



Etudes fonctionnelles et structurales de l'ATPase-Ca²⁺ native du muscle squelettique de lapin et de la protéine recombinante exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae*

Cédric MONTIGNY

Directeur de thèse : Philippe CHAMPEIL

Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes

URA CNRS 2096 - Laboratoire des Protéines Membranaires

Institut de Biologie et de Technologies de Saclay

cedric.montigny@cea.fr

Plan de la présentation

- **Introduction**

- Structure et rôle de la membrane biologique
- Le cas particulier de la cellule du muscle squelettique
- L'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a

- **Quelques méthodes utilisées dans le cadre de ce travail**

- Fluorescence intrinsèque des tryptophanes
- Protéolyse ménagée
- Expression hétérologue de l'ATPase-Ca²⁺ recombinante chez *S. cerevisiae* et purification par chromatographie d'affinité

- **Effets des inhibiteurs employés au cours de la cristallogenèse sur les conformations de l'ATPase**

- Effet de la thapsigargine sur la forme E2.BeF₃
- Fixation Mg²⁺-dépendante de l'acide cyclopiazonique

- **Etude des propriétés de SERCA1a stabilisée en présence de détergent, native ou recombinante (sauvage ou mutée)**

- Effets protecteurs du glycérol
- Application de ces nouvelles conditions expérimentales à la caractérisation fonctionnelle de quelques mutants

- **Conclusion générale et perspectives**

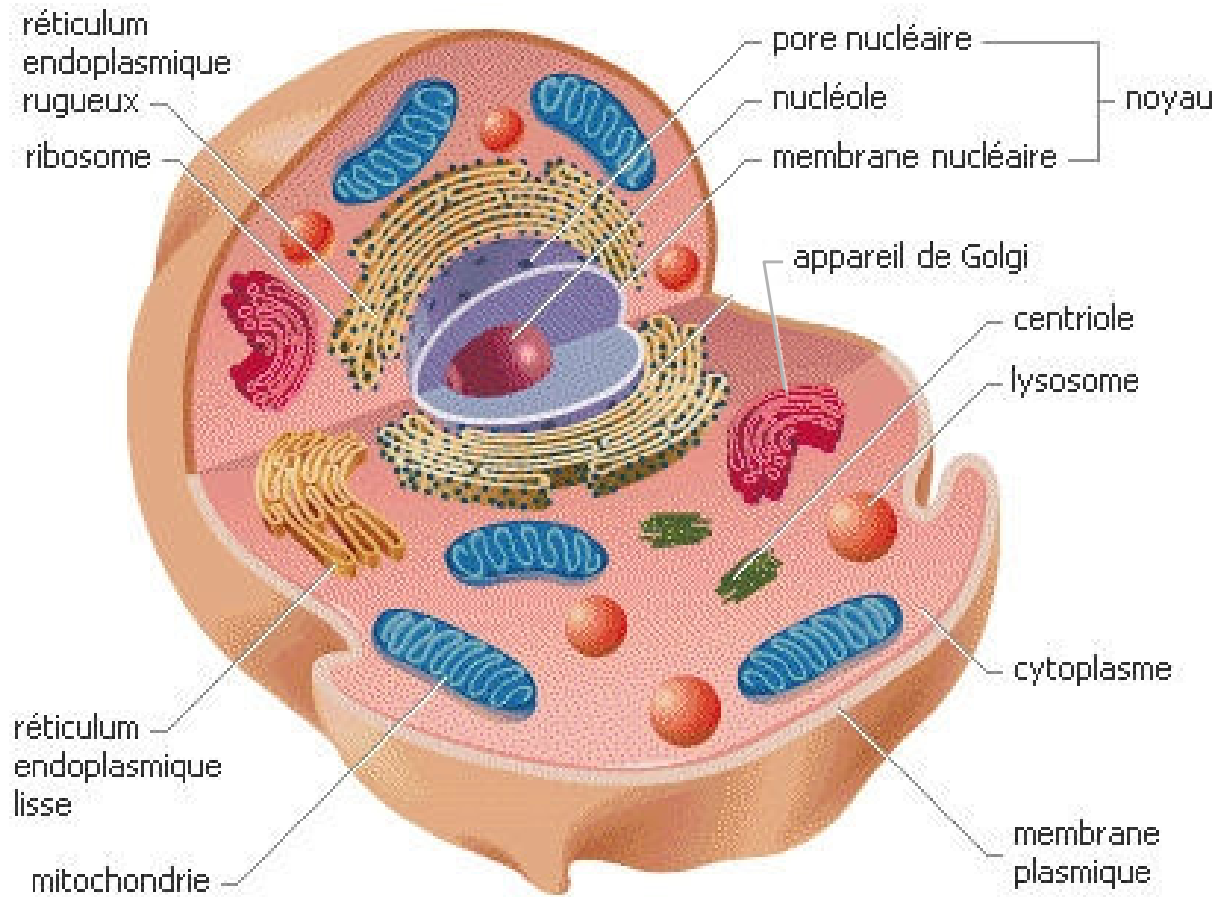
Introduction

Structure et rôle de la membrane biologique

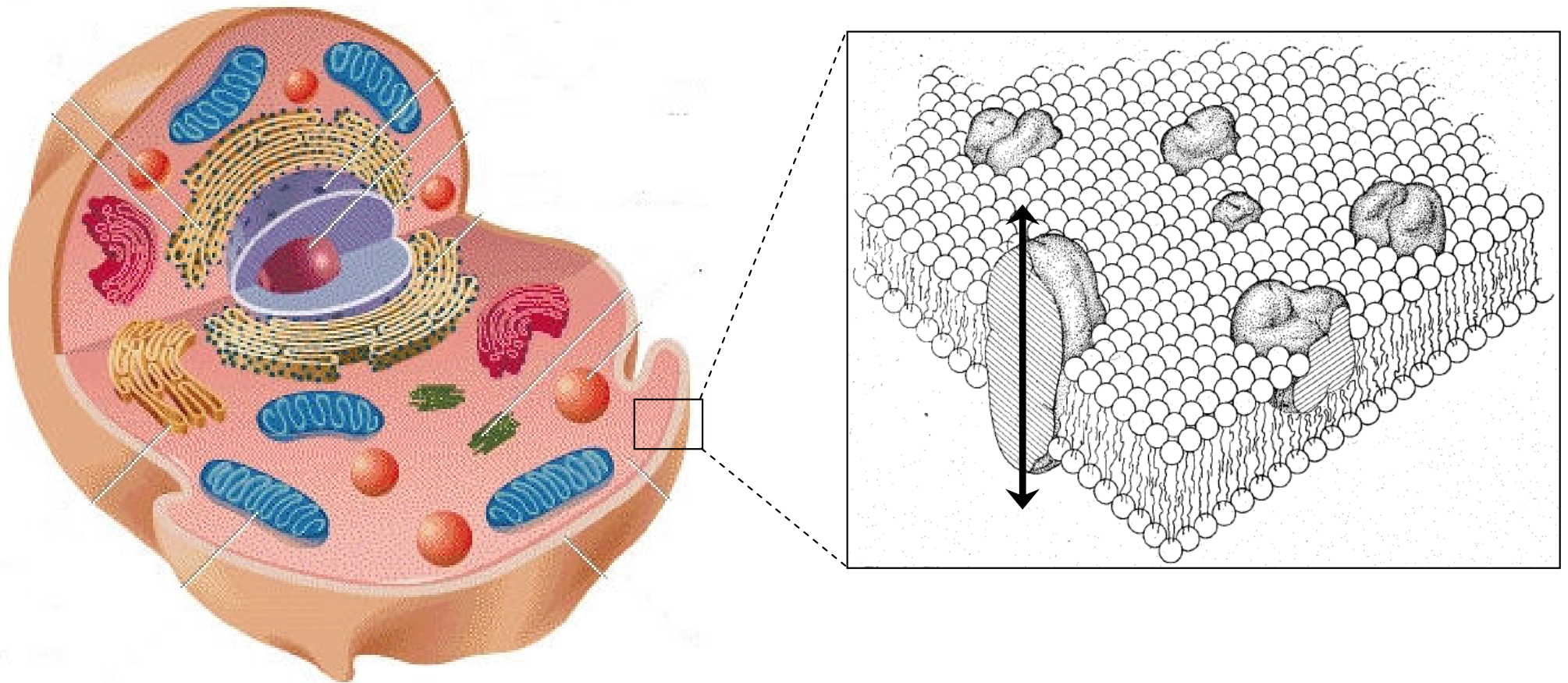
Le cas particulier de la cellule du muscle squelettique

L'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a

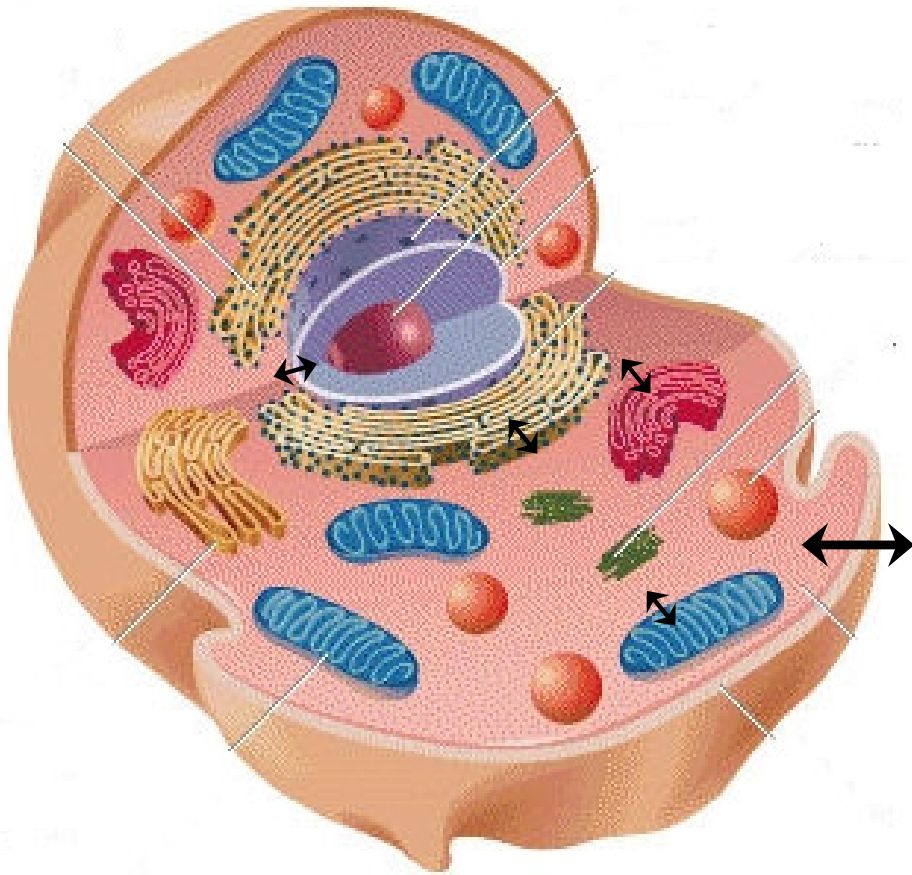
La cellule, un milieu compartimenté



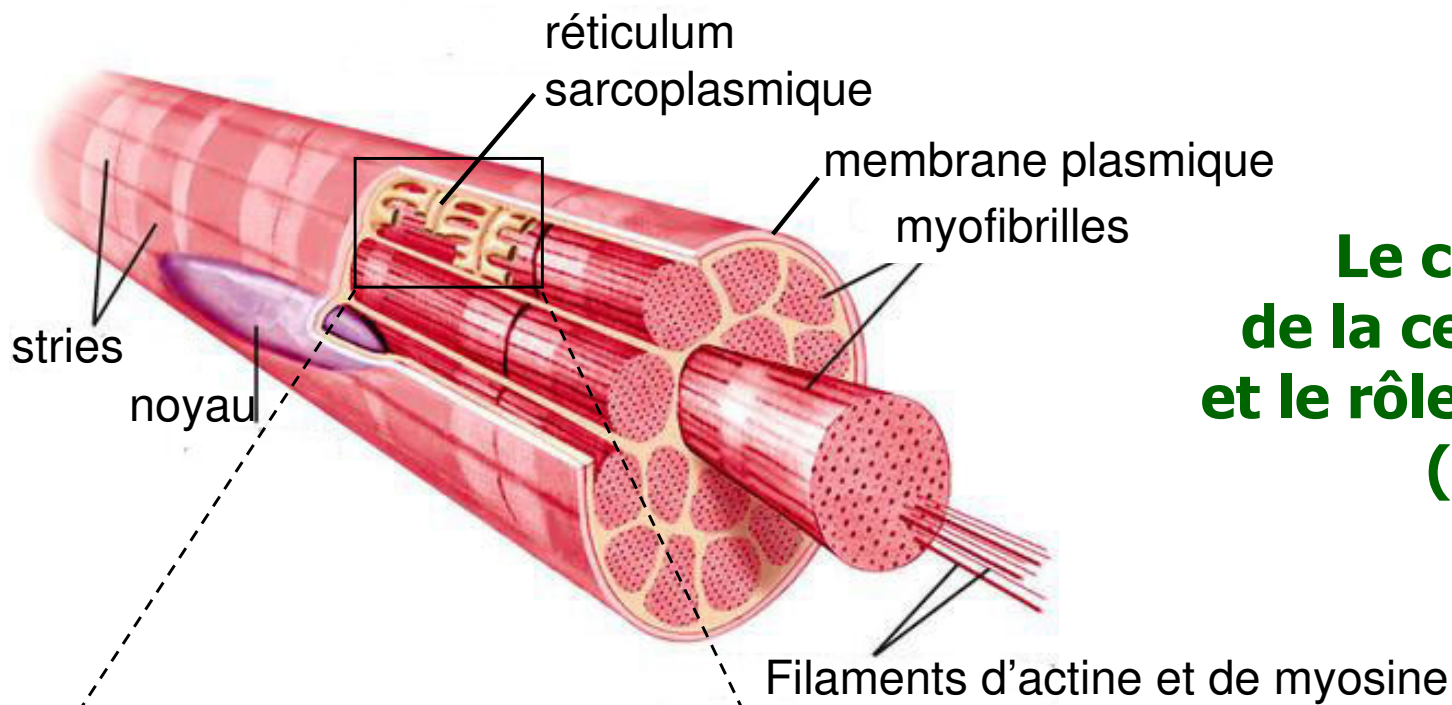
Structure des membranes



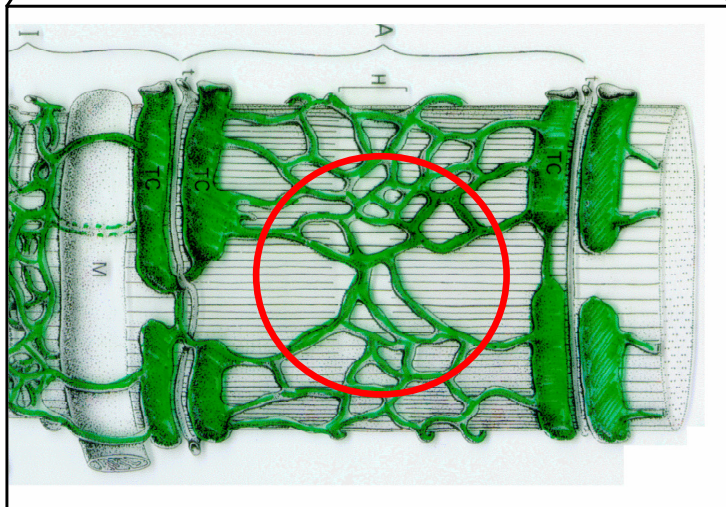
Rôles des protéines membranaires



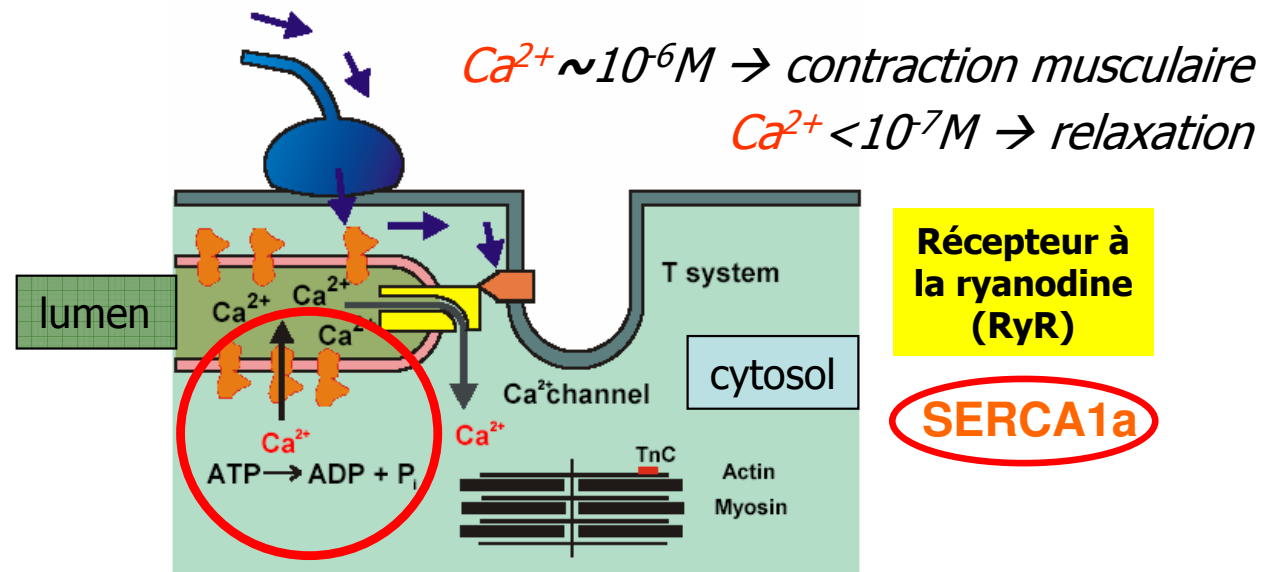
- Transfert d'informations,
- Transfert d'énergie,
- Transport de solutés.



