



**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

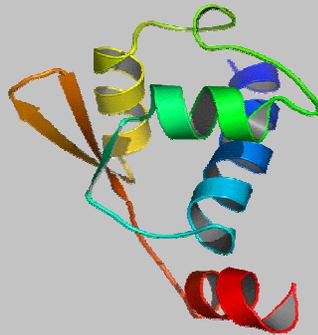
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

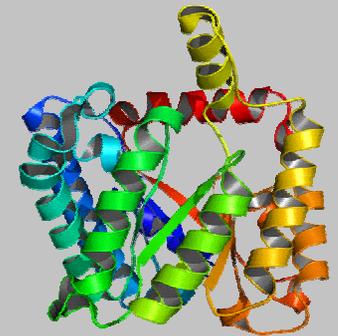
&

# 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

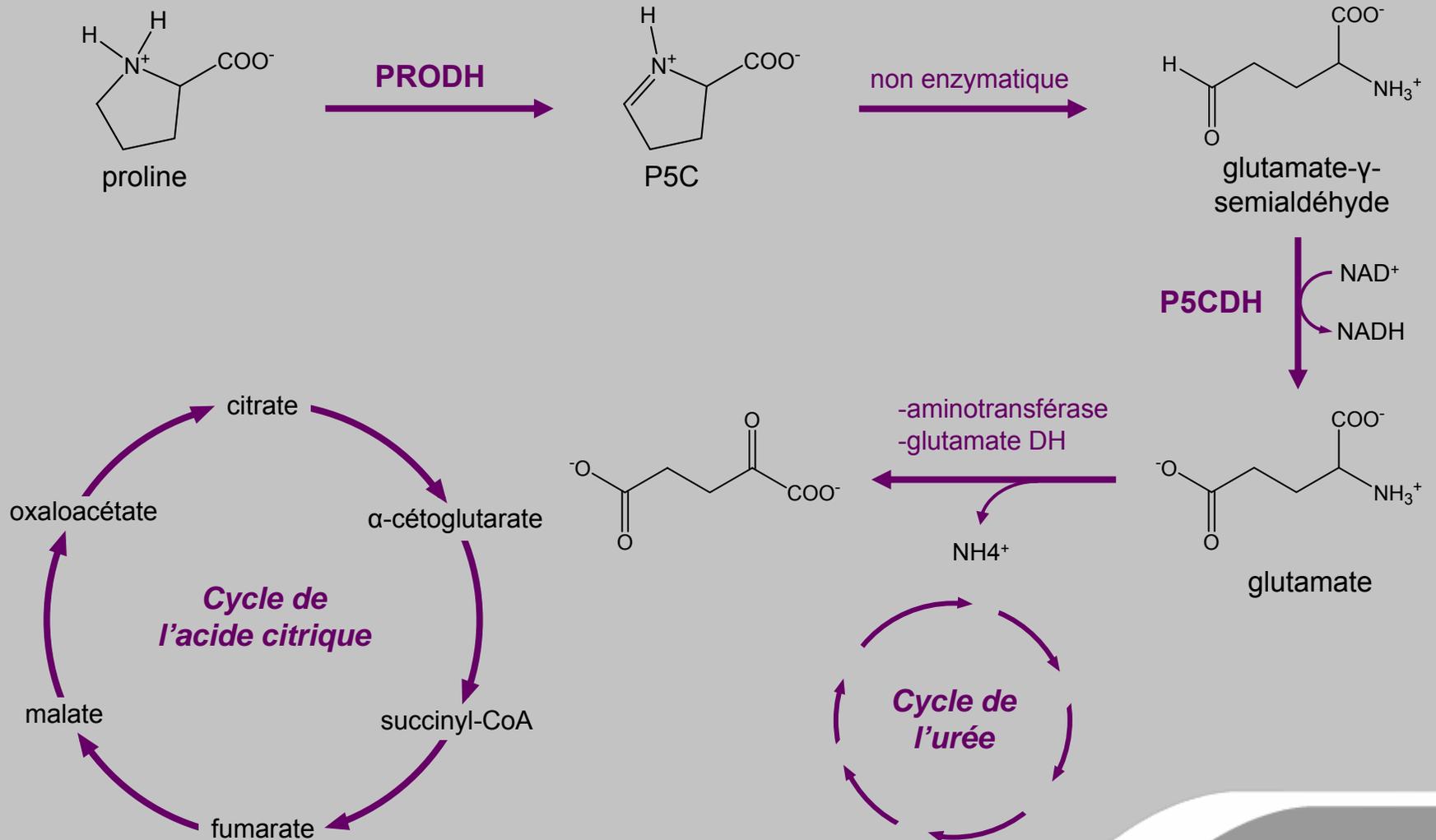
Expression des protéines PRODH sauvage et mature

Production de 4 domaines PRODH

Conclusions

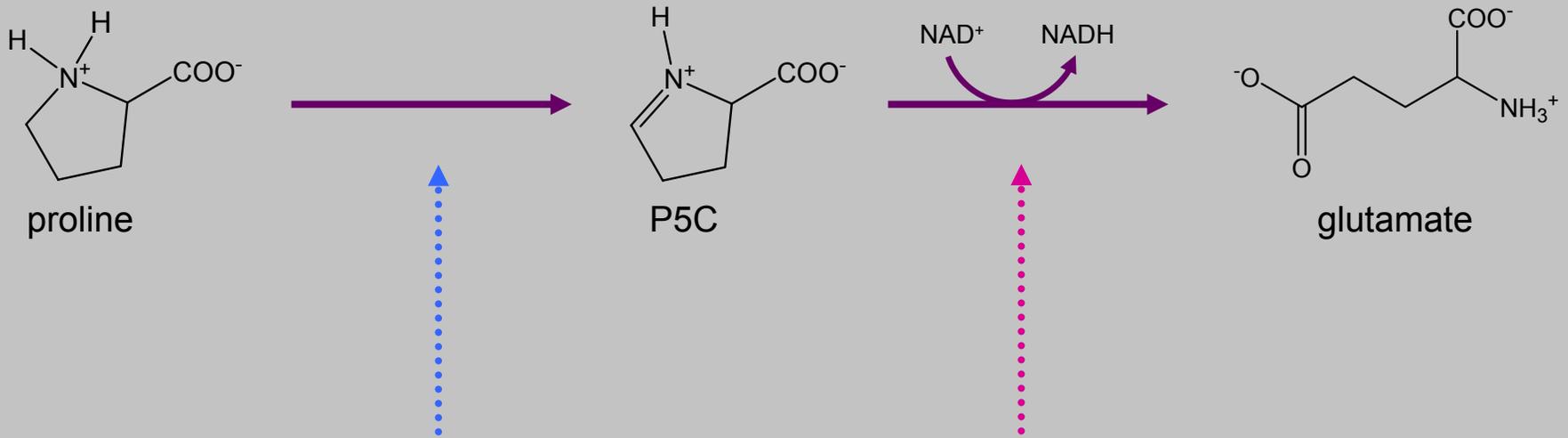
# Contexte biologique

## Le catabolisme de la proline



# Contexte biologique

## Le catabolisme de la proline



22 **PRODH**

2 **P5CDH**

*humain*



*E.coli*

## 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  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$

→ 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



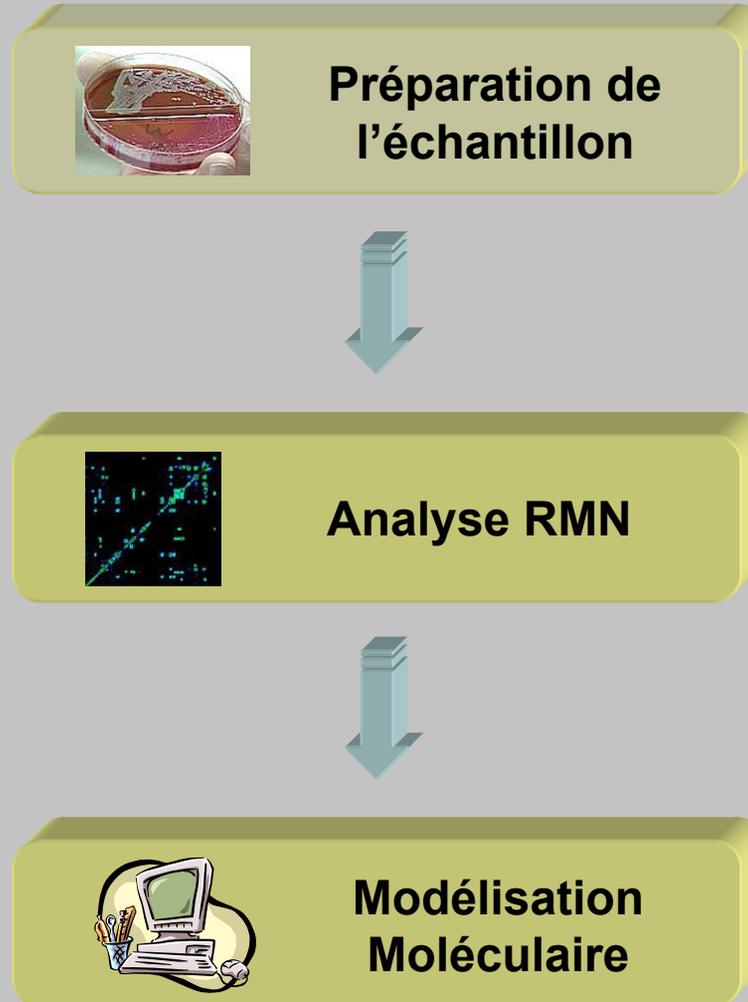
bases moléculaires de  
l'hyperprolinémie de type I



