



HAL
open science

Production de domaines recombinants PRODH en vue de l'analyse structurale & Caractérisation de la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine par RMN et Modélisation Moléculaire

Ludovic Carlier

► **To cite this version:**

Ludovic Carlier. Production de domaines recombinants PRODH en vue de l'analyse structurale & Caractérisation de la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine par RMN et Modélisation Moléculaire. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Rouen, 2006. Français. NNT : . tel-00124229

HAL Id: tel-00124229

<https://theses.hal.science/tel-00124229>

Submitted on 12 Jan 2007

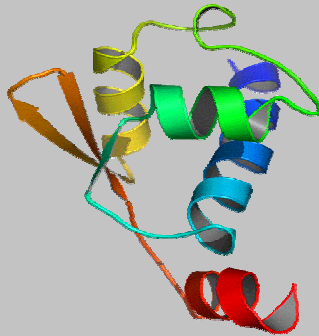
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Production de domaines recombinants PRODH en vue de l'analyse structurale

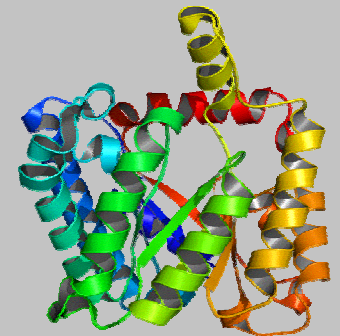
&

Caractérisation de la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine par RMN et Modélisation Moléculaire



Ludovic CARLIER

Présenté en vue d'obtenir le titre de
Docteur de l'Université de Rouen



10 juillet 2006

Plan

Contexte biologique

Expression des protéines PRODH sauvage et mature

Production de 4 domaines PRODH

Conclusions

Plan

Contexte biologique

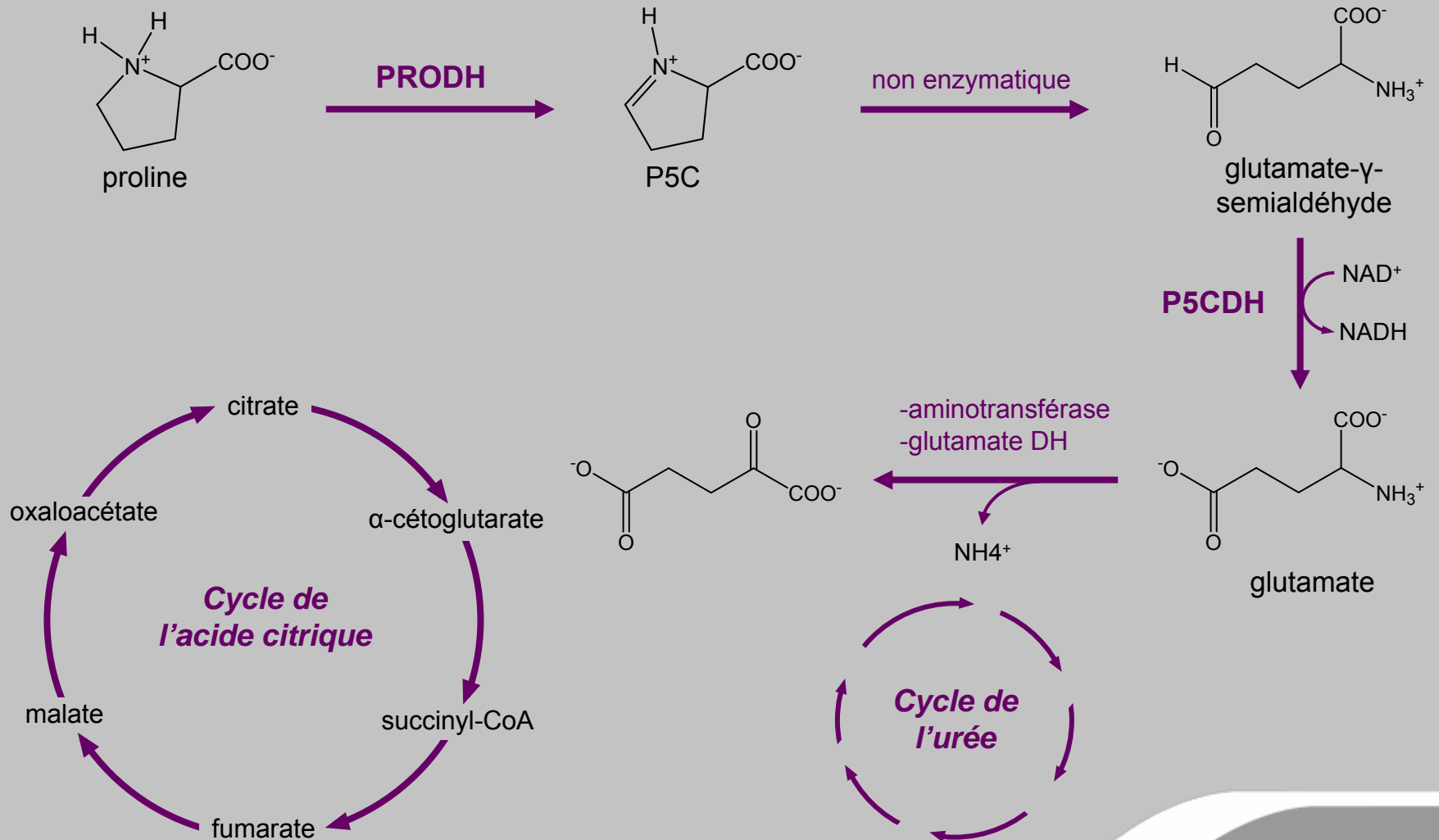
Expression des protéines PRODH sauvage et mature

Production de 4 domaines PRODH

Conclusions

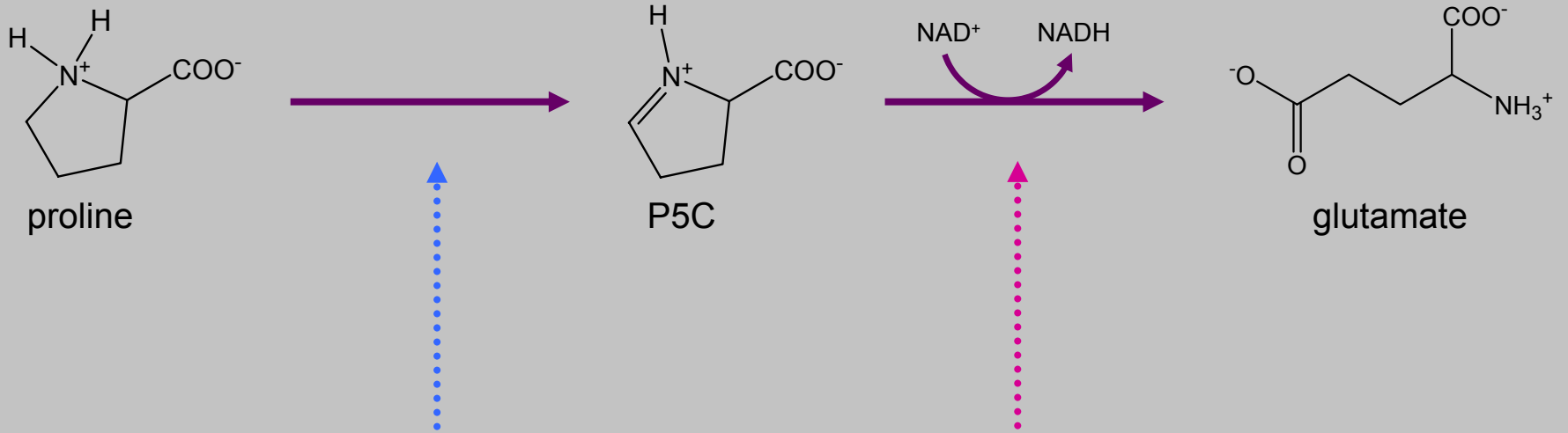
Contexte biologique

Le catabolisme de la proline



Contexte biologique

Le catabolisme de la proline



Contexte biologique

Hypothèses sur la régulation de PRODH chez les eucaryotes

- Enzyme localisée dans la matrice mitochondriale et fixée à la membrane interne
- Lactate : inhibiteur compétitif de PRODH
- Activité enzymatique :
 - nécessite la présence d'un accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire
 - inhibée par le KCN
 - indépendante en dinucléotide de type NAD^+ ou NADP^+

→ cofacteur FAD ou FMN ?

Contexte biologique

Troubles de l'activité de PRODH chez les eucaryotes

Hyperprolinémie de type I

- Maladie rare récessive associée à un taux élevé de proline
- Possibilité de troubles neurologiques sévères :
 - retard mental
 - retard psychomoteur
 - épilepsie

→ mutations du gène PRODH associées à ces troubles

Contexte biologique

Troubles de l'activité de *PRODH* chez les eucaryotes

PRODH et schizophrénie



- Le syndrome de Digeorge :
 - microdélétion de la région q11 du chromosome 22 contenant *PRODH*
 - prévalence de la schizophrénie de 20 à 30 fois supérieure
- Recherche de variations nucléotidiques du gène *PRODH* :
 - **relation** entre hyperprolinémie de type I et schizophrénie
 - **aucune relation** entre hyperprolinémie de type I et schizophrénie

Contexte biologique

Objectifs de l'étude

- PRODH : - responsable de l'hyperprolinémie de type I
 - implication dans la schizophrénie ?
 - Cofacteur ? Inhibiteur naturel ? mécanismes d'action ?



Caractérisation structurale de PRODH humaine par RMN



mode de
fonctionnement



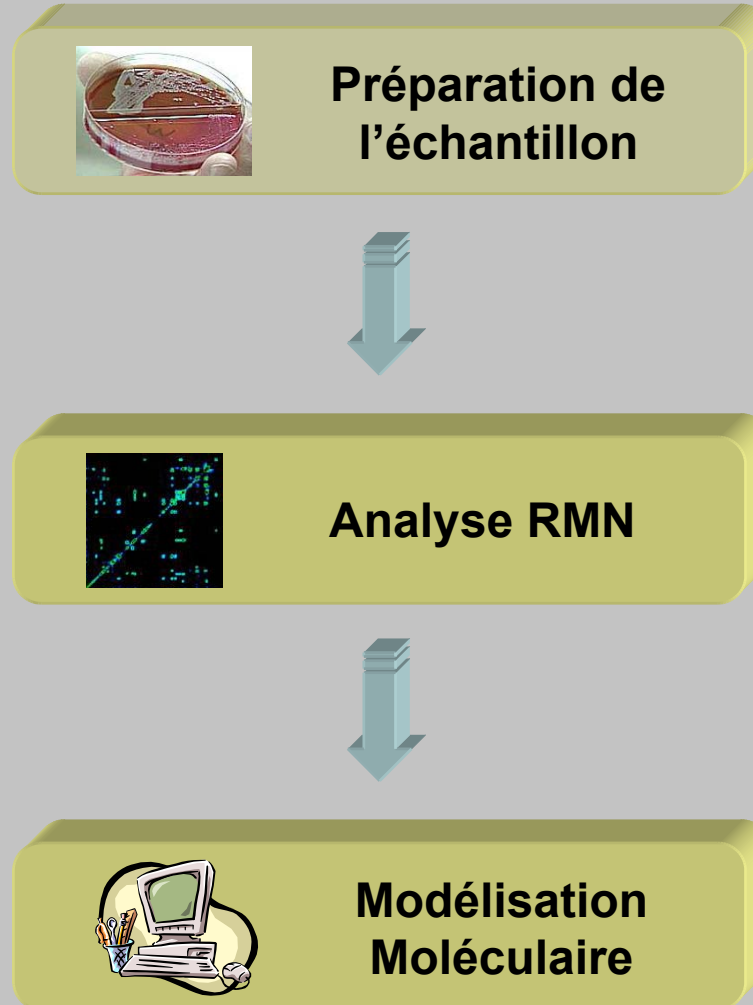
bases moléculaires de
l'hyperprolinémie de type I



caractérisation
de ses partenaires

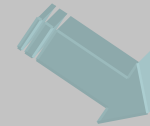
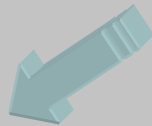
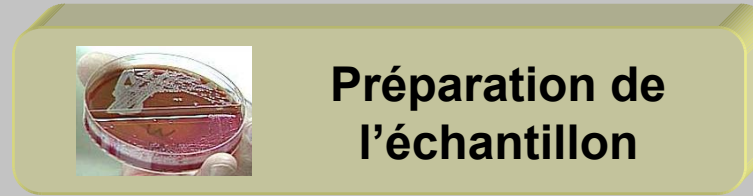
Contexte biologique

Stratégie d'étude structurale d'une protéine par RMN



Contexte biologique

Stratégie d'étude structurale d'une protéine par RMN



Conditions de l'analyse par RMN :

- protéine de taille raisonnable (< 45 kDa)
- protéine soluble, stable, en quantité



