

Projet « MacroTET »

Une super-machine de destruction des polypeptides chez un micro-organisme des abysses.

Coordinateur: B. Franzetti- Institut de Biologie Structurale, Grenoble

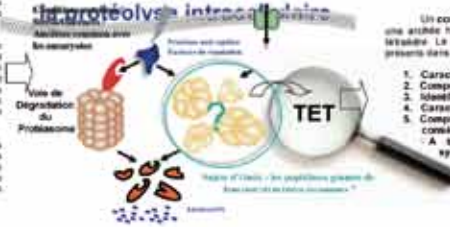


Contexte :

Le protéasome 20S est considéré comme le système central de la protéolyse ubiquitine chez les eucaryotes. Les Archaea forment un 2nd domaine du vivant où sont les bactéries et des eucaryotes. Ces organismes possèdent un protéasome « primitif » large eucaryote. Nous avons montré que la plupart des études survenues à date utilisent des protéines de l'archéobactérie *Halobacterium salinarum* ou des protéines eucaryotes dérivées de caséin du protéasome. Ceci suggère l'existence d'autres systèmes de protéolyse eucaryotes. L'exploration de ces systèmes représente un enjeu majeur en Biologie et en Biotechnologie.

L'objectif de laboratoire est de caractériser, chez les Archaea extrémophiles des complexes de protéasomes susceptibles de représenter des voies de dégradation alternatives du protéasome. Au-delà d'un intérêt en biologie fondamentale, ces complexes représentent des cibles pharmacologiques de choix. De plus leur capacité à rester stable et à fonctionner à 100°C, sous hautes pressions et à 500 psi, les rendent également un candidat fort pour les biotechnologies.

Les Archaea : des cellules modèles pour comprendre



Objectifs :

Un complexe peptidase de fonction inconnue a été découvert en 2002 au laboratoire chez une archéobactérie. Il comprend 12 sous-unités et forme des assemblages sous forme de tétramère. Le complexe a été nommé TET. Plusieurs gènes codants pour des protéines TET sont présents dans les génomes d'Archaea. Les objectifs du projet ANR MacroTET sont :

1. Caractériser les activités enzymatiques et les structures des différents TETs.
2. Comprendre pourquoi il existe plusieurs variantes de cette protéine.
3. Identifier les substrats et modes d'action des TETs.
4. Caractériser leurs limites de fonctionnement vis-à-vis de la contrainte extrême.
5. Comprendre comment les assemblages eucaryotes TET se forment et quelles sont les conséquences sur l'activité de la protéine.
 - A assigner une place aux protéines TET dans la protéolyse intracellulaire vis-à-vis du système protéasome.

Résultats :

Relations structure-fonction?

Structure cristallographique, recherche de substrats et enzymologie de 2 complexes TET de *Pyrococcus*

	PI/TET1	PI/TET2	PI/TET3
Substrats spécifiques d'halobactériennes eucaryotes	Basic	Acidic	Hydrophobic
Active site			
Catalytic chamber			

Tous les complexes TET ont des enzymologies
 Ces complexes TET possèdent des spécificités enzymologiques
 La spécificité des complexes TET est dictée par les propriétés électrostatiques de la cavité active

Mécanismes d'assemblage?

Ultra-centrifugation analytique
 Mutagenèse + Biophysique (ultra-centrifugation, diffusion aux petits angles)

Les enzymes catalytiques contrôlent l'assemblage
 L'assemblage de TET se fait par addition successive de dimères
 Structure du dimère en solution (MXS)
 L'ultra-centrifugation permet l'assemblage des TET

Mode d'action?

Cartes de densité expérimentales
 Canal d'entrée Site actif (S1)
 Modèle de fonctionnement des machines TET
 4 modules eucaryotes permettent le contact des polypeptides
 Leur assemblage leur procure catalytiques
 Validation expérimentale + développement mathématique de la RMN des grands assemblages (Collaboration groupe ADR/ISB) (ANR, Inserm, Agence Nationale de la Recherche)

Rôle(s) physiologique?

Archées Halophiles
 TET-2a
 TET-2b
 TET-2c
 TET-2d
 TET-2e
 TET-2f
 TET-2g
 TET-2h
 TET-2i
 TET-2j
 TET-2k
 TET-2l

Phénotype de mutant KO de création de dimères altéré la protéasome (complexes) d'activités peptidases / protéasomes

TET est un acteur clé de la réponse au stress métabolique TET n'est pas un partenaire ubiquitine de Protéasome Identification de nouveaux complexes peptidases génés de fonction inconnue

Extrémophilie?