caractérisation  
de ses partenaires

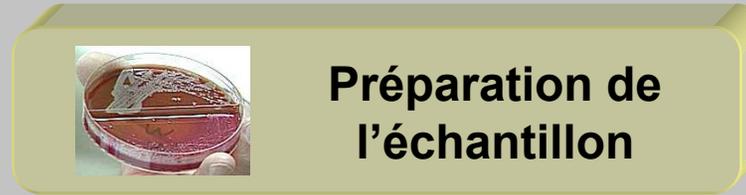
# Contexte biologique

## 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~~

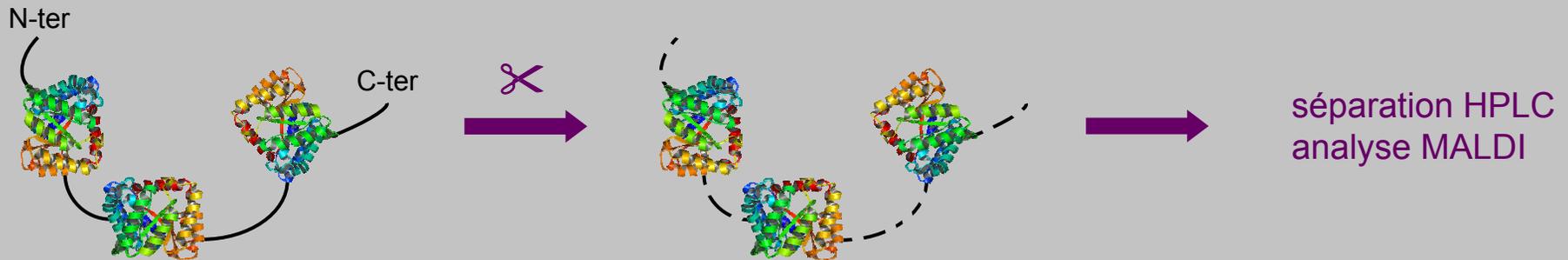


Recherche des domaines structuraux

# 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

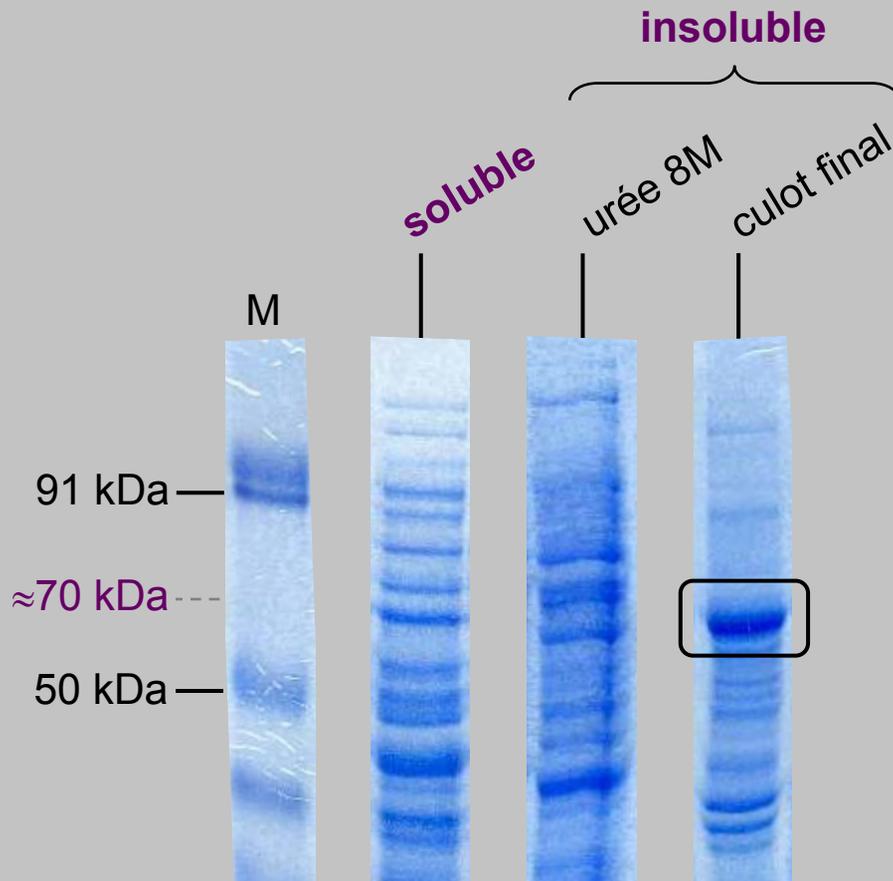
Expression des protéines PRODH sauvage et mature