Production dans un organisme recombinant

~~PRODH humaine : enzyme de 70 kDa~~

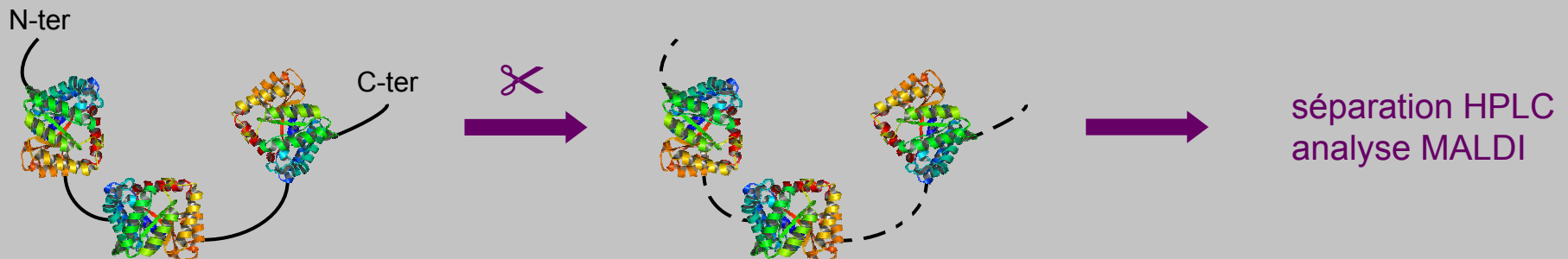


Recherche des domaines structuraux

Contexte biologique

Stratégie de préparation de l'échantillon

- 1) Surexpression de PRODH humaine sous forme **soluble**
- 2) Digestion enzymatique ménagée suivie sur MALDI-TOF :



- 3) Surexpression des domaines de taille compatible avec l'analyse RMN
- 4) Etude structurale de ces domaines par RMN

Plan

Contexte biologique

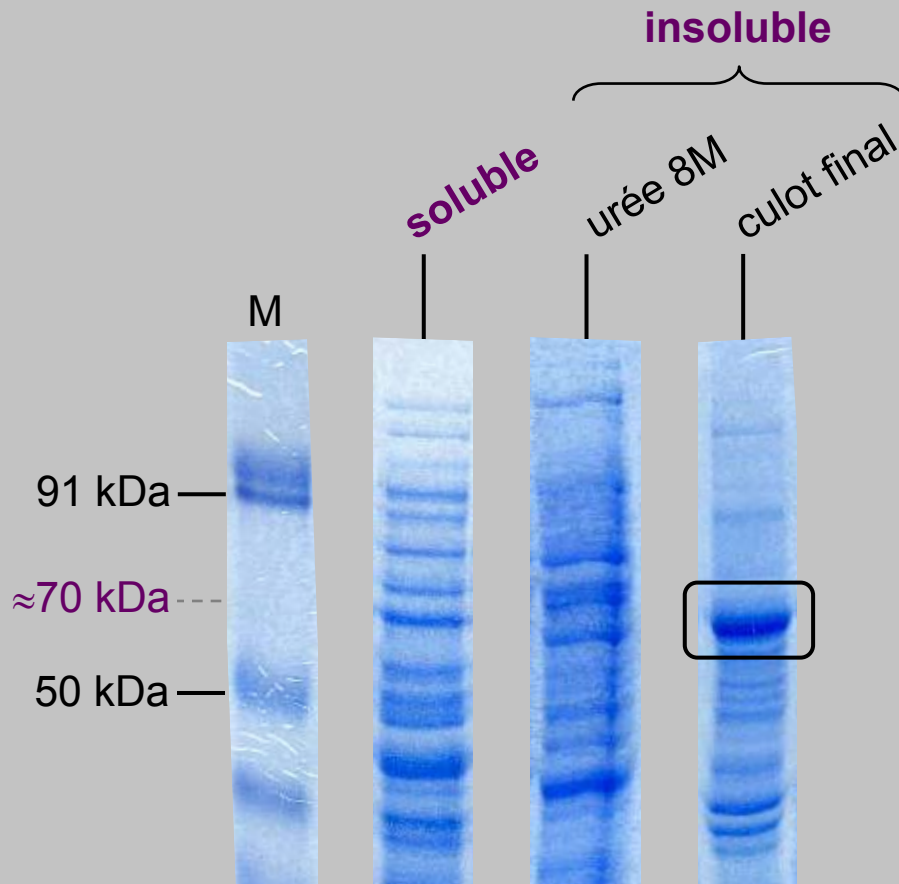
Expression des protéines PRODH sauvage et mature

Production de 4 domaines PRODH

Conclusions

Expression de PRODH sauvage et mature

Expression de PRODH sauvage

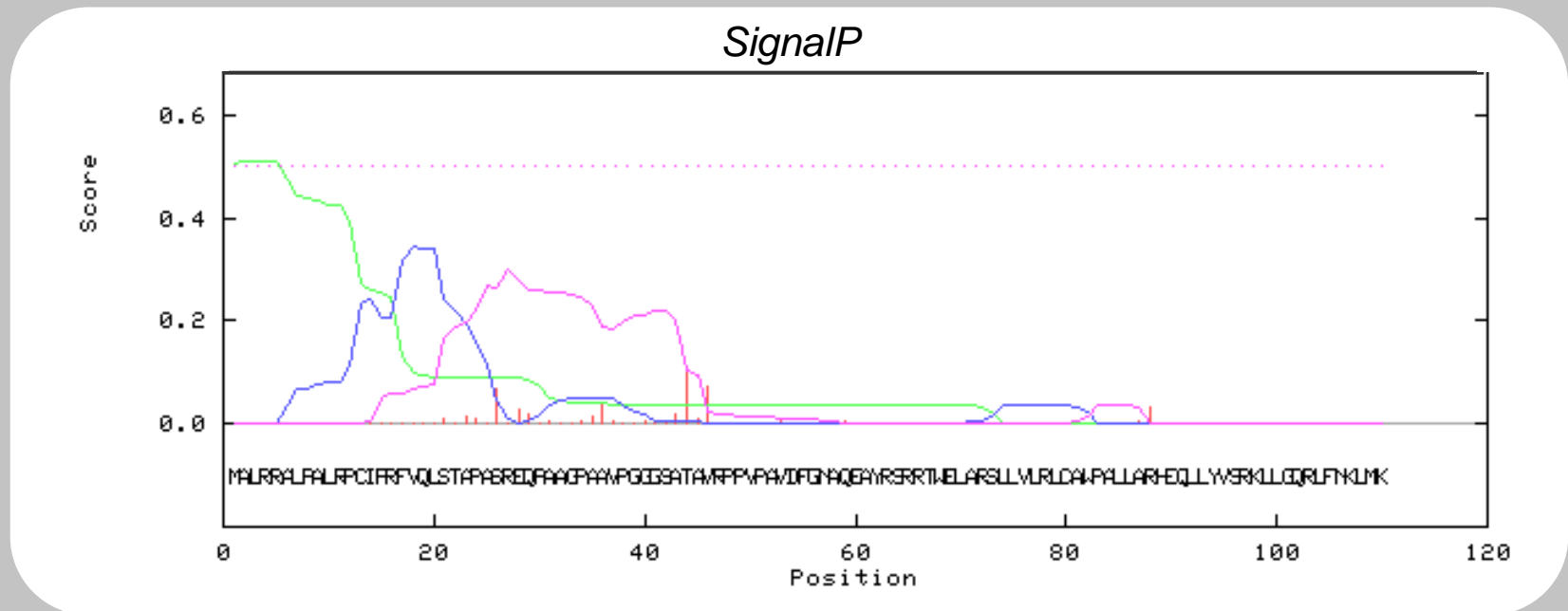


corps d'inclusion
hydrophobie élevée

- optimisation des paramètres :
 - ajout de détergents
 - diminution de la température
 - diminution de l'inducteur

Prédiction du peptide signal de PRODH

- Les signaux d'adressage mitochondrial :
 - localisés en N-terminal de la séquence protéique
 - longueur et composition de séquence variable

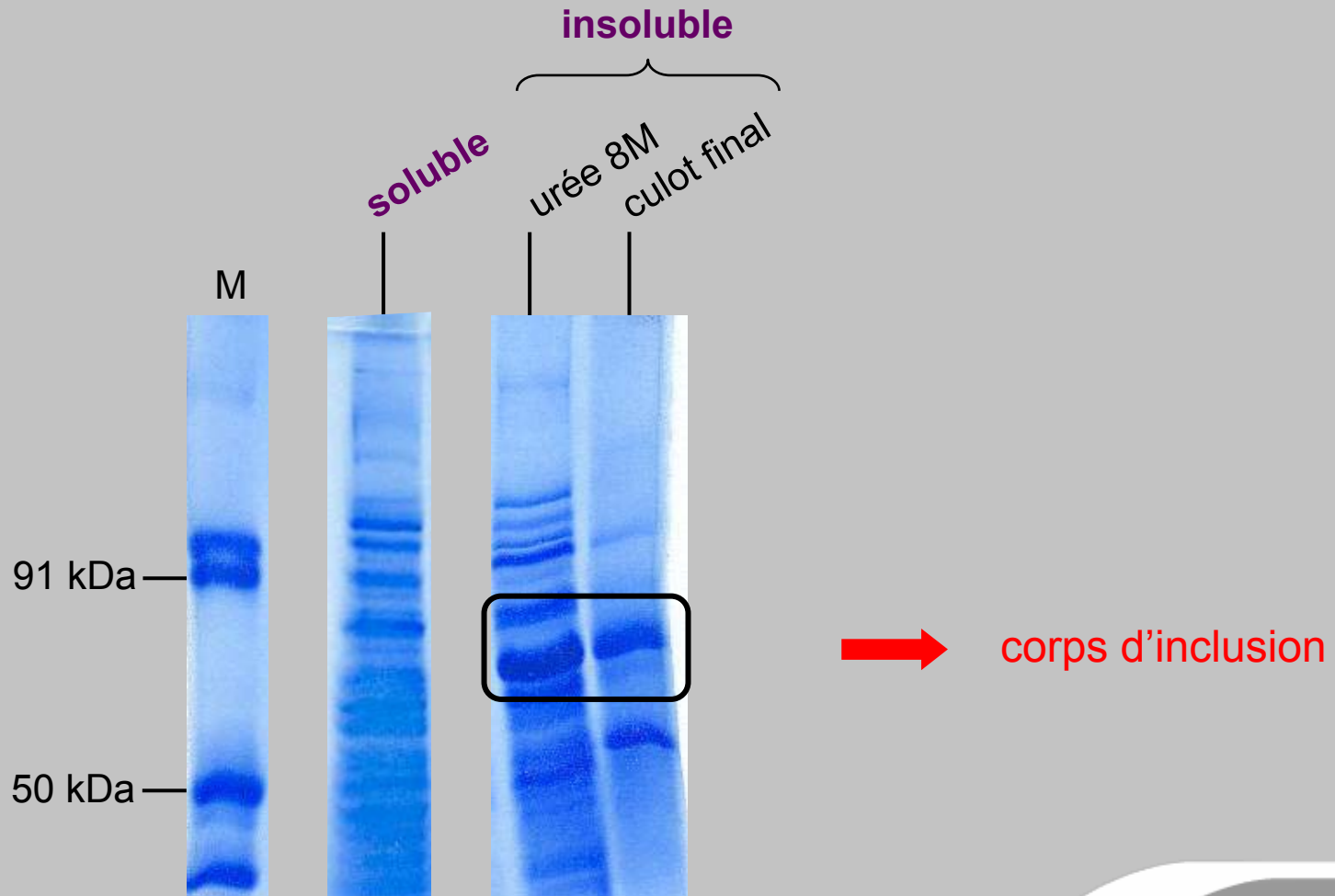


prédiction consensus : 35 résidus

➔ PRO564

Expression de PRODH sauvage et mature

Expression de PRO564



Conclusions

PRODH et PRO564 sont exprimés sous forme de corps d'inclusion



- changer d'organisme de production ?

- criblage à moyen débit de plusieurs paramètres : partenaire de fusion...



