la structure des protéines membranaires : de nombreuses avancées ont été faites ces dernières années, dont notamment les premières structures à haute résolution de protéines membranaires d'origine mammalienne.

I.4 Objectifs de mon travail de thèse

La partie I.2 de cette introduction montre que l'ATPase Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique SERCA1a a été le sujet de nombreuses études, à la fois fonctionnelles, et depuis plus récemment, structurales. Pour réaliser ces études, les différents auteurs ont utilisé, soit l'ATPase native, soit l'ATPase exprimée et éventuellement purifiée grâce à l'utilisation de différents systèmes d'expression et de purification, décrits dans la partie I.3. Dans notre laboratoire, un travail important a déjà été mené pour exprimer puis purifier SERCA1a à partir de la levure *S. cerevisiae* (Centeno *et al.*, 1994; Lenoir *et al.*, 2002). Parallèlement à la mise au point de la purification par la méthode « histidine » décrite par Lenoir *et al.* (2002), une autre stratégie de purification a été démarrée au laboratoire, utilisant l'étiquette « domaine accepteur de biotine ». En utilisant la forte interaction entre l'avidine et la biotine, donc en augmentant l'interaction étiquette/ partenaire, un des objectifs de cette nouvelle stratégie de purification était d'augmenter la pureté et le rendement de purification.

Au démarrage de ma thèse, le protocole de la stratégie de purification « biotine » restait à améliorer, des difficultés ayant été rencontrées notamment pour l'éluion de la protéine. Par ailleurs il nous était apparu intéressant de profiter de l'expérience acquise sur l'isoforme SERCA1a pour tenter d'exprimer, de purifier et d'étudier des isoformes SERCA3. En effet, comme il a été dit dans les paragraphes I.2.2.3 et I.2.3.2, cette famille d'isoformes est peu connue. La purification de ces isoformes pourrait permettre d'approfondir les connaissances concernant les propriétés biochimiques de ces isoformes, pour tenter de mieux comprendre les différences fonctionnelles qui les distinguent, d'une part des isoformes SERCA1 et SERCA2, et d'autre part les unes par rapport aux autres. La compréhension de ces distinctions pourrait apporter des éléments permettant de comprendre quel rôle particulier peut jouer chacune des isoformes SERCAs, lorsque plusieurs d'entre elles sont exprimées dans une même cellule.

Le but initial de mon travail de thèse était donc d'améliorer la purification par la méthode « biotine » et, en cas de succès de l'appliquer à la purification de SERCA3-BAD.

La mise au point de la purification par la méthode « biotine » constitue la première partie des résultats présentés dans ma thèse. Si les rendements de purification ne sont pas meilleurs que ceux obtenus précédemment par la méthode « histidine », nous verrons que l'ATPase SERCA1a conserve mieux ses propriétés biochimiques après purification par la méthode « biotine » que par la méthode « histidine ». Par ailleurs, grâce à l'addition d'une étape supplémentaire de purification nous obtenons une protéine pure à plus de 70%. Ces résultats ont permis des essais de cristallisation. Le succès des essais de cristallisation de l'ATPase sauvage SERCA1a purifiée après son expression hétérologue dans la levure sera présenté dans une seconde partie. Cette réussite a ouvert la voie vers des essais de cristallisation de mutants. Je présenterai également dans la deuxième partie des résultats, les essais de cristallisation d'un mutant E309Q. Ce mutant, supposé ne fixer qu'un seul calcium et ne pas hydrolyser l'ATP (*cf.* paragraphe I.2.4.2 page 45), pourrait fournir une structure d'un état conformationnel supplémentaire adopté par SERCA1a au cours de son cycle catalytique.

Parallèlement à ces travaux sur SERCA1, des expériences ont été menées pour essayer d'étudier SERCA3. Un premier essai d'expression chez *S. cerevisiae* de SERCA3, plus précisément de l'isoforme SERCA3a de rat, a été suivi d'un premier essai de purification de cette isoforme par la stratégie « biotine ». Les résultats obtenus nous ont poussés à essayer d'améliorer l'expression de SERCA3a de rat. La difficulté à analyser les résultats, faute d'anticorps suffisamment sensible pour détecter de faible quantité de SERCA3a de rat, nous a poussés à envisager l'expression et la purification de l'isoforme SERCA3a humaine, pour laquelle des anticorps plus sensibles existent. Ce choix a également été justifié par la découverte de nouvelles isoformes humaines et de la spécificité inter-espèces des SERCA3 (*cf.* paragraphe I.2.2.3 et Martin *et al.*, 2002; Bobe *et al.*, 2004). Il nous a par ailleurs semblé que les études biochimiques seules ne nous permettraient pas de comprendre le rôle de ces isoformes. En effet, dans les

cellules exprimant au moins une des isoformes SERCA3, jusqu'à présent, l'isoforme SERCA2b a toujours été également détectée. Aussi, parallèlement à ces tentatives d'expression et de purification, dans le but de connaître la localisation subcellulaire des différentes isoformes SERCAs dans une cellule, des expériences d'observations microscopiques ont été menées.

Chapitre II : TECHNIQUES UTILISEES : PRINCIPES ET PROTOCOLES

II.1 Clonage des gènes d'intérêt dans un vecteur navette et transformation de ce vecteur chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le système d'expression choisi pour toutes ces études est la levure *S. cerevisiae*. Les avantages de ce choix ont été discutés dans l'introduction. Pour une question de rapidité et d'efficacité, il est toutefois préférable de réaliser les manipulations génétiques sur des plasmides pouvant être transformés dans les bactéries. Le vecteur utilisé est donc un vecteur qualifié de navette, servant de vecteur de clonage chez *E. coli* et de vecteur d'expression chez *S. cerevisiae*.

II.1.1 Description du vecteur navette utilisé

Ce vecteur a été fourni au laboratoire par Denis Pompon (CGM, Gif-sur-Yvette). Ses principales caractéristiques sont présentées sur la Figure II.1-1.

Ce vecteur possède des caractéristiques permettant son utilisation comme vecteur de clonage chez *E. coli* : il possède en effet une origine de réplication bactérienne (Ori *E. coli*) et un gène de sélection (Amp^r) qui confèrera à la bactérie transformée par ce plasmide une résistance à l'ampicilline.

On trouve également sur ce vecteur des caractéristiques qui en feront un vecteur d'expression chez la levure. L'origine de réplication 2- μ assure que le nombre de copies est maintenu de manière stable dans la lignée de levures. Le vecteur porte différents marqueurs de sélection chez la levure : le marqueur URA3 et ADE2, qui vont compléter les génotypes *ura* et *ade* de la souche de levure utilisée. (cf. paragraphe II.1.3.1page 101). Par ailleurs, il possède les éléments nécessaires à l'expression d'un gène : un promoteur (Pro *GAL10-CYC1*) et une séquence de terminaison (Ter PGK). Le promoteur *GAL10-CYC1* est un promoteur fort inductible par le galactose contenant la séquence initiatrice de la transcription du cytochrome c_1 (*CYC1*) et la séquence transactivatrice du promoteur *GAL10* (Pedersen et al., 1996 ; Lenoir et al., 2002),

séquence reconnue par l'activateur de transcription Gal4p (cf. également Figure II.1-4 page103).

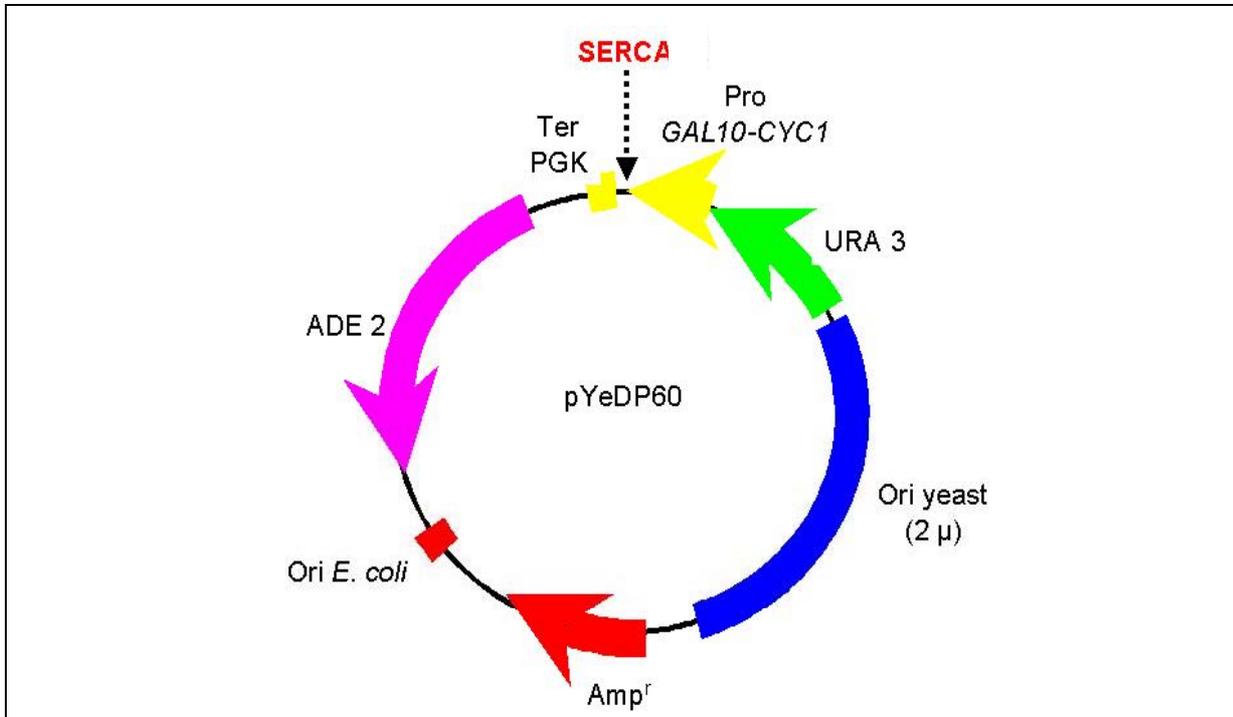


Figure II.1-1 Description du vecteur navette pYeDP60

Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline- Ori E. coli : origine de répllication bactérienne- ADE2 et URA3 : marqueurs de sélection chez la levure,- Pro GAL10-CYC1 : promoteur inductible par le galactose - Ter PGK : séquence de terminaison de la phosphoglycérate kinase.-Ori yeast (2 μ) : origine de répllication chez la levure.

II.1.2 Préparation des constructions chez *E. coli*

II.1.2.1 Stratégies choisies pour le clonage des différentes SERCA étudiées :

a) Clonage de SERCA1a , SERCA1-E309Q et SERCA3a de rat:

Ces constructions ont été réalisées par Christine JAXEL. La construction du plasmide SERCA1-BAD est décrite dans la partie Matériels et Méthodes de l'article I. La mutation E309Q de SERCA1a a été réalisée précédemment au laboratoire (*cf.* Lenoir en préparation) : elle a été réinsérée dans le vecteur pYE60-SERCA1BAD à partir du vecteur pYE60-SERCA1-6His-E309Q. L'ADNc de l'isoforme SERCA3a de rat a été fourni au laboratoire dans le vecteur pcDNA3 (obtenu auprès du Dr A-M Lompre). Il a été inséré dans le vecteur pYE60-BAD.

b) Clonage de SERCA3a humain

L'ADN du gène codant pour la protéine SERCA3ah nous a été aimablement fourni par Jocelyne ENOUF (INSERM, Hôpital Lariboisière, PARIS). Il était initialement cloné dans le plasmide pcDNA. J'ai remplacé la séquence codante pour SERCA3ah dans le plasmide pYEDP60, sous contrôle du promoteur *GAL10-CYC1* et avec la séquence codant pour le site de coupure de thrombine suivie de la séquence codant pour le domaine accepteur de biotine.

Pour ce faire, j'ai utilisé la méthode suivante (*cf.* Figure II.1-2) : dans un premier temps, j'ai amplifié par PCR un fragment « HindIII-EcoRI-S3ah-TB » à partir du plasmide pcDNA-SERCA3ah. J'ai utilisé une amorce 5' HindIII-EcoRI-S3ah : (5') TATAAGCTTAGAATTCTAGT**ATGGAGGCGGCATCTGCTCCCGGCC** (3'). La partie en gras correspond aux premiers nucléotides de la séquence codant pour SERCA3ah. La partie soulignée correspond à la séquence se trouvant juste en amont de la séquence codant pour SERCA1-BAD dans le plasmide pYEDP60. L'amorce 3' S3ah-TBc (5')

CGCCGTGGATCCTCTTGGAACCAACCACCCCTTCTGGCTCATTCTTCGTGCATGTGGTT (3')

est complémentaire de la partie 3' de l'ADNc SERCA3ah (en gras) à laquelle auraient été ajouté deux glycines (en italique non souligné), la séquence codant pour le site de coupure par la thrombine (italique souligné) puis le début de la séquence codant pour le domaine accepteur de biotine (en gras souligné). Le produit de PCR inclut donc la totalité de l'ADNc SERCA3ah avec en aval le début de la construction BAD utilisé pour SERCA1a -BAD (cf. II.1.2.1a) et Figure II.1-2A). Parallèlement, j'ai amplifié un fragment « Thr-BAD » à partir du plasmide pYEDP60 grâce à une amorce 5' TB (5') *GGTGGTTTGGTTCCAAGAGGATCCACGGCG* (3') correspondant à la séquence codant pour deux glycines (en italique non souligné), le site de coupure par la thrombine (italique souligné) puis le début du domaine accepteur de biotine (en gras souligné) et à une amorce 3' « BAD-SacII-BsrgIc », (5') TATGTACATCCGCGGTTAGGTCATCAGGGTGTCGCCGACCGCCAC (3') complémentaire de la séquence codant pour la partie C-terminale du domaine accepteur de biotine (souligné) à laquelle a été ajoutée la séquence codant pour un site de restriction SacII (italique) et BsrgI (gras) (cf. Figure II.1-2B). Pour obtenir le fragment « HindIII-EcoRI-S3ah-BAD-SacII-BsrgI », j'ai utilisé la technique de PCR par hybridation : les fragments précédemment obtenus sont incubés dans un mélange pour PCR (cf. II.1.2.2a)) sans amorces pour un cycle : c'est l'étape d'hybridation. Puis les amorces 5' « HindIII-EcoRI-S3ah » et 3' « BAD-SacII-BsrgIc » sont ajoutées au mélange réactionnel, qui subit alors des cycles de PCR standard. Même en faisant varier les conditions expérimentales (notamment les températures d'hybridation) je n'ai pas réussi à obtenir le produit souhaité. J'ai donc du opter pour une deuxième stratégie.

J'ai amplifié par PCR le fragment « SbfI-S3ah-TB » en utilisant l'amorce 5' « SbfI » (5') CGACACCGACCTGCAGGCTC (3') correspondant à la séquence 1364 à 1383 de SERCA3a humain, incluant un site de restriction par l'enzyme SbfI (souligné), unique dans le plasmide pcDNA-S3ah, et l'amorce 3' « S3ah-TBc » décrite ci-dessus. J'ai ensuite réalisé une hybridation-PCR entre ce fragment et le fragment « Thr-BAD », en utilisant les amorces 5' « SbfI » et 3' « BAD-SacII-BsrgIc ». J'ai ainsi obtenu le fragment « SbfI-S3ah-BAD ». Pour obtenir la construction souhaitée, j'ai tout d'abord inséré le fragment « HindIII-S3ah » dans le vecteur pcDNA en utilisant une digestion

par HindIII et par SbfI (cf. Figure II.1-2C).. Puis j'ai inséré dans le vecteur ainsi obtenu, le fragment « SbfI-S3ah-BAD » en utilisant les enzymes SbfI et BsrGI (cf. Figure II.1-2D). Pour finir, j'ai cloné le fragment « EcoRI-S3ah-BAD » dans pYeDP60 en utilisant les enzymes EcoRI et SacII.

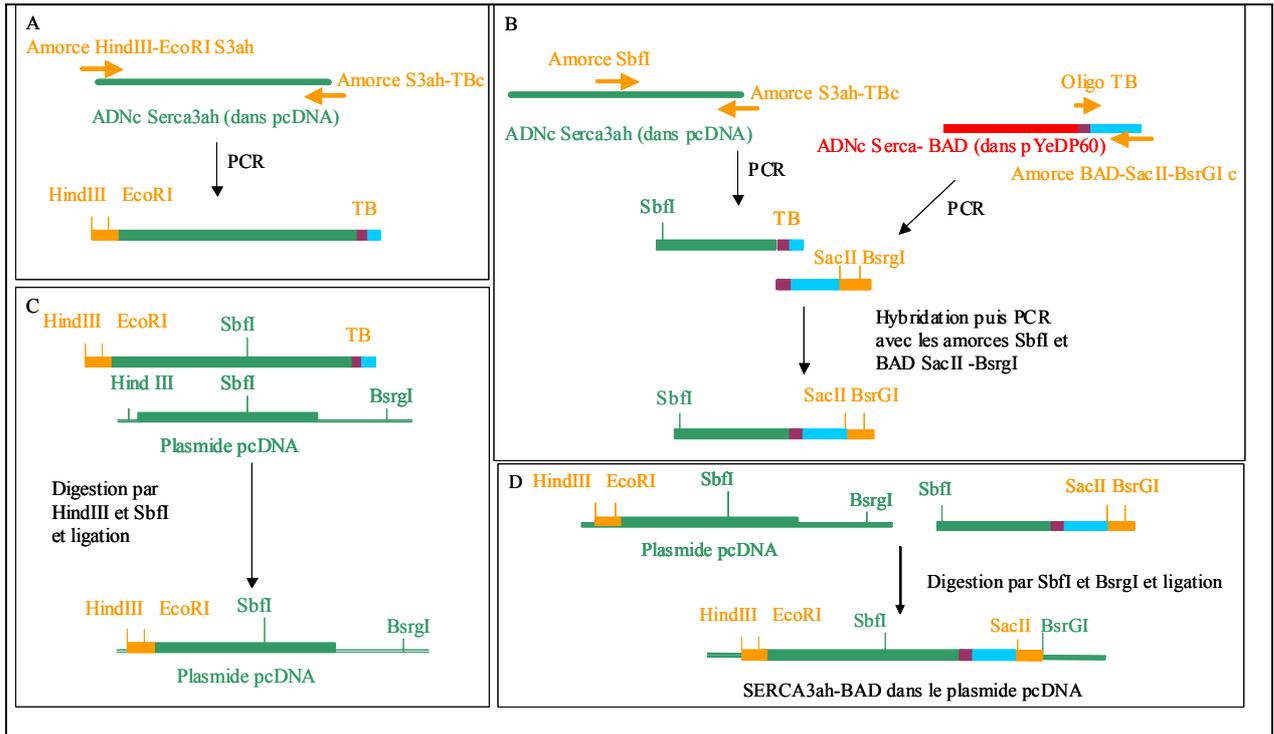


Figure II.1-2 Stratégie de clonage de SERCA3ah : obtention de SERCA3ah-BAD dans le plasmide pcDNA

A- Obtention du fragment HindIII-EcoRI-S3ah-TB. B-Obtention du fragment SbfI S3ah BAD. C- Clonage de HindIII-EcoRI S3ah dans le plasmide pcDNA. D-Clonage de HindIII-EcoRI-S3ah-BAD-SacII-BsrGI dans le plasmide pcDNA.

II.1.2.2 Réalisation, amplification et séquençage des constructions plasmidiques :

a) PCR et PCR par hybridation.

Les PCR sont réalisées à partir de 10, 1 et 0,1 ng de matrice ADN, avec 1,25U d'enzyme *PfuTurbo*[®] ADN polymérase (STRATAGENE[®]), 200 μ M de mélange équimolaire de dNTP, 0,25 μ M de chacune des amorces et qsp 50 μ L 1X du tampon fourni avec l'enzyme. L'étape de dénaturation à chaque cycle se déroule à 94°C pendant 1 min (5 min pour le tout premier cycle). L'étape d'hybridation dure 1min et la température est dépendante des amorces, toutefois on teste généralement une température de 65°C. Pour définir la durée de l'étape d'élongation, on considère qu'il faut 1 min à l'enzyme pour répliquer 1000 bases et on ajoute 1 min de sécurité lorsque la matrice fait plus de 10 kb. On réalise 30 cycles « dénaturation-hybridation-élongation ». Si nous rencontrons des difficultés à amplifier certains fragments, nous testons différentes températures d'hybridations et/ou différents temps d'élongation.

Lorsque nous réalisons une PCR dite par hybridation, le but est de joindre deux fragments d'ADN, généralement obtenus précédemment par PCR, grâce à une partie de leur séquence qui est commune (*cf.*Figure II.1-3). Le mélange réactionnel de départ est constitué de 10^8 copies du plus grand fragment, de $10 \cdot 10^8$, $5 \cdot 10^8$ ou $2 \cdot 10^8$ copies de l'autre fragment, de 200 μ M de mélange équimolaire de dNTP, 2,5U d'enzyme *Pfu*, qsp 50 μ L 1X du tampon fourni avec l'enzyme. Les amorces sont rajoutées au terme du premier cycle à une concentration finale de 0,25 μ M. Au cours du premier cycle, la durée d'hybridation est de 2 min à 65°C et l'élongation se déroule pendant 10 min à 72°C. Les cycles suivants se déroulent selon les conditions standard de PCR décrites ci-dessus. En cas de difficulté, il est possible de faire varier la quantité des matrices, le rapport entre les quantités des deux matrices ainsi que la température d'hybridation du premier cycle.

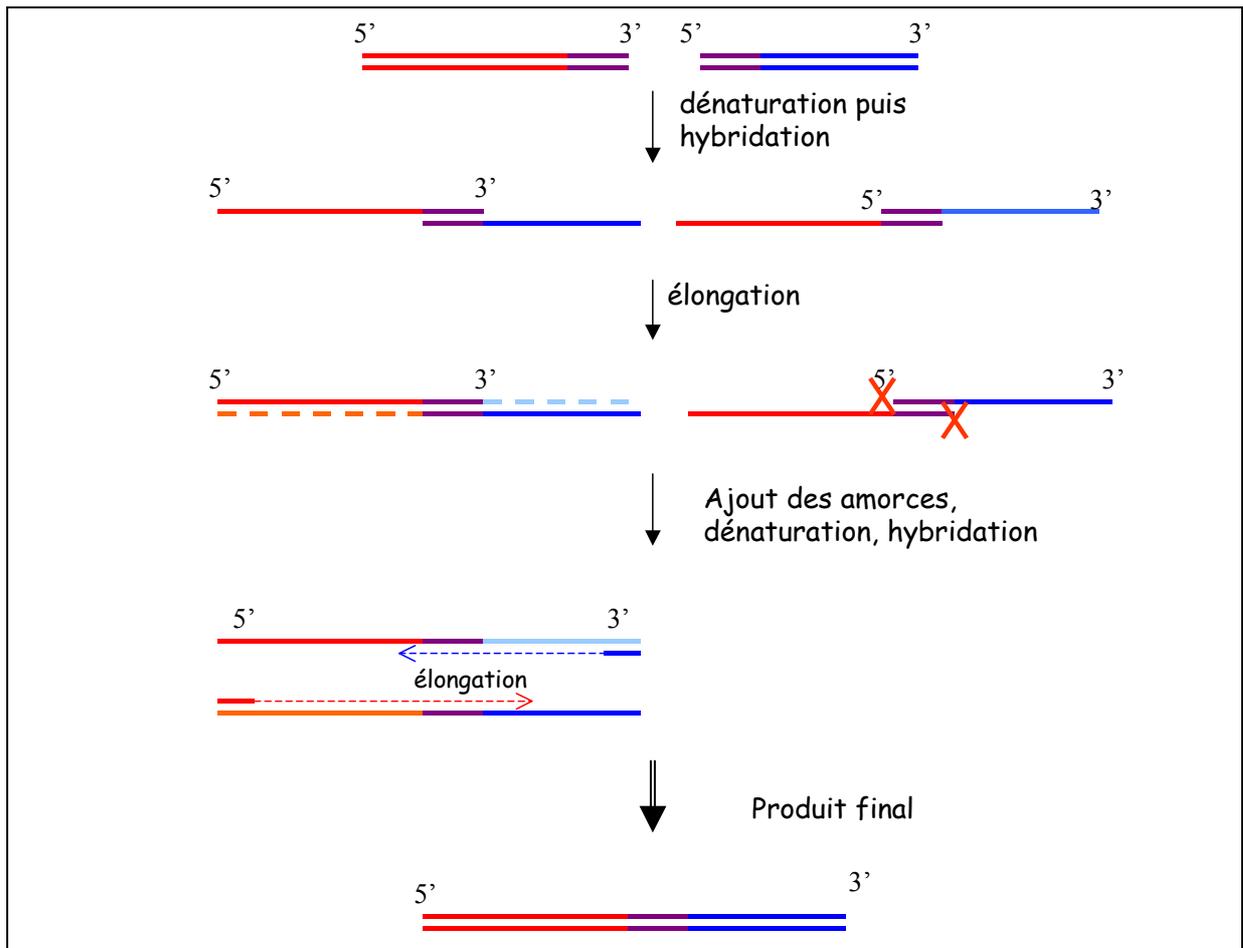


Figure II.1-3 Schématisation d'une PCR par hybridation.

Le premier cycle de PCR se réalise en absence d'amorces. Après dénaturation, la séquence commune aux deux fragments de gènes à joindre va s'hybrider, permettant à la polymérase de se servir de la partie non commune comme matrice

b) Clonage et transformation des bactéries

Avant de réaliser les digestions enzymatiques nécessaires au clonage, il est souvent souhaitable de concentrer les produits de PCR obtenus. Pour cela, un dessalage est tout d'abord réalisé grâce à l'utilisation de la résine G100 Sephadex, qui permet l'élimination de molécules de taille inférieure à 100kDa, donc les ions mais également les enzymes de restriction (pour plus de détails voir Corre *et al.*, 1997). La phase aqueuse des réactions PCR utilisées est regroupée dans un même tube. 850µL de résine G100 en

suspension sont rincés dans du tampon TE' (10mM Tris pH8- 0,1mM EDTA). 200 μ L du mélange à dessaler sont déposés sur la colonne de résine formée après centrifugation à 3500 rpm (1000 g_{av} , centrifugeuse JOUAN MR22) dans un spin module (Q-BioGene). On récupère le filtrat après centrifugation à 3500 rpm pendant 8 min. On renouvèle l'opération autant de fois que nécessaire, sachant qu'on peut charger jusque 1mL total sur une colonne formée à partir de 850 μ L de résine en suspension.

Le filtrat ainsi obtenu est concentré par précipitation à l'éthanol. Dans un premier temps, pour la précipitation à proprement parlé, on ajoute un mélange salin et de l'éthanol (0.825M AcNH₄-66.25% éthanol final) et on laisse la précipitation se dérouler à -20°C pendant 30min. Après centrifugation pendant 30 min à 15 000 rpm (18500 g_{av}), on rince les culots 2 fois avec de l'éthanol 70%, puis avec de l'éthanol 100% avant de les faire sécher puis de les reprendre dans le volume souhaité d'eau.

Les différentes digestions enzymatiques sont, la plupart du temps, réalisées successivement. 5-10 μ g d'ADN purifié sont mis à incuber avec l'enzyme de restriction choisie, dans le tampon, pendant la durée et à la température préconisés par le fabricant. Après chaque digestion, les coupures sont vérifiées par migration électrophorétique sur gel d'agarose.

Les fragments d'ADN d'intérêt sont récupérés par élution : Après une séparation par migration électrophorétique, les fragments sont élués en utilisant la méthode « Quick-Pik™ Electroelution Capsule » (Stratagene).

La ligation des différents fragments se déroule dans un milieu contenant environ 80 ng de vecteur et 2 fois plus de molécules d'inserts. Le produit de ligation obtenu sert à transformer des bactéries *E. coli JM109*. Les bactéries sont rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium : 100mL de milieu LB sontensemencés avec une préculture de bactéries JM109. Après deux heures de croissance, les bactéries sont centrifugées puis le culot est incubé dans le tampon A (50mM CaCl₂- 10 mM Tris pH8) pendant 30 min dans la glace. Après centrifugation 5 min à 5000 rpm (2000 g_{av} , centrifugeuse JOUAN MR 22), le culot est repris dans 1,5 mL de tampon A puis incubé dans la glace pendant 1h. 90 μ L du produit de ligation sont mélangés à 100 μ L de la suspension de bactéries compétentes avec 10 μ L de tampon B (500mM CaCl₂-50mM

Tris pH 8). Le mélange est laissé 1h dans la glace puis un choc thermique est réalisé en plaçant les tubes 5 min à 37°C. 800µL de milieu LB sont alors ajoutés et les tubes sont placés à 37°C pendant 1h, afin de laisser le temps au gène de résistance de s'exprimer. Etant donné le gène de résistance porté par le vecteur navette pYEDP60 (cf. Figure II.1-1 page 94), ces bactéries transformées sont ensuite étalées sur boîte de milieu Luria Broth additionné d'ampicilline. En cas de problème, le rapport vecteur/ insert est modifié.

L'ADN plasmidique est purifié à partir des bactéries transformées en utilisant la méthode QIAprep® Miniprep (Qiagen).

Chaque ADN préparé est vérifié par séquençage en utilisant un séquenceur automatique ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing géré par le service du DIEP au CEA-Saclay. Les ADN à séquencer sont soumis à un cycle de PCR en présence d'une seule amorce et d'un mélange de désoxynucléotides contenant des di-désoxynucléotides (ddNTP) couplés à un fluorochrome différent pour chaque type de ddNTP. L'incorporation d'un ddNTP bloque l'élongation. Les différents produits de PCR sont ensuite récupérés par précipitation à l'éthanol et les ADN sont repris dans le tampon d'analyse. Lors de l'analyse par le séquenceur, le dernier nucléotide incorporé sera détecté grâce au fluorochrome couplé. Grâce à cette méthode des fragments de 300 à 400 bases peuvent être séquencés.

II.1.3 Transformation de *S. cerevisiae* par le vecteur navette

II.1.3.1 Présentation de la souche de levure utilisée :

Nous avons utilisé la souche W3031.b/Gal4 (*a*, *leu2*, *his3*, *trp1::TRP1-P_{GAL10}-GAL4*, *ura3*, *ade2-1*, *can1*, *cir**) décrite dans Lenoir *et al.* (2002)(voir signification des notations dans le Tableau II.1-1).

Symbole génétique	Signification
<i>ADE2</i> ⁺	Allèle sauvage, contrôlant la production d'adénine
<i>ADE2</i>	Locus ou allèle dominant.
<i>ade2</i>	Locus ou allele récessif conférant une auxotrophie pour l'adénine.
<i>ade2-9</i>	Allèle ou mutation spécifique
<i>Ade</i> ⁺	Souche prototrophe pour l'adénine
<i>Ade</i> ⁻	Souche auxotrophe pour l'adénine
<i>Ade2p</i>	Protéine codée par <i>ADE2</i>
<i>ADE2</i> mRNA	ARNm transcrit à partir de <i>ADE2</i>
<i>ade2-Δ1</i>	Délétion spécifique, complète ou partielle de <i>ADE2</i>
<i>ADE2::LEU2</i>	Insertion du gène <i>LEU2</i> fonctionnel au niveau du locus <i>ADE2</i> ; <i>ADE2</i> restant fonctionnel et dominant
<i>ade2::LEU2</i>	Insertion du gène <i>LEU2</i> fonctionnel au niveau du locus <i>ADE2</i> ; <i>ade2</i> étant ou devenant non fonctionnel
<i>CYC1-ADE2</i>	Fusion entre les gènes <i>CYC1</i> et <i>ADE2</i> , les deux gènes étant fonctionnels
<i>P_{CYC1}-ADE2</i>	Fusion entre le promoteur <i>CYC1</i> et <i>ADE2</i> , le gène <i>ADE2</i> est fonctionnel
<i>a</i>	Type sexuel de la souche de levure
<i>leu2, his3, ura3, ade2-1</i>	Levure auxotrophe pour la leucine, l'histidine, l'uracile et l'adénine
<i>Trp1::TRP1-P_{GAL10}-GAL4</i>	Insertion de <i>TRP1</i> et <i>GAL4</i> sous contrôle du promoteur <i>GAL10</i> , <i>TRP1</i> et <i>GAL4</i> étant fonctionnels
<i>can</i> ^r	Souche sensible à la canavanine sulfate
<i>Cir</i> ⁺	Présence d'un plasmide 2- μ m

Tableau II.1-1 Nomenclature en génétique de la levure en utilisant ADE2 comme exemple et application à la souche W303.1.b (adapté de Sherman, 1998)

Cette souche de levure est auxotrophe pour deux acides aminés : la leucine et l'histidine, ainsi que pour deux bases azotées : l'uracile et l'adénine. Ces substances essentielles devront être apportées, soit par le milieu de culture, soit par complémentation.

De plus, il a été inséré dans le génome de cette levure le gène *GAL4* sous contrôle du promoteur *GAL10*. Cette construction, d'après une idée de Schultz *et al.*, (1987), permet d'augmenter le nombre de copies de la protéine Gal4p suite à l'ajout de galactose dans le milieu (*cf.* Figure II.1-4).

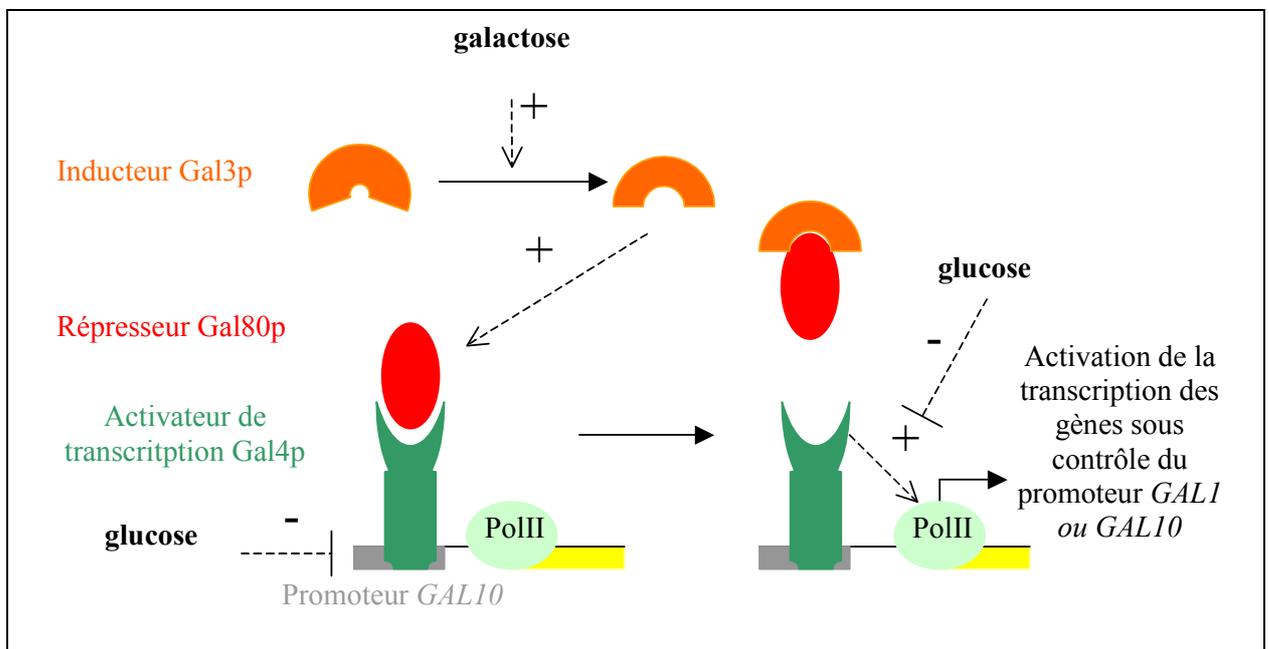


Figure II.1-4 Système Gal4p chez la levure

La protéine Gal 4 est un facteur de transcription qui interagit avec les séquences nucléotides des promoteurs des protéines GAL1 et GAL 10. En absence de galactose, le facteur de transcription Gal4p est réprimé par la protéine Gal80p (Lohr et al., 1995; Bhat et Murthy, 2001). La présence de galactose dans le milieu va activer l'inducteur Gal3p, qui va lever la répression exercée par Gal80p. En absence de glucose, (Johnston, 1999), la protéine Gal4p va alors activer la transcription des gènes situés en aval du promoteur.

De manière constitutive, Gal4p est faiblement exprimée. Grâce à la construction $P_{GAL10-GAL4}$, l'ajout de galactose dans le milieu permet, non seulement de lever la répression des protéines Gal4p déjà présentes, mais également d'amplifier la quantité de protéine Gal4p et par conséquent d'augmenter l'expression des gènes sous contrôle des promoteurs GAL1 et GAL10, y compris ceux présents dans les vecteurs d'expression transfectés dans la levure (*cf.* paragraphe II.1.1)

II.1.3.2 Transformation des levures :

Les levures sont transformées grâce à la méthode à l'acétate de lithium. Un traitement par l'acétate de lithium rend les cellules de levures compétentes. L'utilisation d'un ADN entraîneur et de PEG permet d'augmenter l'efficacité de transformation (Gietz *et al.*, 1992).

$4 \cdot 10^9$ cellules de levures sont utilisées pour chaque préparation de levures compétentes. Après centrifugation des cultures de levures 10min à 5000rpm, rotor JA12 (3000 g_{av} , centrifugeuse Beckman Coulter™), les culots sont lavés deux fois par de l'eau stérile froide. Les culots sont ensuite lavés deux fois dans du tampon lithium froid (0,1M Acétate de lithium - 0,01M Tris pH 7,5 - 1mM EDTA) avant d'être incubés 15 min à 30°C dans ce même tampon.

Le même jour, les cellules compétentes ainsi obtenues sont mélangées avec l'ADN transformeur et à l'ADN entraîneur dans du tampon PEG (40% PEG 4000-0,1M Acétate de lithium - 0,01M Tris pH 7,5 - 1mM EDTA). Un témoin négatif avec de l'eau stérile est réalisé à chaque fois. Pour faire entrer l'ADN par choc thermique, ce mélange réactionnel est incubé pendant 30 min dans un bain marie à 30°C, puis 20 min dans un bain marie à 42°C. La suspension est ensuite centrifugée en présence de liquide de Ringer et les culots de levures sont repris dans du liquide de Ringer avant d'être étalés sur boîtes de milieu minimum S6 complété en adénine (20 μ g/mL) (S6A). Le résultat de la transformation est observable après culture de 48h à 28°C.

II.2 Expression et purification des SERCAs

II.2.1 Mini expression :

Avant de démarrer la culture de levures transformées de 2L ou plus, nous testons l'expression de la protéine d'intérêt par quelques clones sur de plus petits volumes.

Au début de ma thèse, ces tests se déroulaient en milieu minimum : le premier jour, le clone était mis en culture dans 5mL de milieu S6A (milieu sélectif avec glucose) à 28°C pendant 18h. Cette préculture servait àensemencer 10 mL de S5A (milieu sélectif avec galactose), la présence de galactose permettant l'induction de l'expression de la protéine d'intérêt (*cf.* II.1.3.1). La culture était placée sous agitation à 28°C pendant 17h environ. Par la suite, nous avons jugé qu'il était sans doute préférable de sélectionner les clones dans des conditions se rapprochant de celles utilisées pour la maxi expression. Dans ce cas, après une préculture en milieu S6A, les cultures sont réalisées en milieu riche YPGE2X pendant 24h. Nous ajoutons ensuite 2% (m/v) de galactose et remettons la culture 12h à 18°C.

Suite à ces cultures, $1,5 \cdot 10^8$ levures sont utilisées pour réaliser un broyage puis une précipitation des protéines par TCA afin d'analyser l'expression. Les levures sont centrifugées à 10 000 rpm, (8000 g_{av} centrifugeuse Jouan MR22) à 4°C pendant 5 min. Après un lavage dans du NaN_3 10 mM, les culots sont repris dans 400 μL de NaN_3 10mM TCA 2%. Les levures sont ensuite broyées mécaniquement grâce à l'ajout de billes de verres de 0,5 mm de diamètre et à l'utilisation d'un vortex pendant 8 min à vitesse maximale. Les billes sont lavées 3 fois avec du TCA 2%. Le broyat ainsi récolté est laissé 15 min dans la glace, ce qui permet la précipitation des protéines, puis centrifugé à 19 500 rpm (30000 g_{av} , centrifugeuse Jouan MR22) à 4°C pendant 15 min. Les culots sont suspendus dans du Tris 100mM pH8 et conservés à -80°C.

II.2.2 Maxi expression :

Elle est réalisée sur la souche sélectionnée en mini expression. Le protocole est décrit dans la partie « Materials and Methods » de l'article I. Suivant les expériences, de 500mL à 8L de culture sont réalisés. Il faut au minimum 5 jours pour mettre en œuvre cette maxi expression : après deux précultures en milieu minimum S6A, des fernbachs contenant du milieu riche YPGÉ2X (2% Yeast extract-1% glucose- 2% bactopectone -2.7% éthanol) sontensemencés (t=0h). La présence d'un promoteur inductible nous permet de séparer la phase de croissance des levures (jusque t=36h) de la phase d'expression de la protéine d'intérêt. Il a été montré au laboratoire qu'une deuxième induction à t=49h avant un arrêt 6h plus tard était favorable à l'expression de la protéine SERCA-His, et que le déroulement de la phase d'expression à 18°C favorisait son adressage dans les membranes légères. (Centeno *et al.*, 1994; Lenoir *et al.*, 2002)

II.2.3 Fractionnement

Ce protocole a évolué au cours de ma thèse. La version finalement adoptée est décrite dans la partie « Materials and Methods » de l'article I. De manière simplifiée, après la culture, les levures sont récupérées par centrifugation sous forme de culots. Après un rinçage dans l'eau, destiné à éliminer les restes de milieu de culture, les levures sont lavées avec un tampon TEKS (50mM Tris pH 7,5 -1mM EDTA-0,6M Sorbitol-0,1M KCl) afin de créer un choc osmotique, puis sont broyées mécaniquement en présence de billes de verres dans un tampon TES (50mM Tris pH 7,5 -1mM EDTA-0,6M Sorbitol-1mM PMSF). Le broyat récolté est soumis à des centrifugations différentielles, permettant de séparer les différentes fractions membranaires : le premier culot (C1) contenant les levures non broyées, le deuxième culot (C2) contenant majoritairement les fragments de membranes plasmiques et les mitochondries, et le dernier culot (C3) contenant majoritairement des fragments de membranes internes.

Une des évolutions de ce protocole concerne le broyage : dans un premier temps, il s'effectuait par agitation manuelle puis nous avons testé et adopté l'agitation en incubateur (*cf.* Chapitre « Résultats et Discussions »). Pour le fractionnement, nous avons également testé le protocole de fractionnement complexe décrit dans Lenoir *et al.* (2002) et illustré ici dans la Figure II.2-1A. Il s'est avéré que ce protocole, plus lourd en termes de manipulations, n'apportait pas un réel gain en rendement (*cf.* « Résultats et Discussions »)

Enfin, nous avons opté pour un broyage qualifié de « mécanique » car utilisant l'agitation à 350 rpm dans un incubateur, suivi d'un fractionnement qualifié de simple, illustré dans la Figure II.2-1B.

L'ATPase Ca^{2+} représente 1 à 2% des protéines totales des membranes C3, qui seront utilisées pour la purification. Les membranes C2 contiennent également de l'ATPase mais des études antérieures au laboratoire ont montré que l'ATPase contenue dans ces membranes étaient moins active et moins facilement solubilisée (Centeno *et al.*, 1994; Lenoir *et al.*, 2002).

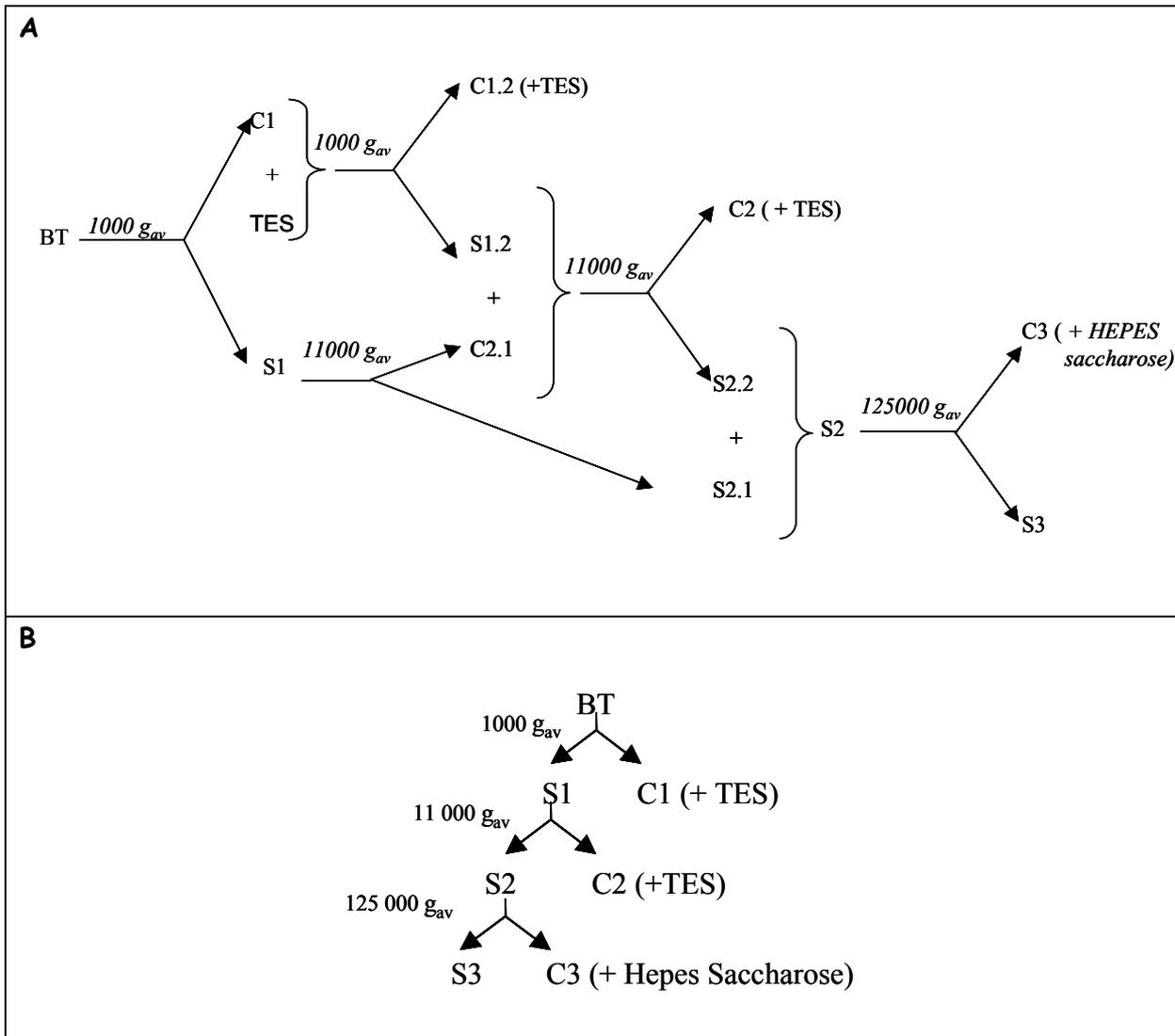


Figure II.2-1 : Procédures de fractionnement

A-Procédure de fractionnement qualifiée de complexe. B-Procédure de fractionnement qualifiée de simple ; C : culot- S : surnageant- BT : Broyat total. TES (50mM Tris pH 7,5 -1mM EDTA-0,6M Sorbitol) et HEPES saccharose (20 mM HEPES pH7,4 - 0,3M saccharose- 0,1mM CaCl₂-) sont les tampons qui servent à reprendre les culots.

II.2.4 Solubilisation et Cinétique de solubilisation

Au cours de ma thèse, les conditions de solubilisation des membranes C3 ont évoluées. Les raisons seront explicitées dans le chapitre « Résultats et Discussions ».

Les membranes sont diluées pour atteindre une concentration finale en protéines totales de $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du tampon de solubilisation (50mM Tris pH7- 0,1M NaCl- 20% glycérol -1mM CaCl_2 - 1mM mercaptoéthanol), en présence de DDM 0.6% ; (rapport détergent/protéines : 3/1 en g/g) et de 1mM de PMSF. Au terme du temps de solubilisation, le mélange est ultracentrifugé à 40 000 rpm dans le rotor Ti 45 (125000 g_{av}) pendant 30 min. Le surnageant, contenant la fraction solubilisée, est conservé.

Lors des tests de cinétique de solubilisation, les mêmes conditions sont appliquées. Au temps souhaité, un aliquot de $200\mu\text{L}$ est prélevé et mis à centrifuger dans l'ultracentrifugeuse Beckman TL-100 à 70 000 rpm (rotor TLA-100 125000 g_{av}) pendant 30min. Le surnageant est conservé et analysé par western blot (*cf.* II.3.1 page 111)

II.2.5 Purification par le système « avidine » :

La mise au point de ce protocole a constitué une grande partie de mon travail de thèse. Les différents protocoles utilisés successivement seront décrits dans la partie « Résultats et Discussions ». Je présente ici le protocole utilisé à la fin de ma thèse.

Le solubilisé obtenu est mis en contact avec l'avidine-agarose (Soft Link Avidin Resin, Promega) préalablement lavée avec du tampon de solubilisation. Pour 10mL de C3, 1,2 mL de résine sont utilisés. Le mélange solubilisé-résine est faiblement agité pendant toute la nuit en chambre froide. La colonne de résine est ensuite formée dans une colonne de verre Biosepra sous un débit de $1,5\text{mL}/\text{min}$. Le « passe-tout-droit » (PTD) obtenu est chargé de nouveau sur la colonne ainsi formée. La résine est ensuite lavée sous un débit de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ avec 10 fois son volume de tampon à haute concentration en sel (tampon haut sel : 50mM Tris pH7- 1M NaCl-20% glycérol- 1mM CaCl_2 - 1mM

mercaptoéthanol- 0,05% DDM), puis rééquilibrée avec du tampon bas sel (50mM Tris pH7- 0,15M NaCl-20% glycérol- 2,5mM CaCl₂ - 1mM mercaptoéthanol- 0,05% DDM). Pour ces deux étapes de lavages, un temps d'attente de 15 min est observé après qu'un premier volume de tampon ait été élué. Pour l'étape de coupure par la thrombine, la résine est resuspendue avec du tampon bas sel. 40 unités de thrombine sont ajoutées à ce mélange qui est lentement agité sur une roue à température ambiante pendant 30min. 20 unités de thrombine sont de nouveau ajoutées et l'incubation se prolonge encore 30min. Au bout du temps imparti, l'action de la thrombine est stoppée par ajout de 2,5mM de PMSF. L'éluion de SERCA, sans son domaine de fusion, a lieu en chambre froide sous un débit de 0,5mL.min⁻¹, grâce à l'ajout de tampon bas sel, mL par mL. Pour toute cette procédure, une pompe péristaltique est utilisée pour assurer des débits constants.

La résine (Soft Link Avidin Resin) est régénérée selon les instructions préconisées par le fournisseur (Promega), à savoir : un lavage avec 8 volumes d'acide acétique 10%, puis un lavage avec un tampon 100mM NaPO₄ pH 7. La résine est ensuite conservée dans 20% d'éthanol.

II.2.6 Purification par gel filtration en HPLC

L'étape de purification par gel filtration se déroule en HPLC : une colonne TSK-gel G3000SW_{XL} est utilisée et la procédure est contrôlée par le System Gold (Beckman).

La boucle d'injection utilisée a un volume de 500μL. Une étape de concentration des éluats obtenus après purification par chromatographie d'affinité est donc nécessaire. A cette fin, les éluats sont répartis dans des Centricons C30 (Amicon) et concentrés par centrifugation à 5000rpm jusqu'à atteindre un volume final inférieur à 500μL.