Production de 4 domaines PRODH

Conclusions

# Expression de PRODH sauvage et mature

## Expression de PRODH sauvage

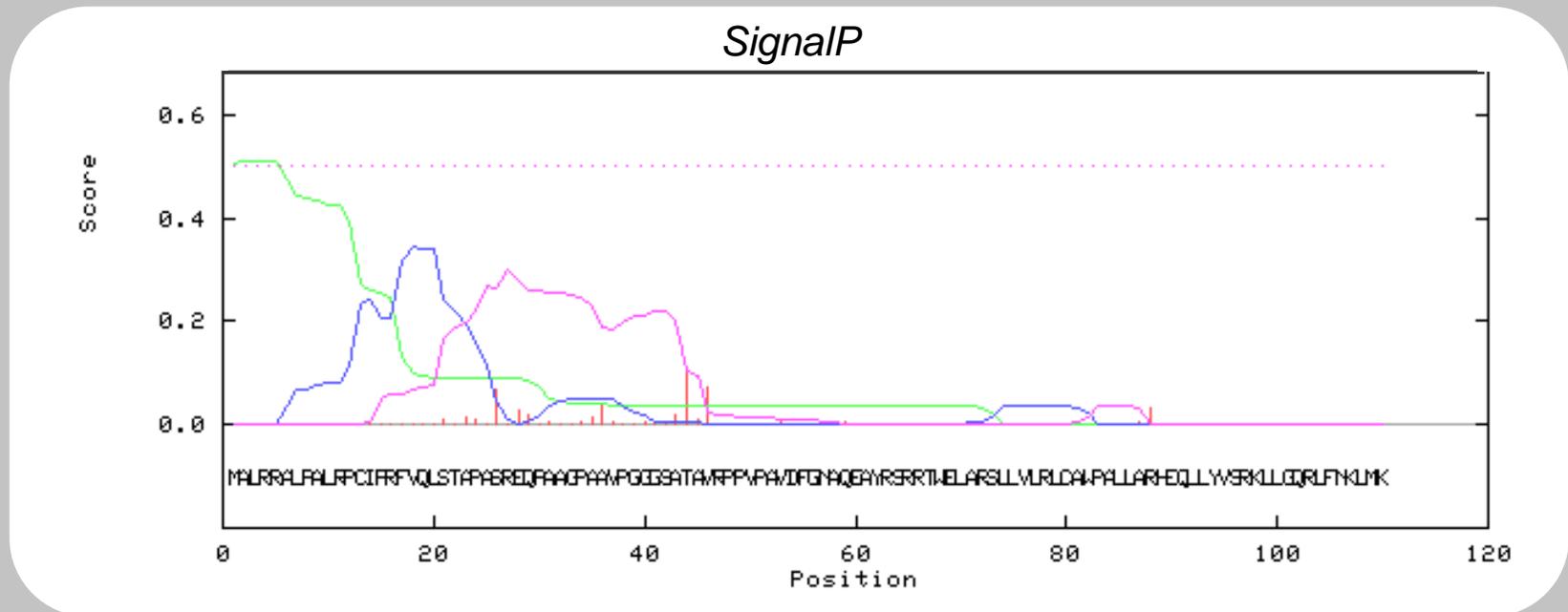


corps d'inclusion  
hydrophobie élevée

- 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

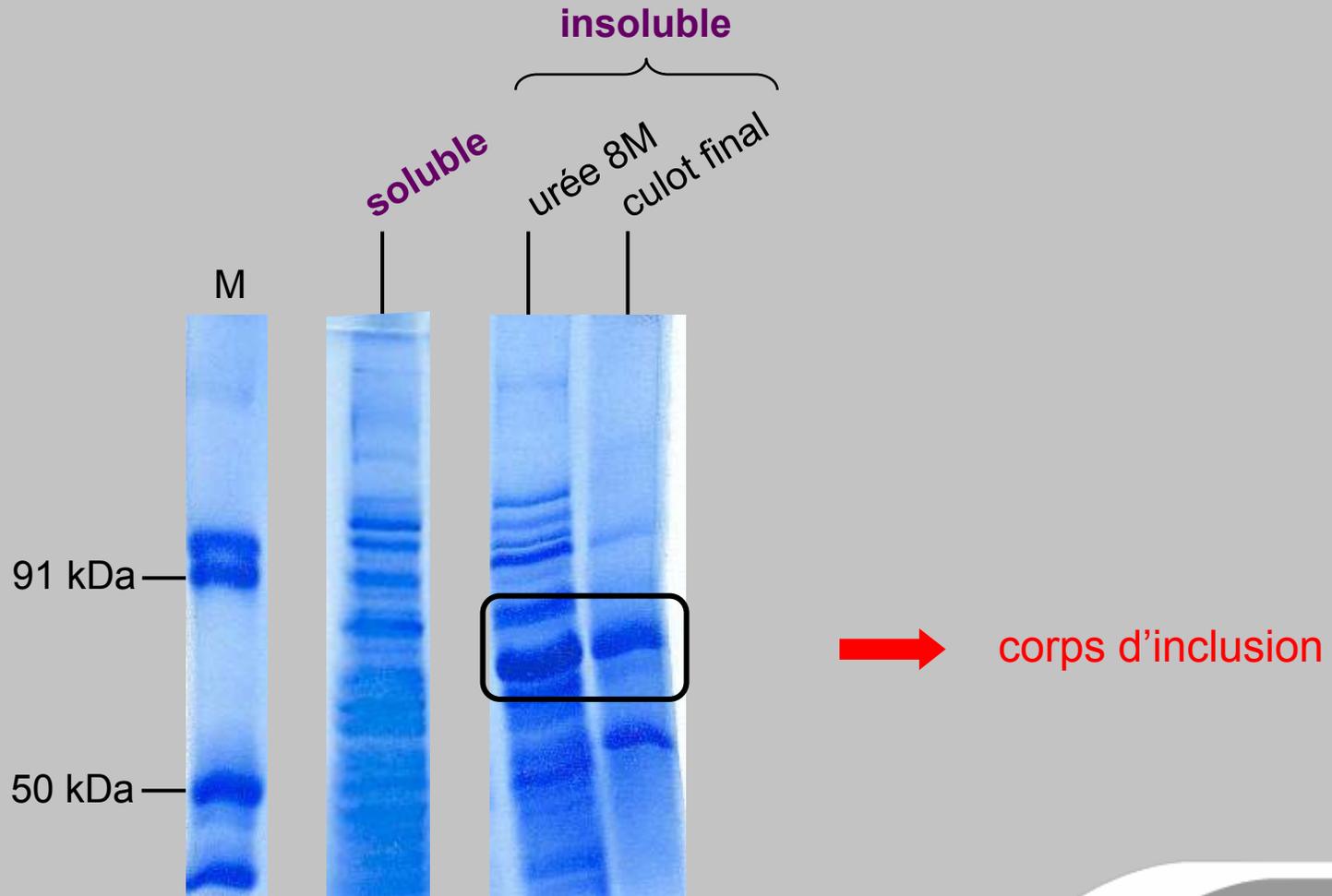


prédiction consensus : 35 résidus

➔ 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

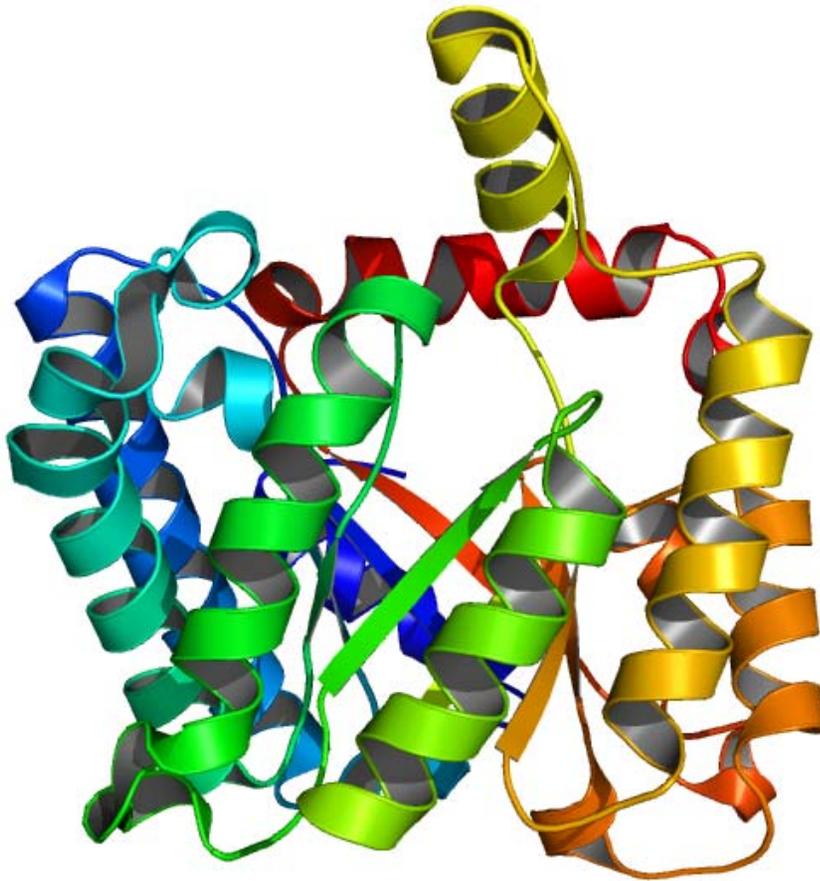
Contexte biologique

Expression des protéines PRODH sauvage et mature

**Production de 4 domaines PRODH**

Conclusions

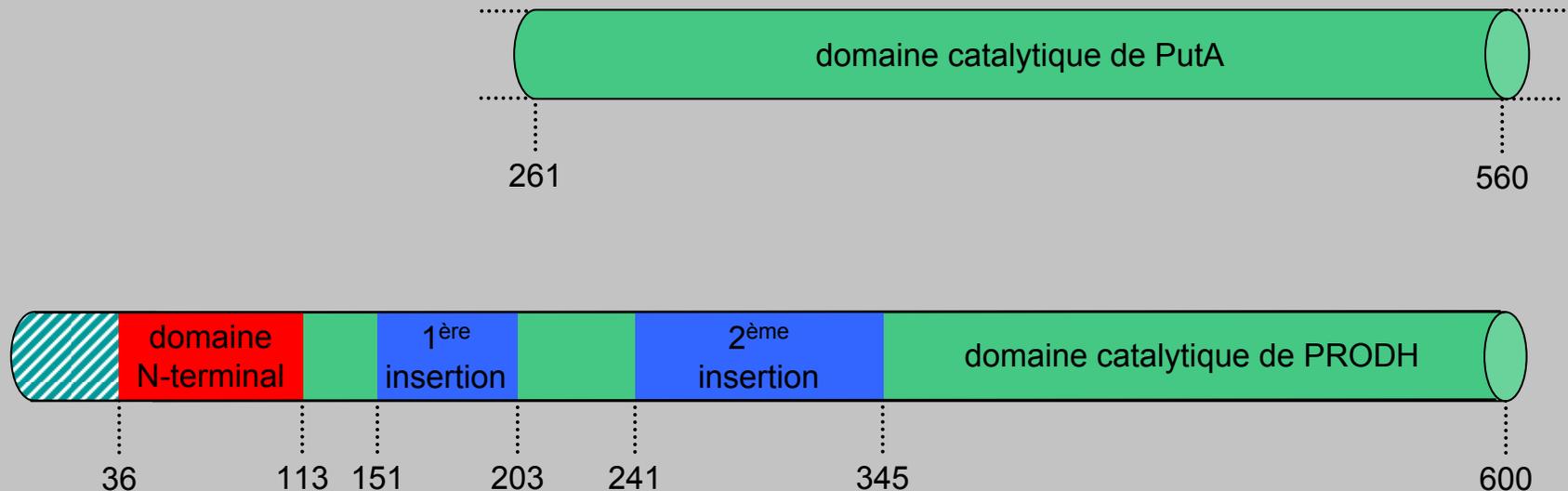
## Structure du domaine catalytique de PutA



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

## Analyse bio-informatique : organisation de PRODH

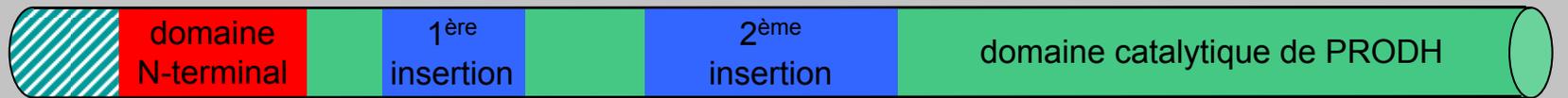
- report de la structure secondaire de PutA sur l'alignement de séquences



→ 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
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>42</b>	<b>42</b>

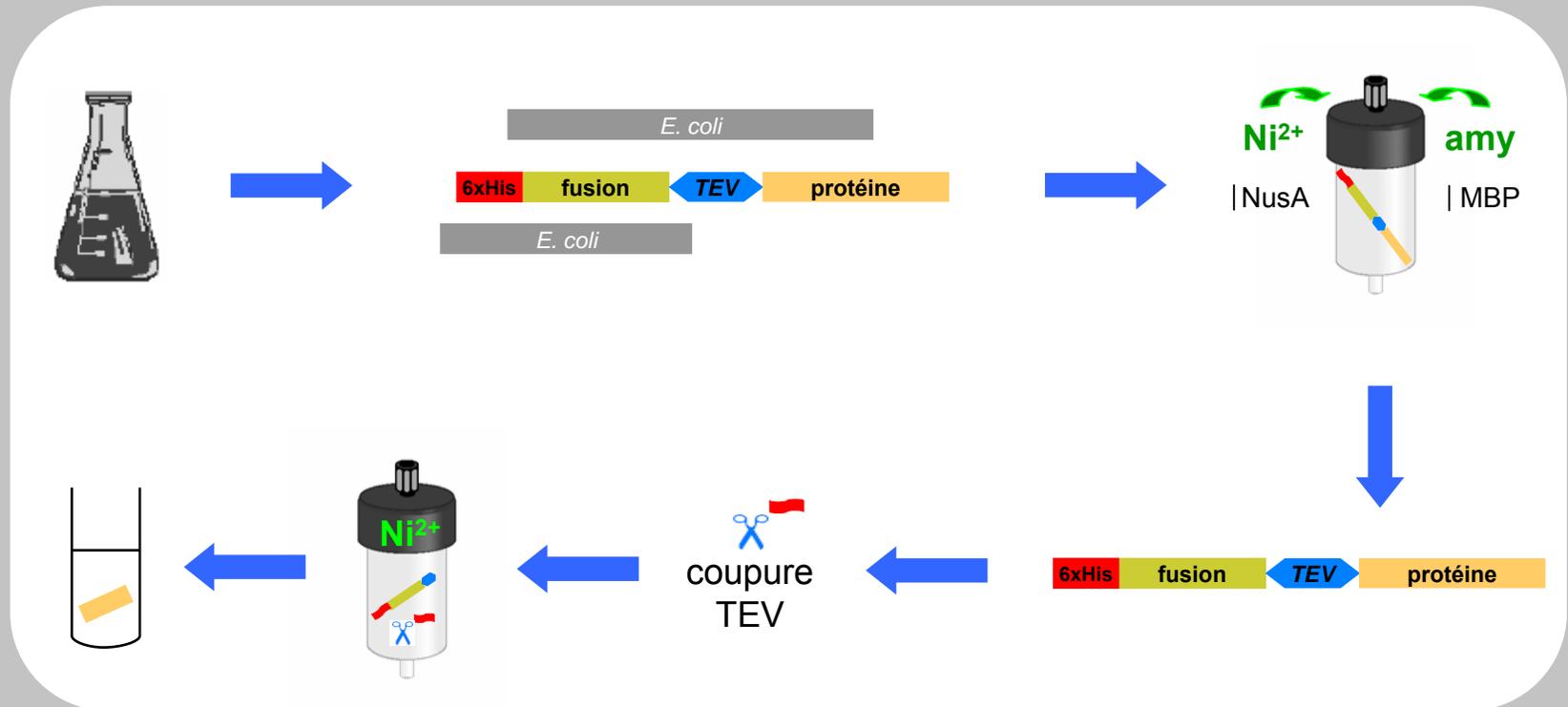
meilleure condition

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

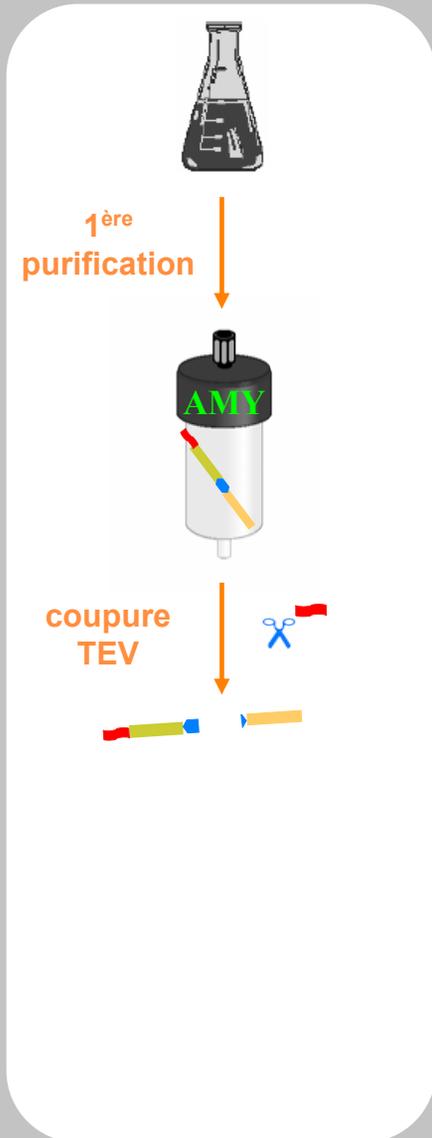
→ **expression suffisante de protéine soluble pour les 4 domaines**

# Production de 4 domaines PRODH

## Production à grande échelle et obtention des protéines cibles



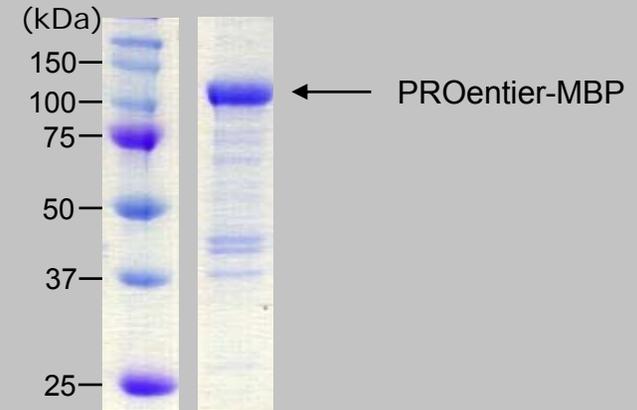
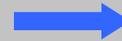
# Production de 4 domaines PRODH



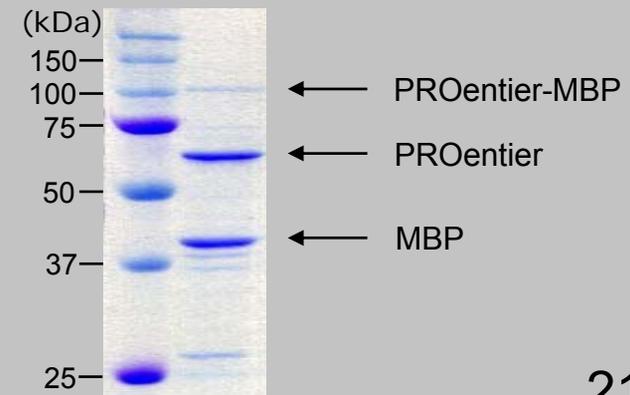
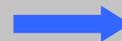
## Production de PROentier

- expression plus faible à grande échelle

- purification sur résine d'amylose :



