4.3 ETUDE FONCTIONNELLE PARTIELLE DE LA SOUS-UNITE ZETA

Sous clonage de la sous-unité PPZETA dans un vecteur d'expression

La partie codante du clone cDNA PPZETA est amplifiée sur le vecteur pBluescript à l'aide de deux amorces. L'armorce 5' (ppz3) introduit un site de restriction Nde1 au niveau du codon start, l'amorce 3' (ppz4) introduit un site de restriction BamH1 après le codon stop de la séquence. L'insert amplifié avec une polymérase (*Taq high fidelity*, Boehringer-Mannheim, taux d'erreurs de copies très faible) est ensuite digéré avec les enzymes de restriction Nde1 et BamH1, et sous-cloné dans les sites Nde1-BamH1 du vecteur d'expression Pet5a (Promega, Madison). L'insert se trouve ainsi orienté dans le bon cadre de lecture. La souche *E. coli* BL21(DE3) est transformée avec le plasmide Pet5aPpzeta et étalé sur milieu sélectif. Les colonies sont directement criblées par PCR avec les amorces ppz3 et ppz4 de façon éliminer d'éventuels faux positifs.

Expression et purification de la sous-unité Ppzeta recombinante

Le système d'expression de protéine recombinante "Pet " est un outil puissant développé pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli*. En effet, le produit exprimé peut dépasser les 50 % des protéines totales de la cellule après quelques heures d'induction. Les 10 colonies positives ont été cultivées et induites à l'IPTG. Après 3 heures, les cultures sont récoltées. Les cellules sont lysées par sonication et centrifugées. Le surnageant est analysé sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 14% (fig. 4.11.A). Un *western blot* de ce gel est révélé avec des anticorps antiprotéasome (fig.4.11.B). Les culots (protéines insolubles) sont analysés sur gel SDS-PAGE (fig. 4.12.B)



Fig. 4.11. Analyse des extraits bruts des cultures 1 à 12 de *E. coli* (transformé avec Pet5aPpzeta) induites à l'IPTG, **A**) sur gel SDS-PAGE 16% coloré au bleu de Coomassie

B) sur *Western Blot* révélé aux anticorps antiprotéasome. **C-:** culture d'*E. coli* transformé avec Pet5a sans insert (contrôle négatif). Les cultures 2,3,4,8 et 11 expriment la protéine recombinante. Les flèches indiquent les positions de la protéine PPZETA intacte et partiellement dégradée.



Fig. 4.12. **A)** Cinétique d'apparition de la protéine recombinante après induction à l'IPTG par analyse des protéines solubles sur *Western blot*, révélé aux anticorps antiprotéasome **B**) Analyse sur gel SDS-PAGE 14%, coloré au bleu de Ccoomassie, des protéines insolubles précipitées avec les *inclusion bodies*. La flèche indique la position de la protéine recombinante. C1, C2: protéines insolubles (*inclusion bodies*) issues de deux cultures différentes. SN: surnageant de ces cultures (protéines solubles)

Les anticorps réagissent fortement contre des protéines des cultures 2,3,4,8,11 (fig.4.11) à la taille attendue (28 kDa). Dans l'ensemble, si l'on se réfère au gel coloré au bleu Coomassie, la protéine surexprimée ne représente pas le constituant majeur des protéines solubles. De plus, dans les cultures 2 et 3, la protéine semble dégradée. Les bandes correspondant à la protéine intacte et dégradée sont bien visibles (Fig. 4.12.flèches). Leur cinétique d'apparition après induction (fig. 4.12.A) démontre qu'il n'y pas de possibilité d'éviter l'hydrolyse de la protéine produite. Toutefois nous avons limité le temps d'induction à une heure. Nous avons analysé les culots qui (Fig. 4.12.B.) contiennent une très grande quantité de protéine recombinante. Celle-ci se trouve donc stockée sous la forme d'*inclusion bodies*. Plusieurs tentatives de solubilisation des *inclusion bodies* par la guanidine ou l'urée, puis de renaturation de la protéine demeure insoluble et précipite. Nous avons cultivé et induit l'expression de la protéine à une température de 28 °C. Cette température semble dans certains cas plus favorable à la solubilisation de certaines protéines surexprimées. Dans ce cas également, nous n'avons pas pu obtenir le résultat escompté.

