

Spécialité : SCIENCES DU VIVANT / Biophysique

[Laboratoire : /LLB/MMB](#)

Caractérisation biophysique de la protéine membranaire mTSPO

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:

L'objectif de ce stage est de caractériser la structure de la protéine transmembranaire mTSPO et son affinité pour des ligands d'intérêt pharmacologique. L'étude se fera en conditions natives, en exprimant mTSPO chez la levure et en la solubilisant dans des environnements biomimétiques. Nous utiliserons des outils biophysiques (spectroscopie optique et SAXS) couplés à de la modélisation ab initio.

Sujet :

Caractérisation biophysique de la protéine membranaire mTSPO

Nous nous intéressons à la structure/fonction de la protéine TSPO (TranSlocator PrOtein), une protéine membranaire ubiquitaire de 18 kDa, à cinq hélices transmembranaires. C'est une protéine d'intérêt pharmacologique majeur car elle utilisée comme cible de ligands pour le diagnostic et la thérapie de plusieurs pathologies inflammatoires et cancéreuses et comme marqueur de maladies neurodegeneratives.

Deux structures bactériennes de TSPO ont été résolues par diffraction de rayons X en phase cubique lipidique, alors que toutes les tentatives pour obtenir des cristaux de TSPO de mammifère ont échoué jusqu'à présent. La structure RMN de la TSPO de souris (mTSPO) a été résolue, mais est controversée car en détergent DPC (déstabilisant) et en présence du ligand de haute affinité PK 11195 qui rigidifie fortement sa structure. Aucune structure de mTSPO à haute résolution sans ligand et dans un environnement membranaire biomimétique n'a encore été obtenue.

L'obtention d'une telle structure reste donc un challenge et permettrait de comprendre la fixation et la stabilité des ligands dans les cavités de mTSPO et leur rôle dans les changements de conformation de la protéine, ce qui est essentiel pour le développement de nouvelles molécules pour l'imagerie et les thérapies.

Nous produisons actuellement mTSPO par surexpression dans E. coli. La protéine est extraite à partir des corps d'inclusion de la bactérie en détergent SDS, très chargé, où elle stable et monodisperse mais sous une forme non fonctionnelle. Le changement du SDS par le DPC et surtout par des mélanges mixtes lipides:détergents (DMPC:DPC) conduit à une structure plus native de mTSPO, capable de lier des ligands, avec une augmentation du taux d'hélices et une compaction de la conformation de la protéine¹.

Un premier objectif de ce projet de stage est de produire la protéine mTSPO sous forme native par voie recombinante chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine s'exprime à la membrane externe des mitochondries, ce qui permet de la solubiliser et la purifier dans des conditions natives, contrairement au protocole chez E. coli. La protéine de fusion GFP (fluorescente) permet de tracer l'extraction et la purification de mTSPO. Nous avons réalisé récemment ce protocole de façon qualitative grâce à l'expertise du plateau technique de production de protéines membranaires de l'I2BC (Saclay). Cette partie sera à améliorer et à appliquer pour purifier la protéine mTSPO dans de nouveaux

environnements, notamment le détergent DDM connu pour favoriser la cristallisation protéique.

Le second objectif du stage sera de caractériser la taille et la structure de mTSPO produite chez la levure par des mesures de spectroscopie optique (absorbance, fluorescence et dichroïsme circulaire), de diffusion de lumière (SEC-MALLS) et de diffusion de rayons X aux petits angles (SEC-SAXS au synchrotron SOLEIL), dans différents environnements amphiphiles (détergents dont le DDM, mélanges lipides:détergents et nanodisques de phospholipides), en présence ou pas de ligands (PK, cholestérol).

Profil recherché : étudiant(e) en biophysique et/ou biochimie et/ou physico-chimie fortement intéressé(e) par la biologie structurale. Une poursuite en thèse est envisageable.

Ce stage sera basé au Laboratoire Léon-Brillouin (LLB, site du CEA/Saclay, Univ. Paris-Saclay), en étroite collaboration avec le Dr. José Luis Vazquez-Ibar (I2BC, Univ. Paris-Saclay) et le Dr. Françoise Bonneté (IBPC, Paris).

Contact : Dr. Sophie COMBET (DR CNRS)

01 69 08 67 20 ; sophie.combet@cea.fr

1 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.11.014>

Biophysical characterization of the membrane protein mTSPO

Abstract:

The objective of this internship is to characterize the structure of the transmembrane protein mTSPO and its affinity for ligands of pharmacological interest. The study will be carried out in native conditions, by expressing mTSPO in yeast and solubilizing it in biomimetic environments. We will use biophysical tools (optical spectroscopy and SAXS) coupled with ab initio modeling.

Subject :