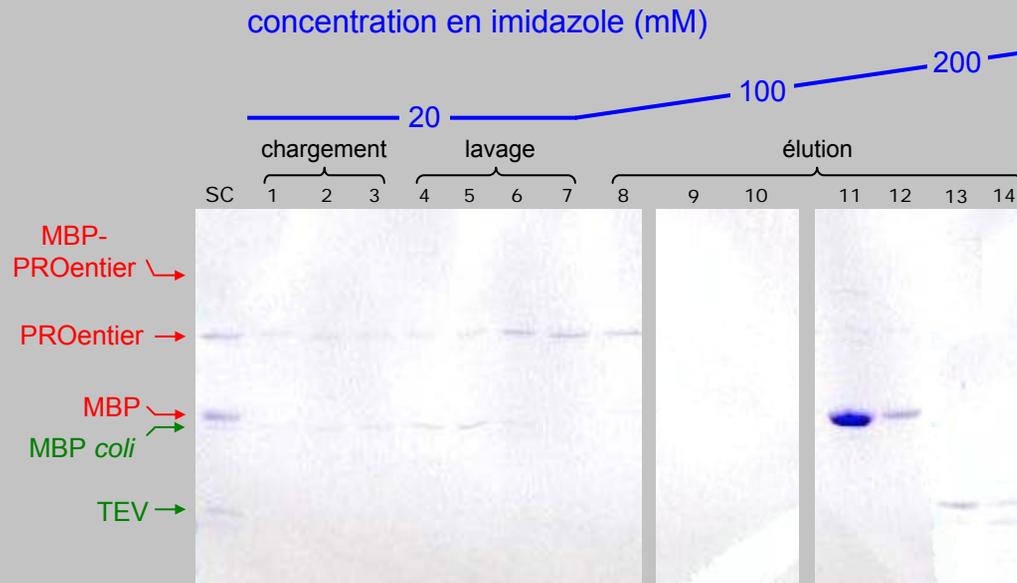
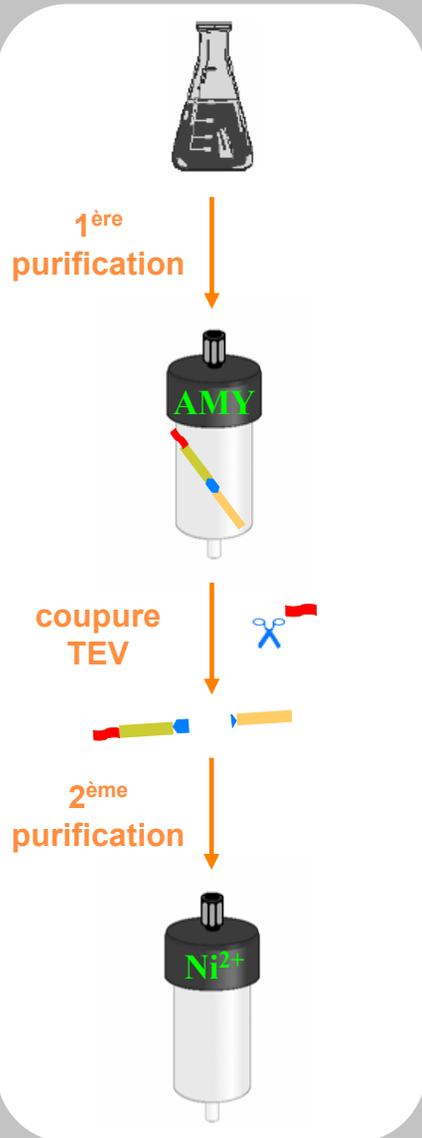
- coupure TEV en solution



# 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

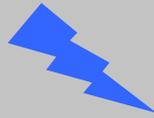
Relations structure-activité

Conclusions et perspectives

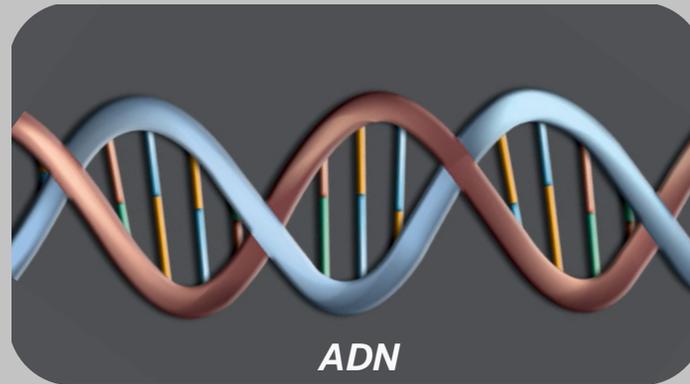
# Contexte biologique

## Les dommages de l'ADN

rayonnements  
UV...



erreurs de  
réplication



cassure simple brin



cassure double brin



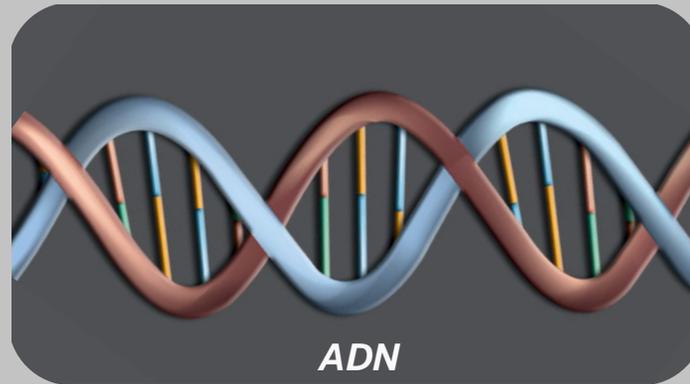
mésappariement



→ risque de cancer

# Contexte biologique

## La réponse aux dommages de l'ADN



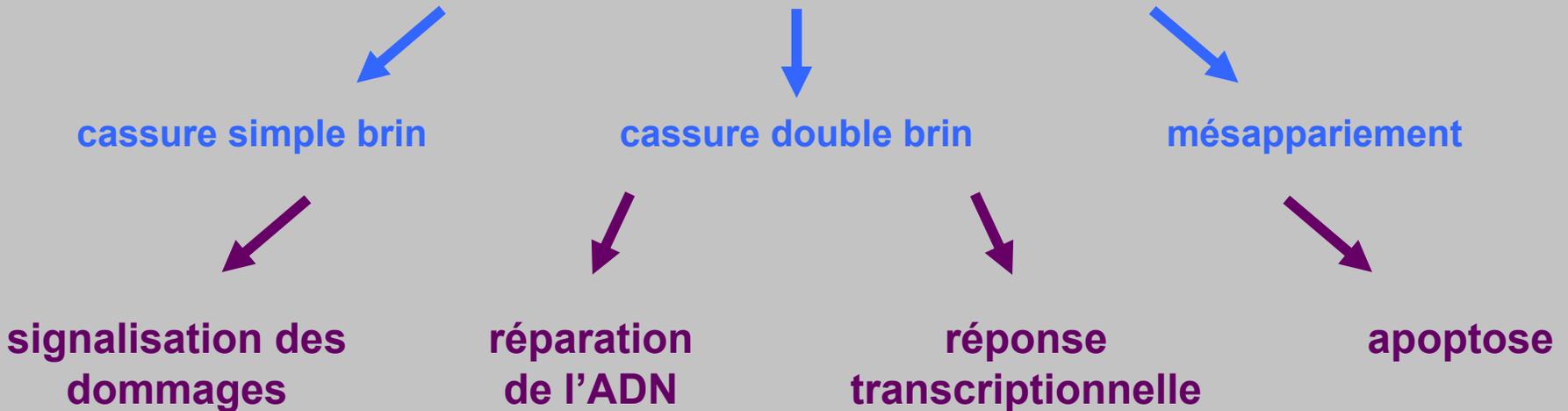
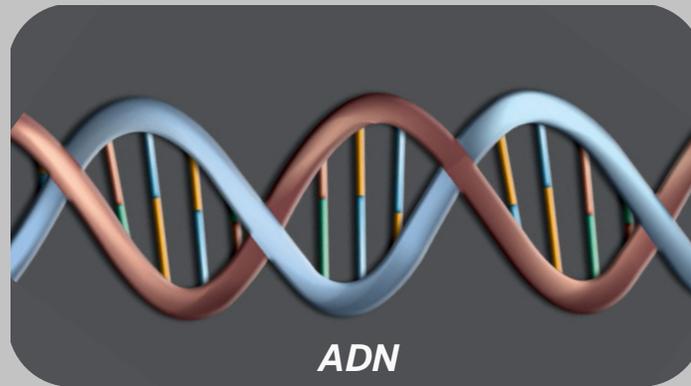
cassure simple brin

cassure double brin

mésappariement

# Contexte biologique

## La réponse aux dommages de l'ADN



→ **découverte d'une nouvelle protéine nucléaire : KIN17**

## Contexte biologique

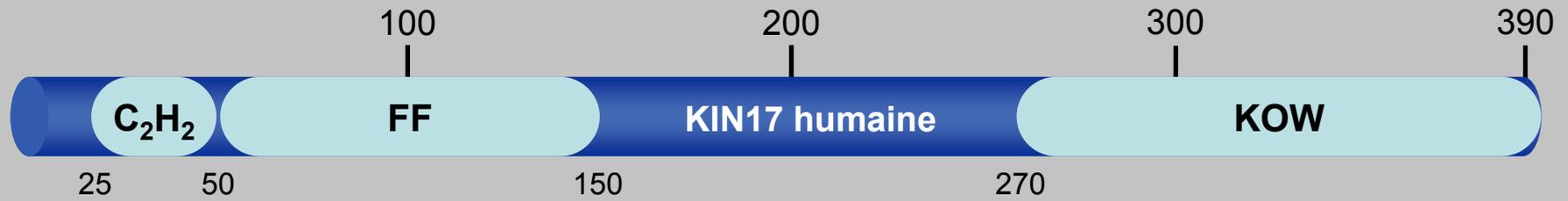
### Caractéristiques fonctionnelles de KIN17

- Distribution en « foyers intra-nucléaires »
- Régulation positive après irradiation par des rayons UV et  $\gamma$ 
  - ↳ 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

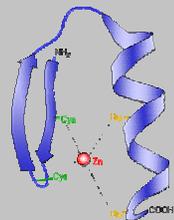
## Organisation de KIN17 humaine



liaison à l'ADN ?



« doigt de zinc »  
confirmé



liaison à des peptides  
phosphorylés ?



???



liaison à l'ARN ?

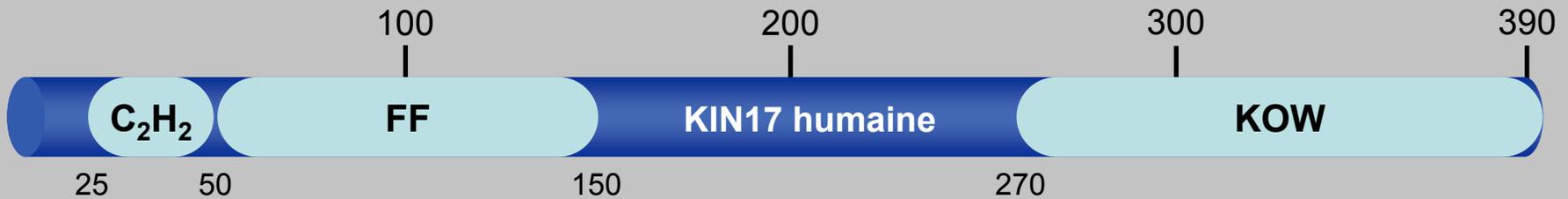


liaison à l'ARN  
confirmée

→ fonctions précises et partenaires de KIN17 ?