Le cas particulier de la cellule musculaire et le rôle de l'ATPase- Ca^{2+} (SERCA1a)



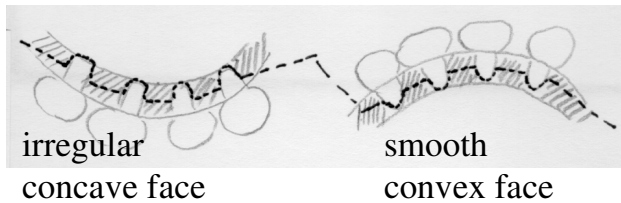
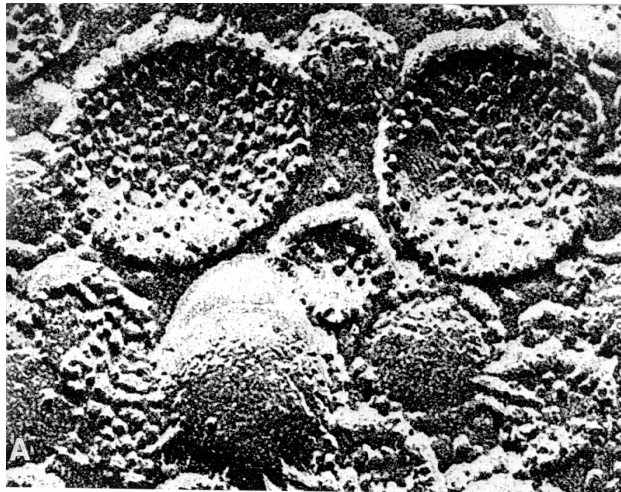
Rambourg & Segretain, *The Anatomical Record* 197 (1981), 33-46.



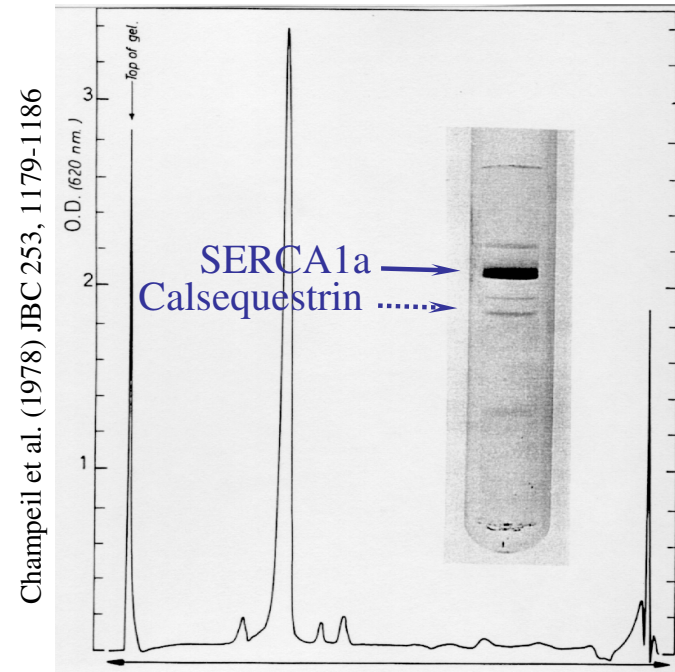


L'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (SERCA1a) dans le muscle squelettique

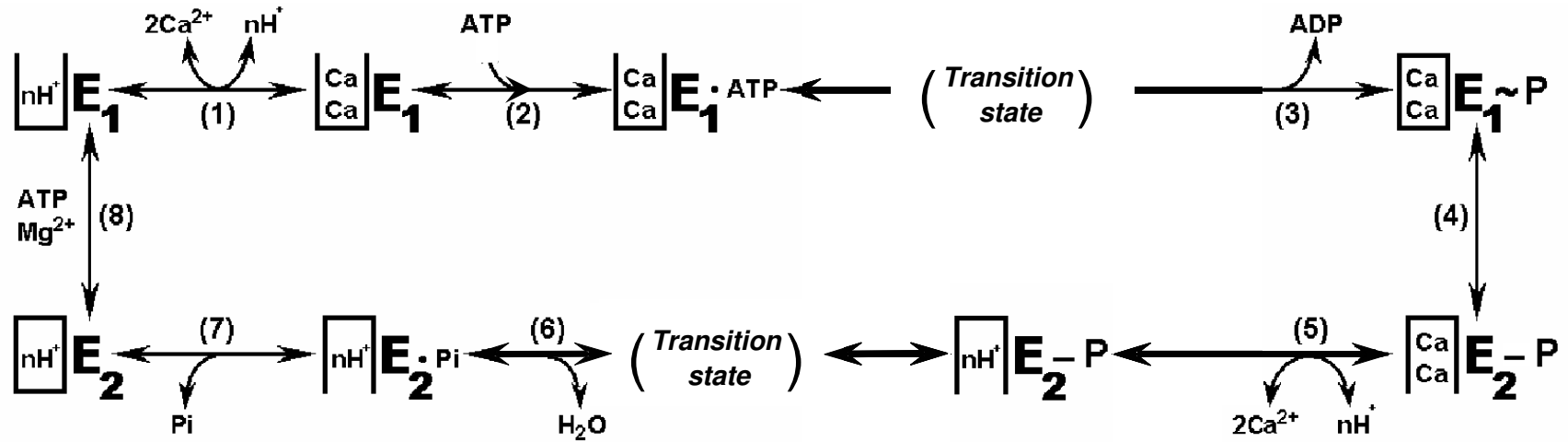
Scales & Inesi (1976) Arch Bioch Biophys 176, 392-394)



(diameter: 600-2000 Å)

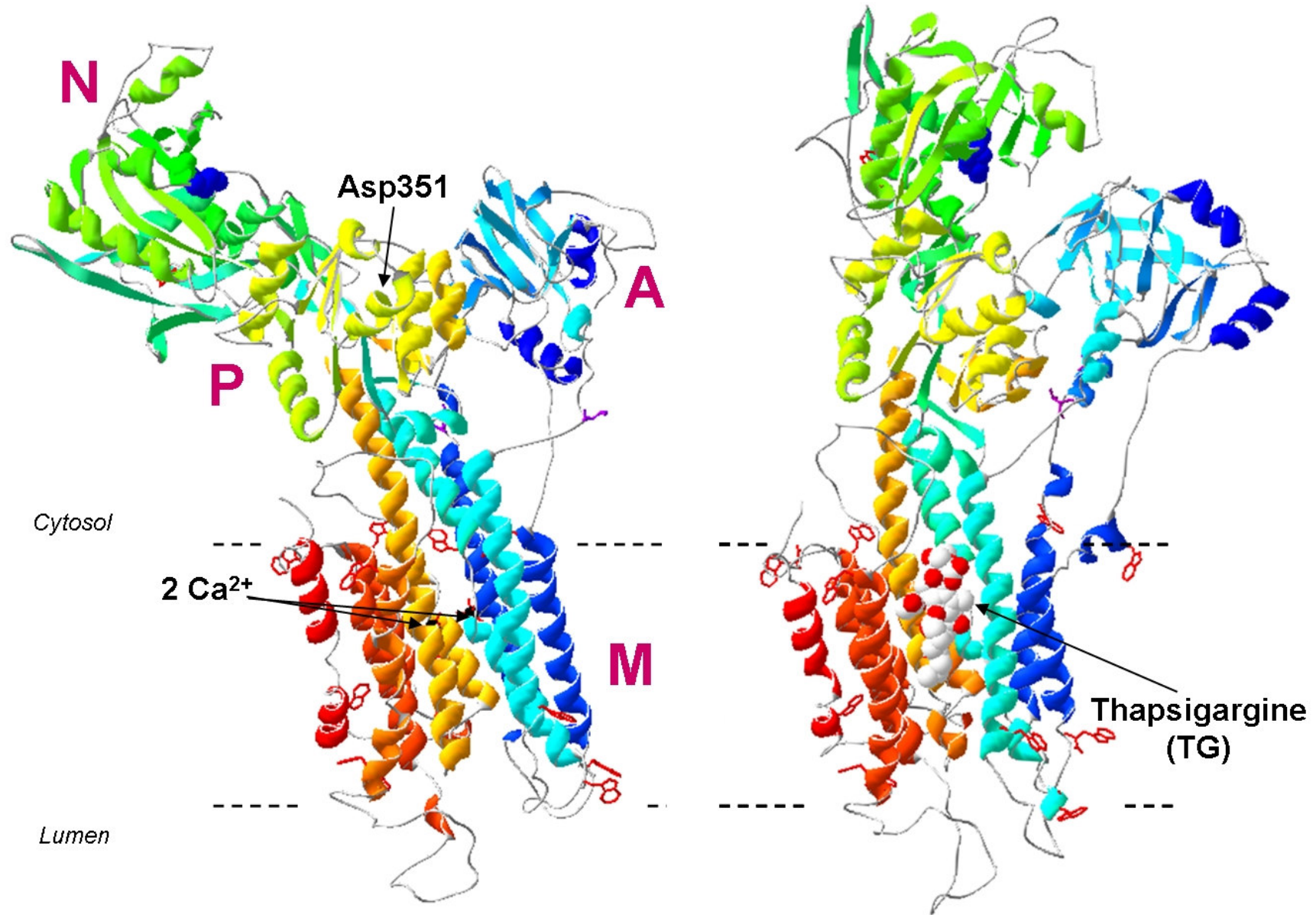


Cycle catalytique de l'ATPase Ca^{2+}

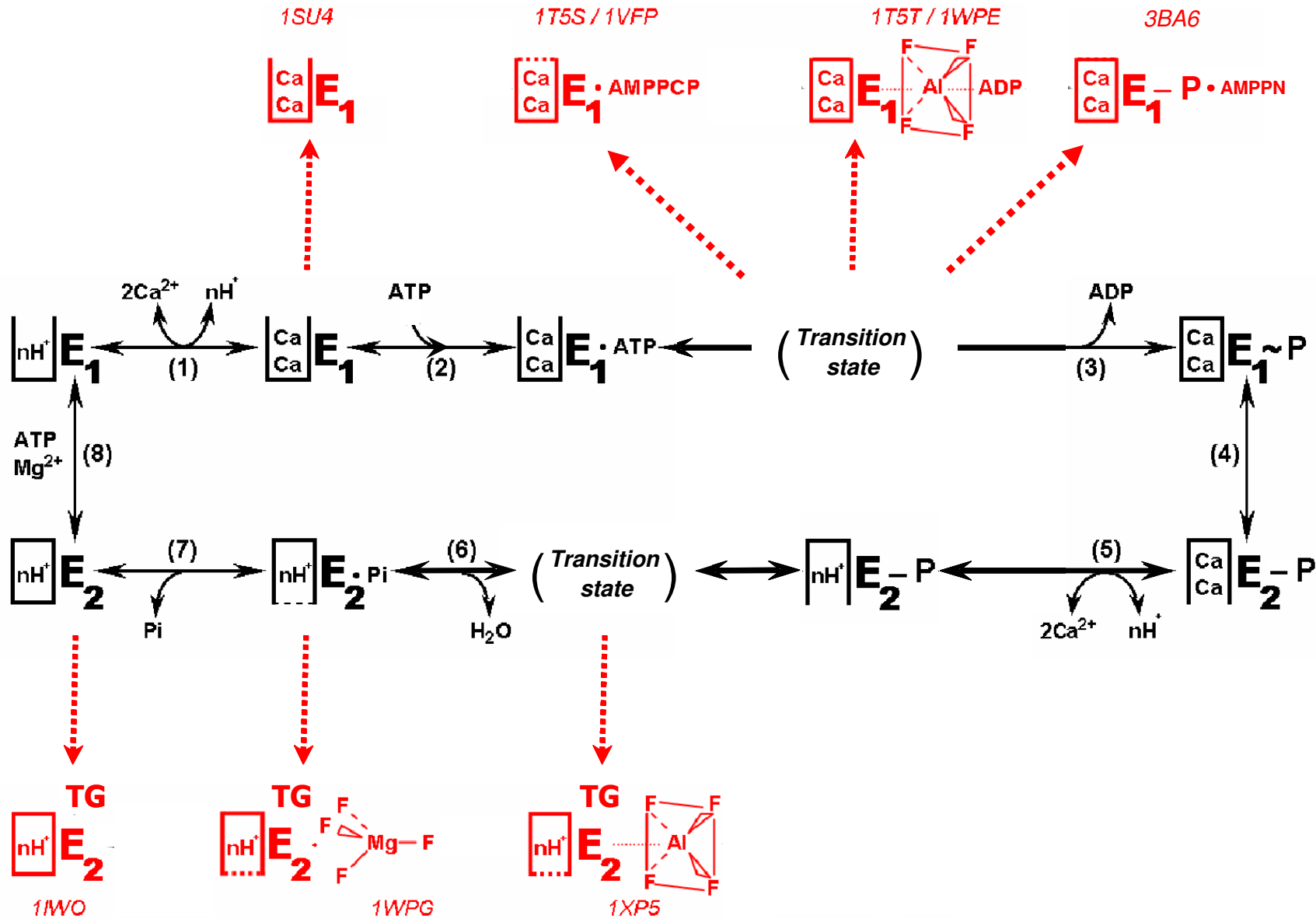


Les premières structures tridimensionnelles de l'ATPase-Ca²⁺

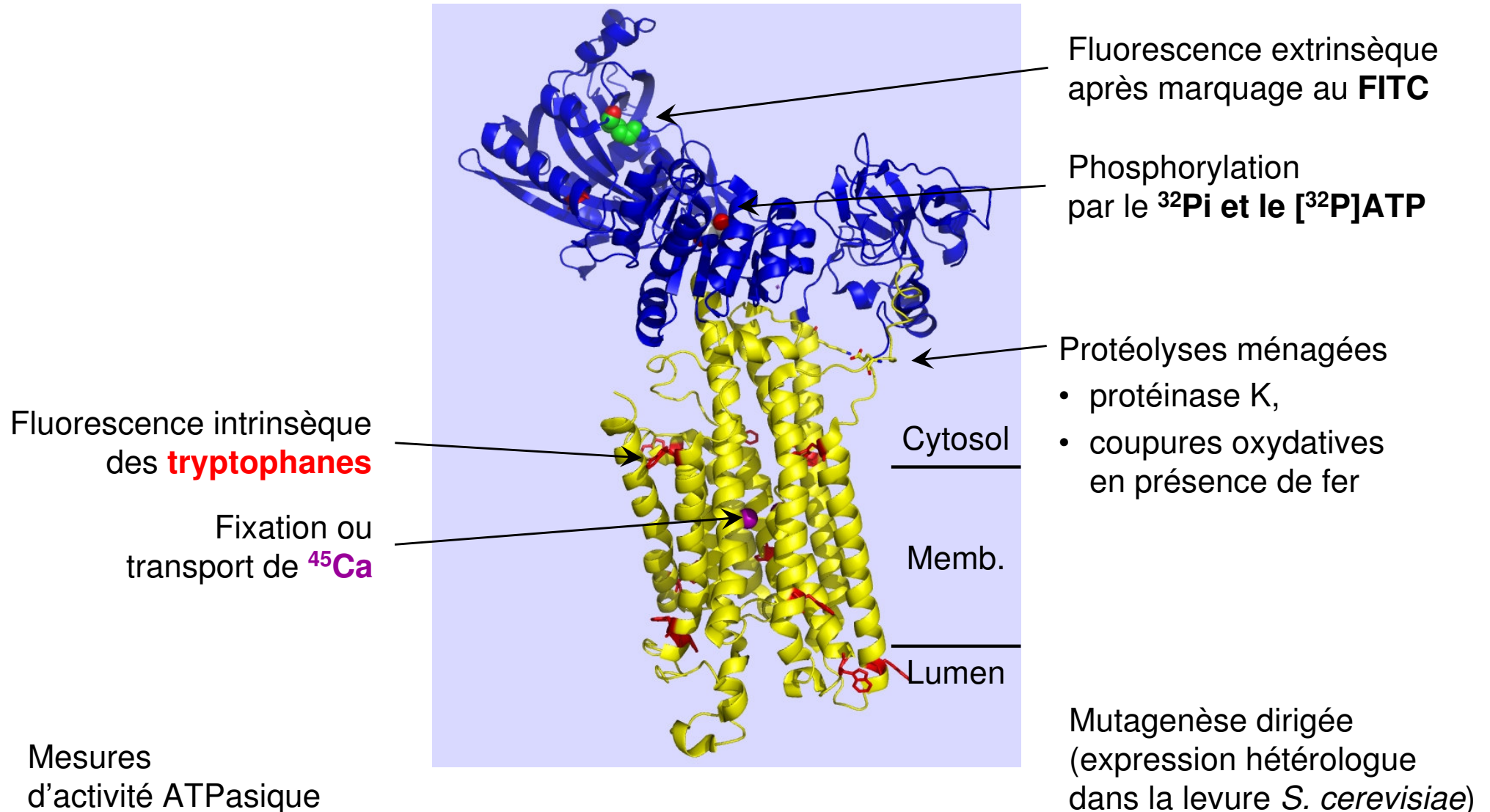
C. Toyoshima (2000, 2002)