La colonne de gel filtration utilisée est préalablement lavée avec le tampon d'éluion (100mM MOPS pH6,8 - 80mM KCl- 1mM MgCl₂- 1mM CaCl₂- 20% glycérol (v/v)- 0,5mg/mL C₁₂E₈). L'éluion a lieu sous un débit de 0,5 mL.min⁻¹.

A cette étape, un changement de détergent est opéré, la protéine étant en sortie de colonne en présence de $C_{12}E_8$ et non plus de DDM. Cet échange peut être contrôlé grâce à l'utilisation de détergents radiomarqués (cf. II.3.3 page 113)

II.3 Analyses biochimiques

II.3.1 Analyses par SDS-PAGE et western blots

Les fractions protéiques peuvent être analysées après électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) par coloration des gels au bleu de Coomassie ou par détection après transfert (Western blot), comme décrit dans la partie « Materials and Methods » de l'article I. En règle générale, la migration est stoppée lorsque le front de migration atteint le bas du gel (environ 1h de migration à 150V, 0,025A par gel), mais il peut arriver que la migration dure plus longtemps, en particulier si l'on souhaite séparer la bande « pyruvate carboxylase » de la bande « SERCA-BAD » avant une révélation par l'avidine peroxydase, la migration durant alors 90 min.

Après transfert, la détection des protéines se fait soit simplement en utilisant de l'avidine couplée à une peroxydase, soit en réalisant une immuno-détection à l'aide d'un couple anticorps I -anticorps II couplé à une peroxydase. Les conditions d'utilisation des anticorps sont résumées dans le Tableau II.3-1.

Les protéines détectées sont révélées par la méthode ECLTM (Enhanced Chemiluminescence, Amersham) puis les membranes sont autoradiographiées. Les quantifications sont réalisées à partir des films faiblement exposés, afin que le signal ne soit pas saturé. Pour quantifier, ces films sont analysés grâce à un densitomètre (scanner Model GS-700 imaging densitometerTM, Biorad) avec Molecular AnalystTM v14.1 (Biorad).

Anticorps I ou avidine peroxydase		Anticorps secondaire	
Dénomination (<i>provenance</i>)	Dilution et Temps d'incubation	Dénomination	Dilution et Temps d'incubation
Avidine peroxydase (<i>SIGMA</i>)	1/50000 - 60 min		
79B (anti SERCA1) (<i>A-M LOMPRES (INSERM, Paris)</i>)	1/30000-50 min	Anti cochon d'Inde	1/10000 -60 min
190.1 (J. MØLLER)	1/5000 -90min	Anti-Lapin	1/10000
PL/IM (anti-SERCA3) (<i>Jocelyne ENOUF (INSERM, Paris)</i>)	1/100- 90min	Anti IgG1 de souris	1/2000 - 90min

Tableau II.3-1 : Conditions d'utilisation des anticorps ou de l'avidine peroxydase après un western blot.

La membrane est dans un premier temps saturée à l'aide de PBS-Tween (90 mM K_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.7, Tween 20 0.2 % (v/v)) +10% lait en poudre (m/v). Dans les cas d'utilisation d'anticorps, les anticorps primaires sont ajoutés à la solution précédente, aux dilutions indiquées dans ce tableau. Après rinçage de la membrane par du PBS Tween, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire adéquat. L'incubation avec l'anticorps secondaire se déroule dans les mêmes conditions. Dans le cas de l'utilisation de l'avidine peroxydase, après saturation, la membrane est rincée puis incubée avec l'avidine peroxydase diluée dans du PBS Tween. Au terme de chaque temps d'incubation, les membranes sont rincées dans du PBS-Tween.

II.3.2 Dosage des protéines totales :

La quantité de protéines dans les échantillons est déterminée selon une adaptation de la méthode de Smith *et al.*, (1985), c'est à dire en utilisant l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode utilise le fait qu'en milieu alcalin, l'interaction du cuivre II Cu^{2+} avec les liaisons peptidiques entraîne sa réduction en cuivre Cu^{1+} (réaction dite du biuret). Le cuivre I va se complexer avec le BCA pour former un produit pourpre, ayant un maximum d'absorbance à 562 nm.

La méthode a été adaptée pour un dosage en microplaque. Les puits sont préparés en mélangeant 1 μL de solution à doser avec 2 μL de SDS 10% et 7 μL d'eau. Une gamme d'albumine sérique bovine (BSA) de 0 à 30 μg de protéine/puits est préparée en ajoutant le volume adéquat d'une solution étalon de BSA à 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1 μL du tampon dans lequel sont conservées les fractions à doser, 2 μL de SDS et qsp 10 μL d'eau. L'ajout de tampon a pour but de rendre cette gamme plus fiable en tenant compte des interférences liées au tampon, le sorbitol contenu dans le tampon TES-PMSF étant en particulier connu pour interférer dans le dosage. On ajoute ensuite dans tous les puits 200 μL de réactif fraîchement préparé. L'absorbance à 540nm est mesurée sur le lecteur multiplaque Labsystems Multiskan® BICHROMATIC.

Remarque : lorsque la quantité de protéines des fractions membranaires est dosée, le tampon de conservation de la fraction C3 diffère de celui des autres fractions (*cf.* Figure II.2-1 page 108): pour ne faire qu'une gamme, il est possible de faire en sorte que tous les puits contiennent la même quantité de tampon en ajoutant 1 μL du deuxième tampon dans les puits.

II.3.3 Mesures de la quantité de détergent présent dans un échantillon

Cette mesure se base sur l'utilisation de détergent, DDM ou C_{12}E_8 marqué au carbone 14, isotope radioactif. Ces détergents ont été synthétisés au CEA-Saclay. La quantité de détergent radioactif est mesurée grâce à un compteur à scintillation.

II.3.3.1 Utilisation du comptage en liquide de scintillation

L'échantillon à mesurer est placé dans des fioles de comptage et dilué dans un liquide de scintillation, composé d'un solvant et d'une molécule fluorescente. Lors de la désintégration d'un atome radioactif de l'énergie est libérée ; cette énergie va être absorbé par le solvant. Le solvant transfère ensuite cette énergie à la molécule fluorescente qui libèrera à son tour cette énergie sous forme de fluorescence. Le signal est analysé par un compteur, qui nous les transmet en coups par minute (cpm)

II.3.3.2 Suivi du devenir d'un détergent au cours d'un passage sur colonne de gel filtration en HPLC ou dans les étapes expérimentales suivantes.

L'échange entre le DDM et le $C_{12}E_8$ au cours de l'étape de purification par HPLC a ainsi été vérifié : pour cela, du DDM radioactif est ajouté à l'échantillon injecté (ajout de $0,2\mu\text{Ci}$). $25\ \mu\text{L}$ des fractions éluées sont ensuite analysées grâce à un comptage en scintillation liquide.

De même, le comportement du $C_{12}E_8$ au cours de la dernière étape de concentration en Centricon 30 avant cristallisation a pu être suivi en ajoutant du $C_{12}E_8$ radioactif au tampon HPLC ($10\ \mu\text{Ci}$ pour $150\ \text{mL}$ de tampon). Les fractions éluées, le pool qui sera concentré et la fraction concentrée obtenus sont analysés grâce à un comptage en scintillation liquide.

Ce type de procédure permet également d'avoir accès à la quantité de détergent lié à une protéine : pour cette mesure, le détergent radioactif est ajouté au tampon et à l'échantillon (*cf. Winstone et al., (2005), article III en annexe*).

II.3.4 Reconstitution de l'ATPase en liposomes

Deux techniques peuvent être utilisées : une première méthode utilisée précédemment au laboratoire (*cf. Lenoir et al., 2002*) consiste à ajouter des lipides tout en enlevant le détergent par Biobeads. Cette méthode est rapide mais les vésicules formées ne

permettent pas de mesurer le transport de calcium par l'ATPase. Une autre méthode consiste à former des liposomes de DOPC par dialyse en présence de la protéine d'intérêt en détergent. Cette méthode, utilisée dans l'article II permet de mesurer le transport de calcium.

II.3.4.1 Ajout de lipides EYPC/EYPA

Une solution de lipides EYPC/EYPA à 30 mg.mL^{-1} (10mg EYPC/1mg EYPA) est préparée. Pour cela, les lipides sont dissous dans du chloroforme puis mélangés dans les proportions souhaitées, lyophilisés, puis repris dans le tampon L (50 mM Tris-HCl pH 8-20% glycérol (v/v) - 1mMDTT). Les lipides sont à une concentration finale de 1 mg.mL^{-1} et les Biobeads (200g de Biobeads pour 1 g de DDM) sont ajoutés à l'échantillon qui est gentiment agité pendant une heure en chambre froide avant élimination des Biobeads.

II.3.4.2 Reconstitution en liposomes de DOPC

Dans un premier temps, le DOPC est solubilisé par du cholate : après avoir fait évaporer le chloroforme dans lequel était préalablement dilué et stocké un volume $V/2$ de DOPC (40 mg.mL^{-1}), un volume V de tampon cholate (0,03M Tris pH7- 400 mM NaCl- 400mM saccharose - 1mM MgCl_2 -1mM NaN_3 - 1% cholate (m/v) -50mM DTT) est ajouté. Parallèlement, l'échantillon souhaité est préparé : s'il s'agit de la protéine purifiée, elle est préparée comme indiqué ci-dessus et l'échantillon final est concentré pour avoir la quantité de protéine souhaitée dans 40 à $200 \mu\text{L}$. S'il s'agit du SR, il est solubilisé grâce à l'ajout de C_{12}E_8 dans un ratio 2 /1 (m de détergent/ m protéine). Le solubilisé est récupéré après centrifugation pendant 30 min à 70 000 rpm (rotor TLA-100 ; $125000 g_{av}$).

Les protéoliposomes sont ensuite formés par dialyse, les détergents (cholate et C_{12}E_8 ou DDM) étant ôtés à l'aide de Biobeads. L'échantillon protéique est ajouté au mélange DOPC-cholate puis le tout est réparti dans un ou plusieurs boudins de dialyse. La dialyse se déroule dans un tampon de dialyse avec DTT en présence de Biobeads (6mL pour un boudin de 5mL). Le tampon de dialyse est changé au bout de 5h. 5h à 8h plus

tard le tampon et les Biobeads sont remplacés. Au cours des 24h suivantes, le tampon sera remplacé deux nouvelles fois par du tampon sans DTT.

Au terme de cette dialyse, les vésicules sont formées. Elles sont concentrées grâce à la mise en contact des boudins de dialyse avec du PEG 20000 . Les vésicules peuvent alors être stockées à 4°C pendant une semaine. La congélation endommagerait les vésicules.

Pour les calculs ultérieurs, on considère que la totalité des protéines ajoutées se retrouvent dans les vésicules.

II.3.5 Mesure d'activité ATPasique :

Elle est réalisée par une méthode de mesure spectrophotométrique associée à l'utilisation de deux enzymes couplées (*cf.* Figure II.3-1). Ce système permet de corréliser l'hydrolyse d'une molécule d'ATP à la consommation d'une molécule de NADH tout en régénérant la molécule d'ATP hydrolysée, évitant à la fois une dépletion en ATP et une accumulation d'ADP, qui pourrait inhiber l'ATPase. La disparition du NADH se mesure en suivant la diminution de l'absorbance à 340nm. La pente mesurée sur le graphique $A_{340nm} = f(t)$ permet de déterminer la vitesse d'hydrolyse de l'ATP. (*cf.* Figure II.3-2). En connaissant la quantité de SERCA utilisée lors de la mesure, on détermine alors l'activité spécifique de la solution de SERCA testée.

Ces activités ATPasiques sont mesurées dans un tampon de dosage (tampon utilisé : 50 mM MOPS pH7, 0,1 M KCl, 7 mM MgCl₂, 0,3mM NADH) auquel est ajouté extemporanément 1mM PEP, 0,1mg.mL⁻¹ de LDH et de PK, 1 mM PMSF et 10mM de NaN₃. Notons que d'autres tampons pH 7 pourraient convenir, comme par exemple le tampon utilisé pour le transport de Ca²⁺ (*cf.* II.3.6),.

La quantité de calcium ajouté sera dépendante de la concentration finale souhaitée, en prenant garde de tenir compte de l'apport de calcium lié à l'ajout de notre échantillon. En dehors des expériences visant à contrôler la dépendance de l'activité ATPasique vis-à-vis du Ca²⁺, la concentration finale utilisée est de 0,1mM.

Après ajout de l'échantillon à tester, la mesure démarre par addition d'ATP (1mM). En fin de mesure, un ajout d'EGTA (0,5mM) ou de thapsigargine permet de mesurer l'hydrolyse de l'ATP calcium-indépendante ou SERCA-indépendante. La valeur de la pente résiduelle éventuellement observée après ajout de l'un de ces deux composés sera soustraite à la valeur de la pente utilisée pour déterminer l'activité ATPasique Ca^{2+} dépendante.

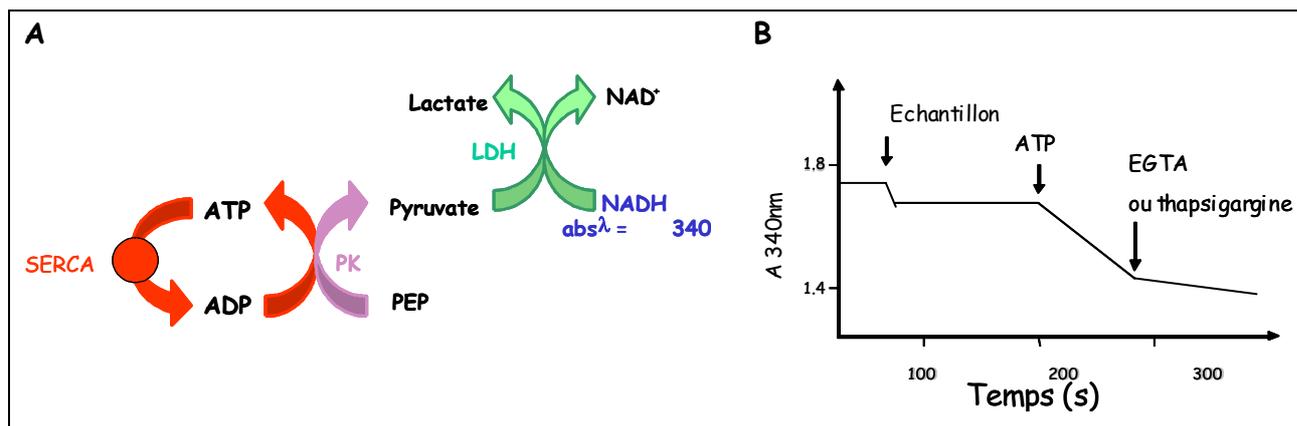


Figure II.3-1 : Principe de la mesure spectrophotométrique de l'activité ATPasique.

A-Principe du système d'enzymes couplées. PK: pyruvate kinase, LDH: lactate déshydrogénase, PEP: phosphoénolpyruvate B-Schématisation du type de tracé obtenu

D'après la loi de Beer-Lambert : $A_{340nm} = l \cdot c \cdot \epsilon_{340nm}$

D'où $\Delta A_{340nm} = l \cdot \Delta[NADH] \cdot \epsilon_{NADH,340nm} \rightarrow \Delta[ATP] = \Delta[NADH] = \Delta A_{340nm} / (l \cdot \epsilon_{NADH,340nm})$

Donc $\mathcal{A}s = |\Delta[ATP]| / [SERCA] = |\Delta A_{340nm}| / (l \cdot \epsilon_{NADH,340nm} \cdot [SERCA])$

Figure II.3-2 Relation entre la pente du graphique A_{340nm} et l'activité ATPasique spécifique de la solution de SERCA

l: longueur de la cuve, c: concentration de la substance absorbant à 340nm, ϵ_{340nm} : coefficient d'extinction molaire de la substance à 340nm, $l=1cm$, $\epsilon_{NADH,340nm} = 6,2 \cdot 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, $\mathcal{A}s$: activité ATPasique spécifique

Pour les mesures sur du SR, il est préférable d'ajouter du $C_{12}E_8$ (1mg/mL) pour le solubiliser car le calcium accumulé dans le réticulum inhibe l'enzyme. Ce détergent sera également ajouté lors des mesures sur les échantillons purifiés, car la quantité de DDM

apporté par l'ajout de l'échantillon dans la cuvette de mesure peut influencer sur l'activité ATPasique de SERCA, et ce de manière non linéaire, et le $C_{12}E_8$ lisse ces effets (*cf.* Champeil *et al.*, 2000 et communication personnelle de Philippe CHAMPEIL)

Lors de mesures destinées à tester l'influence de la concentration en calcium sur l'activité ATPasique : pour les concentrations en calcium inférieures à 1mM, à partir d'une solution préparée comme décrite ci-dessus, on ajoute une quantité définie d'EGTA, pour les concentrations supérieures à 1mM, on ajoute du Ca^{2+} . Les concentrations de calcium libre sont déterminées grâce au logiciel Maxchelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) et en tenant compte de dilutions liées à ces ajouts.

II.3.6 Mesure du transport de calcium

La méthode décrite ci-dessous est basée sur les colonnes de Peneksky (Penefsky, 1977) : par gel filtration, les protéoliposomes, et donc le calcium transporté et accumulé, sont séparés du calcium libre.

Le mélange réactionnel est composé de 0,33mM $^{45}Ca^{2+}$ à 1 $\mu Ci \cdot \mu mol^{-1}$ de Ca^{2+} , 0,3 mM EGTA, de vésicules (200 à 800 μL pour 4mL de mélange réactionnel), de 7mM Mg^{2+} et du tampon de dosage du transport (0,03 M imidazole pH 7-1 mM $MgCl_2$, 1 mM NaN_3 , 150 mM NaCl). La mesure se déroule à température constante dans un bain marie.

A $t=0$, l'ajout de 5 mM d'ATP déclenche la réaction de transport. Au temps souhaité, un prélèvement de 200 μl de mélange réactionnel est déposé sur une colonne de G50 Sephadex. Le volume exclu, contenant les protéoliposomes, sont récupérés après centrifugation 3 min à 900 rpm (100 g_{av} , rotor JA12 Beckman). La radioactivité est ensuite mesurée par scintillation (*cf.* II.3.3.1 page 114). Un témoin négatif ainsi qu' un standard sont également réalisés.

II.4 Biologie cellulaire et microscopie

Dans le cadre de mon travail sur SERCA3, j'ai travaillé sur la localisation cellulaire de ces isoformes. Pour cela, j'ai été amenée à travailler en collaboration avec l'équipe de Jean Marc VERBAVATZ (SBFM, CEA Saclay). Avec eux, j'ai fait de la culture cellulaire de cellules HEK transfectées avec un vecteur pcDNA contenant ou non les différentes isoformes SERCA3 (données aimablement au laboratoire par Jocelyne ENOUF, INSERM, Hôpital Lariboisière, Paris). J'ai également réalisé des coupes cellulaires ainsi que des marquages immunocytochimiques. Enfin, j'ai assisté à la préparation et à l'observation de coupes marquées en microscopie électronique.

II.4.1 Culture des cellules HEK

Les cellules HEK sont cultivées dans du milieu RPMI (Gibco) additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté par chauffage 30 min à 56°C. Lorsque les cellules sont à confluence, après un lavage avec du PBS (Gibco), les adhésions sont altérées par ajout de trypsine (Solution Gibco, 2mL pour un flacon de culture T75). Après 2 min d'incubation à 37°C, 2mL de milieu sont ajoutés. La suspension de cellules est récupérée, diluée une nouvelle fois dans le milieu (afin de bloquer en partie l'action de la trypsine par dilution), puis centrifugée 5 min à 5000 rpm. Le culot de cellules est repris dans 1 mL de milieu stérile et réparti dans 2 boîtes T75 contenant chacune 12,5 mL de RPMI-SVF.

Pour stocker les souches de cellules dans l'azote liquide, après culture, action de la trypsine et centrifugation, le culot de cellules correspondant à une boîte T75 est repris dans 3mL de SVF/DMSO (90/10, v/v) avant d'être réparti dans des cryotubes qui sont tout d'abord placés à -20°C puis à -80°C avant d'être finalement stockés dans l'azote liquide.

II.4.2 Observation de la localisation de SERCA en immunohistochimie

II.4.2.1 Préparation des cellules ou du tissu

L'observation peut se faire, soit directement sur cellules entières, qui dans ce cas ont été mises en culture sur des lamelles, soit sur coupes de cellules ou de tissus.

Pour obtenir des coupes de cellules, le contenu d'un flacon de culture contenant des cellules 90 à 100% confluentes est rincé par du PBS puis fixé grâce à 4% de paraformaldéhyde (préalablement dissoute dans du PBS à 60°C) pendant au moins 30min. Le fixateur est ensuite jeté et les cellules sont rincées dans du PBS : un premier lavage rapide (2-3 min) est suivi d'un lavage d'au moins 2h. Après élimination du PBS, les cellules sont récupérées par un léger grattage. La suspension cellulaire recueillie est centrifugée. Le culot de cellules est mis en contact avec une solution de saccharose à 30% pendant toute une nuit. Les cellules sont ensuite déposées sur le support du cryostat et entourées de « tissue freezer ». Des coupes de 5µm d'épaisseur sont réalisées grâce au cryostat (Leica CM3050).

Dans le cas de cellules cultivées sur lamelles, celles-ci subissent simplement l'étape de fixation.

Dans le cas d'un tissu, celui-ci reste plus longtemps (au moins $\frac{1}{2}$ journée) dans la solution de fixation.

II.4.2.2 Observations au microscope à fluorescence ou au microscope confocal.

Que ce soit pour des coupes ou pour des cellules entières, le protocole d'immunomarquage est le même. La préparation est incubée 5 min dans du PBS puis 10 min dans du PBS-Triton X-100 à 0,1%. Après une étape de blocage dans du PBS-BSA 2%, la préparation est incubée avec l'anticorps primaire dans du PBS-BSA 1% pendant 1h30. Les conditions d'utilisation des anticorps sont détaillées dans le Tableau II.4-1. Au bout du temps imparti, la préparation est rincée trois fois dans du PBS puis incubée

avec l'anticorps secondaire pendant 1h. La préparation est finalement rincée trois fois dans du PBS avant d'être colorée au bleu Evans. Des témoins négatifs sont réalisés en incubant avec l'anticorps secondaire en absence d'anticorps primaire

AnticorpsI		Anticorps secondaire	
Dénomination (<i>provenance</i>)	Dilution	Dénomination	Dilution
Anti SERCA3a humain (<i>Jocelyne ENOUF (INSERM, Paris)</i>)	1/50	Anti lapin	1/50
PL/IM (anti SERCA3) (<i>Jocelyne ENOUF (INSERM, Paris)</i>)	1/50	Anti souris	1/50

Tableau II.4-1 : Conditions d'utilisation des anticorps en immunocytochimie.

Les préparations sont ensuite observées avec un microscope à fluorescence standard ou confocal.

II.5 Cristallographie :

Toutes les manipulations visant à l'obtention et à l'observation de cristaux de protéines ont été réalisées dans l'équipe de Poul NISSEN, en collaboration avec l'équipe de Jesper MØLLER (Université d'Aarhus, Danemark). Le but de ce paragraphe est de décrire dans les grandes lignes le principe de la cristallographie 3D des protéines puis de présenter les expériences de préparation du cristal auxquelles j'ai pu prendre part directement.

II.5.1 Principe de la détermination de la structure 3D de protéines par cristallographie aux rayons X.

L'obtention de cristaux constitue la première étape, souvent limitante, de la détermination de la structure 3D de protéines par cristallographie aux rayons X.

a) Obtention de cristaux de protéines

Un cristal est un arrangement ordonné d'atomes, d'ions ou de molécules, répété de façon périodique dans les trois dimensions de l'espace.

La formation d'un cristal nécessite que la solubilité des molécules diminue au-delà de sa courbe de solubilité, sans toutefois tomber dans la zone de précipitation. Les molécules sont alors dans un état de sursaturation qui peut être favorable à l'obtention de cristaux. Pour atteindre cet état, il est donc nécessaire de diminuer la solubilité de la molécule en faisant varier les conditions dans lesquelles elle se trouve: évaporation du solvant, abaissement de la température, variation du pH ou de la force ionique...Le cristal croît en général autour d'un premier cristal microscopique qu'on nomme noyau de cristallisation. Sa formation est appelée nucléation.

Partir d'une solution initiale de protéines concentrée (autour de 10-20 mg.mL⁻¹) et la plus pure possible est indispensable pour mener à bien des essais de cristallisation.

Cette solution va être amenée à sursaturation en utilisant différents additifs, qui ont tous pour but de faire précipiter la protéine en captant les molécules d'eau disponibles : des sels (NaCH_3COOH , MgSO_4 ...), des agents précipitants (PEG 2000, PEG6000) ou des solvants organiques (t-butanol, MPD). L'interaction entre la solution de protéine et le mélange de cristallisation peut se réaliser de différentes manières, la plus utilisée étant la diffusion de vapeur (*cf.* Figure II.5-1). Dans ce système clos, deux compartiments liquides sont séparés par de la vapeur : une gouttelette, contenant la protéine en solution et un ou plusieurs agents précipitants, et un réservoir, renfermant les mêmes agents précipitants à une concentration plus élevée. La diffusion de vapeur à l'intérieur du système provoque un transfert d'eau de la goutte vers le réservoir. Ceci a pour conséquence d'augmenter la concentration de la protéine et la sort de sa zone de solubilité.

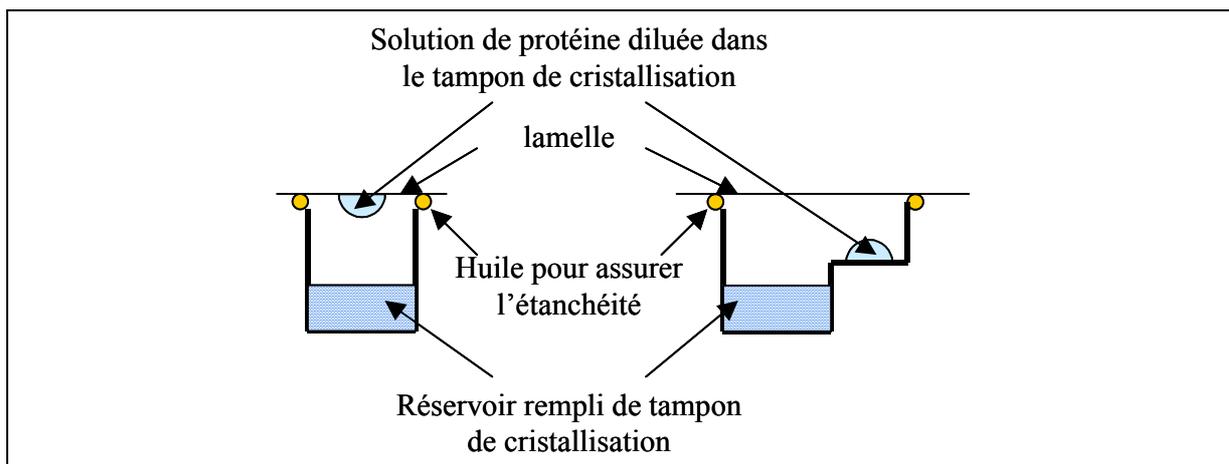


Figure II.5-1 : Présentation des deux méthodes permettant l'utilisation de la diffusion de vapeur pour les essais de cristallisation

A gauche : méthode « goutte suspendue » (« handing drop »), à droite, « goutte posée » (« sitting drop »)

b) Analyses des cristaux par diffraction des rayons X

Les cristaux obtenus peuvent être analysés grâce au phénomène de diffraction des rayons X. La plage de longueurs d'ondes correspondant aux rayons X va d'environ 100 Å jusqu'à 0,05 Å, valeurs qui sont de l'ordre de grandeur de la dimension des atomes et des distances interatomiques (quelques angströms).

Un atome irradié par des rayons X se comporte comme une source secondaire : il diffuse le rayonnement X. Si plus d'un atome est présent, les ondes diffusées entreront en interférence et les rayons X seront alors émis dans des directions privilégiées : c'est le phénomène de diffraction. Chaque onde diffractée peut être décrite par un paramètre complexe nommé facteur de structure. Si l'on arrive expérimentalement à mesurer les facteurs de structure d'un cristal, il est possible de calculer sa fonction de densité électronique, c'est à dire de répartir les électrons par unité de volume. A partir de cette carte, il est possible de proposer une image tridimensionnelle atomique de la protéine étudiée.

Un des paramètres importants de ces analyses est la résolution, à savoir la précision à laquelle un atome peut être positionné grâce aux données recueillies : plus la valeur de résolution est petite, plus elle se rapproche de la distance interatomique (1,5 Å), plus la résolution est bonne. Par exemple, 5.0 Å est assez mauvais pour une protéine, 2.5 Å permet de résoudre tous les atomes avec une bonne précision et 1.2 Å signifie une très bonne qualité permettant de discerner les H.

Les rayons X peuvent être obtenus soit dans des tubes à rayons X, soit grâce à un synchrotron. Les tubes à rayons X ont des limites: la lumière est émise dans toutes les directions, sans qu'il soit possible de la focaliser ou de rendre les rayons parallèles. De plus cette lumière est peu intense. Les rayons X obtenus grâce à un synchrotron sont fins et intenses, ce qui permet de collecter rapidement un nombre suffisant de données.

II.5.2 Préparation en vue de l'obtention de cristaux de SERCA.

Les fractions contenant SERCA obtenues après purification par HPLC sont regroupées et concentrées sur Centricon 30 environ 40 fois. La concentration en protéines est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm. L'échantillon est alors mis en présence de DOPC, de manière à ce que le ratio $C_{12}E_8$ /DOPC soit de 3/1 (m/m), de 10mM final de calcium et d'éventuellement 1mM d'AMP-PCP. La préparation est laissée à 4°C toute une nuit. Du $C_{12}E_8$ est éventuellement rajouté avec parcimonie si la préparation n'est pas limpide.

Avant de procéder aux essais de cristallisation, la préparation est centrifugée à 70000rpm dans le rotor TLA-1000 (125000 g_{av}) pendant 15 min afin d'ôter le matériel agrégé. Les expériences de cristallisation sont réalisées dans des plaques 24 puits (cf. Figure II.5-2) permettant la mise en place d'un système diffusion de vapeur en gouttelettes suspendues (cf. Figure II.5-1).

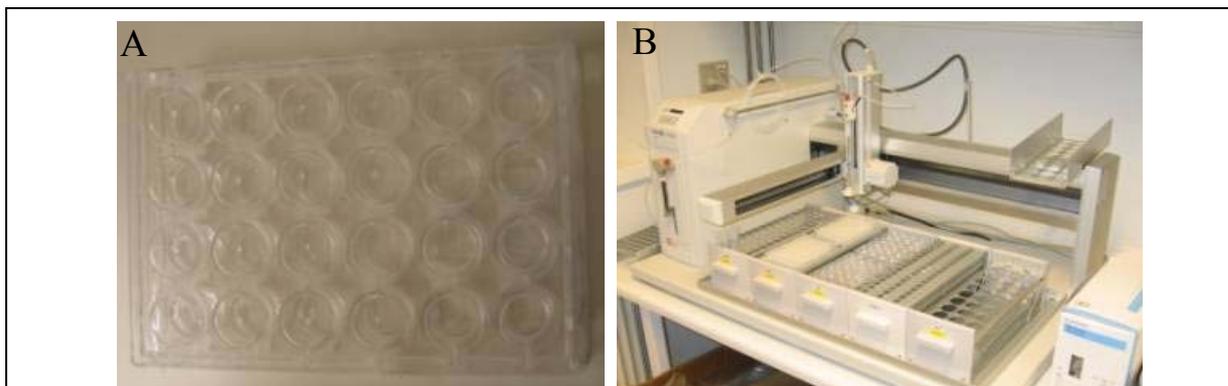


Figure II.5-2 Présentation du matériel utilisé pour la mise en œuvre des essais de cristallisation.

A-Photo d'une plaque multi-puits utilisée pour des essais de cristallisation avec la méthode « goutte suspendue » B-Robot 2T5 Liquid handler, GILSON

Les différents tampons de cristallisation sont préparés soit manuellement, soit à l'aide d'un robot (robot 2T5 Liquid handler, GILSON, cf. Figure II.5-2 B), contrôlé grâce au logiciel « 735 sample software ». 1 à 2 μ L d'échantillon sont mélangés au même volume de tampon de cristallisation sur une lamelle (« siliconized glass circle cover slides»). Cette lamelle est retournée sur un puits contenant 450 μ L de tampon de

crystallisation, l'étanchéité de l'ensemble étant assurée par de l'huile, type huile à immersion pour microscope. Les différentes conditions testées seront décrites dans la partie « Résultats et Discussions ». La plaque ainsi préparée est placée à 19°C et est observée grâce une loupe binoculaire tous les jours durant la première semaine, puis plus épisodiquement.

Le cas échéant, le cristal est traité puis analysé au synchrotron par des cristallographes (équipe de Poul NISSEN, voir Materials et methods de l'article II).

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1 Mise au point d'une nouvelle technique de purification de SERCA1a

Nous avons vu, dans l'introduction, l'intérêt de la mise au point de systèmes d'expressions hétérologues et de purifications. Je vais présenter dans cette partie la mise au point d'une nouvelle méthode de purification de SERCA1a. Elle se base sur l'utilisation du système avidine-biotine décrit dans la partie I.3.3.3 page 80. Pour la mise au point de cette technique, j'ai profité de l'expérience du laboratoire dans l'expression hétérologue de SERCA1 chez *S. cerevisiae*. Par ailleurs, j'ai pu comparer les propriétés de la protéine purifiée par ce système avidine, avec les propriétés de l'ATPase native présente dans les membranes de réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de lapin préparées par Philippe CHAMPEIL mais également avec l'ATPase SERCA1a purifiée par Guillaume LENOIR grâce au système « histidine » (Lenoir *et al.*, 2002). Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise (Article I) et a été la base de la réussite de la cristallisation de SERCA1a après expression hétérologue dans la levure, présentée dans la partie suivante et dans l'article II (Jidenko *et al.*, 2005).

Cette partie a pour but de compléter et de détailler les résultats présentés dans l'article I.

III.1.1 Insertion d'un domaine accepteur de biotine

La première étape de ce travail a consisté à l'insertion d'un domaine biotine (BAD : biotine acceptor domain), en partie C-terminale de la protéine SERCA insérée dans le vecteur YeDP60. Entre ces deux séquences a été insérée une séquence reconnue et coupée par la protéase thrombine. Cette construction est détaillée dans la partie « Materials and Methods » de l'article I.

III.1.2 Expression dans la levure *S. cerevisiae*

Après sélection d'un clone exprimant la protéine par mini expression (*cf.* II.2.1 page 105), celui-ci est mis en culture en milieu riche (II.2.2 page 106).

Au terme de la culture, les levures sont soumises à un fractionnement membranaire comme décrit dans la partie « Techniques utilisées ». Les résultats obtenus sont présentés dans l'article I.

Au cours de ma thèse, différents protocoles ont été testés. Nous avons comparé les résultats obtenus avec le protocole de fractionnement qualifié de simple et le protocole de fractionnement qualifié de complexe décrit dans l'article de Lenoir *et al.*, 2002 et présenté dans la partie « Techniques utilisées » (*cf.* paragraphe II.2.3 et Figure II.2-1) : en partant d'un même broyat total (BT), nous avons comparé la quantité de protéine de fusion SERCA-BAD présente dans les fractions membranaires dites lourdes (C2) et les fractions membranaires dites légères (C3). Les résultats obtenus sont présentés Figure III.1-1A. Aucun enrichissement en SERCA-BAD dans la fraction C3 utilisée par la suite ne nous est apparu notable lors de l'utilisation du fractionnement qualifié de complexe. Nous avons donc décidé que le fractionnement qualifié de simple était suffisant.

Par ailleurs, dans un premier temps, les levures étaient broyées par les billes de verre grâce à une agitation manuelle pendant 8 min. Un protocole recourant à l'agitation en incubateur (350 RPM pendant 18 min) a été introduit dans le laboratoire. Nous avons comparé la quantité de protéine de fusion SERCA-BAD présente dans les différentes fractions obtenues après broyage selon les deux protocoles en utilisant des levures provenant de la même culture. Les résultats obtenus sont présentés Figure III.1-1 B. Aucune différence notable n'est observée entre les deux protocoles. Nous avons donc opté pour l'agitation en incubateur, permettant d'envisager de broyer de plus importantes quantités de levures en même temps.

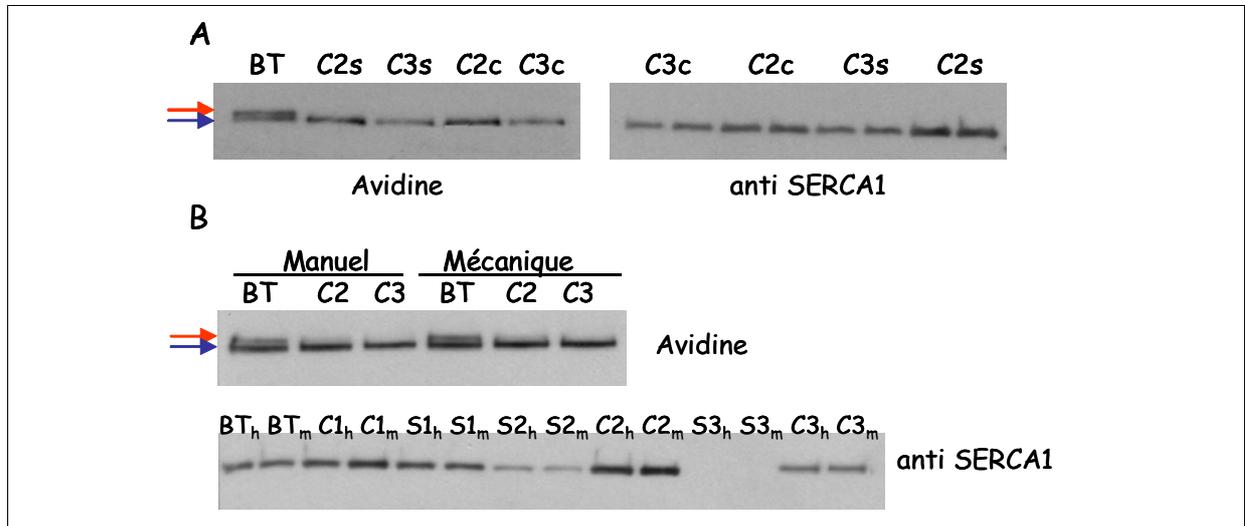


Figure III.1-1 Comparaison des résultats obtenus avec différents protocoles de fractionnement membranaire

A-Comparaison entre le protocole de fractionnement membranaire simple (s) et le protocole de fractionnement membranaire complexe (c). BT : 4 µg de protéines déposées, C2 et C3 : 1µg. B-Comparaison des fractions obtenues après un broyage par agitation manuelle ou un broyage par agitation en incubateur. 4µg de protéines déposées, excepté pour C2 et C3 : 2µg. h : agitation manuelle, m : agitation mécanique par l'incubateur

BT : Broyat total; C1 : levures entières, gros débris; C2 : fractions membranaires dites lourdes; C3-fractions membranaires dites légères; S1 à S3 : surnageant obtenu en préparant C1 à C3. → pyruvate carboxylase → SERCA-BAD.

III.1.3 Traitement des membranes avant passage sur colonne de chromatographie

III.1.3.1 Addition d'une étape de décapage

Avant l'étape de solubilisation, Lenoir *et al.*, 2002 ont introduit une étape qualifiée de décapage membranaire : ils montrent que l'incubation des membranes C3 avec un tampon KCl 0.72M permet l'élimination de 60% de protéines, avec une perte de seulement 5% de SERCA.

J'ai testé le protocole décrit dans cet article. Les résultats obtenus avec ou sans cette étape de décapage sont présentés Figure III.1-2.

L'étape de décapage permet d'éliminer environ 50% des protéines totales présentes dans la fraction membranaire (*cf.* puits « surnageant éliminé », gel de droite) avant solubilisation. Toutefois, l'analyse des éluats obtenus après chromatographie d'affinité sur colonne avidine (*cf.* gel en bas de la Figure III.1-2), indique que le rendement global de la purification est diminué. Un léger profit vis à vis de la pureté pourrait être mis en avant, mais la faible concentration en protéine de l'échantillon ne permet pas de l'affirmer. D'après l'analyse en SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, une des raisons expliquant qu'il n'y ait pas un gain significatif vis à vis de la pureté pourrait être qu'une partie des protéines éliminées par le décapage sont, dans la procédure sans décapage, éliminées à l'étape de lavage « Haut sel » (comparer les puits « lavage Haut sel » dans la Figure III.1-2). Les analyses par western blot m'ont permis de suspecter différentes causes pouvant être à l'origine de la baisse de rendement lors de l'addition de l'étape de décapage : légère perte au moment du décapage, moins bon rendement de solubilisation. Le possible gain en pureté ne m'est pas apparu suffisant pour explorer ce protocole plus en profondeur. J'ai donc décidé de ne pas intégrer cette étape dans le protocole de purification « avidine »

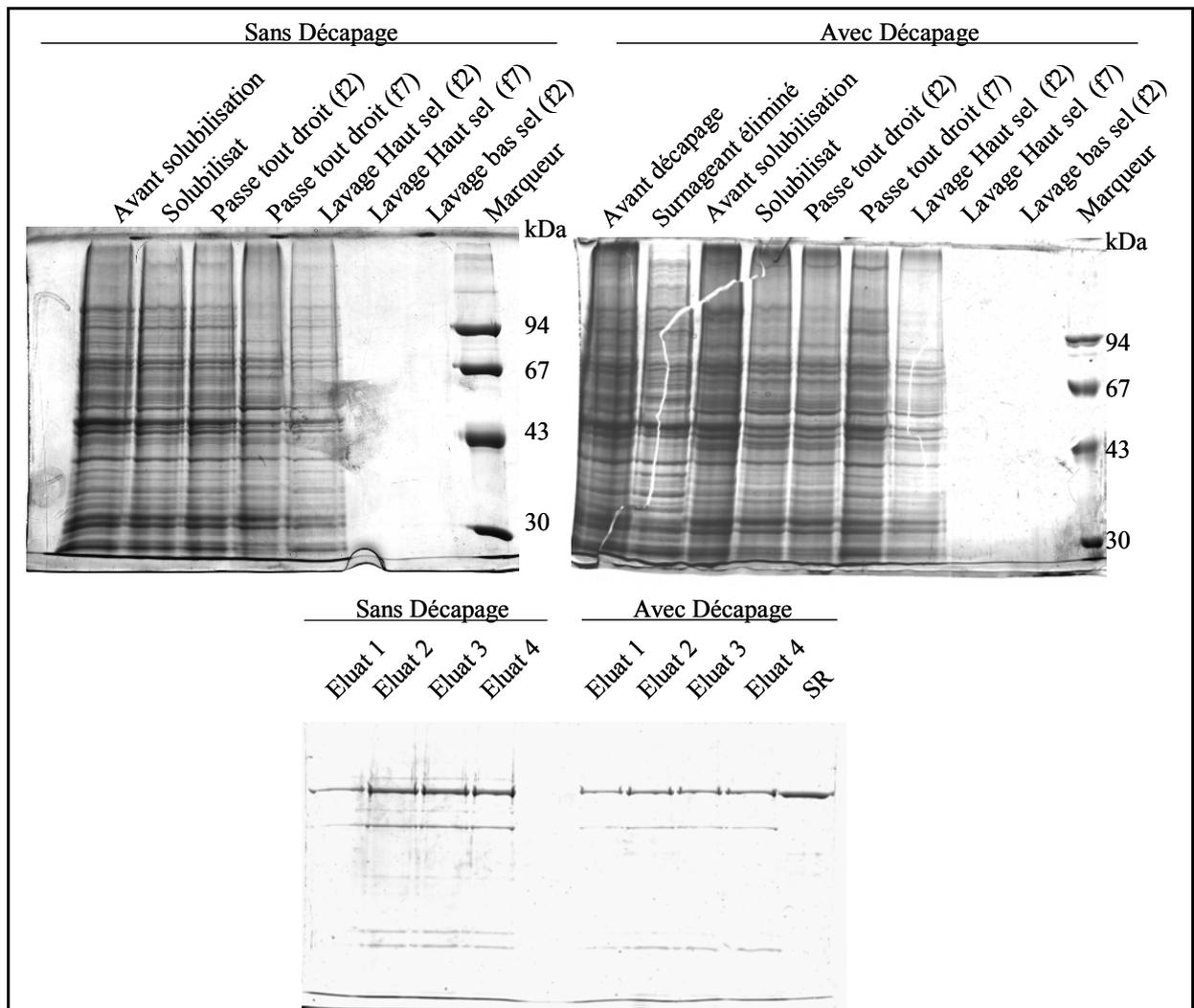


Figure III.1-2 Analyse par SDS-PAGE de l'influence de l'ajout d'une étape préalable de décapage membranaire sur la purification.

Pour les deux conditions, 5 mL de fractions membranaires C3 d'une même préparation sont utilisés (soit environ 100 mg de protéines, correspondant à 0.5mL de culture). Exceptée pour l'étape de décapage, les deux purifications sont réalisées en parallèle. 10 μ L de certaines fractions sont déposés sur gel. Après migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie.

III.1.3.2 Solubilisation

La détermination du choix du détergent ainsi que du meilleur rapport détergent/protéines a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire. Nous solubilisons la protéine avec du DDM dans un rapport 3/1 (g détergent /g protéine). Dans un premier temps, la solubilisation était réalisée dans les mêmes conditions que pour la purification de SERCA-6His (cf. Lenoir *et al.*, 2002), à savoir 45 min à 10°C , dans un tampon à pH 8. Maité PATERNOSTRE nous a alors suggéré de tester une cinétique de solubilisation. Les résultats présentés sur la Figure III.1-3 , montrent que pour optimiser la solubilisation dans ces conditions, il est préférable de solubiliser la fraction membranaire pendant 6h.

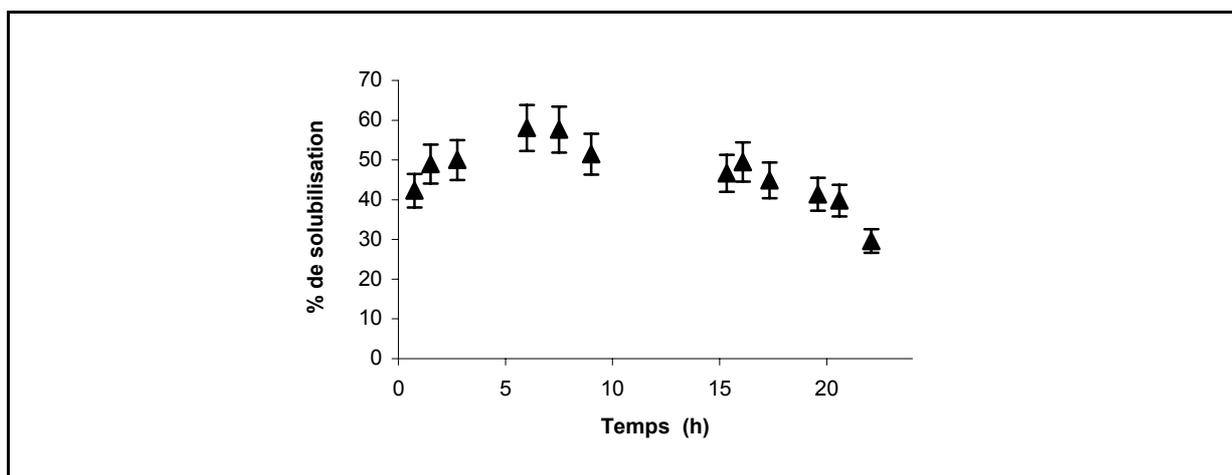


Figure III.1-3 Cinétique de solubilisation des membranes C3 par le DDM à pH 8 et 4°C

A t=0, les membranes C3 sont diluées dans le tampon de solubilisation en présence de détergent et le tout est soumis à une légère agitation (cf. chapitre « Techniques utilisées, paragraphe II.2.4 page 109). Aux temps indiqués, un aliquot est prélevé et centrifugé à 200 000g. Le surnageant est conservé et analysé par western blot. Le pourcentage de solubilisation est estimé par rapport à la quantité totale de SERCA présente dans les membranes diluées à t=0. L'erreur est estimée arbitrairement à 10%.

Dans un deuxième temps, Philippe CHAMPEIL nous a conseillé de tester la solubilisation à pH 7 et à température ambiante, la protéine SERCA semblant s'inactiver moins rapidement dans ces conditions (Champeil *et al.*, 2000). Nous avons réalisé une nouvelle cinétique dans ces conditions : il nous est apparu qu'à température ambiante, une solubilisation durant 2h donnait les meilleurs résultats (non montré).

III.1.4 Purification grâce à une chromatographie d'affinité

Pour cette purification, nous utilisons la forte interaction avidine -biotine (*cf.* paragraphe I.3.3.3 page 80). Comme pour les paragraphes précédents, le protocole final, ainsi que les résultats qu'il permet d'obtenir sont présentés dans l'article I. Je vais décrire ici les diverses conditions que nous avons pu tester à chaque étape.

III.1.4.1 Fixation sur la résine

a) Incubation du solubilisé avec la résine

La résine est mise en contact avec le produit de solubilisation et le tout est soumis à une faible agitation à 4°C. Selon le protocole décrit dans l'article, cette agitation se déroule sur la nuit. Toutefois, il m'est arrivé de réaliser l'ensemble de la purification sur une seule journée. Dans ce cas, le solubilisé est mis en contact avec la résine uniquement pendant 45 min. Je n'ai alors détecté aucune augmentation notable de la quantité de SERCA présente dans le « passe tout droit », signe que la fixation n'était pas drastiquement diminuée.

J'ai testé un protocole évitant de passer tout le volume du mélange « résine-solubilisé » pour former la colonne de résine. Après avoir incubé la résine avec le solubilisé, l'agitation est coupée afin de laisser la résine se décanter. Les trois quarts du surnageant sont alors mis de côté, et la colonne de résine est formée avec la suspension restante. Le 1^{er} PTD ainsi obtenu est mélangé au solubilisé restant et le tout est déposé sur la résine. Une perte significative dans le « passe tout droit » n'a pas été notée. [HABETS4]

b) Utilisation d'une résine régénérée

La résine utilisée (SoftLink Avidin Resin, Promega) est chère (~90 € / mL) mais peut être régénérée. Pour cela, j'ai suivi les instructions du fournisseur (10% d'acide acétique puis lavage avec 100mM NaPO₄ pH 7). L'impact de la régénération est visible sur la Figure III.1-4. Comme le montre cette figure, l'élimination de l'ATPase n'est pas totale, une partie des protéines biotinylées sont donc irréversiblement fixées. La résine régénérée sera donc préférentiellement utilisée pour purifier la même protéine, c'est-à-dire soit la protéine sauvage, soit le mutant E309Q.

La Figure III.1-4B montre l'analyse par western blot de deux purifications menées en parallèle utilisant soit de la résine neuve, soit de la résine régénérée. Pour prendre en compte que certains sites de fixation de la biotine ne sont plus disponibles après régénération, j'ai décidé arbitrairement d'augmenter de 1,5 à 2 [HABETS5]fois la quantité de résine utilisée. Dans ces conditions, les résultats présentés Figure III.1-4 montrent qu'il est possible de purifier la protéine SERCA1a en utilisant la résine régénérée, avec un rendement similaire à ce qui est obtenu avec la résine neuve. Il est donc possible d'utiliser la résine au moins une deuxième fois après régénération, ce qui n'est pas négligeable étant donné son coût.