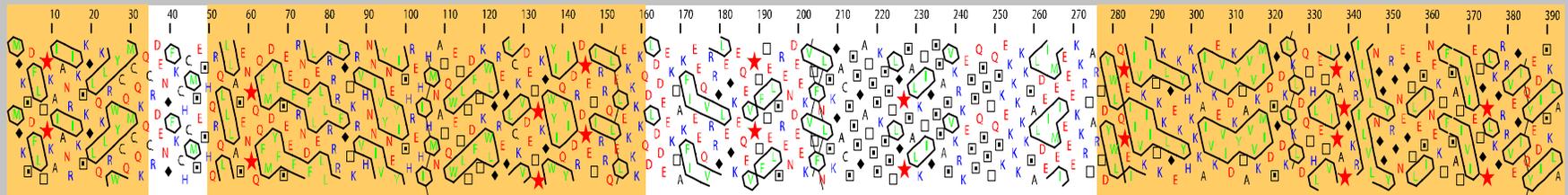
# Contexte biologique

## 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

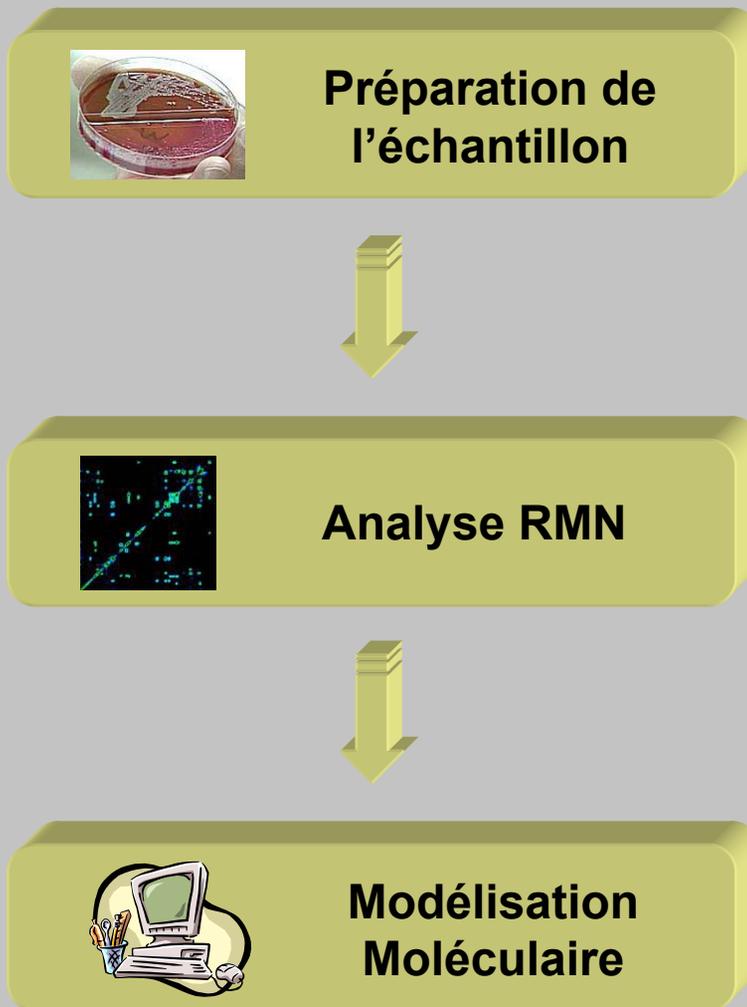
Contexte biologique

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

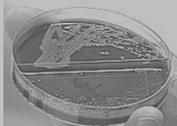


- production en milieux marqués :
  - $^{15}\text{N}$  et  $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$
  - optimisation des conditions
  - analyses préliminaires

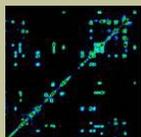


**protéine concentrée (0.7 mM),  
soluble, pure, stable, et repliée**

## Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire



Préparation de  
l'échantillon



Analyse RMN



Modélisation  
Moléculaire

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

K2 : protéine de 14 kDa



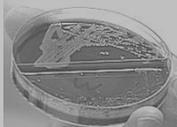
↳ expériences 3D triple résonance  
 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  en solvant  $\text{H}_2\text{O}$

↳ expériences 3D double  
résonance  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  en solvant  $\text{D}_2\text{O}$

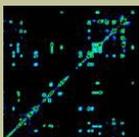


**attribution du squelette = 98%**  
**attribution des chaînes > 95%**

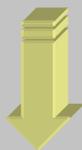
## Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire



Préparation de  
l'échantillon



Analyse RMN



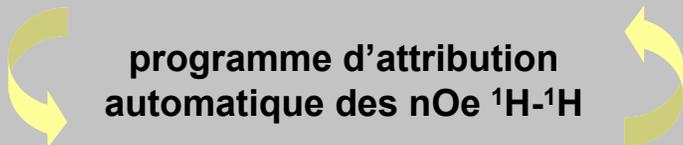
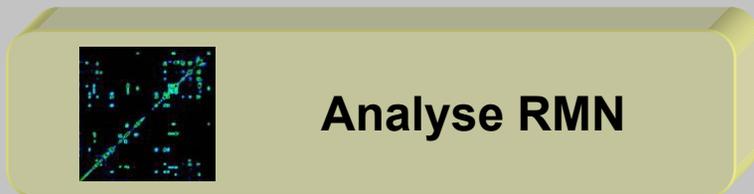
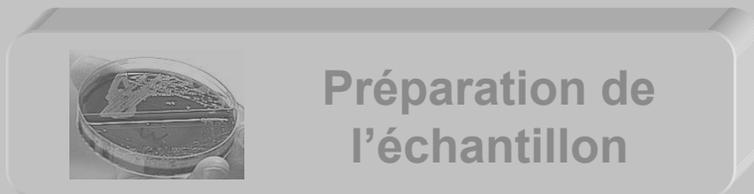
Modélisation  
Moléculaire

**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  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
- 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

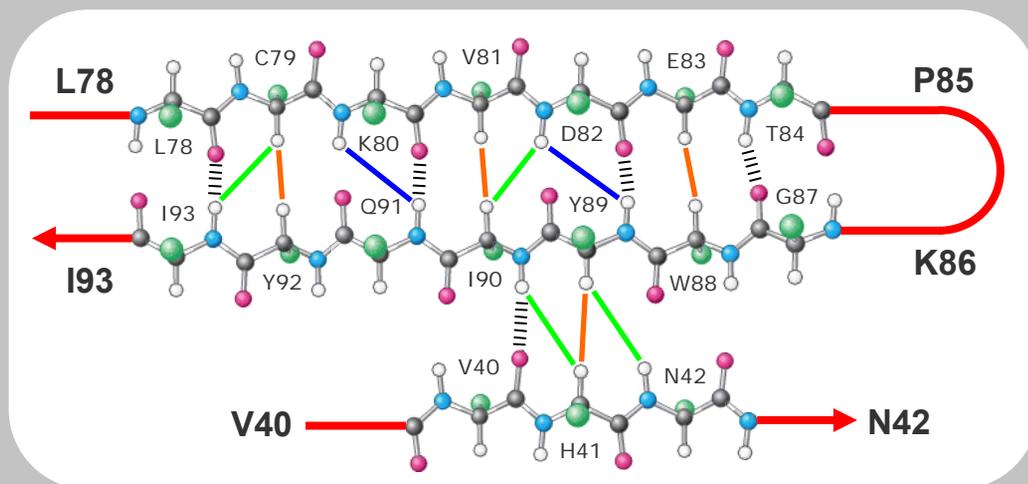
→ **préparation des données initiales**

## Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

### 1) Détermination de la topologie des feuillets $\beta$

- **paramètres structuraux RMN :**

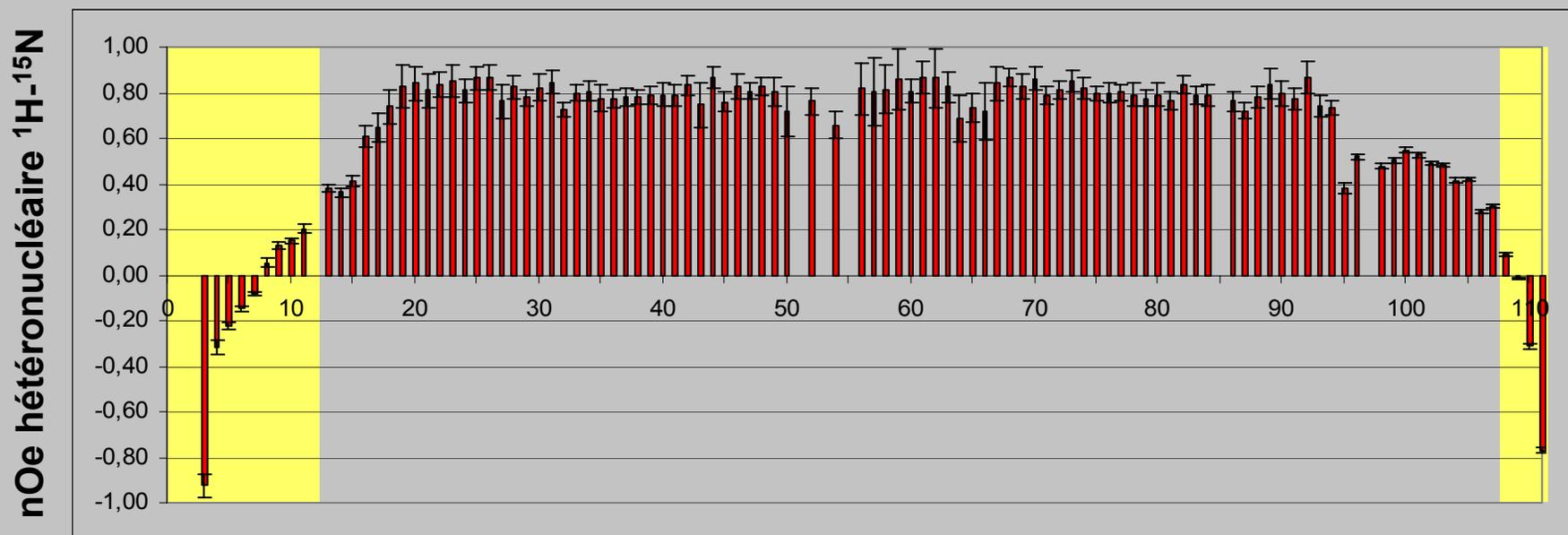
- déplacements chimiques secondaires
- nOe caractéristiques  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
- liaisons hydrogène



→ présence d'un feuillet  $\beta$  triple brin anti-parallèle

## Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

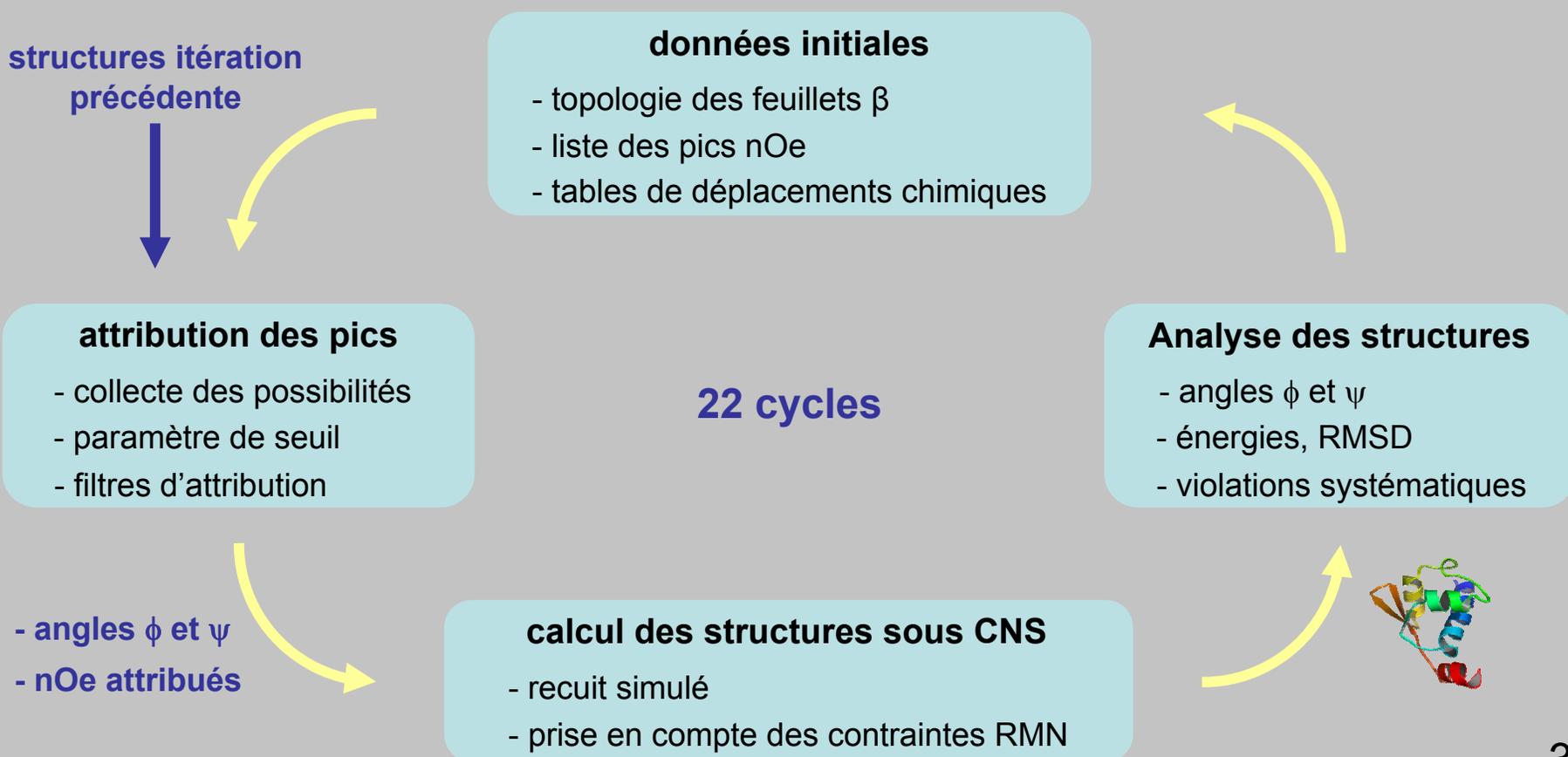
### 2) Identification des extrémités flexibles déstructurées



