

Spécialité : SCIENCES DU VIVANT / Biophysique

[Laboratoire : /LLB/MMB](#)

Production, purification et caractérisation de protéines membranaires recombinantes

Responsable de stage : COMBET Sophie

sophie.combet@cea.fr

Tel : +33 1 69 08 67 20

Stage pouvant se prolonger en thèse : Oui

Durée du stage : 6 mois

Résumé:**Sujet :**

Les protéines membranaires représentent un quart des protéines totales et plus de la moitié des cibles thérapeutiques actuelles. Cependant, leurs structures ainsi que leurs dynamiques utiles à l'optimisation de molécules à visées thérapeutiques et diagnostiques sont mal connues. De plus, ces protéines sont peu abondantes et doivent être extraites de leur membrane à l'aide de détergents, rendant leur purification difficile. Pour contourner cette difficulté, il est possible de surexprimer ces protéines notamment à l'aide de bactéries. Une fois ces protéines produites et purifiées, il faut, pour leur étude structurale et fonctionnelle, les stabiliser dans une conformation homogène. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte, en particulier le choix du détergent et/ou le maintien dans un environnement naturel lipidique. Lors de ce stage, nous proposons d'étudier la protéine membranaire TSPO qui est une cible diagnostique et thérapeutique de plusieurs pathologies inflammatoires et cancéreuses chez l'homme [Lacapere et al, 2020].

La TSPO est une protéine de 18 kDa présente dans différentes espèces, des bactéries aux plantes. La conservation de la séquence est importante entre les différentes espèces comme l'homme (human TSPO, hTSPO), la souris (mouse TSPO, mTSPO) et la bactérie (*Bacillus cereus*, BcTSPO) dont il a été obtenu en 2014-2015 les premières structures pour les mTSPO et BcTSPO mais pas pour la hTSPO, cible diagnostique et thérapeutique. La structure de la mTSPO a été obtenue par RMN en solution en présence d'un détergent, le DPC (DodecylPhosphoCholine) et d'un ligand de haute affinité, le PK 11195 [Jarmenko et al, 2014]. Celle de la BcTSPO par cristallographie électronique en pseudo membrane avec et sans ligand [Guo et al, 2015].

Malgré de nombreux essais, il n'a jamais pu être obtenu de structure cristallographique des différents orthologues de mammifère de la TSPO (mTSPO, hTSPO par exemple). Il a été suggéré que cette difficulté pourrait provenir de l'environnement des protéines qui ne les stabiliserait pas suffisamment et/ou de différences locales des séquences en acides aminés pouvant conduire à des stabilisations différentes. Nous disposons de systèmes d'expression et pouvons purifier les différentes TSPO (mTSPO, hTSPO et BcTSPO) dont nous souhaitons caractériser les structures à l'aide de différentes techniques telles que, par exemple, le dichroïsme circulaire (CD), la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffusion statique de lumière (MALLS), la diffusion de rayons X ou de neutrons aux petits angles (SAXS et SANS) et la fluorescence.

La caractérisation de la couronne de détergent peut être réalisée grâce à la séparation de la protéine avec son détergent, des micelles de détergent libres, sur colonne d'exclusion en taille (SEC) et analyse par MALLS (permettant de déterminer la quantité de détergent entourant la protéine), par SAXS (donnant une enveloppe globale de la protéine et du détergent) et par SANS (permettant de distinguer la couronne de détergent (deutéree) de la protéine (hydrogénée) dans des mélanges adéquats de tampon hydrogénée et deutérée). L'ensemble de ces résultats peut être modélisé par des simulations ab initio ou de dynamique moléculaire.

Le stage propose de se familiariser avec ces techniques de production, de purification et de caractérisation de protéines membranaires dans des environnements constitués de différents détergents purs ou de mélange de détergents et de lipides.

Références :

- Insight into the structural features of TSPO: implications for drug development, J.-J. Lacapere, L. Duma, S. Finet, M. Kassiou, V. Papadopoulos, [Trends in Pharmacological Sciences](https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.11.005) **41**(2) (2020) 110-122
- Structure of the mitochondrial translocator protein in complex with a diagnostic ligand, J. Jaremko, M. Jaremko, K. Giller, S. Becker, M. Zweckstetter, [Science](https://doi.org/10.1126/science.1248725) **343**(6177) (2014) 1363-1366
- Be cautious with crystal structures of membrane proteins or complexes prepared in detergents Y. Guo, [Crystals](https://doi.org/10.3390/cryst10020086) **10**(2) (2020) 86

Production, purification, and characterization of recombinant membrane proteins

Abstract:

Subject :