Programme de Production et Marquage des Protéines 3PM du CEA de Saclay



7 partenaires de fusion



3 souches bactériennes



2 températures

Plan

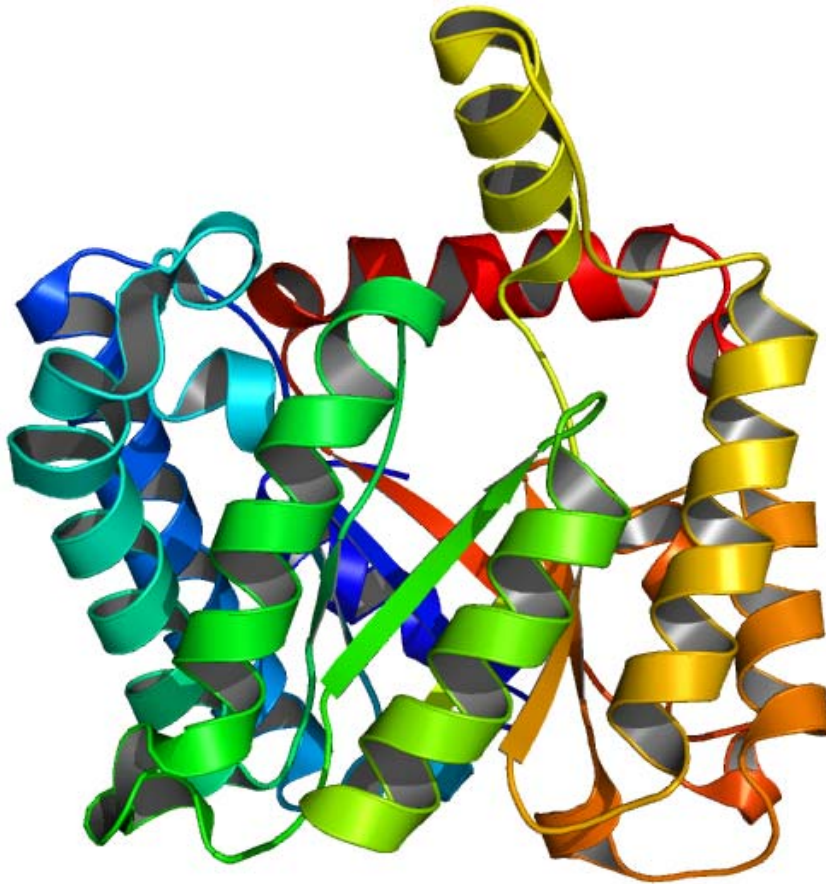
Contexte biologique

Expression des protéines PRODH sauvage et mature

Production de 4 domaines PRODH

Conclusions

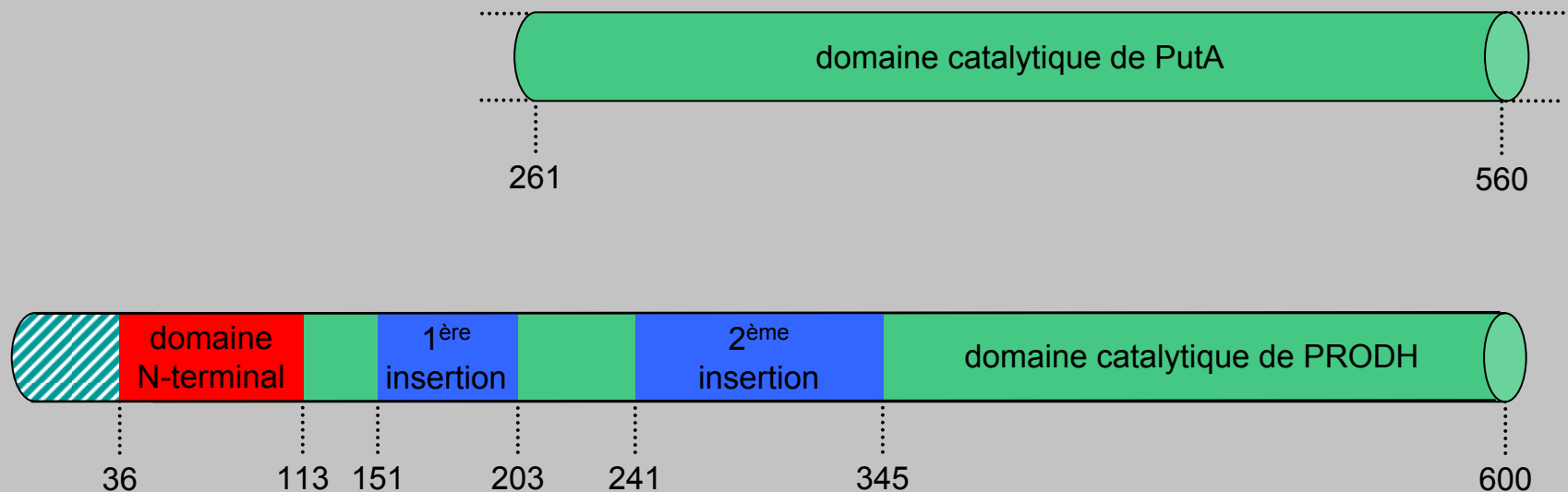
Structure du domaine catalytique de PutA



- tonnelet $\alpha 8\beta 8$ de 350 aa
- cofacteur FAD
- inhibiteur lactate

Analyse bio-informatique : organisation de PRODH

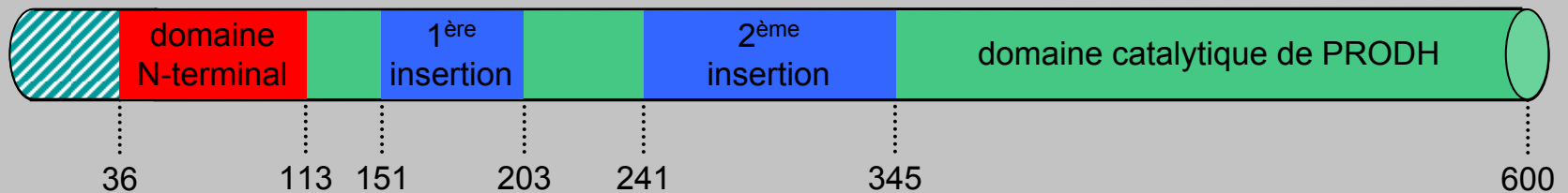
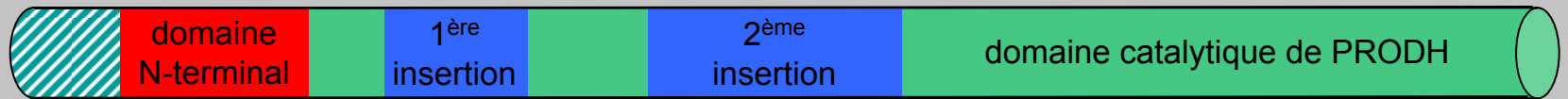
- report de la structure secondaire de PutA sur l'alignement de séquences



→ présence de 2 insertions

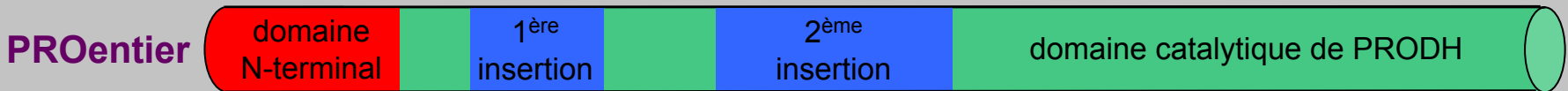
Production de 4 domaines PRODH

Analyse bio-informatique : sélection de 4 domaines



Production de 4 domaines PRODH

Analyse bio-informatique : sélection de 4 domaines



Criblage des conditions d'expression en microplaques

	PROentier	PROcatal	PROter	PROinser
partenaires de fusion	7	7	7	7
souches d'expression	2	2	3	3
températures d'expression	2	2	2	2
TOTAL	28	28	42	42

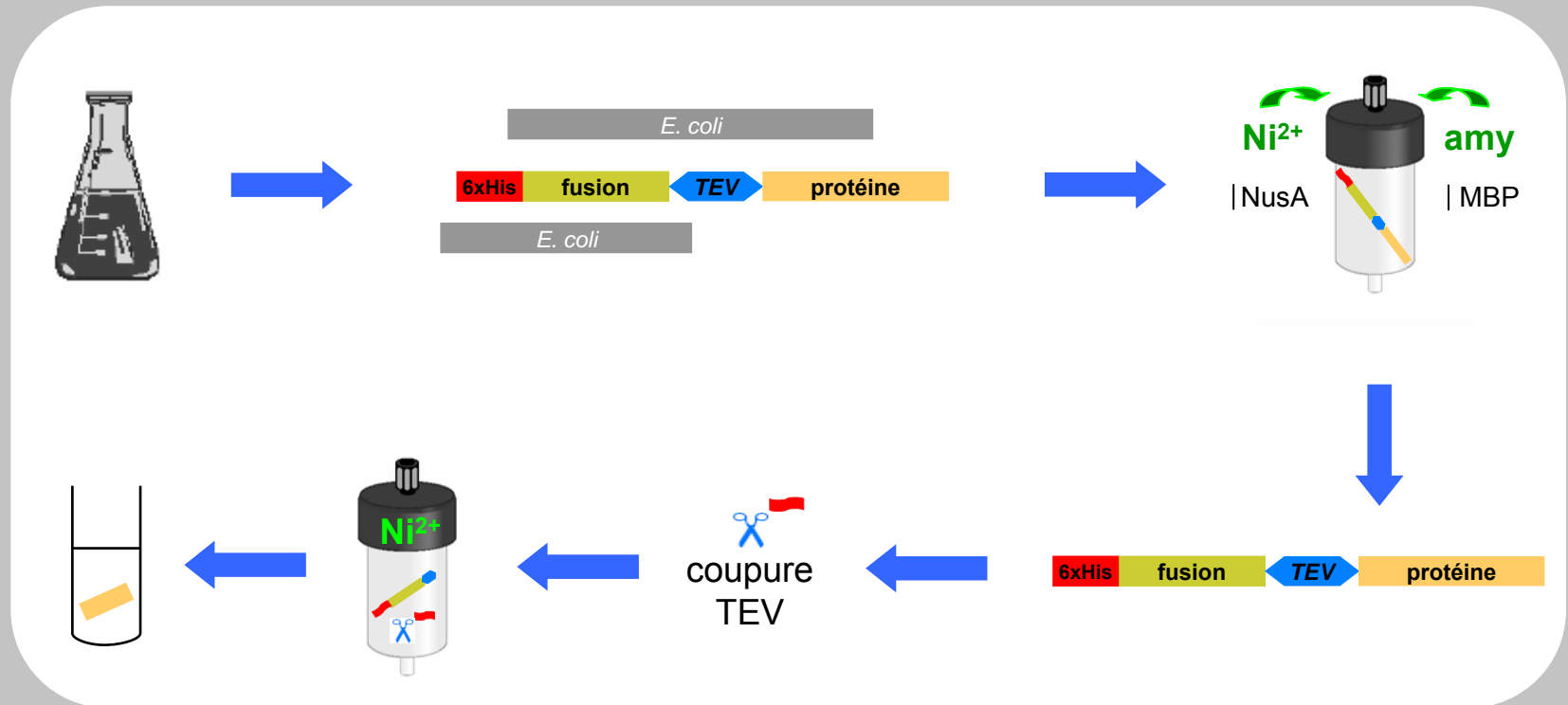
meilleure condition

- PROcatal : MBP / Rosetta / 20°C
- PROentier : MBP / Rosetta / 20°C
- PROinser : MBP / Rosetta / 20°C
- PROter : NusA / Rosetta / 20°C

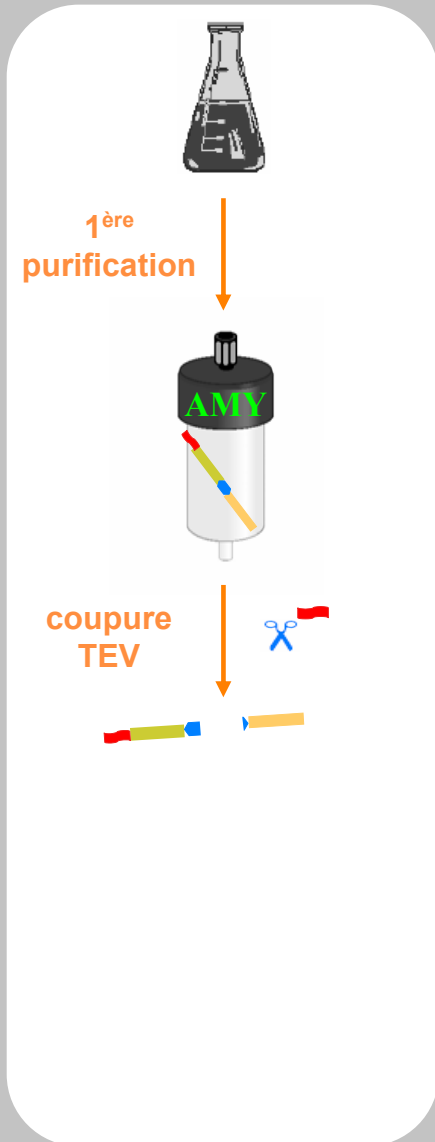
→ **expression suffisante de protéine soluble pour les 4 domaines**

Production de 4 domaines PRODH

Production à grande échelle et obtention des protéines cibles



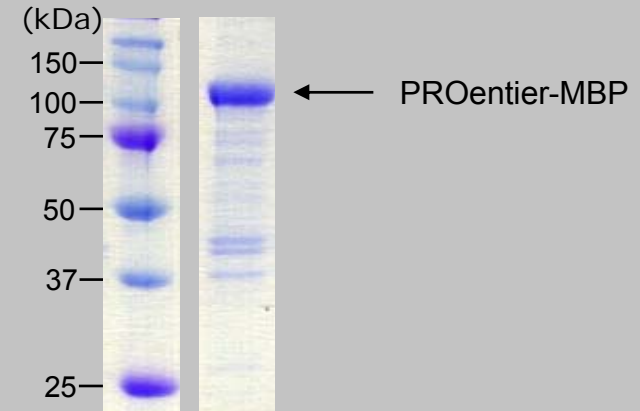
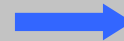
Production de 4 domaines PRODH



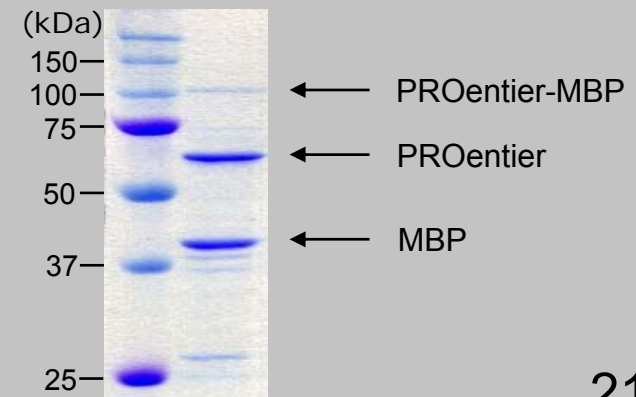
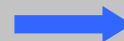
Production de PROentier