→ extrémités G1-P12 et K108-K111 déstructurées

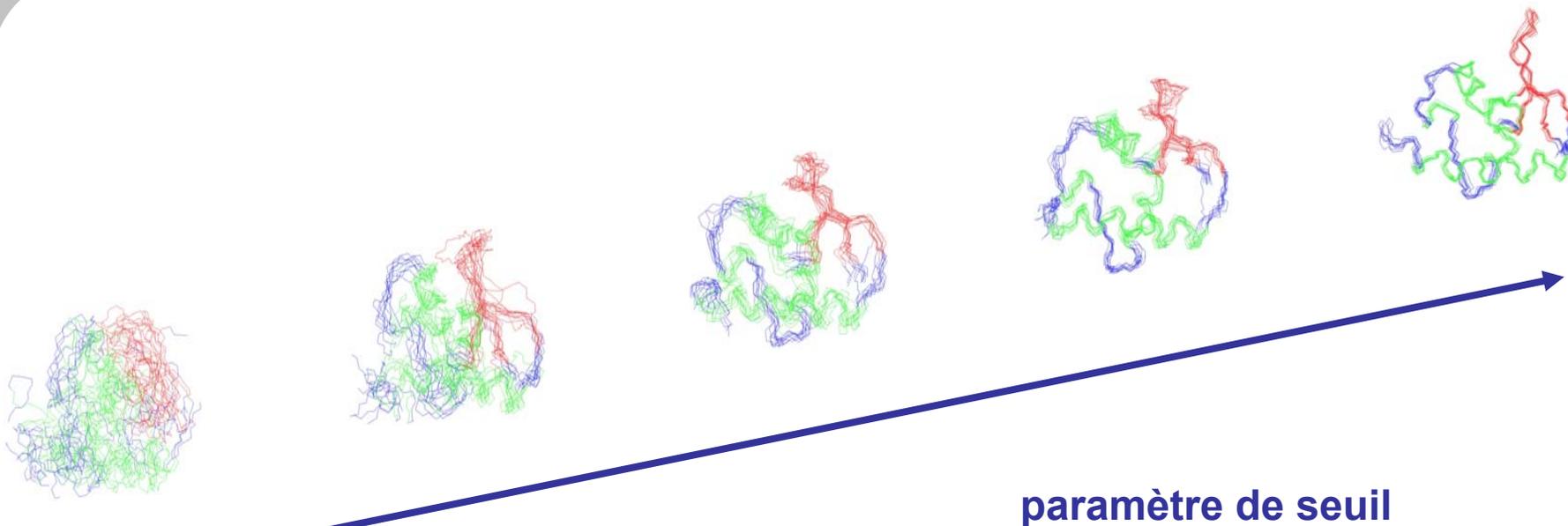
## Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

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

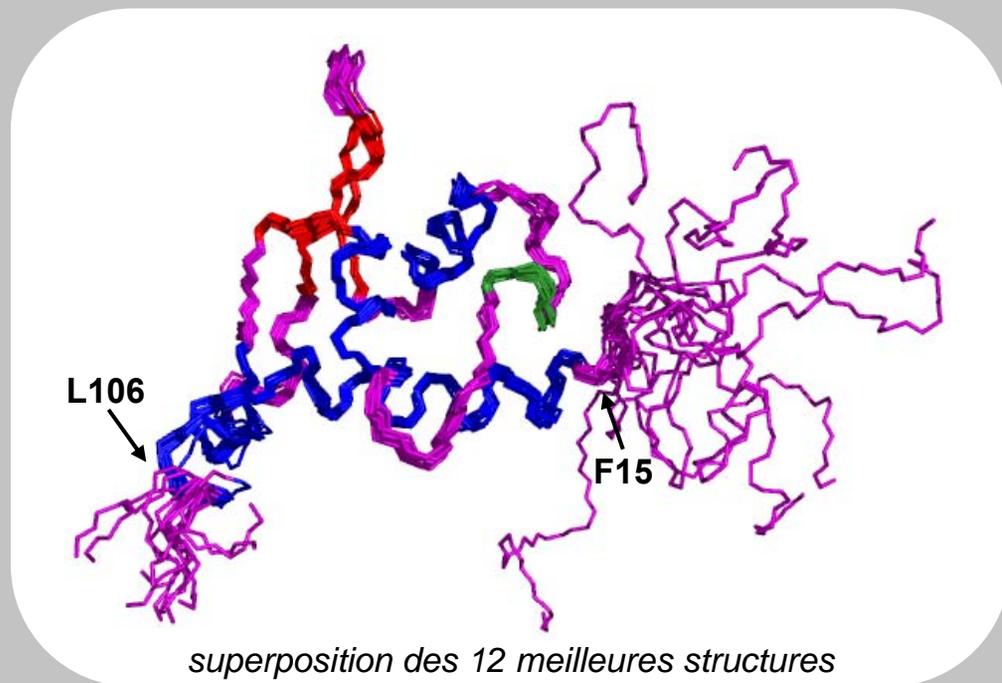


## Etude structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

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



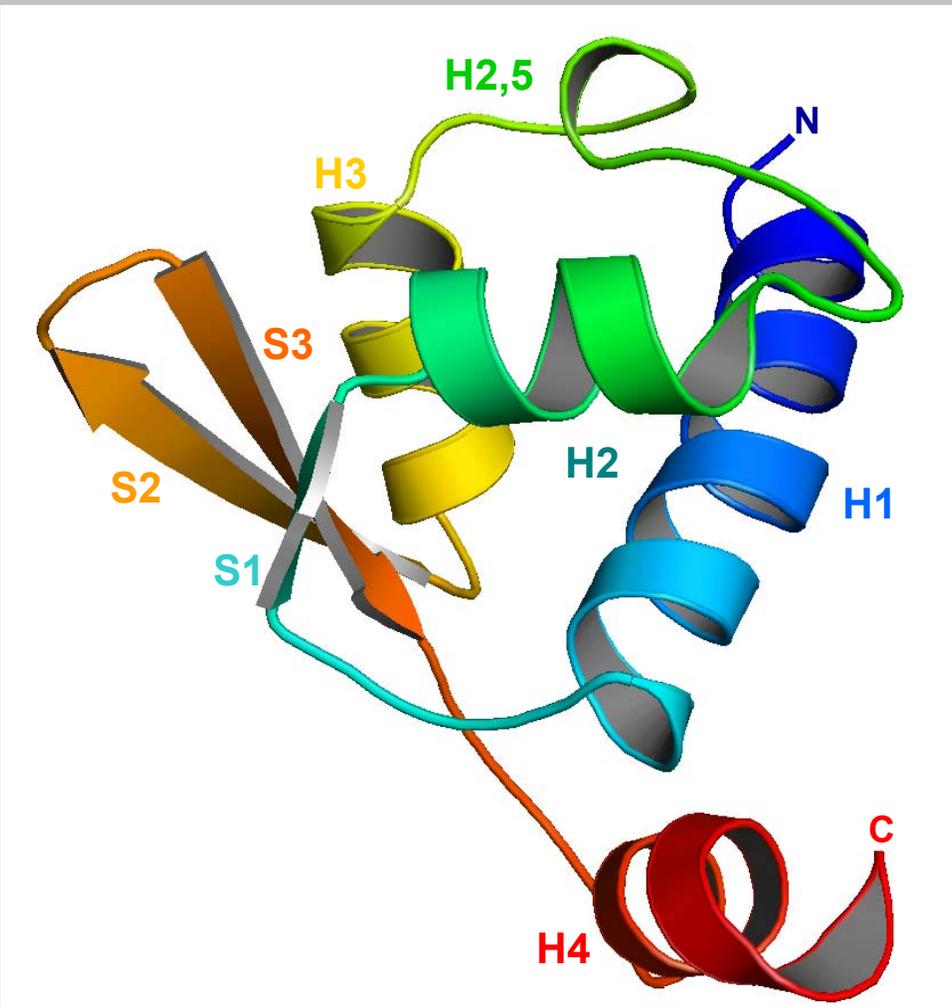
## Evaluation de la qualité des structures



- RMSD : 0.43 Å (F15-L106)
- aucune violation de distance > 0.5 Å et d'angle dièdre > 10°
- angles  $\phi$  et  $\psi$  : > 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

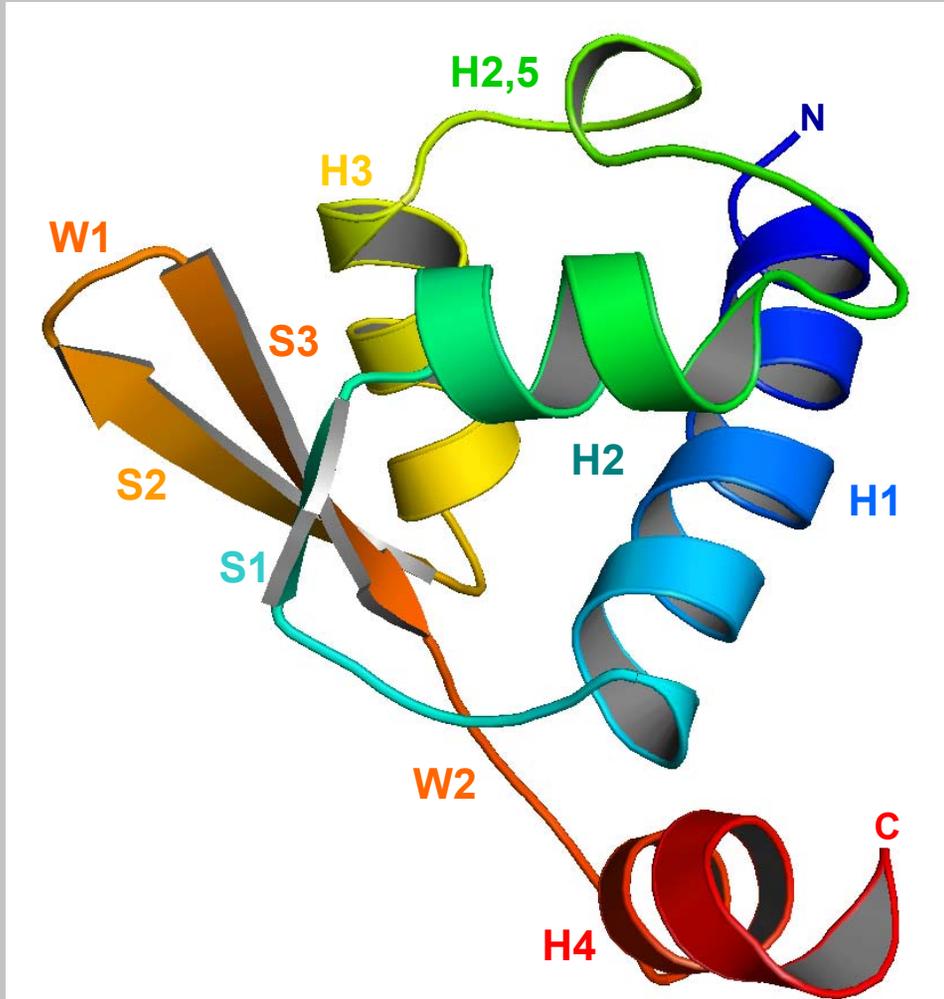
Caractérisation structurale par RMN et Modélisation Moléculaire