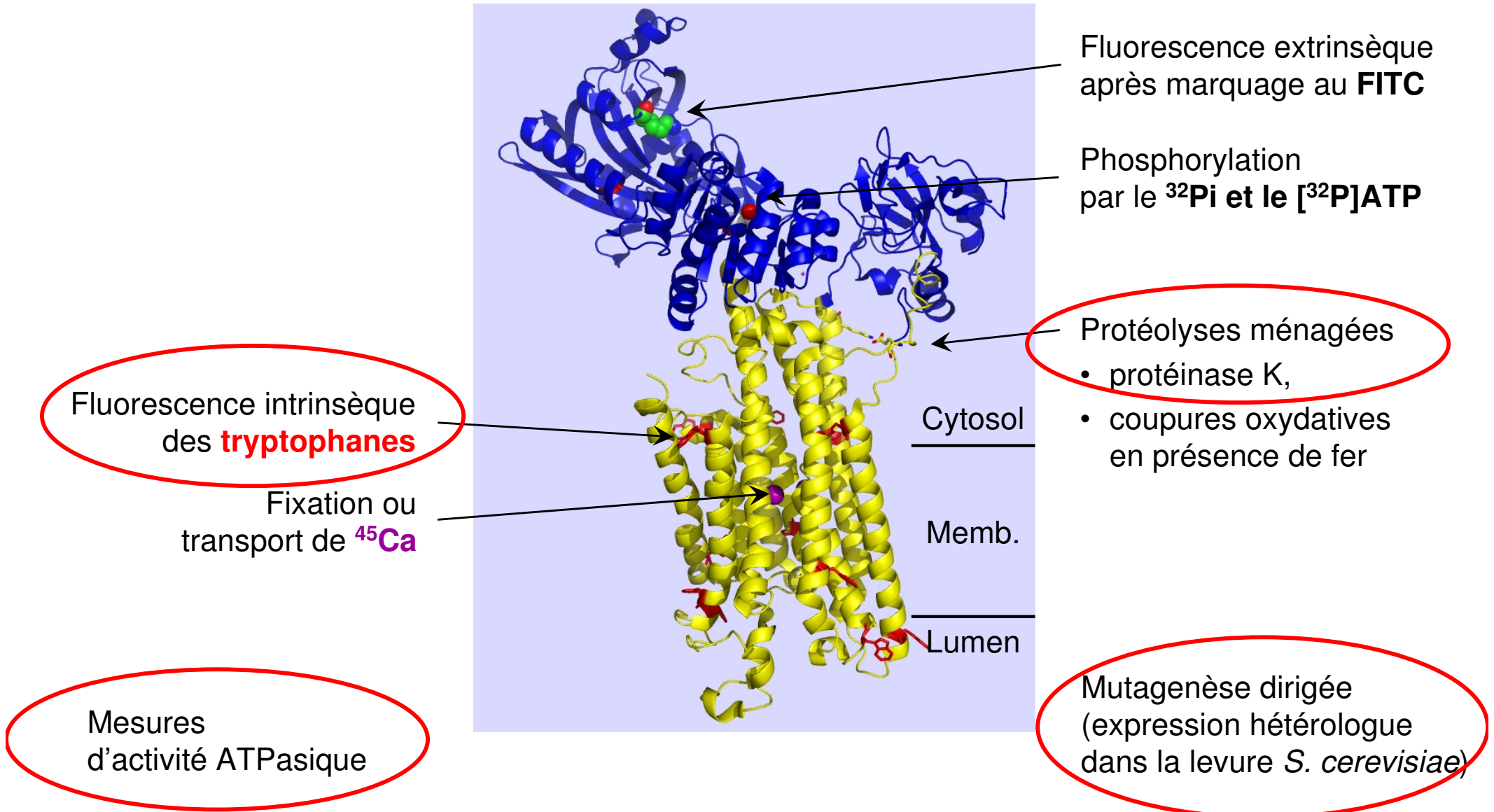
Cycle catalytique de l'ATPase Ca^{2+} et formes cristallisées (fin 2006)



Quelques outils utilisés pour la caractérisation des différents intermédiaires du cycle catalytique de l'**ATPase-Ca²⁺**, qu'elle soit **membranaire ou solubilisée**, **native ou recombinante**, **sauvage ou mutée**.

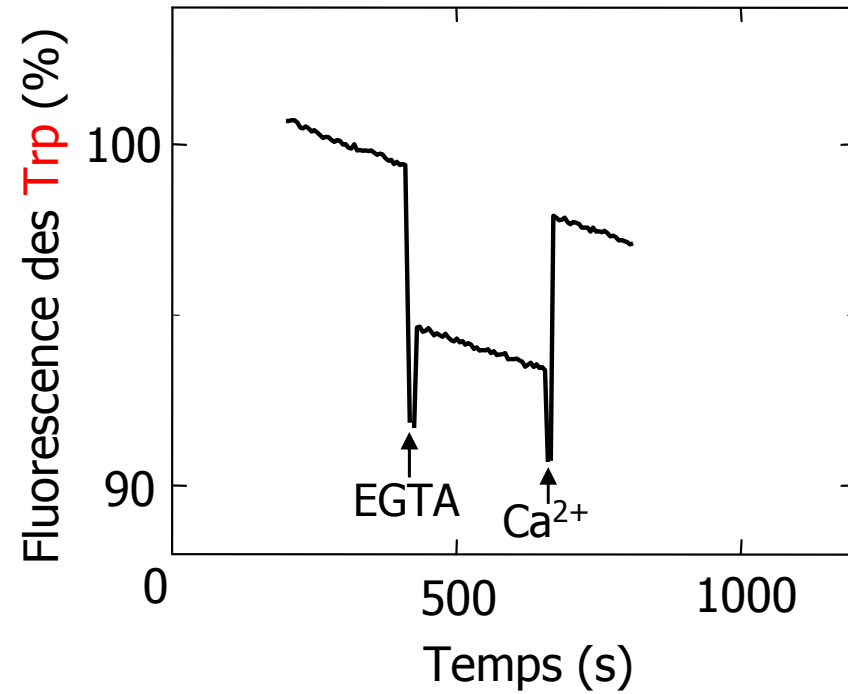
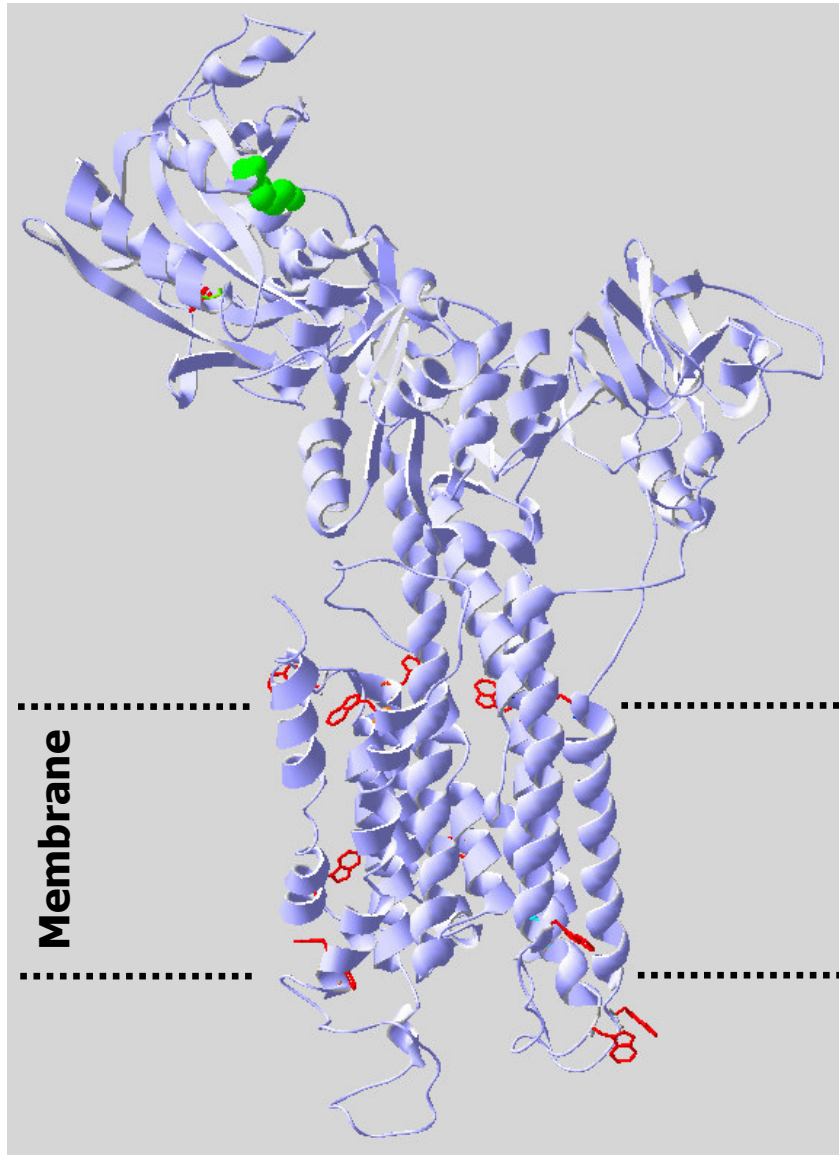


Quelques outils utilisés pour la caractérisation des différents intermédiaires du cycle catalytique de l'**ATPase-Ca²⁺**, qu'elle soit **membranaire ou solubilisée**, **native ou recombinante, sauvage ou mutée**.



Quelques méthodes utilisées dans le cadre de ce travail

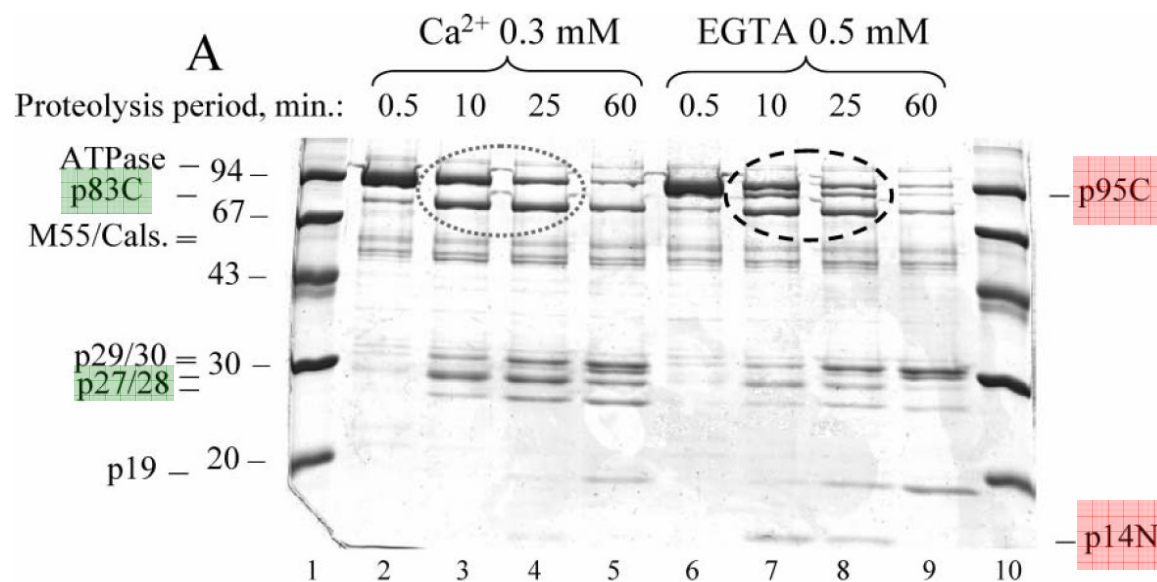
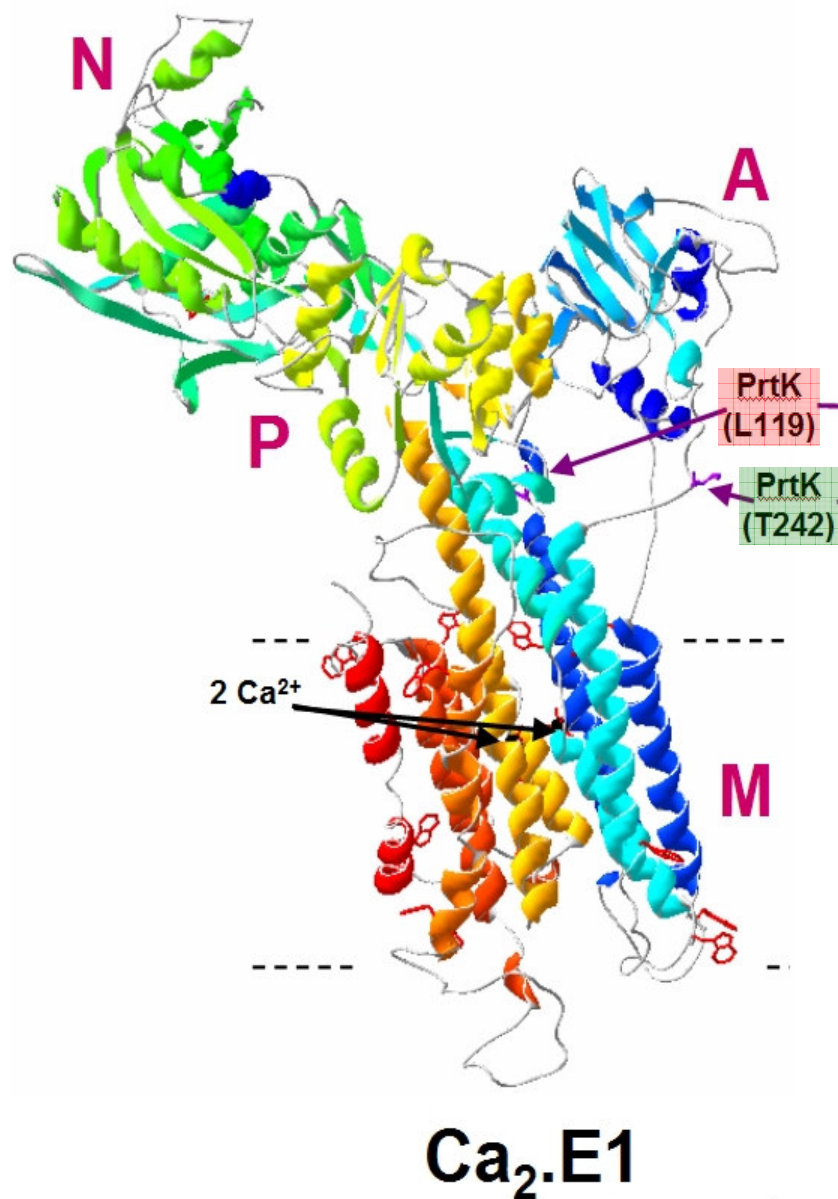
Utilisation des signaux de fluorescence **intrinsèque** (ou *extrinsèque*) de l'ATPase- Ca^{2+} pour suivre la fixation de ligands : exemple du calcium



