

**Identification de l'expérience**

date début-fin 13/04/01 – 14/04/01

n° proposition **30-01-311**nom du laboratoire ou nom du responsable du projet **L.E.B.S.**

nom des utilisateurs présents

Mme Petya CHRISTOVA, M Louis RENAULT

Mlle D. Makarenko, Mr. M. Knossow

nom du local contact Dr. Philippe CARPENTIER

**Temps de faisceau**

mode / intensité

temps alloué 3 shifts

temps utilisé 3 shifts

**Statistique d'utilisation**

MAD	oui [ ]	seuil:	non [X]	= 0.979
cryo	oui [X]		non [ ]	

**Rapport d'expérience et commentaires****Mme Petya CHRISTOVA, M Louis RENAULT**

Nous avons utilisé 1.5 shifts sur BM30A du 13 au 14 avril 2001 pour analyser des petits cristaux contenant potentiellement différents états transitoires de la réaction d'échange du nucléotide GDP pour la petite protéine fixant le GTP (ou protéines G) Arf.

Les protéines Arf régulent le bourgeonnement des vésicules de transports membranaires intracellulaires et l'activation de la phospholipase D en oscillant entre une conformation inactive associée à la fixation du GDP et une conformation active associée à la fixation du GTP. Pour beaucoup de protéines G, la transition rapide de la conformation protéine G/GDP inactive vers la conformation protéine G/GTP active est assurée par l'interaction avec les protéines facteurs d'échange du nucléotide guanine (ou GEF pour Guanine nucleotide Exchange Factor) au cours d'une réaction complexe encore mal comprise. Cette réaction comprend plusieurs étapes avec formations de complexe binaires et ternaires transitoires entre la protéine G, le nucléotide GDP ou GTP et le GEF. Nous avons essayé de cristalliser et d'analyser sur BM30A des cristaux contenant potentiellement certains de ces complexes transitoires de faible affinité piégés par l'utilisation de GEFs rendus abortifs pour la réaction d'échange du nucléotide par mutations ou par l'utilisation du seul inhibiteur connu pour la réaction d'échange du nucléotide sur une protéine G, la bréfeldine A qui inhibe spécifiquement l'activation des protéines Arf.

Nous avons donc collecté sur BM30A plusieurs jeux de données de cristaux obtenus entre différentes constructions de la protéine humaine Arf1, le nucléotide GDP et différentes

constructions et mutants du GEF ARNO humain ou du GEF Gea2 de levure en présence ou non de l'inhibiteur Bréfeldine A. Huit formes cristallines différentes avaient ainsi été obtenues représentant potentiellement différents états transitoires de la réaction d'échange de faible affinité. Ces cristaux étaient tous de petites tailles (plus petites dimensions < 50  $\mu\text{m}$ ) et très peu nombreux. Les structures de la protéine Arf et du domaine GEF d' ARNO ou de Gea2 étant connues, la collecte et le traitement des différents jeux sur BM30A nous ont permis d'apprendre qu'aucun de ces cristaux ne correspondait à un des états transitoires de la réaction d'échange. Les cristaux correspondaient soit à des cristaux de la protéine G complexée avec son GDP, soit à des cristaux du domaine GEF d' ARNO ou de Gea2. Ces tests sur BM30A nous ont donc été nécessaires pour évaluer une première partie de notre travail sur plusieurs constructions de protéines Arf et de domaines GEF.

#### **D. Makarenko, M. Knossow**

Les expériences effectuées pendant le 1,5 shift mis à notre disposition visaient à étudier une interaction de la protéine de matrice du Virus de la Stomatite Vésiculaire (M) avec les ions  $\text{PO}_4^-$  ou analogues ( $\text{SO}_4^-$ ). En effet la protéine M interagit avec la face interne des membranes cellulaires et la question de l'interaction avec les têtes de phospholipides se pose donc. Dans un premier temps, les ions phosphate (ou sulfate) ont semblé l'analogie la plus simple à analyser.

Des données de diffraction ont été mesurées avec des cristaux de M obtenus en présence de 100mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et de (100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Les données obtenues en présence d'ions sulfate étant de qualité nettement supérieure aux autres, elles ont été analysées complètement.

Le facteur d'accord  $R_{\text{sym}}$  est de 5.7% en tenant compte de toutes les données jusqu'à une résolution de 2.3 Å. Les paramètres de la maille montrent un changement de structure entre la forme cristallisée en présence d'acétate et la forme cristallisée en présence d'ions sulfate ; Le groupe de symétrie est inchangé ( $P4_212$ ), mais la maille change ( $a=b=79.8$  Å (80.7)  $c= 54.8$  Å (51.7)).

L'affinement montre une rotation de la protéine M dans la maille, sans changement de conformation. L'analyse de l'implication des ions sulfate dans ce mouvement est en cours.

**Publication** : Gaudier, M., Gaudin, Y. & Knossow, M. (2001) Cleavage of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Prevents Self-Association and Leads to Crystallization. **Virology**, 288, 308-314

La publication de la structure est soumise.