D'un point de vue pratique, la purification de cette protéine nécessite un traitement plus complexe lorsqu'elle ne se trouve pas présente majoritairement dans les extraits bruts. Dans un premier temps, nous avons tenté de purifier la protéine recombinante à partir des extraits bruts. Mais la méthode s'est révélée fastidieuse, plus complexe et finalement inefficace. Dans un second temps, nous avons réuni les surnageants obtenus lors de nos expériences de renaturation des *inclusion bodies* solubilisés par différents agents dénaturants. Bien que la majorité des protéines précipitent lors de la renaturation, une quantité suffisante de protéine recombinante reste soluble et majoritaire malgré la présence de quelques contaminants.

Les surnageants sont chargés sur une colonne hydroxyapatite. Les protéines sont éluées par application d'un gradient de 0 à 700 mM de NaPO₄ pH:7,8 (fig. 4.13.). Les fractions sont analysées par gel d'électrophorèse et *western blot*. La protéine élue principalement dans la fraction A, mais se trouve présente également dans les fractions B à G (fig. 4.13.B.C)



Fig. 4.13. A) Chromatogramme de la purification des surnageants contenant la protéine recombinante, sur colonne hydroxyapatite, obtenu après application d'un gradient de 0 à 300 mM NaPO4 pH: 8.0. Les fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE 16 % B) coloré au bleu de Coomassie, C) sur "Western Blot" révélé aux anticorps antiprotéasome.

Les fractions B à F sont réunies et chargées sur une colonne HPLC échangeuse d'anions. L'élution se fait par application d'un gradient de 0 à 700 mM de NaCl, (fig. 4.14.A). Le gel SDS-PAGE coloré au bleu Coomassie et le *western blot* signalent la présence de PPZETA dans les fractions B à F (fig.4.14.B,C).



Fig. 4.14. A) Chromatogramme de la purification de la protéine recombinante sur colonne échangeuse d'anions MonoQ. Analyse des fractions éluées après l'application d'un gradient de 0 à 700mM de NaCl sur B) gel SDS-PAGE 14% coloré au bleu de Coomassie C) par "Western blot" révélé aux anticorps antiprotéasome
D) Chromatogramme de la purification de la protéine recombinante PPZETA sur colonne à tamis moléculaire TDSK4000, E) les fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE 14% et coloré au bleu de Coomassie.

Une dernière étape de purification est effectuée afin d'éliminer les derniers contaminants ainsi que les produits de dégradation. Les fractions B à F de la colonne échangeuse d'anions sont réunies et appliquées sur une colonne HPLC à tamis moléculaire séparant les protéines selon leur taille (fig. 4.14.D). L'analyse sur gel SDS-PAGE 14% et coloré au bleu de Coomassie indique la présence de PpZeta dans les fractions A à F (fig. 4.14.E). Les fractions B à F peuvent être utilisées pour la suite des essais, malgré la présence indissociable de la protéine dégradée.

Caractérisation fonctionnelle de la protéine recombinante

Les propriétés de reconnaissance des chaînes de polyubiquitine sont-elles vérifiées sur la protéine recombinante que nous venons de purifier?

Pour ce faire, nous avons suivi la méthode utilisée au chapitre 3 à la différence près que nous avons effectué une simple séparation sur gel SDS-PAGE de la protéine recombinante avant le transfert sur nitrocellulose. La protéine étant pure, nous n'avons pas jugé nécessaire une séparation en deux dimensions. Après révélation aux anticorps antiubiquitine, seule la bande correspondant au produit de dégradation de PPZETA réagit très faiblement. La protéine recombinante ne reconnaît pas les chaînes de polyubiquitine!

Si on analyse par gel d'électrophorèse en deux dimensions la protéine recombinante, on constate que son point isoélectrique avoisine 7 (fig.4.15) et n'a plus de ce fait la charge acide (pI:5,0) de la protéine issue de la structure du protéasome de mousse. Cette différence de charge peut expliquer l'impossibilité de la protéine recombinante à s'associer avec les chaînes d'ubiquitine. Cette différence de charge perturbe probablement les propriétés de la protéine recombinante dans l'association avec les chaînes de polyubiquitine. La bactérie *E. coli* ne peut sans doute pas effectuer les modifications post-traductionnelles nécessaires au rétablissement de ces propriétés (Gianazza, 1995) (Mason et al., 1996).



Ppzet

Fig. 4.15. Gel en deux dimensions (taille et pI) de la protéine recombinante PPZETA. Les cercles représentent la position des sous-unités du protéasome de mousse séparées dans les mêmes conditions. La position de la sous-unité PPZETA native est indiquée.