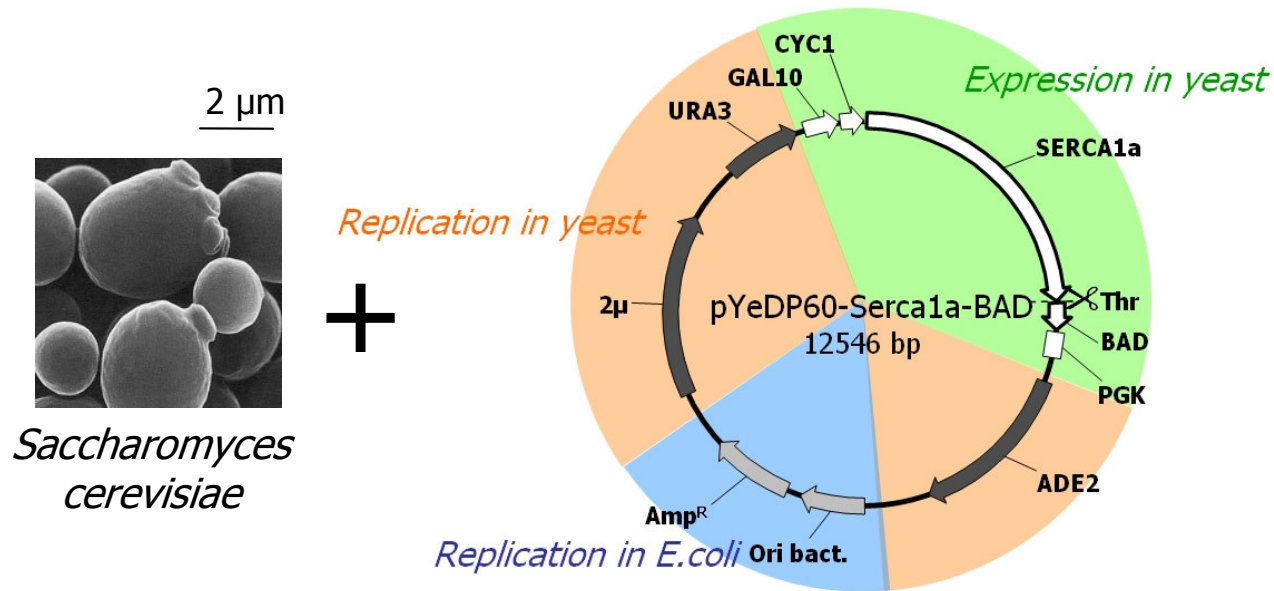
📖 Dupont Y. (1976)

Utilisation de la protéolyse ménagée pour suivre les changements de conformation de l'ATPase-Ca²⁺

(avec Marc le Maire)



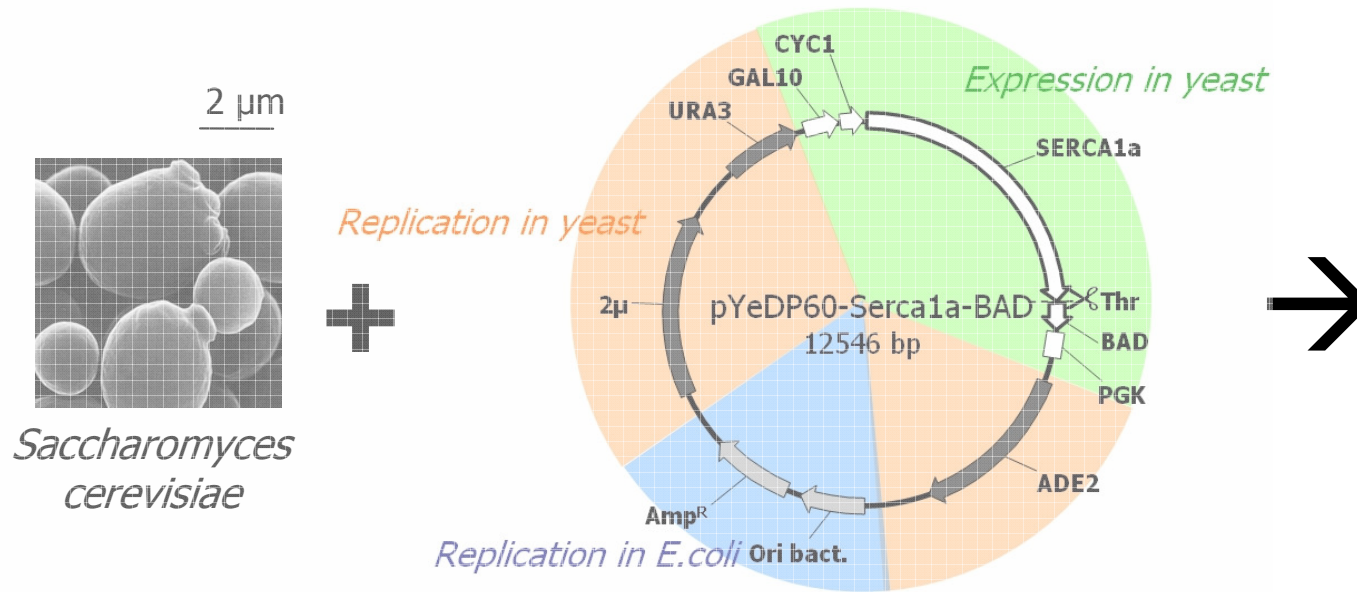
Expression hétérologue et purification de l'ATPase-Ca²⁺ sauvage ou mutée dans la levure *S. cerevisiae* (avec Christine Jaxel et Marc le Maire)



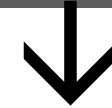
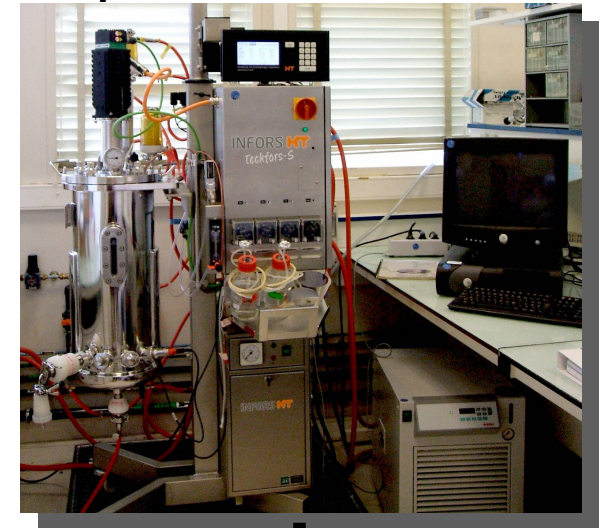
- Expression dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*
 - Système peu coûteux,
 - Cultivable à forte densité,
 - Synthèse de membranes internes.

Lenoir G. *et al.* (2002) *Biochem. Biophys. Acta*

Expression hétérologue et purification de l'ATPase-Ca²⁺ sauvage ou mutée dans la levure *S. cerevisiae* (avec Christine Jaxel et Marc le Maire)



Expression en fermenteur

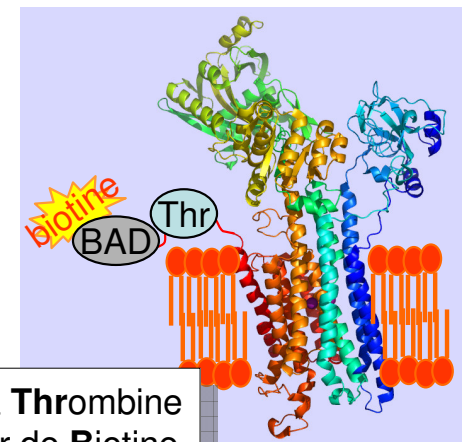


➤ Fermenteur (20 litres)

- contrôle fin de la T^{°C}, pO₂, agitation et pH.
- Rendement d'expression multiplié par 7-10

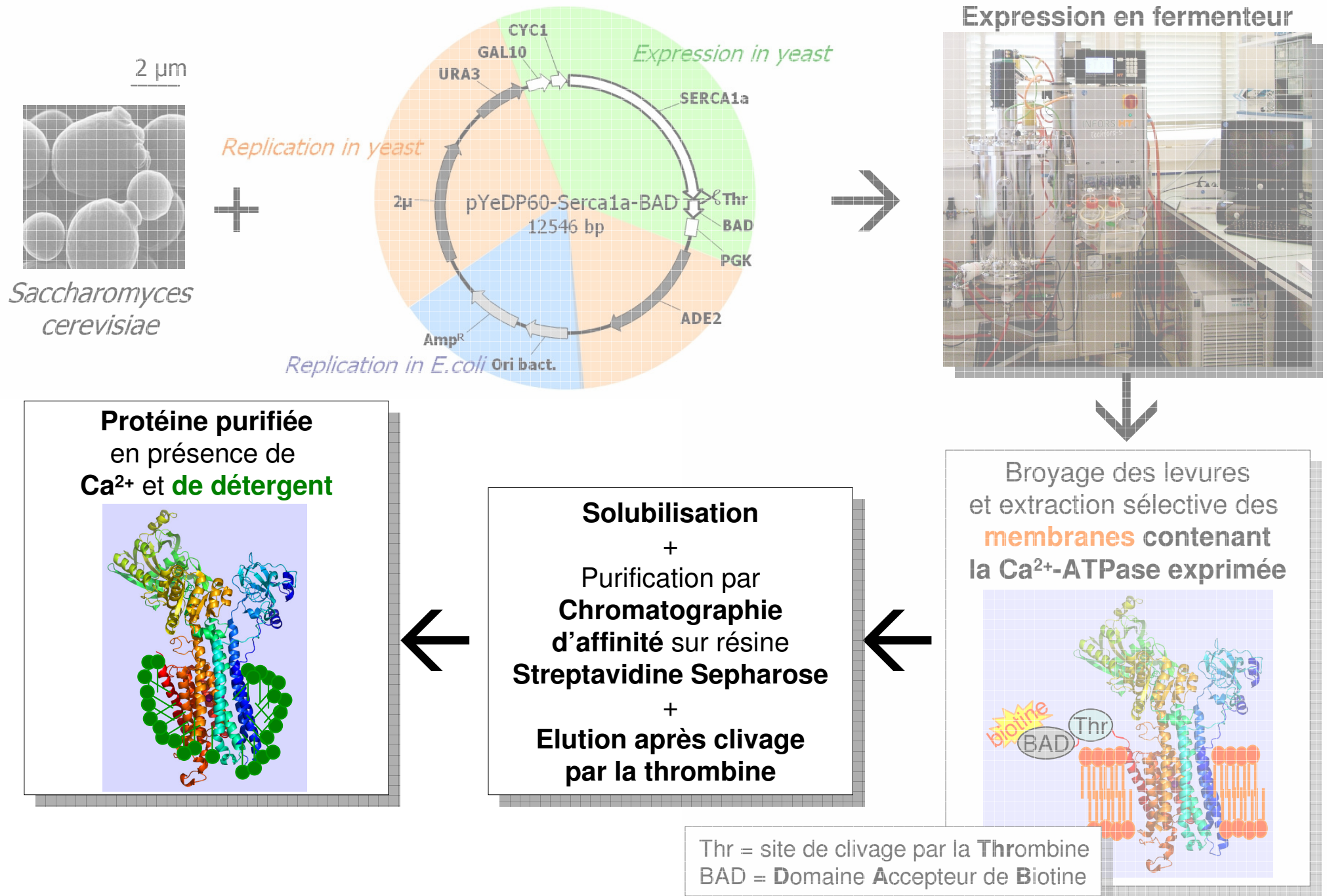
Cardi D. - Montigny C. - Arnou B. *et al.* (2009) *Meth. Mol. Biol.*

Broyage des levures et extraction sélective des **membranes** contenant la Ca²⁺-ATPase exprimée



Thr = site de clivage par la **Thrombine**
BAD = **D**omaine **A**ccepteur de **B**iotine

Expression hétérologue et purification de l'ATPase-Ca²⁺ sauvage ou mutée dans la levure *S. cerevisiae* (avec Christine Jaxel et Marc le Maire)



Contenu de cette thèse

Influence des inhibiteurs sur les conformations adoptées par l'ATPase-Ca²⁺ au cours de la cristallogenèse

Montigny et al. Biochemistry (2007)

Utilisation du glycérol et de la bétaine pour stabiliser l'ATPase-Ca²⁺ solubilisée, notamment pour des études de fluorescence intrinsèque

Montigny et al. Biochemistry (2008)

Marchand et al. J. Biol. Chem. (2008)

Etude d'une forme particulière de l'ATPase-Ca²⁺ marquée au FITC

McIntosh et al. Biochemistry (2008)

Caractérisation de l'association d'un divalent avec ses chélateurs potentiels : exemples du magnésium et du cadmium

Montigny et al. Anal. Biochem. (2007)

Leverrier et al. Anal. Biochem. (2007)

Contenu de cette thèse

Influence des inhibiteurs sur les conformations adoptées par l'ATPase-Ca²⁺ au cours de la cristallogenèse

Montigny et al. Biochemistry (2007)

Utilisation du glycérol et de la bétaine pour stabiliser l'ATPase-Ca²⁺ solubilisée, notamment pour des études de fluorescence intrinsèque

Montigny et al. Biochemistry (2008)

Marchand et al. J. Biol. Chem. (2008)

Etude d'une forme particulière de l'ATPase-Ca²⁺ marquée au FITC

McIntosh et al. Biochemistry (2008)

Caractérisation de l'association d'un divalent avec ses chelateurs potentiels : exemples du magnésium et du cadmium

Montigny et al. Anal. Biochem. (2007)

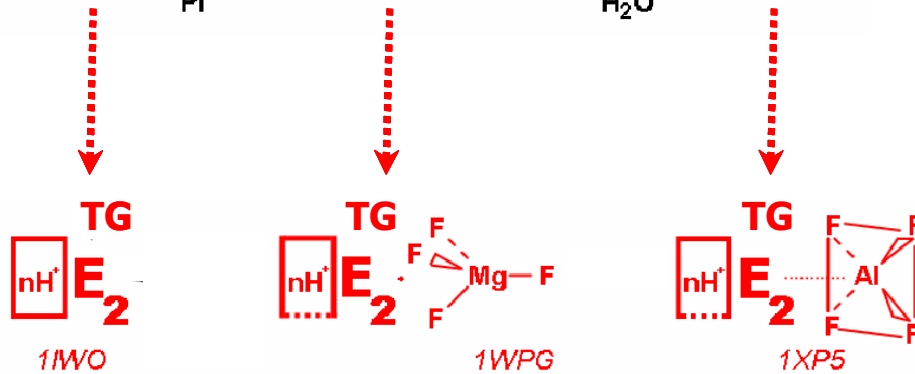
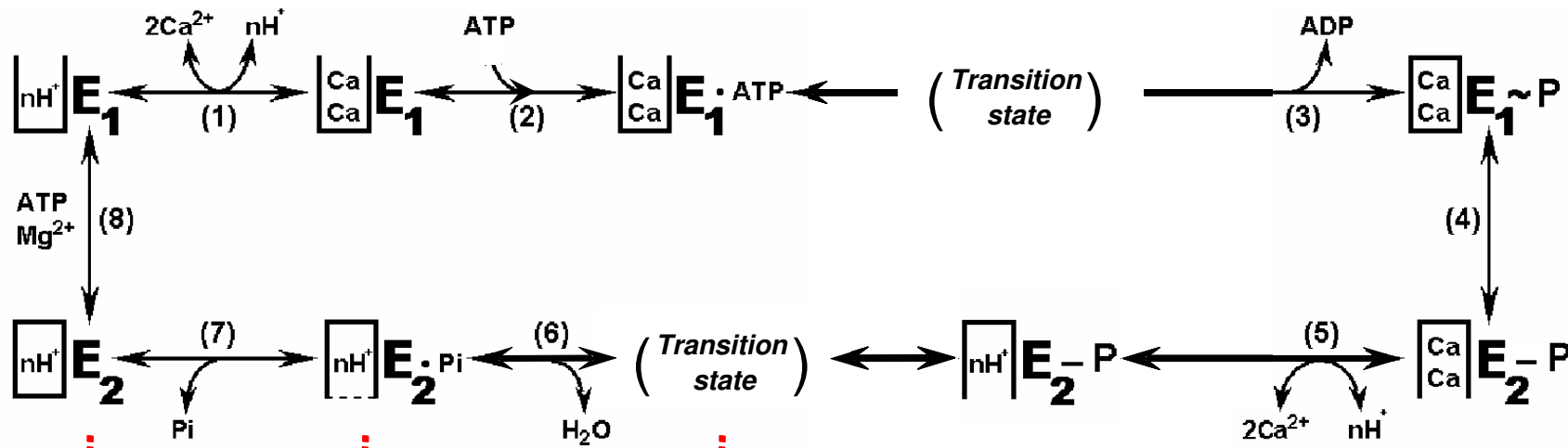
Leverrier et al. Anal. Biochem. (2007)