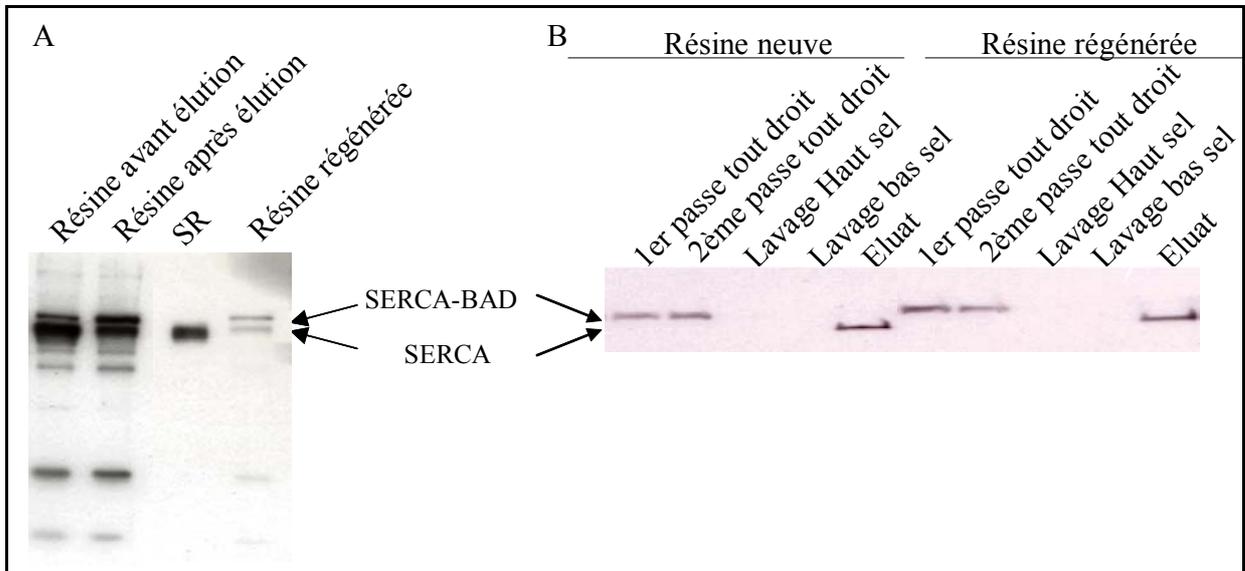


Figure III.1-4 Régénération de la résine de chromatographie

A-Effet de l'étape de régénération : Analyse par western blot de la résine avant élution, après élution et après régénération (anticorps anti-SERCA1). La même quantité de résine est déposée dans chaque puits. B-Analyse par western blot (anticorps anti-SERCA1) de deux purifications de SERCA1a wt utilisant soit de la résine neuve, soit de la résine régénérée : après l'étape de solubilisation, le surnageant (solubilisat) a été séparé en deux volumes égaux et chargé soit sur la résine neuve soit sur la résine régénérée. 10 μ L de « Passe tout droit » et 2 μ L d'éluats sont déposés sur gel.

III.1.4.2 Elution

Avant l'étape d'éluion, la résine est lavée. Le premier lavage sert à éliminer les protéines fixées non spécifiquement sur la résine. Le deuxième lavage sert à rééquilibrer la résine afin d'être dans de bonnes conditions pour l'éluion.

a) Elution avec un tampon biotine

Etant donné le protocole utilisé par les autres équipes employant le système « avidine biotine » (cf. chapitre « Introduction », paragraphe I.3.3.3 page 80), les premiers essais d'éluion ont été réalisés avec un tampon biotine (contenant 5 mM de D-biotine). Comme le montre la Figure III.1-5, l'éluion est peu efficace. Cette éluion a très vite été abandonnée au profit d'une éluion après action de la thrombine.

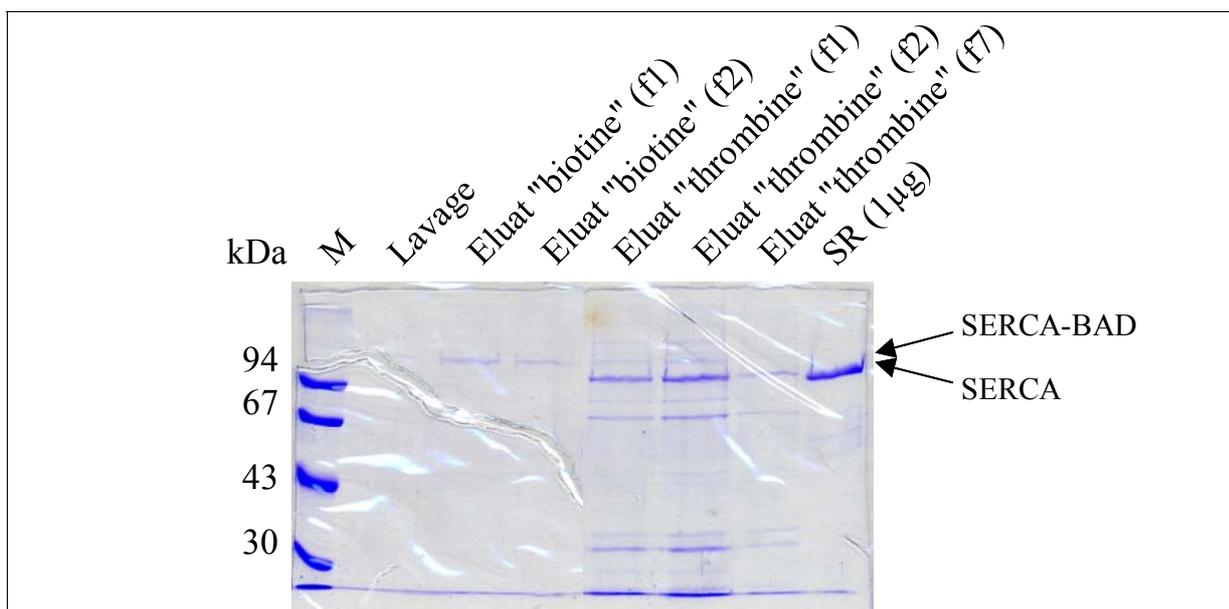


Figure III.1-5 Essais d'éluion avec 5 mM de biotine

Les éluats « biotine » sont obtenus grâce à une éluion avec un tampon 5mM biotine. Les éluats « thrombine » sont obtenus après action de la thrombine sur la résine, une fois l'éluion biotine réalisée. Notons que le protocole d'action de la thrombine n'était pas encore optimisé au moment de la réalisation de cette expérience. 10µL d'éluats sont déposés sur le gel.

b) Elution après coupure par la thrombine

Différentes conditions de coupure ont été testées.

J'ai testé différentes quantités de thrombine: de trop fortes quantités de thrombine (20 unités par mL de membranes) semblent augmenter le rendement de coupure mais diminuent la pureté des fractions éluées (comparer les puits Eluat « thrombine » de la partie gauche (4U de thrombine utilisée par mL de membranes) ou droite (20U de thrombine par mL de membranes) du gel de la Figure III.1-6A). Une partie des contaminations est en effet due à la solution de thrombine elle-même (cf. bandes contaminantes de masses moléculaires inférieures à 37kDa sur la Figure III.1-5 et comparer les puits « Eluat thrombine » pour les différentes quantités de thrombine utilisées sur la Figure III.1-6A).

La durée d'incubation de la résine avec la thrombine a également une importance : il a semblé qu'il était préférable d'incuber la résine avec la thrombine pendant 1h : au bout de 30 min la quantité de protéine de fusion protéolysée ne semblait pas avoir atteint son maximum, et une incubation d'1h30 ne semblait pas produire une quantité de protéines de fusion protéolysées significativement supérieure à celle obtenue au bout d'1h (non montré). En tenant compte que la thrombine pouvait s'auto-protéolyser, nous avons finalement opté pour un ajout séquentiel : La Figure III.1-6B montre que le deuxième ajout de thrombine permet d'augmenter la quantité de protéine de fusion SERCA-BAD protéolysée mais les ajouts suivants ne semblent pas augmenter beaucoup le pourcentage de protéine de fusion coupée.

Dernièrement, il est apparu que remplacer le NaCl (150mM) par du KCl (50mM) dans le tampon favorisait la protéolyse de la protéine de fusion. L'expérience m'a montré qu'il était aussi important de limiter la dilution de la thrombine. J'essaie donc de suspendre la résine dans un volume final correspondant environ à 1,5 fois le volume de résine.

Notons enfin que les conditions d'élution ne permettent pas de récupérer toutes les protéines SERCAs, puisque la bande correspondante est observable dans le puits « Résine après élution ». Toutefois, le rapport entre l'intensité de la bande

correspondant à SERCA et la bande correspondant à SERCA-BAD a nettement diminué, signe qu'une majorité de la protéine débarrassée de son étiquette a été éluée.

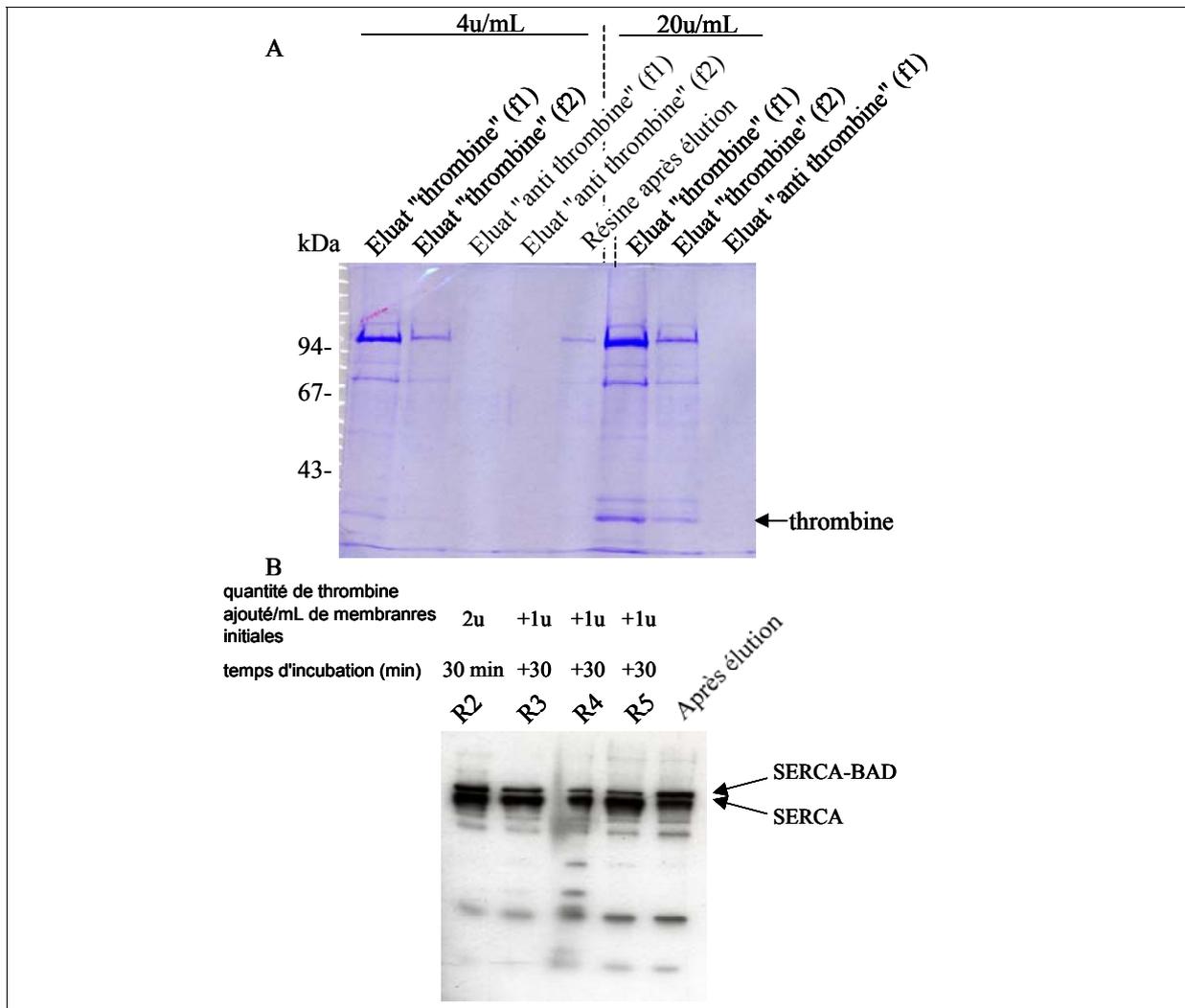


Figure III.1-6 Optimisation de l'étape de coupure par la thrombine

A- Analyse de la coupure par deux quantités différentes de thrombines : Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Après action de la thrombine, soit la protéine est éluée directement (Eluat « thrombine ») soit de la résine anti thrombine est ajoutée avant élution (Eluat « anti thrombine »). (10µL de fractions déposées). 5µL de résine après addition de résine anti thrombine et élution sont également déposés (Résine « anti thrombine ») B-Ajout séquentiel de thrombine. Analyse par western blot (anticorps anti-SERCA1) de la résine au terme du temps d'incubation indiqué. 5µL de résine en suspension déposés.

c) Utilisation d'une résine anti-thrombine

Sur la Figure III.1-6 A, il est visible que la thrombine en elle-même est un important contaminant de la fraction purifiée. Il existe sur le marché des résines anti thrombine. J'ai espéré pouvoir éliminer la thrombine grâce à l'utilisation d'une de ces résines, la Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia). Pour cela, après action de la thrombine, j'ai ajouté 2 mM de PMSF ou 50 μ L de Benzamidine Sepharose à 0,4 mL de résine avidine. Comme le montre les puits «Eluats anti thrombine» de la Figure III.1-6 A, je ne suis pas arrivée à éluer SERCA dans ces conditions, la protéine restant accrochée à la résine (cf. puits « Résine après élution »).

III.1.4.3 Propriétés de l'ATPase purifiée

Nous avons voulu vérifier que la protéine purifiée conserve de bonnes propriétés biochimiques. Un des avantages de mettre au point la purification sur l'isoforme SERCA1a de lapin était de pouvoir comparer les propriétés biochimiques de la protéine purifiée à celles de l'ATPase native présente dans les membranes du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de lapin.

a) Activité ATPasique

Une propriété facilement analysable est l'hydrolyse de l'ATP. Le système des enzymes couplées décrit Figure II.3-1 (cf. chapitre « Techniques utilisées » page 117) permet de mesurer l'activité ATPasique directement en sortie de colonne de purification, sans avoir besoin de reconstituer l'enzyme. De plus, chaque mesure avec ce système consomme peu de matériel (100 μ L de fractions purifiées suffisent pour effectuer ce type de mesure).

La pente observée sur le graphique, correspondant à la disparition du NADH est convertie en quantité d'ATP hydrolysée comme détaillé dans la partie « Techniques utilisées ». Afin de pouvoir convertir l'hydrolyse d'ATP en activité spécifique, la quantité de SERCA dans l'échantillon est estimée par comparaison à une gamme de SR, soit d'après un gel SDS-PAGE colorée en bleu de Coomassie, soit d'après un western blot

déte  t   avec l'anticorps anti-SERCA1 (cf. Figure III.1-7). Dans les deux cas, la concentration en protéines totales du SR est connue et il a été pris comme référence que, dans cette préparation, SERCA1a était pure à 70%. Les résultats obtenus sont similaires à ceux montrés sur la figure 5 de l'article I.

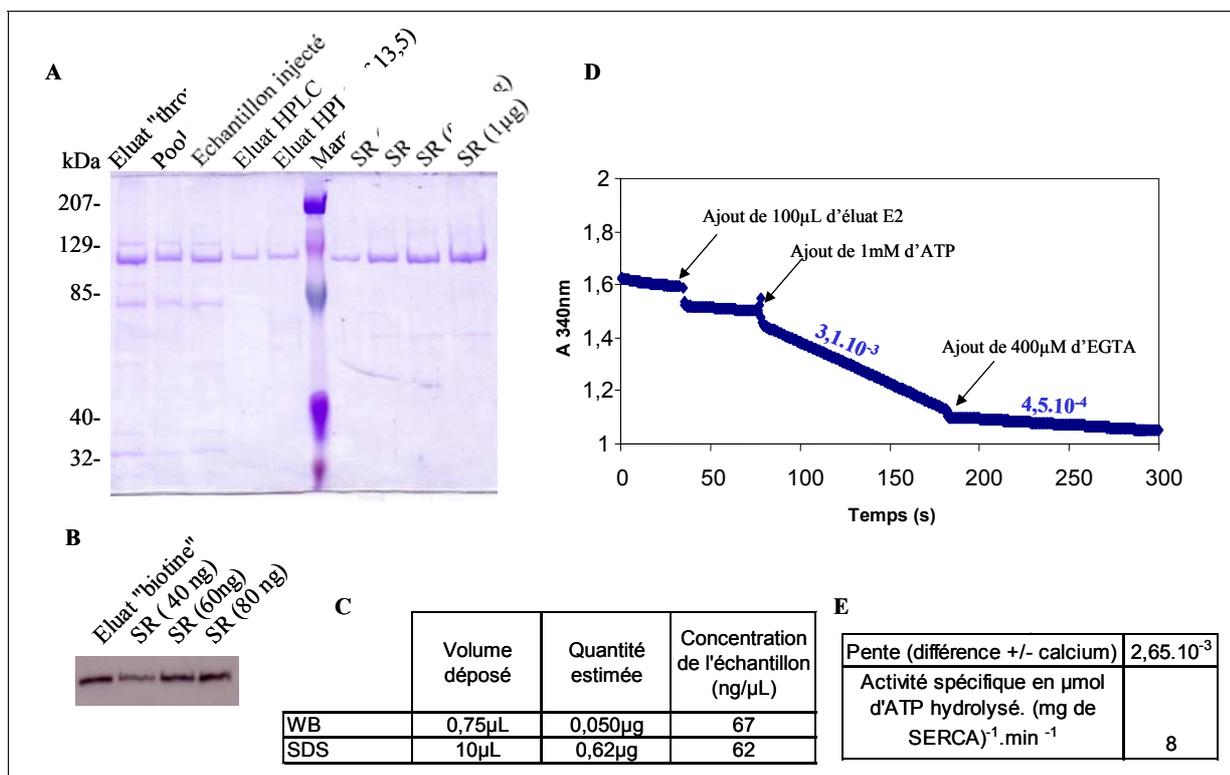


Figure III.1-7 Estimation de l'activité spécifique d'un éluat « thrombine »

A-Analyse par gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de différentes fractions de purification et quantification grâce à une gamme de SR. B- Quantification de l'éluat « thrombine » grâce à une gamme de SR en western blot (Anticorps anti-SERCA1). Pour A et B, les valeurs indiquées entre parenthèses pour le SR correspondent à la quantité totale de protéines déposées C- Concentration de l'éluat « thrombine » estimée d'après le gel A et le western blot B. Pour les estimations en quantité de SERCA, on considère que le SR est pur à 70%. D- Activité ATPasique de 100  L de l'éluat « thrombine »    30  C, en présence de 100  M Ca^{2+} et de $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de C_{12}E_8 ; tracé brut obtenu lors de la mesure de l'hydrolyse de l'ATP grâce au système d'enzymes couplées. E-Estimation de l'activité ATPasique spécifique. A 30  C, en présence de 100  M Ca^{2+} et de $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de C_{12}E_8 , l'activité spécifique de SR est voisine de $12 \mu\text{mol d'ATP hydrolysé. (mg de SERCA)}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

b) Reconstitution

Après purification de l'ATPase SERCA purifiée par la méthode « histidine », Guillaume Lenoir et ses collaborateurs ajoutent un mélange de liposomes EYPC:EYPA à 1 mg.mL^{-1} calibré à l'aide d'une membrane de polycarbonate, avant d'éliminer le détergent par action de Biobeads (voir Lenoir *et al.*, 2002 et chapitre « Techniques utilisées » paragraphe II.3.4.1 page 115). Cette méthode peut être considérée comme une reconstitution, étant donné que la protéine se retrouve en présence de lipides et en absence de détergent. Toutefois, cette méthode ne permet pas la mesure de transport de calcium, car elle n'entraîne pas la formation de vésicules étanches (Lenoir, 2003).

L'équipe de Jesper Møller maîtrise une technique de reconstitution de l'ATPase native du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de lapin (*cf.* Heegaard *et al.*, 1990). Dans leur laboratoire, j'ai appliqué avec eux cette méthode à l'ATPase purifiée à partir de la levure ainsi que sur l'ATPase du SR, solubilisée par du $C_{12}E_8$. Le protocole suivi est décrit dans la partie « Techniques utilisées » (*cf.* paragraphe II.3.4.2 page 115). Dans les expériences menées par Heegaard *et al.*, (1990), le rapport protéines/lipides utilisé est de 1/100 (g/g). Nous avons fait le choix de ne pas modifier le protocole d'obtention des liposomes alors que nous ajoutons une quantité moindre de protéines. De ce fait, nous nous trouvons dans un rapport protéines/ lipides d'environ 1/700. Afin de ne pas diluer outre mesure les lipides, l'échantillon élué de la colonne d'avidine est préalablement concentré sur Centricon-30.

La Figure III.1-8 montre l'analyse des vésicules ainsi formées par microscopie électronique après cryofracture (travail de l'équipe de Jean-Marc Verbavatz). Les préparations de liposomes formés en présence de SERCA solubilisée à partir du réticulum sarcoplasmique ou de SERCA purifiée sont similaires. Ces deux préparations contiennent des vésicules closes, ayant entre 100 et 700 nm de diamètre. Quelques vésicules sont multilamellaires (non montré).

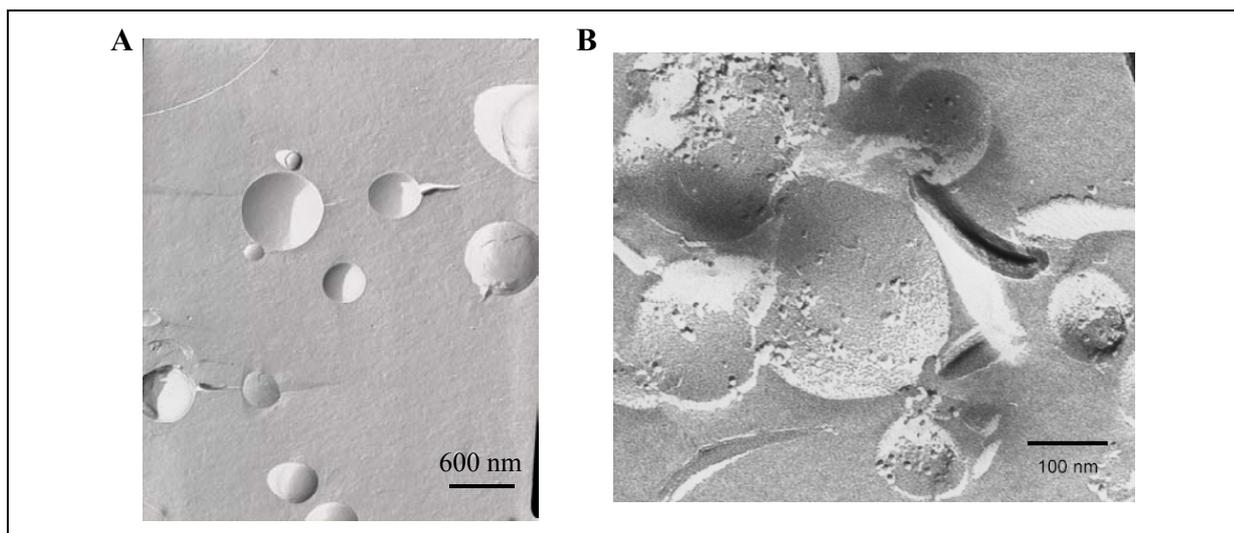


Figure III.1-8 Observation au microscope électronique après cryofracture d'une préparation de vésicules de DOPC (A) ou de EYPC/EYPA (B) contenant SERCA1a purifiée après cryofracture (Images réalisées par l'équipe de Jean-Marc Verbavatz)

A-Vésicules de DOPC renfermant SERCA1a purifiée par la méthode « biotine » B-Vésicules EYPC/EYPA renfermant SERCA1a-His purifiée (extrait de Lenoir, 2003).

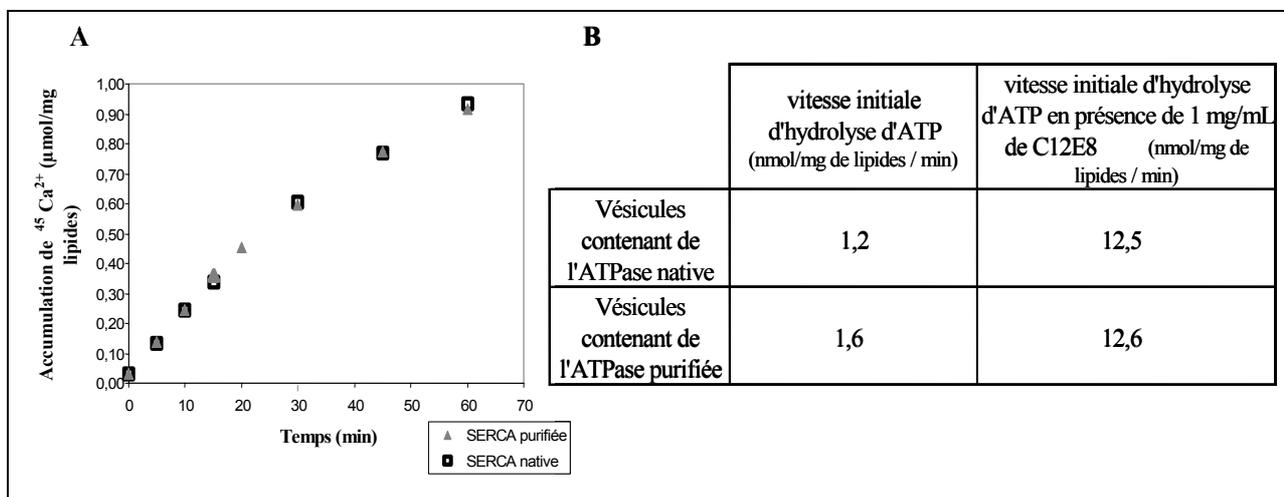


Figure III.1-9 Transport de calcium et hydrolyse d'ATP par SERCA1a purifiée et reconstituée en liposomes de DOPC

A-Mesure de l'accumulation de calcium dans les liposomes renfermant soit de l'ATPase native, soit de l'ATPase purifiée (mesure à 23°C en présence de 0.1mM de calcium). B-Activité ATPasique mesurée sur les mêmes vésicules (à 23°C en présence de 0.1mM de calcium).

La courbe de la Figure III.1-9A montre qu'il a été possible de mesurer le transport de calcium sur les vésicules ainsi formées, et que l'ATPase purifiée a une vitesse d'hydrolyse initiale et un maximum de transport similaire aux vésicules renfermant l'ATPase native, solubilisée à partir du SR et reconstituée dans les mêmes conditions. Cette similarité est retrouvée lors de mesure de l'activité d'hydrolyse d'ATP sur ces mêmes vésicules.

Les résultats présentés ici sont ceux obtenus lors des expériences réalisées dans le laboratoire de Jesper Møller. Les données sont ramenées à la quantité de lipides et non à la quantité de protéines : en effet, il est difficile d'estimer la quantité de protéines présentes dans les liposomes. Notamment, il n'est pas possible de déposer les liposomes sur gel pour quantifier la quantité de SERCA comme sur la Figure III.1-7A et B. Par la suite, j'ai préféré considérer que la totalité des protéines SERCA que j'ajoute aux lipides se retrouve dans les vésicules. Cette estimation n'est pas forcément rigoureuse toutefois, elle permet de prendre en compte le fait que la quantité de SERCA ajoutée aux liposomes n'est pas strictement identique dans chaque reconstitution. Bien entendu, cette approche nécessite la quantification des protéines ajoutées aux lipides.

c) Conservation de l'enzyme

L'ATPase en sortie de colonne est active. Il peut être intéressant de pouvoir la conserver. Différentes conditions de conservation ont été testées : conservation dans 40% de glycérol, avec ou sans lipides, à -20°C ou -80°C. En présence de 40% de glycérol et stockées à -80°C, SERCA1a purifiée conserve au moins 80% de son activité pendant au moins 1mois.

Remarque : je n'ai pas effectué de test de conservation de l'ATPase reconstituée en liposomes de DOPC. En effet, la congélation fragilise les liposomes et les rend perméables, empêchant alors toute mesure d'accumulation de calcium. Sans congélation, il est possible d'observer du transport de calcium pendant au moins une semaine (communication personnelle de l'équipe de Jesper Møller).

III.1.5 Optimisation de la purification grâce à l'ajout d'une étape de chromatographie d'exclusion par la taille en HPLC

La pureté de l'échantillon après purification par la méthode «avidine» est principalement diminuée du fait de la présence de bandes bien distinctes, dont entre autres des bandes de contamination de plus faible poids moléculaire liées à la solution de thrombine (cf. Figure III.1-6). Il m'a donc semblé intéressant de déposer l'échantillon sur une colonne de gel filtration pour essayer d'augmenter la pureté de l'échantillon.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III.1-10.

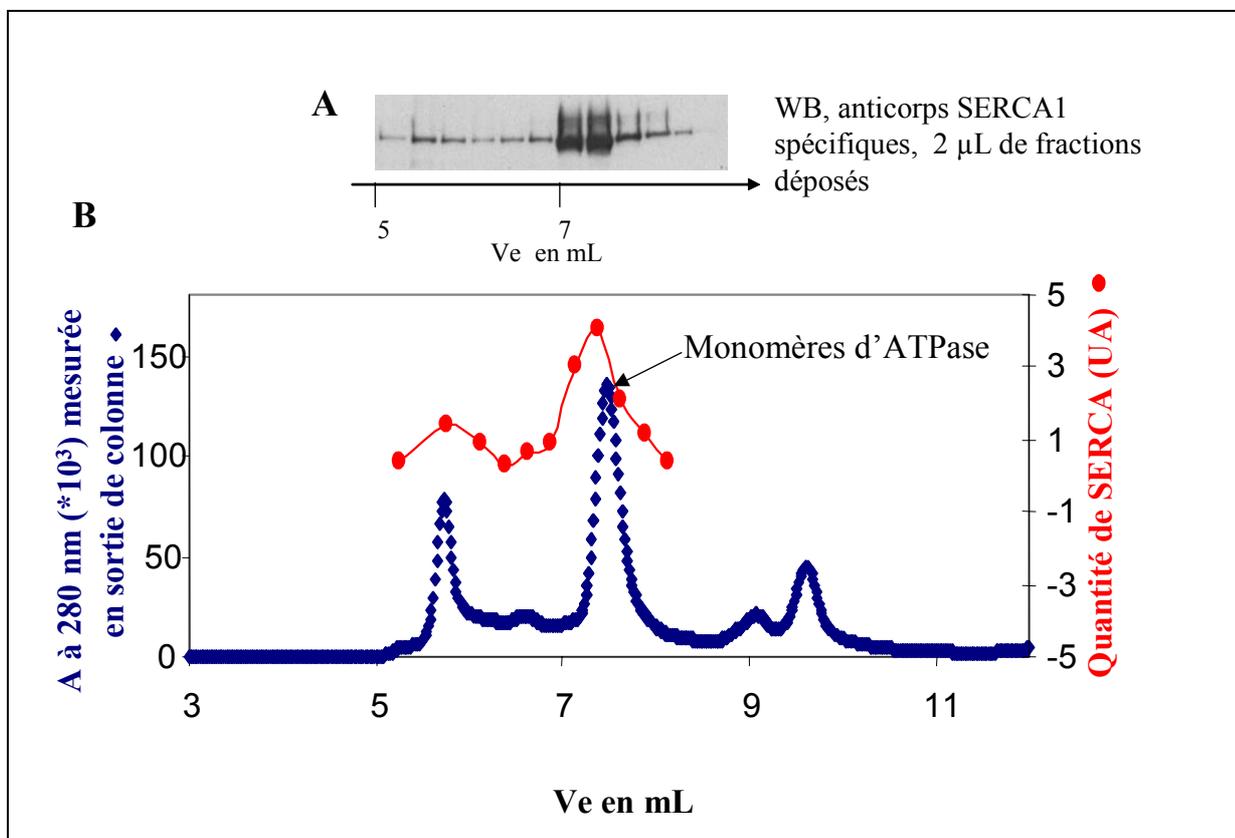


Figure III.1-10 Analyse de l'étape de purification par gel filtration.

A-Analyse par western blot (anticorps anti-SERCA1) des fractions recueillies après gel filtration. B-Chromatogramme de l'étape de gel filtration (tampon : 20mM Tes pH7 - 100mM KCl- 1mM MgCl₂- 0,5mM CaCl₂- 20% glycérol (v/v)-1mg/mL DDM. - Débit :1mL.min⁻¹).

Grâce à cette étape, nous obtenons un échantillon pur à plus de 70% (voir par exemple Figure III.1-7 ou figure 2 de l'article II). La pureté de l'échantillon contenant l'ATPase est certes un des objectifs que nous nous étions fixés, mais nous voulions aussi que la protéine reste active. Des mesures similaires à celles décrites dans le paragraphe III.1.4.3 ont été réalisées et ont montré qu'après l'étape de gel filtration, la protéine conservait les mêmes propriétés enzymatiques (voir articles I et II).

III.1.6 Comparaison par rapport à la purification « histidine »

Etant donné que nous avons au laboratoire deux méthodes de purification de la même protéine, il nous est apparu intéressant de comparer les propriétés de SERCA1a purifiée selon ces deux méthodes. Pour que les données concernant les deux échantillons soient comparables, après purification, nous les avons traités de la même manière, à savoir une « reconstitution » en EYPC :EYPA. Les trois échantillons (SERCA1a après colonne avidine, SERCA1a après colonne avidine et gel filtration et SERCA1a-6His après colonne de nickel) ont été quantifiés sur des mêmes gels (SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie ou western blot détecté par l'anticorps anti-SERCA1, cf. figure 5 de l'article I). Les propriétés des protéines purifiées ont été comparées grâce des mesures d'activité ATPasique et des mesures de fluorescence. Les résultats obtenus sont décrits dans l'article I. La protéine purifiée par la méthode « biotine » est plus active que la protéine purifiée par la méthode « histidine » : elle présente une activité ATPasique spécifique maximale d'environ 8 μmol d'ATP hydrolysé/mg de SERCA/min, comparativement à 3,5 pour la protéine SERCA-His testée dans les mêmes conditions. Cette différence en faveur de la protéine purifiée par la méthode « biotine » se retrouve lors des mesures de fluorescence. La protéine SERCA1a après colonne d'avidine et après gel filtration ont la même activité spécifique. Avec l'échantillon SERCA1a après colonne HPLC, les variations de fluorescence sont plus importantes, sans doute à cause de la plus grande pureté de l'échantillon.

III.1.7 Discussion:

Le Tableau III.1-1 rappelle les principaux résultats de cette nouvelle méthode de purification de SERCA1a.

Fraction	Ca ²⁺ ATPase (mg)	Vitesse maximale d'hydrolyse d'ATP ($\mu\text{mol ATP/mg Ca}^{2+}$ ATPase/min)	Rendement	SERCA/protéines totales (%)
C3	5	ND	100	1 à 3 %
Purifiée après colonne avidine	0,30 à 0,5	8-9	6 à 10	40 à 50 %
Purifiée après gel filtration	0,150 à 0,250	8-9	3 à 5	>70%

Tableau III.1-1 Bilan de la purification de SERCA1a par la méthode « biotine » (pour 1L de culture de levure).

L'étape de gel filtration permet d'augmenter la pureté à plus de 70% mais diminue considérablement le rendement de purification. Certaines mesures biochimiques ne nécessitent pas obligatoirement une aussi grande pureté, d'autant que l'échantillon après purification « avidine » ne semble pas être contaminé par d'autres ATPases. Ainsi pour des mesures telles que les mesures d'activités ATPasiques ou de transport de calcium, il me semble plus judicieux de s'arrêter après l'étape de purification sur colonne d'avidine, privilégiant ainsi la quantité de matériel disponible. Par contre, l'étape de gel filtration peut s'avérer utile si l'on aborde des techniques pour lesquelles la pureté de l'échantillon est importante. Ceci est vrai par exemple pour la mesure de fluorescence des tryptophanes, le rapport signal sur bruit étant augmenté avec la pureté de l'ATPase. La pureté est également un critère important pour des essais de cristallisation (voir partie suivante).

Nous avons vu dans l'introduction que trois autres purifications de SERCA après expression hétérologue avaient été publiées par Skerjanc *et al.* (1993); Miras *et al.* (2001); Lenoir *et al.* (2002). Les résultats obtenus sont rappelés dans le Tableau III.1-2.

Expression		Première étape de purification			Purification additionnelle			Références
hôte	rendement	système	rendement	pureté	système	rendement	pureté	
SF9	1-2% PM ¹ 3mg/L	Anticorps (+PL) ²	375µg/L	< 30% ³	-	-	-	Skerjanc <i>et al.</i> , 1993
SF9	6% PM (mais 1/3 d'active) 6 mg/L	His (+PL)	0 (trop peu de fixation)		-	-	-	Miras <i>et al.</i> , 2001
		Red 120 (+PL)	2 mg/L	26% ³				
<i>S.cerevisiae</i>	2% PMdans C3 5.5mg/L	His (+PL)	1 mg/L de culture	50-60% ³	Red 120	0.28mg/L de culture	70% ³	Lenoir <i>et al.</i> , 2002

Tableau III.1-2 Rappel des résultats obtenus par d'autres auteurs pour la purification de SERCA1a de lapin exprimée de manière hétérologue

1-% PM : pourcentage de SERCA par rapport aux protéines membranaires. 2-(+PL) : addition de phospholipides. 3-Estimation des auteurs.

Par rapport aux résultats obtenus par Skerjanc *et al.* (1993); Miras *et al.* (2001); Lenoir *et al.* (2002), la méthode décrite ici présente l'avantage d'obtenir une pureté de l'ordre de 50%. Toutefois, d'un point de vue quantitatif, après l'étape sur colonne d'avidine, cette méthode présente un rendement moindre par rapport à ceux décrits dans ces travaux. Le plus faible rendement de purification, alors que le niveau d'expression dans les membranes était similaire (1% du C3), est probablement due en grande partie à l'étape de protéolyse par la thrombine qui reste incomplète. Le déroulement de cette étape dans un tampon KCl devrait permettre d'augmenter le rendement.

Un des avantages de cette méthode pour la purification de SERCA1a par rapport à la méthode « étiquette 6His + colonne de nickel » de Lenoir *et al.* (2002) est l'activité spécifique de l'ATPase après purification. Une hypothèse que nous formulons est que l'étape de biotinylation sélectionne des protéines de fusion dont le domaine accepteur de biotine est correctement conformé et que cette bonne conformation du domaine est un gage de bon repliement de la protéine SERCA en elle-même. Une autre hypothèse pourrait être que les conditions de purification sur colonne de biotine dénaturent moins SERCA1a que les conditions utilisées pour la colonne de nickel. La différence observée entre la méthode « avidine » et la méthode « histidine » pour SERCA1a ne se retrouvera pas obligatoirement pour d'autres protéines. Ainsi, pour purifier le transporteur de citrate de *K. pneumoniae* après son expression hétérologue dans *E. coli*, Pos *et al.*, (1994) ont utilisé une stratégie « résine d'avidine avec élution par un tampon biotine » ou une stratégie « colonne de nickel ». Ils n'ont pas observé de différence d'activité entre les deux préparations.

L'étape supplémentaire de gel filtration permet d'atteindre une pureté que nous estimons supérieure à 70%, ce qui n'avait jamais été décrit pour SERCA1a exprimée de manière hétérologue. Après leur étape en Reactive Red, Lenoir *et al.* (2002) obtenaient une pureté voisine de 70%. Par ailleurs, ils montraient que SERCA1a ainsi purifiée avait une activité spécifique nettement meilleure que celle purifiée uniquement sur colonne de nickel. L'étape sur Red 120 leur permettait donc d'enrichir leur préparation en protéines actives. Par la suite, les auteurs ont choisi d'abandonner cette étape de purification, jugeant la perte en rendement trop importante (Lenoir, 2003).

La pureté de l'échantillon que nous obtenons après gel filtration a permis d'envisager des études de cristallisation, qui sont présentées dans la partie suivante et dans l'article II.

III.2 Essais de cristallisation sur l'ATPase sauvage purifiée et sur le mutant E309Q

Les résultats que nous avons obtenus avec l'ATPase sauvage ont fait l'objet d'une publication. (Jidenko *et al.*, 2005). Je présenterai ici les grandes lignes de la démarche que nous avons utilisée, ce qui me permettra d'introduire les essais de cristallisation du mutant E309Q.

III.2.1 Echange de détergent au cours de l'étape de purification par HPLC

Le détergent que nous utilisons pour solubiliser l'ATPase et qui est conservé dans les tampons de purification est le DDM (*cf.* II.2.6 page 110). Pour se rapprocher des conditions avec lesquelles les cristaux, puis les structures de l'ATPase native ont été obtenus par les équipes de Jesper Møller et Poul Nissen (Sørensen *et al.*, 2004), il a semblé préférable de leur proposer une ATPase en présence de $C_{12}E_8$. Nous avons donc modifié le tampon utilisé à l'étape « HPLC » en remplaçant le DDM par le $C_{12}E_8$. Nous avons voulu nous assurer que l'échange de détergent était effectif et complet. Pour cela, nous avons ajouté du DDM radioactif dans le tampon HPLC (voir plus de précisions dans la partie « Techniques utilisées », paragraphe II.3.3.2 page 114). La Figure III.2-1 montre que la radioactivité est détectée dans les fractions correspondant aux volumes d'élution 8,5mL à 14,5mL et que les fractions contenant SERCA correspondant aux volumes d'élution 6,75 mL à 8 mL ne contiennent pas de radioactivité. Les fractions contenant la protéine sont donc dépourvues de DDM : l'échange entre les deux détergents a bien eu lieu.

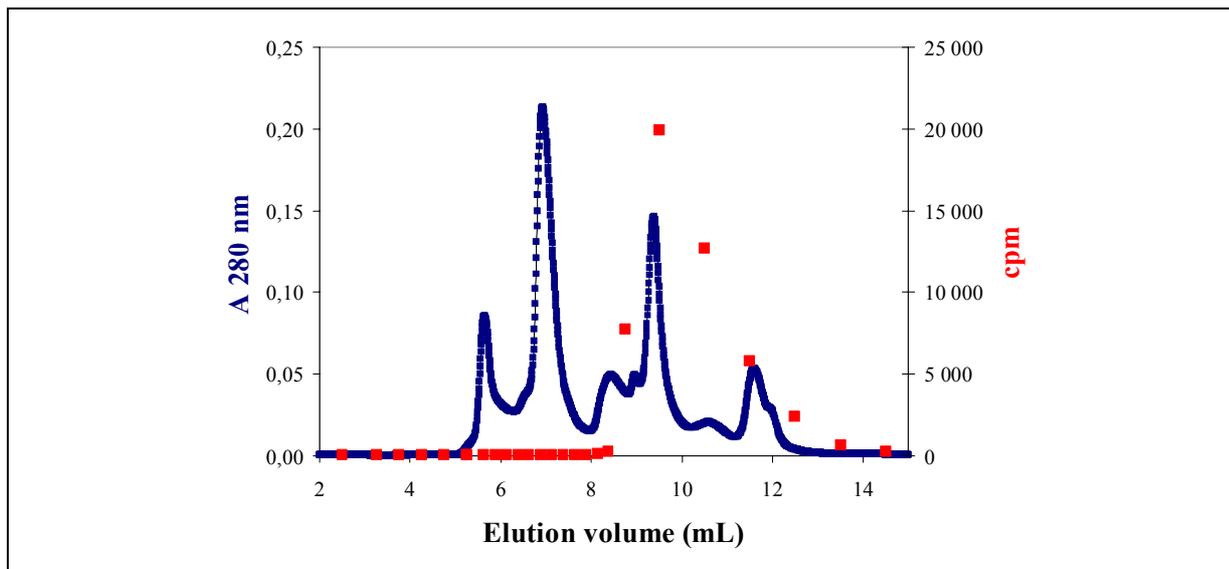


Figure III.2-1 : Gel filtration en HPLC de la protéine recombinante SERCA1a après une première étape de purification par chromatographie d'affinité - Détection de la présence de DDM dans les différentes fractions

Le DDM radioactif est ajouté à l'échantillon avant son injection. Le $C_{12}E_8$ est utilisé dans le tampon d'éluion de la filtration sur gel en HPLC (100mM MOPS pH6,8 - 80mM KCl- 1mM $MgCl_2$ - 1mM $CaCl_2$ - 20% glycérol (v/v)-0,5mg/mL $C_{12}E_8$). L'éluion a lieu sous un débit de 0,5 mL.min⁻¹.

III.2.2 Préparation de l'échantillon pour les essais de cristallisation

Les fractions contenant SERCA après l'étape de purification en HPLC sont regroupées et traitées comme indiqué dans le chapitre II. (cf. II.5.2 page 125). Pour déterminer la quantité de DOPC à ajouter, il nous faut définir la quantité de $C_{12}E_8$ présent dans notre échantillon concentré.

La méthode utilisée pour préparer l'ATPase sauvage a consisté à faire une approximation indirecte: dans l'échantillon non concentré regroupant les fractions HPLC, la concentration en micelles de $C_{12}E_8$ est de 0,45 mg.mL⁻¹ (cf. détail Figure III.2-2). Les micelles ne passent pas au travers de la membrane du centricon 30. Elles sont donc concentrées. Par ailleurs, du $C_{12}E_8$ est lié à la protéine. Pour SERCA, il est admis que 2 mg de protéine lie 1 mg de $C_{12}E_8$ (Møller et le Maire, 1993). Ce $C_{12}E_8$ lié se concentre au même titre que les protéines.

A						
$[C_{12}E_8]_{\text{tot}} = [C_{12}E_8]_{\text{micellaire}} + [C_{12}E_8]_{\text{monomère}} + [C_{12}E_8]_{\text{lié aux protéines}}$				avec $CMC_{C_{12}E_8} = [C_{12}E_8]_{\text{libre}} = 0.05 \text{ mg.mL}^{-1}$		
$[C_{12}E_8]_{\text{tampon}} = [C_{12}E_8]_{\text{micellaire}} + [C_{12}E_8]_{\text{monomère}}$						
$[C_{12}E_8]_{\text{micellaire concentré}} = f * [C_{12}E_8]_{\text{micellaire initial}}$ avec f, facteur de concentration						
$[C_{12}E_8]_{\text{lié aux prot concentré}} = 0,5 * [\text{protéines}]_{\text{concentré}}$						
$[C_{12}E_8]_{\text{total}} = [C_{12}E_8]_{\text{micellaire concentré}} + [C_{12}E_8]_{\text{lié aux prot concentré}} (+ [C_{12}E_8]_{\text{monomère}} \text{ (négligée)})$						
B						
$[C_{12}E_8]_{\text{tampon}} = 0.5 \text{ mg.mL}^{-1} \rightarrow [C_{12}E_8]_{\text{micellaire}} = 0,45 \text{ mg.mL}^{-1}$						
$f = 34 \rightarrow [C_{12}E_8]_{\text{micellaire concentré}} = 15.3 \text{ mg.mL}^{-1}$						
$[\text{protéines}]_{\text{concentré}} = 13 \text{ mg.mL}^{-1} \quad [C_{12}E_8]_{\text{lié aux prot concentré}} = 6,5 \text{ mg.mL}^{-1}$						
$[C_{12}E_8]_{\text{total}} = 21,8 \text{ mg.mL}^{-1}$						
C						
		Blanc	Tampon HPLC radioactif (0,5 mg/mL)		Pool HPLC avant concentration	Echantillon concentré
Volume testé (μL)			50	25	25	1
Données brutes (cpm)	comptage 1	113	3285	1629	2385	2638
	comptage 2	110	3351	1609	2362	2596
Moyenne (blanc soustrait) (cpm)			3207	1508	2262	2505
cpm moyen par mg $C_{12}E_8$			125715			
$[C_{12}E_8]$ (mg.mL^{-1}) (données calculées)					0,72	19,9

Figure III.2-2 : Détermination de la quantité de $C_{12}E_8$ présent dans l'échantillon concentré à l'issue d'une purification du mutant E309Q.

En bleu : données se rapportant aux fractions issues de l'HPLC - En rouge : données se rapportant à l'échantillon après concentration.

A : Equation théorique

B : Application des équations théoriques pour obtenir une approximation indirecte de la quantité de détergent

C : Utilisation de détergent radioactif pour déterminer la quantité de détergent dans le même échantillon.

Une autre méthode, directe, consiste à utiliser du $C_{12}E_8$ marqué au carbone 14, ce qui permet ensuite de déterminer la quantité de détergent par mesure de radioactivité. Cette expérience a été réalisée lors d'une purification du mutant E309Q. $10\mu Ci$ de $C_{12}E_8$ radioactif ont été ajoutés au tampon HPLC (à $0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de $C_{12}E_8$).

Les calculs présentés Figure III.2-2 indiquent que la méthode indirecte donne à 10% près, le même résultat que la méthode de dosage direct par radioactivité.

III.2.3 Obtention de cristaux de l'ATPase sauvage.

Les essais de cristallisation de l'ATPase sauvage ont été réalisés dans le laboratoire de Poul Nissen. Les conditions dans lesquelles l'ATPase native a été cristallisée sont 8% (w/v) PEG6000, 4% (v/v) tert-butanol, 15% (v/v) glycerol, 5mM β -mercaptoethanol, 200 mM sodium acetate (Sørensen *et al.*, 2004). Nous avons donc testé des conditions se rapprochant de celles-ci (*cf.* «Materials and Methods» de l'article II). Ces conditions ont permis l'obtention de cristaux diffractant les rayons X. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article II.

III.2.4 Essais de cristallisation du mutant E309Q

III.2.4.1 Purification du mutant E309Q

L'ADNc portant la mutation E309Q a été cloné dans le vecteur d'expression avec l'étiquette « BAD » (*cf.* chapitre « Techniques utilisées »).

L'expression de ce mutant dans *S. cerevisiae*, sa solubilisation et sa purification n'ont pas posé de problèmes particuliers et les rendements sont similaires à ceux obtenus avec SERCA1a sauvage.

Le chromatogramme de l'étape de gel filtration d'une purification de SERCA1-E309Q contenant le mutant après purification sur colonne d'avidine et concentration est présenté sur la Figure III.2-3A. Pour comparaison, des chromatogrammes obtenus pour l'ATPase solubilisée à partir du réticulum sarcoplasmique ou l'ATPase SERCA1a sauvage purifiée sur colonne avidine ont été représentés. Si nous tenons compte du décalage

observé pour la position du pic correspondant aux agrégats (assimilé au volume mort), le mutant est retrouvé dans des volumes d'élution proche de l'ATPase sauvage purifiée après expression hétérologue. Il s'agit donc très probablement d'un monomère. Notons que la forte concentration en protéine d'un échantillon peut être responsable d'un décalage du pic vers le volume mort (le Maire *et al.*, 1978). Ceci pourrait expliquer le décalage du pic correspondant à l'ATPase native (solubilisée à partir du SR). La Figure III.2-3B montre que la fraction 6,5-7,75 correspondant à l'ATPase est pure à au moins 70%.

Remarque : Nous pensons que la protéine présente dans les fractions (7,75-8 → 8,25-8,5) est un contaminant de la solution de thrombine utilisée. En effet, nous nous sommes rendu compte *a posteriori* que la pureté des solutions de thrombine varie suivant les lots et le principal contaminant est une bande migrant aux alentours de 60 kDa, que nous suspectons être de l'albumine sérique (analyse en bleu de Coomassie de solution de thrombine, non montrée). L'efficacité de la coupure des solutions de thrombine (à activité spécifique égale) varie également. Pour nous affranchir de ces variations, nous commandons dorénavant une grande quantité de thrombine (10000U) après avoir préalablement testé le lot (et accessoirement, nous avons changé de fournisseur).