Etude des domaines de la sous-unité PPZETA

L'étude des domaines essentiels d'une protéine peut se faire sur la base des motifs conservés entre protéines possédant des propriétés ou fonctions identiques. Les délétions ou mutations dans ces séquences conservées permettent de comprendre les propriétés fonctionnelles de la protéine. De plus, la connaissance de la position spatiale de certains domaines dans la structure tridimensionnelle de la protéine peut nous renseigner sur le mécanisme d'interaction lors du processus biochimique.

Les séquences primaires des sous-unités alpha d'un même organisme, *A. thaliana* (fig. 4.16), diffèrent sensiblement. Pourtant leurs structures secondaire et tertiaire sont fortement conservées (représentation spatiale des sous-unités de l'anneau alpha de la levure, fig. 4.17). Nous constatons sur l'empilement des séquences des sous-unités alpha d'A. *thaliana* que seule la sous-unité PAE1 possède une courte séquence supplémentaire que nous appellerons domaine Z, souligné à la figure 4.16. Caractéristique que l'on retrouve chez la levure (DOA5), l'homme (ZETA) et la drosophile (PROSMA5) et PPZETA (fig. 4.10). Bien qu'elles ne soient pas fortement conservées chez ces différents organismes, ces séquences (domaine Z) constituent une acquisition évolutive certaine. On ne trouve pas dans la sous-unité α du protéasome de *T. acidophilum* ce type de séquence.

Nous avons pu obtenir les coordonnées cristallographiques de l'anneau alpha de la levure de la banque de données de GCG-Wisconsin. Le programme *Weblabviewer* permet la modélisation de ses sous-unités telles qu'elles se présentent dans la structure cristalline avec l'avantage de pouvoir les visionner sous l'angle de vue désiré.

Sur les différentes vues des anneaux alpha de la levure (fig. 4.17. A,B et fig.4.18. A,B), on constate que toutes les sous-unités alpha ont des structures secondaires et tertiaires semblables. Toutefois, une seule sous-unité possède une boucle (flèche Z) distincte. Cette boucle est dirigée vers le centre avec un changement de direction très net vers l'intérieur de la structure (fig. 4.17 A,B et fig. 4.18. A,B).

Cette sous-unité correspond à DOA5 de la levure, et la boucle est constituée des acides aminés surnuméraires spécifiques au domaine que nous avons appelé Z, à savoir le motif "GEGASGEE". Cette boucle est également visible sur l'empilement des structures tridimensionnelles des sous-unités alpha effectué par Groll et al. (1997). Ces résultats indiquent qu'une seule sous-unité de l'anneau α du protéasome possède ce domaine Z caractéristique des eucaryotes. Ce domaine Z forme probablement une boucle, dont la fonction reste à définir.



Fig. 4.16. Alignement des séquences en acides aminés de la famille des sous-unités alpha d' *A. thaliana*. Le domaine Z de la sous-unité PAE1 est en rouge



Fig. 4.17. Vues A) de dessus B) de dessus mais avec éclatement des sous-unités du disque alpha du protéasome de levure modélisé à partir des données cristallographiques (Groll et al., 1997). Les sous-unités se distinguent entre elles par leur couleur. La boucle est indiquée par une flèche Z. A cette position, les sous-unités voisines de la sous-unité DOA5 (en vert) ne possèdent pas cette boucle (flèches X).



Fig. 4.18. Vues A) de côté, B) de dessus, après légère rotation autour de l'axe indiqué en A, de l'anneau alpha du protéasome de levure modélisé à partir des données cristallographiques (Groll et al., 1997). Les sous-unités se distinguent entre elles par leur couleur. Deux sous-unités, dont la DOA5 (vert), sont dégagées de la structure. La boucle est indiquée par une flèche Z. A cette position, les sous-unités voisines ne possèdent pas cette boucle (flèches X).

4.4 DISCUSSION

Nous avons bien isolé une sous-unité α puisque nous retrouvons le motif "YDRGFNTFSPEGRLFQYEYAIEA" conservé, commun à toutes les sous-unités alpha; ce résultat est confirmé par l'empilement des sous-unités homologues à PPZETA (fig. 4.10). Cette sous-unité se retrouve également dans le pool de protéines (pic α , fig.2.18.) isolé lors de notre expérience de dissociation du protéasome, ce qui semble indiquer que nous avons probablement obtenu de cette manière des anneaux alpha comme nous l'avions prédit.