- expression plus faible à grande échelle

- purification sur résine d'amylose :



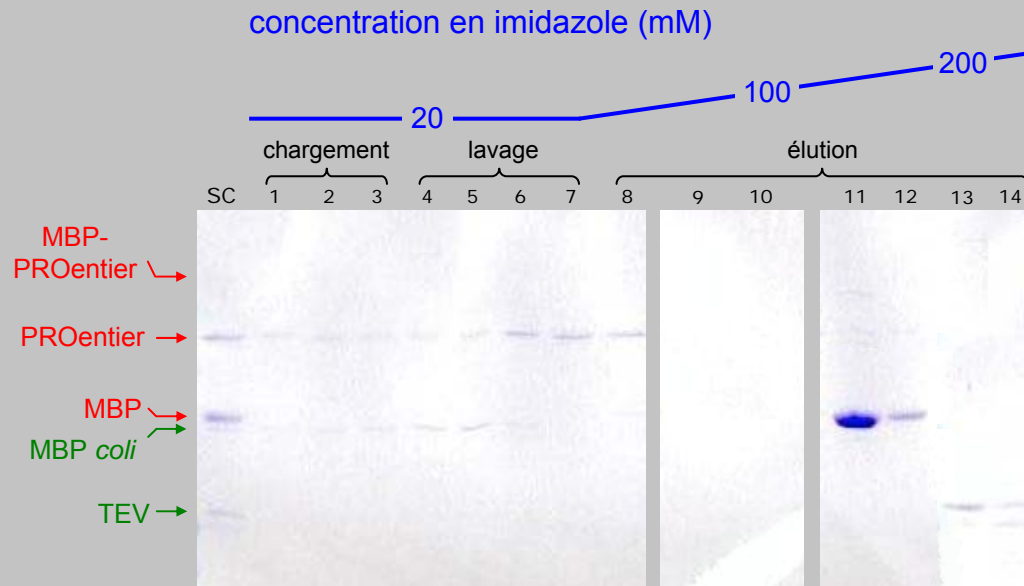
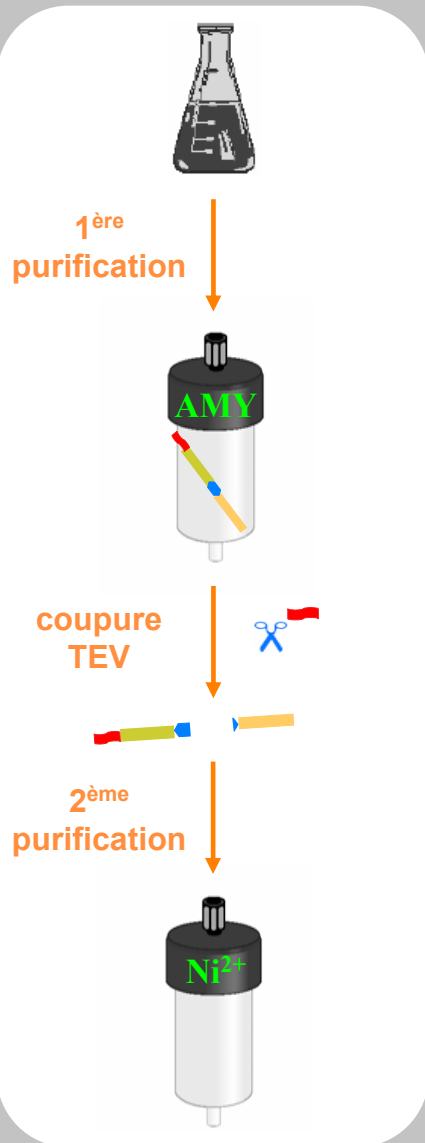
- coupure TEV en solution



Production de 4 domaines PRODH

Production de PROentier

- séparation du partenaire MBP sur résine de nickel :



→ **PROentier séparée de son partenaire**
rendement : 1 mg / L de culture

Bilan de la production de PROcatal, PROter, et PROinser

- **PROcatal**
 - **PROinser**
- } - instabilité de la protéine de fusion
- partenaire de fusion clivé mais non séparé
- **PROter**
- toxicité de la protéine de fusion
- profil de dégradation protéolytique

Plan

Contexte biologique

Expression des protéines PRODH sauvage et mature

Production de 4 domaines PRODH

Conclusions

Conclusions

- production des protéines PRODH sauvage et mature (PRO564) :

↳ **corps d'inclusion**

- sélection et production des domaines PROentier, PROcatal, PROter, et PROinser dans le cadre de la plate-forme 3PM :

↳ **PROentier : 67 kDa**



rendement trop faible



~~RMN~~

Plan

Contexte biologique

Caractérisation structurale par RMN et Modélisation Moléculaire

Relations structure-activité

Conclusions et perspectives

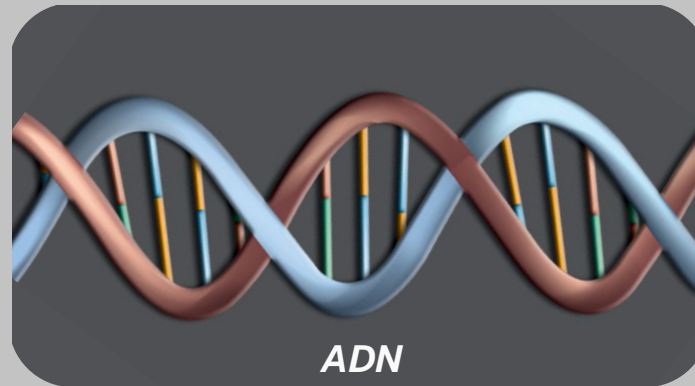
Contexte biologique

Les dommages de l'ADN

rayonnements
UV...



erreurs de
réplication



cassure simple brin



cassure double brin



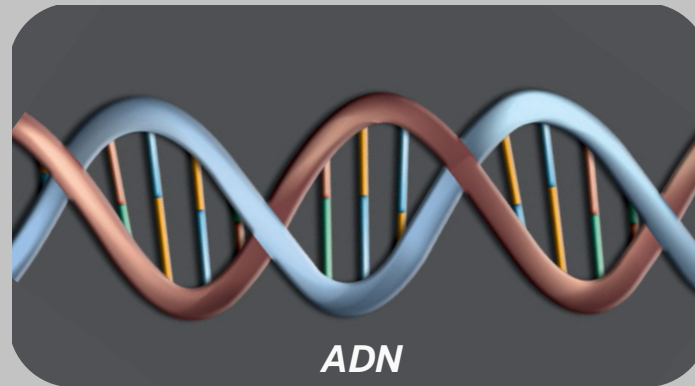
mésappariement



→ risque de cancer

Contexte biologique

La réponse aux dommages de l'ADN



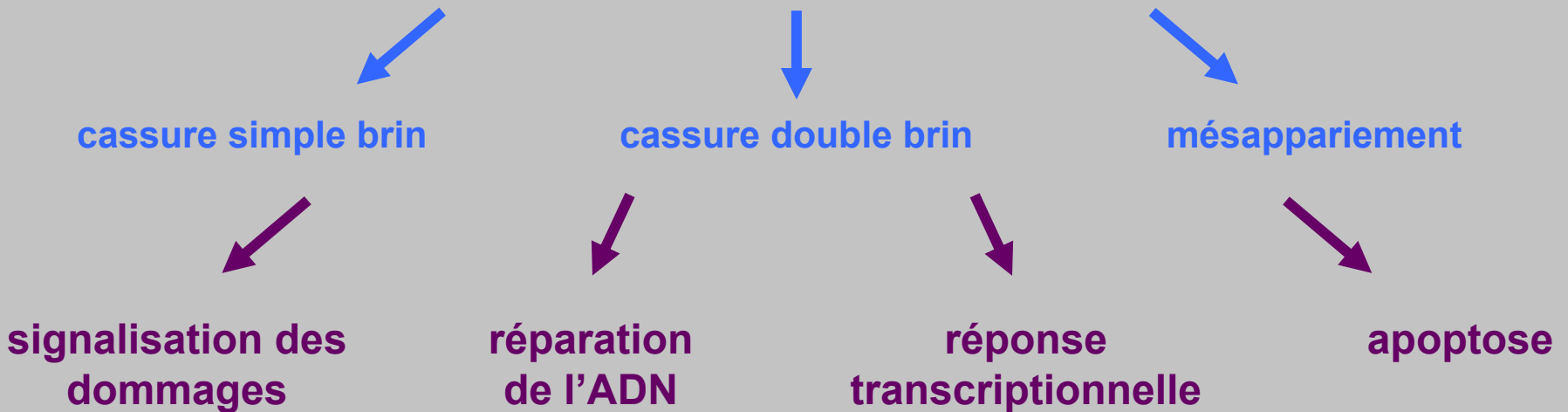
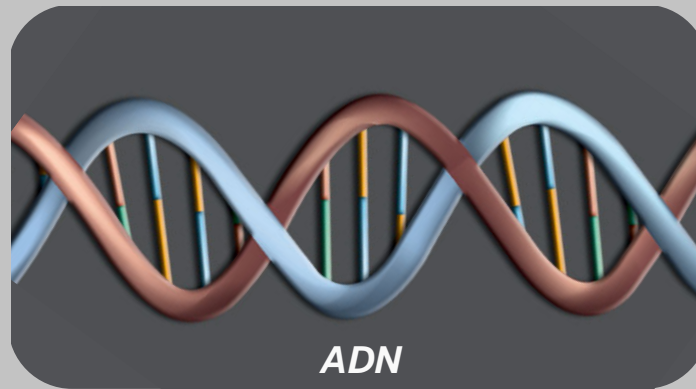
cassure simple brin

cassure double brin

mésappariement

Contexte biologique

La réponse aux dommages de l'ADN



→ découverte d'une nouvelle protéine nucléaire : KIN17

Contexte biologique

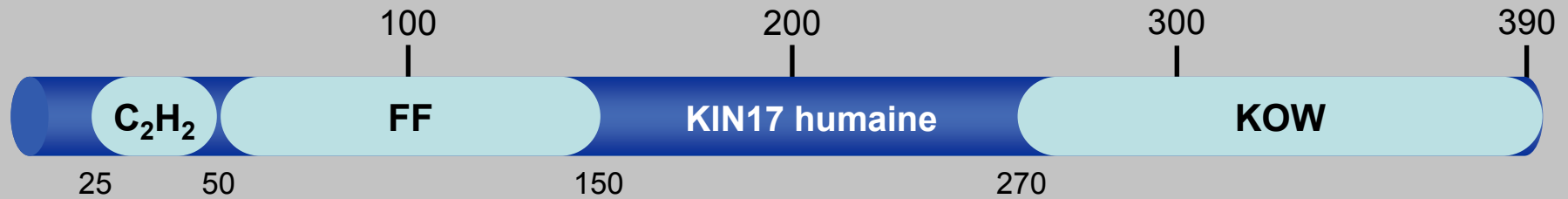
Caractéristiques fonctionnelles de KIN17

- Distribution en « foyers intra-nucléaires »
- Régulation positive après irradiation par des rayons UV et γ
 - ↳ dépendance XPA et XPC : mécanisme de réparation NER
- Liaison à l'ADN et l'ADN courbe (recombinaison illégitime)
- Liaison à l'ARN

→ KIN17 impliquée dans la réplication et la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN

Contexte biologique

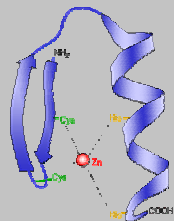
Organisation de KIN17 humaine



liaison à l'ADN ?



« doigt de zinc »
confirmé



liaison à des peptides
phosphorylés ?



???



liaison à l'ARN ?

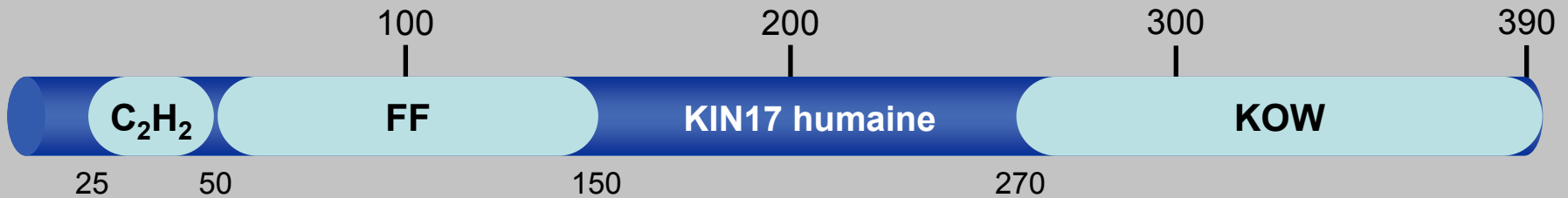


liaison à l'ARN
confirmée

→ fonctions précises et partenaires de KIN17 ?