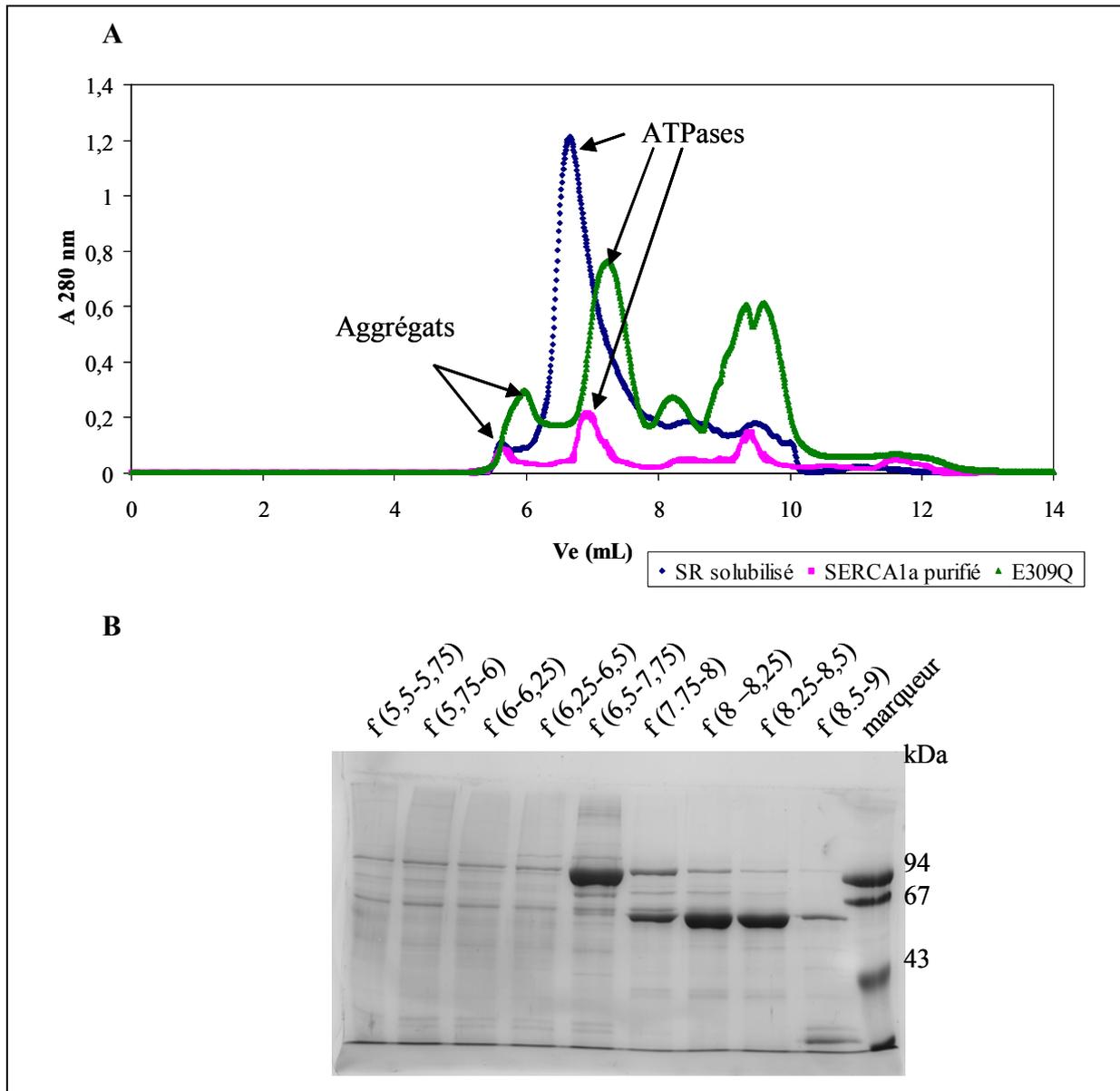


Figure III.2-3 Analyse de l'étape de filtration sur gel d'un échantillon de E309Q préalablement purifié sur colonne avidine.

A-Chromatogrammes obtenus lors de l'étape de gel-filtration du mutant E309Q (vert) ou de SERCA1a wt (rose) après purification sur colonne d'avidine, et du SR solubilisé (bleu). Nous estimons que les agrégats se retrouvent dans le volume mort.

B-Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de différentes fractions obtenues après gel filtration du mutant E309Q. 10 μ L de fractions ont été déposés. Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent au volume d'éluion de la fraction. Nous pensons que la protéine présente dans les fractions (7,75-8 \rightarrow 8,25-8,5) est un contaminant de la solution de thrombine utilisée.

III.2.4.2 Essais de cristallisation du mutant E309Q

Après avoir réussi à cristalliser la protéine SERCA1a sauvage exprimée chez *S. cerevisiae* (cf. Jidenko *et al.*, 2005), des premiers essais de cristallisation du mutant E309Q ont été réalisés par Rikke Nielsen dans le laboratoire de Poul Nissen : la purification était réalisée dans notre laboratoire puis l'ATPase mutée était placée en présence de DOPC et de 10mM CaCl₂ et de 1mM AMP-PCP avant d'être envoyée au Danemark. Différentes concentrations de PEG, différents sels (acétate de sodium, NaCl, KCl) ont été testés. Dans certains cas, des micro-cristaux ont pu être observés. Au cours de ces essais, nous avons changé de tampon de purification à l'étape HPLC : en effet, des expériences réalisées par l'équipe de Jesper Møller ont suggéré que l'ATPase était plus stable en présence de 15 % de saccharose qu'en présence de 20% de glycérol. En collaboration avec l'équipe de Poul Nissen, ils ont réussi à cristalliser l'ATPase native de lapin en présence de saccharose. Dans le tampon utilisé à l'étape de gel filtration, nous avons donc remplacé le glycérol par 15% de saccharose.

J'ai aussi réalisé personnellement des essais de cristallisation sur l'ATPase mutée E309Q purifiée en présence de 1mM Ca²⁺ ou en présence de thapsigargine dans le laboratoire de Poul Nissen. Dans ce dernier cas, la thapsigargine est ajoutée dans un rapport de 10 nmol.mg⁻¹ de protéine avant injection de l'échantillon en HPLC, la concentration en calcium de l'échantillon étant au préalable amenée à 0,1mM par ajout d'EGTA. Le tampon HPLC avec lequel est purifié ce complexe protéine-thapsigargine contient dans ce cas 0,1mM de Ca²⁺. En réalisant des expériences en présence de thapsigargine, nous voulions voir si ce composé ne permettait pas de stabiliser le mutant et donc de favoriser sa cristallisation. D'après des expériences précédentes de l'équipe de Jesper Møller, après complexation avec la thapsigargine, l'ATPase sauvage, supposée être en conformation E2, lierait un Ca²⁺ avec une affinité intermédiaire (10-20 μM à pH 7,2). Une hypothèse est que cette liaison ait lieu au niveau du site 1 et qu'elle pourrait donc avoir lieu également pour le mutant (communication personnelle de Jesper Møller).

Les différentes conditions que j'ai testées pour la protéine mutée sont présentées dans le Tableau III.2-1.

A • Sels : 50 ou 200mM Acétate de sodium - 50 ou 200mM Sulfate de magnésium - 100 mM de chlorure de calcium • Sel supplémentaire : 0 ou 10 mM de chlorure de calcium • Alcool : 3% tert-butanol • PEG- 14- 17 -20% PEG 2000 ou 11-14-17 % PEG 6000 • 0 ou 10% glycérol	
B • Sels : 100 mM de chlorure de calcium • Alcool : 4% MPD • PEG : 11-14-17 % PEG 6000 • 0 ou 5% glycérol	
C • Sels : 50 - 100 - 150- 200 mM de CaCl ₂ • Alcool : 3% tert-butanol ou 5% MPD • PEG : 17% PEG 2000 ou 11 % PEG 6000 • 0 ou 5% glycérol	• Sels : 100 mM de CaCl ₂ • Alcool : 3% tert-butanol • PEG : 11 % PEG 6000 • 0-3-6-9-12% glycérol ou 0-3-6-9-12% saccharose
D • Sels : 100 mM de CaCl ₂ • Alcool : 3% tert-butanol • PEG : 6 -7.5-9-10.5 % PEG 6000 • 0- 5 10 % glycérol ou 5-7.5- 10 % saccharose	
E • Sels : 100 mM de CaCl ₂ • Alcool : 3% tert-butanol • PEG : 9-11 % PEG 6000 • 0-1-2-3-4-5% glycérol • Concentration de l'échantillon: 11.5 mg.mL ⁻¹ ou 8 mg.mL ⁻¹	

Tableau III.2-1 Différentes conditions de cristallisation testées sur un échantillon de SERCA1-E309Q préparé après purification en DOPC et avec 1 mM Ca²⁺

A-Premières conditions testées (avec la purification P17, en présence de Ca²⁺ et P18 en présence de thapsigargine) B-Conditions testées avec le même échantillon protéique qu'en A, quelques jours plus tard. C-Deuxième série de conditions testées (avec la purification P19*) D- Conditions testées avec le même échantillon protéique qu'en C, quelques jours plus tard. E-Troisième série de conditions testées (avec P20*) : Afin d'éliminer les précipitations apparaissant dès le mélange de l'échantillon protéique avec le tampon de cristallisation, l'échantillon (préparé en 15% saccharose) est mélangé au tampon ne contenant pas de glycérol ou de saccharose et est centrifugé avant d'être déposé sur les lamelles qui sont retournées sur les différents puits. * dénomination de la purification du mutant E309Q utilisée, voir également Tableau III.2-2 page 163).*

Sauf indication contraire, l'échantillon protéique a une concentration voisine de 11-12 mg.mL⁻¹. Les conditions apparaissant préférables pour la cristallisation sont signalées en bleu. Les conditions ne conduisant à aucun micro cristal sont signalées en rouge et sont barrées.

Les conditions décrites lignes A et B ont été testées sur une préparation réalisée en Ca^{2+} ou en présence de thapsigargine. Au bout d'une semaine, il ne m'est pas apparu de différences nettes entre les deux préparations. Pour cette raison, les conditions suivantes n'ont été testées que sur l'ATPase préparée en présence de Ca^{2+} .

Au cours de ces essais, nous avons pu observer dans différentes conditions des cristaux 2D en forme de petites assiettes (voir un exemple Figure III.2-4A). Nous avons également pu observer d'autres formes de cristaux, plutôt en bâtonnets (*cf.* Figure III.2-4B et C). Bien que restant petits ($50 \times 5-10 \times 5 \mu\text{m}$), certains de ces cristaux ont pu être collectés et congelés environ 1 mois après le démarrage des essais de cristallisation. A l'heure où cette thèse est rédigée, ces cristaux n'ont pas encore été testés au synchrotron. Notons que nous avons obtenu des cristaux de la protéine préparée en présence de thapsigargine (conditions décrites en ligne B) qui semblaient finalement de meilleures qualités que ceux obtenus dans les mêmes conditions avec la protéine préparée en Ca^{2+} .

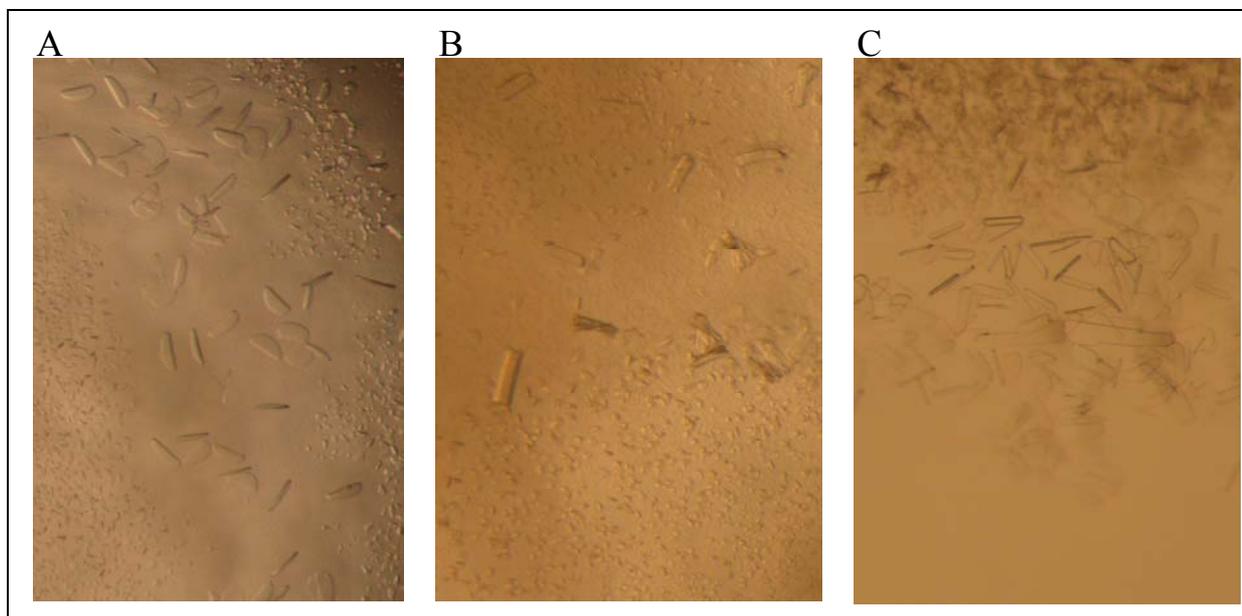


Figure III.2-4 Exemples de cristaux obtenus avec le mutant E309Q.

A-Exemple de cristaux 2D en forme d'assiettes, obtenus par exemple en présence de 11% PEG 6000-100 mM CaCl₂-3 % tButOH-3% sucrose. B-Exemple de cristaux 3D obtenus (14% PEG 6000 - 100 mM CaCl₂ -4% MPD) C - Autre exemple de cristaux 3D obtenus (9.5% PEG-1% glycérol-100mM CaCl₂- 3% tButOH)

III.2.5 Discussion

III.2.5.1 Cristallisation de l'ATPase sauvage

Les résultats concernant la collection de données à partir de cristaux de SERCA1a purifiée après expression hétérologue dans la levure sont discutés dans l'article II. Il est évident que nous avons bénéficié de la connaissance acquise par les groupes de Poul Nissen et Jesper Møller quant à la cristallisation de l'ATPase native. Cette connaissance nous a évité d'avoir à tester tout un panel de conditions de cristallisation. L'utilisation d'une préparation d'ATPase qui, en plus d'être pure à plus de 70%, présente une bonne activité est, à notre avis, une des raisons de notre succès.

Au moment de la rédaction et de la soumission de cet article, à notre connaissance, ces résultats étaient le premier exemple de réussite de cristallisation d'une protéine membranaire de mammifère après expression hétérologue. Toutefois, quelques semaines avant nous, Long *et al.* (2005), ont publié une structure à 2.9Å d'un canal potassique de rat, purifié après surexpression dans la levure *P. pastoris*.

Un important travail préliminaire au travail de Long *et al.* avait été publié 2ans plus tôt par Parcej et Eckhardt-Strelau, (2003). Dans cet article, les auteurs avaient montré qu'il était possible non seulement de purifier en grandes quantités la protéine Kv1.2, sous unité α du canal potassique, mais aussi qu'il était possible de la co-purifier avec la sous unité Kv2 β après co-expression des deux protéines dans *P. pastoris*. Différentes mutations, éliminant les sites potentiels de glycosylations et de phosphorylations ont amélioré l'homogénéité de la protéine. Leur travail met en avant un des avantages du système *P. pastoris* : ils obtiennent en effet 250g de levures par litre de culture (nous en obtenons environ 40g) ce qui leur permet d'obtenir environ 2000 mg de protéines membranaires et de purifier environ 25 mg de sous unités Kv1.2 pure à 75% par litre de levures ! Après purification grâce à une étiquette « 8 histidines » placée en N-terminal, les auteurs montrent que la protéine est complètement active. Grâce à ce système, les auteurs ont pu analyser le complexe Kv1.2/Kv β par microscopie électronique.

Dans leur article, Long *et al.*, ont purifié le même complexe. Ils ont travaillé avec la sous unité Kv1.2 mutée uniquement pour son site de glycosylation. Il semblerait donc que l'hétérogénéité observée par Parcej et Eckhardt-Strelau pour ce type de construction ne soit pas un problème pour la cristallisation. Long *et al.* solubilisent la protéine avec du DDM, puis utilisent des billes de cobalt pour purifier la protéine étiquetée avec 8 histidines en N-terminal. Ils ont également optimisé la pureté de leur échantillon en ajoutant une deuxième étape de purification qui se trouve être une chromatographie d'exclusion (colonne Superdex-200). Notons que les auteurs ajoutent des lipides à leur échantillon protéique et dans leurs tampons dès l'élution des billes de cobalt. Pour les auteurs, il est important que la protéine ne soit pas en présence d'un milieu oxydant : ils utilisent des tampons contenant différents agents réducteurs (DTT, Mercaptoéthanol, TCEP) et leur procédure de cristallisation par diffusion de vapeur a lieu sous atmosphère d'azote.

Bien que la stratégie de la première étape de purification ne soit pas identique, dans l'exemple de SERCA1a ou du canal potassique Kv, une deuxième étape de purification a été nécessaire, et dans ces deux exemples ce fut une chromatographie d'exclusion. Tout comme pour SERCA après son expression dans la levure, il semble que le canal potassique Kv cristallisé était bien actif. Ceci tend à renforcer le sentiment que nous avons qu'il ne faut pas renoncer à une bonne activité de la protéine d'intérêt au profit de grandes quantités de protéines. Cet argument me semble d'autant plus valable qu'avec les avancées technologiques en matière de robot, les essais de cristallisation consommeront de plus faibles volumes d'échantillon protéique.

III.2.5.2 Essais de cristallisation du mutant

La procédure de purification mise au point sur l'ATPase sauvage, a permis l'obtention du mutant E309Q à une pureté voisine de 70%. Les derniers essais réalisés ont permis l'obtention de cristaux. Bien que petits, certains de ses cristaux seront prochainement utilisés pour des expériences de diffraction aux rayons X (source synchrotron).

Les différentes tentatives que nous avons réalisées sur le mutant nous ont fait toucher du doigt une des difficultés d'essayer de cristalliser une protéine purifiée après expression hétérologue. En effet, il est difficile d'obtenir un échantillon concentré possédant exactement les mêmes caractéristiques que les autres. Le Tableau III.2-2 nous montre que cette difficulté influe notamment sur le rapport protéine/détergent de l'échantillon. Selon notre mode opératoire, la quantité de lipides ajoutée est proportionnelle à la quantité de détergent, le rapport protéine/lipide varie donc également d'un échantillon à l'autre.

	Volume (μL)	Concentration protéique (mg.mL^{-1})	Concentration en C_{12}E_8 (mg.mL^{-1})	Rapport protéine / C_{12}E_8	Quantité de protéines (μg)
P8	40	18,9	23	1,22	756
P10	53	16,5	20,2	1,22	874
P11	40	24,7	30	1,21	988
P12	40	13	22,8	1,75	520
P13	46	14,6	21,7	1,49	672
P17	54	11	17,7	1,61	594
P18	47	10,5	19,61	1,87	494
P19	62	14,5	17,9	1,23	899
P20	56	11,5	17,7	1,53	644

Tableau III.2-2 Propriétés de l'échantillon après la dernière étape de centrifugation de différentes purifications.

Les purifications dont les données sont présentées ici ont été réalisées à partir d'une quantité de fractions membranaires correspondant à 4L de culture de levures. Les purifications réalisées à partir d'une même préparation de fractions membranaires sont de la même couleur. Si besoin, l'échantillon est dilué dans du tampon type HPLC (sans C_{12}E_8) de manière à réaliser les essais de cristallisation avec une solution à environ 11-12 mg.mL^{-1} .

Une hypothèse tentante pour expliquer ces variations serait de pointer du doigt la différence de préparations membranaires. Les purifications opérées à partir d'une même préparation membranaire ont été regroupées dans le Tableau III.2-2. Il semble effectivement que la préparation membranaire influe sur la quantité de protéines purifiées, et donc qu'elle puisse expliquer en partie les variations observées. Pour limiter les variations liées à la préparation membranaire, il pourrait être intéressant de produire en une fois une grosse quantité de membranes. A l'heure actuelle, chaque préparation membranaire est réalisée à partir de 8L de culture de levures. Les moyens techniques du laboratoire pourraient nous permettre d'envisager la production de 12L de culture. Une augmentation du volume de culture dans chaque Fernbachs de 500 à 750 mL pourrait permettre la production de 18L de culture mais il faudrait vérifier que cela n'influence pas le niveau d'expression. Ceci permettrait de réaliser 4 purifications à partir de la même préparation membranaire. Au delà, il faudrait envisager le passage en fermenteur semi industriel, ce qui suppose de mettre au point la culture et l'expression dans ces conditions.

Une autre origine de ces variations pourrait être la difficulté à répéter à l'identique les étapes de purification, par exemple le volume de résine, le volume d'élution, le facteur de concentration, etc... Même si toutes ces imprécisions ne sont que 5-10%, cumulées, elles peuvent avoir leur importance. Ces différences me semblent difficiles à contrôler, même si leur éventuel impact doit être gardé en mémoire par l'expérimentateur afin de les limiter.

A l'heure actuelle, il est difficile de dire si les variations de propriétés de l'échantillon ont un impact sur la cristallisation. En effet, à ma connaissance, une seule condition a été testée avec deux préparations différentes : il s'agit de la condition 11% PEG6000-0.1M CaCl₂ -3% t-ButOH. Cette condition a été testée avec la purification P17 et deux fois avec la purification P19 (cf. Tableau III.2-2 et voir lignes A et C du Tableau III.2-1 page 158). Il se trouve que dans les deux essais avec la purification P19, cette condition a permis l'obtention de cristaux qui ont été congelés et seront testés en diffraction. Par contre, l'essai réalisé avec la protéine de la purification P17 n'avait

permis d'obtenir que des cristaux de type 2D. Au travers de cet unique exemple, il semble donc que les propriétés de l'échantillon pourraient avoir une importance.

Dahout-Gonzalez *et al.* (2003) avaient déjà étudié l'impact du rapport détergent/protéine pour la cristallisation du transporteur ADP/ATP (*cf.* Figure III.2-5). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la diminution du rapport détergent/protéine pour atteindre 13g de détergent / g de protéines permettait la formation de cristaux et que la diminution du rapport en dessous de cette barre entraînait l'augmentation de la taille des cristaux obtenus. Au dessous de 10g/g, la protéine semble précipiter de manière irréversible. Leur étude montre donc l'importance du rapport détergent/protéine pour la cristallisation du transporteur ADP/ATP. Cependant les rapports détergents/protéines dans les essais de cristallisation du mutant E309Q ne sont pas du même ordre de grandeur (*cf.* Tableau III.2-2) et contrairement à Dahout-Gonzalez *et al.*, le rapport lipides/protéines varie également dans nos essais. Des études complémentaires pourraient être intéressantes, d'autant plus que des essais de cristallisation d'autres mutants de SERCA sont envisagés. Si une relation entre les propriétés chimiques de l'échantillon et la probabilité de cristallisation était montrée, cela pourrait permettre d'optimiser les essais de cristallisation.

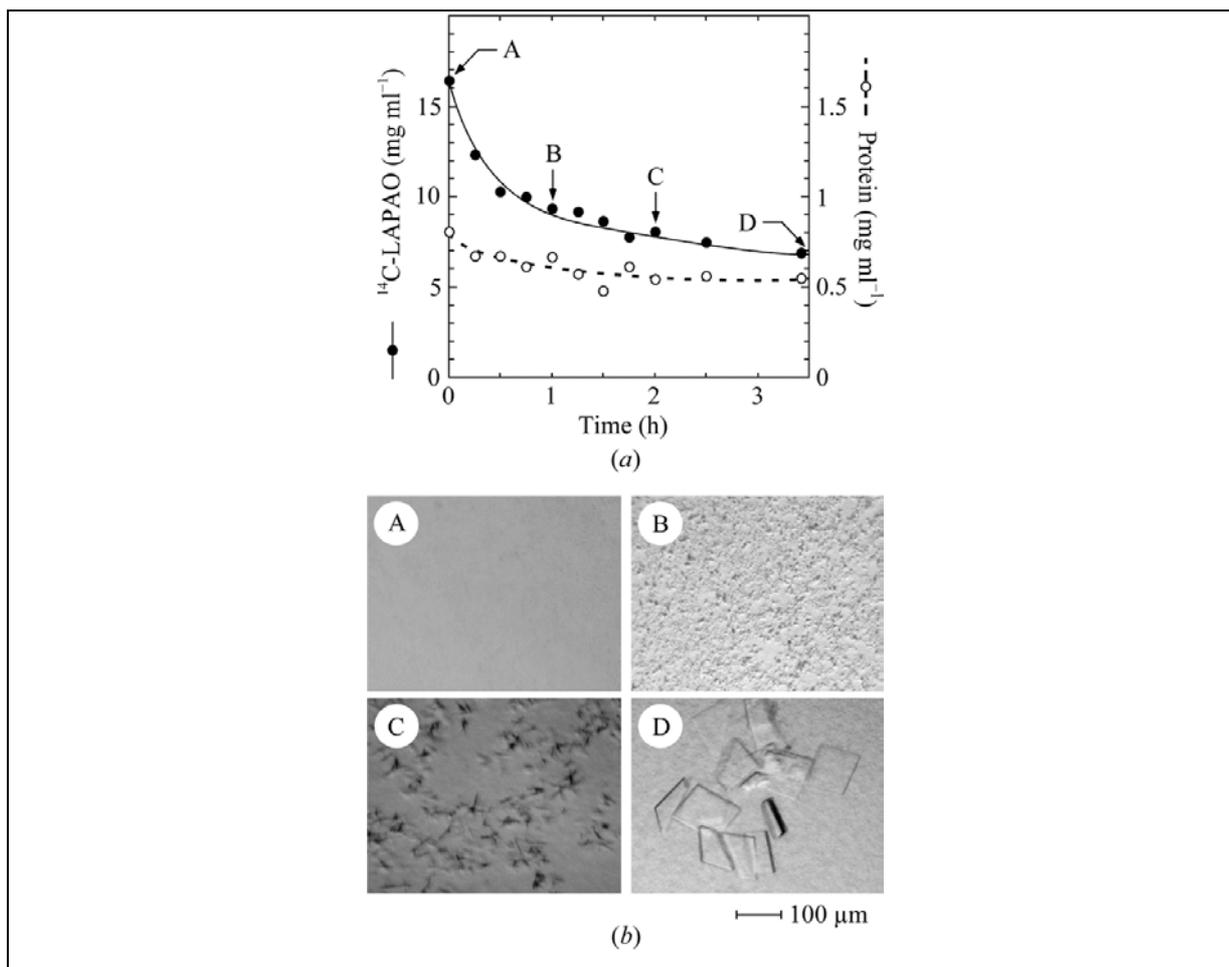


Figure III.2-5 Effet du rapport détergent/protéines sur la cristallisation du transporteur ADP/ATP (extrait de Dahout-Gonzalez *et al.*, 2003)

*Pour étudier cet effet les auteurs ont éliminé le détergent grâce à des biobeads (a)
La figure (b) montre les essais de cristallisation effectués à partir d'une solution prélevée aux points A, B, C et D indiqués sur le graphe (a), et contenant respectivement 20, 16, 13 et 10 g de détergent par g de protéine.*

III.3 Etude de l'isoforme SERCA3

Il a été montré dans l'introduction de cette thèse, la diversité des isoformes SERCA3 et les variations fonctionnelles qui semblaient exister entre ces isoformes et par rapport aux isoformes SERCA1 et SERCA2. Toutefois, peu d'études biochimiques ont été menées sur ces différentes isoformes. Nous avons voulu profiter de l'expérience acquise au laboratoire quant à l'expression hétérologue et la purification de SERCA1a pour essayer de purifier et d'étudier ces isoformes SERCA3. En parallèle des études de localisation cellulaire de ces isoformes ont été réalisées.

L'isoforme de SERCA3 que le laboratoire possédait à mon arrivée était l'isoforme SERCA3a de rat. Les premiers essais d'expression et de purification ont été conduits sur cette isoforme.

III.3.1 Essais d'expression et de purification de SERCA3a de rat.

III.3.1.1 Expression de SERCA3a de rat dans *S. cerevisiae*

L'ADNc de l'isoforme SERCA3a de rat a été cloné dans le vecteur pYEDP60 en amont du site de thrombine et de l'étiquette « BAD » comme présenté sur la Figure II.1-1 page 94.

Dans un premier temps, après avoir sélectionné un clone par la procédure de « mini-expression » décrite dans la partie « Techniques utilisées » (cf. II.2.1 page 105), nous avons testé le protocole d'expression mis au point sur SERCA1a-His et appliqué à SERCA1a-BAD (cf. partie III.1). Les résultats obtenus sont présentés Figure III.3-1. Les résultats de l'analyse par western blot des différentes fractions membranaires (A) montrent que la protéine SERCA3a semble avoir été exprimée et biotinylée. Lors des expressions de SERCA1-BAD ou du mutant, il était possible de quantifier la quantité de SERCA présente dans les membranes grâce à une gamme de SR, mais l'anticorps utilisé (79B) ne reconnaît pas SERCA3. Afin d'estimer la réussite de cette expression, nous l'avons comparée donc à celle de SERCA1-BAD. Les résultats de cette comparaison sont présentés Figure III.3-1B. Sur cette figure, l'intensité des bandes correspondant à

SERCA-BAD dans les fractions membranaires C2 et C3, comparativement à celles des autres protéines biotinylées détectées dans ces mêmes fractions, démontre que la quantité de SERCA3-BAD exprimée est nettement inférieure à celle obtenue lors de l'expression de SERCA1-BAD. Nous considérons que nous avons plus de 10 fois moins de protéines SERCA3-BAD exprimées, biotinylées et localisées dans la fraction C3, comparativement à SERCA1a-BAD. Toutefois, nous avons décidé de tenter une première purification de SERCA3-BAD.

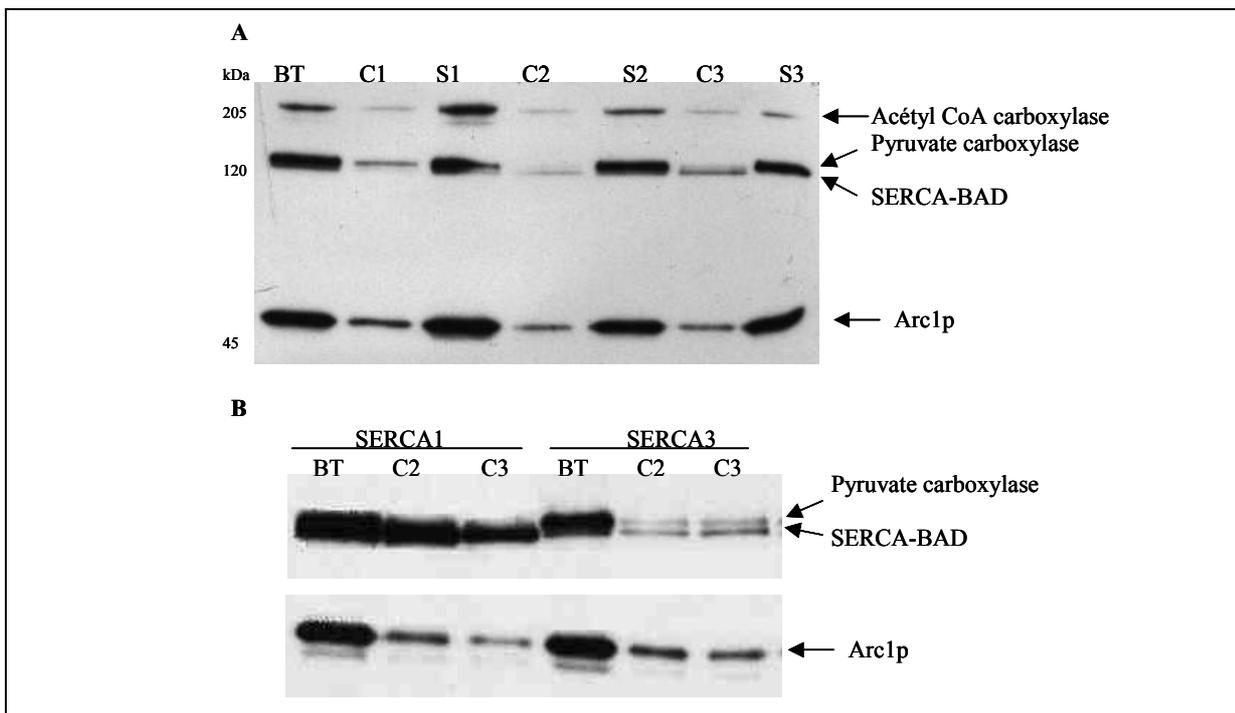


Figure III.3-1 Analyse par western blot (Avidine peroxydase) de l'expression de SERCA3a de rat.

A-Analyses des différentes fractions obtenues après broyage et fractionnement d'une culture de levures transformées avec SERCA3a de rat. B-Comparaison des expressions de SERCA1a de lapin et de SERCA3a de rat

Quantité de protéines totales déposées : pour BT, S1, S2, S3, C1 : 4 µg ; pour C2 et C3 1µg. Les différentes protéines biotinylées observées sont indiquées par des flèches.

III.3.1.2 Essai de purification de SERCA3a de rat

L'essai de purification de SERCA3-BAD a été réalisé à partir de 15 mL de fraction membranaire C3, soit l'équivalent de 500mL de culture. L'analyse des différentes fractions récoltées est présentée Figure III.3-2. La quantité de protéines SERCA3 récoltées dans les éluats, après coupure par la thrombine, est très faible (*cf.* gel SDS-PAGE, Figure III.3-2A). L'analyse en WB nous indique que la procédure de purification n'est pas à mettre en cause en elle-même : une partie de SERCA3 se retrouve dans le solubilisé et reste fixée sur la colonne, la protéine de fusion n'étant quasiment plus détectée dans les fractions de « Passe tout droit » (*cf.* Figure III.3-2B).

Pour analyser par western blot la purification jusqu'à l'étape d'éluion, il nous faudrait un anticorps anti-SERCA3. Comme il a été dit plus haut, l'anticorps 79B utilisé pour toutes les analyses relatives à SERCA1a ne détecte pas SERCA3 (non montré). J'ai testé différents anticorps anti-SERCA3 polyclonaux obtenus par immunisation de lapin avec un peptide correspondant aux 15 acides aminés N-terminaux de SERCA3a de rat (fourni au laboratoire par J. MØLLER et utilisés par Fuentes *et al.*, 2000). Les anticorps 190.1 (*cf.* Figure III.3-2C) ou 190.2 (non montré) permettent de détecter SERCA3a de rat, mais, pour observer un signal, il faut déposer un volume important d'échantillon (100 fois plus que pour une détection de la protéine de fusion biotinylée avec l'avidine peroxydase) et exposer la membrane pendant au moins 20 min.

En estimant très approximativement que les éluats 1,2 et 3 (1mL chacun) contiennent 0,07 μ g de SERCA (4 fois moins de protéines SERCA que l'échantillon « SR 0,4 μ g », *cf.* Figure III.3-2A), nous pourrions purifier ainsi 40 μ g de SERCA3 partir de 1L de culture, soit 10 fois moins que lors de la purification de SERCA1a.

Au vu de ces résultats, il nous a semblé préférable de tenter d'optimiser l'expression de SERCA3a de rat avant de poursuivre les expériences de purification.

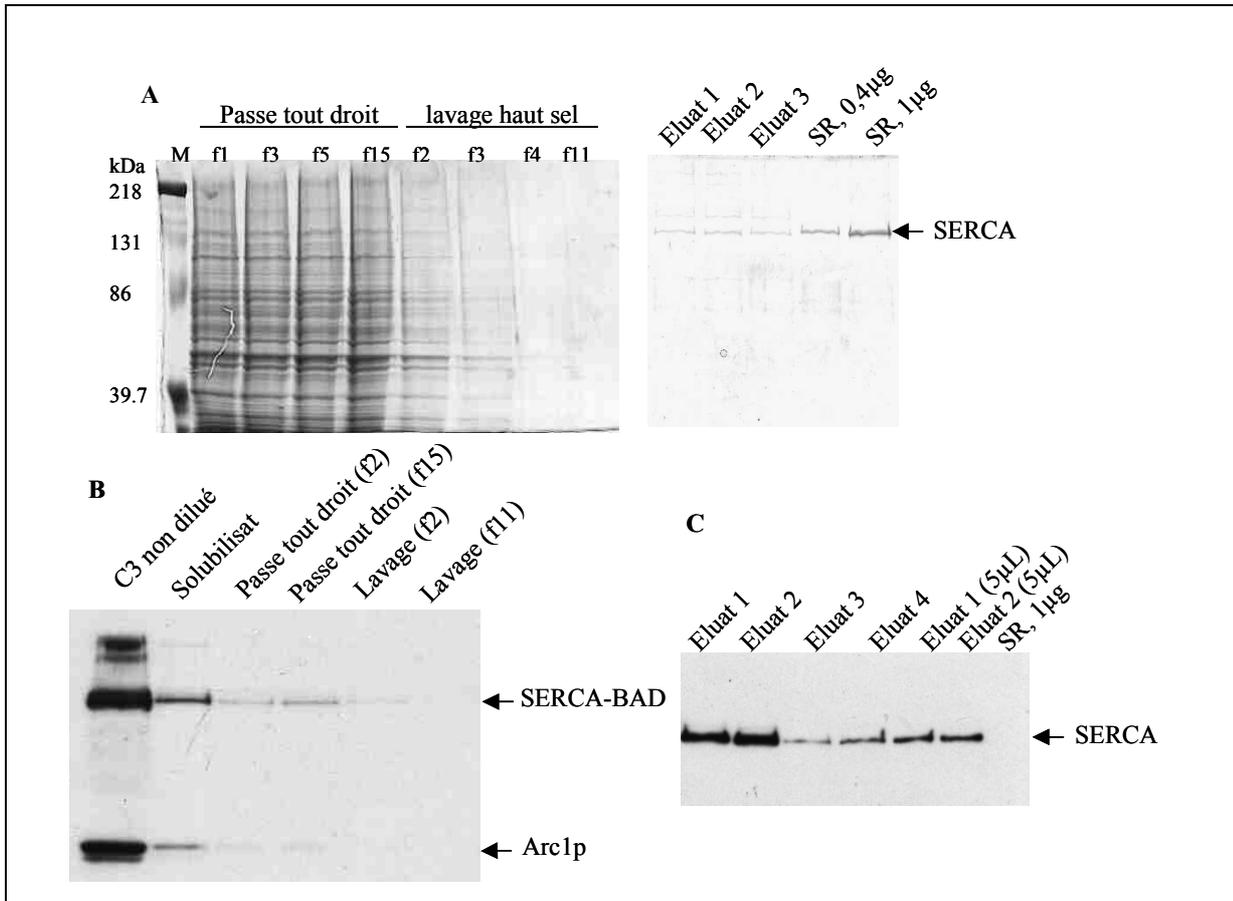


Figure III.3-2 Analyses de l'essai de purification de SERCA3a de rat

A- Gels SDS -PAGE coloré au bleu de Coomassie, dépôt de 10µL de chaque fraction , sauf pour SR : dépôt de 0.4 et 1µg de protéines totales (soit 0,28 et 0,7 µg de SERCA) B- Western blot, détection par l'avidine peroxydase (10 s d'exposition), dépôt de 0.125µL d'échantillons C- Western Blot, détection par l'anticorps 190.1 (20 min d'exposition), dépôt de 10µL de chaque fraction sauf indications contraires.

Solubilisat: surnageant de solubilisation - fi : fraction numéro i -Eluat: fraction éluee après action de la thrombine -M : marqueur- SR : extrait protéique de réticulum sarcoplasmique.

III.3.1.3 Tentatives d'amélioration de l'expression de SERCA3a de rat.

a) Analyses de l'expression lors du protocole « standard »

Avant de modifier le protocole d'expression utilisé, j'ai analysé le déroulement de l'expression dans le protocole tel qu'il était, à savoir une phase de croissance à 28°C pendant 36h avant passage à 18°C et une première induction, suivi d'une deuxième induction à t=49h et un arrêt à t=55h (cf. partie « Techniques utilisées », paragraphe II.2.2 page 106).

Un des premiers paramètres qu'il est possible d'analyser est la croissance des levures au cours de la culture. Lors de l'expression décrite dans le paragraphe III.3.1.1, j'ai récolté 44 g de levures par litre de culture, ce qui est similaire à ce qui est récolté avec les levures exprimant SERCA1. C'est donc sans surprise que les courbes de croissance sont peu différentes (cf. Figure III.3-3A).

L'évolution de la quantité de protéines totales dans le broyat a été suivie grâce à des prélèvements de 15mL de culture à des temps donnés. Il semble que la quantité de protéines soit légèrement plus importante dans le broyat « SERCA1 » que dans le broyat « SERCA3 » ; toutefois l'évolution de la quantité de protéines dans le broyat total est similaire. L'étude de la quantité de protéines présentes dans la fraction C3 n'est pas indiquée ici car nous nous sommes rendu compte que le protocole de broyage/fractionnement utilisé (adaptation à de faibles volumes du protocole standard) n'était pas valide. Les broyats totaux ont été analysés par western blot (détection avidine peroxydase) : malheureusement, il n'a pas été possible de détecter avec certitude SERCA3-BAD biotinylée, alors que la protéine SERCA1-BAD biotinylée était détectable dans tous les broyats « post induction » déposés (non montré).

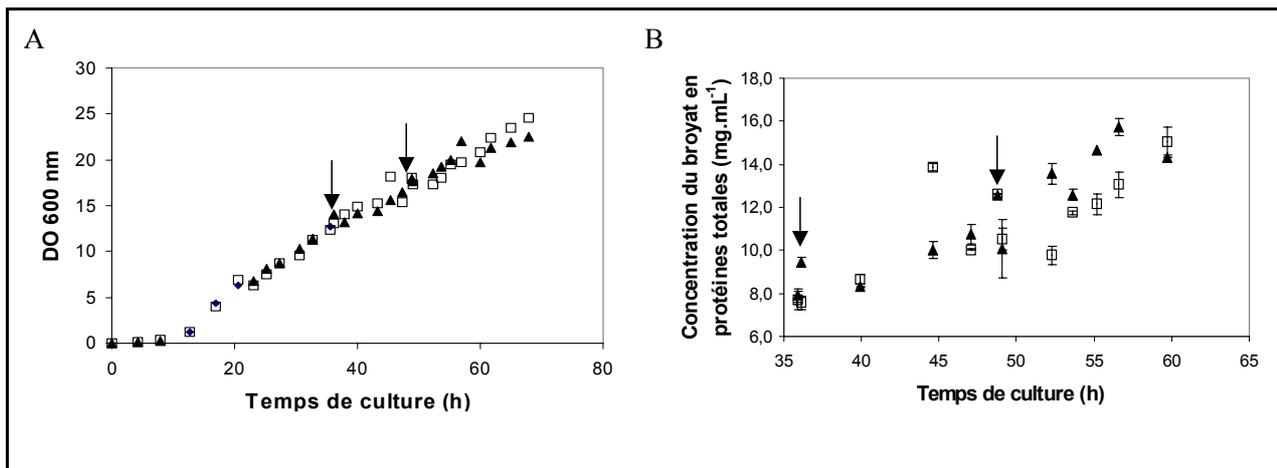


Figure III.3-3 Analyses de la croissance des levures et de la concentration en protéines totales du broyat au cours de la culture visant à l'expression de SERCA1a-BAD ou SERCA3a-BAD (deux inductions à 18°C)

A-Analyse de la densité optique de la culture de levure. B-Analyse de la concentration en protéines totales, mesurées par BCA, dans le broyat total. ▲ SERCA1a □ SERCA3a. Les flèches indiquent les inductions. Au moment de la première induction, la culture est transférée à 18°C.

Afin d'essayer d'améliorer l'expression de SERCA3, j'ai essayé de faire varier les conditions de culture.

b) Conséquences d'inductions à 28°C au lieu de 18°C

J'ai analysé l'expression de SERCA3-BAD, et toujours en parallèle, de SERCA1-BAD, dans le cas où la culture, après induction, continue à 28°C. La Figure III.3-4 montre l'analyse de la croissance des levures et l'évolution de la quantité de protéines totales au cours de cette expérience. La croissance des levures « SERCA3 » ou « SERCA1 » est similaire, et, de manière non surprenante, plus importante que celle observée lorsqu'un passage à 18°C est effectué (*cf.* Figure III.3-4A). Comme dans le cas du protocole standard décrit précédemment, il semble que la quantité de protéines soit légèrement plus importante dans le broyat « SERCA1 » que dans le broyat « SERCA3 », avec toutefois une évolution de la quantité de protéines dans le broyat total similaire.

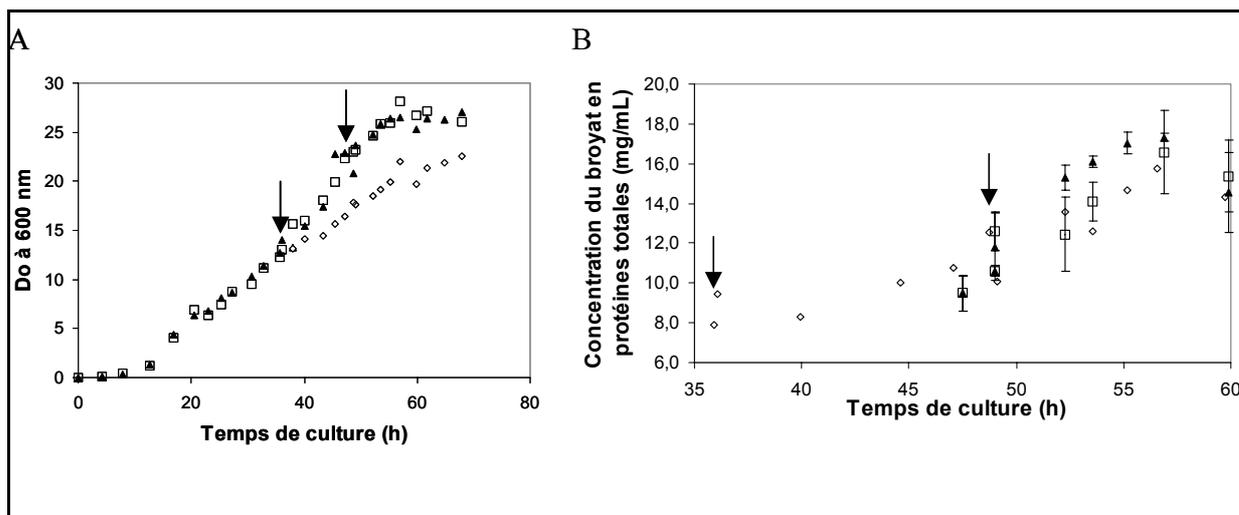


Figure III.3-4 Analyses de la croissance des levures et de la concentration en protéines totales du broyat au cours de la culture visant à l'expression de SERCA1a-BAD ou SERCA3a-BAD (température unique : 28°C).

A-Analyse de la densité optique de la culture de levure. B-Analyse de la concentration en protéines totales, mesurées par BCA, dans le broyat total. ▲ SERCA1a □ SERCA3a. Les flèches indiquent les inductions. La culture a lieu à 28°C, même après induction. Pour comparaison, les valeurs concernant SERCA1-BAD présenté sur la Figure III.3-3 sont rappelées (◇)

D'après les résultats présentés Figure III.3-4B, le broyat total « SERCA3 » obtenu dans ce protocole aurait une concentration en protéines totales similaire à celle du broyat total obtenu avec le protocole « standard ». Les broyats totaux ont été analysés par western blot (détection avidine peroxydase) : encore une fois, il n'a pas été possible de détecter avec certitude SERCA3-BAD biotinylée, alors que la protéine SERCA1-BAD biotinylée était détectable dans tous les broyats « post induction » déposés.

c) Conséquences d'un apport exogène de biotine.

Nous avons pensé que le faible niveau de SERCA3-BAD biotinylée détectée était peut-être dû à une mauvaise biotinylation de l'étiquette, liée à une carence en biotine. Les résultats obtenus après croissance des levures « SERCA3 » dans un milieu

additionné de 1 mM de biotine (série « SERCA3+biotine ») sont comparés à ceux obtenus après croissance des levures « SERCA3 » sans addition supplémentaire de biotine (série « SERCA3 sans biotine »). Dans cette série d'expériences, une seule induction a été réalisée, et les levures sont restées à 28°C.

La croissance des levures « SERCA3 + biotine » et « SERCA3 sans biotine » est comparable. Les résultats présentés Figure III.3-5B montrent toutefois que l'addition de biotine dans le milieu permet l'augmentation de la quantité de protéines dans le broyat. L'analyse par western blot (détection avidine peroxydase) des broyats montre que, lorsque de la biotine a été ajoutée, il est possible de détecter sans équivoque une protéine biotinylée supplémentaire, qui migre aux alentours de 120 kDa, et qui pourrait donc être SERCA3-BAD.

Ces expériences d'expression de l'isoforme SERCA3a de rat chez *S. cerevisiae* n'ont pas été poursuivies. Elles indiquent toutefois des pistes intéressantes pour améliorer l'expression d'autres protéines dans ce système. Ces pistes pourront être suivies en cas de mauvaises expressions de l'isoforme SERCA3a humaine, vers laquelle nous nous sommes tournés (voir Paragraphe III.4.3 : Discussion).

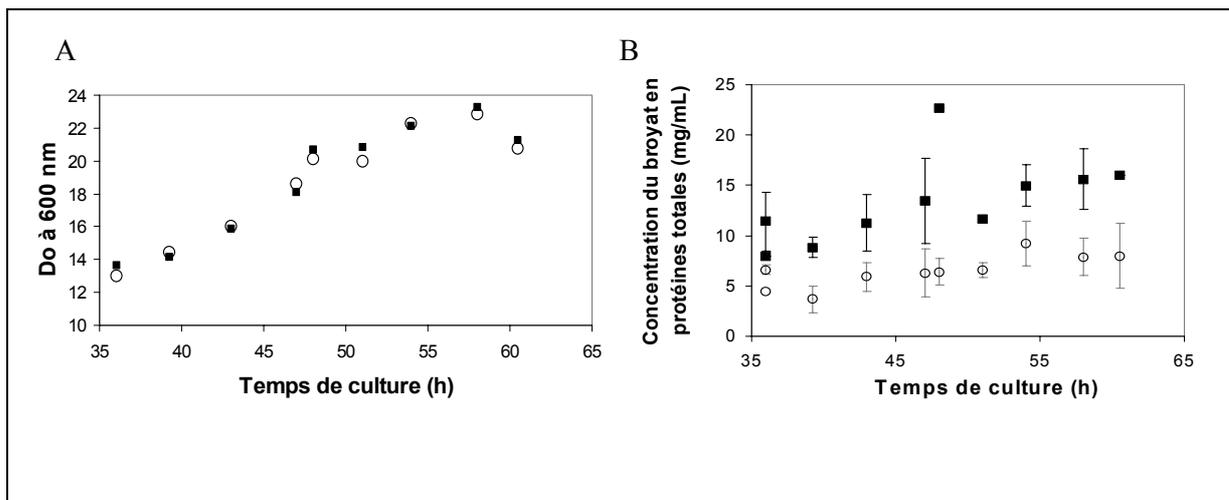


Figure III.3-5 Analyses de la croissance des levures et de la concentration en protéines totales du broyat au cours de la culture visant à l'expression de SERCA3a BAD (température unique : 28°C, une induction, milieu additionné ou non de biotine)

t=0 correspond au démarrage de la culture. L'induction par la galatose se fait à *t=36h*. ■ : ajout de biotine dans le milieu de culture ○ : pas de biotine ajoutée.