Effets sur les conformations de l'ATPase des inhibiteurs employés notamment au cours de la cristallogenèse

Effet de la thapsigargine sur la forme E2.BeF₃

Dépendance en Mg²⁺ de l'effet
de l'acide cyclopiazonique

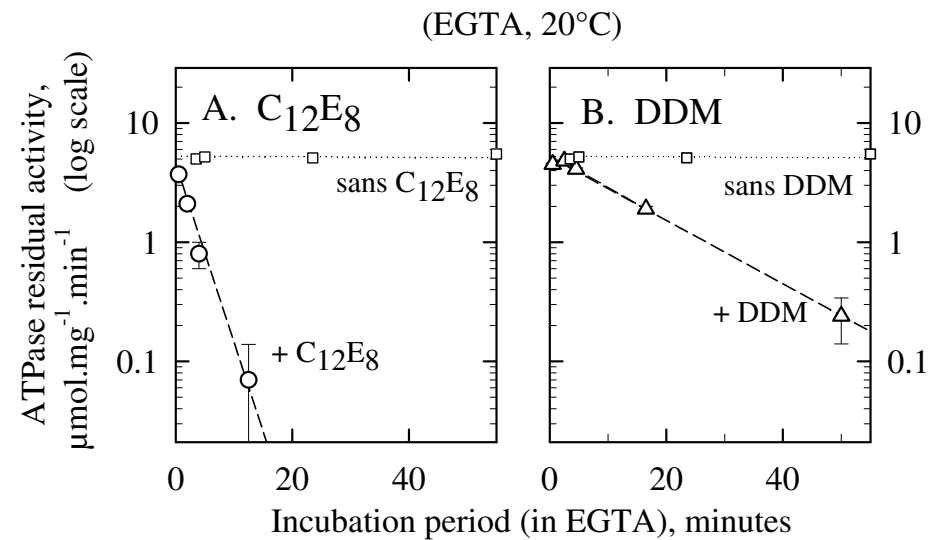
Cycle catalytique de l'ATPase Ca^{2+} et formes cristallisées (fin 2006)



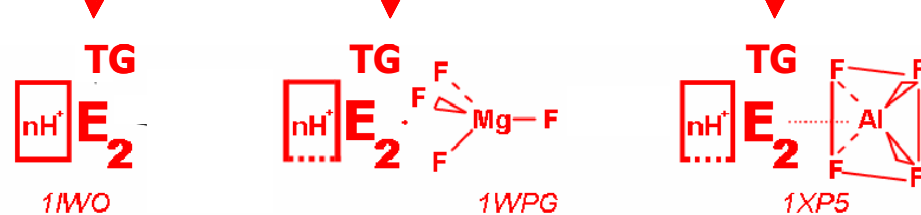
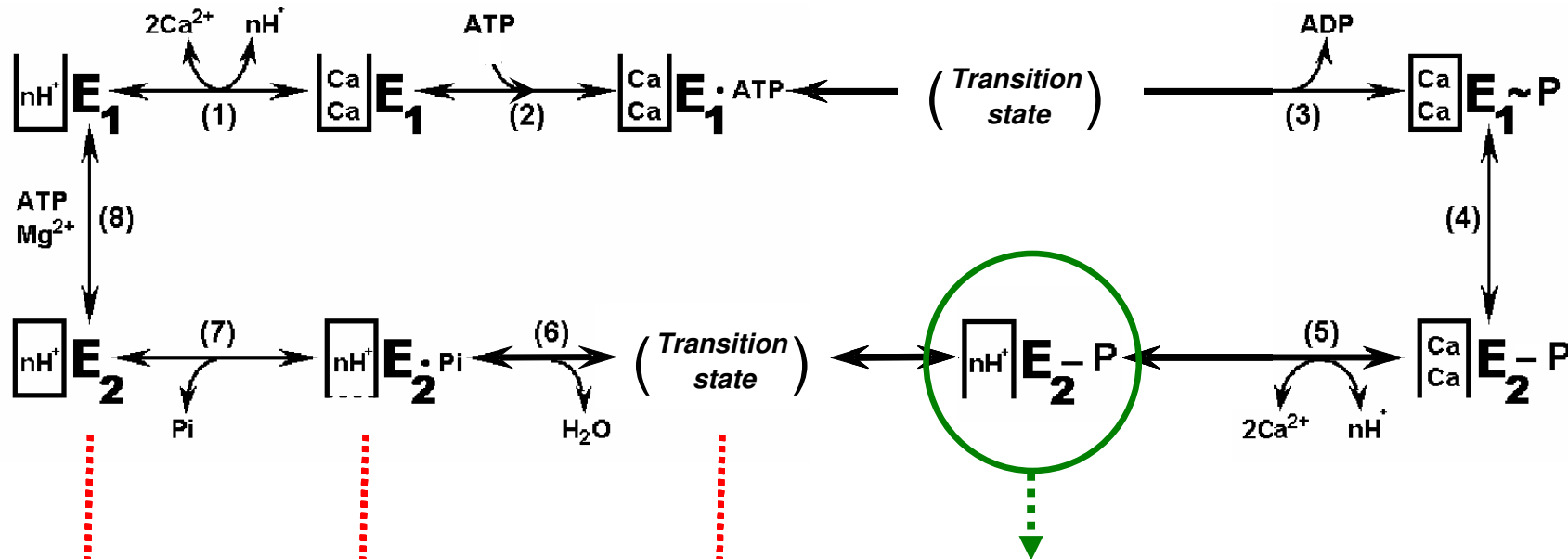
Toutes les formes E2 cristallisées en 2006
avaient été obtenues
en présence de TG !

= Stabilisation des enzymes solubilisés en
absence de calcium

(Stokes et al. (1994), Seekoe et al. (2001))



Cycle catalytique de l'ATPase Ca^{2+} et formes cristallisées (fin 2006)



Toutes les formes E2 cristallisées en 2006
avaient été obtenues
en présence de TG !

• Le complexe E2.BeF_3 est un bon analogue de E2-P ; Danko *et al.* (2004).

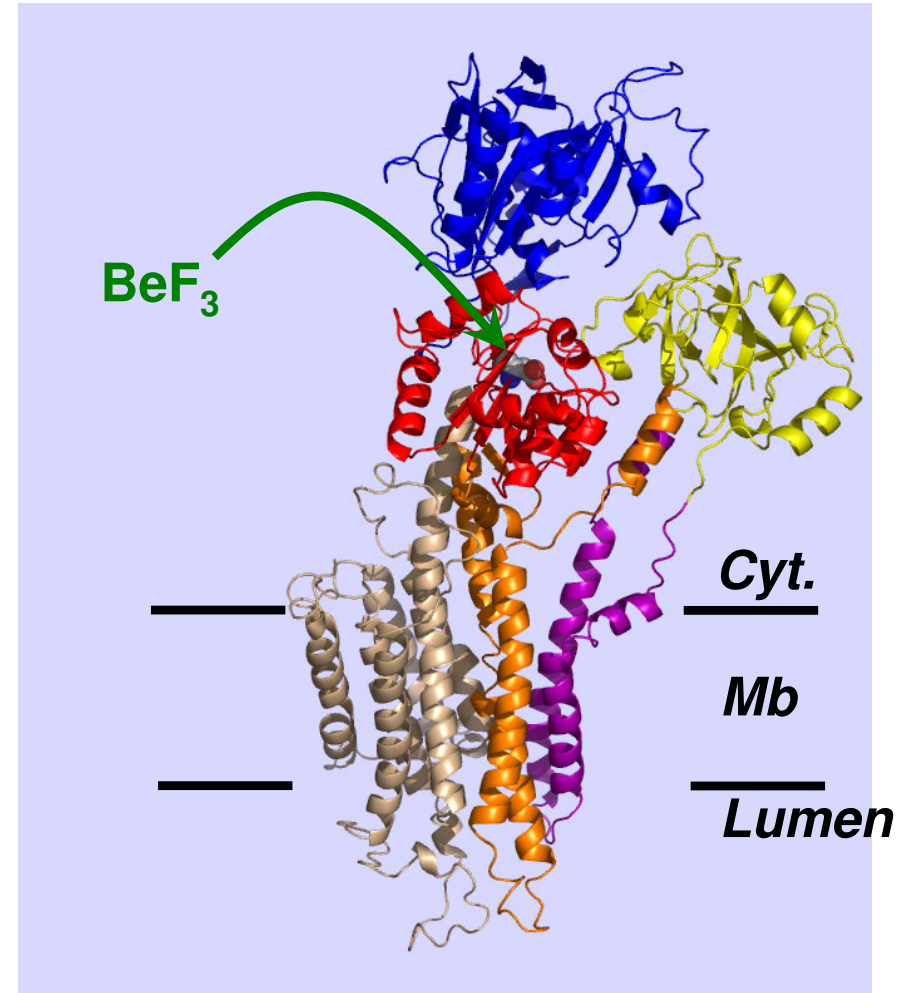
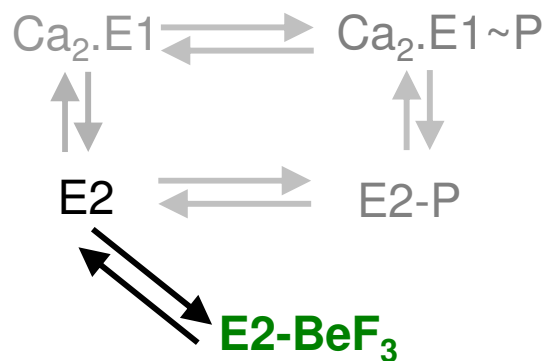
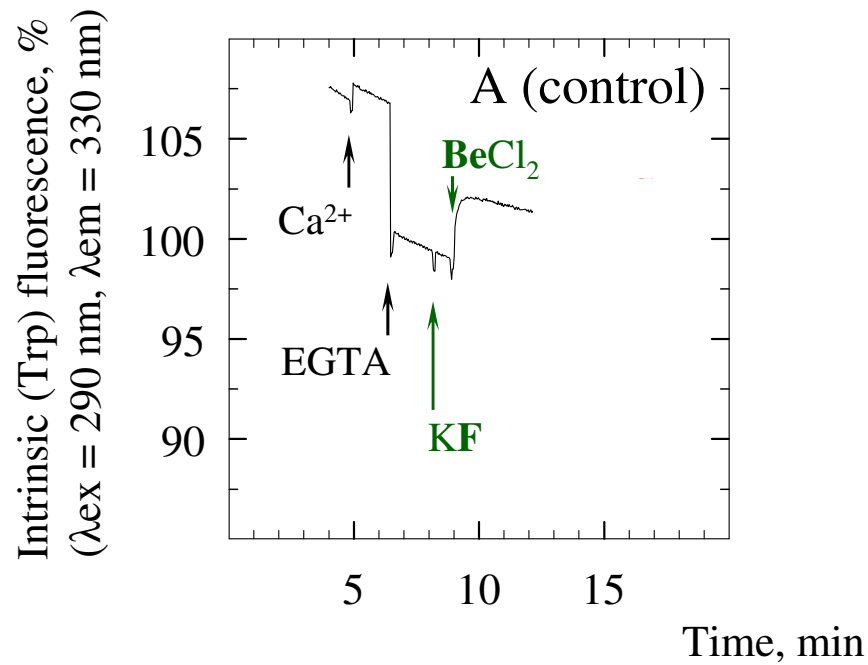
• Les sites luminaux sont ouverts en E2-P (ou E2.BeF_3) mais la présence de TG bloque l'accès du Ca^{2+} à ces sites ; Picard *et al.* (2006)

Effets sur les conformations de l'ATPase des inhibiteurs employés notamment au cours de la cristallogenèse

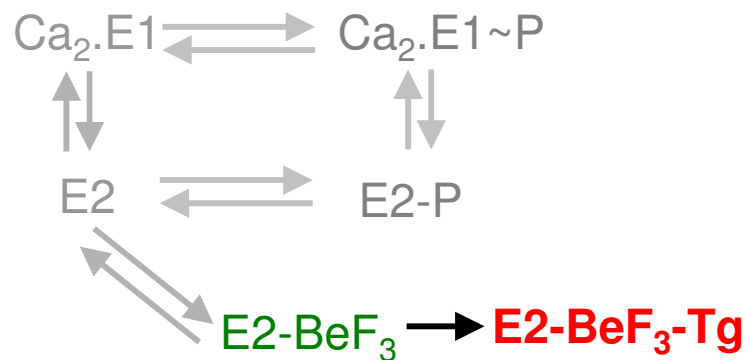
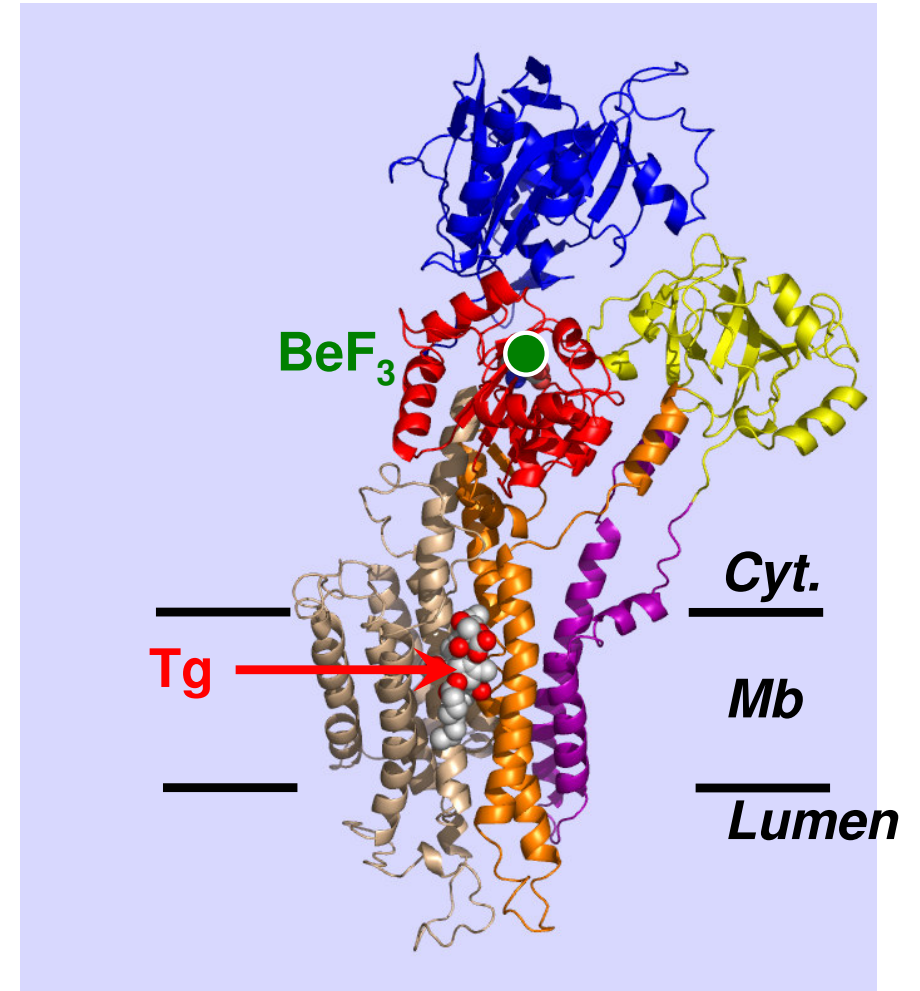
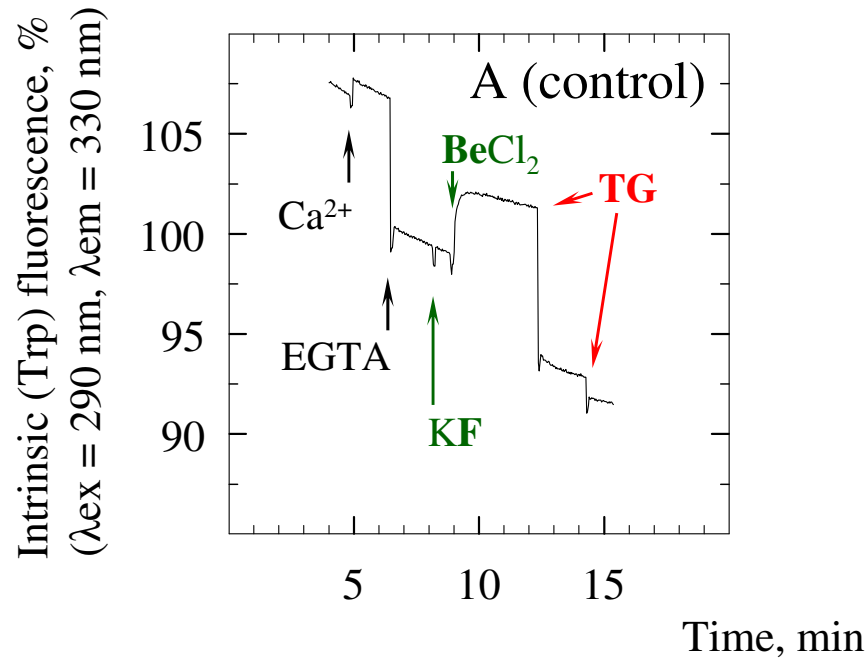
Effet de la thapsigargine sur la forme E2.BeF₃