**Relations structure-activité**

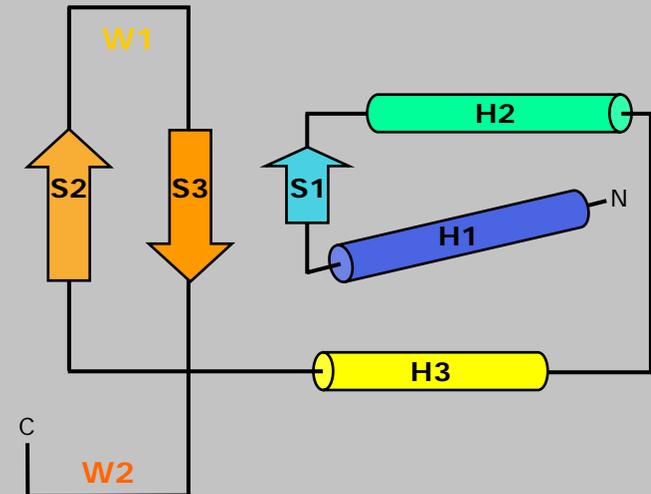
Conclusions et perspectives

# Relations structure-activité

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



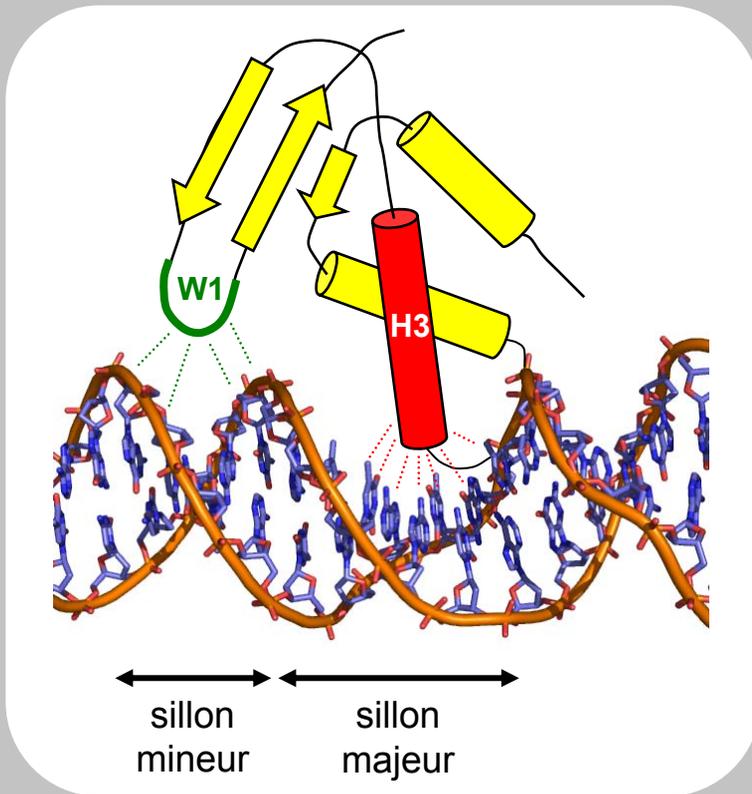
- DALI : score significatifs



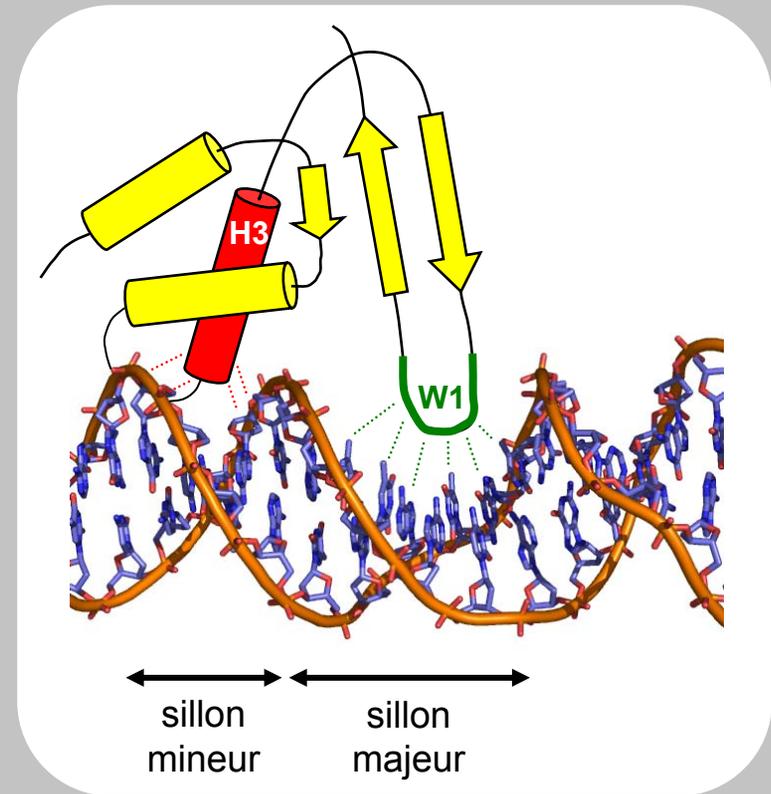
*Winged Helix* canonique

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

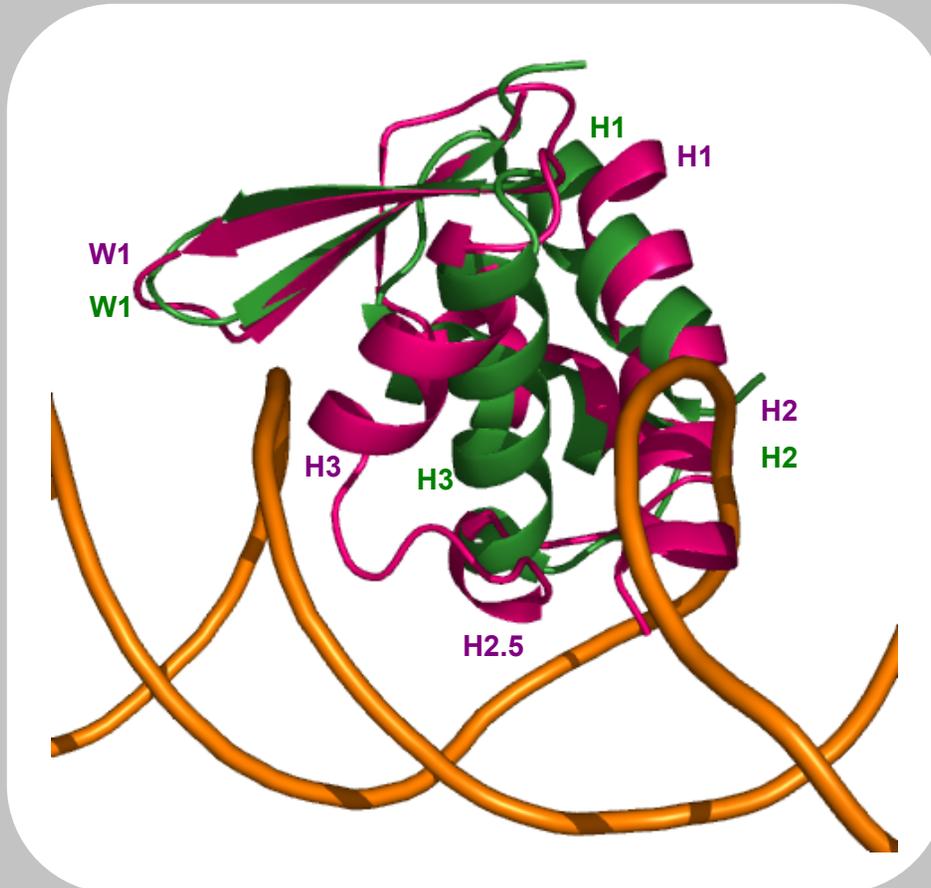
mode de reconnaissance classique



mode de reconnaissance atypique



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



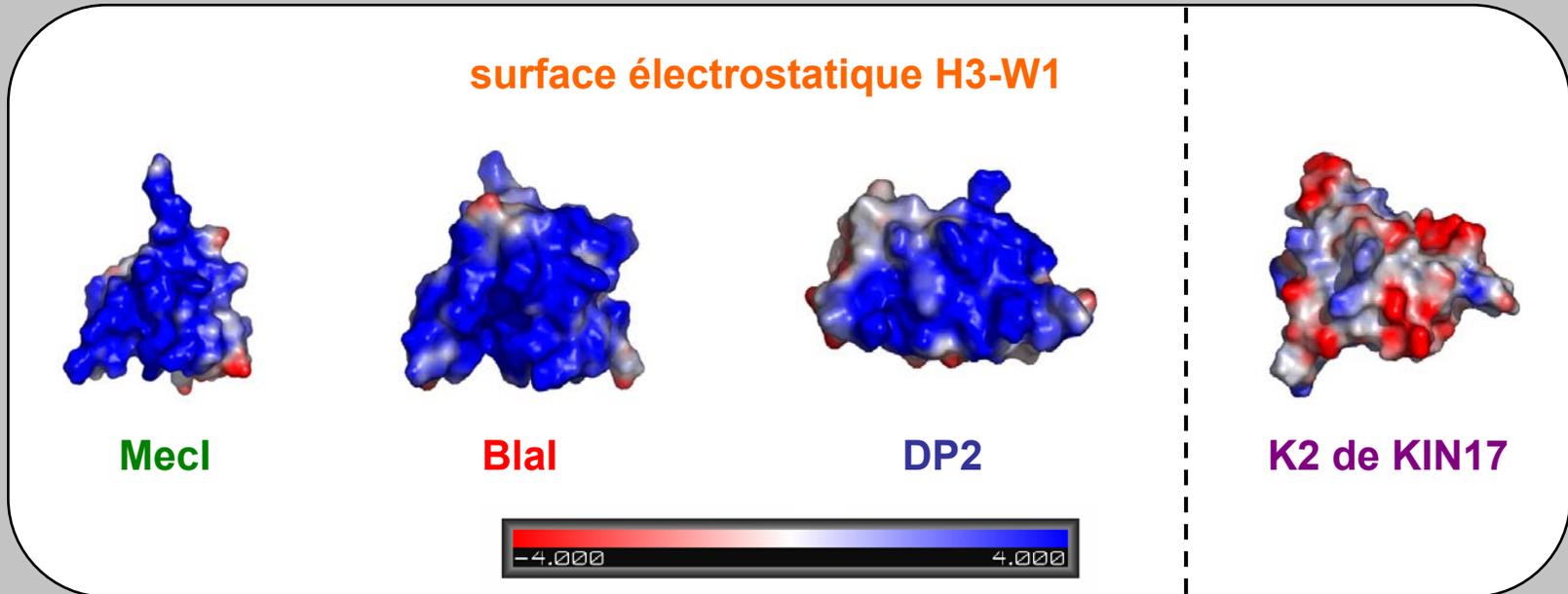
■ K2 de KIN17

■ Mecl

→ rmsd de 2.7 Å  
sur 66 carbones  $\alpha$

→ divergence structurale :  
hélice H3

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



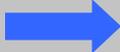
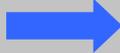
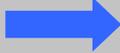
→ surface électrostatique H3-W1 de K2 peu polaire

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.