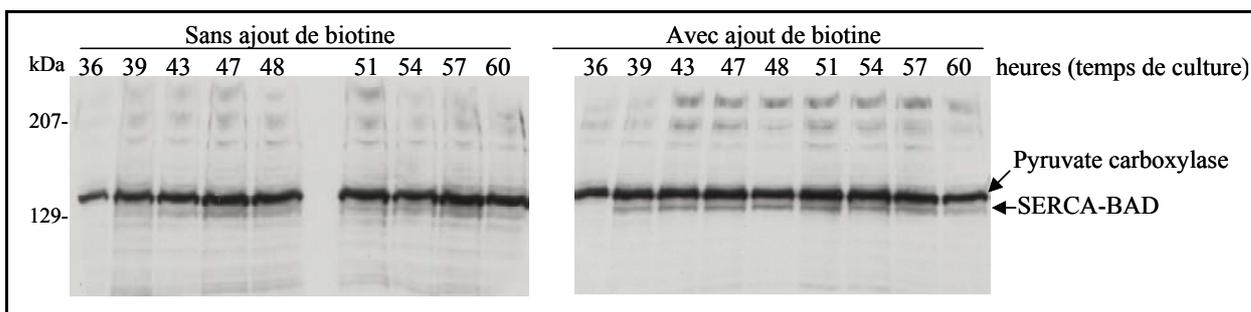


Figure III.3-6 Analyse par western blot (avidine peroxydase) des broyats de levures « SERCA3 » après culture dans un milieu additionné ou non de 1 mM biotine

III.4 Localisation cellulaire

Une des hypothèses reliées à la présence de plusieurs isoformes SERCA dans une même cellule serait que ces isoformes soient localisées dans des régions subcellulaires différentes. Avec l'équipe de Jean-Marc VERBAVATZ, nous cherchons à regarder s'il est possible de corroborer cette hypothèse par des expériences de microscopie électronique. Pour que l'observation en microscopie électronique soit possible, il ne faut pas que la protéine à détecter ait un trop faible niveau d'expression. Au cours de ma thèse, j'ai réalisé un travail préliminaire consistant à chercher des cellules humaines exprimant suffisamment SERCA3a pour qu'il soit envisageable de la détecter lors d'expériences de microscopie électronique. La microscopie de fluorescence est une méthode qui a pu nous permettre de nous rendre compte du niveau d'expression de SERCA3 dans différents types cellulaires.

III.4.1 Analyses de cellules HEK transfectées par un vecteur d'expression contenant ou non SERCA3

L'équipe de Jocelyne ENOUF a obtenu des lignées stables de cellules HEK transfectées chacune avec un vecteur d'expression pcDNA contenant l'ADN codant pour l'une des différentes isoformes SERCA3 humaines (Martin *et al.*, 2002; Bobe *et al.*, 2004). Jocelyne ENOUF nous a aimablement fourni ces lignées. Nous avons voulu regarder la localisation de SERCA3 dans les cellules HEK transfectées avec le vecteur pcDNA non recombinant, le vecteur contenant SERCA3a humaine ou le vecteur contenant SERCA3b humaine. Les résultats sont présentés Figure III.4-1.

Nous avons pu visualiser sans équivoque possible SERCA3 dans ces cellules aussi bien avec l'anticorps PL/IM 430 reconnaissant toutes les SERCAs qu'avec l'anticorps spécifique à SERCA3a. Il est évident que les cellules HEK transfectées par les vecteurs SERCA3ah ou SERCA3bh surexpriment la protéine. Nous pouvons observer que les protéines SERCA3 apparaissent, comme attendu, localisées dans le réticulum. Par contre, nous ne pouvons rien en déduire quant à la localisation subcellulaire

« physiologique » de SERCA3. Toutefois, ces expériences montrent qu'il est possible de détecter SERCA3a *in situ* avec les deux anticorps que nous avons à disposition et il nous a paru intéressant de regarder ce qui se passe dans des cellules non transfectées, dans un premier temps en immunofluorescence.

Par ailleurs, des lysats de ces cellules HEK transfectées ont été déposées sur gel SDS-PAGE et ont permis de vérifier qu'il était possible de détecter SERCA3a humaine après western blot par l'anticorps PL/IM 430 (non montré). Ces lysats pourront ultérieurement servir de contrôle positif lorsqu'il s'agira de vérifier par western blot la présence de SERCA3 humaine dans des préparations.

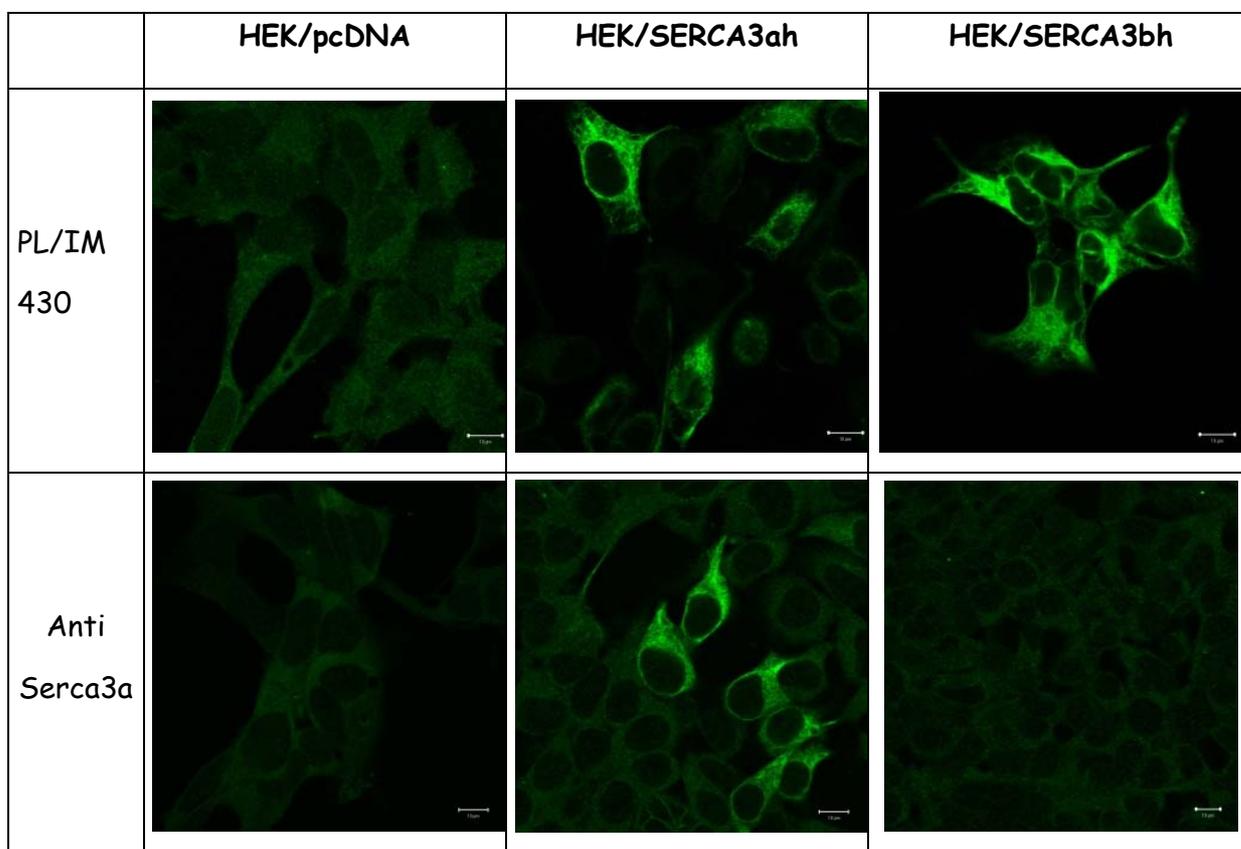


Figure III.4-1 Analyses par microscopie de fluorescence confocale de cellules HEK transfectées après perméabilisation par du Triton X-100 et immunomarquage.

pcDNA : cellules transfectées avec le vecteur pcDNA vide- HEK/SERCA3ah ou SERCA3bh : cellules transfectées avec le vecteur PcDNA/SERCA3a humaine ou SERCA3b humaine. PL/IM : immunomarquage réalisé avec l'anticorps PL/IM 430. - anti-SERCA3a : immunomarquage réalisé avec l'anticorps Anti-SERCA3a humaine - Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la fluorescéine (fluorescence verte)

III.4.2 Analyses de cellules humaines non transfectées et d'un tissu, la peau.

III.4.2.1 Utilisation de lignées cellulaires

Nous avons regardé si SERCA3a était détectable par microscopie de fluorescence dans deux lignées cellulaires disponibles au laboratoire, les cellules Caco-2 et les cellules HaCat (cellules humaines d'adénocarcinome du colon et cellules kératinocytes respectivement) ainsi que dans une lignée fournie par Anne-Marie LOMPRES, les cellules EAHy926 (cellules endothéliales).

Avec les cellules Caco-2 et HaCat, aucun signal ne ressort du bruit de fond, que ce soit avec l'anticorps anti-SERCA3a ou avec PL/IM 430.

Les résultats obtenus avec les cellules EAHY926 sont présentés Figure III.4-2. Un très faible signal est détectable avec l'anticorps PL/IM 430. Un signal un peu plus intense est observée avec l'anti-SERCA3a. Malgré ce faible signal obtenu en microscopie de fluorescence, des essais d'observations en microscope électronique de ces cellules EAHy926 après immunomarquage ont été réalisés. Il n'a pas été possible de détecter SERCA3a (non montré). Cet échec confirme qu'il nous faut travailler avec des cellules pour lesquelles le signal observé lors d'expériences en microscopie de fluorescence avec le même anticorps primaire est suffisamment intense.

III.4.2.2 Analyse d'un tissu humain: la peau

Des coupes de peau (5 μ m) ont été réalisées. Les résultats observés en microscopie de fluorescence après immunomarquage sont présentés Figure III.4-3. Un faible marquage est observé dans les cellules épithéliales avec l'anticorps anti-SERCA3a (*cf.* première ligne). Un plus fort signal est observable dans les cellules endothéliales (cellules entourant les vaisseaux, *cf.* deuxième ligne). De manière surprenante, ces marquages ne sont pas retrouvés avec l'anticorps PL/IM, censé reconnaître toutes les SERCA3. Par contre, un signal est détecté avec cet anticorps dans des cellules acineuses (*cf.* troisième ligne) laissant supposer qu'une autre isoforme SERCA3 est exprimée dans ces cellules.

L'intensité du signal observé avec l'anticorps anti-SERCA3a dans les cellules endothéliales de la peau (contraste non amplifié, contrairement aux résultats présentés Figure III.4-2) est suffisamment forte pour que des analyses en microscopie de cellules endothéliales soient envisagées. Pour faciliter l'observation, des coupes de péritoine, tissu hautement vascularisé, pourraient être utilisées, après avoir bien sûr, vérifié que le même type de signal était observable sur des coupes de ce tissu en microscopie de fluorescence.

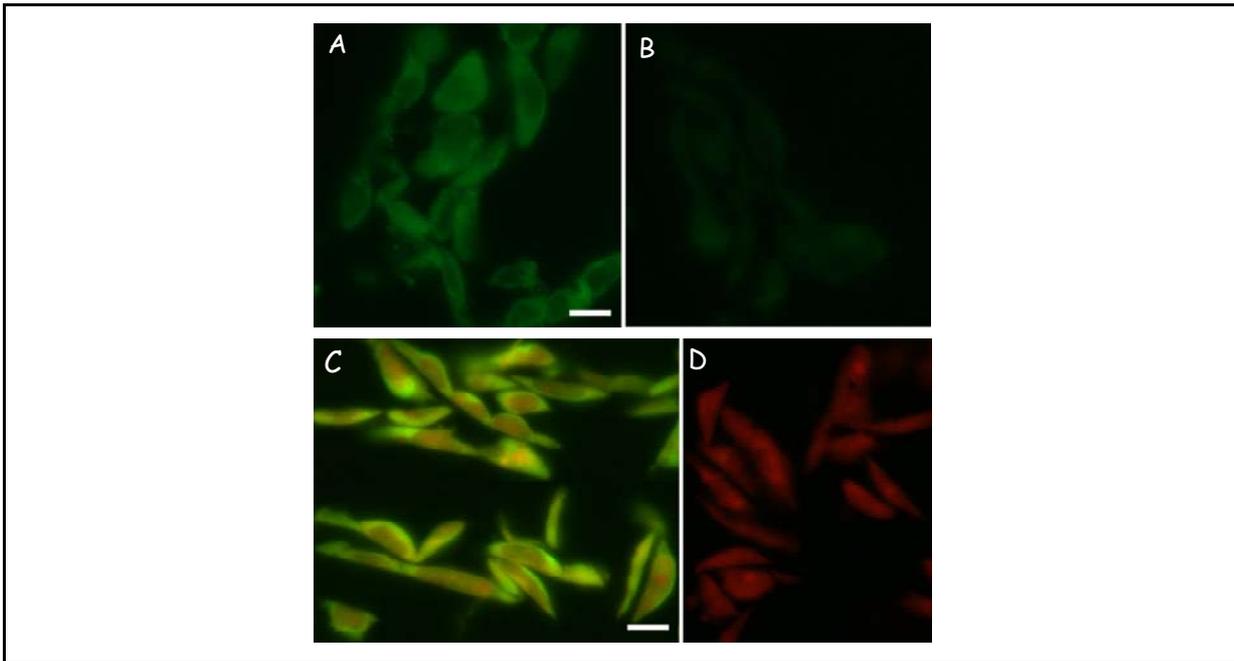


Figure III.4-2 Analyses par microscopie de fluorescence de cryo-coupes ($5\mu\text{M}$ d'épaisseur) de cellules EAHy926 après perméabilisation au Triton X-100 et marquage par anticorps.

A. PLIM dilution 1/50 +anti souris 1/50, pas de contre coloration. B Contrôle : anti souris 1/50 seul, pas de contre marquage. C: Anti SERCA3a 1/100 + anti lapin 1/50, contre coloration bleu Evans. D Contrôle : anti lapin 1/50 seul, contre coloration bleu Evans Barre : $10\mu\text{m}$. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la fluorescéine (fluorescence verte). Le contraste a été amplifié.

Détail de la légende de la Figure III.4-3 (voir ci-contre)

Dans chaque ligne ont été représentés des champs d'observations correspondant au même type cellulaire, à savoir des cellules épithéliales (indiquées par une flèche), des vaisseaux (indiqués par un double flèche) et des cellules de type acineuse (indiquées par une flèche pointillée). Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la fluorescéine (fluorescence verte). La fluorescence rouge est due au contre marquage au bleu Evans.

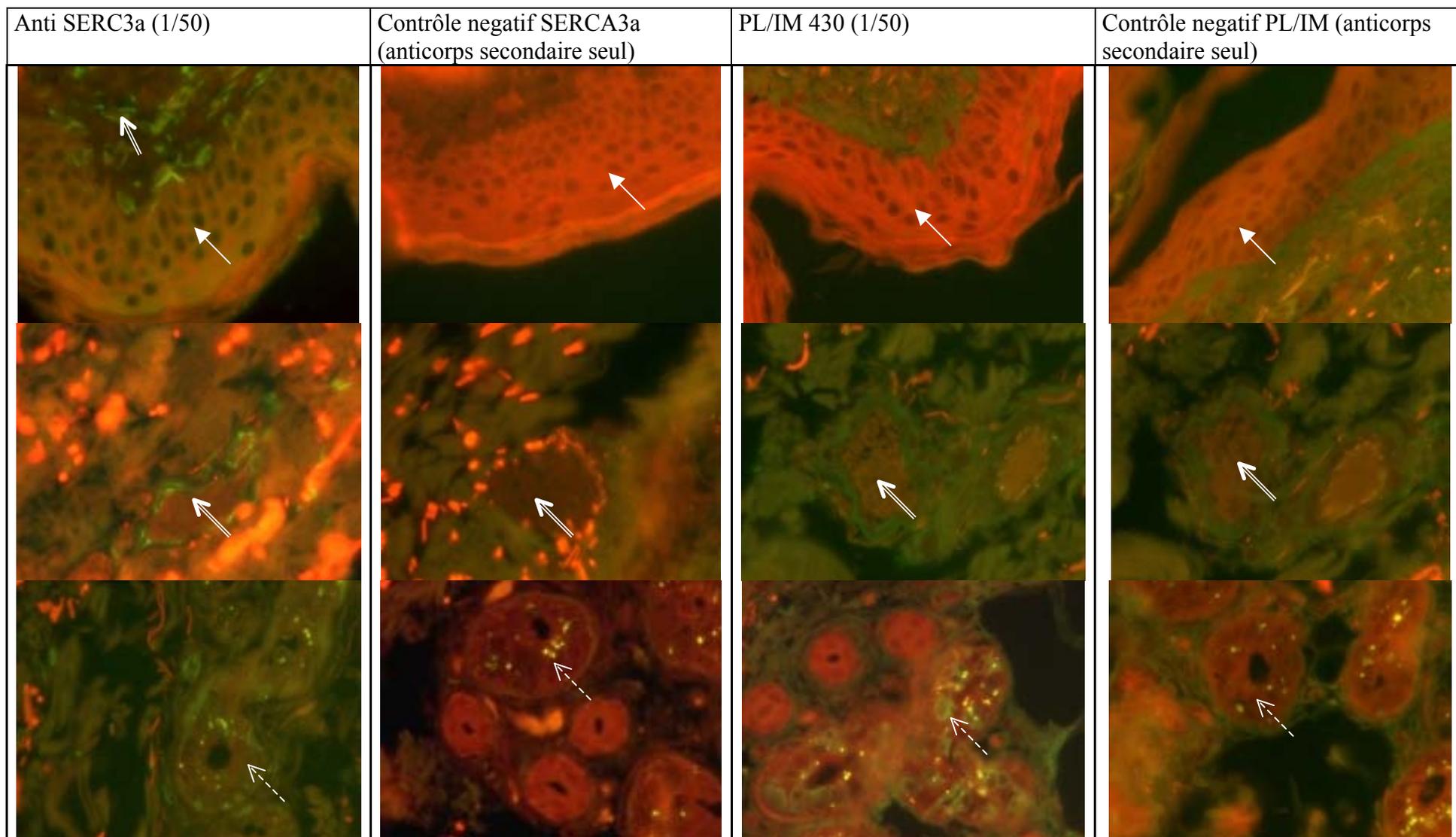


Figure III.4-3 Analyses par microscopie de fluorescence de cryo-coupes (5 μ M d'épaisseur) de peau humaine après perméabilisation au Triton X-100 et marquage par anticorps. (voir le détail de la légende page ci contre).

III.4.3 Discussion

III.4.3.1 Essais d'expression et de purification

Les expériences d'expression de SERCA3 se sont révélées plus difficiles que nous le pensions. Notons que des difficultés d'expression avaient déjà été rencontrées au laboratoire pour l'étude de certains mutants de SERCA1 (*cf.* Lenoir, 2003). Les essais d'amélioration du niveau d'expression de SERCA3a de rat, en particulier ceux menés en additionnant de la biotine au milieu de culture, laissent toutefois un espoir quant à la faisabilité de ce projet.

Au vu des résultats obtenus avec addition de biotine, on peut se demander s'il est possible que la protéine de fusion soit exprimée dans les expériences précédentes mais qu'elle ne soit pas biotinylée. Pour y répondre, il serait nécessaire d'avoir un anticorps anti-SERCA3a de rat suffisamment sensible pour la détecter. Or, les anticorps que nous avons à disposition au laboratoire, dirigés contre la partie N-terminale sont trop peu sensibles pour être utilisés dans les analyses d'expression. Une collaboration avec les équipes d'Anne-Marie LOMPRES et de Jocelyne ENOUF nous a amenés à nous intéresser à la localisation de SERCA3a humaine, pour laquelle des anticorps plus sensibles sont disponibles. Par ailleurs, au cours de ma thèse a été publiée la découverte de 3 nouvelles isoformes SERCA3 humaines, ces papiers démontrant de plus une spécificité entre espèces propre à cette famille d'isoformes (Martin *et al.*, 2002; Bobe *et al.*, 2004). Pour ces raisons, à la fois pratiques et théoriques, nous avons donc décidé de repartir vers l'expression de SERCA3a humaine. Dans ce but, j'ai réalisé la construction décrite dans la partie « Techniques utilisées » (paragraphe II.1.2.1b) page 95). Les premiers essais d'expression de SERCA3a humaine n'ont pas été concluants. Après analyse de la construction réalisée, il s'avère que 17 nucléotides entre le codon STOP après le domaine BAD et la séquence de terminaison de la PGK ont été supprimés. Il faudrait rétablir cette séquence avant de poursuivre plus en avant les essais d'expression de SERCA3a. Une fois la nouvelle construction réalisée, si l'expression de SERCA3a humaine est faible, les tests présentés dans cette thèse pour tenter d'améliorer

l'expression de SERCA3a de rat pourraient donner des pistes pour améliorer l'expression de SERCA3 humaine. L'addition de biotine semble être favorable à l'expression de SERCA3-BAD biotinylée, alors qu'il n'y avait aucun effet sur l'expression de SERCA1-BAD biotinylée (cf. discussion de l'article I). Des variations dans le protocole d'induction pourraient être testées, à l'image de celles qui ont été réalisées pour mettre au point le protocole d'expression de SERCA1a (Lenoir *et al.*, 2002). Signalons cependant que même si le niveau d'expression reste faible, à la lumière des expériences à grande échelle réalisées pour la cristallisation, il semble possible d'utiliser 2 voire 4 L de culture pour réaliser une purification et ainsi obtenir suffisamment de matériel pour des études ultérieures.

En cas de succès de l'expression de SERCA3a, il pourrait être intéressant de purifier les différentes isoformes SERCA3 humaines afin de comparer leurs propriétés biochimiques. Ces propriétés pourraient être comparées à celle de SERCA1a, toutefois il serait également intéressant de les comparer à SERCA2b, isoforme ubiquitaire toujours présente dans les cellules dans lesquelles une ou plusieurs isoformes SERCA3a ont été détectées. Ceci nécessiterait la mise au point de l'expression de SERCA2b également.

III.4.3.2 Localisation cellulaire de SERCA3

Les expériences de microscopie de fluorescence menées sur les coupes de peau montrent que, *in situ*, la protéine SERCA3a humaine a un taux d'expression qui varie suivant les types cellulaires. Par ailleurs, la détection d'un signal par l'anticorps PL/IM 430 dans les cellules acineuses indiquent que les isoformes SERCA3a n'ont pas toutes la même localisation cellulaire *in situ*. Les résultats obtenus avec cet anticorps PL/IM sont toutefois surprenants : en effet, cet anticorps, censé reconnaître toutes les isoformes SERCA3 humaines devrait détecter la présence de SERCA3a. L'anticorps PL/IM 430 est un anticorps monoclonal de souris, dirigé contre les membranes intracellulaires de plaquettes (Hack *et al.*, 1988). Chandrasekera et Lytton, (2003) ont montré que cet anticorps était dirigé contre la partie N-terminale des isoformes SERCA3 humaines et que la proline 8 et le glutamate 192 étaient essentiels pour former l'épitope reconnu par

PL/IM 430. Les auteurs ont proposé que cet anticorps soit un anticorps « conformationnel », capable de distinguer la forme E1Ca₂ de la forme E2. En effet, les mouvements du domaine A au cours du cycle catalytique font que l'épitope de PL/IM 430 est moins accessible dans la conformation E2-TG (*cf.* Figure III.4-4). Selon cette hypothèse et d'après nos résultats présentés Figure III.4-3, il semblerait que les protéines SERCA3a détectées soient majoritairement dans la conformation E2. Ceci soulève la question de savoir pourquoi dans certaines cellules, les isoformes SERCA3 seraient dans une conformation E2, et dans d'autres cellules, dans une conformation E1. Une hypothèse alternative serait qu'une autre protéine masque cet épitope dans certaines cellules.

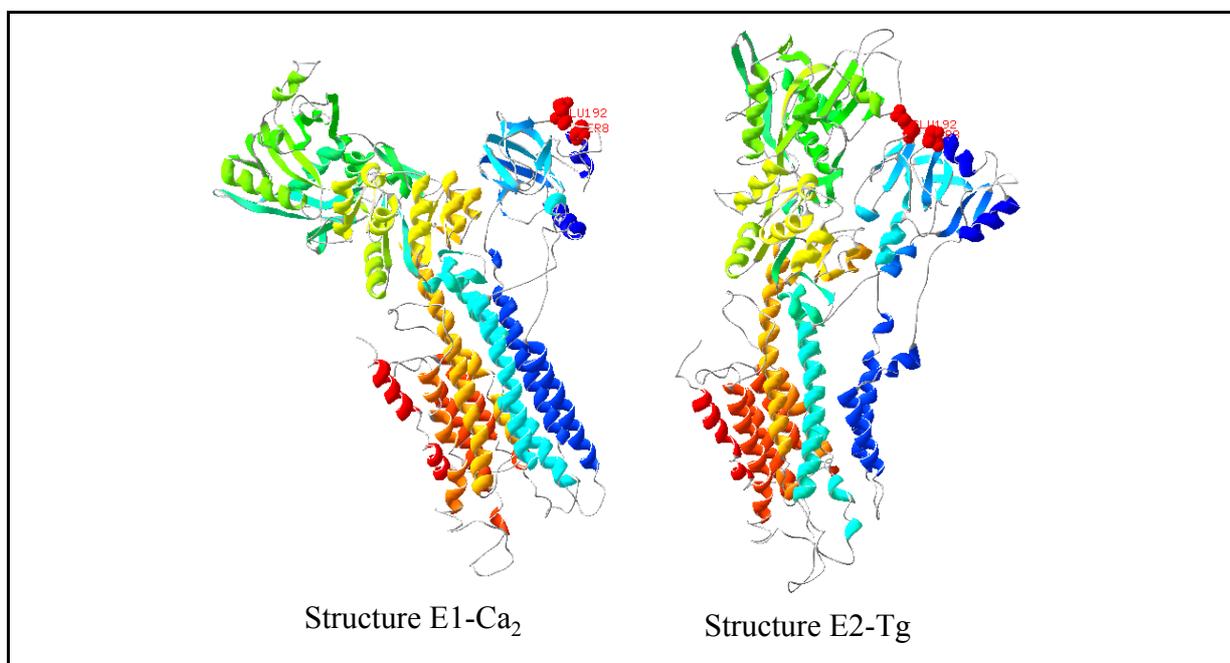


Figure III.4-4 Localisation de l'acide aminé 8 (Sérine) et de l'acide aminé 192 (Glutamate) dans les structures E1-Ca₂ et E2-TG de SERCA1a (figure réalisée avec Martin PICARD)

Les chaînes latérales des acides aminés 8 et 192 sont modélisées par des sphères rouges représentant l'encombrement des atomes.

Peu de groupes ont publié des résultats sur la localisation cellulaire des isoformes SERCA. L'équipe de Jocelyne Enouf s'est intéressée à la localisation subcellulaire des isoformes SERCA2b et SERCA3 dans la plaquette. Des observations en microscopie électronique leur ont permis de montrer que, dans les plaquettes au repos, les isoformes SERCA3 reconnues par PL/IM 430 seraient localisées près de la membrane plasmique. Un point intéressant soulevé par leurs travaux est qu'après activation des plaquettes, les isoformes reconnues par PL/IM 430 ne seraient plus observées proche de la membrane plasmique et seraient relocalisées dans le cytoplasme. A la lumière des résultats de Chandrasekera et Lytton, une autre interprétation de ces résultats seraient que les isoformes SERCA3 localisées à proximité de la membrane plasmique auraient changé de conformation. Selon l'hypothèse alternative proposée plus haut pour expliquer la non-reconnaissance des isoformes SERCA3a par l'anticorps PL/IM 430, une troisième interprétation serait que l'interaction entre la protéine SERCA3 et une autre protéine masquant l'épitope de PL/IM430 soit modifiée. Les travaux de l'équipe de Muallem réalisées sur les cellules des glandes salivaires et des glandes pancréatiques apportent également des arguments en faveur d'une localisation particulière des isoformes SERCA3 (Lee *et al.*, 1997). Les auteurs montrent que les isoformes SERCA3, détectées avec l'anticorps N89, ne sont pas présentes dans tous les types cellulaires de la glande et qu'à l'échelle cellulaire, contrairement à l'expression de SERCA2b, l'expression de SERCA3 serait polarisée, SERCA3a étant principalement observée au niveau du pôle basal.

Il serait intéressant d'avoir des données supplémentaires sur la localisation subcellulaire *in situ* des isoformes SERCA3. L'intensité du signal observée en microscopie de fluorescence dans les cellules endothéliales de la peau après immunomarquage avec l'anticorps anti-SERCA3a fait qu'il est envisageable de passer à l'échelle sub-microscopique grâce à des analyses par microscopie électronique. Il serait intéressant de détecter également l'isoforme SERCA2b dans ces mêmes cellules. Etant donné les expériences de Liu *et al.* (1997), démontrant une relation entre SERCA3 et la signalisation par le NO chez la souris (voir le paragraphe dans le chapitre d'introduction)

il pourrait être intéressant de regarder la localisation de la NO-synthase dans ces mêmes cellules.

Le fait que l'anticorps PL/IM se révèle être un anticorps conformationnel peut en faire un outil intéressant pour établir éventuellement une relation structure/fonction/localisation. Il serait intéressant de regarder dans d'autres types cellulaires que les plaquettes si la modification de l'état d'activation de la cellule influence un changement de conformation E1/E2, voire la localisation des pompes SERCA3 suivant leur conformation. Mais ce type d'expérience suppose de trouver des lignées cellulaires exprimant SERCA3 à un taux suffisamment élevé pour permettre des analyses à l'échelle subcellulaire.

Chapitre IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Expression et purification des isoformes SERCA

L'utilisation du protocole d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* mis au point par Lenoir *et al.* (2002) a permis d'obtenir de bons rendements d'expression de SERCA1a-BAD et de SERCA1a-E309Q-BAD. De manière inattendue, nous avons rencontré des difficultés lors de l'expression de SERCA3a de rat. Des expériences visant à améliorer cette expression ont donc été entreprises. Me calquant sur les expériences réalisées par Lenoir *et al.* (2002) pour améliorer le protocole d'expression initial (*cf.* Centeno *et al.*, 1994), j'ai fait varier les conditions d'induction. Stolz et ses collaborateurs ayant montré l'influence de l'ajout de biotine dans le milieu lors de l'expression d'une protéine étiquetée « BAD » (Stolz *et al.*, 1995), nous avons testé une complémentation du milieu en biotine, bien que cette complémentation n'ait eu aucun effet sur l'expression/biotinylation de SERCA1a-BAD (résultats non publiés du laboratoire). Cet ajout a amélioré l'expression de la protéine de fusion biotinylée. Faute d'analyses plus poussées, nous ne sommes pas capables de dire si cet ajout de biotine joue sur l'expression ou sur la biotinylation uniquement. D'autres auteurs ont tenté d'améliorer l'expression de leur protéine d'intérêt en ajoutant au milieu de culture des « chaperons chimiques » (notion introduite par Welch et Brown, 1996). Dans le cas d'expression chez *S. cerevisiae*, il a été montré que le glycérol pouvait favoriser l'expression de la protéine exogène (voir par exemple le cas de la P-gp décrit par Figler *et al.*, 2000). D'autres chaperons chimiques sont connus (d'autres polyols, des triméthylamines... *cf.* Perlmutter, 2002); ces chaperons chimiques peuvent être le ligand même de l'enzyme. Ainsi, Portmann et Solioz, 2005), ont favorisé l'expression fonctionnelle de l'ATPase Cu chez *S. cerevisiae* en ajoutant du cuivre dans le milieu de culture. L'utilisation de tels chaperons chimiques pourrait être envisagé pour améliorer l'expression chez *S. cerevisiae* de SERCA3, voire de SERCA1.

Le protocole de purification par la méthode « biotine », mis au point au cours de cette thèse, s'avère efficace pour la purification de l'ATPase Ca^{2+} du réticulum. Pour SERCA1a, cette stratégie de purification est meilleure que la stratégie de purification « Histidine » car elle permet d'obtenir une protéine plus active. Une hypothèse que nous

avançons pour expliquer cette différence est que l'étape de biotinylation *in vivo* sélectionne des protéines de fusion correctement conformées, donc plus actives. Une autre hypothèse, non exclusive, est que, dans le cas de SERCA, la purification par la méthode « Histidine » dénature la protéine. La stratégie « biotine » pourrait être employée pour la purification d'autres protéines membranaires, sous réserve que la protéine de fusion biotinylée soit exprimée. Dans ce cas, des adaptations du protocole devront sans doute être apportées dans les étapes de solubilisation et de coupure par la protéase, ces deux étapes dépendant de la protéine d'intérêt. L'essai de purification de SERCA3a de rat laisse supposer que cette méthode est applicable même en cas de faible taux d'expression.

Cristallisation des protéines recombinantes SERCA1a sauvage et SERCA1a-E309Q

Les essais de cristallisation réalisée sur la protéine SERCA1a, purifiée après son expression hétérologue chez *S. cerevisiae* ont abouti à l'obtention de cristaux diffractant les rayons X à 3,1 Å. La structure déduite de l'analyse du profil de diffraction obtenu à 3,4 Å est similaire de la structure obtenue à partir de cristaux de l'ATPase native du SR formés dans les mêmes conditions (+ Ca²⁺ + AMPPCP). Ce travail et celui réalisé sur la canal potassium de rat par Long *et al.* (2005) sont les premiers exemples de réussite d'obtention de structures à partir de protéines membranaires mammaliennes purifiées après leur expression en système hétérologue. De nombreuses équipes cherchent également à obtenir des structures 3D de protéines membranaires mammaliennes après expression hétérologue. Selon nous, notre réussite s'explique en partie par la bonne activité spécifique de la préparation protéique utilisée pour les essais de cristallisation. Nous avons également bien sûr bénéficié de l'expérience acquise par les équipes de Poul Nissen et Jesper Møller quant à la cristallisation de SERCA1a, ce qui nous a évité de tester de nombreuses conditions de cristallisation.

Les résultats obtenus avec la protéine sauvage ont ouvert la voie à l'étude de mutants, avec pour objectif l'obtention d'informations structurales sur d'autres états

conformationnels de l'enzyme. Le mutant choisi, E309Q, est suspecté ne fixer qu'un seul ion Ca^{2+} . L'obtention de la structure du mutant en présence de Ca^{2+} pourrait donc permettre d'avoir une image de l'état conformationnel E1- Ca_1 . Les résultats obtenus avec le mutant E309Q sont prometteurs puisque des cristaux ont été observés. Ces cristaux, plus petits que ceux obtenus dans le cas de SERCA1a purifiée, n'ont pas encore été analysés au synchrotron. Il a toutefois été plus difficile d'obtenir des cristaux du mutant. Nous avons dû tester beaucoup plus de conditions que pour obtenir des cristaux de SERCA1a sauvage purifiée. Ceci peut être dû au fait que les conditions de cristallisation varient suivant l'état conformationnel de la protéine. Une hypothèse alternative serait que ce mutant soit moins stable que la protéine sauvage. En effet, le Ca^{2+} est connu pour stabiliser la protéine sauvage or le mutant E309Q est justement un mutant du site calcium.

D'autres mutants sont actuellement en préparation au laboratoire.

Localisation cellulaire in situ de SERCA3

Les isoformes SERCA3 sont toujours exprimées dans des cellules exprimant également l'isoforme SERCA2b. En parallèle à des études biochimiques, la connaissance de la localisation cellulaire pourrait aider à comprendre la fonction de ces isoformes. Ce type d'études implique de pouvoir détecter les protéines en microscopie. Les travaux préliminaires présentés dans ma thèse montrent que dans la peau humaine, les cellules endothéliales sont les seules à exprimer l'isoforme SERCA3a à un taux suffisamment élevé pour qu'il soit envisageable de les détecter avec l'anticorps anti-SERCA3a en microscopie électronique. Il serait intéressant d'analyser d'autres tissus, comme par exemple le poumon et le pancréas, dans lesquels un fort taux d'ARNm SERCA3a a été décelé (cf. Figure I.2-4 page 29 et Martin *et al.*, 2002).

Ces études de localisation cellulaire pourraient également permettre de chercher de potentiels partenaires des SERCA3 ou du moins d'impliquer ces SERCAs dans une voie de signalisation calcique donnée. Etant donné les résultats publiés par Liu *et al.* (1997), il serait intéressant de comparer la localisation de SERCA3 et de la NOS. S'il était

montré que ces deux protéines étaient co-localisées, il serait possible d'associer SERCA3 à la voie de signalisation calcique impliquée dans l'activation de la NOS.

L'homéostasie du calcium intracellulaire est la résultante complexe de mécanismes impliquant des systèmes diminuant, tamponnant ou augmentant la concentration calcique intracellulaire. La connaissance fonctionnelle et structurale de chacun de ses composants aide à comprendre comment la cellule peut créer et réguler un signal calcique. Il est maintenant admis que les signaux calciques ont une délimitation temporelle mais également spatiale. L'étude de la localisation cellulaire des différents composants intervenant dans ces signaux est donc un aspect important.

Tels les SERCAs, de nombreux composants intervenant dans cette signalisation calcique présentent plusieurs isoformes (Berridge *et al.*, 2003). La compréhension du signal Ca^{2+} passe par l'étude de la fonction, de la structure et de la localisation de chacune de ces isoformes. La localisation des isoformes peu abondantes reste difficile, mais les travaux présentés dans ma thèse peuvent aider à étudier leur fonction et leur structure, après expression hétérologue et purification.

Chapitre V : BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, J. P.** (1995). "Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by site-directed mutagenesis." Biosci Rep **15**(5): 243-61.
- Andersen, J. P. and Vilsen, B.** (1992). "Functional consequences of alterations to Glu309, Glu771, and Asp800 in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **267**(27): 19383-7.
- Andersen, J. P. and Vilsen, B.** (1994). "Amino acids Asn796 and Thr799 of the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum bind Ca²⁺ at different sites." J Biol Chem **269**(22): 15931-6.
- Asano, S., Tega, Y., Konishi, K., Fujioka, M. and Takeguchi, N.** (1996). "Functional expression of gastric H⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and site-directed mutagenesis of the putative cation binding site and catalytic center." J Biol Chem **271**(5): 2740-5.
- Beckett, D., Kovaleva, E. and Schatz, P. J.** (1999). "A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation." Protein Sci **8**(4): 921-9.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L.** (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.
- Berrier, C., Park, K. H., Abes, S., Bibonne, A., Betton, J. M. and Ghazi, A.** (2004). "Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent." Biochemistry **43**(39): 12585-91.
- Bhat, P. J. and Murthy, T. V.** (2001). "Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction." Mol Microbiol **40**(5): 1059-66.
- Bobé, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J. P., Clausen, J. D., Dode, L., Kovacs, T. and Enouf, J.** (2004). "Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 gene." J Biol Chem **279**(23): 24297-306.
- Bowie, J. U.** (2001). "Stabilizing membrane proteins." Curr Opin Struct Biol **11**(4): 397-402.
- Brandl, C. J., deLeon, S., Martin, D. R. and MacLennan, D. H.** (1987). "Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle." J Biol Chem **262**(8): 3768-74.
- Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B. and MacLennan, D. H.** (1986). "Two Ca²⁺ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences." Cell **44**(4): 597-607.

- Breyton, C.** (2004). Manipulation des protéines membranaires : rappels sur l'utilisation des détergents. Atelier du GDR 2478, Saulieu 24-27 octobre 2004
- Buhle, E. L., Jr., Knox, B. E., Serpersu, E. and Aebi, U.** (1983). "The structure of the Ca²⁺ ATPase as revealed by electron microscopy and image processing of ordered arrays." J Ultrastruct Res **85**(2): 186-203.
- Burk, S. E., Lytton, J., MacLennan, D. H. and Shull, G. E.** (1989). "cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump." J Biol Chem **264**(31): 18561-8.
- Centeno, F., Deschamps, S., Lompre, A. M., Anger, M., Moutin, M. J., Dupont, Y., Palmgren, M. G., Villalba, J. M., Møller, J. V., Falson, P. and et al.** (1994). "Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in yeast." FEBS Lett **354**(1): 117-22.
- Cereghino, J. L. and Cregg, J. M.** (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." FEMS Microbiology Reviews **24**(1): 45-66.
- Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J. L. and le Maire, M.** (2000). "Interaction of amphipols with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." J Biol Chem **275**(25): 18623-37.
- Chandrasekera, C. P. and Lytton, J.** (2003). "Inhibition of human SERCA3 by PL/IM430. Molecular analysis of the interaction." J Biol Chem **278**(14): 12482-8.
- Chang, G. and Roth, C. B.** (2001). "Structure of MsbA from *E. coli*: A Homolog of the Multidrug Resistance ATP Binding Cassette (ABC) Transporters." Science **293**(5536): 1793-1800.
- Chapman-Smith, A. and Cronan, J. E., Jr.** (1999). "Molecular biology of biotin attachment to proteins." J Nutr **129**(2S Suppl): 477S-484S.
- Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. and MacLennan, D. H.** (1989). "Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." Nature **339**(6224): 476-8.
- Codina, J., Kone, B. C., Delmas-Mata, J. T. and DuBose, T. D., Jr.** (1996). "Functional expression of the colonic H⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit. Pharmacologic properties and assembly with X⁺,K⁺-ATPase beta-subunits." J Biol Chem **271**(47): 29759-63.
- Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D. M., Ebel, C., le Maire, M. and Karlisch, S. J. D.** (2005). "Purification of Na⁺,K⁺-ATPase Expressed in

- Pichia pastoris Reveals an Essential Role of Phospholipid-Protein Interactions." J. Biol. Chem. **280**(17): 16610-16618.
- Coll, R. J. and Murphy, A. J. (1984). "Purification of the CaATPase of sarcoplasmic reticulum by affinity chromatography." J Biol Chem **259**(22): 14249-54.
- Consler, T. G., Persson, B. L., Jung, H., Zen, K. H., Jung, K., Prive, G. G., Verner, G. E. and Kaback, H. R. (1993). "Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 6934-8.
- Cornelius, F. and Møller, J. V. (1991). "Electrogenic pump current of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase reconstituted at high lipid/protein ratio." FEBS Lett **284**(1): 46-50.
- Corre, F., Bouneau, L., le Maire, M. and Falson, P. (1997). "Improvement of the Spun Column Procedure to Purify Plasmid DNA." International Journal of Bio-Chromatography **3**(2): 137-142.
- Crambert, G., Schaer, D., Roy, S. and Geering, K. (2004). "New molecular determinants controlling the accessibility of ouabain to its binding site in human Na,K-ATPase alpha isoforms." Mol Pharmacol **65**(2): 335-41.
- Cronan, J. E., Jr. (1990). "Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins." J Biol Chem **265**(18): 10327-33.
- Dahout-Gonzalez, C., Brandolin, G. and Pebay-Peyroula, E. (2003). "Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **59**(Pt 12): 2353-5.
- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H. and Toyoshima, C. (2001). "Organization of cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in E(1)P and E(1)ATP states: a limited proteolysis study." FEBS Lett **505**(1): 129-35.
- de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F. and Strouboulis, J. (2003). "Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7480-5.
- de Carvalho Aguiar, P., Sweadner, K. J., Penniston, J. T., Zaremba, J., Liu, L., Caton, M., Linazasoro, G., Borg, M., Tijssen, M. A., Bressman, S. B., Dobyns, W. B., Brashear, A. and Ozelius, L. J. (2004). "Mutations in the Na⁺/K⁺ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism." Neuron **43**(2): 169-75.

- de Meis, L. and Vianna, A. L.** (1979). "Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum." Annu Rev Biochem **48**: 275-92.
- Devauchelle, G. and C erutti, M.** Les baculovirus d'insectes, vecteurs d'expression de g enes étrangers. <http://www.univ-montp1.fr/biotech/Baculovirus/BaculoContenu.htm> (version du 30/11/2000)
- Dode, L., Vilsen, B., Van Baelen, K., Wuytack, F., Clausen, J. D. and Andersen, J. P.** (2002). "Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses." J Biol Chem **277**(47): 45579-91.
- Dode, L., Wuytack, F., Kools, P. F., Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Brike, F., van de Ven, W. J. and Casteels, R.** (1996). "cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3 gene." Biochem J **318** (Pt 2): 689-99.
- Drew, D. E., von Heijne, G., Nordlund, P. and de Gier, J. W.** (2001). "Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in Escherichia coli." FEBS Lett **507**(2): 220-4.
- Dupont, Y.** (1980). "Occlusion of divalent cations in the phosphorylated calcium pump of sarcoplasmic reticulum." Eur J Biochem **109**(1): 231-8.
- East, J. M.** (2000). "Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure/function and biology (review)." Mol Membr Biol **17**(4): 189-200.
- Ebashi, S.** (1958). "A granule-bound relaxation factor in skeletal muscle." Arch Biochem Biophys **76**(2): 410-23.
- Elbaz, Y., Steiner-Mordoch, S., Danieli, T. and Schuldiner, S.** (2004). "In vitro synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1519-24.
- Esmann, M. and Skou, J. C.** (1984). "Kinetic properties of C12E8-solubilized (Na⁺ + K⁺)-ATPase." Biochim Biophys Acta **787**(1): 71-80.
- Fiermonte, G., Walker, J. E. and Palmieri, F.** (1993). "Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria." Biochemical Journal **294**(1): 293-299.
- Figler, R. A., Omote, H., Nakamoto, R. K. and Al-Shawi, M. K.** (2000). "Use of Chemical Chaperones in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* to Enhance

- Heterologous Membrane Protein Expression: High-Yield Expression and Purification of Human P-Glycoprotein." Archives of Biochemistry and Biophysics **376**(1): 34-46.
- Fuentes, J. M., Lompre, A. M., Møller, J. V., Falson, P. and le Maire, M.** (2000). "Clean Western blots of membrane proteins after yeast heterologous expression following a shortened version of the method of Perini et al." Anal Biochem **285**(2): 276-8.
- Geering, K., Beguin, P., Garty, H., Karlsh, S., Fuzesi, M., Horisberger, J. D. and Crambert, G.** (2003). "FXYP proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase." Ann NY Acad Sci **986**: 388-94.
- Gelebart, P., Kovacs, T., Brouland, J. P., van Gorp, R., Grossmann, J., Rivard, N., Panis, Y., Martin, V., Bredoux, R., Enouf, J. and Papp, B.** (2002). "Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation." J Biol Chem **277**(29): 26310-20.
- Gelebart, P., Martin, V., Enouf, J. and Papp, B.** (2003). "Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation." Biochem Biophys Res Commun **303**(2): 676-84.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H.** (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." Nucleic Acids Res **20**(6): 1425.
- Giga-Hama, Y. and Kumagai, H.** (1999). "Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Biotechnol Appl Biochem **30** (Pt 3): 235-44.
- Gohon, Y. and Popot, J. L.** (2003). "Membrane protein-surfactant complexes." Current Opinion in Colloid & Interface Science **8**(1): 15-22.
- Green, N. M. and Stokes, D. L.** (1992). "Structural modelling of P-type ion pumps." Acta Physiol Scand Suppl **607**: 59-68.
- Grishin, A. V. and Caplan, M. J.** (1998). "ATP1A1, a Member of the Non-gastric H,K-ATPase Family, Functions as a Sodium Pump." J. Biol. Chem. **273**(43): 27772-27778.
- Grisshammer, R. and Tucker, J.** (1997). "Quantitative evaluation of neurotensin receptor purification by immobilized metal affinity chromatography." Protein Expr Purif **11**(1): 53-60.

- Grover, A. K., Kwan, C. Y. and Samson, S. E.** (2003). "Effects of peroxynitrite on sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump isoforms SERCA2b and SERCA3a." Am J Physiol Cell Physiol **285**(6): C1537-43.
- Guerini, D.** (1998). "The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase." Cell Tissue Res **292**(2): 191-7.
- Guerini, D., Pan, B. and Carafoli, E.** (2003). "Expression, purification, and characterization of isoform 1 of the plasma membrane Ca²⁺ pump: focus on calpain sensitivity." J Biol Chem **278**(40): 38141-8.
- Hack, N., Wilkinson, J. M. and Crawford, N.** (1988). "A monoclonal antibody (PL/IM 430) to human platelet intracellular membranes which inhibits the uptake of Ca²⁺ without affecting the Ca²⁺ +Mg²⁺-ATPase." Biochem J **250**(2): 355-61.
- Hasselbach, W. and Makinose, M.** (1961). "[The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting]." Biochem Z **333**: 518-28.
- Heegaard, C., le Maire, M., Gulik-Krzywicki, T. and Møller, J.** (1990). "Monomeric state and Ca²⁺ transport by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase, reconstituted with an excess of phospholipid." J. Biol. Chem. **265**(20): 12020-12028.
- Hochuli, E.** (1988). "Large-scale chromatography of recombinant proteins." J Chromatogr **444**: 293-302.
- Hockney, R. C.** (1994). "Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli." Trends Biotechnol **12**(11): 456-63.
- Hovnanian, A.** (2004). "Darier's disease: from dyskeratosis to endoplasmic reticulum calcium ATPase deficiency." Biochemical and Biophysical Research Communications **322**(4): 1237-1244.
- Howard, E. M. and Roepe, P. D.** (2003). "Purified human MDR 1 modulates membrane potential in reconstituted proteoliposomes." Biochemistry **42**(12): 3544-55.
- Hu, Y. K., Eisses, J. F. and Kaplan, J. H.** (2000). "Expression of an active Na,K-ATPase with an alpha-subunit lacking all twenty-three native cysteine residues." J Biol Chem **275**(39): 30734-9.
- Inesi, G.** (1987). "Sequential mechanism of calcium binding and translocation in sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase." J Biol Chem **262**(34): 16338-42.

- Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C. and Lewis, D. E.** (1980). "Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles." J Biol Chem **255**(7): 3025-31.
- Ishihara, G., Goto, M., Saeki, M., Ito, K., Hori, T., Kigawa, T., Shirouzu, M. and Yokoyama, S.** (2005). "Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors." Protein Expression and Purification **41**(1): 27-37.
- Jenny, R. J., Mann, K. G. and Lundblad, R. L.** (2003). "A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa." Protein Expression and Purification **31**(1): 1-11.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R.** (2003). "X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel." **423**(6935): 33-41.
- Jidenko, M., Nielsen, R. C., Sørensen, T. L., Møller, J. V., le Maire, M., Nissen, P. and Jaxel, C.** (2005). "Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11687-91.
- Johnston, M.** (1999). "Feasting, fasting and fermenting: glucose sensing in yeast and other cells." Trends in Genetics **15**(1): 29-33.
- Julien, M., Kajiji, S., Kaback, R. H. and Gros, P.** (2000). "Simple purification of highly active biotinylated P-glycoprotein: enantiomer-specific modulation of drug-stimulated ATPase activity." Biochemistry **39**(1): 75-85.
- Kao, J., Fortner, C. N., Liu, L. H., Shull, G. E. and Paul, R. J.** (1999). "Ablation of the SERCA3 gene alters epithelium-dependent relaxation in mouse tracheal smooth muscle." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): L264-70.
- Kaplan, J. H.** (2002). "Biochemistry of Na,K-ATPase." Annu Rev Biochem **71**: 511-35.
- Kempf, J., Snook, L. A., Vonesch, J. L., Dahms, T. E., Pattus, F. and Massotte, D.** (2002). "Expression of the human mu opioid receptor in a stable Sf9 cell line." J Biotechnol **95**(2): 181-7.
- Kim, H. S., Hoja, U., Stolz, J., Sauer, G. and Schweizer, E.** (2004). "Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of in vivo biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **279**(41): 42445-52.