Dépendance en Mg²⁺ de l'effet
de l'acide cyclopiazonique

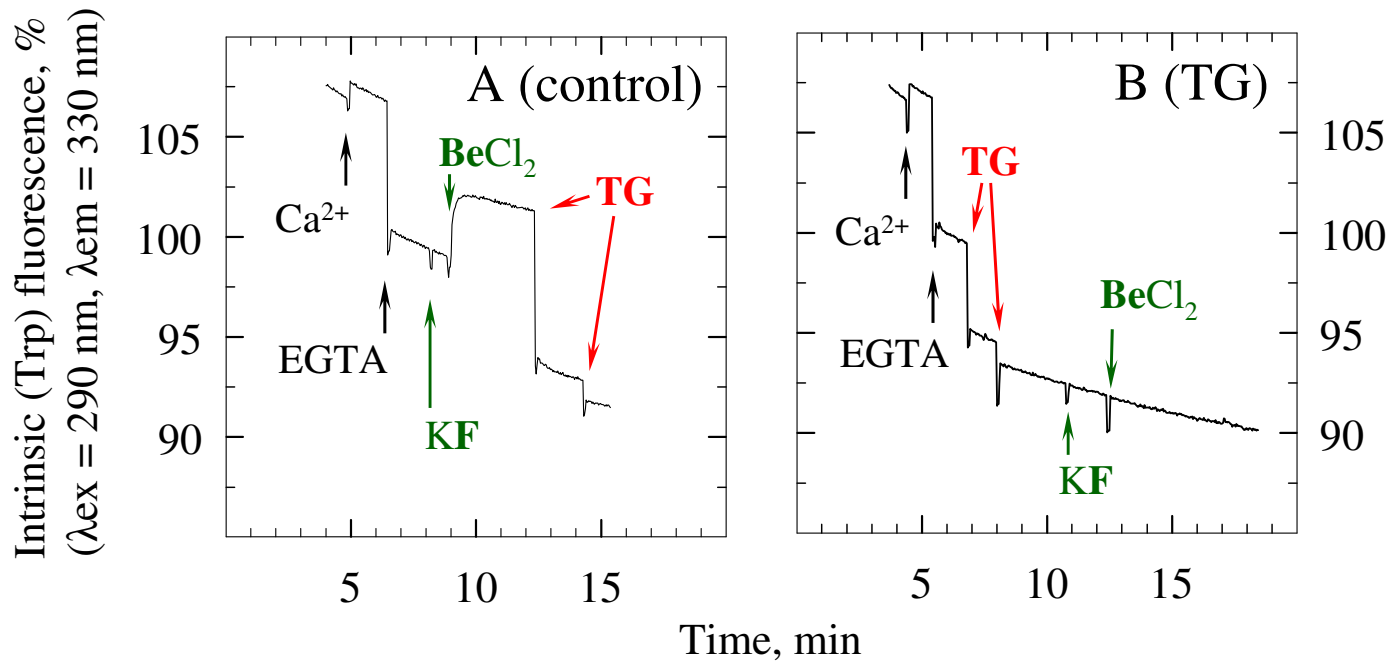
Réponse des Trp membranaires à la formation du complexe E2.BeF₃



Réponse des Trp membranaires à la formation du complexe E2.BeF₃



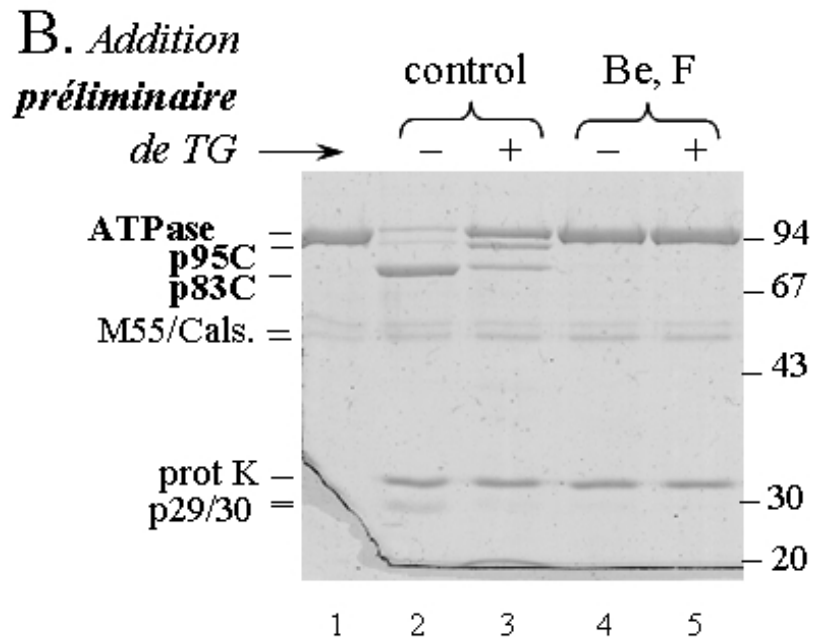
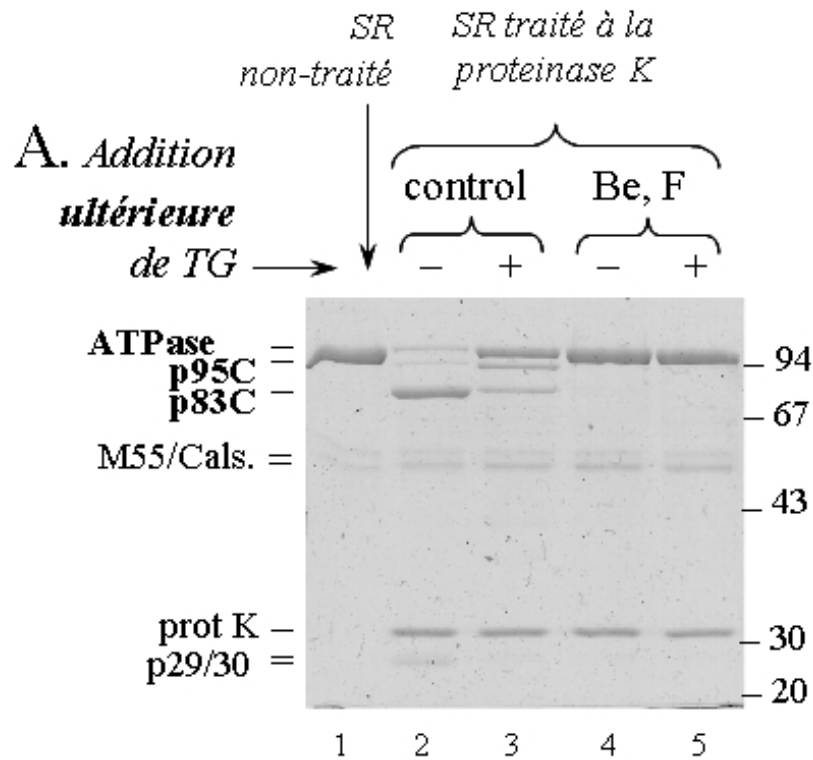
La thapsigargine bloque la réponse des Trp membranaires à la formation du complexe E2.BeF₃



- Quand l'inhibiteur est fixé (au domaine membranaire),
les tryptophanes ne répondent plus à l'addition du BeF₃ .

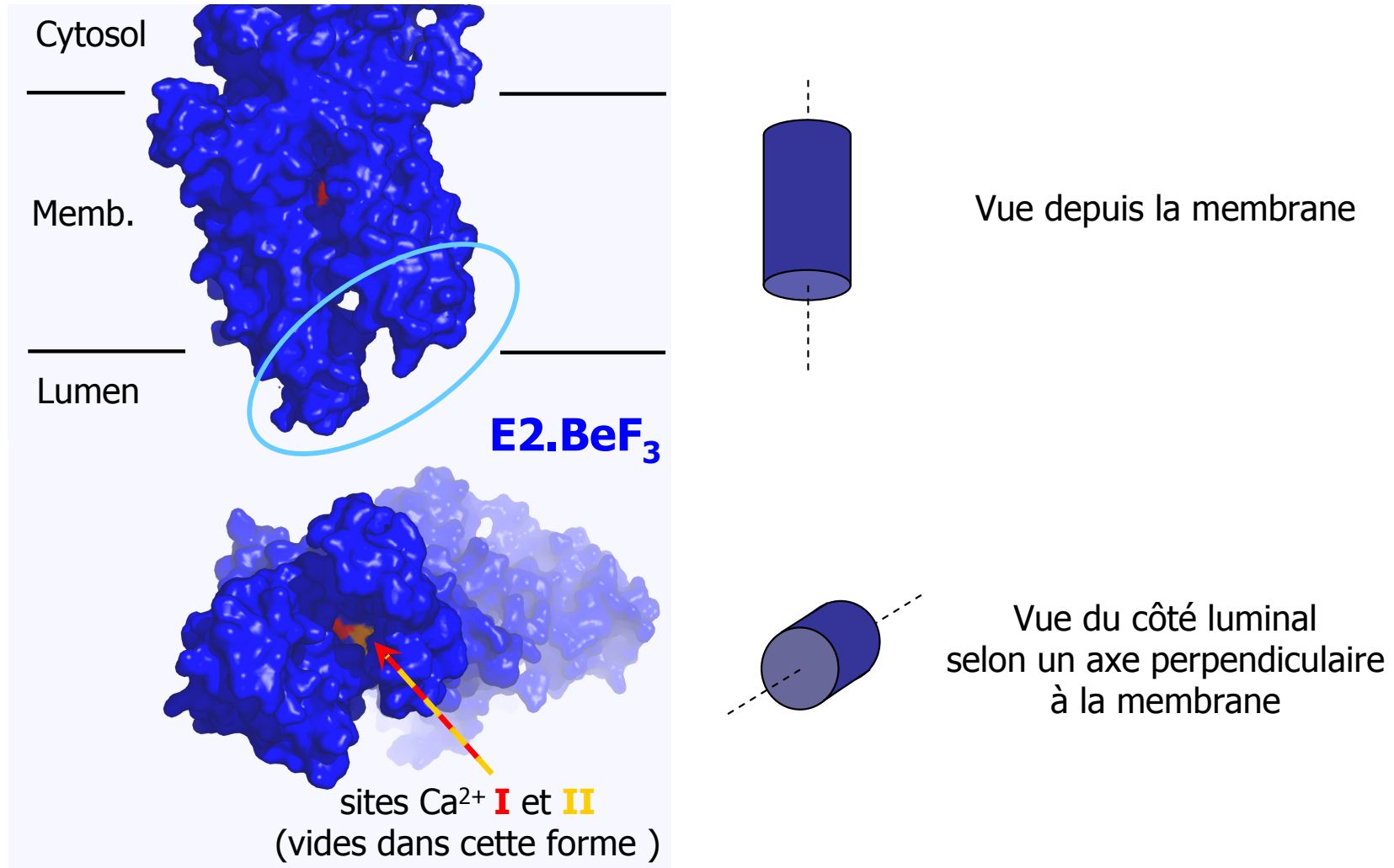
Les formes E2.BeF₃ sont complètement protégées de la protéolyse, y compris en présence de thapsigargine

- En absence de BeF₃, la TG ne fait que ralentir la coupure de l'ATPase.
- Le complexe fluoré BeF₃ empêche complètement la protéolyse, même après une addition préliminaire de TG (B): c'est la preuve que **le BeF₃ continue à se fixer**.



→ La thapsigargine fige les hélices transmembranaires, mais la flexibilité des boucles reliant les domaines membranaire et cytosolique permet encore la fixation du BeF₃.

En absence de TG, la forme E2.BeF₃ désormais cristallisée a bien ses sites luminaux ouverts



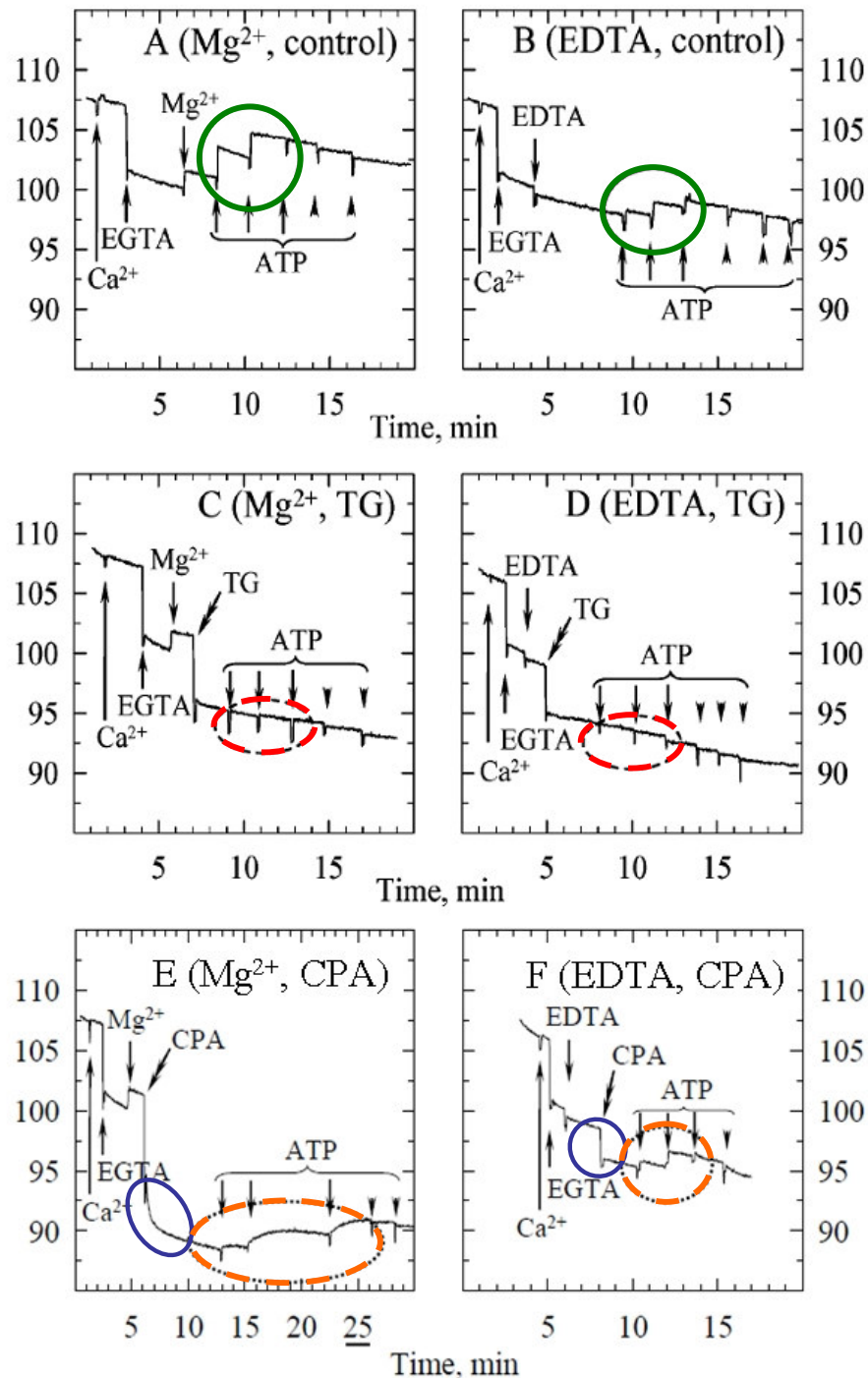
→ Structures cohérentes avec les résultats expérimentaux (Prt K, W, ⁴⁵Ca²⁺)
(Picard *et al.* (2006), Montigny *et al.* (2007))

Effets sur les conformations de l'ATPase des inhibiteurs employés notamment au cours de la cristallogenèse

Effet de la thapsigargine sur la forme E2.BeF₃

Dépendance en Mg²⁺ de l'effet
de l'acide cyclopiazonique

Intrinsic (Trp) fluorescence, % (298 nm / 320 nm)

