

---

**Identification de l'expérience**

date début-fin

6 shifts du 27/04/02-7:00 au 29/04/02-7:00

n° proposition 30-01-514

nom du laboratoire ou nom du responsable du projet      LEBS

nom des utilisateurs présents

Thomas Bertrand , Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales (LEBS), Bat. 34,  
CNRS, 1, avenue de la Terrasse, 91 198 Gif-Sur-Yvette

Pierre Briozzo, meme laboratoire

Guillaume Hible, meme laboratoire

Louis Renault, meme laboratoire

Ines Li De La Sierra Gallay, meme laboratoire

Herman Van Tilbeurgh, meme laboratoire

nom du local contact

Dr Jean-Luc FERRER

---

**Temps de faisceau**

mode / intensité

temps alloué

6 shifts

temps utilisé

6 shifts

---

**Statistique d'utilisation**

MAD

oui [ X ]

seuil: Se

non [X]

 $\lambda =$ 

cryo

oui [ X ]

non [ ]

---

**Rapport d'expérience et commentaires**

**Utilisateurs : Thomas BERTRAND, Pierre BRIOZZO (2 shifts)**

Protéine DeoX de *Salmonella typhimurium*, induite par le désoxyribose, présente chez de rares bactéries, et chez les souches pathogènes d'*E. coli*. Des données MAD de la protéine sélénée avaient été précédemment enregistrées sur BM14S, mais la qualité des cristaux (précipitant PEG 4000) n'était pas suffisante.

Nous avons le 27/4 retenté avec des conditions de cristallisation différentes (précipitant Na/K tartrate). Des données complètes de diffraction (MAD) ont pu être enregistrées, avec 360° de rotation pour chaque longueur d'onde. Le traitement de ces données indique de bien meilleurs paramètres que précédemment. Mais la recherche des sites Se reste infructueuse. Le cas est assez difficile : groupe d'espace P21, avec 6 molécules par unité asymétrique, et 15 méthionines dans la séquence. Donc 90 sites Sélénium.

Pour la suite du projet, un nouveau lot protéique obtenu en présence de DTT a produit des cristaux qui pourront être testés en MAD. Des cristaux de la protéine non sélénée ont été également infiltrés au mercure pour des essais de SIRAS (la protéine comporte 5 cystéines).

**Utilisateurs : Louis Renault, Guillaume Hible (1 shift)**

Lors de notre utilisation de la ligne BM30A le 28 avril 2002, nous avons testé pour 3 projets de remplacement moléculaire la diffraction de nouveaux petits cristaux dont la taille ou la faible limite de diffraction sur anode tournante nécessitaient l'utilisation de rayonnement synchrotron. Il s'agissait de cristaux des protéines G régulatrices Rab11 et GBP1 (Guanine nucleotide-binding protein 1) en complexe avec différents nucléotides guanine, et de la protéine ARNO (ARF nucleotide-binding site opener).

Rab11 est une petite protéine G de 24 kDa dont le cycle GDP/GTP régule le trafic vésiculaire endosomal. GBP1 est une grosse protéine G de 70 kDa ayant une activité antivirale encore mal comprise, caractérisée par une forte activité GTPase dépendant de l'état d'oligomérisation de la protéine et par sa capacité unique d'hydrolyser le GTP à la fois en GDP et GMP. Nous recherchons à résoudre ces protéines dans différents états conformationnels avec différents nucléotides guanine. La protéine ARNO est une protéine de 47 kDa composée de 3 domaines dont un domaine Sec7 facteur d'échange du nucléotide guanine spécifique aux petites protéines G Arf. L'activation des protéines G Arf par leur facteur d'échange lors du chargement du nucléotide GTP contrôle le bourgeonnement des vésicules de transport dans les mécanismes d'exocytose et d'endocytose. Nous cherchons à comprendre comment les différents domaines s'orientent et s'organisent pour réguler l'activation et la localisation des protéines Arf sur les membranes.

Nous avons testé la diffraction des cristaux de la petite protéine G Rab11 potentiellement en complexe avec du GTP/Mg<sup>2+</sup>, de la protéine G GBP1 (Guanine nucleotide-binding protein 1) obtenus dans plusieurs conditions de cristallisation différentes potentiellement dans différents états intermédiaires de la réaction d'hydrolyse du GTP en GDP et GMP et enfin de la protéine ARNO (ARF nucleotide-binding site opener) entière. Tous les cristaux diffractant à moyenne résolution sur BM30A (au mieux 3.5 Å pour des cristaux doubles de GBP1 obtenu avec du GMP et fluorure d'Aluminium) et/ou étant jumelés (spots multiples), aucun de ces projets n'a donné lieu à l'enregistrement d'un jeu de données. Nous avons néanmoins pu lors de notre passage sur BM30A déterminer les meilleures conditions de cristallisation de GBP1 avec différents nucléotides guanine en terme de résolution et d'obtention de cristaux monocristallins et optimiser la cryo-protection des cristaux que nous ne pouvions pas faire sur anode tournante en raison de leur faible limite de diffraction d'environ 7-6 Å. Ce travail préliminaire sur

BM30A nous a ainsi permis d'obtenir peu après un premier jeu à 2.8 Å sur ID14-EH1 pour GBP1 en complexe avec GMP+fluorure d'Aluminium et à 3 Å sur ID14-EH4 pour GBP1 potentiellement en complexe avec GDP+fluorure d'Aluminium, deux états différents normalement transitoires de la réaction d'hydrolyse du GTP.

**Utilisateurs : Ines Li De La Sierra Gallay, Herman Van Tilbeurgh (3 shifts)**

Protéine : GRD19 de la levure *S. cerevisiae* (nom systématique : YOR357c)

GRD19 est une protéine de 162 résidues, contenant un domaine de type PX. Nous avons collecté un jeu de données MAD à 2.8 Å de résolution sur la protéine marquée avec de la SeMet et un jeu de la protéine native à 2 Å de résolution.

Ces données ont permis de résoudre la structure de 133 derniers résidues de la protéine (le domaine PX inclus). L'affinement a été effectué à 2 Å et un article est actuellement en rédaction.

Protéine : YGR205w de la levure *S. cerevisiae*.

YGR205w est une protéine de 290 résidues et de fonction inconnue, mais qui présente une structure très similaire à celle de la pantothenase kinase. Nous avons enregistré un jeu de données de la protéine native à 2.9 Å de résolution afin de mener à terme l'affinement de la structure.

Protéine : YML079w de la levure *S. cerevisiae*.

YML079w contient 201 résidues et est de fonction inconnue. Nous avons collecté un jeu MAD sur la protéine marquée avec de la SeMet, les données anormales sont actuellement en dépouillement.