- Kim, T. K., Zhang, R., Feng, W., Cai, J., Pierce, W. and Song, Z. H. (2005). "Expression and characterization of human CB1 cannabinoid receptor in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif **40**(1): 60-70.
- Klaassen, C. H., Van Uem, T. J., De Moel, M. P., De Caluwe, G. L., Swarts, H. G. and De Pont, J. J. (1993). "Functional expression of gastric H,K-ATPase using the baculovirus expression system." FEBS Lett **329**(3): 277-82.
- Klammt, C., Lohr, F., Schafer, B., Haase, W., Dotsch, V., Ruterjans, H., Glaubitz, C. and Bernhard, F. (2004). "High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins." Eur J Biochem **271**(3): 568-80.
- Kovacs, T., Felfoldi, F., Papp, B., Paszty, K., Bredoux, R., Enyedi, A. and Enouf, J. (2001). "All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells." Biochem J **358**(Pt 3): 559-68.
- Kraut, J. A., Helander, K. G., Helander, H. F., Iroezi, N. D., Marcus, E. A. and Sachs, G. (2001). "Detection and localization of H⁺-K⁺-ATPase isoforms in human kidney." Am J Physiol Renal Physiol **281**(4): F763-768.
- Kuhlbrandt, W. (2004). "Biology, structure and mechanism of P-type ATPases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(4): 282-95.
- le Maire, M. (1997). "Prix Nobel de chimie 1997 : Paul D. Boyer (CA, USA), John E. Walker (Cambridge, GB), Jens Skou (Aarhus, Danemark) . L'identification de la première ATPase de type P, responsable d'un transport actif d'ions, l'ATPase Na⁺-K⁺." médecine/sciences vol. **13**(n°12): pp.1528.
- le Maire, M., Champeil, P. and Møller, J. V. (2000). "Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents." Biochim Biophys Acta **1508**(1-2): 86-111.
- le Maire, M., Lind, K. E., Jorgensen, K. E., Roigaard, H. and Møller, J. V. (1978). "Enzymatically active Ca²⁺ ATPase from sarcoplasmic reticulum membranes, solubilized by nonionic detergents. Role of lipid for aggregation of the protein." J Biol Chem **253**(19): 7051-60.
- le Maire, M., Lund, S., Viel, A., Champeil, P. and Møller, J. V. (1990). "Ca²⁺(+)-induced conformational changes and location of Ca²⁺ transport sites in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase as detected by the use of proteolytic enzyme (V8)." J Biol Chem **265**(2): 1111-23.

- le Maire, M., Møller, J. V. and Tanford, C.** (1976). "Retention of enzyme activity by detergent-solubilized sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase." Biochemistry **15**(11): 2336-42.
- Lee, M. G., Xu, X., Zeng, W., Diaz, J., Kuo, T. H., Wuytack, F., Racymaekers, L. and Muallem, S.** (1997). "Polarized expression of Ca²⁺ pumps in pancreatic and salivary gland cells. Role in initiation and propagation of [Ca²⁺]_i waves." J Biol Chem **272**(25): 15771-6.
- Lenoir, G.** (2003). Etude des changements de conformation de l'ATPase-Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique (SERCA1) associés à la fixation et au transport de Ca²⁺. Thèse de l'Université Paris XI, Ecole doctorale "Signalisations Cellulaire, Endocrinologie, Reproduction".
- Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thines, D., le Maire, M. and Falson, P.** (2002). "Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca(2+)-ATPase." Biochim Biophys Acta **1560**(1-2): 67-83.
- Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J. and Tan, S.** (2005). "Comparison of affinity tags for protein purification." Protein Expr Purif **41**(1): 98-105.
- Liu, L. H., Paul, R. J., Sutliff, R. L., Miller, M. L., Lorenz, J. N., Pun, R. Y., Duffy, J. J., Doetschman, T., Kimura, Y., MacLennan, D. H., Hoying, J. B. and Shull, G. E.** (1997). "Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca²⁺ signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3." J Biol Chem **272**(48): 30538-45.
- Lohr, D., Venkov, P. and Zlatanova, J.** (1995). "Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network." FASEB J. **9**(9): 777-787.
- Long, S. B., Campbell, E. B. and Mackinnon, R.** (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel." Science **309**(5736): 897-903.
- Lutsenko, S., Barnes, N. and Tsivkovskii, R.** (2005a). "Function and regulation of human copper-transporting ATPases, the Menkes disease and Wilson disease proteins." Journal of General Physiology **126**(1): 7a-7a.
- Lutsenko, S., Barnes, N. and Tsivkovskii, R.** (2005b). Function and regulation of human copper-transporting ATPases, the Menkes disease and Wilson disease proteins. 11th International ATPase Conference and 59th Annual Meeting and

Symposium of the Society of General Physiologists, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts.

- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E. and MacLennan, D. H. (1992).** "Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps." J Biol Chem **267**(20): 14483-9.
- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M. R. (1991).** "Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps." J Biol Chem **266**(26): 17067-71.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. and Harvey, L. M. (2005).** "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system." Yeast **22**(4): 249-70.
- MacLennan, D. H., Asahi, M. and Tupling, A. R. (2003).** "The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin." Ann N Y Acad Sci **986**: 472-80.
- MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B. and Green, N. M. (1985).** "Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence." Nature **316**(6030): 696-700.
- MacLennan, D. H. and Green, N. M. (2000).** "Structural biology. Pumping ions." Nature **405**(6787): 633-4.
- MacLennan, D. H., Rice, W. J. and Green, N. M. (1997).** "The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases." J Biol Chem **272**(46): 28815-8.
- MacLennan, D. H., Toyofuku, T. and Lytton, J. (1992).** "Structure-function relationships in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca²⁺ pumps." Ann N Y Acad Sci **671**: 1-10.
- Makinose, M. (1973).** "Possible functional states of the enzyme of the sarcoplasmic calcium pump." FEBS Lett **37**(2): 140-3.
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovacs, T., Gelebart, P. and Enouf, J. (2002).** "Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family." J Biol Chem **277**(27): 24442-52.
- Maruyama, K. and MacLennan, D. H. (1988).** "Mutation of Aspartic Acid-351, Lysine-352, and Lysine-515 Alters the Ca²⁺ Transport Activity of the Ca²⁺-ATPase Expressed in COS-1 Cells." PNAS **85**(10): 3314-3318.

- Masuda, H. and de Meis, L.** (1973). "Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum membrane by orthophosphate. Inhibition by calcium ions." Biochemistry **12**(23): 4581-5.
- McGregor, C. L., Chen, L., Pomroy, N. C., Hwang, P., Go, S., Chakrabartty, A. and Prive, G. G.** (2003). "Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane proteins." Nat Biotechnol **21**(2): 171-6.
- Miras, R., Cuillel, M., Catty, P., Guillain, F. and Mintz, E.** (2001). "Purification of heterologous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase Serca1a allowing phosphoenzyme and Ca²⁺-affinity measurements." Protein Expr Purif **22**(2): 299-306.
- Miroux, B. and Walker, J. E.** (1996). "Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J Mol Biol **260**(3): 289-98.
- Missiaen, L., Raeymaekers, L., Dode, L., Vanoevelen, J., Van Baelen, K., Parys, J. B., Callewaert, G., De Smedt, H., Segaert, S. and Wuytack, F.** (2004). "SPCA1 pumps and Hailey-Hailey disease." Biochem Biophys Res Commun **322**(4): 1204-13.
- Mohanty, A. K. and Wiener, M. C.** (2004). "Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position." Protein Expression and Purification **33**(2): 311-325.
- Møller, J. V., Juul, B. and le Maire, M.** (1996). "Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases." Biochim Biophys Acta **1286**(1): 1-51.
- Møller, J. V. and le Maire, M.** (1993). "Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins." J Biol Chem **268**(25): 18659-72.
- Møller, J. V., Nissen, P., Sørensen, T. L. and le Maire, M.** (2005). "Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase pump." Curr Opin Struct Biol.
- Mus-Veteau, i.** (2002). "Heterologous expression and purification systems for structural proteomics of mammalian membrane proteins." Comp. Funct. Genom. **3**: 511-517.
- Nielsen, G., Malmendal, A., Meissner, A., Møller, J. V. and Nielsen, N. C.** (2003). "NMR studies of the fifth transmembrane segment of sarcoplasmic

reticulum Ca²⁺-ATPase reveals a hinge close to the Ca²⁺-ligating residues." FEBS Lett **544**(1-3): 50-6.

Odermatt, A., Taschner, P. E. M., Khanna, V. K., Busch, H. F. M., Karpati, G., Jablecki, C. K., Breuning, M. H. and MacLennan, D. H. (1996). "Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca ATPase, are associated with Brody disease." Nature Genetics **14**(2): 191-194.

Olesen, C., Sørensen, T. L., Nielsen, R. C., Møller, J. V. and Nissen, P. (2004). "Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion." Science **306**(5705): 2251-5.

Palmgren, M. G. and Axelsen, K. B. (1998). "Evolution of P-type ATPases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1365**(1-2): 37-45.

Papp, B., Enyedi, A., Kovacs, T., Sarkadi, B., Wuytack, F., Thastrup, O., Gardos, G., Bredoux, R., Levy-Toledano, S. and Enouf, J. (1991). "Demonstration of two forms of calcium pumps by thapsigargin inhibition and radioimmunoblotting in platelet membrane vesicles." J Biol Chem **266**(22): 14593-6.

Papp, B., Enyedi, A., Paszty, K., Kovacs, T., Sarkadi, B., Gardos, G., Magnier, C., Wuytack, F. and Enouf, J. (1992). "Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radio-immunoblotting and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone." Biochem J **288** (Pt 1): 297-302.

Parcej, D. N. and Eckhardt-Strelau, L. (2003). "Structural characterisation of neuronal voltage-sensitive K⁺ channels heterologously expressed in *Pichia pastoris*." J Mol Biol **333**(1): 103-16.

Paulusma, C. C. and Oude Elferink, R. P. (2005). "The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease." Biochim Biophys Acta **1741**(1-2): 11-24.

Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. and Brandolin, G. (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." Nature **426**(6962): 39-44.

Pedersen, P. A., Rasmussen, J. H. and Jørgensen, P. L. (1996). "Expression in High Yield of Pig alpha1beta1 Na,K-ATPase and Inactive Mutants D369N and D807N in *Saccharomyces cerevisiae*." J. Biol. Chem. **271**(5): 2514-2522.

- Penefsky, H. S.** (1977). "Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase." J. Biol. Chem. **252**(9): 2891-2899.
- Perlmutter, D. H.** (2002). "Chemical Chaperones: A Pharmacological Strategy for Disorders of Protein Folding and Trafficking." Pediatr Res **52**(6): 832-836.
- Perret, B. G., Wagner, R., Lecat, S., Brillet, K., Rabut, G., Bucher, B. and Pattus, F.** (2003). "Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in Drosophila Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of G-protein coupled receptors." Protein Expr Purif **31**(1): 123-32.
- Petithory, J. R. and Jencks, W. P.** (1988). "Sequential dissociation of Ca²⁺ from the calcium adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum and the calcium requirement for its phosphorylation by ATP." Biochemistry **27**(15): 5553-64.
- Pharmagingen** (1999). Baculovirus Expression Vector System Manual, 6th Edition.
- Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., Maire, M. I., Popot, J.-L. and Champeil, P.** (2005 (en préparation)). "Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study."
- Picard, M., Duval-Terrie, C., De, E. and Champeil, P.** (2004). "Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins." Protein Sci **13**(11): 3056-8.
- Picard, M., Toyoshima, C. and Champeil, P.** (2005). "The average conformation at micromolar [Ca²⁺] of Ca²⁺-atpase with bound nucleotide differs from that adopted with the transition state analog ADP.AIFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar [Ca²⁺]." J Biol Chem **280**(19): 18745-54.
- Poch, E., Leach, S., Snape, S., Cacic, T., MacLennan, D. H. and Lytton, J.** (1998). "Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): C1449-58.
- Popot, J. L., Berry, E. A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D. M., Flotenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hong, Q., Lakey, J. H., Leonard, K., Shuman, H. A., Timmins, P., Warschawski, D. E., Zito, F., Zoonens, M., Pucci, B. and Tribet, C.** (2003). "Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1559-74.
- Portmann, R. and Solioz, M.** (2005). "Purification and functional reconstitution of the human Wilson copper ATPase, ATP7B." FEBS Lett **579**(17): 3589-95.

- Pos, K. M., Bott, M. and Dimroth, P.** (1994). "Purification of two active fusion proteins of the Na⁺-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*." FEBS Letters **347**(1): 37-41.
- Pouny, Y., Weitzman, C. and Kaback, H. R.** (1998). "In vitro biotinylation provides quantitative recovery of highly purified active lactose permease in a single step." Biochemistry **37**(45): 15713-15719.
- Preiano, B. S., Guerini, D. and Carafoli, E.** (1996). "Expression and functional characterization of isoforms 4 of the plasma membrane calcium pump." Biochemistry **35**(24): 7946-53.
- Reis, E. M., Kurtenbach, E., Ferreira, A. R., Biselli, P. J., Slayman, C. W. and Verjovski-Almeida, S.** (1999). "N-terminal chimeric constructs improve the expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase in yeast." Biochim Biophys Acta **1461**(1): 83-95.
- Roussel, M., Benvegnu, T. and Plusquellec, D.** (2003). Nouveaux tensio actifs dérivés de sucres. Atelier GDR 2478 "Détergents", 3-5 février 2003, Saulieu
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P. and Milon, A.** (2003). "Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1529-46.
- Schmidt, T., Zaib, F., Samson, S. E., Kwan, C. Y. and Grover, A. K.** (2004). "Peroxynitrite resistance of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig coronary artery endothelium and smooth muscle." Cell Calcium **36**(1): 77-82.
- Schultz, L. D., Hofmann, K. J., Mylin, L. M., Montgomery, D. L., Ellis, R. W. and Hopper, J. E.** (1987). "Regulated overproduction of the GAL4 gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast." Gene **61**(2): 123-33.
- Segall, L., Mezzetti, A., Scanzano, R., Gargus, J. J., Purisima, E. and Blostein, R.** (2005). "Alterations in the alpha2 isoform of Na,K-ATPase associated with familial hemiplegic migraine type 2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 11106-11.
- Serpersu, E. H., Kirch, U. and Schoner, W.** (1982). "Demonstration of a stable occluded form of Ca²⁺ by the use of the chromium complex of ATP in the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." Eur J Biochem **122**(2): 347-54.
- Sherman, F.** An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/Sherman_f/yeast/Index.html (1998)

- Shull, G. E. (2000). "Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases." Eur J Biochem **267**(17): 5284-90.
- Skerjanc, I. S., Toyofuku, T., Richardson, C. and MacLennan, D. H. (1993). "Mutation of glutamate 309 to glutamine alters one Ca(2+)-binding site in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum expressed in Sf9 cells." J Biol Chem **268**(21): 15944-50.
- Skou, J. C. (1957). "The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves." Biochim Biophys Acta **23**(2): 394-401.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Sørensen, T. L., Møller, J. V. and Nissen, P. (2004). "Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump." Science **304**(5677): 1672-5.
- Soulie, S., Neumann, J. M., Berthomieu, C., Møller, J. V., le Maire, M. and Forge, V. (1999). "NMR conformational study of the sixth transmembrane segment of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." Biochemistry **38**(18): 5813-21.
- Stolz, J., Darnhofer-Demar, B. and Sauer, N. (1995). "Rapid purification of a functionally active plant sucrose carrier from transgenic yeast using a bacterial biotin acceptor domain." FEBS Letters **377**(2): 167-171.
- Strock, C., Cavagna, M., Peiffer, W. E., Sumbilla, C., Lewis, D. and Inesi, G. (1998). "Direct demonstration of Ca²⁺ binding defects in sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase mutants overexpressed in COS-1 cells transfected with adenovirus vectors." J Biol Chem **273**(24): 15104-9.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L. and Picot, D. (2003). "An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex." Nature **426**(6965): 413-8.
- Strugatsky, D., Gottschalk, K. E., Goldshleger, R., Bibi, E. and Karlish, S. J. (2003). "Expression of Na⁺,K⁺-ATPase in *Pichia pastoris*: analysis of wild type and D369N mutant proteins by Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage and molecular modeling." J Biol Chem **278**(46): 46064-73.
- Tanford, C., Ed. (1991). The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes, 2nd edition, Krieger publishing company.

- Tanford, C., Reynolds, J. A. and Johnson, E. A.** (1985). "Thermodynamic and kinetic cooperativity in ligand binding to multiple sites on a protein: Ca²⁺ activation of an ATP-driven Ca pump." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(14): 4688-92.
- Theisen, M. J., Potocky, T. B., McQuade, D. T., Gellman, S. H. and Chiu, M. L.** (2005). "Crystallization of bacteriorhodopsin solubilized by a tripod amphiphile." Biochim Biophys Acta **1751**(2): 213-6.
- Ton, V. K., Mandal, D., Vahadji, C. and Rao, R.** (2002). "Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca(2+), Mn(2+)-ATPase defective in Hailey-Hailey disease." J Biol Chem **277**(8): 6422-7.
- Tota, M. R., Xu, L., Sirotina, A., Strader, C. D. and Graziano, M. P.** (1995). "Interaction of [fluorescein-Trp25]glucagon with the human glucagon receptor expressed in Drosophila Schneider 2 cells." J Biol Chem **270**(44): 26466-72.
- Toustrup-Jensen, M. and Vilsen, B.** (2002). "Importance of Glu(282) in transmembrane segment M3 of the Na(+),K(+)-ATPase for control of cation interaction and conformational changes." J Biol Chem **277**(41): 38607-17.
- Toustrup-Jensen, M. and Vilsen, B.** (2003). "Importance of conserved Thr214 in domain A of the Na⁺,K⁺ -ATPase for stabilization of the phosphoryl transition state complex in E2P dephosphorylation." J Biol Chem **278**(13): 11402-10.
- Toyoshima, C. and Mizutani, T.** (2004). "Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue." Nature **430**(6999): 529-35.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H.** (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution." Nature **405**(6787): 647-55.
- Toyoshima, C. and Nomura, H.** (2002). "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium." Nature **418**(6898): 605-11.
- Toyoshima, C., Nomura, H. and Tsuda, T.** (2004). "Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues." Nature **432**(7015): 361-8.
- Tribet, C., Audebert, R. and Popot, J. L.** (1996). "Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15047-50.
- Troullier, A., Girardet, J. L. and Dupont, Y.** (1992). "Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase." J Biol Chem **267**(32): 22821-9.

- Tsivkovskii, R., Eisses, J. F., Kaplan, J. H. and Lutsenko, S.** (2002). "Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells." J Biol Chem **277**(2): 976-83.
- Tucker, J. and Grisshammer, R.** (1996). "Purification of a rat neurotensin receptor expressed in Escherichia coli." Biochem J **317** (Pt 3): 891-9.
- Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J. B., Raeymaekers, L. and Wuytack, F.** (2004). "The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 103-12.
- Varadi, A., Lebel, L., Hashim, Y., Mehta, Z., Ashcroft, S. J. and Turner, R.** (1999). "Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48)." Diabetologia **42**(10): 1240-3.
- Voskoboinik, I., Greenough, M., La Fontaine, S., Mercer, J. F. and Camakaris, J.** (2001). "Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant." Biochem Biophys Res Commun **281**(4): 966-70.
- Wallin, E. and Vonheijne, G.** (1998). "Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms." Protein Sci **7**(4): 1029-1038.
- Welch, W. J. and Brown, C. R.** (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." Cell Stress Chaperones **1**(2): 109-15.
- Winstone, T. L., Jidenko, M., le Maire, M., Ebel, C., Duncalf, K. A. and Turner, R. J.** (2005). "Organic solvent extracted EmrE solubilized in dodecyl maltoside is monomeric and binds drug ligand." Biochem Biophys Res Commun **327**(2): 437-45.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L. and Missiaen, L.** (2002). "Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps." Cell Calcium **32**(5-6): 279-305.
- Yu, S. M., McQuade, D. T., Quinn, M. A., Hackenberger, C. P., Krebs, M. P., Polans, A. S. and Gellman, S. H.** (2000). "An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization." Protein Sci **9**(12): 2518-27.
- Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N. M. and Stokes, D. L.** (1998). "Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution." Nature **392**(6678): 835-9.

- Zhang, Z., Lewis, D., Strock, C., Inesi, G., Nakasako, M., Nomura, H. and Toyoshima, C.** (2000). "Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca(2+) binding and catalytic activation in the Ca(2+) transport (SERCA) ATPase." Biochemistry **39**(30): 8758-67.
- Zhang, Z., Lewis, D., Sumbilla, C., Inesi, G. and Toyoshima, C.** (2001). "The role of the M6-M7 loop (L67) in stabilization of the phosphorylation and Ca(2+) binding domains of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA)." J Biol Chem **276**(18): 15232-9.
- Zoonens, M., Catoire, L. J., Giusti, F. and Popot, J. L.** (2005). "NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(25): 8893-8.

ANNEXES

Article I



Expression in yeast and purification of a membrane protein, SERCA1a, using a biotinylated acceptor domain

Marie Jidenko, Guillaume Lenoir¹, José M. Fuentes², Marc le Maire, Christine Jaxel^{*}

Unité de Recherche Associée 2096 of the Centre National de la Recherche Scientifique and Service de Biophysique des Fonctions Membranaires, Département de Biologie Joliot Curie, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, and Laboratoire de Recherche Associé 17V and Institut Fédératif de Recherches 46, Université Paris Sud, France

Received 15 November 2005, and in revised form 24 February 2006

Abstract

We have recently described the final steps leading to the crystallization of a mammalian membrane protein, the rabbit sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, after heterologous expression. Here, we detail the initial steps leading to this new purification method. A biotin acceptor domain was fused at the C-terminal part of Ca²⁺-ATPase and a thrombin site was inserted between both coding regions. The recombinant protein was expressed under the control of a galactose-inducible promoter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The biotinylation reaction of the protein was performed directly in vivo in yeast. After solubilization of the yeast light membrane fraction, the biotinylated protein was retained specifically using the strong biotin–avidin interaction. Finally, digestion by the protease thrombin allowed the separation of the Ca²⁺-ATPase from the biotinylated domain. At this step, Ca²⁺-ATPase is in a relatively purified form (about 40%). After a size-exclusion HPLC step, the purity of the protein is about 70%, and evaluation of the conformational changes during the catalytic cycle by monitoring the intrinsic fluorescence is demonstrated. The major advantage of this avidin procedure is the particularly good specific ATPase activity as compared with that of a purified His-tagged Ca²⁺-ATPase.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Expression in yeast; Membrane protein; Biotinylated fusion protein; Affinity purification

Expression and purification of membrane proteins is always challenging, especially if the final goal is the crystallization of these molecules. Nevertheless, they are often key steps in obtaining knowledge of the enzyme structure/function relationship. Recently, we purified the rabbit sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase after expression in yeast, and this led us to describe one of the first successful crystallizations of a mammalian membrane protein derived from a heterologous expression

system [1]. At the same time, Long et al. [2] have obtained the crystal structure of a rat brain voltage-dependent *Shaker* family K⁺ channel over-expressed in the yeast *Pichia pastoris*. In earlier work [1], we focused on the final steps of the purification and on the crystallization conditions, while here, we describe in detail the initial steps of the expression and purification, and compare the yeast-expressed, purified His-tagged SERCA1a and the avidin-purified SERCA1a.

Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases (SERCA)³ are involved in many cellular functions by maintaining a

^{*} Corresponding author. Fax: 33169088139.

E-mail address: jaxel@dsvifd.cea.fr (C. Jaxel).

¹ Present address: Department of Membrane Enzymology, Bijvoet Center and Institute of Biomembranes, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands.

² Present address: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, E. U. Enfermería y T. O., Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain.

³ Abbreviations used: SR, sarcoplasmic reticulum; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; BAD, biotin acceptor domain; SEC, size-exclusion chromatography; EYPC, egg-yolk 1- α -phosphatidylcholine; EYPA, egg-yolk phosphatidic acid; DDM, *n*-dodecyl β -D-maltoside; C₁₂E₈, octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride, PVDF, polyvinylidene difluoride, GFP, green fluorescent protein.

low concentration of Ca^{2+} in the cytosol. In vertebrates, the SERCA1a isoform is expressed in the sarcoplasmic reticulum (SR) of skeletal muscle cells. Rabbit skeletal muscle SERCA1a is one of the most intensively studied transport Ca^{2+} -ATPases, because it is particularly stable and abundant in this tissue (it represents about 75% of the reticulum membrane proteins). Using the rabbit protein as starting material, several 3D structures of SERCA1a have been obtained (for reviews, see [3,4]). In parallel with the structural work, a number of site-directed mutagenesis studies on SERCA1a have been undertaken to look at the residues crucial for Ca^{2+} -binding or/and the activity of the pump [5–7]. For the latter work, it was necessary to express the mutated protein in a heterologous system, and several hosts were used, including infected mammalian COS-1 cells [8–10], baculovirus-infected Sf9 insect cells [11,12], and cells from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [13–15]. In terms of the amount of expressed protein, the baculovirus-Sf9 system is interesting but the SERCA1a protein obtained is only partly functional [11,12]. A good compromise is found with the COS-1 cells, which are able to over-express active proteins with a low endogenous SERCA activity [9]. If the goal is a subsequent purification, the yeast system appears to be a better tool. The mechanisms of Ca^{2+} homeostasis and signalling in yeast are fundamentally similar to those in higher eukaryotes, and the use of yeast as the expression system allows simple and inexpensive growth conditions, and a relatively short cell-cycle (for a review, see [16]). Moreover, the over-expression of membrane proteins in the yeast system can be tuned to produce sufficient amounts of purified SERCA1a protein in a functional state [15]. Finally, SERCA proteins are not coded for in the yeast genome.

For protein purification, the addition of a His tag has been used largely to retain the protein on a Ni^{2+} support by affinity chromatography (for a review on the various purification tags, see [17]). To increase the affinity between the tag and its counterpart, we have chosen the biotin–avidin system, which is one of the most efficient. By this procedure, a biotin acceptor domain (BAD) is fused to the protein of interest and it is naturally biotinylated in the host organism. The biotin ligase, which is responsible for the catalytic reaction, is highly conserved together with its recognition sequence [18]. Biotinylation of proteins other than the one of interest will occur, and this represents a problem that must be solved during purification. One protein in bacteria, and three proteins in *S. cerevisiae* are naturally biotinylated [19,20].

In the case of membrane proteins, the purification based on the biotin–avidin interaction has been used successfully for lactose permease [21] and P-glycoprotein [22,23].

Here, we have focused on the over-expression and purification of rabbit SERCA1a in a heterologous system by using the biotin–avidin purification procedure. Thus, we have over-expressed SERCA1a fused to a BAD in yeast, purified the *in vivo* biotinylated fusion protein on a monomeric avidin affinity column, and eluted a relatively

well-purified protein by a thrombin protease cleavage. This protein is characterized by a high level of ATPase activity, close to that of SERCA1a from rabbit sarcoplasmic reticulum. After an additional size-exclusion chromatography (SEC) step, the conformational changes of the protein associated with Ca^{2+} binding at the high affinity sites are followed by monitoring its intrinsic fluorescence properties.

Materials and methods

Materials

Biochemical products were from Sigma-Aldrich (Lyon, France) unless specified otherwise. Restriction and modification enzymes were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). PfuTurbo DNA polymerase and Quik-Pik Electroelution capsules were from Stratagene. Bovine thrombin (#604980) was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). The Softlink™ Soft Release Avidin Resin was purchased from Promega (Charbonnières, France). Avidin–peroxidase conjugate was from Sigma. Products for yeast and bacteria cultures were purchased from Difco (Detroit, MI, USA). Purified egg–yolk L- α -phosphatidylcholine (EYPC) and egg–yolk phosphatidic acid (EYPA) were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Pure *n*-dodecyl β -D-maltoside (DDM, #D310) was purchased from Anatrace (Maumee, OH, USA). Octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether (C_{12}E_8) was purchased from Nikkol Chemical (Tokyo, Japan). Biobeads SM-2 absorbent (20–50 mesh), and precision protein standards were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Immobilon-P membranes were from Millipore (Bedford, MA, USA).

Strain, plasmid and constructions

Strain

The *S. cerevisiae* W3031.b/Gal4 (*a*, *leu2*, *his3*, *trp1::TRP1-GAL10-GAL4*, *ura3*, *ade2-1*, *can'*, *ctr'*) strain was as described by Lenoir et al. [15].

Plasmid

Plasmid pYeDP60 was generously given by Denis Pompon (CGM, Gif-sur-Yvette, France) [24]. The expression plasmid pYeDP60-6HCSERCA1a was used for the construction described in this work [15].

Construction of plasmid pYeDP60-SERCA1a-Bad

A 3' 192 bp fragment of the 2982 bp rabbit SERCA1 cDNA and a 300 bp *Klebsiella pneumoniae* C-terminal oxaloacetate decarboxylase BAD cDNA fragment were amplified from pYeDP60-6HCSERCA1a [15] and pKR35 (kindly provided by R. Kaback and D. Hardy, UCLA, USA), respectively. Oligonucleotides were designed to be complementary to both the stop codon region of rabbit SERCA1a cDNA and the 5' end of the relevant

fragment of BAD cDNA. The SERCA1a 5' primer sequence (5') C CTC CAC TTC CTC ATC CTC TA (3') was complementary to SERCA1a cDNA near a *SacI* site. The SERCA1a 3' primer sequence (5') AGC AGC CGC CGT GGA TCC TCT TGG AAC CAA ACC ACC TCC CTC CAG GTA GTT (3') was complementary to the C-terminal SERCA1a cDNA (in italics), destroyed the His codons, included additional nucleotides encoding two glycines, nucleotides encoding a thrombin cleavage site (in bold) and nucleotides complementary to the 5' end of the BAD fragment (underlined). The BAD 5' primer sequence (5') G GGA GGT GGT TTG GTT CCA AGA GGA TCC ACG GCG GCT GCT CCT GCT CCT (3') was complementary to the 5' end of the SERCA1a 3' primer sequence (40 nucleotides) and included additional nucleotides complementary to the 5' end of the BAD fragment. The BAD 3' primer sequence (5') G CAG ATC GAG CTC TTA GGT CAT CAG GGT GTC GC (3') was complementary to the 3' end of BAD cDNA (underlined), and included a stop codon region and a *SacI* site. Two DNA fragments were amplified, a SERCA1a fragment (192 bp) and a BAD fragment (300 bp). Both fragments were gel-purified, combined to act as template, and PCR amplified (the first cycle was performed without primers and the following with the SERCA1a 5' primer and the BAD 3' primer) in a hybridization-extension reaction. The resultant gene fusion SERCA1a + biotin acceptor domain (452 bp) was trimmed with *SacI* and *SacI*, gel-purified, inserted into electroeluted digested pYeDP60-6HCSERCA1a, and transformed into *Escherichia coli* JM109, and the recombinant plasmid was colony-purified. The resultant construct encodes full-length rabbit SERCA1a protein fused in-frame (at the C terminus) to an efficient 94 amino acid residue BAD (Fig. 1). This construct was checked by DNA sequencing.

Expression

Culture and expression

Competent yeast was transformed with this plasmid and selected on minimal plates. Growth conditions and criteria for expression of the Ca²⁺-ATPase were as described for the test of individual clones and for the expression on minimal medium [15]. The conditions of large-scale expression are as described [15]. First, 10 ml of minimal medium (0.1% (w/v) Bacto™ Casamino acids, 0.7% (w/v) yeast nitrogen base, 2% (w/v) glucose, 20 µg/ml of adenine) were inoculated with the selected clone. After 24 h of growth at 28 °C with shaking, this first preculture was used to inoculate 100 ml of minimal medium. This second preculture was used to start the culture by inoculating 500 ml of YPGE2X (2% (w/v) Bacto™ Peptone, 2% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) glucose, 2.7% (v/v) ethanol). After 36 h of growth at 28 °C, the temperature of the culture was lowered to 18 °C. Expression was induced by adding 20 g/L of galactose. After 13 h, a second induction was performed by adding a further 20 g/L of galactose. The culture was stopped 6 h later.

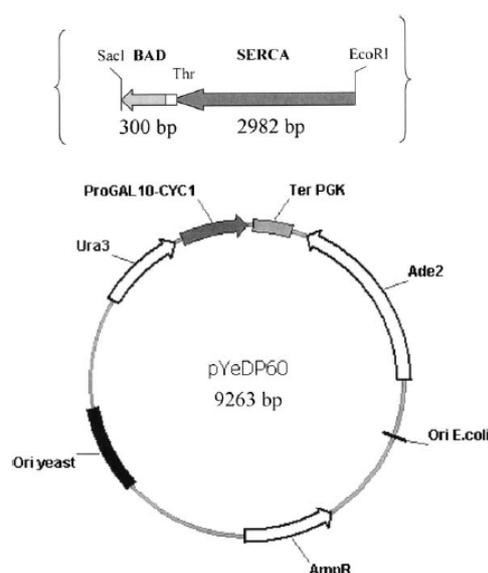


Fig. 1. Plasmid used for the SERCA1a-BAD expression. ADE2 and URA3, yeast selection markers; Amp^r, bacterial selection marker; Pro GAL10-CYC1, galactose-inducible promoter; Ter PGK, phosphoglycerate kinase terminator sequence; BAD, biotin acceptor domain; Thr, thrombin cleavage site.

Preparation of membrane fractions

The handling process was done in a cold-room (~4 °C). The culture (volume usually 2 L) was centrifuged at 5000g_{av} for 10 min at 4 °C. Pellets were resuspended in cold sterile water and centrifuged at 5000g_{av} for 10 min at 4 °C. The weight of pellets was measured (w_p : ~100 g). Pellets were suspended in 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.6 M sorbitol in a final volume equivalent to 2 w_p (~200 ml). After 5 min, this suspension was centrifuged at 5000g_{av} for 10 min at 4 °C. Pellets were resuspended in breakage buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.6 M sorbitol, 1 mM PMSF) in a final volume equivalent to 2 w_p (~200 ml). Glass beads (diameter 0.5 mm) were added until the suspension was covered. Yeast cells were then broken by mechanical agitation in an incubator (at room temperature) (INFORS AG; Bottmingen, Switzerland) for 18 min at 350 rpm. The crude extract obtained was removed by pipette and the beads were washed with a final volume of breakage buffer equivalent to 3 w_p (~300 ml). The pH was adjusted to 7.5. The crude extract after breakage (Fig. 2A) was centrifuged at 1000g_{av} for 15 min at 4 °C to give pellet P1 and supernatant S1. Supernatant S1 was centrifuged at 11,000g_{av} for 15 min at 4 °C, to give pellet P2 and supernatant S2. P2, corresponding to the heavy membrane fraction was resuspended in the breakage buffer in a final volume equivalent to 0.5 w_p (~50 ml). S2 was centrifuged at 125,000g_{av} for 1 h at 10 °C, to give pellet P3 and supernatant S3. P3, corresponding to the light membrane fraction, was resuspended in Hepes-sucrose buffer (20 mM Hepes-Tris

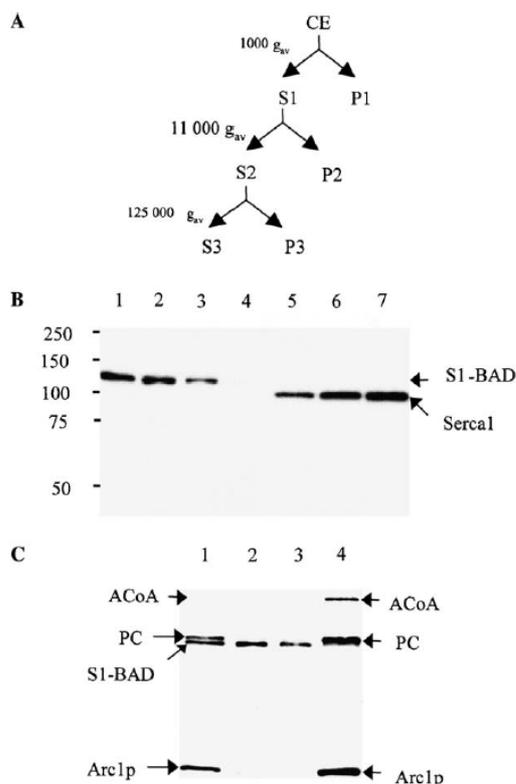


Fig. 2. Preparation of the membrane fractions. (A) Principle of the fractionation. CE, crude extract; S, supernatant; P, pellet; P2, heavy membrane fraction; P3, light membrane fraction. (B) Western blot analysis of various fractions detected with anti SERCA1a polyclonal antibodies. A fraction (4 μ g) of total proteins of crude extract and S3 (lanes 1 and 4, respectively) and 1 μ g of total proteins of P2 and P3 (lanes 2 and 3) were loaded onto the SDS/polyacrylamide gel. Lanes 5, 6, and 7 correspond to 20, 40, and 60 ng of protein of the SR preparation, respectively. The positions of SERCA1a-BAD (S1-BAD) and SERCA1a are indicated by arrows. Molecular mass markers are indicated (in kDa). (C) Western blot of the various fractions shown in (B) detected with avidin peroxidase. The same amounts of total proteins and the same fractions as indicated in (B) were analysed. ACoA, acetyl CoA carboxylase (205 kDa); PC, pyruvate carboxylase (120 kDa); and Arc1p protein (45 kDa), the endogenous biotinylated proteins of the yeast *S. cerevisiae*, and SERCA1a-BAD (S1-BAD) are indicated by arrows.

(pH 7.4), 0.3 M sucrose, 0.1 mM CaCl_2) at a final volume equivalent to 0.5 w_p (~50 ml).

Solubilization of membrane fractions

All volumes are given for purification from 10 ml of P3. Light membranes were diluted into the solubilization buffer (50 mM Tris (pH 7), 0.1 M NaCl, 20% (v/v) glycerol, 1 mM CaCl_2 , 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF) at a protein concentration of 2 mg/ml and with a DDM to protein ratio of 3:1 (w/w). The suspension was stirred gently for 2 h at room temperature before centrifugation at 120,000 g_{av} for 30 min at 4 °C.

Purification of the ATPase by avidin–agarose chromatography

Unless specified otherwise, the handling process was done in a cold-room. Softlink™ Soft Release Avidin resin (1.2 ml) was washed with solubilization buffer before use. The supernatant of the solubilization step was mixed and stirred gently with the resin overnight at 4 °C. The suspension was then put into an 11 \times 100 mm column (BioSeptra, MA, USA). The first flow-through was loaded onto the same column. The resin was washed first with 15 ml of high-salt buffer (50 mM Tris (pH 7), 1 M NaCl, 20% (w/v) glycerol, 1 mM CaCl_2 , 1 mM β -mercaptoethanol, 0.05% (w/v) DDM) then with 15 ml of low-salt buffer (50 mM Tris (pH 7), 150 mM NaCl, 20% (w/v) glycerol, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM β -mercaptoethanol, 0.05% (w/v) DDM) at a flow-rate of 1 ml/min. We modified the concentration of Ca^{2+} , since the thrombin activity was lower at 1 mM than at 2.5 mM. The resin was then mixed with 0.8 ml of low-salt buffer, 45 U of thrombin was added and the mixture was stirred gently at room temperature for 30 min. Then, 25 U was once again added and, after 30 min, 2.5 mM PMSF was added to stop the thrombin activity. The column was placed in the cold-room. The proteins were eluted from the column by repeatedly adding 1 ml of low-salt buffer. The fractions that included SERCA1 were pooled.

To increase protein purity, the eluate was concentrated on Centricon-30 and applied onto a HPLC gel-filtration column. The SERCA1a-containing fractions were selected and pooled as described in [1]. The only differences with this procedure are that there was not replacement of DDM by C_{12}E_8 during the HPLC chromatography and no concentrating step at the end. Moreover, in this work, the HPLC elution buffer was: 20 mM TES NaOH (pH 7), 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 , 1 mg/ml DDM.

Detergent removal, relipidation and sample conservation

Glycerol and EYPC-EYPA (10:1, w/w) were added to final concentrations of 40% (w/v) and 1 mg/ml, respectively. The Bio-beads SM2 were prepared as described [25], and detergent was removed by adding Biobeads as described [15]. Samples were frozen in liquid nitrogen and then stored at –80 °C.

Analysis of the purification

SDS–PAGE and blotting

For SDS–PAGE, aliquots were diluted in the corresponding purification buffer, then mixed with an equal volume of denaturing buffer (100 mM Tris–HCl (pH 8), 1.4 M β -mercaptoethanol, 4% (w/v) SDS, 5 mM EDTA, 8 M urea, 0.05% (w/v) bromophenol blue). Samples were heated at 100 °C for 1.5 min, cooled and then loaded onto a Laemmli-type 8% (w/v) polyacrylamide gel as described [26]. Amounts of proteins or volumes of initial samples loaded

in each well are indicated in the Figure legends. Proteins were revealed by staining with Coomassie brilliant blue.

The same gels were used for blotting. Proteins were blotted onto PVDF membrane (Immobilon-P) in cold Caps buffer (10 mM Caps (pH 11.1), 10% (v/v) methanol,) as described [27]. The Western blotting was followed either by immunodetection with the polyclonal antibody anti-SERCA1a 79B (a gift from A.-M. Lompré, INSERM, France), or by detection with avidin–peroxidase for the recognition of biotinylated proteins as described by the manufacturer. In this last case, the saturation step was followed by several washes with PBS-Tween buffer (90 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄ (pH 7.7), 100 mM NaCl, 0.2% (v/v) Tween 20) without milk, because biotin is usually present in commercial milk. Blots were revealed by enhanced chemiluminescence with the ECL kit (Amersham). In the case of other SERCA proteins, another procedure for revealing them has been described [28].

For each gel, molecular mass markers (LMW, Amersham Biosciences) were loaded. For the Western blots, the positions of molecular mass markers are indicated relative to their positions on the PVDF membranes.

Protein estimation and Ca²⁺-ATPase quantification

Protein concentrations were measured by the bicinchoninic acid procedure [29] in the presence of 2% (w/v) SDS with bovine serum albumin as a standard (see Table 1).

Quantification and estimation of the purity was carried out with a GS-700 imaging densitometer (Bio-Rad) and the Molecular Analyst software (Bio-Rad), and using as reference native SR membranes in which 75% of the protein content is assumed to be Ca²⁺-ATPase. SR membranes were prepared as described [30] and generously provided by Philippe Champeil (CEA Saclay, France). To better quantify the amount of Ca²⁺-ATPase in the membrane fractions CE, P2 and P3, the same quantity of membranes expressed from a strain containing an empty vector (without SERCA1a) was added to the SR solutions (see Fig. 2B).

Indeed, the staining of the bands on the Western blots seems to be decreased in the presence of excess protein present in these membranes (data not shown).

ATPase activity measurement

ATPase activity was assayed at 30 °C using a spectrophotometric method as described [31,32]. From 2 to 5 µg of proteins was used in 2 ml of reaction buffer (50 mM Mops (pH 7), 0.1 M KCl, 7 mM MgCl₂, 0.3 mM NADH, 1 mM phosphoenol pyruvate (PEP), 0.1 mg/ml of lactate dehydrogenase (LDH), 0.1 mg/ml of pyruvate kinase (PK), 1 mM PMSF, 10 mM NaN₃) containing (final concentrations) 0.1 mM Ca²⁺ and 1 mg/ml of the detergent C₁₂E₈. The reaction was started by addition of 1 mM ATP and stopped by addition of either 40 mM EGTA or 2 µg of thapsigargin. The difference between the slopes obtained before and after addition of EGTA or thapsigargin is considered to be due to the SERCA1a Ca²⁺-ATPase activity. To obtain the specific activity, the concentration of SERCA1a was determined from Western blotting or staining with Coomassie brilliant blue after SDS–PAGE. The sample specific activity was compared with that measured with SR membranes under the same conditions. The Ca²⁺-dependence of this ATPase activity for purified fractions or the SR preparation was checked with the same enzymatic system, starting with a concentration of Ca²⁺ of 0.1 mM. Increasing amounts of EGTA were added to give the desired decreasing concentrations of free Ca²⁺. These values were calculated with Maxchelator software (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>).

Fluorescence measurements

Fluorescence measurements were performed with a Spex fluorolog instrument. The temperature was kept at 20 °C and samples were stirred continuously. Intrinsic fluorescence was measured with excitation and emission wavelengths of 290 and 330 nm, and bandwidths of 2 and 20 nm, respectively, in a buffer containing 150 mM Mops/Tris at

Table 1
Properties of SERCA1 purified by avidin–agarose and relipidated^a

Fraction	Total protein (mg)	Ca ²⁺ -ATPase (mg)	Ca ²⁺ -ATPase/protein (%) ^b	Specific activity ^c		Yield (%) ^d	Fold of purification ^e
				(µmol ATP min ⁻¹)/mg protein	(µmol ATP min ⁻¹)/mg Ca ²⁺ -ATPase		
S1 ^f	2900						
S2 ^f	2400						
S3 ^f	1800						
P3 ^g	500	5	1	0.04	2.7	100	1
Avidin-purified ^h	0.71	0.30	42	3.8	9	6.0	92

^a The values are for 1 L of yeast culture.

^b This percentage (amount of Ca²⁺-ATPase divided by the total amount of proteins) was determined by densitometry of the SDS/polyacrylamide gel displayed on Fig. 5. In this Figure, by using the same method, the SR Ca²⁺-ATPase is pure at about 75%.

^c Measured at 30 °C, as described in the Materials and methods.

^d This percentage corresponds to the amount of Ca²⁺-ATPase divided by the amount of starting material, 5 mg of SERCA1a (100%).

^e Change in the total activity between P3 and the avidin-purified fraction.

^f Supernatants during the fractionation (see Fig. 2A).

^g Light membrane fraction (see Fig. 2A).

^h Pool of the fractions after elution by treatment with thrombin (see Fig. 5, lane 1).

pH 7.0. Changes in tryptophan fluorescence were monitored after 20-fold dilution of SR vesicles or HPLC-purified recombinant SERCA1a (to 5 µg/ml for SR vesicles and to 2.6 µg/ml for HPLC-purified enzyme) in 150 mM Mops/Tris (pH 7 at 20 °C). The total concentration of Ca²⁺ was 55 µM, due to the presence of contaminating Ca²⁺, and Ca²⁺ added together with the enzyme. EGTA (0.5 mM) was added to reach a concentration of free Ca²⁺ of about 0.05 µM ($K_{dCa-EGTA}=0.4\ \mu\text{M}$ at pH 7.0 and no MgCl₂). Ca²⁺ was then added to 55 µM to restore the fluorescence level of the Ca²⁺-bound form.

Results

Expression of the fusion protein SERCA1a-BAD in the yeast S. cerevisiae and solubilization of a membrane fraction

We have analysed all the steps allowing the preparation of a membrane fraction containing the biotinylated SERCA1a-BAD (Fig. 2). The expression of SERCA1a-BAD is relatively high (0.6% of the total proteins) in the crude extract (Fig. 2B, lane 1), consistent with the amount of expressed SERCA1a-His obtained previously [15]. Note the difference in the size of the SERCA1a-BAD protein relative to that of the Ca²⁺-ATPase prepared from the SR, due to the presence of the BAD. Due to the presence of biotinylated tail, the protein may be detected by using avidin conjugated to peroxidase as single antibody (Fig. 2C). It can be seen in Fig. 2C (lanes 1 and 4) that SERCA1a-BAD is not the only biotinylated protein but that some yeast proteins are naturally biotinylated; e.g., acetyl CoA carboxylase (205 kDa), pyruvate carboxylase (120 kDa) (19) and the Arc1p protein (45 kDa) as described recently [20].

We performed the membrane fractionation to isolate the heavy P2 (plasma membranes and mitochondria) and light P3 (endoplasmic reticulum and secretion vesicles) membrane fractions from the soluble fraction S3 as described in Materials and methods. The Western blotting with avidin–peroxidase shows that the naturally biotinylated yeast proteins are found mainly in the S3 soluble fraction (Fig. 2C, lane 4), while the protein SERCA1a-BAD is found mainly, in addition to the crude extract, in the membrane fractions P2 and P3 (Figs. 2B and C, lanes 1–3). We have indications that there is incomplete biotinylation in the crude extract (data not shown). Several *in vitro* biotinylation assays have been performed as described [21] without major and reproducible gain (data not shown). In any case, the amount of *in vivo* biotinylated proteins was sufficient (represents a level of about 5 mg/L of yeast culture, see Table 1) to perform solubilization and avidin purification procedures on this membrane fraction. In spite of a greater SERCA1a-BAD content in the P2 fractions, we have used the P3 membrane fraction to solubilize and purify the protein SERCA1a-BAD, the P2 fraction containing less active protein.

After the membrane fractionation, we tested the effect of a high-KCl stripping step as described [15] on the purity of

the fusion protein but, in the case of the SERCA1a-BAD protein, the improvement was not clear (data not shown). Consequently, the P3 membrane fraction was solubilized directly with DDM, a mild detergent used also to solubilize the SERCA1a-His protein. This detergent has been used successfully in the case of several membrane proteins [33], and its efficiency may be explained by its polar headgroup structure [34]. Several solubilization conditions using DDM have been checked (ratio of detergent to protein, period of solubilization (data not shown)), and the optimum of solubilization was defined as a detergent to protein ratio of 3/1 (w/w) and a time of 2 h at room temperature. The solubilization ratio is about 30% under these conditions (Fig. 3B, compare lanes 1 and 2).

Purification of the SERCA1a protein by monomeric avidin chromatography: binding of the fused SERCA1a-BAD protein and elution of SERCA1a by thrombin

The solubilized fraction was then loaded onto a monomeric avidin resin column. To bind the SERCA1a-BAD on the resin more efficiently, we have used another resin, the TetraLink™ tetrameric avidin resin (Promega), which has been shown to exhibit a very strong interaction with biotin. In our hands, this assay did not give better purification results than those obtained by using the monomeric avidin resin (data not shown). The non-retained proteins (Figs. 3A, lane 3, and B and C, lanes 3 and 4) do not contain a large amount of SERCA1a-BAD, confirming the presence of a fair proportion of biotinylated protein in the loaded solution. A high-salt wash gave rise to elution of some contaminant proteins without removing much SERCA1a-BAD (Figs. 3A, lane 4 and B, lane 5). During the first purification assays, we tried to elute the biotinylated protein by using a buffer containing 5 mM biotin (in the literature, the concentrations used most often are from 1 to 5 mM ([21,22,35] as examples). It appeared that the protein was essentially irreversibly bound to the resin and could not be displaced, even by increasing the concentration of biotin (data not shown).

We thus resorted to the thrombin site, which has been inserted between the SERCA1a coding gene and the BAD coding sequence (see Fig. 1), in order to remove the protein SERCA1a from the resin. This protocol was chosen to avoid using a large amount of thrombin and a long incubation period at room temperature. Thus, the protein bound on the resin was incubated for 1 h at room temperature in the presence of 70 U of thrombin, as described in Materials and methods, in a buffer containing a low concentration of salt adequate for thrombin activity. The thrombin was added in two batches to avoid auto-proteolysis. It appears that, under these conditions, the protein SERCA1a-BAD is cleaved almost completely (compare lanes 6 and 7 in Figs. 3A and B). Moreover, the results obtained by using anti-SERCA1a antibodies and avidin–peroxidase are consistent (compare Figs. 3B, lanes 6 and 7 with C, lanes 5 and 6).