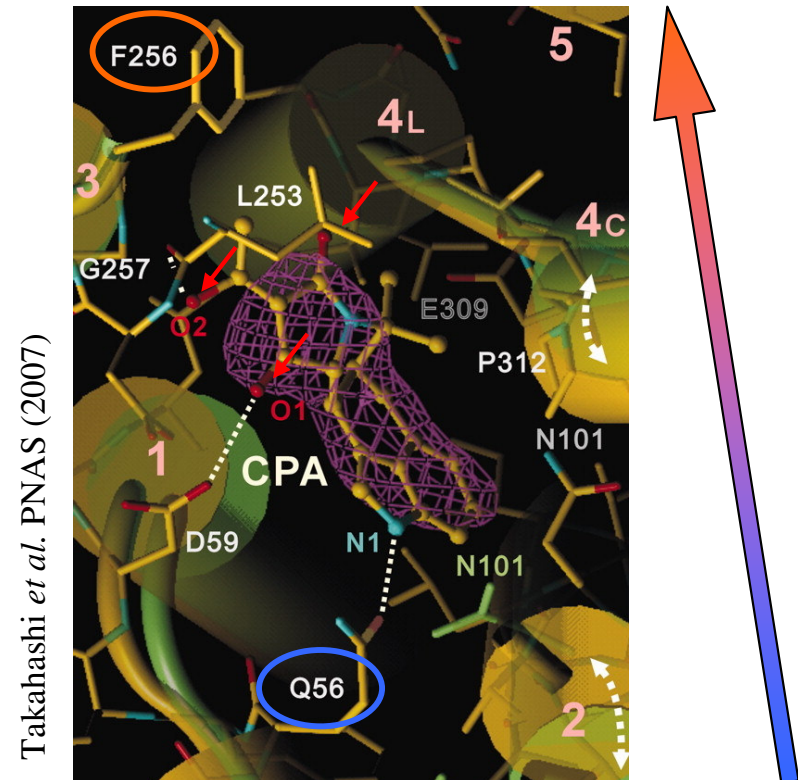
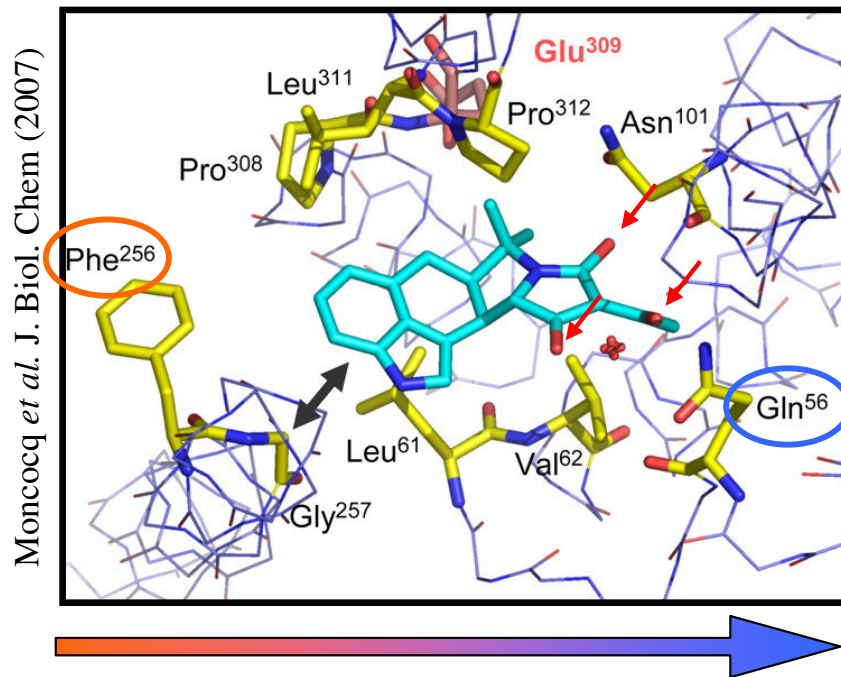


Fixation d'ATP : dépendance en Mg²⁺ de l'effet de l'acide cyclopiazonique

- En présence ou en absence de Mg²⁺, la thapsigargine **empêche** les tryptophanes membranaires de répondre à la fixation d'ATP.
 - En absence de Mg²⁺, **le CPA n'empêche pas** les tryptophanes membranaires de répondre à la fixation d'ATP.
 - En présence de Mg²⁺, la réponse des Trp à la fixation du CPA est biphasique, et **la fixation d'ATP est lente et d'affinité mauvaise**.
- **la fixation du CPA serait dépendante du Mg²⁺?**

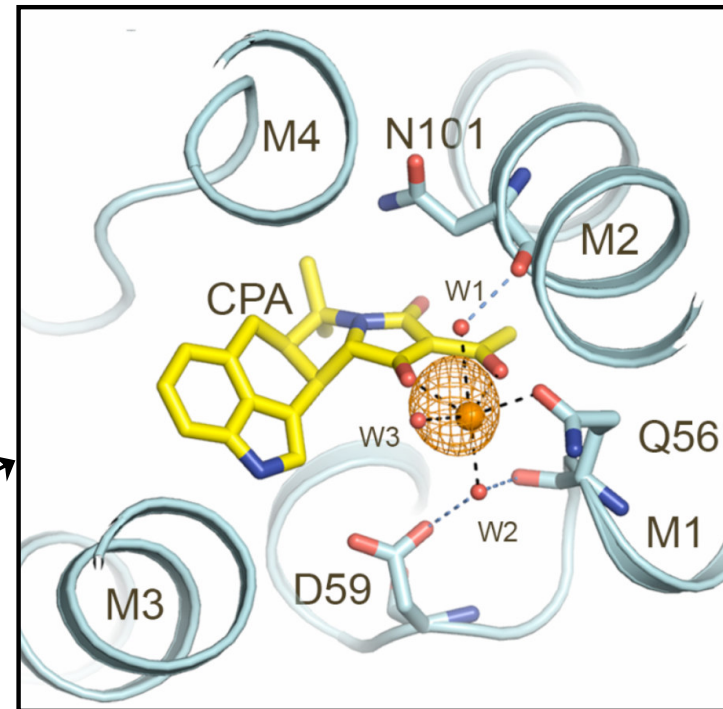
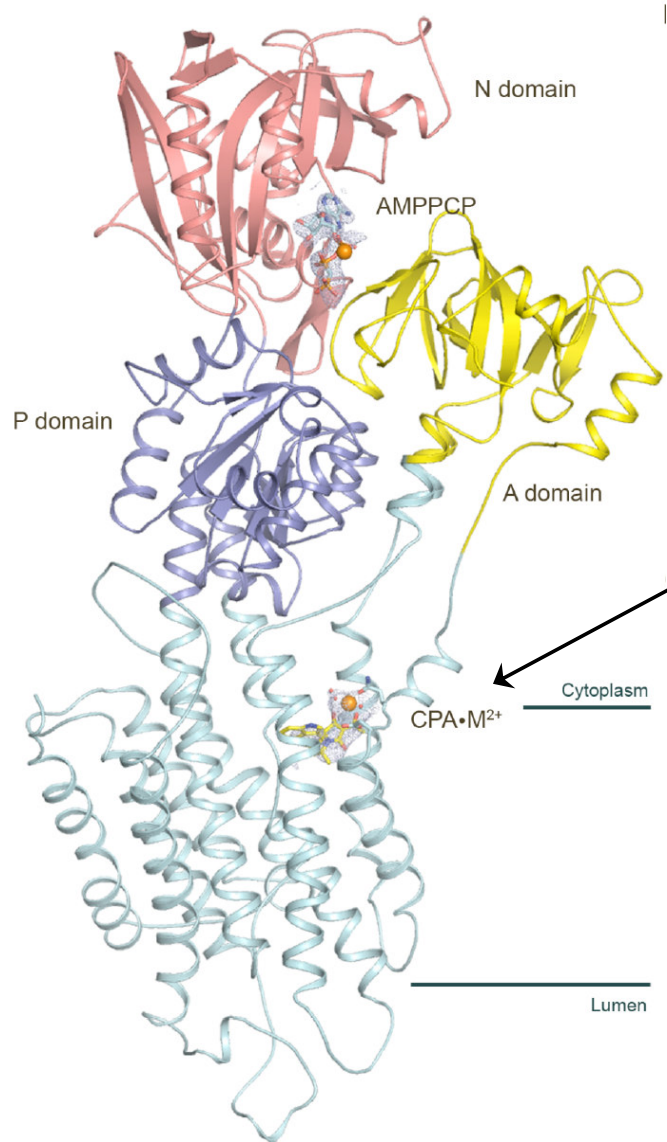
Du côté des structures tridimensionnelles...

- En 2007, publication de **deux structures** à résolution atomique montrant **deux orientations différentes de la molécule de CPA** dans son site de fixation !!



➤ Or nos résultats suggèrent que la fixation du CPA pourrait être dépendante du Mg^{2+} : pour visualiser un éventuel métal, le Mn^{2+} a été utilisé pour cristalliser l'ATPase- Ca^{2+} en présence de CPA...

Fixation d'un complexe Mn^{2+} .CPA sur l'ATPase- Ca^{2+}

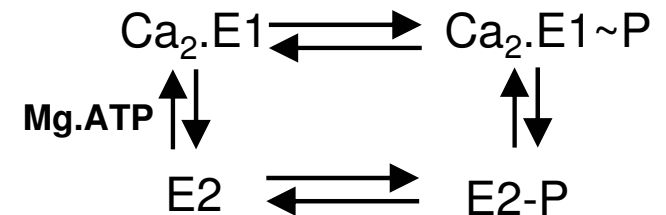


Laursen *et al.* (2009) *J. Biol. Chem.*

La fixation sur l'ATPase d'un complexe Mn^{2+} .CPA est sans doute en partie responsable de la divergence des précédentes structures

Vers la validation (ou non) de certaines structures cristallographiques

- En présence de TG (ou de CPA, ou de BHQ), les Trp membranaires ne répondent pas à la fixation de nucléotide
 - Validité de la structure E2.TG.AMPPCP présentée dans Jensen *et al.* (2007) ?



- En revanche, les structures E2.AIF₄ et E2.AIF₄.TG sont très semblables (Olesen *et al.* (2008))
 - La forme E2.AIF₄ est plus proche que la forme E2.BeF₃ de la forme E2 dépourvue de calcium sur laquelle la TG se fixe le plus efficacement.



- *Les structures cristallographiques sont souvent obtenues dans des conditions expérimentales extrêmes pour la protéine ([ligands], inhibiteurs, détergents...)*
 - ➔ **nécessité de valider ces structures par l'étude fonctionnelle.**
- *Et si l'on ne veut pas utiliser les inhibiteurs pour stabiliser les protéines ?*
 - ➔ **utilisation d'autres agents stabilisants : glycérol, bétaïne...**

Etude des propriétés de Serca1a stabilisée en *présence de détergent*, native ou recombinante (sauvage ou mutée)

**Effets protecteurs du glycérol
vis-à-vis de la dénaturation induite par la solubilisation
en absence de Ca²⁺**

**Application de ces nouvelles conditions expérimentales à la
caractérisation fonctionnelle de quelques mutants**

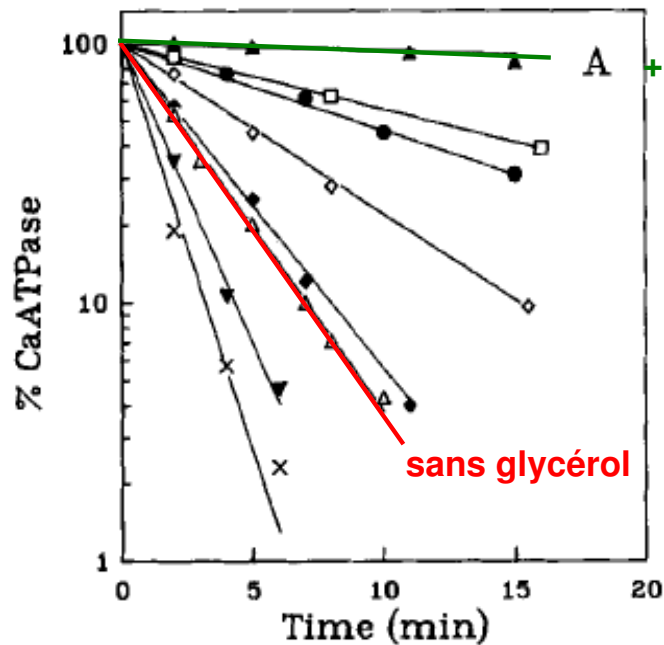
Etude des propriétés de Serca1a stabilisée en *présence de détergent*, native ou recombinante (sauvage ou mutée)

**Effets protecteurs du glycérol
vis-à-vis de la dénaturation induite par la solubilisation
en absence de Ca²⁺**

**Application de ces nouvelles conditions expérimentales à la
caractérisation fonctionnelle de quelques mutants**

Objectifs

- Recherche de nouvelles conditions de stabilisation des enzymes solubilisés :
 - pour la cristallogénèse, pour éventuellement remplacer l'utilisation de certains inhibiteurs,
 - pour la caractérisation fonctionnelle des enzymes recombinants qui sont purifiés en présence de détergent et dont la reconstitution en protéoliposomes est souvent malaisée voire délétère.



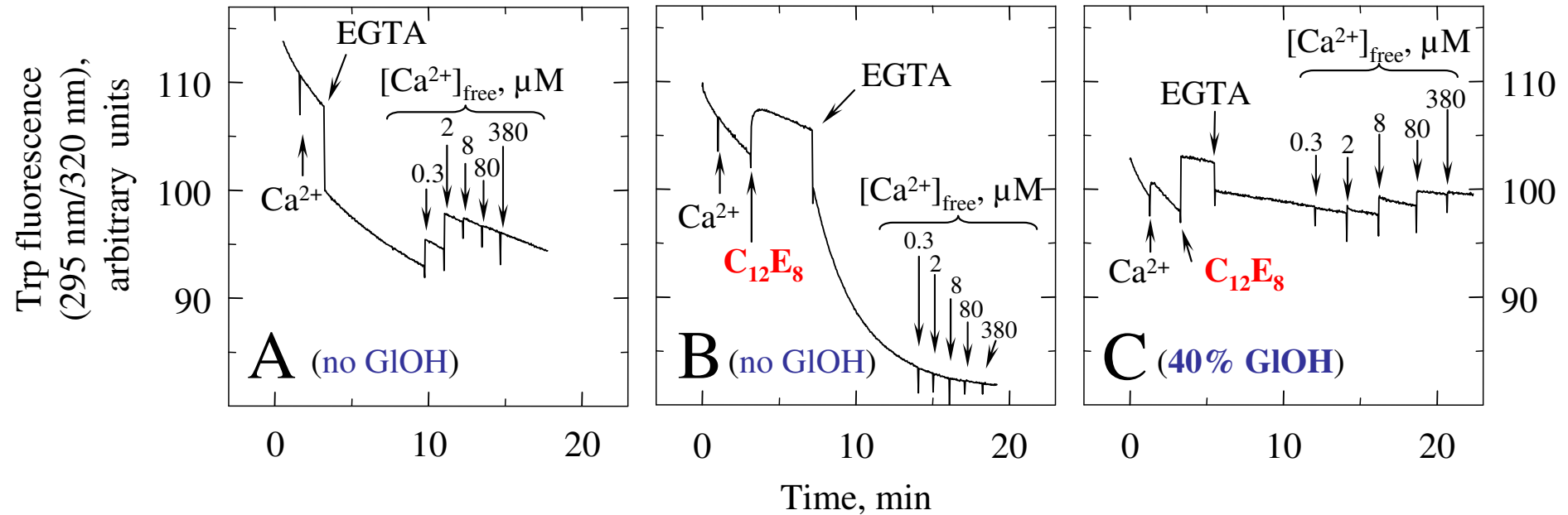
+ 30% glycérol

sans glycérol

Le glycérol stabilise l'ATPase- Ca^{2+} solubilisée en présence (Møller *et al.* (1980) ; Murphy et al. (1982)) ou en absence de calcium (Vilsen et al. (1987), ci-contre)

20 mM Tes pH 7.0, 100 mM NaCl, 20°C,
0.09 mg.ml⁻¹ Serca1a, 2 mg.ml⁻¹ C₁₂E₈

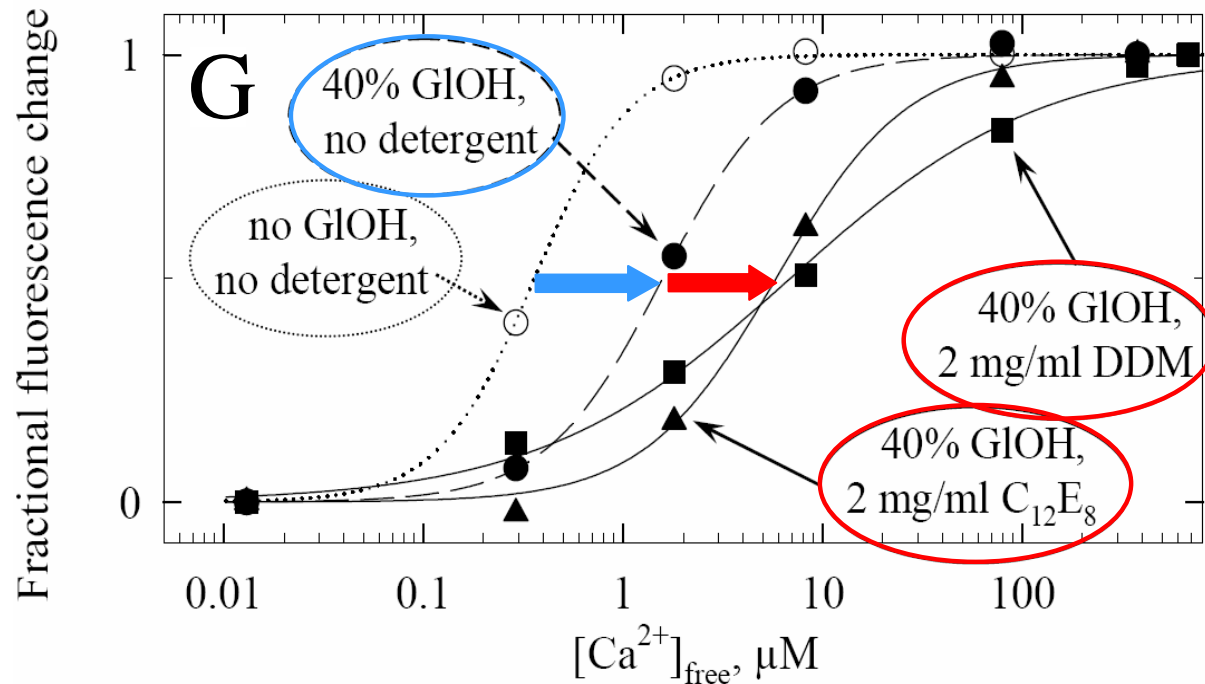
Utilisation du glycérol pour étudier les changements de fluorescence intrinsèque de la protéine Serca1a *en présence de détergent*



- **En absence de Ca^{2+} , l'ATPase solubilisée est dénaturée** rapidement et perd sa capacité à fixer le Ca^{2+} .
- **Le glycérol protège l'ATPase de la dénaturation induite par les détergents**, rendant possible la détermination de l'affinité pour le calcium de l'ATPase solubilisée (*ici à pH 7*).