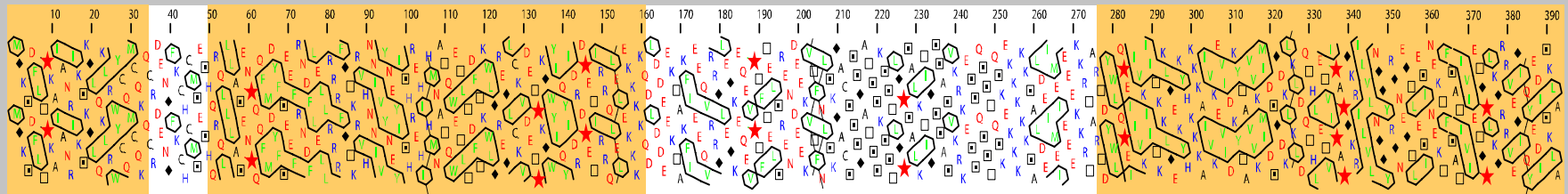
Contexte biologique

Objectifs de l'étude : caractérisation structurale et fonctionnelle



• Diagramme HCA de visualisation des amas hydrophobes :

■ régions structurées



14 kDa



étude structurale par RMN et MM
- fonctions et partenaires ?

Plan

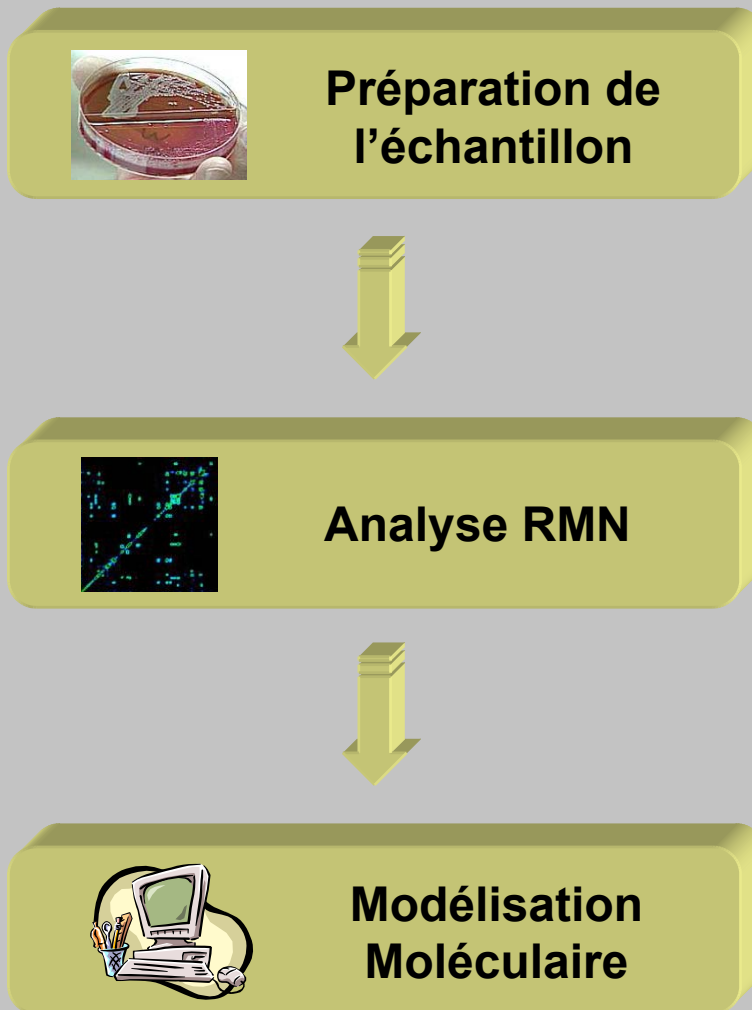
Contexte biologique

Caractérisation structurale par RMN et Modélisation Moléculaire

Relations structure-activité

Conclusions et perspectives

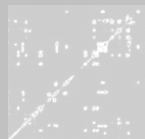
Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire



Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire



**Préparation de
l'échantillon**



Analyse RMN



**Modélisation
Moléculaire**

- production en milieu non marqué :
 - programme de production 3PM

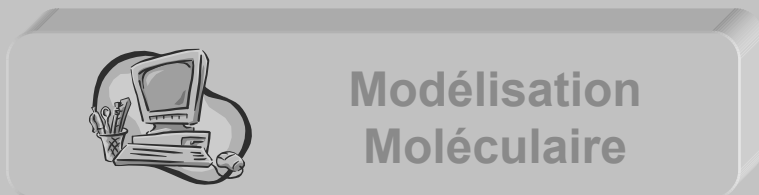
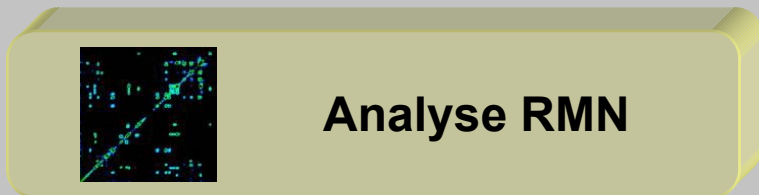
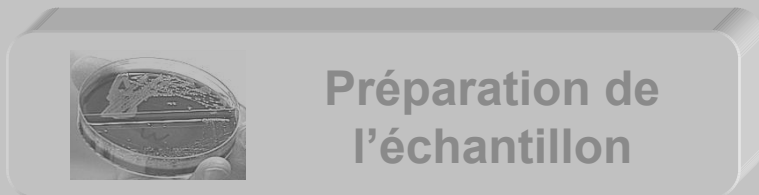


- production en milieux marqués :
 - ^{15}N et $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$
 - optimisation des conditions
 - analyses préliminaires



**protéine concentrée (0.7 mM),
soluble, pure, stable, et repliée**

Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire



**Attribution des raies de résonance de la
chaîne principale et des chaînes latérales**

K2 : protéine de 14 kDa



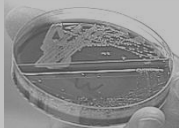
↪ expériences 3D triple résonance
 ^1H , ^{15}N , ^{13}C en solvant H_2O

↪ expériences 3D double
résonance ^1H , ^{13}C en solvant D_2O

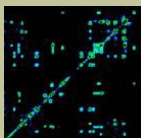


attribution du squelette = 98%
attribution des chaînes > 95%

Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire



Préparation de
l'échantillon



Analyse RMN



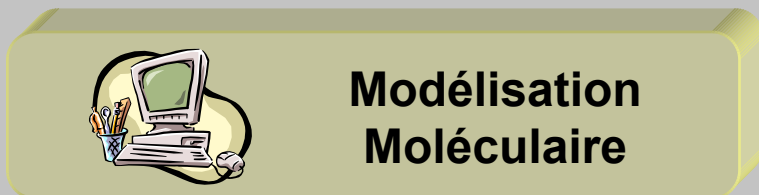
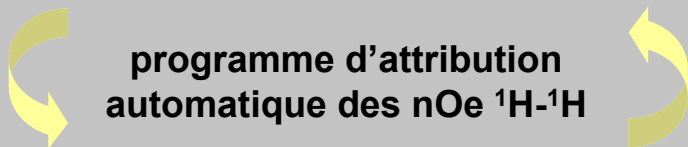
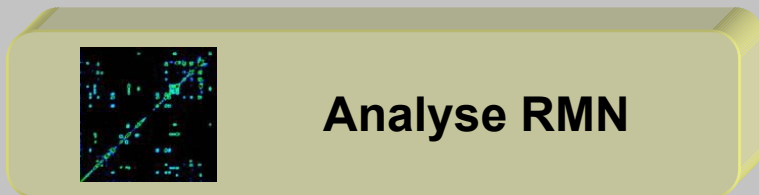
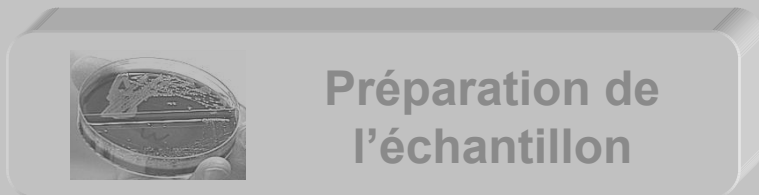
Modélisation
Moléculaire

**Stratégie classique de calcul de la
structure par RMN et Modélisation
Moléculaire**

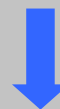


- 1) extraction des paramètres structuraux**
- 2) recueil des contraintes RMN**
 - angles dièdres
 - collecte et attribution des nOe ^1H - ^1H
- 3) calcul de la structure**
 - dynamique moléculaire

Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire



Utilisation du programme d'attribution automatique des nOe du LSP



collecte des nOe



attribution automatique des nOe

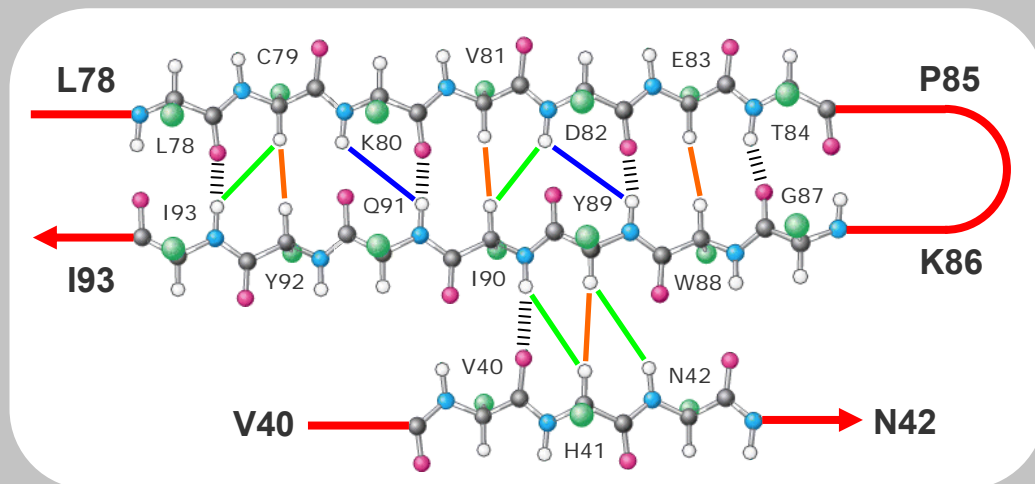
→ **préparation des données initiales**

Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

1) Détermination de la topologie des feuillets β

- **paramètres structuraux RMN :**

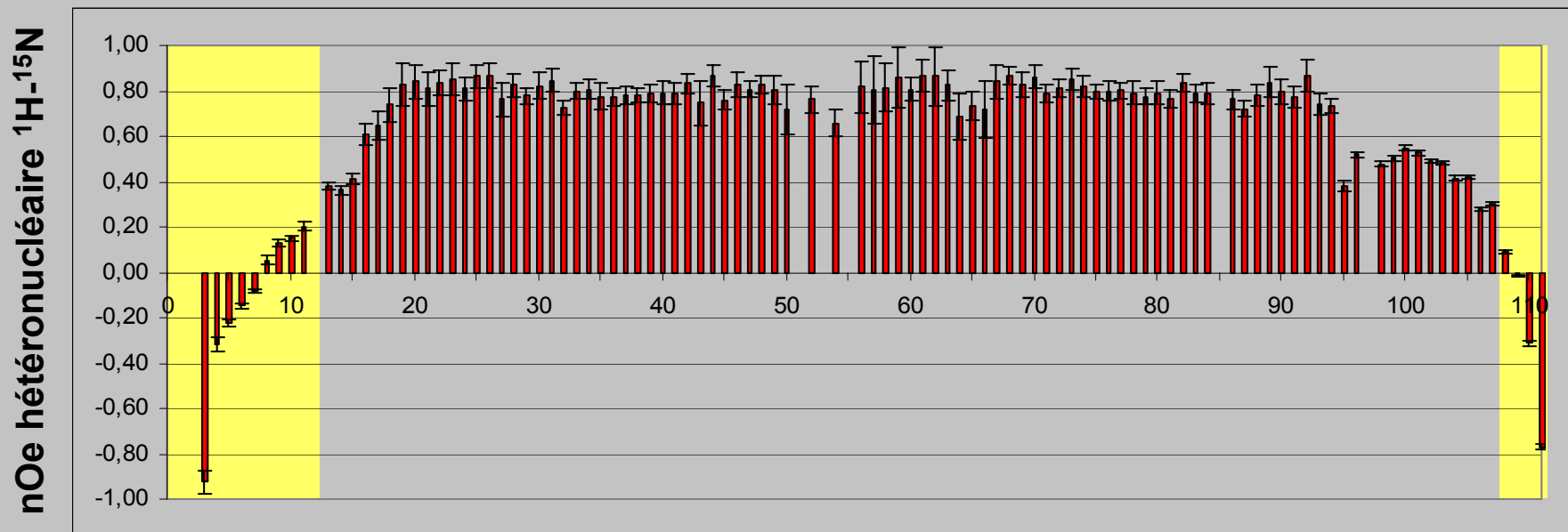
- déplacements chimiques secondaires
- nOe caractéristiques ^1H - ^1H
- liaisons hydrogène