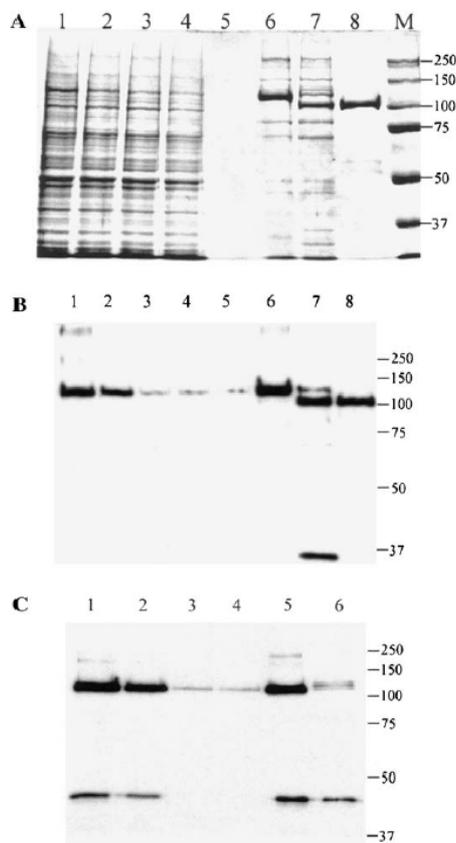


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the avidin-agarose column chromatography. (A) SDS-PAGE and staining with Coomassie brilliant blue of various fractions. Except for the resin, 7.5 μ l of collected fractions were loaded onto the SDS/polyacrylamide gel. Light membranes were diluted in solubilization buffer (lane 1) and, after centrifugation, the solubilized fraction was obtained (lane 2). Lanes 3–5 correspond to the flow-through, the washing with high-salt buffer and the final washing with low-salt buffer, respectively. To check the action of thrombin, 5 μ l of the resin before (lane 6) and after (lane 7) incubation with the protease were analysed. As a control, 1 μ g of protein of the SR preparation was loaded (lane 8). M, molecular mass markers (in kDa). (B) Western blot analysis with anti-SERCA1a antibodies. Except for the resin, 2 μ l of the various fractions was used. For lanes 1 and 2, the same fractions as in Coomassie blue stained gel (A) were analysed. Lanes 3–5 correspond to two flow-through fractions and one washing with high-salt buffer fraction, respectively. In addition, 0.1 μ l of resin before (lane 6) and after (lane 7) thrombin incubation were analysed. In lane 8, 40 ng of protein of the SR preparation was loaded. Molecular mass markers are indicated (in kDa). (C) Western blot analysis with avidin peroxidase. The same volumes of fractions as in (B) were used and, for lanes 1–4, the same fractions were loaded. Lanes 5 and 6 correspond to resin before and after thrombin incubation, respectively, i.e., lanes 6 and 7 in (B). Note that in (B), a low molecular mass proteolyzed fragment of SERCA1a appeared in the gel (~30 kDa) while in (C), several biotinylated yeast proteins are present (see the text). Molecular mass markers are indicated (in kDa).

After the cleavage with thrombin, the protein SERCA1a without the BAD was released from the monomeric avidin resin (Figs. 4A and B, lanes 1 and 2). The corresponding

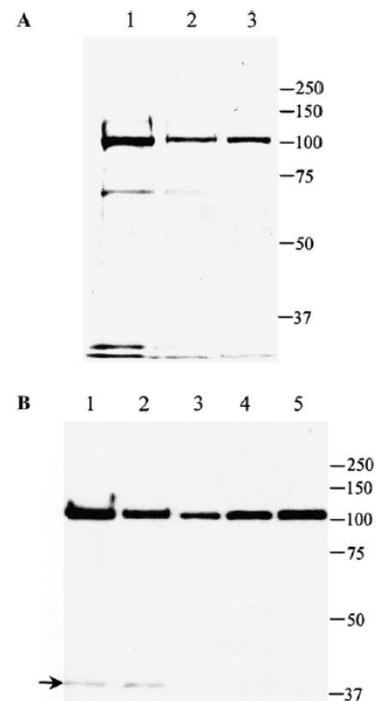


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the fractions eluted from an avidin-agarose chromatography column by thrombin proteolysis. (A) SDS-PAGE followed by staining with Coomassie brilliant blue. Ten microliters of various fractions were loaded onto the SDS/polyacrylamide gel. Lanes 1 and 2 correspond to the second and fourth elution fractions (we called these fractions E2 and E4 below). As a control, 0.25 μ g of total protein of the SR preparation was loaded (lane 3). (B) Western blot analysis with anti-SERCA1a antibodies. Loading of 1 μ l of E2 (lane 1) and 2 μ l of E4 (lane 2) was performed. To quantify the amount of SERCA1a in these samples, 20, 40, and 60 ng of total protein of the SR preparation were loaded into wells 3, 4, and 5. The arrow indicates a small amount of proteolyzed SERCA1a. Molecular mass markers are indicated (in kDa).

fractions are well purified (about 40% purity evaluated by densitometry of polyacrylamide gels stained with Coomassie brilliant blue). Quantification from the stained gel (Fig. 4A) and the Western blot (Fig. 4B) gives an approximate concentration of 100 μ g/ml and a total amount of at least 0.3 mg starting from 1 L of culture. The yield of the SERCA1a purified by the avidin procedure is about 6% (Table 1). Finally, the Western blot shows that the eluted SERCA1a fractions contain only a very small amount of proteolyzed protein (indicated by an arrow in Fig. 4B).

To increase protein purity, the eluate has been applied onto a HPLC gel-filtration column as described in the Materials and methods section.

Enzymatic properties of the purified SERCA1a protein

We have compared the specific activities of the avidin-purified enzyme with those of the purified SERCA1a-His, the avidin-SEC-HPLC-purified protein and the native SR

protein (Fig. 5). For this purpose, the purified proteins were relipidated in the presence of glycerol, and the pools were incubated with Biobeads to remove the DDM [15]. The two one step-purified samples are equivalent in terms of purity (about 40%) (Fig. 5C, lanes 1 and 3, respectively, for the avidin-purified and His-tagged SERCA1a) while the Ca^{2+} -ATPase of SR vesicles is normally assumed to be pure at 70–75% (Fig. 5C, lane 4). In the case of the SEC-HPLC-purified protein, the purity is close to that of the enzyme from SR vesicles, about 70% (Fig. 5C, lane 2). The maximal rate of ATP hydrolysis of the avidin-purified SERCA1a is about $9 \mu\text{mol}$ of hydrolysed ATP $\text{min}^{-1} (\text{mg SERCA1a})^{-1}$ at 30°C , which represents about 70% of what is obtained, under the same conditions, with the Ca^{2+} -ATPase isolated from SR and shows similar dependence on the concentration of calcium (Fig. 5A). It appears that the avidin affinity chromatography purification procedure is more suitable than the nickel affinity chromatography procedure for obtaining high SERCA1a activity (Fig. 5A). This could be due to the C-terminal His-part added not removed (in the

case of the His-tagged protein) or because active ATPases are preferentially recovered by the avidin purification procedure (see Discussion). The more purified SEC-HPLC protein is in the same range of ATPase activity as that of the avidin-purified protein (Fig. 5A). As for the His-tagged protein, the relipidated, avidin-purified enzyme is still active after storage at -80°C for at least 1 month. Moreover, for the avidin-purified protein, the enzyme activity may be conserved if we add 40% (w/v) glycerol (final concentration) without removing the DDM, and add lipid (data not shown). The Ca^{2+} -ATPase activity is correlated also with Ca^{2+} transport activity after reconstitution in proteoliposomes (data not shown). Finally, after an additional SEC-HPLC step, we were better able to visualize the tryptophan fluorescence changes associated with the dissociation-binding of Ca^{2+} to the ATPase (Fig. 5B). Thus, dissociation of Ca^{2+} from the enzyme previously incubated in the presence of $55 \mu\text{M}$ free Ca^{2+} triggered a fluorescence drop of about 4%, while subsequent addition of Ca^{2+} (to reach a concentration of free Ca^{2+} of $55 \mu\text{M}$) restored the fluorescence

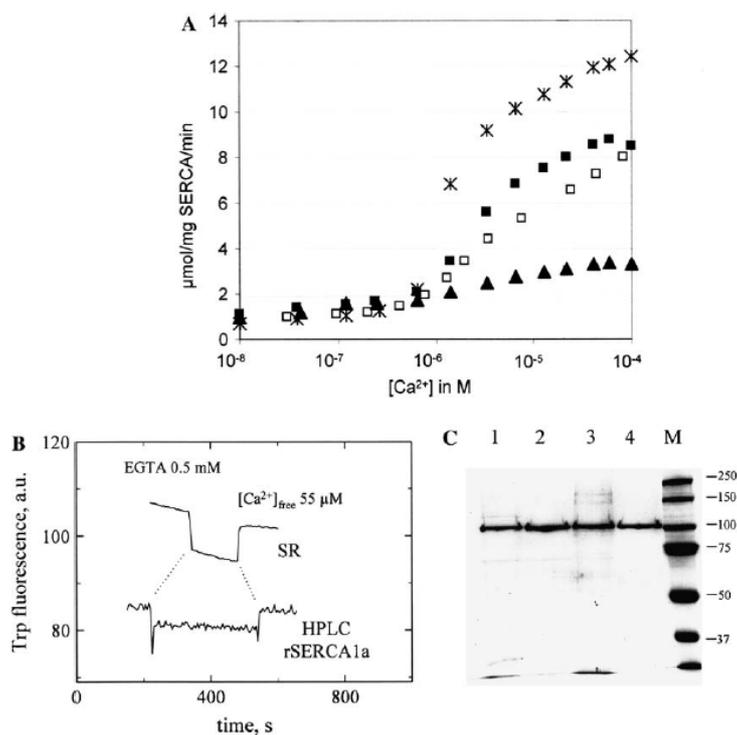


Fig. 5. Functional properties of various preparations of SERCA1a. (A) Ca^{2+} -dependent ATPase activities. ATPase activity of the relipidated avidin-purified pool (■) and of the relipidated avidin-SEC-HPLC-purified pool (□) were measured at 30°C as described in Materials and methods. As controls, ATPase activities of the SR preparation (*) and of the purified relipidated His-tagged SERCA1a (▲) prepared as described (15), were measured in the same conditions. (B) Changes in tryptophan fluorescence upon addition of EGTA or Ca^{2+} in the absence of ATP (arrows). They were monitored for SR vesicles (upper trace, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ of SR vesicles) and relipidated avidin-SEC-HPLC-purified pool (lower trace, $2.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ of HPLC-purified enzyme). The higher noise-level in the fluorescence trace of the recombinant ATPase is probably due to the smaller amount of protein. The fluorescence traces have been shifted slightly with respect to each other for clarity, and the very small changes (0.1%) due to dilution have been corrected for. Additions were identical for both traces, as indicated by the dotted lines. (C) SDS-PAGE followed by staining with Coomassie brilliant blue of the various SERCA1a preparations. Fractions ($10 \mu\text{l}$) of the avidin-purified pool (lane 1) and of the avidin-SEC-HPLC-purified pool (lane 2), and $2.5 \mu\text{l}$ of His-tagged SERCA1a (lane 3) were used. As a control, $0.25 \mu\text{g}$ of total protein of the SR preparation was loaded (lane 4). M, molecular mass markers (in kDa).

level of the initial Ca^{2+} -saturated form. It may be noted that the amplitude of the fluorescence drop (4%) is lower than that obtained with the native SR vesicles ATPase (7.5–8%) but higher than those obtained with the His-tagged Ca^{2+} -ATPase (1.5%) and the avidin-purified protein (3%) (data not shown).

Discussion

The over-expression of SERCA1a-BAD in yeast was performed by using an inducible system that allows the separation of the growing phase from the expression phase. Moreover, the BAD is biotinylated directly in yeast by the host biotin ligase during the expression phase.

The present procedure for the purification of SERCA1a was designed initially to increase the purity relative to the purifications described previously for SERCA1a [12,13,15]. In the case of the rat neurotensin receptor expressed in *E. coli* fused with several tags, the authors have observed that at a similar expression ratio, the His-tagged protein was not bound to the metal affinity material sufficiently well to allow an efficient purification [36]. Therefore, we aimed to increase the interaction between the fused tag and the affinity part positioned on the resin. We chose to use the very strong avidin–biotin interaction for purification purposes. We have fused the entire BAD of the oxaloacetate decarboxylase of *K. pneumoniae* to the C-terminal part of our protein. Despite the relatively large size of this tag (about 10kDa), we did not encounter obvious problems of folding. Moreover, we have obtained a proper in vivo biotinylation in *S. cerevisiae*, avoiding the in vitro biotinylation step used by Pouny et al. [21] to increase the amount of biotinylated lactose permease over-expressed in *E. coli*. In addition, in our studies, we did not find it useful to add a higher concentration of biotin in the culture medium (data not shown) as was done by Stolz et al. [35] for the purification of plant sucrose carrier from yeast.

While in some purification procedures, the authors have used the entire BAD as tags, some attempts have been made to decrease the size of this tag [18]. First, various sizes of tags have been tested for their ability to be biotinylated, in terms of simple peptides as well as tags fused to their partners [37]. In these in vitro experiments, the usual biotin ligase was the *E. coli* BirA biotin ligase and it appears that very short peptides may be recognized by this enzyme. Tucker and Grishammer have used a 13 amino acid residue Bio tag fused to the rat neurotensin receptor and increased the level of biotinylation by co-expressing the *E. coli* biotin ligase [36]. For the biotin ligases from other organisms, the in vivo biotinylation using these small tags is not very efficient, particularly in mammalian cells. This problem was compensated also by expressing the bacterial Bir A biotin ligase in these cells to biotinylate very efficiently a protein fused to a small (23 amino acid residues) artificial peptide tag [38].

For the purpose of protein purification, monomeric avidin ($K_d 10^{-7}$ M with biotin) seems to be better than

tetrameric avidin ($K_d 10^{-15}$ M with biotin) or streptavidin ($K_d 10^{-13}$ M with biotin) despite its weaker affinity for the biotinylated acceptor domain. Indeed, if a strong interaction is crucial to obtain a specific binding of the fused protein to the resin, it is important to be able to remove the protein from the resin. If we take into account work describing purification of membrane proteins by this method, the classical procedure is to use competition with free biotin present in the elution buffer [21–23,35] but an excessively high avidin–biotin affinity prevents the elution of the protein even at a high concentration of biotin. One interesting method of decreasing the interaction (which is compatible also with resin regeneration) is to replace biotin by analogues such as desthiobiotin, but this requires in vitro desthiobiotinylation [39]. In any case, even with monomeric avidin, the use of a biotin-containing buffer did not give rise to efficient elution in our hands. Consequently, SERCA1a was released from the resin with thrombin. This procedure may be inappropriate if there are thrombin sites in the protein of interest, but DNA sequence coding for cleavage sites recognized by other, very specific proteases may be inserted. A protease elution presents multiple advantages. First of all, the eluted protein has approximately the same size as the natural protein. Second, only the biotinylated protein of interest is eluted, the other proteins that are naturally biotinylated in the host organism remain bound to the resin. In our case, the naturally biotinylated yeast proteins are soluble and hence removed during the membrane fractionation. Only a very small fraction of these proteins is bound to the resin, revealing the contamination of our membrane fraction with small amounts of soluble proteins. Taking into account the thrombin elution, we tried to use a tetrameric avidin column but without improvement in terms of the purification results.

The reaction of biotinylation that takes place in yeast is not complete (unpublished results). The biotin ligase selects the proteins with a properly folded BAD domain. One hypothesis is that, if the BAD domain is folded properly, it is more likely that the Ca^{2+} -ATPase is also folded properly and fully active. The same kind of hypothesis was put forward to select active, green fluorescent protein (GFP)-fused, membrane proteins expressed in *E. coli* [40]. In addition, in the case of other proteins, it has been reported that some tags are able to promote the proper folding of their fusion partners [17]. In that respect, we have noted that the protein prepared by the BAD procedure exhibits an ATPase activity that is higher than that of the protein prepared by nickel affinity chromatography. This high level of activity is correlated with a relatively high level of purity ($\approx 40\%$) (see Table 1). Nevertheless, we did not consider this level of purity to be sufficient, which prompted us to add one step to the purification procedure as described by Jidenko et al. [1]: we performed SEC-HPLC in detergent and obtained a protein that was pure enough (about 70%) and sufficiently active (about 70% of the activity of the SR Ca^{2+} -ATPase) to allow its crystallization. The well-diffracting crystal of the over-expressed protein has led to a structure that is identical with that of the

native protein. Moreover, we were able to follow the conformational changes associated with binding/dissociation of Ca^{2+} to this SEC-HPLC purified protein. The large amplitude of the fluorescence variations recorded suggests that the purification procedure described here may be a convenient tool to examine in details the residues critical for the establishment and/or the transmission of such movements in the ATPase polypeptide.

Concluding remarks

It is well known that membrane proteins are difficult to handle. If the expression in yeast presents some advantages for all mammalian membrane proteins [16], the next step of solubilization is characteristic of each membrane protein [33,36], as each prefers one detergent relative to another. The biotinylation reaction in yeast and the procedure developed for the avidin chromatography described here should easily be generalized to other membrane proteins, and this should also be the case for the step leading to the protein elution by treatment with protease. Finally, for crystallization trials, it is again crucial to think in terms of each individual membrane protein and of its preferred detergent and sometimes lipids.

In conclusion, our procedure for over-expression and purification of membrane proteins in yeast and in a biotinylated form gives rise to a protein with relatively high purity and activity, which may be used directly to perform enzymatic studies of wild-type or mutated proteins.

Acknowledgments

We are very grateful to C. Montigny for technical assistance, and we thank C. Montigny, Drs. M. Paternostre and P. Champeil for many helpful suggestions. We thank Dr. A. Marchand for critical reading of the manuscript.

References

- [1] M. Jidenko, R.C. Nielsen, T.L. Sørensen, J.V. Møller, M. le Maire, P. Nissen, C. Jaxel, Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11687–11691.
- [2] S.B. Long, E.B. Campbell, R. Mackinnon, Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel, Science 309 (2005) 897–903.
- [3] C. Toyoshima, G. Inesi, Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum, Annu. Rev. Biochem. 73 (2004) 269–292.
- [4] J.V. Møller, P. Nissen, T.L. Sørensen, M. le Maire, Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump, Curr. Opin. Struct. Biol. 15 (2005) 387–393.
- [5] J.P. Andersen, Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by site-directed mutagenesis, Biosci. Rep. 15 (1995) 243–261.
- [6] B. Vilsen, Structure-function relationships in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum studied by use of the substrate analogue CrATP and site-directed mutagenesis. Comparison with the Na^+ , K^+ -ATPase, Acta Physiol. Scand. Suppl. 624 (1995) 1–146.
- [7] D.H. MacLennan, W.J. Rice, N.M. Green, The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases, J. Biol. Chem. 272 (1997) 28815–28818.
- [8] Y. Gluzman, SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants, Cell 23 (1981) 175–182.
- [9] K. Maruyama, D.H. MacLennan, Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca^{2+} transport activity of the Ca^{2+} -ATPase expressed in COS-1 cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 3314–3318.
- [10] Z. Zhang, D. Lewis, C. Strock, G. Inesi, M. Nakasako, H. Nomura, C. Toyoshima, Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca^{2+} binding and catalytic activation in the Ca^{2+} transport (SERCA) ATPase, Biochemistry 39 (2000) 8758–8767.
- [11] I.S. Skerjanc, T. Toyofuku, C. Richardson, D.H. MacLennan, Mutation of glutamate 309 to glutamine alters one Ca^{2+} -binding site in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum expressed in Sf9 cells, J. Biol. Chem. 268 (1993) 15944–15950.
- [12] R. Miras, M. Cuillel, P. Catty, F. Guillain, E. Mintz, Purification of heterologous sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase Serca1a allowing phosphoenzyme and Ca^{2+} -affinity measurements, Protein Expr. Purif. 22 (2001) 299–306.
- [13] F. Centeno, S. Deschamps, A.M. Lompre, M. Anger, M.J. Moutin, Y. Dupont, M.G. Palmgren, J.M. Villalba, J.V. Møller, P. Falson, et al., Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast, FEBS Lett. 354 (1994) 117–122.
- [14] E.M. Reis, E. Kurtenbach, A.R. Ferreira, P.J. Biselli, C.W. Slayman, S. Verjovski-Almeida, N-terminal chimeric constructs improve the expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast, Biochim. Biophys. Acta. 1461 (1999) 83–95.
- [15] G. Lenoir, T. Menguy, F. Corre, C. Montigny, P.A. Pedersen, D. Thines, M. le Maire, P. Falson, Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca^{2+} -ATPase, Biochim. Biophys. Acta. 1560 (2002) 67–83.
- [16] V.K. Ton, R. Rao, Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} -transporting ATPases, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287 (2004) C580–C589.
- [17] D.S. Waugh, Making the most of affinity tags, Trends Biotechnol. 23 (2005) 316–320.
- [18] J.E. Cronan Jr., Biotinylation of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins, J. Biol. Chem. 265 (1990) 10327–10333.
- [19] J. Knappe, Mechanism of biotin action, Annu. Rev. Biochem. 39 (1970) 757–776.
- [20] H.S. Kim, U. Hoja, J. Stolz, G. Sauer, E. Schweizer, Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of in vivo biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 42445–42452.
- [21] Y. Pouny, C. Weitzman, H.R. Kaback, In vitro biotinylation provides quantitative recovery of highly purified active lactose permease in a single step, Biochemistry 37 (1998) 15713–15719.
- [22] M. Julien, S. Kajiji, R.H. Kaback, P. Gros, Simple purification of highly active biotinylated P-glycoprotein: enantiomer-specific modulation of drug-stimulated ATPase activity, Biochemistry 39 (2000) 75–85.
- [23] E.M. Howard, P.D. Roepe, Purified human MDR 1 modulates membrane potential in reconstituted proteoliposomes, Biochemistry 42 (2003) 3544–3555.
- [24] D. Pompon, B. Louerat, A. Bronine, P. Urban, Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments, Methods Enzymol. 272 (1996) 51–64.
- [25] J.L. Rigaud, G. Mosser, J.J. Lacapere, A. Olofsson, D. Levy, J.L. Ranck, Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins, J. Struct. Biol. 118 (1997) 226–235.
- [26] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680–685.
- [27] B. Juul, H. Turc, M.L. Durand, A. Gomez de Gracia, L. Denoroy, J.V. Møller, P. Champeil, M. le Maire, Do transmembrane segments in proteolyzed sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

- retain their functional Ca^{2+} binding properties after removal of cytoplasmic fragments by proteinase K? *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20123–20134.
- [28] J.M. Fuentes, A.M. Lompre, J.V. Møller, P. Falson, M. le Maire, Clean Western blots of membrane proteins after yeast heterologous expression following a shortened version of the method of Perini et al, *Anal. Biochem.* 285 (2000) 276–278.
- [29] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [30] P. Champeil, F. Guillain, C. Venien, M.P. Gingold, Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-deprived sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation, *Biochemistry* 24 (1985) 69–81.
- [31] J.V. Møller, K.E. Lind, J.P. Andersen, Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. Effect of protein–protein interactions, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 1912–1920.
- [32] P. Falson, T. Menguy, F. Corre, L. Bouneau, A.G. de Gracia, S. Soulie, F. Centeno, J.V. Møller, P. Champeil, M. le Maire, The cytoplasmic loop between putative transmembrane segments 6 and 7 in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase binds Ca^{2+} and is functionally important, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17258–17262.
- [33] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Møller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim. Biophys. Acta.* 1508 (2000) 86–111.
- [34] L. Tortech, C. Jaxel, M. Vincent, J. Gallay, B. de Foresta, The polar headgroup of the detergent governs the accessibility to water of tryptophan octyl ester in host micelles, *Biochim. Biophys. Acta.* 1514 (2001) 76–86.
- [35] J. Stolz, B. Darnhofer-Demar, N. Sauer, Rapid purification of a functionally active plant sucrose carrier from transgenic yeast using a bacterial biotin acceptor domain, *FEBS Lett.* 377 (1995) 167–171.
- [36] J. Tucker, R. Grishammer, Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*, *Biochem. J.* 317 (Pt 3) (1996) 891–899.
- [37] D. Beckett, E. Kovaleva, P.J. Schatz, A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation, *Protein Sci.* 8 (1999) 921–929.
- [38] E. de Boer, P. Rodriguez, E. Bonte, J. Krijgsveld, E. Katsantoni, A. Heck, F. Grosveld, J. Strouboulis, Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 7480–7485.
- [39] S.C. Wu, S.L. Wong, Development of an enzymatic method for site-specific incorporation of desthiobiotin to recombinant proteins in vitro, *Anal. Biochem.* 331 (2004) 340–348.
- [40] D.E. Drew, G. von Heijne, P. Nordlund, J.W. de Gier, Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 507 (2001) 220–224.

Article II

Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*

Marie Jidenko^{*†}, Rikke C. Nielsen[‡], Thomas Lykke-Møller Sørensen[‡], Jesper V. Møller[§], Marc le Maire^{*†}, Poul Nissen[‡], and Christine Jaxel^{*†¶}

^{*}Unité de Recherche Associée 2096 of the Centre National de la Recherche Scientifique and Service de Biophysique des Fonctions Membranaires, Département de Biologie Joliot Curie, Commissariat à l'Énergie Atomique Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France; [†]Laboratoire de Recherche Associé 17V and Institut Fédératif de Recherches 46, Université Paris Sud, France; [‡]Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Gustav Wieds Vej 10C, DK-8000 Aarhus C, Denmark; and [§]Department of Biophysics, Institute of Physiology and Biophysics, University of Aarhus, Ole Worms Allé 185, DK-8000 Aarhus C, Denmark

Edited by H. Ronald Kaback, University of California, Los Angeles, CA, and approved June 21, 2005 (received for review May 13, 2005)

The Ca²⁺-ATPase SERCA1a (sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 1a) from rabbit has been overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. This membrane protein was purified by avidin agarose affinity chromatography based on natural biotinylation in the expression host, followed by HPLC gel filtration. Both the functional and structural properties of the overexpressed protein validate the method. Thus, calcium-dependent ATPase activity and calcium transport are essentially intact after reconstitution in proteoliposomes. Moreover, the recombinant protein crystallizes in a form that is isomorphous to the native SERCA1a protein from rabbit, and the diffraction properties are similar. This represents a successful crystallization of a mammalian membrane protein derived from a heterologous expression system, and it opens the way for the study of mutant forms of SERCA1a.

overexpression | Ca²⁺-ATPase | SERCA1a

The major protein component of the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane is a Ca²⁺-transporting ATPase that is responsible for the cessation of muscle contraction cycle. Since its discovery (1), rabbit SR Ca²⁺-ATPase (SERCA1a, sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 1a) has been a favorite subject for membrane studies, because vesicles predominantly consisting of Ca²⁺-ATPase and with intact Ca²⁺-transporting properties can be prepared in large yield from skeletal muscle. Moreover, this protein is a paradigm of P-type ATPases, which constitute the major cation transporter family. P-type ATPases are characterized by the formation of a covalent aspartylphosphorylated intermediate during their catalytic cycle. Crystallization attempts of SERCA1a started a long time ago from detergent-solubilized membranes, which provided valuable initial structural information as to how to proceed with crystallization of this difficult-to-handle membrane protein (2, 3). Recently, several 3D structures corresponding to various conformations of the catalytic cycle have been described, all of them obtained from the native protein of SR (4–10). With the object of studying structural and functional properties of mutants of this transporter, we here outline a procedure of purification of Ca²⁺-ATPase after heterologous expression in yeast (11). Our aim was to increase the quantity and, most importantly, the quality of our purified protein to be used for 3D crystallization. For this, we have chosen to use a recombinant protein: the SERCA1a fused to a biotin acceptor domain (SERCA1a-BAD). This procedure allows us to specifically purify the fusion protein by affinity chromatography after *in vivo* biotinylation, which selects for properly folded protein. Finally, we show, with wild-type SERCA1a as an example, that the purified protein can be used for crystallization and functional studies, including transport, and that its structure is isomorphous to the native enzyme from rabbit.

Methods

Protein Purification. Expression in yeast was performed as described in ref. 11. Starting from a 4-liter culture, 75 ml of a light

membrane fraction (protein concentration ≈15 mg/ml) were solubilized with dodecylmaltoside (DDM) (detergent/protein ratio of 3:1) in solubilization buffer (0.05 M Tris, pH 7/0.1 M NaCl/20% glycerol/1 mM CaCl₂/1 mM 2-mercaptoethanol/1 mM PMSF) at room temperature for 2 h. After centrifugation at 120,000 × *g*_{av} and 10°C for 30 min, the supernatant from the solubilization step was mixed with ≈9 ml of avidin resin (Softlink Soft Release Avidin Resin from Promega) and gently stirred at 4°C overnight. The suspension was then loaded onto a column. The resin was initially washed with 12 resin volumes of high-salt buffer [0.05 M Tris, pH 7/1 M NaCl/20% (wt/vol) glycerol/1 mM CaCl₂/1 mM 2-mercaptoethanol/0.05% (wt/vol) DDM] and then with 12 resin volumes of low-salt buffer (0.05 M Tris, pH 7.0/0.15 M NaCl/20% glycerol/2.5 mM CaCl₂/1 mM 2-mercaptoethanol/0.05% DDM) at a flow rate of 1 ml/min. The encoded protein contains a thrombin cleavage site (LVPRGS motif) separating the biotinylation domain from the C terminus of SERCA1a. Thus, the resin was resuspended with ≈6.4 ml of low-salt buffer, and 350 units of thrombin (Sigma-Aldrich) was added. The mixture was gently stirred at room temperature for 30 min, and another 250 units of thrombin was added to the suspension. After an additional 30 min, the thrombin cleavage was stopped by adding 2.5 mM PMSF, and the resin, reformed into a column, was placed in the cold room. The protein was eluted from the column by adding low-salt buffer, 1 ml at the time. The SERCA1a-containing fractions were identified by ATPase activity assays or Western blot and appeared after elution in ≈25 ml. SERCA1a fractions were pooled and concentrated by Centricon-30 (Amicon) to <500 μl. The concentrate was applied at 0.5 ml/min to a gel-filtration column (a 0.78-cm × 30-cm TosoHaas TSK-gel G3000SW_{XL} column), using a System Gold from Beckman in the following buffer: 100 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (Mops), pH 6.8/80 mM KCl/1 mM MgCl₂/1 mM CaCl₂/20% (wt/wt) glycerol/0.5 mg/ml C₁₂E₈ (dodecyl octaethylene glycol monoether). The fractions containing SERCA1a were concentrated by Centricon-30 until reaching a volume of ≈50 μl.

To measure the removal of DDM, the protocol was the same, except that we added 0.2 μCi (1 Ci = 37 GBq) ¹⁴C-labeled DDM [synthesized by the Centre d'Études de Saclay, France (12)] to the injected sample. Twenty-five microliters of each of the collected fractions was counted for detergent radioactivity.

Protein Crystallization, Data Collection, and Refinement. Before crystallization experiments, the concentrated SERCA1a sample (≈50

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: AMPPCP, β,γ-methyleneadenosine 5'-triphosphate; BAD, biotin acceptor domain; C₁₂E₈, dodecyl octaethylene glycol monoether; DDM, dodecylmaltoside; DOPC, dioleoyl phosphatidylcholine; SERCA1a, sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1a isoform; SR, sarcoplasmic reticulum.

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: jaxel@dsvidf.cea.fr.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

μl at 12 mg/ml) was supplemented with 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (Aventi) (≈ 0.4 mg), 10 mM Ca^{2+} , and 1 mM AMPPCP (β , γ -methyleneadenosine 5'-triphosphate) and then subjected to ultracentrifugation ($180,000 \times g$ for 10 min in a Beckman TLA110 rotor) to remove aggregated material. Crystallization experiments were performed in 2 + 2- μl hanging drops equilibrating against 450 μl of well solution [200 mM sodium acetate/10–14% (wt/vol) polyethylene glycol (PEG) 6000/10% glycerol/4% *tert*-butanol]. Crystals formed after 1–3 days at 19°C and grew over 2 weeks to 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$. The crystals were cryoprotected by increasing the glycerol concentration to 20% in the well solution and moving the crystallization tray to 4°C for overnight equilibration by vapor diffusion. Crystals were mounted in nylon loops (Hampton Research, Riverside, CA) from the mother liquor and were flash-frozen and stored in liquid nitrogen. Data were collected at 100 K at the BESSY synchrotron (Berlin), beamline BL14.1. The crystals diffracted anisotropically beyond 3.1 Å, which is comparable (at this beamline) to crystals of similar size of the native protein. Crystallographic data were processed and scaled by using the HKL package (13). The data were isomorphous with data from crystals of native protein from rabbit fast-twitch muscle SR membranes. An unbiased difference Fourier map using $F_{\text{obs}}(\text{native}) - F_{\text{obs}}(\text{recombinant})$ coefficients based on experimental phases (7) was calculated to reveal any structural differences between the native and the yeast-expressed protein. The structure was represented by a model obtained by rigid-body and grouped *B*-factor refinement of PDB entry 1T5S (7) (with bound AMPPCP and metal atoms omitted) using CNS (14). The refinement yielded a free *R*-factor of 31.4% (40–3.3 Å, all data). A σ_A -weighted $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ omit map was derived showing unambiguous electron density for the omitted ligands (Mg:AMPPCP, two Ca^{2+} ions, and one K^+). Maps and structures were displayed and analyzed by using the program *o* (15).

Protein Purity Analysis. For SDS/PAGE, aliquots were diluted in the corresponding purification buffer and mixed with an equal volume of denaturing buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8/1.4 M 2-mercaptoethanol/4% SDS/5 mM EDTA/8 M urea/0.05% bromophenol blue). Samples were boiled for 90 sec, cooled, and loaded on a Laemmli-type 8% polyacrylamide gel as described in ref. 16. Proteins were stained by Coomassie brilliant blue.

Protein Reconstitution in Proteoliposomes. For reconstitution, 20 mg of lipid (DOPC) was dissolved into 1 ml of cholate buffer [30 mM Tris, pH 7/400 mM NaCl/400 mM sucrose/1 mM MgCl_2 /1 mM NaN_3 /1% (wt/vol) sodium cholate/50 mM DTT] and stirred until clear. Before reconstitution, HPLC fractions containing yeast-expressed SERCA1a were concentrated until reaching a concentration of >1 mg/ml, whereas an SR membrane preparation (17) (kindly provided by P. Champeil, Commissariat à l'Énergie Atomique de Saclay) was solubilized with C_{12}E_8 (detergent/protein ratio, 2:1) in HPLC buffer and centrifuged at $180,000 \times g$ for 35 min. In both cases, at least 100 μg of protein was added to 5 ml of the clear lipid mixture. In this procedure, the lipid-to-protein ratio was $\approx 700:1$ and thus much higher than previously described (18). Proteoliposomes were formed by dialyzing the mixture at 10°C against a phosphate buffer (0.1 M NaH_2PO_4 , pH 7.0/1 mM MgCl_2 /5 mM DTT/1 mM NaN_3) containing Bio-Beads resin (Bio-Rad). This resin absorbs detergents, and thus cholate and C_{12}E_8 . The dialysis buffer was exchanged four times over a period of 30 h; the last two changes did not contain DTT. After a moderate withdrawal of water by treatment of the cellophane bags with PEG 20,000, the reconstituted vesicles were stored at 4°C. For specific activity calculation, we assumed that all of the protein used was reconstituted into the proteoliposomes.

Calcium Transport. For Ca^{2+} -uptake measurement, vesicles were diluted in reaction buffer (0.03 M imidazole, pH 7/1 mM MgCl_2 /1 mM NaN_3 /150 mM NaCl) with 0.33 mM $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and 0.3 mM EGTA. The reaction was initiated by addition of 5 mM MgATP, and the separation of proteoliposomes from the reaction medium was carried out by centrifugation through a gel column (Sephadex G-50, Amersham Biosciences), according to the method of Penefsky (19). Centrifuged effluents were collected in counting vials, and the radioactivity was determined by scintillation counting.

Results

Overexpression of SERCA1a-BAD in *S. cerevisiae*. For heterologous expression, we have chosen the yeast system, which is an attractive tool for producing mammalian proteins (for a review, see ref. 20). To perform a fast and efficient purification, we have added to the SERCA1a gene a DNA fragment coding for the *Klebsiella pneumoniae* C-terminal oxaloacetate decarboxylase BAD (21) (kindly provided by R. Kaback and D. Hardy, University of California, Los Angeles). Inserted after a thrombin cleavage site at the C-terminal part of the protein, this tag is chosen for the very-high-affinity binding of its biotinylated end to avidin, allowing efficient purification of the protein. The BAD (from oxaloacetate decarboxylase) is naturally biotinylated in yeast (22). Thus, the *SERCA1a-BAD* gene was inserted into a shuttle vector (23) with a galactose inducible promoter, allowing expression of the fusion protein at the end of yeast growth (11). Under these conditions, SERCA1a-BAD represents $\approx 0.6\%$ of the total membrane protein, and, from a 4-liter yeast culture, 75 ml of a membrane "light" fraction is obtained after differential centrifugation at a protein concentration of 15 mg/ml. At this step, SERCA1a-BAD represents 1% of the total protein (corresponding to 100 pmol/mg of membrane protein).

Purification of SERCA1a. After solubilization of the light membrane fraction with DDM (see protein pattern in Fig. 2a, lane 1) the solution was applied to a monomeric avidin resin. The SERCA1a protein without the BAD was then eluted from the column by the use of thrombin protease. The advantage of thrombin cleavage is first to remove the BAD, and secondly to increase considerably the yield of protein elution relatively to biotin elution previously used (21, 24, 25). This procedure also prevents the elution of host biotinylated proteins. To increase protein purity, the eluate was concentrated on Centricon-30, applied onto a HPLC gel-filtration column, equilibrated, and eluted with buffer containing 0.5 mg/ml C_{12}E_8 , thus exchanging DDM. This chromatography allowed us to separate SERCA1a from a small amount of aggregated protein, the thrombin protease, and other contaminants (see Fig. 1). To follow the removal of DDM, we added ^{14}C -labeled DDM to the injected sample. The absence of radioactivity in fractions containing SERCA1a (see Fig. 1) demonstrates that all of the bound DDM was replaced at this step by C_{12}E_8 .

The SERCA1a-containing fractions were selected (see Fig. 1) and pooled. The protein pattern of this sample is analyzed and presented in Fig. 2a (lane 2). On this Coomassie blue-stained SDS/PAGE, protein purity is estimated to be nearly equivalent to that of protein prepared from rabbit SR (Fig. 2a, lane 3). We have measured the Ca^{2+} -dependent ATPase activity of our purified protein and obtained a value of $\approx 8 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ at 25°C, consistent with the usual activity obtained for the native ATPase prepared from SR. We have also reconstituted the recombinant protein in DOPC using a standard method (18), allowing for calcium transport assays. As shown in Fig. 2b, the vesicles are able to transport Ca^{2+} at approximately the same rate as native SR Ca^{2+} -ATPase, reconstituted by the same method. Yields of SERCA1a per 4 liters of yeast culture were ≈ 1.2 mg of delipidated protein after affinity chromatography

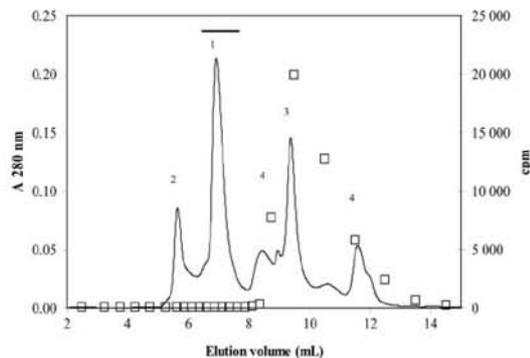


Fig. 1. Size-exclusion chromatography of yeast-expressed SERCA1a. The continuous line is the absorbance at 280 nm, and the open squares are the ^{14}C -DDM radioactivity. The bar over peak 1 represents the SERCA1a-containing fractions selected for the crystallization procedure. The other peaks (analyzed by SDS/PAGE; not shown) contain aggregates (peak 2), thrombin (peak 3), and other low-molecular-mass proteins (peaks 4). The sample in DDM + ^{14}C -DDM was prepared as described in *Methods* and eluted in the following buffer: 100 mM Mops, pH 6.8/80 mM KCl/1 mM MgCl_2 /1 mM CaCl_2 /20% (wt/wt) glycerol/0.5 mg/ml C_{12}E_8 (flow rate of 0.5 ml/min).

and 0.8 mg after gel filtration. Selected HPLC fractions containing SERCA1a were pooled and concentrated by Centricon-30 until reaching a final volume of about 50 μl and a final protein concentration of ≈ 15 mg/ml was obtained, allowing us to perform crystallization attempts.

Crystallization of SERCA1a. We prepared stable SERCA1a samples for crystallization trials by relipidation of the purified and concentrated sample. For this, DOPC was solubilized by the C_{12}E_8 detergent present in the sample at a final weight ratio of $\approx 1:3$ (DOPC/ C_{12}E_8) followed by addition of 10 mM Ca^{2+} and 1 mM AMPPCP. The sample was eventually diluted to reach a protein concentration of 12 mg/ml. A general crystallization screen did not yield any crystals, but a specific screen focusing on conditions previously identified as optimal for the native protein (7) readily produced crystals. The crystals displayed the same morphology as those of the native protein, however we observed small differences during the crystallization procedure. The purified and relipidated SERCA1a expressed in yeast was more sensitive to storage at 4°C over a time course of several

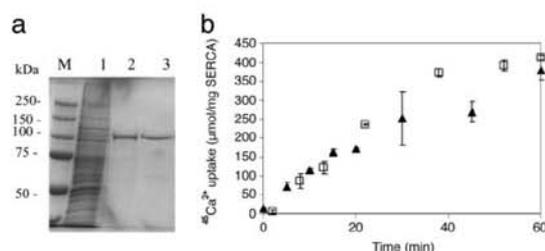


Fig. 2. Properties of yeast-expressed rabbit SERCA1a. (a) Coomassie blue-stained SDS/PAGE. Lane 1, DDM-solubilized yeast light membrane fraction before purification; lane 2, pool of HPLC-purified SERCA1a; lane 3, 0.5 μg of SR Ca^{2+} -ATPase; lane M, standard proteins, with the indicated molecular masses. (b) Ca^{2+} -uptake by SERCA1a proteoliposomes. Filled triangles, proteoliposomes containing SERCA1a solubilized from rabbit SR; open squares, proteoliposomes containing purified yeast-expressed SERCA1a.

Jidenko et al.

Table 1. Crystallographic data

Rabbit SERCA1a expressed in <i>S. cerevisiae</i> , $\text{Ca}_2\text{E1}$ -AMPPCP form	
Space group	C2
Unit cell	$a = 163.1 \text{ \AA}$, $b = 75.97 \text{ \AA}$, $c = 151.1 \text{ \AA}$, $\beta = 108.9^\circ$
Wavelength, \AA	0.9754
Resolution, \AA	40–3.3 (3.4–3.3)
$I/\sigma I$	17.1 (3.2)
Completeness, %	90.0 (85.8)
Redundancy	2.7 (2.7)
R_{sym} , %	5.8 (30.2)
R_{iso} to native, %	11.4 (23.6)
Model	
Starting model	PDB entry 1T55, AMPPCP and bound cations omitted
Refinement	Rigid body refinement of domains Grouped B-factor refinement from single, overall B-factor
R/R_{free} , %	0.304/0.318 (0.341/0.351)

days, and batch-dependent variations in the crystallization properties were larger compared with the native enzyme. A lower success rate in forming large, single crystals was observed compared with the native enzyme (10–15% of crystallization drops, versus $\approx 33\%$ for native protein), and crystals appeared within a narrow range of PEG 6000 concentration compared with the native protein (3% wt/vol window versus 6% wt/vol, respectively). This narrow range is probably the reason that no crystals were observed in the general crystallization screen. We believe that the differences are mainly due to variations in the protein/lipid/detergent ratios of the purified, relipidated, and concentrated protein. The C_{12}E_8 concentrations were routinely estimated from the increase in protein concentration, resulting from the Centricon filtration, on the assumption that micellar C_{12}E_8 , like the protein, would not pass the filter. Although the validity of this assumption could be confirmed with radiolabeled detergent, improved control of the protein/lipid/detergent parameters might be a key to reproducing in full the crystallization properties of the native SERCA1a protein from rabbit. It is well known that the ratio detergent/protein is crucial for membrane protein crystallization (26, 27).

A crystal of recombinant SERCA1a was cryo-protected and flash-frozen at 100 K as described in ref. 7. Diffraction extended anisotropically beyond a 3.1- \AA resolution, and a full data set was collected at 3.3- \AA resolution (Table 1). The crystal form is similar to that of the native enzyme as indicated by the space group and unit cell dimensions. Scaling to a data set of the native enzyme exhibits a merging R -value of 11.4% (30- to 3.3- \AA resolution), indicative of a high level of isomorphism. Indeed, the unbiased $F_{\text{obs}}(\text{native}) - F_{\text{obs}}(\text{recombinant})$ difference Fourier map shows no significant features (Fig. 3). Furthermore, an $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ omit map shows that the functional ligands such as Mg:AMPPCP and Ca^{2+} are present at their respective binding sites as previously identified from studies of the native protein (5, 7, 8) (Fig. 3). Thus, even at a detailed level, there are no structural differences, either in the cytoplasmic or the trans-membrane regions, and the structure of the yeast-expressed protein represents in full the native protein.

Discussion

We have used the previously described heterologous system *S. cerevisiae* to overexpress the membrane protein SERCA1a (11). The yeast offers more advantages than *Escherichia coli*, because exogenous proteins may be targeted to membrane-bound compartments, based on the conservation of a basic cellular machinery and signal transducing pathways similar to that of higher eukaryotes. Yeast membranes have a lipid composition (see, e.g.,

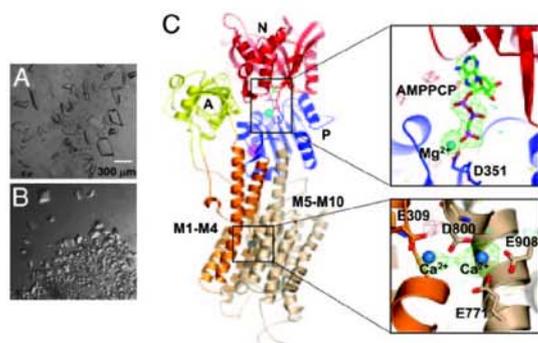


Fig. 3. A native structure of rabbit SERCA1a expressed in *S. cerevisiae*. (A) Crystals of native SERCA1a. (B) Crystals of yeast expressed SERCA1a. (C) Structural cartoon of SERCA1a expressed in *S. cerevisiae* and with individual domains shown in separate colors as indicated. Two regions of critical importance are shown in detail together with the $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ omit difference Fourier map (3σ and -3σ , green and red) and the experimental $F_{\text{obs}}(\text{native}) - F_{\text{obs}}(\text{recombinant})$ difference Fourier map (2.5σ and -2.5σ , cyan and yellow). Unambiguous electron density is reproduced for the omitted ligands (green mesh), and no significant differences between the native and the yeast-expressed protein are observed (cyan and yellow mesh).

refs. 28 and 29) rather different from the SR membrane, but in our procedure, we remove the lipids by chromatography in two different detergents; and furthermore, SERCA1a has no specific requirements for a given lipid (30) and does not preferentially bind a given class of lipid after detergent solubilization (31). Moreover, yeast expression also surpasses cultured insect and mammalian cell lines, because of the simple and inexpensive growth conditions and a shorter cell cycle (20). The use of an inducible promoter has allowed for carefully timed expression of biotinylated SERCA1a-BAD fusion protein. This principle has also been used by Reeves *et al.* (32) to decrease the toxicity of the overexpressed protein. This has allowed the production of bovine rhodopsin and its mutants at a very high level (up to 10 mg/liter) by the use of a tetracycline-inducible HEK293S stable mammalian cell line as a heterologous system. In this case, purification was based on an immunopurification of the protein of interest. However, the heterogeneous glycosylations impaired structural studies by NMR spectroscopy and 3D crystallization (33). In our case, SERCA1a is not the target of posttranslational modifications, and consequently, the purified SERCA1a protein is present in a homogenous and functional state so that it can be crystallized. The 3D structure of a small peptide ligand (PACAP) interacting with its corresponding G protein-coupled receptor (GPCR) has been obtained on the basis of protein expressed in Sf9 insect cells (34). No structure of a heterologously expressed GPCR has been obtained so far despite extensive efforts in many laboratories. Rhodopsin represents the only known crystal structure of a GPCR, yet the crystals were obtained from native protein (35).

Many different tags, including polyhistidine, have been used for purification (36, 37). Previously, the purification of *in vivo*-biotinylated membrane proteins has been successfully applied in a few cases, like a plant sucrose carrier from yeast (24), the lactose permease from *E. coli* (21), and the human P-glycoprotein expressed in yeast (25). The comparison between polyhistidine tag and BAD is in favor of the biotin, in particular for the protein activity (unpublished work). In our case, even if the BAD domain is relatively large (≈ 10 kDa), a potential advantage is that, *in vivo*, the biotinylation reaction only takes place with properly folded fusion protein, as

previously described in the case of GFP-fused membrane proteins expressed in *E. coli* (38). Thus, it is likely that inactive Ca^{2+} -ATPases proteins, improperly folded, could be eliminated at this step. In the case of lactose permease, Pouny *et al.* (21) have shown that an *in vitro* biotinylation by BirA biotin ligase increases significantly the amount of protein obtained by *in vivo* biotinylation. In our hands, we have obtained enough *in vivo*-biotinylated material to perform the affinity chromatography on an avidin monomeric column. Moreover, we have introduced a thrombin cleavage and elution, giving rise to a relatively purified protein, instead of using the classical method of elution with biotin (21, 24, 25). The following HPLC gel-filtration step worked well because the size of Ca^{2+} -ATPase is very different from the contaminants (see Fig. 1). Both in terms of purity and enzymatic activity, the purified, overexpressed protein is nearly equivalent to that of ATPase prepared from SR. This is a great advantage relative to some other expression-purification methods for this protein (11, 39).

Finally, as a most prominent point in terms of protein purity and integrity, we were able to obtain well diffracting crystals of this overexpressed membrane protein, leading to a structure identical to that of the native protein (7). To our knowledge, this result has not been obtained before with a mammalian overexpressed membrane protein. However, we also observe that the overexpressed protein crystallizes within a narrow window of precipitant concentrations compared with the native protein, and crystallization screens should therefore encompass a finer sampling of this parameter.

To summarize, it has been possible after relipidation with DOPC to recover the functional and structural properties characteristic of SR Ca^{2+} -ATPase based on heterologously expressed and chromatographically purified SERCA1a. This result provides us with a powerful tool to study, in detail, the structure of SERCA1a mutants with interesting functional properties (see, e.g., ref. 40 for a review and ref. 41 for one recent example). It also emphasizes the applicability of a heterologous expression system in the crystallization of mammalian membrane proteins.

Concluding Remarks

The amount of purified protein obtained here is within the range of what was obtained in yeast or other expression systems for mammalian membrane proteins (for reviews, see refs. 36 and 37 and references cited therein): Starting from 1 liter of culture, we routinely obtain 2.8 mg of SERCA1a protein after its expression and differential centrifugation, 1 mg after its solubilization, and 0.3 mg after avidin chromatography, and 0.2 mg of purified protein after the gel-filtration HPLC step. In some cases, higher yields than ours have been obtained (36, 37). Although low expression levels would certainly impair the efficiency of the purification procedure, one should be aware that very high production levels are likely to be problematic for correct membrane insertion and folding. It would seem that the most important property of an overexpression system would be the ability to provide active protein rather than high yields as a goal by itself. The polyhistidine tag is very popular for affinity chromatography. Our choice of using as a tag a large cleavable biotin domain, together with the elution by a protease, allows, after selective *in vivo* biotinylation, both efficient binding to the avidin resin and specific elution. This procedure constitutes an alternative to polyhistidine and other affinity purification strategies (36). It is a procedure that could be seriously considered for future works, in particular when the expression levels are moderate. New crystallization technologies are less protein-consuming and this will make the final yield a less important issue. In our experience, for 3D crystallization, the high level of specific activity and purity of the enzyme have been the most crucial factors.