C_{12}E_8 = octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether

Utilisation du glycérol pour étudier les changements de fluorescence intrinsèque de la protéine Serca1a *en présence de détergent*

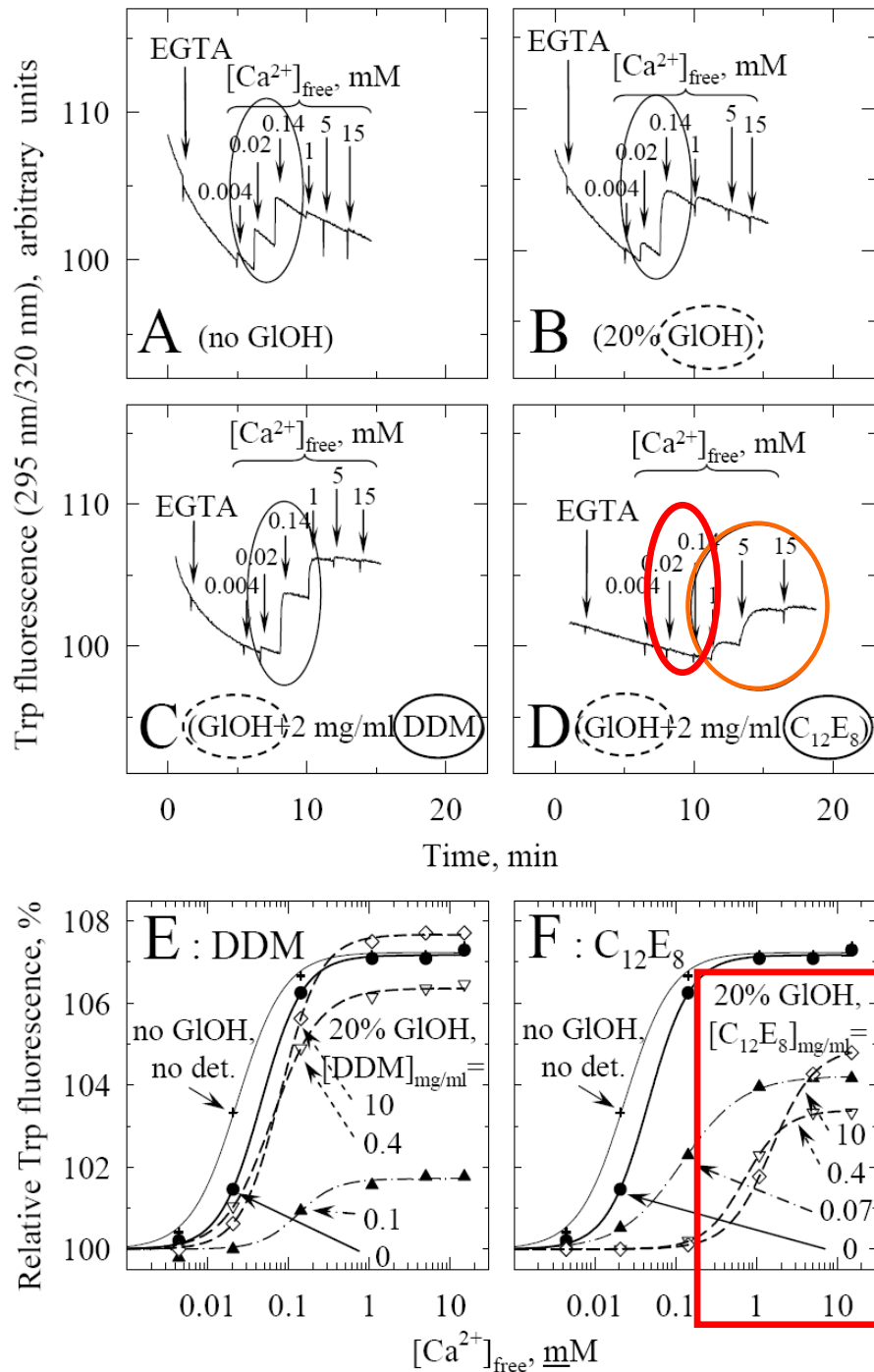


- **Le glycérol**, seul, déplace l'affinité apparente pour le calcium (de Meis *et al.* (1980)).
- A pH 7, les deux détergents testés ont des effets différents sur la fixation de calcium : **le DDM** et **le $C_{12}E_8$** réduisent tous deux l'affinité de l'enzyme pour le calcium, mais **le DDM réduit aussi la coopérativité apparente**.

$C_{12}E_8$ = octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether
DDM = dodecyl maltoside

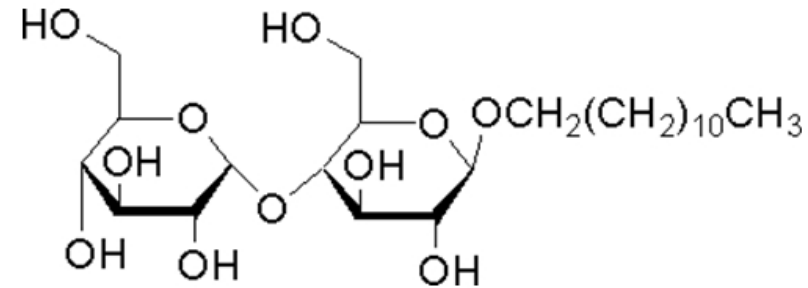
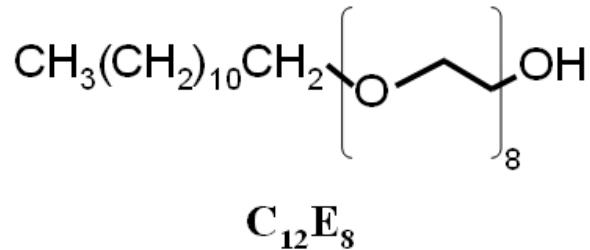
A pH 6, le C₁₂E₈ mais pas le DDM, réduit encore plus sévèrement l'affinité pour le calcium

- Comme à pH 7, l'utilisation du DDM réduit l'affinité pour le calcium mais cette fois sans perte de coopérativité.
- En revanche, **la solubilisation par le C₁₂E₈ entraîne une très importante augmentation du Ca_{1/2}**, qui devient millimolaire.
- Un ralentissement de la transition E2 > E1 contribue sans doute à la mauvaise affinité.



➤ *Est-ce pour cela qu'il faut mettre la protéine en présence de 10-20 mM de Ca²⁺ pour obtenir des cristaux des formes saturées en Ca²⁺ ?*

Pourquoi ces deux détergents influencent-ils différemment la catalyse enzymatique ?



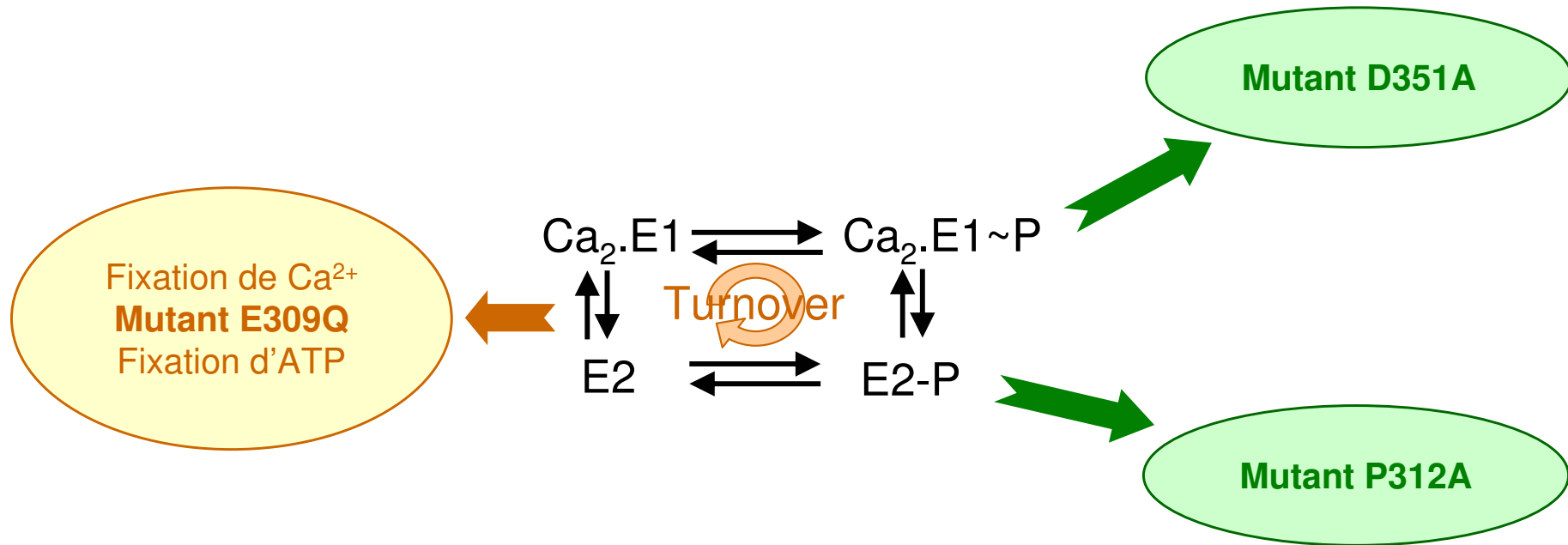
	C_{12}E_8	DDM
MW, Da	539	510
Chaîne aliphatique	C_{12}	C_{12}
CMC, mM	0,09	0,17
N_{agg} , molécules	90-120	80-150
Tête polaire	Octaéthylène glycol	Maltose

- Importance de la nature de la tête polaire : interaction avec la protéine ?
 - Elimination différentielle de co-facteurs : lipides ? protéines accessoires ?
- *Influence possible de ces détergents sur la cristallisation ?*

Etude des propriétés de Serca1a stabilisée en *présence de détergent*, native ou recombinante (sauvage ou mutée)

Effets protecteurs du glycérol
vis-à-vis de la dénaturation induite par la solubilisation
en absence de Ca^{2+}

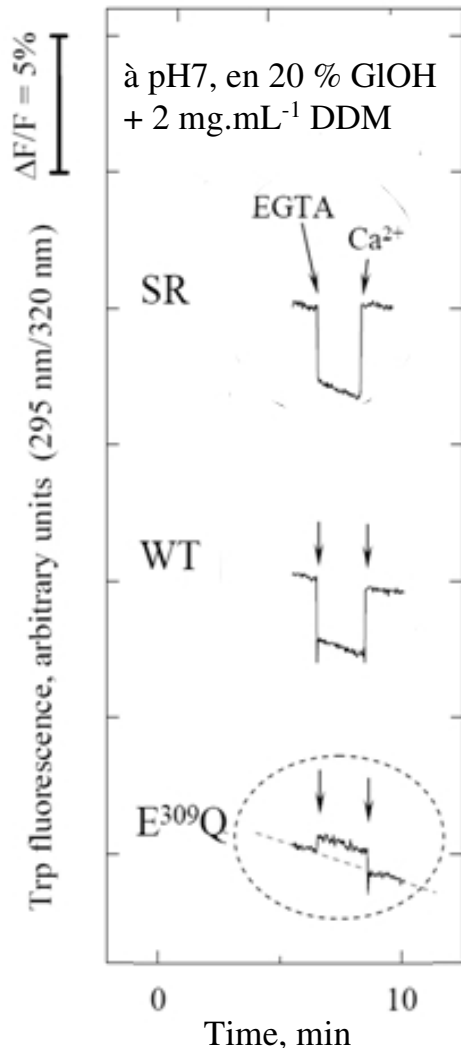
**Application de ces nouvelles conditions expérimentales à la
caractérisation fonctionnelle de quelques mutants**



Montigny *et al.* (2008) Biochemistry

Marchand *et al.* (2008) J.Biol. Chem

Caractérisation fonctionnelle d'une ATPase recombinante solubilisée, sauvage ou mutée : exemple de la fixation de calcium chez le mutant E309Q



- Les signaux EGTA/Ca²⁺ observés sont de même amplitude pour l'enzyme recombinant sauvage (WT) et l'enzyme natif (SR) soit $\Delta F/F \sim 5\%$ (versus 1-2% pour les enzymes reconstitués, qui se sont partiellement dénaturés).
- La fixation de calcium au « site I » de transport uniquement donne lieu à un signal négatif, *i.e.* de signe opposé à celui correspondant à la fixation de calcium aux deux sites.
 - Différenciation des deux sites de transport à l'aide des changements de fluorescence des tryptophanes ! (Champeil *et al.* (1997))

Conclusion générale

et

perspectives

Influence du domaine membranaire de l'ATPase-Ca²⁺ sur les structures cristallines

- Biais possibles induits par les composants du domaine transmembranaire : inhibiteurs membranaires, détergents, lipides eux-mêmes.
 - Mais cristallisation dans une phase « physiologique » évidemment impossible (résolution faible, de plusieurs dizaines d'angströms)...
- Coupler le plus souvent possible cristallisation
et caractérisation fonctionnelle ☺ ?

Bertrand ARNOU (Post-Doc) : Cristallisation

Delphine CARDI (PhD) & Maëlle CARRAZ (Post-Doc) : PfATP6

Agnès de LACROIX de LAVALETTE (Post-Doc) : Serca3a

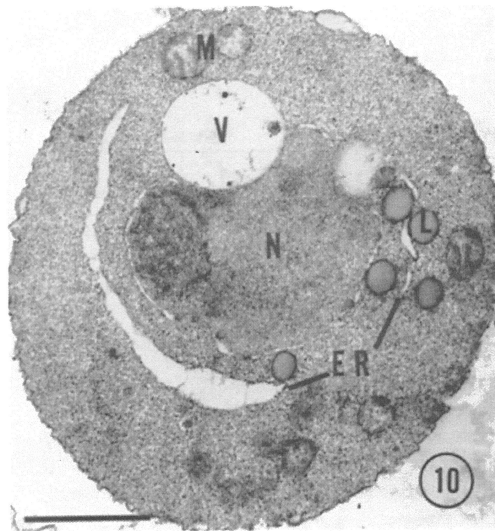
Christine JAXEL

Guillaume LENOIR

Estelle MARCHAL

Marc le MAIRE

Martin PICARD



Collaborations

Chikashi TOYOSHIMA

Université de Tokyo, Japon

Cristallographie

Jesper V. MØLLER et Poul NISSEN

Université d'Aarhus, Danemark

Tests fonctionnels et cristallographie

David McINTOSH

Université de Cape Town, Afrique du Sud

Fluorescence de l'ATPase marquée au FITC

...et la levure qui garde le sourire en toutes circonstances 😊