→ présence d'un feuillet β triple brin anti-parallèle

Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

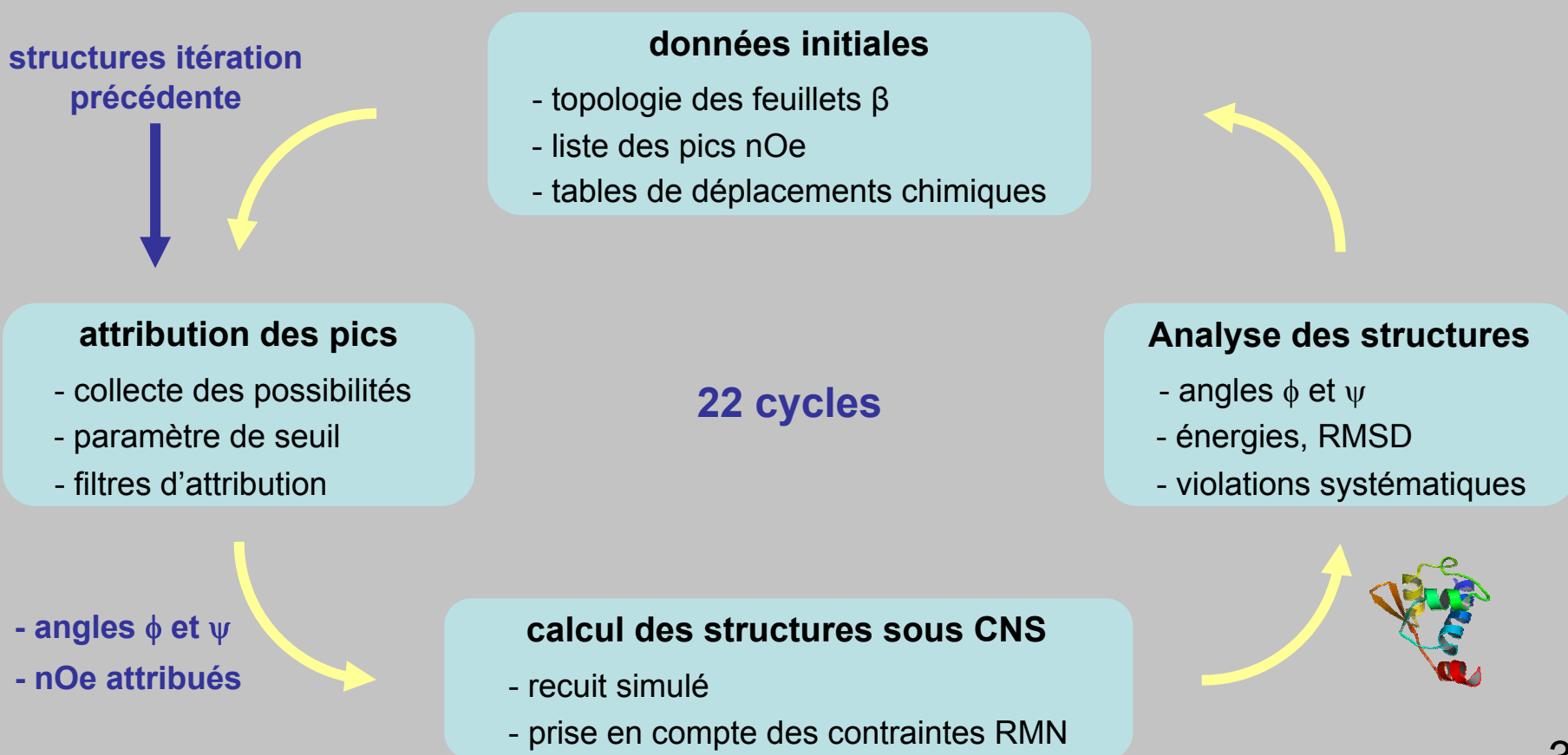
2) Identification des extrémités flexibles déstructurées



→ extrémités G1-P12 et K108-K111 déstructurées

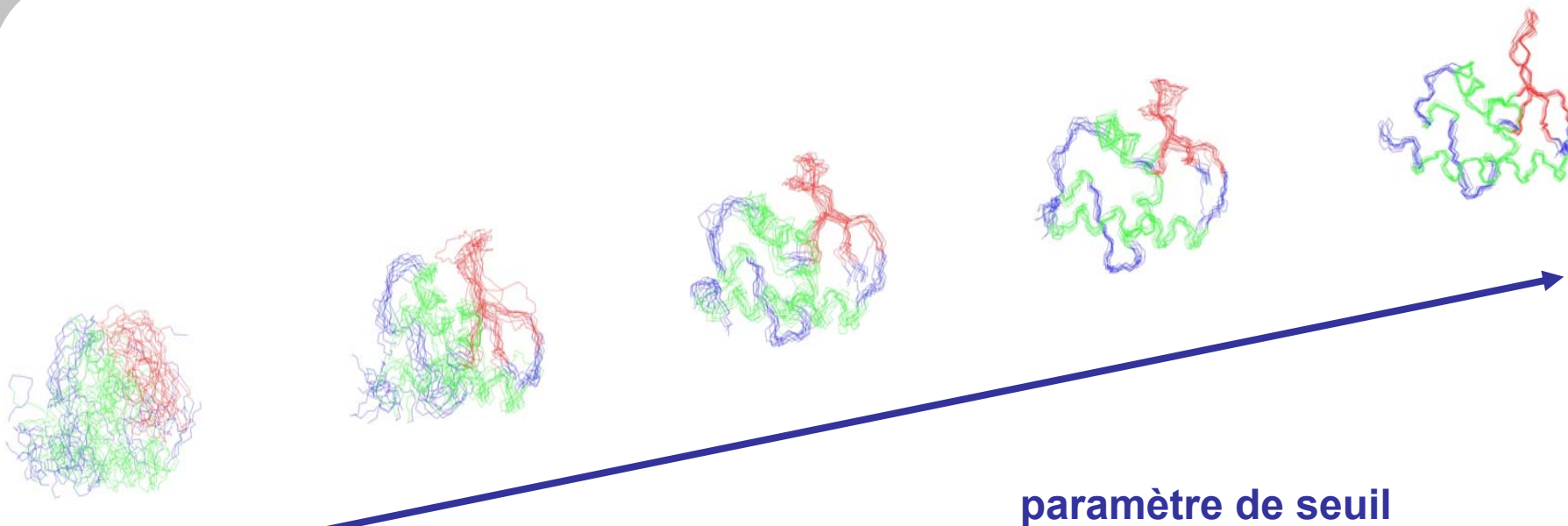
Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

3) Processus itératif géré par le Programme d'Attribution automatique

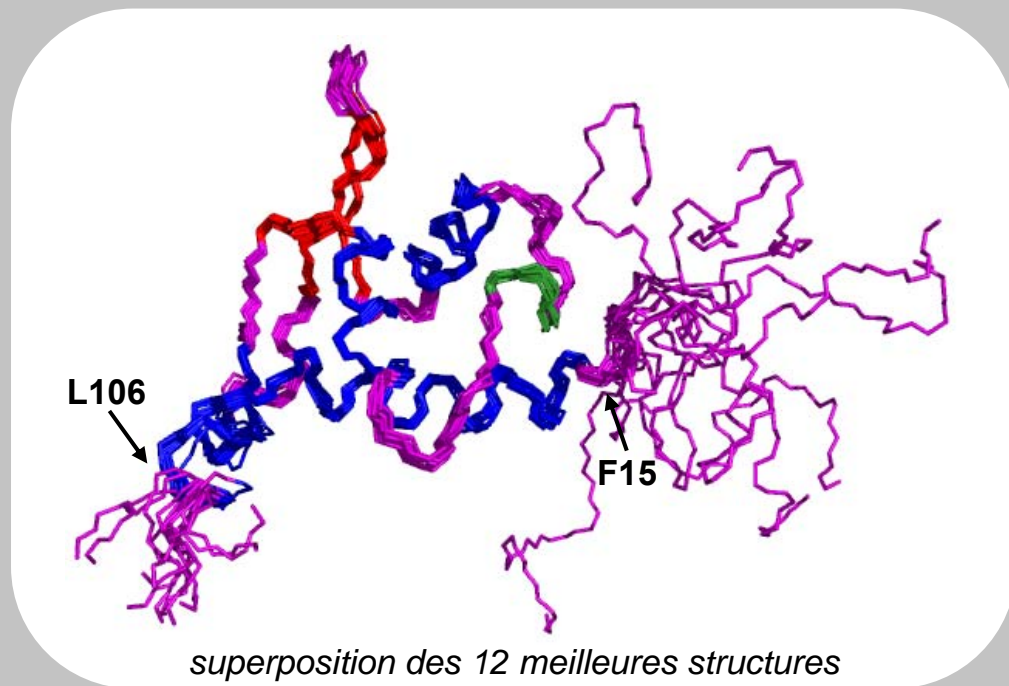


Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

3) Processus itératif géré par le Programme d'Attribution automatique



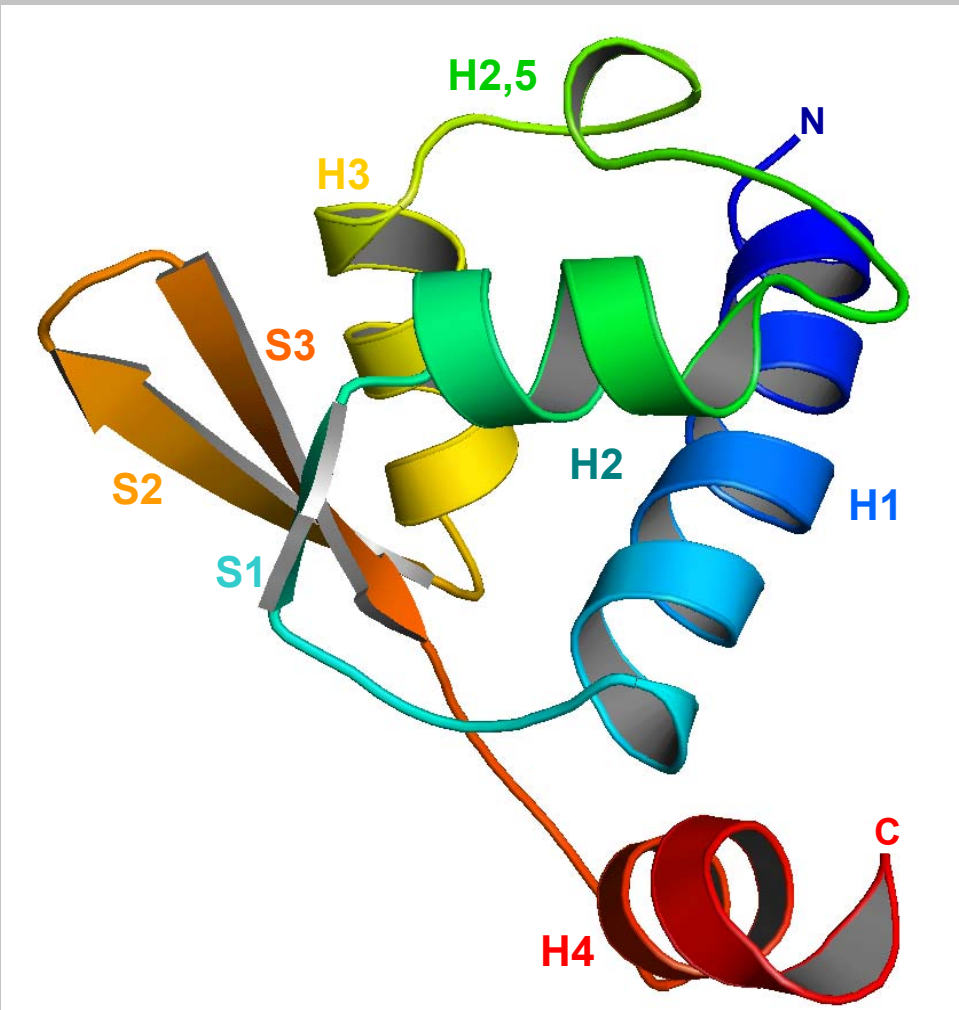
Evaluation de la qualité des structures



- RMSD : 0.43 Å (F15-L106)
- aucune violation de distance > 0.5 Å et d'angle dièdre > 10°
- angles ϕ et ψ : > 99 % régions permises du diagramme de Ramachandran
- faibles valeurs de déviation par rapport à la géométrie idéale

→ ensemble de structures RMN de bonne qualité

Description de la structure tridimensionnelle du domaine K2



Plan

Contexte biologique

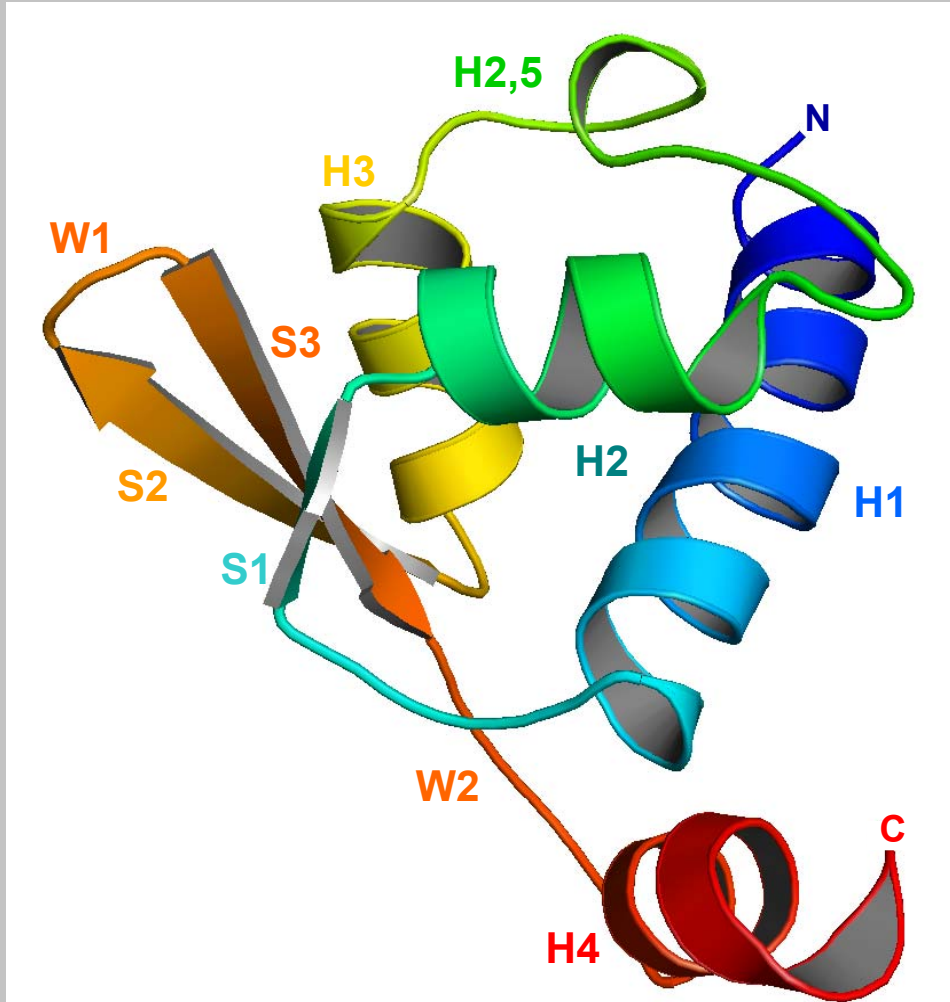
Caractérisation structurale par RMN et Modélisation Moléculaire