Les TETs de *Pyrococcus* sont des Thermopiles actives par les hautes pressions

Protéasome Haute Pression et Enzymologie/Biophysique/Catalytographie à Hautes pressions et températures

Conclusion :

Le projet MacroTET a permis de montrer que les différents protéasomes TET possèdent des spécificités de substrats complémentaires et forment un **protéasome**. Nous montrons également que l'assemblage des 12 sous-unités est un moyen d'activer la protéase et que ce processus est régulé in vivo. L'ensemble de ce travail indique que les complexes TET ont pour fonction d'aider les microorganismes à croître en conditions de stress métabolique. Les études des complexes TET réalisés sous hautes températures et pressions ont débouché sur des perspectives d'applications industrielle ainsi que sur des usages potentiels en nano-médecine.

Perspectives :

Le projet MacroTET a ouvert des perspectives nouvelles dans le domaine de la protéolyse intracellulaire. En particulier il a permis de purifier le complexe d'activation du protéasome de *Pyrococcus* ouvrant ainsi la voie à des études structurales et fonctionnelles sur les voies d'adressage au protéasome qui n'étaient pas possibles avant. Le projet a également permis d'identifier 4 autres grands complexes peptidases de structure et de fonction inconnues. L'étude de ces systèmes présente un grand intérêt. L'étude des complexes TET se *Pyrococcus* a été initiée dans le cadre de l'ANR. Ces peptidases pourraient représenter des cibles pour des nouveaux antibiotiques. Ces perspectives ont été à l'origine d'un regroupement de chercheurs à CRBS pour aller à la création en 2011 d'un nouveau groupe de recherche. Un projet d'ANR Blanc, basé sur ces perspectives a été déposé en 2011 (Archéolys).

Valorisation :

- Un potentiel de valorisation important est apparu en cours d'étude. Il repose sur :
 - L'enzymologie particulière des complexes TET ainsi que sur la possibilité de tirer parti de la robustesse des particules TET en nano-science (Un projet de brevet est en cours de rédaction).
 - L'étude des complexes TET se *Pyrococcus* a été initiée dans le cadre de l'ANR. Ces peptidases pourraient représenter des cibles pour des nouveaux antibiotiques.
 - Le projet a servi d'incubateur pour développer à l'IBS de nouvelles approches en biologie structurale tirant parti de la thermostabilité des assemblages thermophiles :
 - La RMN rapide des grands assemblages (un financement ERC attribué à l'équipe RMN de l'IBS est directement issu de l'ANR MacroTET)
 - L'utilisation des hautes pressions et du phasage expérimental via les complexes de lamelles (une plan forme > haute pression > est directement issue du projet ANR)

Publications :

8 Publications acceptées :

- 1) Charbon, B., Gasser, D., and Franconi, B. (2010) The two 20S of *Pyrococcus* from *Halobacterium* are not equivalent to the bacterial 20S and have different specificities with the 20S proteasome. *Biochem J* 421: 307-317
- 2) Franconi, B., Gasser, D., Lantier, D., Simeoni, J., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) Structure of the active site pocket of the 20S proteasome from *Halobacterium*, a member of the 20S superfamily. *Biochemistry* 49: 11151-11159
- 3) Franconi, B., Charbon, B., Lantier, D., Gasser, D., Simeoni, J., and Franconi, B. (2010) The crystal and functional characterization of a novel TET peptidase complex from *Pyrococcus* homologous to the 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459
- 4) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459
- 5) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459
- 6) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459
- 7) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459
- 8) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459

2 Publications soumises (+3 en préparation) :

- 1) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459
- 2) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459
- 3) Franconi, B., Charbon, B., Gasser, D., Simeoni, J., Franconi, B., Charbon, B., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459

1 chapitre de Livre

Charbon, B., Gasser, D., and Franconi, B. (2010) TET is a novel 12-subunit 20S-like peptidase complex from *Pyrococcus*. *J. Biol. Chem.* 285: 11449-11459

CONTACT :
 B. Franzetti
 Groupe « extrémophiles et grands assemblages », Institut de Biologie Structurale- Grenoble
 franzetti@ibs.fr