Le gène *ppzeta* code pour une protéine qui présente de fortes homologies avec les séquences: ZETA humaine, DOA5 de la levure, PROSMA5 de la drosophile et PAE1 d'A. thaliana (Chen et Hochstrasser, 1995; Belote, 1997; Fu et al., 1998). Leur comparaison par alignement de séquences, nous montre d'une part que la plus forte conservation des séquences entre elles se situe dans la partie N-terminale, d'autre part, que toutes possèdent une séquence d'acides aminés supplémentaires (pos.124 à 131) par rapport aux autres sous-unités alpha voisines. Celle-ci constitue une acquisition évolutive pour toutes ces sous-unités. En effet, lorsque l'on procède à l'empilement de toutes les séquences des sous-unités alpha d'un même organisme, notamment, de la levure ou d'A. thaliana (fig. 4.16) (Fu et al., 1998.), on constate que c'est la seule sous-unité de l'anneau alpha qui possède cette séquence supplémentaire. Ce motif, rendu relativement acide par la présence répétée de l'acide glutamique, n'est pas fortement conservé entre les différents organismes (fig. 4.10), mais doit probablement être essentiel à la spécificité fonctionnelle de cette sous-unité. De plus, chez la levure, le domaine Z forme une boucle positionnée à l'intérieur du canal central. Ces observations suggèrent que ces protéines constituent une forme de sous-famille des sous-unités alpha très conservées dans les règnes végétal et animal, où elles doivent partager des fonctions communes.

Le phylogramme (fig. 4.9) nous montre que la sous-unité PAE1 d'A. *thaliana* est plus proche évolutivement de PPZETA que des autres sous-unités. Il est plus surprenant de constater que PPZETA possède une homologie plus forte pour la sous-unité ZETA de l'homme que pour la protéine DOA5 de la levure. Ce constat nous conforte dans l'idée que *P. patens* pourrait constituer un modèle d'étude biologique proche des systèmes eucaryotiques supérieurs. La similarité des séquences entre sous-unités de protéasome provenant du même organisme est nettement plus faible (35 %) que la similarité des séquences entre sous-unités provenant d'organismes très divergents (65% à 85%). Ceci se vérifie pour d'autres sous-unités du protéasome d'*A. thaliana* (Hughes et al.,1997).

Le sous-clonage de Ppzeta dans le vecteur d'expression Pet5a n'a pas posé de problèmes majeurs. Ce travail a été facilité par le fait que le cDNA ne contient pas de sites de restriction NotI, nécessaires à la libération de l'insert du DNA phagique, ni NdeI et BamHI; ceci permet de sous-cloner, en une seule étape et dans la bonne orientation, le cDNA Ppzeta dans le vecteur d'expression Pet5a.

L'expression de la construction Pet5aPpzeta est fonctionnelle puisque la protéine recombinante est exprimée en grande quantité (> 50 % des protéines totales de la bactérie). Toutefois, celle-ci est insoluble et se trouve compartimentée sous la forme d'agrégats dans les *inclusion bodies*. Ceux-ci se présentent sous la forme de granules, visibles au microscope à contraste de phase. Ils peuvent être séparés du lysat de cellules par simple centrifugation; ce que nous avons fait.

Les *inclusion bodies* sont des agrégats de protéines, qui ne possèdent pas leur conformation native correcte, et qui s'accumulent rapidement dans le cytoplasme de *E. coli*. Il est également possible que l'expression de PPZETA soit toxique pour la bactérie, qui parvient d'ailleurs à dégrader partiellement la protéine. Cet événement semble peu fréquent, car ces lignées bactériennes *E. coli* BL21(DE3) dépourvues des protéases *OmpT* et *lom* aident à la stabilisation des protéines étrangères sensibles à l'activité des protéases endogènes. La présence de la protéine recombinante est incompatible ou interfère avec le métabolisme de *E. coli*.

Nous avons également constaté que les cultures exprimant la protéine recombinante ont une croissance fortement ralentie, avec ou sans induction à l'IPTG. La protéine recombinante perturbe probablement le métabolisme de la bactérie qui la neutralise en quelque sorte sous une forme inactive dans des structures inertes, telles que des *inclusion bodies*.