Relations structure-activité

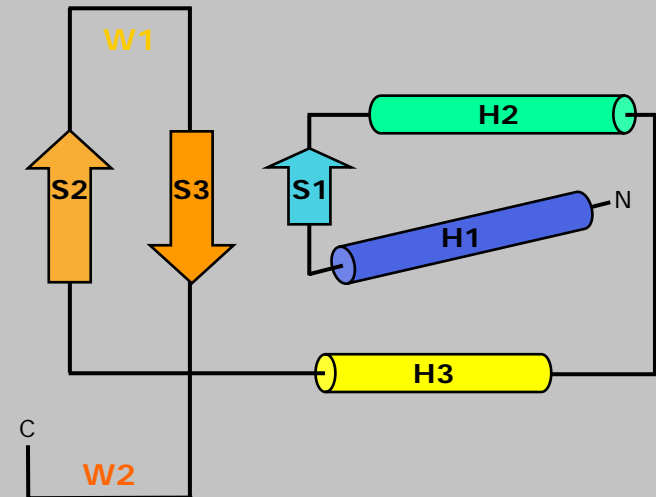
Conclusions et perspectives

Relations structure-activité

Le domaine K2 adopte un repliement de type *Winged Helix*



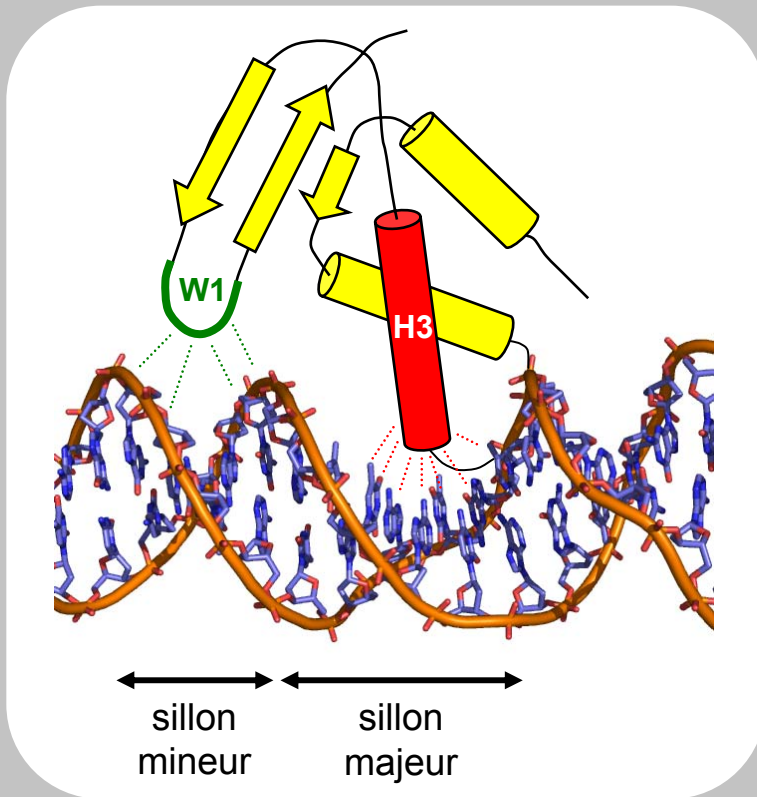
- DALI : score significatifs



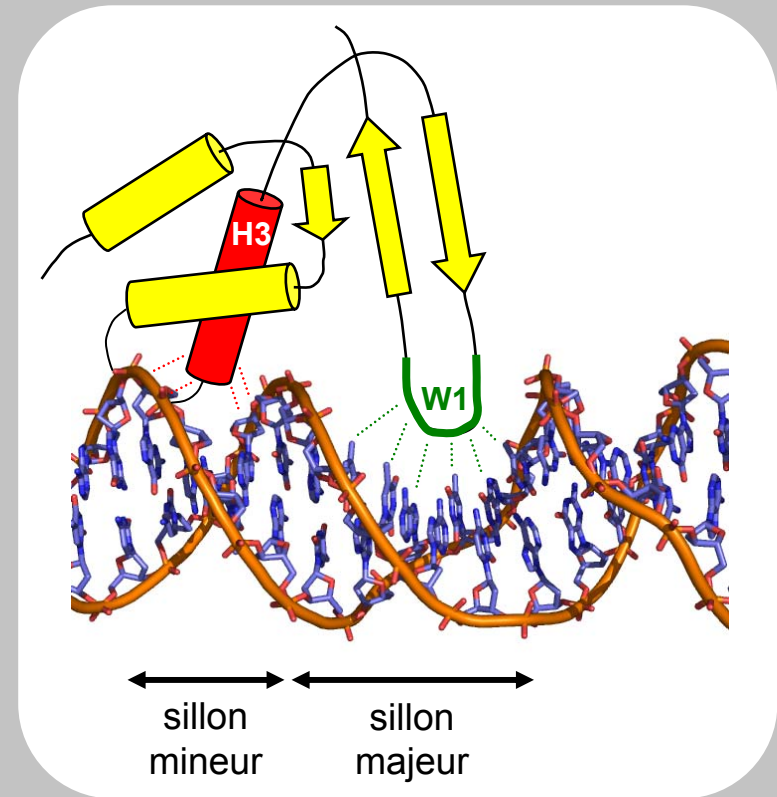
Winged Helix canonique

Le repliement *Winged Helix* : un motif de liaison à l'ADN

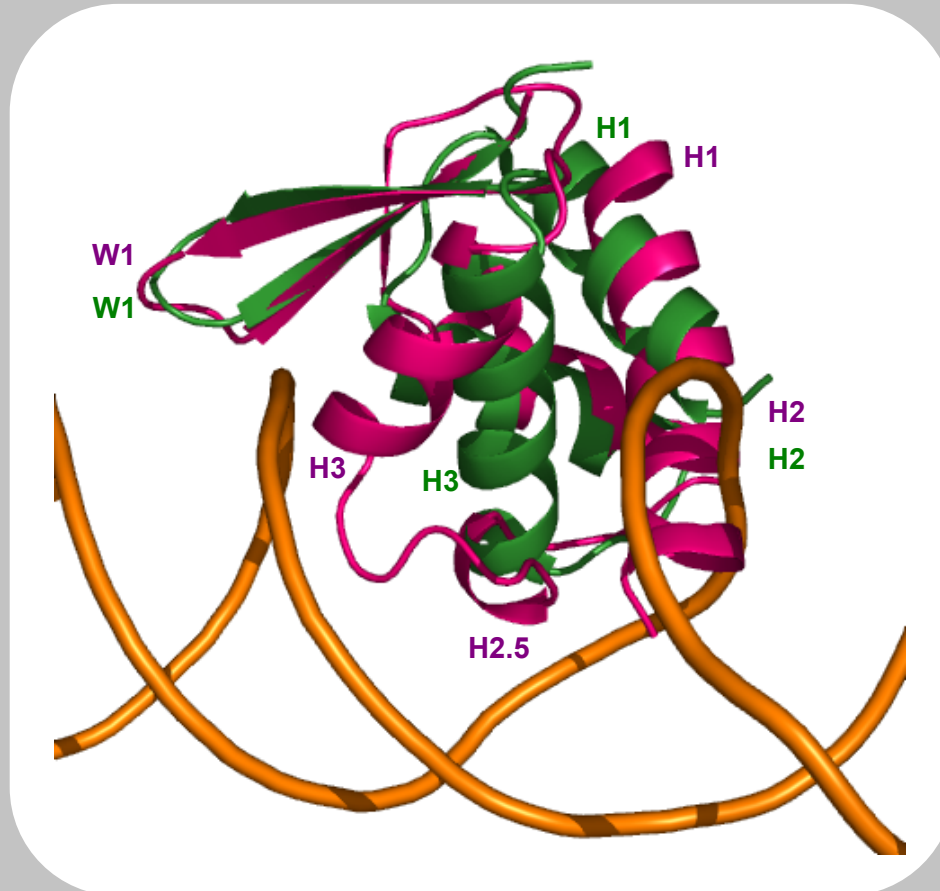
mode de reconnaissance classique



mode de reconnaissance atypique



Le domaine K2 est-il capable de lier l'ADN ?



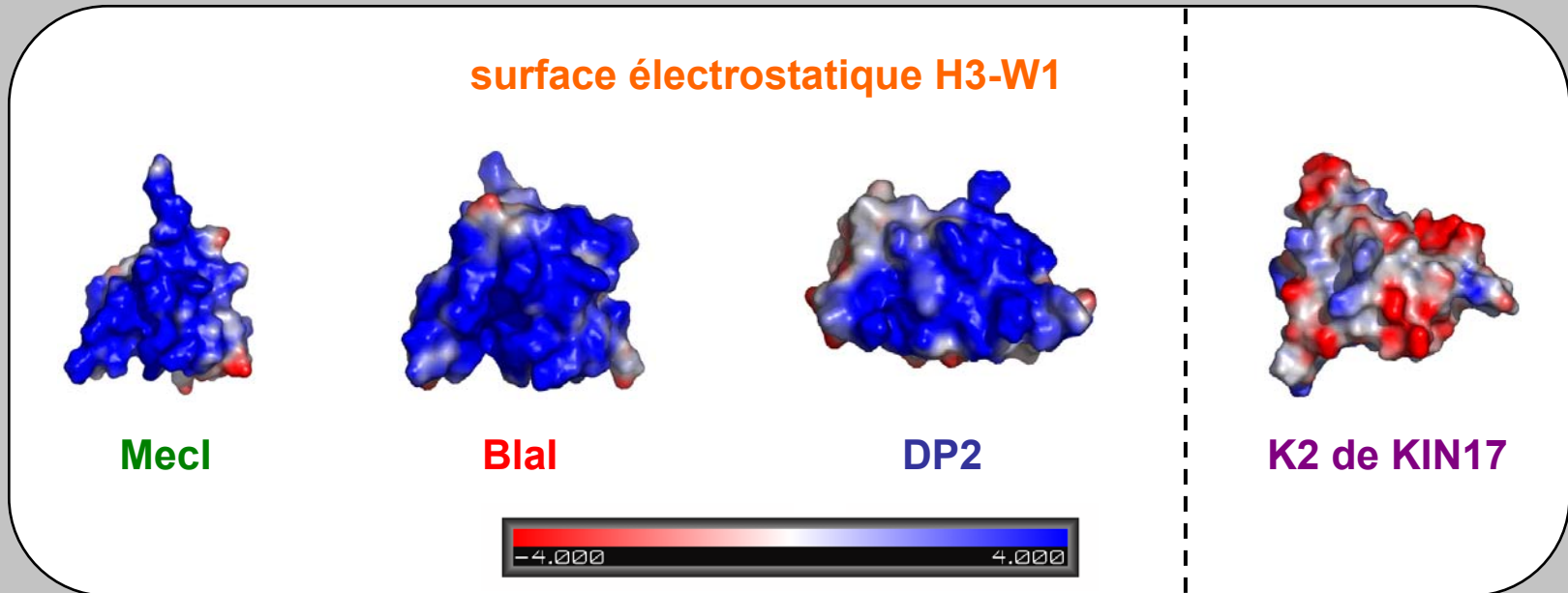
■ K2 de KIN17

■ Mecl

→ rmsd de 2.7 Å
sur 66 carbones α

→ divergence structurale :
hélice H3

Le domaine K2 est-il capable de lier l'ADN ?



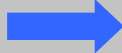
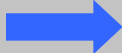
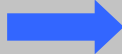
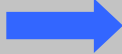
→ surface électrostatique H3-W1 de K2 peu polaire

Zheng et al., (1999), *Genes Dev*, **13**, 666-674.

Melckebeke et al., (2003), *J Mol biol*, **333**, 711-720. Safo et al., (2005), *J Bacteriol*, **187**, 1833-1844.

