

# Structure and function in solution of the transmembrane protein mTSP0 in different amphiphilic systems: from detergents to biomimetic environments

*Structure et fonction en solution de la protéine transmembranaire mTSP0 dans différents systèmes amphiphiles : des détergents aux environnements biomimétiques*

## Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n° 571, Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Laboratoire Léon-Brillouin (LLB)** (CEA, CNRS, Université Paris-Saclay), sous la direction de **Sophie COMBET**, Directrice de Recherche CNRS.

**Date de soutenance prévue à Paris-Saclay, le 26 septembre 2024, par**

**Christelle SAADE**

## Composition du Jury

<b>Dr Laura BACIOU</b> DR CNRS, LCP, Université Paris-Saclay	Présidente
<b>Dr Véronique RECEVEUR-BRECHOT</b> DR CNRS, BIP, Université Aix-Marseille	Rapporteuse & Examinatrice
<b>Dr Jean-Michel JAULT</b> DR CNRS, IBCP, Université de Lyon 1	Rapporteur & Examineur
<b>Dr Frank GABEL</b> DR CEA, IBS, CEA, CNRS, Université Grenoble-Alpes	Examineur
<b>Dr Luminita DUMA</b> CRCN HDR CNRS, ICMR, Université de Reims Champagne-Ardenne	Examinatrice
<b>Dr Sophie COMBET</b> DR CNRS, LLB, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse
<b>Dr Jean-Jacques LACAPERE</b> DR CNRS, LBM, Sorbonne Université	Invité
<b>Dr Alexandre POZZA</b> IR CNRS, IBPC, Université Paris-Cité	Invité

# RÉSUMÉ et ABSTRACT

**Titre :** Structure et fonction en solution de la protéine transmembranaire mTSPO dans différents systèmes amphiphiles: des détergents aux environnements biomimétiques.

**Mots clés :** protéines membranaires, mTSPO, amphiphiles, diffusion aux petits angles de rayons X et de neutrons (SAXS, SANS), modélisation *ab initio*, affinité.

**Résumé :** TSPO est une petite protéine membranaire translocatrice, ubiquitaire, composée de cinq hélices- $\alpha$  transmembranaires. Chez les mammifères, elle est principalement localisée dans la membrane externe des mitochondries, où elle jouerait un rôle dans le transport du cholestérol et la voie de synthèse des stéroïdes. Cette protéine présente un intérêt pharmacologique majeur en raison de sa forte affinité pour de nombreux ligands utilisés comme marqueurs de l'inflammation en neuro-imagerie. La seule structure atomique connue des TSPOs de mammifères est la structure RMN (2MGY.PDB) de la TSPO de souris (mTSPO). Cependant, cette structure est controversée, car obtenue en repliant la protéine dans une concentration forte de détergent DPC et en présence du ligand (R)-PK11195, qui la rigidifie fortement. En l'absence de ligand, la structure de mTSPO est trop flexible pour être résolue par RMN. De plus, à ce jour, aucune condition amphiphile n'a permis de cristalliser les TSPOs de mammifères, avec ou sans ligand, contrairement aux TSPOs bactériennes.

L'objectif de cette étude est de déterminer, par une approche structure/fonction, l'effet de différents environnements amphiphiles sur la structure de mTSPO en condition "apo" (*i.e.* sans ligand). Nous avons sondé sa structure en solution à différentes échelles par des techniques de diffusion de rayonnement et de spectroscopie optique. En particulier, la diffusion de rayons X et de neutrons aux petits angles (SAXS et SANS), combinée à la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la variation de contraste en SANS et la modélisation *ab initio*, a permis d'obtenir la conformation du complexe entier mTSPO/amphiphiles et de sonder spécifiquement celles de la protéine et de la bouée d'amphiphiles. La quantité de molécules d'amphiphiles associés à mTSPO, mesurée par MALLS, a permis de valider les modèles proposés. L'effet de l'environnement sur l'affinité du ligand a été mesuré par thermophorèse à micro-échelle (MST).

L'apo-mTSPO, produite par voie recombinante dans les

corps d'inclusion de la bactérie *E. coli*, est partiellement dépliée suite à son extraction par le SDS. Nous montrons que la protéine se replie en DPC à la fois au niveau local (augmentation significative de la quantité et des interactions des hélices- $\alpha$  et de la fluorescence des tryptophanes) et au niveau tridimensionnel avec une conformation "apo" plus étendue que la structure RMN 2MGY.PDB. En ajoutant des phospholipides DMPC, pour obtenir un environnement de bicelles mixtes DMPC:DPC partiellement biomimétique, l'apo-mTSPO se structure davantage : la quantité d'hélices- $\alpha$  et leurs interactions augmentent significativement, ainsi que la fluorescence des tryptophanes. Ce repliement est associé à une augmentation significative de l'affinité de la protéine pour le ligand (R)-PK11195 (0.9  $\mu$ M) comparée à celle en DPC (70  $\mu$ M) et SDS (absence d'affinité). Nous démontrons ainsi la pertinence de l'utilisation de bicelles DMPC:DPC pour l'étude en solution des protéines membranaires et confirmons le rôle crucial des lipides dans la structure et la fonction de mTSPO. Enfin, nous montrons que cet environnement est favorable à la cristallisation de l'apo-mTSPO et à la reconstitution de la protéine dans des nanodisques de DMPC.