Ces propriétés d'agrégation compliquent fortement la purification de PPZETA. En effet, il n'est plus possible de renaturer la totalité des protéines après leur solubilisation, puisque l'élimination progressive de l'agent dénaturant se solde par une précipitation. Seul ce qui est encore soluble (surnageant) peut subir des étapes de purification. Toutefois on y retrouve cette propriété d'agrégation, aussi bien du point de vue de la charge que de la taille. En effet, la protéine PPZETA est distribuée sur un grand nombre de fractions lors de l'élution des colonnes hydroxyapatite et échangeuses d'anions. Ce qui suggère que sa charge varie en fonction de son taux d'agrégation. Le constat est d'autant plus frappant sur le tamis moléculaire, celui qui est utilisé pour la purification du protéasome, où les premières molécules apparaissent à la taille d'exclusion de la colonne (volume mort), à savoir 1000 kDa. Dans ces conditions, il est difficile de purifier une protéine en jouant sur sa taille et/ou sa charge nette spécifique.

L'expérience de reconnaissance des chaînes de multi-ubiquitine par la protéine recombinante n'a pas confirmé l'implication de la sous-unité PPZETA dans le processus de dégradation des chaînes.

Quels arguments peut-on invoquer pour expliquer cet échec?

Le gel en deux dimensions (fig. 4.15) confirme que la protéine recombinante n'a pas les mêmes propriétés biophysiques que celle qui est issue du protéasome. On le constate de manière évidente à la charge nette de la protéine; puisque celle-ci n'est pas assez acide.

Des modifications post-traductionnelles sur des sous-unités du protéasome ont déjà été décrites (Genschik et al., 1992) (Parmentier et al., 1997). Outre la glycolsylation, les phosphorylations sont fréquentes (Mason et al., 1996) (Arribas et al., 1994) et peuvent expliquer la différence de charge entre les protéines recombinante et native. La figure 4.6 présente les motifs de la séquence PPZETA susceptibles d'être phosphorylés ou glycosilés. L'action de kinases sur ces sites permettrait de rétablir, en quelque sorte, la charge nette, plus acide, de la protéine recombinante. Il n'est pas exclu que la protéine soit également glycosilée (Scliephacke et al., 1991) ou bloquée à l'extrémité N-terminale comme cela a été démontré pour certaines sous-unités alpha. Ces modifications peuvent être mises en évidence sur la protéine native: la phosphorylation par l'action de phosphatases spécifiques et l'analyse des glycoprotéines par interaction de lectines spécifiques (Scliephacke et al., 1991).

L'expression de cette protéine dans *E. coli* n'est donc pas appropriée. Le système d'expression dans *Baculovirus* serait un moyen plus efficace pour surexprimer une protéine nécessitant des modifications post-traductionnelles qui peuvent modifier de façon déterminante la conformation tridimensionnelle de la protéine et lui rendre ses propriétés fonctionnelles initiales.

Les sous-unités alpha HsC8, HsPROS30 et HsPROS27 humaines ont pu être exprimées dans *E. coli* (Gerards et al., 1998). L'expression de HsC8 seule donne des structures formées de deux anneaux superposés et composés chacun de sept sous-unités, alors que celle des deux autres alpha mène à la formation de dimères. La coexpression de deux sous-unités alpha humaines soit HsC8 et HsPROS30 ou HsC8 et HsPROS27 aboutissent à la formation d'hétéro-oligomères ayant des structures identiques à celles formées lors de l'expression de HsC8 seule. Ces structures sont composées de proportions variables des deux sous-unités alpha.

Gerards et al. (1997, 1998) n'ont pas abordé les problèmes de modifications posttraductionnelles de leurs protéines recombinantes. Sans doute, parce que celles-ci étaient parfaitement surexprimées et solubles dans *E. coli*. Leurs caractérisations se sont limitées à la vérification de la taille et de l'antigénicité spécifique sans mesure de la charge nette. Toutefois, pour avoir exprimé PPZETA dans un même contexte, nous avons constaté un comportement différent lors de son expression avec l'apparition d'agrégats, que l'on pourrait peut-être éviter par des modifications post-traductionnelles.

La complexité relative de cette sous-unité, par rapport à d'autres sous-unités alpha, démontre probablement que son rôle ne se limite pas à une fonction d'assemblage de la structure 20S ou de barrière physique à l'accessibilité de toutes protéines cytoplasmiques. PPZETA possède sans doute une ou des fonctions plus spécifiques que les sous-unités voisines et doit participer de façon active dans le processus de dégradation des protéines soit en interagissant directement avec le substrat soit par coopération avec d'autres protéines additionnelles nécessaires à la dégradation des conjugués ubiquitinés.