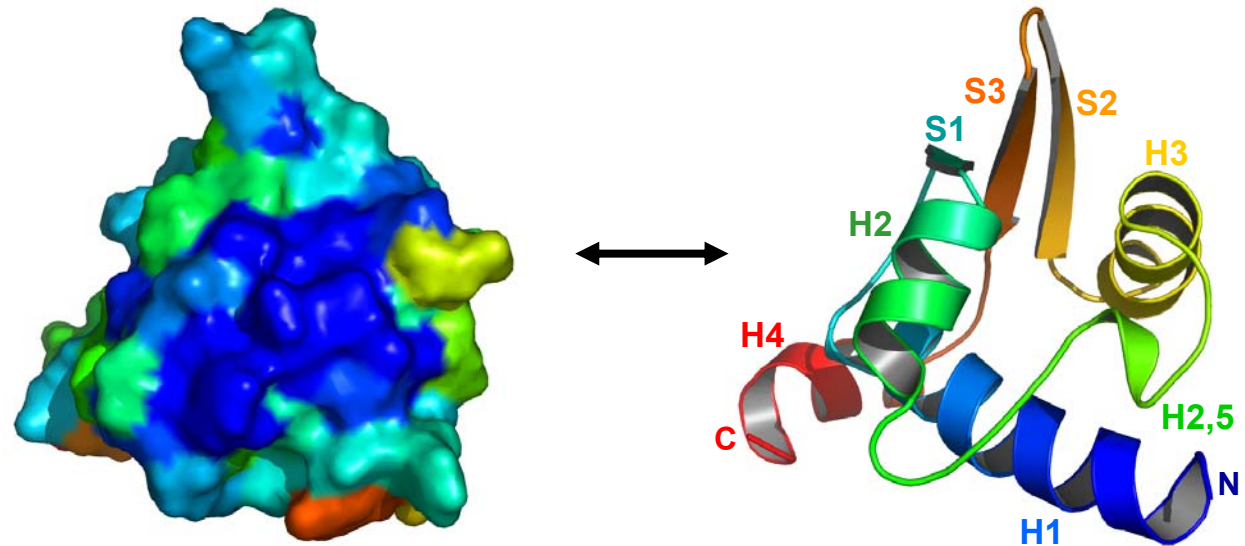
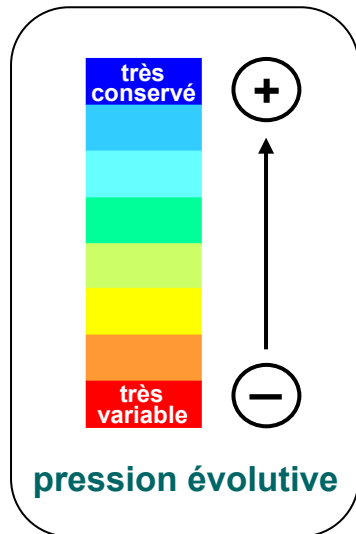
Garcia-Castellanos et al., (2004), *J Biol Chem*, **279**, 17888-17896.

Fonction du *Winged Helix* du domaine K2 ?

- Pas de liaison à l'ADN ?  SouthWestern  ~~ADN~~
- Liaison ARN ?  NorthWestern  ~~ARN~~
- Liaison partenaire protéique ?

Relations structure-activité

Le domaine K2 présente une surface H2-H2.5 ultra conservée



→ surface électrostatique H2-H2.5 neutre plutôt hydrophobe

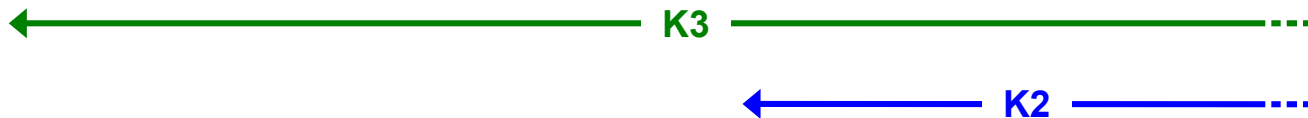
→ interactions protéine-protéine ?

interactions protéine-protéine intra-moléculaires ?

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Humain	MGK-SDFLTPKAIANRIKSKGLQKLRWY	QMCQKQCRD	ENGFKCHCMSE	SHQRQLLLASEN	PQQFMDYFSEEF	RNDFLELLRRRF	GT	KRV...	
Plante	MGK-NDFLTPKAIANRIKAKGLQKLRWY	QMCQKQCRD	ENGFKCHCMSE	SHQRQMVFQGNP	TRVVDGYSEEF	FEQTFLDL	MRRSHRFS	SRI...	
Spore	MGR-AEAGTPKAISNALSKGLQKLRWY	SACQKQMRD	ENGFKCHTQSE	GHIRQMNVIAMN	PGKRIQDFSNQ	FLRDFISL	LRTAHGEK	KI...	
Ver	MGK-HEKGSKDLANRTKSKGLQKLRWY	QMCQKQCRD	ANGFKCHLTSE	AHQRQLLLFAENS	NSYLRFSDQ	FLKDFIAQL	KTSHGEK	EI...	
Neurospore	MPK-AEVGSAKYLANKMKSRLNRLRWY	QLCEKSCRDE	NGYKMHCS	PSHTAKALEAGAN	FKGVQDTFSDQ	FLKDFIAQL	KTSHGEK	EI...	
Levure	MAD---YDSAKYWSKQGARRGLQKTRYY	QICQRC	KDANGFQSHNKS	PSHLRKISQV	TAEDAR---RY	NIQFEKGF	LQLLQK	RHGK	WI...
Humain	MGK-SDFLTPKAIANRIKSKGLQKLRWY	QMCQKQCRD	ENGFKCHCMSE	SHQRQLLLASEN	PQQFMDYFSEEF	RNDFLELLRRRF	GT	KRV...	

motif prédit
« doigt de zinc »

région N-terminale du
motif *Winged Helix*



→ étude structurale du domaine K3 par RMN

Etude du domaine K3 de KIN17 par RMN

Le « doigt de zinc » a-t-il une position préférentielle autour du domaine « Winged Helix » ?

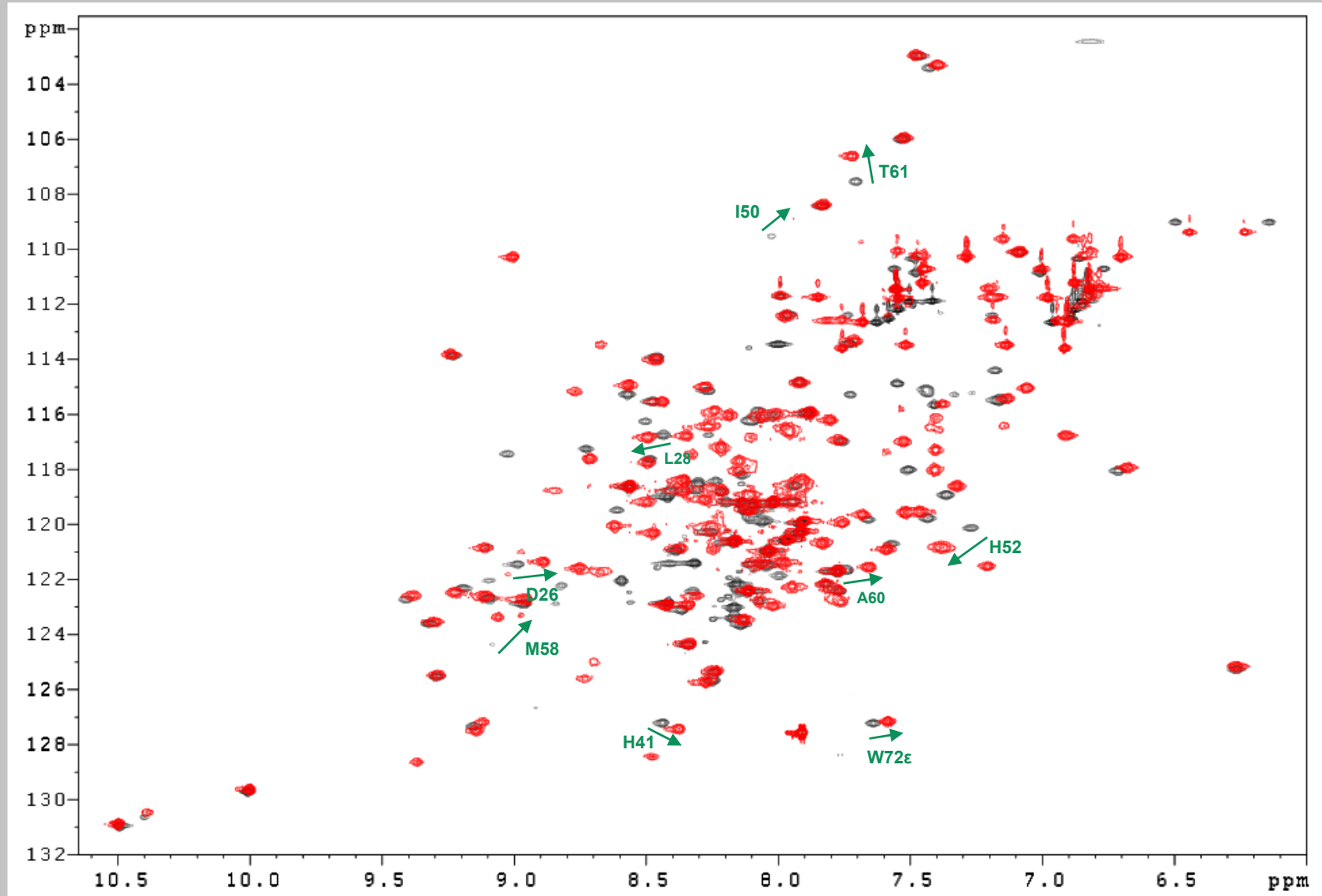


comparaison des déplacements chimiques des groupements amides du *Winged Helix* entre K2 et K3

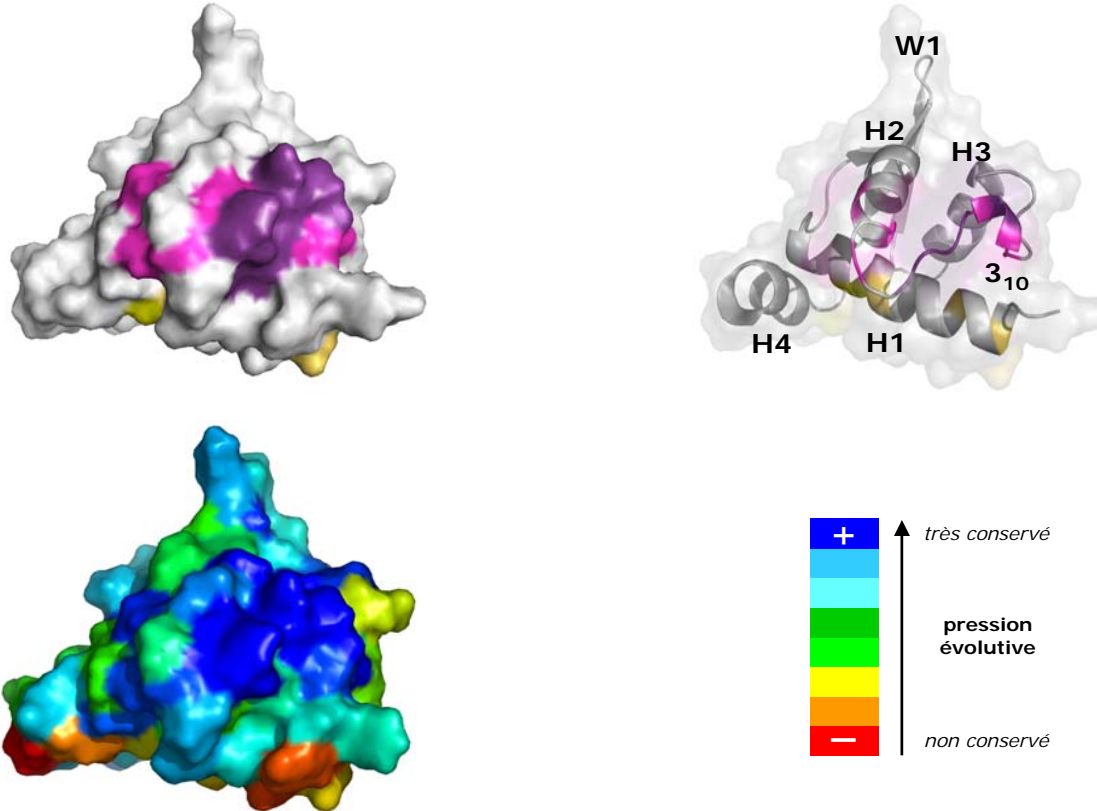


cartographie des déplacements chimiques ^1H - ^{15}N

Etude du domaine K3 de KIN17 par RMN



Etude du domaine K3 de KIN17 par RMN



→ positionnement du *Winged Helix* au niveau de la surface ultra conservée

Plan

Contexte biologique

Caractérisation structurale par RMN et Modélisation Moléculaire

Relations structure-activité

Conclusions et perspectives

Conclusions

- K2 adopte un repliement *Winged Helix*
- incapacité structurale de lier l'ADN selon les modes de reconnaissance connus
- études biochimiques : pas de liaison à l'ADN ni à l'ARN
- surface fonctionnelle conservée, implication interactions « doigt de zinc »

Perspectives

- étude structurale de K3 : rôle du *Winged Helix* ?
→ rôle structural, fonctionnel ?
- SAXS : reconstituer la structure de la protéine entière
- recherche de partenaires biologiques
- Caractérisation de l'interaction du *Winged Helix* avec des partenaires biologiques par RMN