Pour comparer ces résultats avec une protéine exprimée en condition native, nous avons développé un nouveau protocole de production de mTSPO en levures. Nous avons réussi à purifier la protéine en condition "apo" en DDM, un détergent connu pour solubiliser les protéines correctement repliées tout en conservant des lipides membranaires associés.

Ces travaux de thèse (*i*) contribuent à une meilleure compréhension de la structure/fonction de mTSPO dans différents environnements amphiphiles, pour déterminer les conditions optimales à des études structurales à plus haute résolution, et (*ii*) constituent un apport méthodologique significatif pour l'étude des protéines membranaires en solution.

**Title:** Structure and function in solution of the transmembrane protein mTSPO in different amphiphilic systems: from detergents to biomimetic environments.

**Keywords:** membrane proteins, mTSPO, amphiphiles, small-angle X-ray and neutron scattering (SAXS/SANS), *ab initio* modeling, affinity.

**Abstract:** TSPO is a small, ubiquitous, translocator membrane protein composed of five transmembrane  $\alpha$ -helices. In mammals, it is primarily located in the outer mitochondrial membrane, where it is believed to play a role in cholesterol transport and steroid synthesis pathways. This protein has significant pharmacological interest due to its affinity for various ligands used as markers of inflammation in neuroimaging. The only known atomic structure of mammalian TSPOs is the NMR structure (2MGY.PDB) of mouse TSPO (mTSPO). However, this structure is controversial as it was obtained by refolding the protein using a high concentration of DPC and in the presence of the ligand (*R*)-PK11195, that stiffens it significantly. In the absence of ligand, the structure of mTSPO is too flexible to be resolved by NMR. Furthermore, to date, no amphiphilic condition has allowed the crystallization of mammalian TSPOs, with and without ligand, unlike bacterial TSPOs.

The aim of the present study is to determine, using a structure/function approach, the effect of different amphiphilic environments on the structure of apo-mTSPO (*i.e.* without the ligand). We investigated mTSPO's structure in solution at different scales using radiation scattering and optical spectroscopy techniques. Small-angle X-ray and neutron scattering (SAXS, SANS), combined with size-exclusion chromatography (SEC), contrast variation in SANS, and *ab initio* modeling, allowed us to obtain the conformation of the entire mTSPO/amphiphile complex and to specifically probe those of the protein and the amphiphilic belt within the complex. The quantity of amphiphile molecules associated with mTSPO, measured by MALLS, allowed the validation of the proposed models. The effect of the environment on ligand affinity was measured by microscale thermophoresis (MST).

The apo-mTSPO, produced by a recombinant way in

*E.coli* bacteria inclusion bodies, is partially unfolded following its extraction by SDS. We show that the protein refolds in DPC, both locally (significant increase of content and interactions of  $\alpha$ -helices and in tryptophan fluorescence) and three-dimensionally, with a more extended "apo" conformation than the NMR structure 2MGY.PDB. Adding DMPC phospholipids to create a partially biomimetic environment of mixed DMPC:DPC bicelles further structures apo-mTSPO: the quantity and interactions of  $\alpha$ -helices, as well as tryptophan fluorescence, increase significantly. This refolding is associated with a significant increase in the protein's affinity for the ligand (*R*)-PK11195 (0.9  $\mu$ M) compared to that in DPC (70  $\mu$ M) and SDS (no affinity). Thus, we demonstrate the relevance of using DMPC:DPC bicelles for studying membrane proteins in solution and confirm the crucial role of lipids in the structure and function of mTSPO. Finally, we show that this environment is favorable for the crystallization of apo-mTSPO and for reconstituting the protein in DMPC nanodiscs.

To compare these results with a protein expressed under native conditions, we developed a new protocol for producing mTSPO in yeast cells. We managed to purify the protein in "apo" condition in DDM, a detergent known for solubilizing properly folded proteins, while retaining associated membrane lipids.

This thesis work (*i*) contributes to a better understanding of the structure/function of mTSPO in different amphiphilic environments to determine optimal conditions for higher-resolution structural studies, and (*ii*) provides a significant methodological contribution to the study of membrane proteins in solution.