We thank Claus Olesen and Anne-Marie Lund Jensen for help with data collection and data processing and Bitten Holm for expert technical assistance. This work was supported by the Danish Medical Research Council, the Danish Natural Science Research Council (Center for Structural Biology, the Dansync program, and an Ole

Romer stipend to P.N.), the Aarhus University Research Foundation, the Novo-Nordic Foundation (Denmark), and the Commissariat à l'Energie Atomique and Centre National de la Recherche Scientifique (France). R.C.N. is supported by a stipend from the Lundbeck Foundation.

- Hasselbach, W. & Makinose, M. (1961) *Biochem. Z.* **333**, 518–528.
- Pikula, S., Mullner, N., Dux, L. & Martonosi, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5277–5286.
- Stokes, D. L. & Green, N. M. (1990) *Biophys. J.* **57**, 1–14.
- Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N. M. & Stokes, D. L. (1998) *Nature* **392**, 835–839.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 647–655.
- Toyoshima, C. & Nomura, H. (2002) *Nature* **418**, 605–611.
- Sorensen, T. L., Moller, J. V. & Nissen, P. (2004) *Science* **304**, 1672–1675.
- Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) *Nature* **430**, 529–535.
- Toyoshima, C., Nomura, H. & Tsuda, T. (2004) *Nature* **432**, 361–368.
- Olesen, C., Sorensen, T. L., Nielsen, R. C., Moller, J. V. & Nissen, P. (2004) *Science* **306**, 2251–2255.
- Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thines, D., le Maire, M. & Falson, P. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1560**, 67–83.
- Kragh-Hansen, U., le Maire, M., Noël, J. P., Gulik-Krzywicki, T. & Moller, J. V. (1993) *Biochemistry* **32**, 1648–1656.
- Otwinowski, Z., Borek, D., Majewski, W. & Minor, W. (2003) *Acta Crystallogr. A* **59**, 228–234.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., et al. (1998) *Acta Crystallogr. D* **54**, 905–921.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard (1991) *Acta Crystallogr. A* **47**, 110–119.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685.
- Champeil, P., Guillain, F., Venien, C. & Gingold, M. P. (1985) *Biochemistry* **24**, 69–81.
- Andersen, J. P., Skriver, E., Mahrous, T. S. & Moller, J. V. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **728**, 1–10.
- Penefsky, H. S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 2891–2899.
- Ton, V. K. & Rao, R. (2004) *Am. J. Physiol.* **287**, C580–589.
- Pouny, Y., Weitzman, C. & Kaback, H. R. (1998) *Biochemistry* **37**, 15713–15719.
- Cronan, J. E., Jr. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10327–10333.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. & Urban, P. (1996) *Methods Enzymol.* **272**, 51–64.
- Stolz, J., Darnhofer-Demar, B. & Sauer, N. (1995) *FEBS Lett.* **377**, 167–171.
- Howard, E. M. & Roepe, P. D. (2003) *Biochemistry* **42**, 3544–3555.
- Dahout-Gonzalez, C., Brandolin, G. & Pebay-Peyroula, E. (2003) *Acta Crystallogr. D* **59**, 2353–2355.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. & Brandolin, G. (2003) *Nature* **426**, 39–44.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C. D., Fasch, E. V., Kohlwein, S. D., Paltauf, F. & Daum, G. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 2026–2034.
- Zinser, E., Paltauf, F. & Daum, G. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 2853–2858.
- Warren, G. B., Toon, P. A., Birdsall, N. J., Lee, A. G. & Metcalfe, J. C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 622–626.
- le Maire, M., Lind, K. E., Jorgensen, K. E., Roigaard, H. & Moller, J. V. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7051–7060.
- Reeves, P. J., Kim, J. M. & Khorana, H. G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13413–13418.
- Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R. & Khorana, H. G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13419–13424.
- Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M. & Shirakawa, M. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 161–165.
- Edwards, P. C., Li, J., Burghammer, M., McDowell, J. H., Villa, C., Hargrave, P. A. & Schertler, G. F. (2004) *J. Mol. Biol.* **343**, 1439–1450.
- Mus-Veteau, I. (2002) *Comp. Funct. Genomics* **3**, 511–517.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P. & Milon, A. (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1529–1546.
- Drew, D. E., von Heijne, G., Nordlund, P. & de Gier, J. W. (2001) *FEBS Lett.* **507**, 220–224.
- Miras, R., Cuillel, M., Catty, P., Guillain, F. & Mintz, E. (2001) *Protein Expression Purif.* **22**, 299–306.
- MacLennan, D. H., Rice, W. J. & Green, N. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28815–28818.
- McIntosh, D. B., Clausen, J. D., Woolley, D. G., MacLennan, D. H., Vilsen, B. & Andersen, J. P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 32515–32523.

Article III



Organic solvent extracted EmrE solubilized in dodecyl maltoside is monomeric and binds drug ligand[☆]

Tara L. Winstone^a, Marie Jidenko^b, Marc le Maire^{b,*}, Christine Ebel^{c,*},
Karen A. Duncalf^a, Raymond J. Turner^{a,*}

^a Division of Biochemistry, Department of Biological Sciences, University of Calgary, 2500 University Dr. NW, Calgary, Alta., Canada T2N 1N4

^b DBJCSBFM, URA CNRS 2096 et LRA17V (Commissariat à l'Energie Atomique/University of Paris XI)
CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

^c Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale J. P. Ebel, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz,
F-38027 Grenoble Cedex 01, France

Received 23 November 2004

Available online 15 December 2004

Abstract

Ethidium multidrug resistance protein (EmrE) is a member of the small multidrug resistance family of proteins and is responsible for resistance to a diverse group of lipophilic cations. To examine the multimeric state(s), size-exclusion HPLC and sedimentation velocity experiments were performed with EmrE solubilized in *N*-dodecyl- β -*D*-maltopyranoside (DM) detergent. EmrE was purified from *Escherichia coli* membranes using organic extraction with a 3:1 chloroform:methanol solvent followed by LH-20 chromatography and the recovered pure protein was re-solubilized in a buffer containing 2% DM. The purified protein was analyzed by SEC-HPLC to estimate the monodispersity and to determine the amount of bound detergent. The results show that EmrE is homogeneous in DM with a Stokes radius of 3.6 nm compatible with that of a monomer. Sedimentation velocity experiments indicated that the EmrE preparation was monodisperse and supports the fact that the organic extracted protein solubilized in DM is monomeric. This monomeric form of the protein analyzed here is also shown to bind substrate in the micromolar range. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: EmrE; Membrane proteins; Dodecyl maltoside; Multimers; SEC-HPLC; Ultracentrifugation; Chloroform:methanol

Ethidium multidrug resistance protein (EmrE) is a member of the small multidrug resistance (SMR) family and is the smallest multidrug resistance transporter proteins known, averaging 100–110 amino acids in length [1]. Hydropathy, gene fusion, and α -periodicity analyses support the hypothesis that SMR proteins are composed of a four-helix anti-parallel bundle [2,3]; with the N and

C-termini located within the cytoplasm [4–6]. Cysteine accessibility scanning, NMR spectroscopy, and X-ray crystallography have helped to define the transmembrane segments of EmrE [7–9].

When the functionality of EmrE was originally investigated [4], most characterized transporters were shown to contain 12 transmembrane segments (TMS) therefore it was postulated that EmrE, as well as other SMR proteins, were multimeric and likely trimeric [4]. The oligomeric structure of EmrE has been investigated using *in vivo* and *in vitro* mixing experiments of varied non-functional mutants, which demonstrated that the functional unit is a homo-oligomer [10,11]. EmrE has been modeled as a trimer [12] and as a dimer [13]. A projection structure of two-dimensional crystals of EmrE in dimyristoyl

[☆] Abbreviations: CM, chloroform:methanol; DM, *N*-dodecyl- β -*D*-maltopyranoside; DTT, dithiothreitol; SEC-HPLC, size-exclusion chromatography-high pressure liquid chromatography; TPP⁺, tetraphenylphosphonium.

* Corresponding authors. Fax: +1 403 289 9311 (R.J. Turner).

E-mail addresses: lemaire@dsvidf.cea.fr (M.le Maire), christine.ebel@ibs.fr (C. Ebel), turnerr@ucalgary.ca (R.J. Turner).

phosphatidylcholine revealed an asymmetric homo-dimer with one molecule of tetraphenylphosphonium (TPP⁺) bound at the monomer–monomer interface [14,15]. Crosslinking studies of DM solubilized EmrE support the possibility of a dimer as the oligomeric form in detergent [16]. The three-dimensional structure of EmrE in nonyl glucoside (NG) detergent was recently solved using X-ray crystallography to 3.8 Å (PDB 1S7B). The structure shows EmrE as a tetramer or a dimer of heterodimers [9]. The binding site of the substrate was proposed to be located at the interface between the dimers and the tetramer the functional entity. Cysteine crosslinking and pull-down experiments suggest mixtures of dimers and tetramers [17]. EmrE ligand binding experiments demonstrated that 0.3 mol of the substrate TPP⁺ bound to ~1 mol of dodecyl maltoside (DM) solubilized EmrE, suggesting one substrate-binding site per trimer [17,18]. However, the three-dimensional structure of EmrE by electron cryomicroscopy 2D crystals at 7.0 Å resolution shows EmrE as an eight helical bundle with substrate bound near the center, i.e., suggesting a functional dimer [19,20]. Recently, DM solubilized EmrE preparations were described by size exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation as a lipid dependent monomer–dimer equilibrium consisting predominantly of dimers of EmrE, with a binding of 0.5 mol TPP⁺ per EmrE molecule [21]. In parallel, work investigating the nature of the substrate interaction with the proposed active site residue, Glu-14, demonstrated that for DM solubilized EmrE, a stoichiometry of the substrate induced release is one proton per monomer [22], while two protons are exchanged in the transport cycle per substrate per dimer [23].

The majority of the above work was performed with EmrE directly extracted with detergent and purified as a C-terminal fusion with a Myc-epitope tag acting as a linker to a hexahistidine tag. Here EmrE with no fusion tags was purified from *Escherichia coli* membranes using organic extraction with 3:1 chloroform:methanol (CM) solvent followed by hydrophobic chromatography and resolubilized after drying with 2% DM. The multimeric state was then investigated using size-exclusion chromatography-high pressure liquid chromatography (SEC-HPLC) and analytical ultracentrifugation. It has been shown that EmrE purified in this fashion binds ligand [24] and can be reconstituted into lipid vesicles generating a functional form [25]. In our study, the EmrE–protein–detergent complex (EmrE–PD) was determined to have an R_s of 3.6 nm and 4.3 g DM bound per gram of EmrE. SEC-HPLC and analytical ultracentrifugation indicate EmrE to be monomeric in this detergent environment. Ligand binding by fluorescence quenching complements our calorimetry data [24] and provides further evidence that this form of EmrE can bind ligand in the micromolar range. The data suggest that different oligomeric forms of EmrE could participate in the drug export mechanism.

Materials and methods

Chemicals

Dodecyl maltoside (DM) (anagrade) was from Anatrace. [¹⁴C]DM (55 mCi/mmol) was synthesized by the Centre d'Etudes de Saclay, France [26]. Standard proteins for SEC were from Sigma.

Expression and purification of EmrE

Optimal expression and purification conditions are discussed elsewhere [25]. Briefly, EmrE was expressed in the *E. coli* strain LE392- Δ unc containing the expression plasmid pMS119EH with the cloned *emrE* gene positioned behind a *tac*-promoter (pEMR-11). Cells were grown to a density of 0.5 (A_{600}) in 1 L of Terrific broth at 37 °C at which time IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM. The cells were incubated for 3 h, harvested by centrifugation, and washed with SMR A buffer (50 mM Mops, 8% (w/v) glycerol, 5 mM EDTA, and 1 mM DTT, pH 7). Washed cells were resuspended in the same buffer with 100 μ M PMSF and lysed by two passes through a French press (16,000 psi). A low-speed centrifugation (9000g for 30 min) removed the heavy cellular constituents and unlysed cells, followed by a high-speed centrifugation (110,000g for 1.5 h) to collect the membrane fraction.

The membrane fraction was homogenized in SMR A buffer and diluted to a final protein concentration of 10 mg/mL. Ten milliliters of the membrane fraction was extracted with 300 mL of 3:1 CM. Fifty milliliters of double distilled water was added to separate the water-soluble constituents from the organic phase. The resulting organic phase was then evaporated to 6 mL using a roto-vap. The protein was further purified and separated from extracted lipid using Sephadex LH-20 hydrophobic chromatography with an isocratic elution in 1:1 CM solvent using an Aktäpurifier. EmrE containing fractions were pooled and solvent was removed under N₂ gas and the dried protein was stored at –70 °C. Protein purified in this fashion is easily reconstituted into lipid vesicles and demonstrates substrate transport activity [25].

Solubilization of EmrE in dodecylmaltoside

Dried EmrE aliquots were vortexed with 300 μ L SMR B buffer (50 mM Mops, pH 7, 100 mM NaCl) with 2% (w/v) DM for 2 h at room temperature followed by three rapid freeze–thaw cycles. The sample was then centrifuged at 10,000g for 10 min to remove insolubles. The soluble protein was transferred to a clean microfuge tube and protein concentration was determined by a modified Lowry assay using BSA as a standard.

Size exclusion chromatography

Method 1. Analytical SEC-HPLC was performed with an Aktä Purifier instrument. A 0.78 cm \times 30 cm TOSOH Bioscience TSK-GEL G3000SW_{XL} column and 0.6 cm \times 4 cm SW_{XL} Guard column were equilibrated with at least two column volumes of SMR B buffer prior to equilibration with 2–3 column volumes of SMR B buffer with 0.04% (w/v) DM. Thus, detergent was maintained at about 5 times the critical micelle concentration (cmc) within the eluent since DM has been shown to reversibly bind to silica columns [27] and is necessary to maintain the detergent-solubilized state of the protein while on the column. For SEC-HPLC studies of membrane proteins it is necessary for the detergent in the eluent to be present at least 2 times the cmc [28]. One hundred microliter EmrE samples (100–500 μ g/mL) were applied at 0.5 mL/min and peak detection was monitored at 280 nm.

Method 2. Analytical SEC-HPLC was performed with System Gold from Beckman instruments. A 0.78 cm \times 30 cm TosoHaas TSK-gel G3000SW_{XL} column was equilibrated with 2–3 volumes of SMR B

buffer with 0.4 mg/mL DM at about 1.75 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. One hundred to two hundred microlitre samples (about 2 mg/mL) were applied to the column at 1 mL/min. Fractions were collected along the elution profile and used to measure protein concentration and radioactivity [27]. For re-chromatography selected fractions were concentrated using Centricon 10 (Millipore) before re-injection.

Calibration of TSK G3000SW_{XL} column and Stokes radius determination

Protein standards with Stokes radii (R_S) known to be unchanged in the presence of DM [39] were used to calibrate the column in the identical detergent environment used for EmrE samples: thyroglobulin (8.6 nm, 669 kDa), ferritin (6.3 nm, 440 kDa), aldolase (4.6 nm, 158 kDa), α -chymotrypsinogen (2.1 nm, 25 kDa), cytochrome *c* (1.7 nm, 12.4 kDa). Partition coefficients (K_D) of protein standards and EmrE-PD were determined with:

$$K_D = (V_e - V_o)/(V_t - V_o),$$

where the elution volume (V_e) is the position of the peak in mL. Blue Dextran and tryptophan-methyl-ester were used as a marker of void volume (V_o) and the total excluded volume (V_t), respectively. The calibration standard curve ($\log R_S = -0.93 K_D + 0.93$) was used to interpolate R_S of EmrE-PD complex, with a correlation coefficient $R^2 = 0.998$.

Detergent binding to EmrE and measurement of EmrE protein concentration

Detergent binding to EmrE was determined using SEC-HPLC in the presence of [¹⁴C]DM. Solubilized EmrE was loaded onto a TSK-gel G3000SW_{XL} column equilibrated with SMR B buffer containing the radiolabeled detergent at about 1.75 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Twenty-five microliters of each of the collected fractions was counted for detergent radioactivity. The protein content was determined using the Bio-Rad DC protein assay for microplate, based on a modified Lowry with BSA standard. Based on the extinction coefficient ($\epsilon_{280}^{\text{EmrE}} = 29.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a correction factor of 1.67 was used to correct for the protein concentration estimation from Lowry. When detergent and protein components were compared the detergent/protein ratio was determined (g detergent/g protein) [27].

Analytical ultracentrifugation experiments

EmrE samples were prepared identical to those applied to the SEC-HPLC column. Final protein concentrations as determined by a modified Lowry were 0.2 and 0.05 mg/mL. Sedimentation velocity experiments were performed using a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge and an AN-60 TI rotor (Beckman instruments) at 20 °C and 42000 rpm, equipped with 1.2 cm path two-channel centerpieces filled with 400 μL sample and solvent (without DM). Sedimentation profiles were taken using absorbance optics at 280 nm. The data were analyzed using SEDFIT from Schuck (available at <http://www.analyticalultra-centrifugation.com>) in terms of a continuous distribution of sedimentation coefficients, $c(s)$, [29]. For this analysis (but not for subsequent ones below) we considered for EmrE-PD a partial specific volume \bar{v}_{PD} of 0.78 mL/g (an intermediate value between the value of the protein $\bar{v}_p = 0.765 \text{ mL/g}$ from amino acid composition, determined using the program *sednterp* (by D.B. Haynes, T. Laue and J. Philo; <http://www.bbri.org/RASMB/rasmb.html>) and the detergent $\bar{v}_D = 0.83 \text{ mL/g}$ from [30]), a frictional ratio f/f^0 of 1.25 corresponding to globular species, and the tabulated values of the density and viscosity of a similar solvent (0.1 M NaCl, 50 mM Tris): $\rho = 1.004 \text{ g/mL}$; $\eta = 1.03 \text{ cp}$. The effect of an inadequate choice in ρ , η , \bar{v} or f/f^0 in the $c(s)$ distribution would be a decreased resolution. The profiles of the two samples were then analyzed globally using SEDPHAT (from [29], same web site as

above) in the model of one non-interacting species, which provides independent estimates of the sedimentation, s , and diffusion, D , coefficients, and thus of the buoyancy molar mass of the PD complex, M_{bPD} . The value of M_{bPD} does not depend on any assumption on the value of the partial specific volume of the protein or complex.

Molecular mass of EmrE protein within the PD complex

The Svedberg equation relates the sedimentation coefficient to the buoyancy molar mass of the complex, M_{bPD} , and its Stokes radius:

$$M_{\text{bPD}} = s N_A 6 \pi \eta R_S,$$

where N_A is Avogadro's number. M_{bPD} is related to the multimeric state (N) of the EmrE protein within EmrE-PD, to the molecular mass of the polypeptide $M_P = 11958 \text{ g/mol}$, to δ_D and δ_L , the amounts in gram per gram of detergent and lipid, respectively, and to the partial specific volumes of the constituents, \bar{v}_{PD} , \bar{v}_D , and \bar{v}_L :

$$M_{\text{bPD}} = N M_P (1 - \rho \bar{v}_{\text{PD}}) + \delta_D N M_P (1 - \rho \bar{v}_D) + \delta_L N M_P (1 - \rho \bar{v}_L)$$

M_{bPD} can be also expressed using the partial specific volume of the complex \bar{v}_{PD} , expressed in mL per gram of EmrE-PD complex of molar mass $M_{\text{PD}} = N M_P + \delta_D N M_P + \delta_L N M_P$, or of the operational parameter ϕ' (units: ml per gram of protein), which is not a thermodynamics parameter:

$$M_{\text{bPD}} = M_{\text{PD}} (1 - \rho \bar{v}_{\text{PD}}) = N M_P (1 - \rho \phi').$$

Because $(1 - \rho \bar{v}_L)$ is close to zero [31] the presence of the lipids marginally affects the value of M_{bPD} . The Stokes radius R_S is related to the frictional ratio f/f^0 and the minimum radius R^0 of EmrE-PD:

$$R_S = f/f^0 R^0,$$

$$R^0 = ((3/4\pi N_A)(N M_P \bar{v}_p + \delta_D N M_P \bar{v}_D + \delta_L N M_P \bar{v}_L))^{1/3}.$$

Drug binding

Dried protein samples were solubilized by vortexing in 300 μL SMR C buffer (50 mM Mops, 100 mM NaCl, and 0.1 mM DTT, pH 7.0), 2% w/v DM for 2 h. Samples were then stored at -20°C before sonication and centrifugation (14,000g, 3 min) to remove insolubles. The drug ligand in buffer containing 2% DM was added to 2 mL of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protein sample in a 1 cm pathlength quartz cuvette. After each addition of ligand, the steady-state fluorescence intensity F_i of the tryptophans in EmrE was measured after 30 s mixing at 20 °C, with a SPEX Fluorolog-3, which utilizes a double monochromator for selection of the excitation wavelength, using the emission maximum at 330 nm (excitation at 280 nm) and 1 nm bandpass. The fluorescence was corrected for dilution and inner filter effects using the following equation described by Liu and Sharom [32].

$$F_{\text{icor}} = (F_i - B)(V_i/V_o)10^{0.5b(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})},$$

where A_{ex} and A_{em} are the absorbances of the sample at the excitation and emission wavelengths; V_i/V_o is the dilution factor; b is the cell pathlength; and B is the background intensity from the scattering from the micelles, which was not found to be a significant factor with the format of our spectrometer. The data were evaluated using a one-site binding model as previously described [32]

$$\Delta F/F_0 \times 100 = (\Delta F_{\text{max}}/F_0 \times 100)[L]/(K_d + [L]),$$

where $(\Delta F/F_0 \times 100)$ is the percent change in fluorescence intensity with ligand addition, $[L]$ being the ligand concentration. Data were analyzed and fitted by non-linear regression using Prism software. Titrations were performed at least 3 times from two different protein purification preparations. Parameters from each preparation were found to be within the standard deviations of a given fit from one another.

Results

Purification, SEC-HPLC elution profile analysis of EmrE, and measurement of detergent binding

Organic extraction and lipophilic chromatography were used to purify EmrE from *E. coli* membranes [25]. Solvents were evaporated and the dried protein was solubilized in buffer containing 2% DM. Elution profiles on an analytical SEC-HPLC column were very reproducible once conditions for solubilization were optimized. In order to solubilize the purified EmrE with DM in a form that was not aggregated, it was necessary for this detergent to be present in the solubilization buffer at a minimum of 2%. Also, 3 rapid freeze–thaw cycles or a brief sonication during the solubilization protocol was required. It is of interest to note that various detergents solubilize EmrE with different efficiencies; DM detergent was in fact one of the poorest. Only SDS was found to completely re-solubilize EmrE [25].

With 0.04% DM in the eluant the initial EmrE–PD complex elution shows at 280 nm a sharp, symmetrical peak at an elution volume of about 8 mL on an analytical SEC-HPLC column (Fig. 1, inset) and a very minor peak (<1% total peak area) corresponding to the DM micelle ($R_S = 3.2$ nm). Varying the protein concentration over a 10-fold range did not significantly change the elution profile. However, at protein concentrations above 2 mg/mL the presence of an aggregated species (eluting at the void volume) became apparent (data not shown). Because of the proximity between the DM micelle and EmrE–PD (see the [14 C]DM cpm in Fig. 1

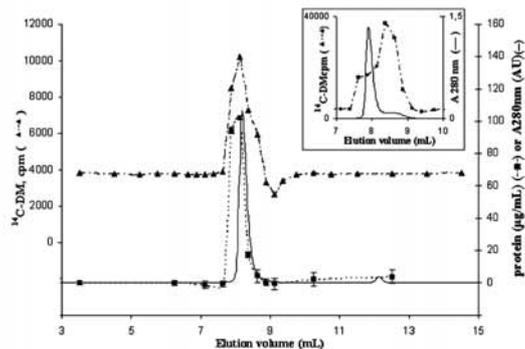


Fig. 1. Size exclusion chromatography on TSK G3000SW_{NL} and [14 C]DM binding level elution profile at 280 nm of EmrE after second passage on TSK G3000SW_{NL} (—). Experimental conditions are described in Materials and methods. [14 C]DM content of the obtained fractions. Twenty-five microliter aliquots were counted for radioactivity (duplicate) (▲). Protein concentration measured as described by modified Lowry and without correction (■). Inset, elution profile of samples first injection pass.

inset), it was necessary to determine R_S more accurately and to measure DM binding to the protein to re-chromatograph the EmrE–PD complex on the same SEC-HPLC column (Fig. 1). The column was calibrated with soluble proteins whose R_S are unchanged in the presence of DM detergent [33,34]. The EmrE–PD R_S is determined to be 3.6 nm using either method 1 or method 2. It is always less rigorous to calibrate a gel filtration in terms of molecular mass [31], however, this R_S value (3.6 nm) corresponds to water soluble proteins in the expected molecular mass range (64 kDa) if one adds the amount of bound detergent and the monomeric mass of EmrE.

After rechromatography most of the excess unbound detergent was removed and the amount of DM detergent bound (δ_{DM}) to EmrE was calculated to be 4.3 ± 0.6 g/g. This value is in the order of that expected for an integral membrane protein with no soluble domains, considering its overall hydrophobicity and predicted small exposed loops [27,35]. Bacteriorhodopsin was found to bind 4.1 g DM/g protein [27]. We note that the experimental values of δ_{DM} and R_S are in agreement, if we consider a monomeric EmrE and a fff^0 ratio of 1.3 that is in the range 1.2–1.3 found for globular species. For the data to be interpreted as a dimer, a fff^0 ratio would be 1.05, which is abnormally low. Sedimentation velocity experiments were performed to establish the stoichiometry of EmrE within the EmrE–PD complex. From these data EmrE likely does not bind a significant amount of lipid as the presence of such would correspond to even lower values of fff^0 .

Analytical ultracentrifugation

Sedimentation velocity experiments were done at two protein concentrations (0.2 and 0.05 mg/mL) in the presence of 2% w/v DM (Fig. 2). The continuous distribution analysis of the sedimentation profiles obtained using detection via absorption at 280 nm revealed one unique peak at the same s value of 2.96 ± 0.03 S for the two samples. This shows that the protein sample is homogeneous and suggests that the macromolecules (EmrE–PD complexes) are not undergoing an auto-association equilibrium. The global analysis of the two samples in the model of one species provided, from the analysis of the sedimentation boundary profiles, values for s of 2.99 S and for M_{bPD} of 11.5×10^3 g/mol. The same M_{bPD} value was obtained from s and R_S (from gel filtration): 12.5 ± 1.10^3 g/mol. A theoretical value of 11.4×10^3 g/mol is calculated considering EmrE as a monomer with $\delta_{DM} = 4.3$ g/g, the experimental amount of bound DM from gel filtration experiment. With the same hypothesis, the molar mass for the complex is $M_{PD} = 63.4 \times 10^3$ g/mol; the calculated values of partial specific volumes are $\bar{v}_{PD} = 0.82$ mL/g

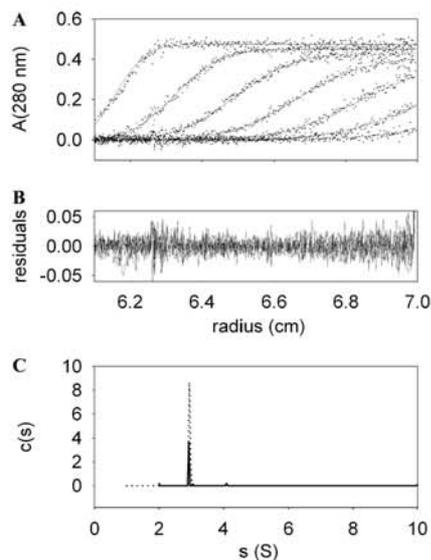


Fig. 2. Sedimentation velocity of the EmrE-PD complex. Sedimentation velocity profiles were obtained at 280 nm at 42000 rpm for EmrE at 0.2 and 0.05 mg/mL, in the presence of 2% DM. (A) A selection, for the sample at 0.2 mg/mL, of regularly spaced profiles obtained for a total of 9 h of sedimentation (dot). The result of the modeling of the sedimentation profiles, from a global analysis of 42 profiles from data obtained at 0.2, in terms of one species, is superimposed (line). (B) The selected files the superimposition of the residuals, i.e., the difference between the fitted and experimental profiles. The $c(s)$ analysis is presented on (C) for the sample at 0.2 mg/mL (dot) and 0.05 mg/mL (line).

and $\phi' = 0.05$ ml/g, i.e., very close to that recently measured for delipidated EmrE [21].

The presence of bound lipid would not affect the results; for example, their contribution to M_{bPD} would only be 0.2×10^3 g/mol, considering $\delta_L = 1$ g/g, EmrE as a monomer, and the value of $\bar{v}_L = 0.981$ cm³/g given for egg yolk phosphatidylcholine [31].

Drug binding

Fluorescence was used to analyze the binding between EmrE with four different substrates in a DM environment. Drug ligand substrates were found to bind the organic extracted EmrE solubilized in DM. K_d values of 6.81 ± 0.53 μ M for ethidium, 43.6 ± 3.80 μ M for methyl viologen, 23.6 ± 7.10 μ M for tetraphenyl phosphonium (TPP⁺), and 6.61 ± 2.20 μ M for cetylpyridinium. A representative ligand binding curve is shown in Fig. 3. These values were obtained using a protein concentration of 0.4 μ M. It was not possible to increase the protein concentration much above 0.8 μ M as the absorbance of the sample became too large for the experiment. Decreasing the protein concentration down

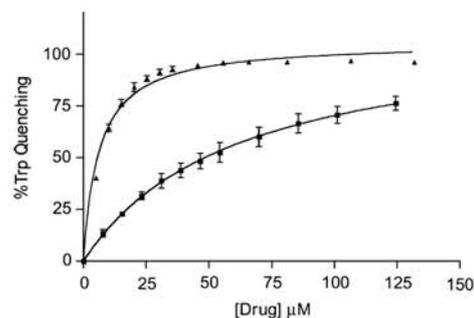


Fig. 3. Quenching of EmrE tryptophan fluorescence from substrate binding. Fluorescence quenching as a result of ligand addition. The fit shown used a non-linear regression to a model of one binding site. Ethidium bromide (▲) and methyl viologen (■).

to 0.008 μ M did not give significantly different K_d values for experiments performed using ethidium. The binding curves were fitted using a non-linear regression of a single binding site. Data fits gave R^2 values of 0.95 and higher. Runs test analysis indicated the data for all substrates methyl viologen and cetylpyridinium did not deviate significantly from the one binding site model.

Although the R^2 is high for the fits (up to 0.9929), the residuals from the fits for ethidium and TPP⁺ suggested a more complicated scheme of binding. The fits improved slightly with a second exponential term that provided a second but negative K_d . For the purpose of this study the simplest fit was used, as the goal was to provide further evidence that this monomer form could bind substrate, and not necessarily to investigate the nature of the binding. The K_d values obtained here following the change in tryptophan fluorescence characteristics are in good agreement with the K_d values obtained using isothermal titration calorimetry where a protein concentration of 40 μ M was able to be used and the partitioning of ligand into micelles could be determined [24]. Furthermore, the values obtained here are within the range of other bacterial multidrug binding proteins such as BmrR, EmrR, QacR, QacT, LmrP, EmrA, and AcrB, as well as eukaryotic MDR and P-glycoprotein ABC transporters, which bind their substrate in the μ M range.

Discussion

The present study represents an assessment of the overall hydrodynamic structure of EmrE in DM detergent solution. The multimeric state of soluble proteins can be determined with SEC-HPLC or non-denaturing PAGE. Such methods work best if the protein of interest has a similar (if not identical) overall hydrodynamic shape to that of the proteins used for calibration. Inves-

tigation of the oligomeric structure of membrane proteins using SEC-HPLC presents additional challenges due to the presence of detergent. Detergent bound to the protein has been found to make a large contribution to the hydrodynamic size of the overall complex however this is often overlooked [36]. Since characterization by SEC-HPLC relies on the hydrodynamic properties of the biomolecule of interest, the EmrE–PD complex is representative of protein in addition to bound detergent. It is essential to analyze the hydrodynamic parameters using methods that take the bound detergent into consideration especially for membrane proteins with no soluble domains, which will bind significant amounts of detergent.

We used the method of SEC-HPLC to determine the Stokes radius and bound detergent (using labeled [¹⁴C]DM) of EmrE. Along with analytical ultracentrifugation it allowed the determination of the multimeric state of EmrE. This combined technique approach provides increased confidence in the parameters obtained. For example, the *E. coli* outer membrane transporter FhuA was analyzed in this fashion with a very good precision, with SEC-HPLC giving an R_S of 4.2 nm and the analytical ultracentrifugation an R_S of 4.5 nm [33]. This same study determined the FhuA–DM complex had a globular shape, confirming the use of mass determination methods for a DM protein detergent complex. Also, when the same equations employed here were used for approximation, the calculated molecular mass of the FhuA protein alone within the PD complex was within 5% of the formula molecular mass of the protein (see Table 1).

A complementary study to ours was recently published [21]. This group purified EmrE through direct detergent extraction and affinity chromatography using a C-terminal hexahistidine-tagged EmrE. This group also studied their version of EmrE by hydrodynamics techniques. It was found that EmrE behaved essentially as a dimer [21]. This conclusion was given for two pro-

ocols of purification that resulted in different proportions of bound lipids to the complexes. These results are in contrast with ours while performed with the same detergent. However, from the raw data reported in Table 2 there is no doubt that each of the studies was properly done and that their main conclusions—a different state of oligomerization for EmrE can be trusted. Apparent molar masses—i.e., hydrodynamic radius, sedimentation coefficient are larger in the DM extraction/purification protocol when compared to organic solvent extraction one, i.e., the present study. Using gel filtration chromatography, an apparent molecular weight of 150 kDa for in vitro-synthesized EmrE was obtained in the presence of 0.08% DM [17]. Thus, the resulting buoyant molar masses are about twice from protein from a DM-extracted and purified protocol when compared to the organic solvent extraction one. This is also in agreement with sedimentation equilibrium with EmrE from the DM extraction/purification protocol, from which were derived dimer to monomer dissociation constants (reported in Table 2) which leads to mainly dimer above 10 μ M protein concentrations [21].

The detergent *N*-nonyl- β -D-glucopyranoside (NG) was used for the purification (solubilization with 2% NG and purification steps with 0.3% NG) and crystallization of EmrE that revealed a tetrameric (dimer of dimers) EmrE structure [9]. The state of the protein from this preparation in solution is not clearly established, since it is mentioned that EmrE eluted as a tetramer of \sim 48 kDa from a gel filtration column. As illustrated in the present work, apparent molar masses from SEC overestimate largely the protein molar mass due to detergent binding. Thus, such an apparent molar mass could fit monomer to tetramer assemblies. NG has a shorter hydrocarbon chain and a smaller head group, but negligible NG binding is highly improbable. Confusion from this report comes also from the fact that the same protein is described to be 90% retained through a 100 kDa cut-off membrane, suggesting some aggregation, a feature that our group observed for EmrE at high protein concentrations (T.L. Winstone and R.J. Turner unpublished results).

Our results describe here a monomer form for EmrE. A number of studies however describe the EmrE dimer as the functional unit with possible additional auto-associations of the dimers. EmrE is an unusual apparently robust membrane protein that can be purified by extraction with a variety of detergents or in organic solvents and reconstituted in a functional form even after drying [25]. The use of C-terminal or N-terminal His-tagged protein and the sample preparation, could influence the final state of the protein and explain some of the discrepancies about the multimeric state of the protein. For example, the 3D structure of EmrE that evidenced the tetramer used a N-terminal His-tagged protein with

Table 1
EmrE structural parameters as deduced from analytical SEC and ultracentrifugation

<i>SEC-HPLC data</i>	
R_S (nm)	3.6 ± 0.2
DM binding δ_D (g/g of EmrE)	4.3 ± 0.6
<i>Sedimentation velocity data</i>	
s (10^{-13} s)	2.96 ± 0.03 S (at 0.2 and 0.05 mg/mL)
M_{bPD} (kDa)	11.5
<i>Combined data</i>	
M_{bPD} ($s + R_S$) (kDa)	12.5
M_{bPD} ($M_P + \delta_D$) (kDa)	11.4
<i>Values for EmrE and DM</i>	
M_P (Da)	11,958
\bar{v}_P (cm ³ /g)	0.765
\bar{v}_D (cm ³ /g)	0.83

Table 2
Hydrodynamic characterization of different preparations of DM solubilized EmrE

EmrE preparation	M_{app} from SEC (kDa)	R_S from SEC (nm)	$s_{20,w}^c$ (S)	M_{bPD} (s + Rs) (kDa)	δ_D (g/g)	δ_L (g/g)	Species in solution
EmrE CHCl ₃ /MeOH extraction, drying, resolubilization with 2% DM [this work]	64 ^a	3.6	3.1	12.5	4.3	ND	Monomer
Cter His-EmrE solubilization with 2% DM, purification with 0.1%DM [21]	137	4.5 ^b	4.9	25	3.5	0.13	Monomer–dimer equilibrium: $K_d = 2.5 \mu\text{M}$
Cter His-EmrE solubilization with 0.5% DM, purification with 0.03% DM [21]	206	5.3 ^b	5.3 ^d	32	3.8	1.28	Monomer–dimer equilibrium, $K_d = 10 \mu\text{M}$, and larger species

ND, not determined.

^a Performed in the presence of 0.04% DM.

^b Estimated from M_{app} .

^c At about 15 μM .

^d Some larger species are also detected in sedimentation velocity.

the His-tag being cleaved prior to crystallization [9], while dimeric EmrE presented in Table 2 is a C-terminal His-tagged protein. The presence of a histidine tag may provide an explanation for the stable dimer in some of these studies. Studies have shown that the presence of the polyhistidine tag can lead to dimerization and/or stabilize dimer forms [37,38].

The lipid content of DM solubilized EmrE varies greatly for two extraction procedures made with different concentrations of DM [21]. For the solubilization protocol at low DM concentration as compared to higher DM concentration, EmrE binds a higher content of lipids, the equilibrium dissociation constant is increased (i.e., monomer is stabilized in the monomer–dimer equilibrium), and there is a tendency to aggregation towards larger association states as seen by sedimentation velocity [21]. The possibility that the multimeric state is changed in each environment thus exists for EmrE.

NMR experiments have been performed on EmrE solubilized in organic solvent which data suggest a monomeric EmrE that adopts a specific folded conformation [39]. Our results suggest that the organic solvent procedure generates a specific condition that stabilizes the monomer state even after removal of the organic solvent and solubilization of the protein using DM. However, EmrE extracted with organic solvent can be reconstituted into liposome, by adding *E. coli* phospholipids either prior to drying or after resuspension in appropriate buffer, and generate a functional transporter [25].

We have shown here that our organic solvent purified EmrE is monomeric when solubilized in 2% DM and binds substrate. Following the fluorescence change of the tryptophans in EmrE upon drug ligand addition, we determined the binding of four different substrates. Binding studies here as well as by isothermal titration calorimetry [24] show that this form of the protein can bind substrate in the micromolar range. This suggests that the chloroform:methanol solvent used here has the ability to disrupt the quaternary interactions during

extraction resulting in a stable monomer form that provides a ligand binding site. With the micelle-to-protein ratio in our experiments at 1000 to 1, once a monomer binds ligand it is unlikely that it will find another protein containing micelle to fuse to and dimerize. Therefore, our experiments are looking at the first event of ligand binding, that to one-half of a binding site—assuming dimer final form. This would be in agreement with the loss of one proton per monomer upon ligand binding measured in detergent-solubilized preparation [22].

Determining the in vivo multimeric state of EmrE is a key component to understanding its transport function and a possible efflux mechanism. While the recent crystal structure suggests a hetero-tetrameric structure, it is crucial to point out that this was obtained in a unique detergent environment (for which no functionality was mentioned). Our previous work has proven that while EmrE exists in a similar conformation in *E. coli* lipid SUVs and DM detergent, it is not identical [40]. EmrE has also been shown to bind substrate in both these environments [24]. It is clear that EmrE can adopt different dynamics and conformational fine structure in various membrane mimetic environments as well as through differences in how the protein is purified. Studying EmrE purified in different ways and solubilized in different membrane mimetics has resulted in different oligomeric states. These differences could account for higher binding affinities for TPP⁺ observed in other publications in the nanomolar range in which a dimer or higher order of oligomerization may be present [15,17,18]. Further work will elucidate these differences and their relationships to the in vivo functional folding state(s).

Perhaps a reason why the oligomeric form has been difficult to establish for EmrE is that some substrates may be better accommodated by a monomer versus a dimer form, or perhaps even trimeric or tetrameric versions. In Fig. 4 we present a simple diagram that reconciles our data with some of the biochemical and structural studies published. The transport cycle is shown with EmrE as a dimer. The formation of the Li-

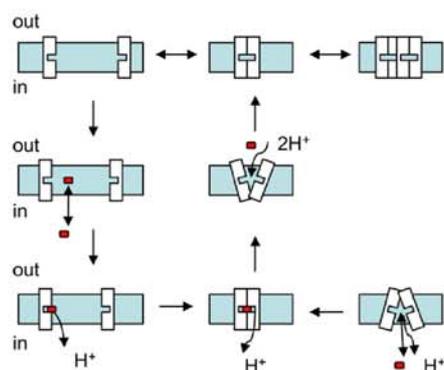


Fig. 4. Binding and transport model of EmrE.

gand (EmrE)₂ complex would occur through a dimeric EmrE with the release of two protons. Alternatively, a monomer binds ligand while releasing one proton, and the subsequent formation of the dimer would correspond to the release of a second H⁺. The result is drug export and concurrent reprotonation from the extra-cytoplasmic side. We also provide for the possibility of higher order oligomer formation.

Acknowledgments

This work was supported by an operating grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to R.J.T. We also thank Prof. Jesper V. Møller (Aarhus University, Denmark) and Tobias Schümmer for technical assistance.

References

- [1] M. Putman, H.W. Van Veen, W.N. Konings, Molecular properties of bacterial multidrug transporters, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 672–693.
- [2] T. Arkin, W.P. Russ, M. Lebendiker, S. Schuldiner, Determining the secondary structure and orientation of EmrE, a multi-drug transporter, indicates a transmembrane four-helix bundle, *Biochemistry* 35 (1996) 7233–7238.
- [3] R.A. Edwards, R.J. Turner, Alpha-periodicity analysis of small multidrug resistance (SMR) efflux transporters, *Biochem. Cell Biol.* 76 (1998) 791–797.
- [4] I.T. Paulsen, M.H. Brown, S.J. Dunstan, R.A. Skurray, Molecular characterization of the *staphylococcal* multidrug resistance export protein QacC, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 2827–2833.
- [5] M.S. Son, C. Del Castillo, K. Duncalf, D. Carney, J.H. Weiner, R.J. Turner, Mutagenesis of Sug, a small multidrug resistance protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 914–921.
- [6] S. Ninio, Y. Elbaz, S. Schuldiner, The membrane topology of EmrE—a small multidrug transporter from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 562 (2004) 193–196.
- [7] S.S. Mordoch, D. Granot, M. Lebendiker, S. Schuldiner, Scanning cysteine accessibility of EmrE, an H⁺-coupled multidrug transporter from *Escherichia coli* reveals a hydrophobic pathway for solutes, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 19480–19486.
- [8] M. Schwaiger, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, M. Coles, A. Groger, C. Schwarz, S. Schuldiner, H. Kessler, NMR investigation of the multidrug transporter EmrE, an integral membrane protein, *Eur. J. Biochem.* 254 (1998) 610–619.
- [9] C. Ma, G. Chang, Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 2852–2857.
- [10] H. Yerushalmi, M. Lebendiker, S. Schuldiner, Negative dominance studies demonstrate the oligomeric structure of Emr, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31044–31048.
- [11] D. Rotem, N. Sal-man, S. Schuldiner, In vitro monomer swapping in EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, reveals that the oligomer is the functional unit, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48243–48249.
- [12] J. Torres, I.T. Arkin, Recursive use of evolutionary conservation data in molecular modeling of membrane proteins. A model of the multidrug H⁺ antiporter EmrE, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 3422–3431.
- [13] K.-E. Gottschalk, M. Soskine, S. Schuldiner, H. Kessler, A structural model for EmrE, a multi-drug transporter from *Escherichia coli*, *Biophys. J.* 86 (2004) 335–3348.
- [14] C.G. Tate, E.R.S. Kunji, M. Lebendiker, S. Schuldiner, The projection structure of EmrE, a proton-linked multidrug transporter from *Escherichia coli*, at 7 Å resolution, *EMBO J.* 20 (2001) 77–81.
- [15] C.G. Tate, I. Ubarretxena-Belandia, J.M. Baldwin, Conformational changes in the multidrug transporter EmrE associated with substrate binding, *J. Mol. Biol.* 332 (2003) 229–242.
- [16] M. Soskine, S. Steiner-Mordoch, S. Schuldiner, Crosslinking of membrane-embedded cysteines reveals contact points in the EmrE oligomer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 12043–12048.
- [17] Y. Elbaz, S. Steiner-Mordoch, T. Danieli, S. Schuldiner, In vitro synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 1519–1524.
- [18] T.R. Muth, S. Schuldiner, A membrane-embedded glutamate is required for ligand binding to the multidrug transporter EmrE, *EMBO J.* 19 (2000) 234–240.
- [19] I. Ubarretxena-Belandia, J.M. Baldwin, S. Schuldiner, C.G. Tate, Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer, *EMBO J.* 22 (2003) 6175–6181.
- [20] I. Ubarretxena-Belandia, C.G. Tate, New insights into the structure and oligomeric state of the bacterial multidrug transporter EmrE: an unusual asymmetric homo-dimer, *FEBS Lett.* 564 (2004) 234–238.
- [21] P.J.G. Butler, I. Ubarretxena-Belandia, T. Warne, C.G. Tate, The *Escherichia coli* multidrug transporter EmrE is a dimer I the detergent-solubilized state, *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 797–808.
- [22] M. Soskine, Y. Adam, S. Schuldiner, Direct evidence for substrate-induced proton release in detergent-solubilized EmrE, a multidrug transporter, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 9951–9955.
- [23] D. Rotem, S. Schuldiner, EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, transports monovalent and divalent substrates with the same stoichiometry, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 48787–48793.
- [24] C.W. Sikora, R.J. Turner, Investigation of ligand binding to EmrE by isothermal calorimetry, *Biophys. J.* (2005), in press.
- [25] T.L. Winstone, K.A. Duncalf, R.J. Turner, Optimization of expression and the organic extraction purification of the integral membrane protein EmrE, *Prot. Express. Purif.* 26 (2002) 111–121.

- [26] U. Kragh-Hansen, M. le Maire, J.P. Noel, T. Gulik-Krzywicki, J.V. Møller, Transitional steps in the solubilization of protein-containing membranes and liposomes by nonionic detergent, *Biochemistry* 32 (1993) 1648–1656.
- [27] J.V. Møller, M. le Maire, Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 18659–18672.
- [28] J.R. Casey, R.A.F. Reithmeier, Analysis of the oligomeric state of Band 3, the anion transport protein of the human erythrocyte membrane, by size exclusion high performance liquid chromatography, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 15726–15737.
- [29] P. Schuck, Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling, *Biophys. J.* 78 (2000) 1606–1619.
- [30] A. Musatov, J. Ortega-Lopez, N.C. Robinson, Detergent-solubilized bovine cytochrome *c* oxidase: dimerization depends on the amphiphilic environment, *Biochemistry* 39 (2000) 12996–13004.
- [31] C. Tanford, Y. Nozaki, J.A. Reynolds, S. Makino, Molecular characterization of proteins in detergent solutions, *Biochemistry* 13 (1974) 2369–2376.
- [32] F.L. Sharom, P. Lu, R. Liu, X. Yu, Linear and cyclic peptides as substrates and modulators of P-glycoprotein: peptide binding and effects on drug transport and accumulation, *Biochem. J.* 333 (1998) 621–630.
- [33] P. Boulanger, M. le Maire, M. Bonhivers, S. Dubois, M. Desmadril, L. Letellier, Purification and structural and functional characterization of FhuA, a transporter of *Escherichia coli* outer membrane, *Biochemistry* 35 (1996) 14216–14224.
- [34] M. le Maire, L.P. Aggerbeck, C. Monteilhet, J.P. Andersen, J.V. Møller, The use of high-performance liquid chromatography for the determination of size and molecular weight of proteins: a caution and a list of proteins suitable as standards, *Anal. Biochem.* 154 (1986) 525–535.
- [35] M. le Maire, S. Kwee, J.P. Andersen, J.V. Møller, Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins, *Eur. J. Biochem.* 129 (1983) 525–532.
- [36] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Møller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochem. Biophys. Acta* 1508 (2000) 86–111.
- [37] J. Wu, M. Filutowicz, Hexahistidine (His6) tag dependent protein dimerization: a cautionary tale, *Acta Biochim. Pol.* 46 (1999) 591–599.
- [38] A.K. Mohanty, M.C. Wiener, Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position, *Prot. Express. Purif.* 33 (2004) 311–325.
- [39] C. Klammt, F. Löhr, B. Schäfer, W. Haase, V. Dötsch, H. Rüterjans, C. Glaubitz, F. Bernhard, High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 568–580.
- [40] S. Federkeil, T.L. Winstone, G. Jicking, R.J. Turner, Spectroscopic analysis of EmrE in various membrane mimicking environments, *Biochem. Cell Biol.* 81 (2003) 61–70.

Résumé

Dans cette thèse est présentée une nouvelle stratégie de purification de SERCA1a après son expression hétérologue chez *S. cerevisiae*. La protéine est fusionnée à un domaine accepteur de biotine, biotinylé *in vivo* par la levure. La procédure de purification, basée sur la forte interaction entre avidine et biotine, permet d'obtenir une protéine active pure à 40-50%. Une étape supplémentaire de filtration sur gel en HPLC a permis d'augmenter la pureté d'environ 70%, tout en conservant une très bonne activité spécifique. Les cristaux obtenus de SERCA1a ainsi purifiée diffractent les rayons X à 3,1Å.

Cette nouvelle méthode de purification a été appliquée avec succès au mutant SERCA1a-E309Q. De petits cristaux de ce mutant ont pu être isolés. Cette méthode a également permis de purifier SERCA3a, bien que le faible taux d'expression de la protéine de fusion chez *S. cerevisiae* limite la quantité purifiée. En parallèle, des essais d'immunolocalisation cellulaire de SERCA3a dans différentes lignées cellulaires et dans des coupes de peau ont été réalisés.

Study of Sarco/Endoplasmique Ca^{2+} ATPase: A new purification method for yeast-expressed SERCA1a leading to crystallisation , application to the E309Q mutant and study of an other isoform, SERCA3We describe here a new purification method of the rabbit SERCA1a after its heterologous expression in the yeast *S. cerevisiae* . A "biotin acceptor domain" is fused at the C-terminal part of the protein and is biotinylated *in vivo* by the yeast. The purification procedure, based on the strong interaction between avidin and biotin, allows us to obtain a protein pure at 40-50% and well active. After an additional purification step by SEC-HPLC the protein is pure at about 70% and always well active. Crystals were obtained from SERCA1a purified by this method and they diffract X-rays at 3,1 Å.

This new method was used with success to purify the mutant E309Q. Small crystals of the mutant were obtained. SERCA3a could also be purified using this procedure, but the low yield of expression limits the amount that could be purified. In parallel, immunolocalization of SERCA3a was performed in several cell lines and in cryosections of skin.

Mots clés : ATPase Ca^{2+} - protéine membranaire- purification -immunolocalisation

Key words: Ca^{2+} -ATPase-membrane protein- purification- immunolocalization

Laboratoire de Transport Membranaire et Détoxication, Service de Biophysique des Fonctions Membranaires, Département de Biologie Joliot Curie - URA CNRS 2096 - LRA 17V et IFR46 Université Paris Sud, Batiment 528, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.