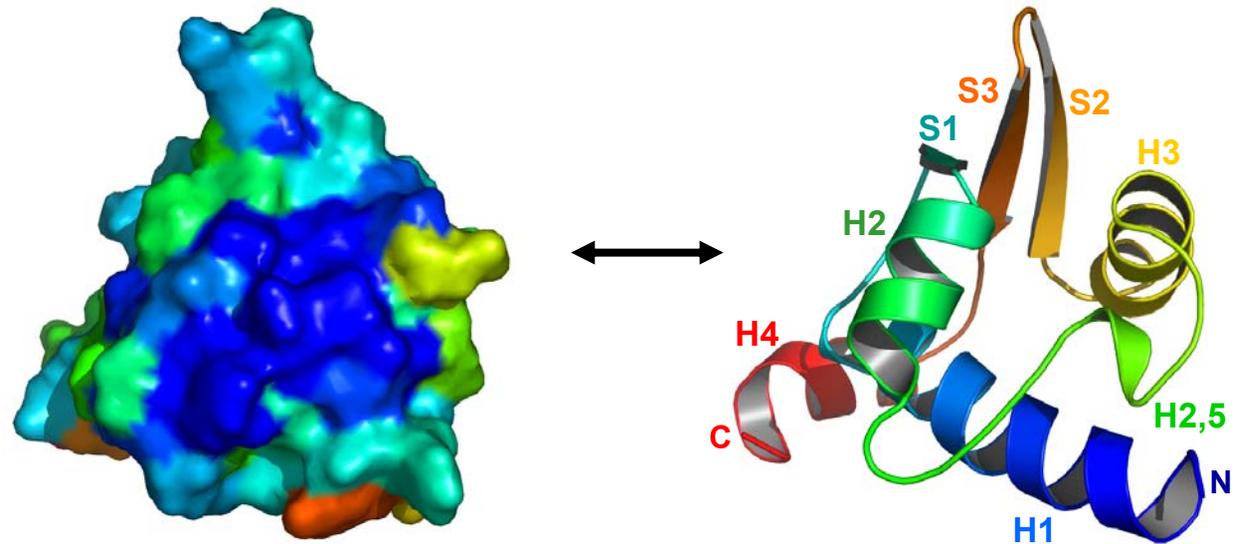
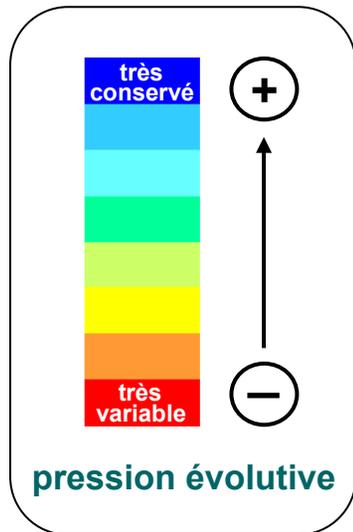
Garcia-Castellanos et al., (2004), *J Biol Chem*, **279**, 17888-17896.

## 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-SDFLTPKA	IANRIKSKGLQ	KLRWYCQMCQ	QCRDENGFK	CHCMSESHQ	RQLLLASEN	PQQFMDYF	SEEFRNDF	LELLRRRF	GTTRV...		
Plante	MGK-NDFLTPKA	IANRIKAKGLQ	KLRWYCQMCQ	QCRDENGFK	CHCMSESHQ	RQMVFQNP	TRVVDGY	SEEFQTF	FLDLMRRS	HRFSRI...		
Spore	MGR-AEAGTPKA	ISNALKSKGLQ	RLRWYCSACQ	QMRDENGFK	CHTQSEGH	IRQMNVIAM	NPGRIQDF	SNQFLRDF	FISLRTAH	GGEKKI...		
Ver	MGK-HEKGS	KDLANRTKSK	GLQKLFYCQ	MCQCRDANG	FKCHLTSE	AHQRLLLFA	ENSNSYL	RQFSNDF	EKNFMQL	LRTSYGTRV...		
Neurospore	MPK-AEVGSA	KYLANKMKS	RGLNRLRWY	QLCEKSCR	DENGYKMH	CQSPSHTA	KALEAGAN	FKGVQDT	FSDQFLK	DFIAQLKTS	HGEKEI...	
Levure	MAD---	YDSAKYWSK	QGARRGLQ	KTRYQCICQ	RQCKDANG	FQSHNKSP	SHLRKISQ	VTAEDAR	---	RYNIQFEK	GFLQLLKQR	HGEKWI...
Humain	MGK-SDFLTPKA	IANRIKSKGLQ	KLRWYCQMCQ	QCRDENGFK	CHCMSESHQ	RQLLLASEN	PQQFMDYF	SEEFRNDF	LELLRRRF	GTTRV...		

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* » ?

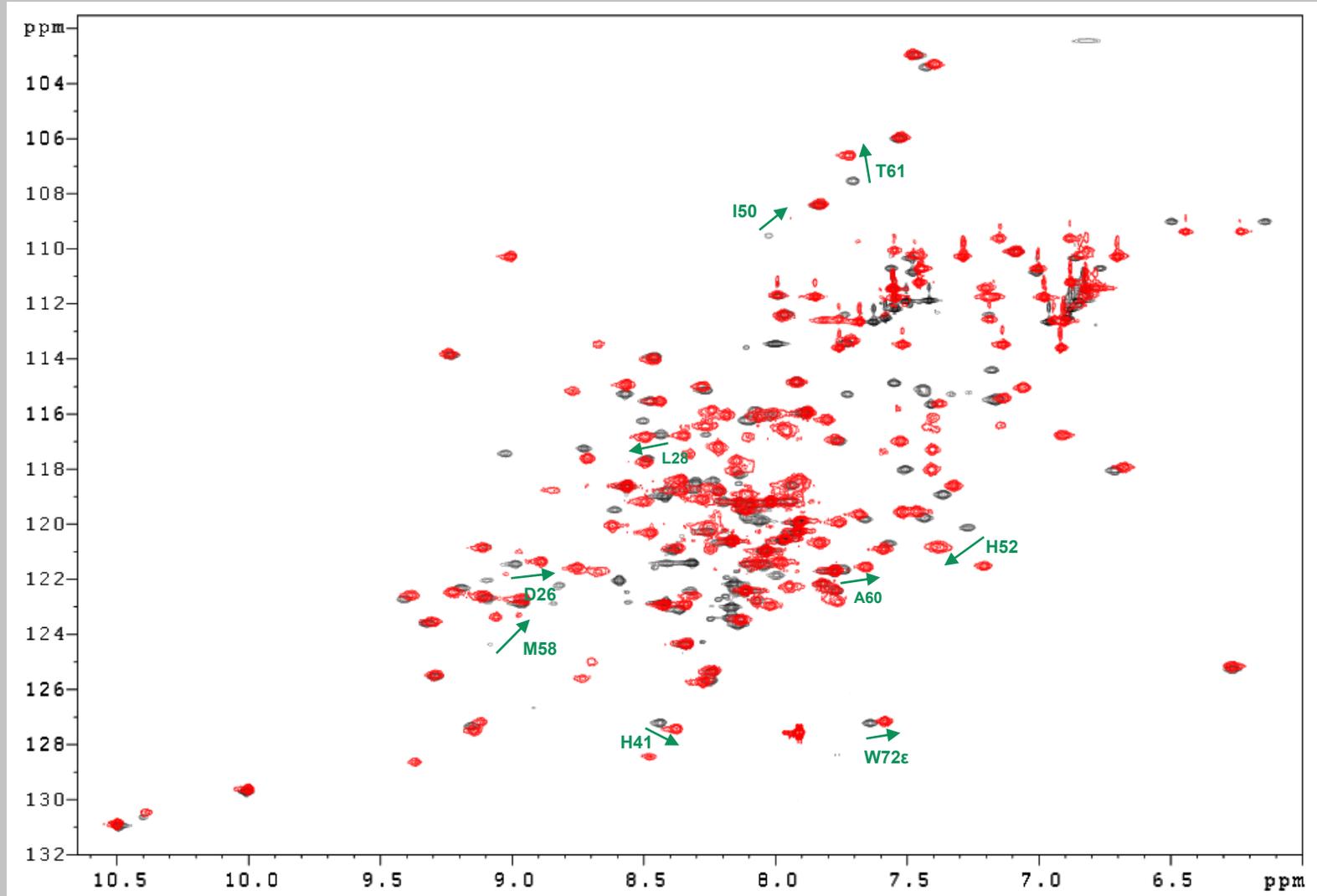


comparaison des déplacements chimiques des groupements amides du *Winged Helix* entre K2 et K3

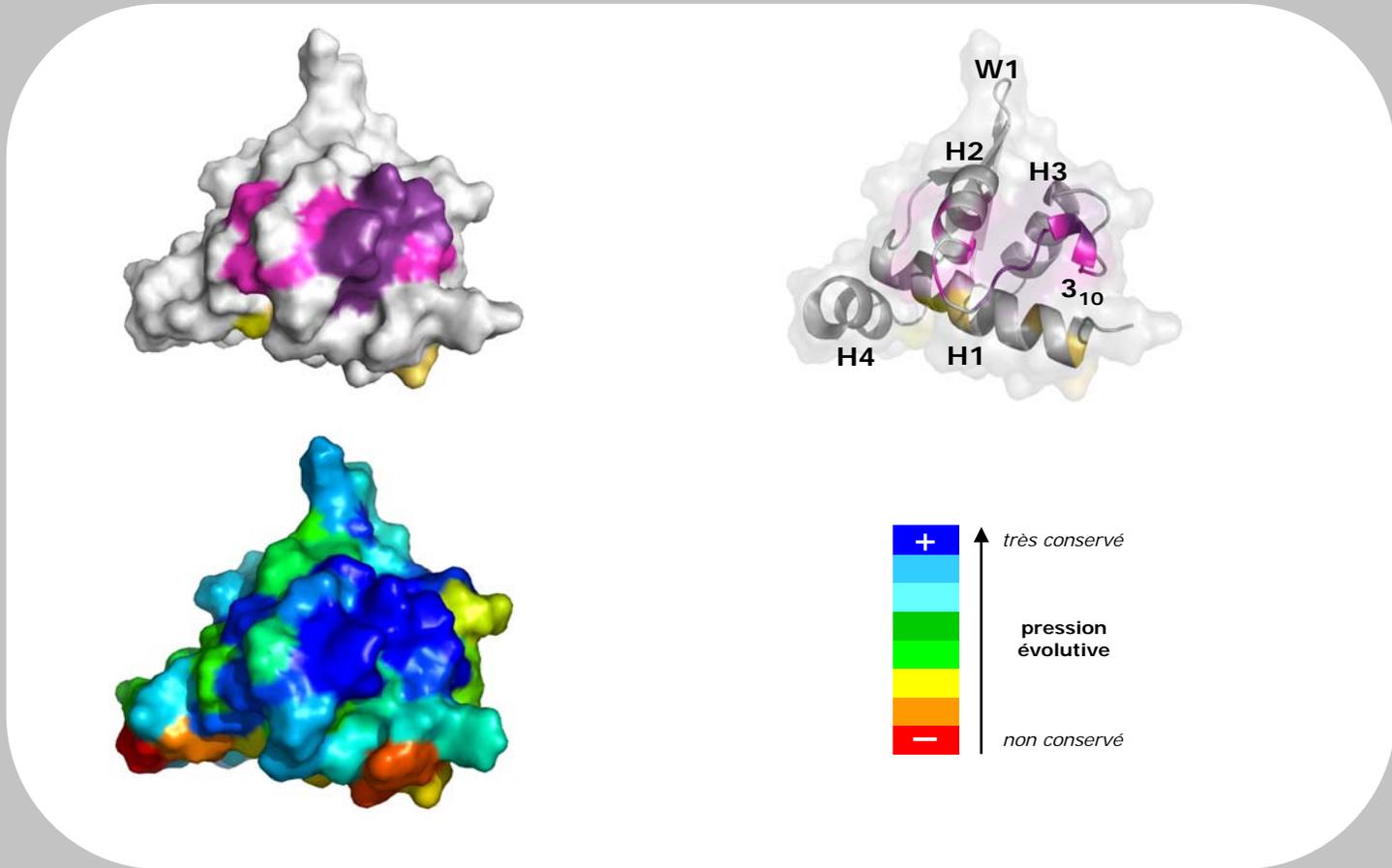


cartographie des déplacements chimiques  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$

## 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