HAL
open science

Etudes structurales de la protéine PerR (Peroxide resistance Regulator): une métalloprotéine senseur de H2O2

Daouda A. K. Traoré

To cite this version:

Daouda A. K. Traoré. Etudes structurales de la protéine PerR (Peroxide resistance Regulator): une métalloprotéine senseur de H2O2. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00326161

HAL Id: tel-00326161

https://theses.hal.science/tel-00326161

Submitted on 2 Oct 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THÈSE

présentée par

Daouda A. K. TRAORE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Spécialité : **CHIMIE-BIOLOGIE**

Etudes structurales de la protéine PerR (Peroxide resistance Regulator) : une métalloprotéine senseur de H_2O_2

Thèse soutenue publiquement le 29 Spetembre 2008 devant la commission d'examen composée de :

Dr Victor DUARTE
Dr Jean-Luc FERRER
Dr Jean-Marc LATOUR
Dr Marie-Hélène LE DU
Dr Serge PÉREZ
Dr David PIGNOL
Dr Myriam SEEMANN
Dr Tim L. STEMMLER

Thèse préparée au

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (UMR 5249 CNRS/CEA/UJF)
Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant au CEA de Grenoble
et au
Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines
Institut de Biologie Structurale J. P. Ebel (UMR 5075 CEA/CNRS/UJF)

Remerciements

Ce travail de thèse est l'accomplissement de plusieurs années de dur labeur et il est coutume d'adresser un certain nombre de remerciements aux personnes ayant participé de près ou de loin (voir pas du tout) à l'aboutissement et au succès de celui-lui. Si je dois exprimer ma gratitude envers toutes ces personnes, il y aurait probablement plus de pages de remerciements que de rapport scientifique. J'ai donc choisi de faire le service minimum. J'espère vous comprendrez.

Je tiens donc à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail : les docteurs Myriam Seemann et David Pignol en tant que rapporteurs ; les docteurs Marie-Hélène LeDu et Tim Stemmler en tant qu'examinateurs ; les docteurs Victor Duarte, Jean-Marc Latour, Lilian Jacquamet et Jean-Luc Ferrer en tant co-directeurs et directeurs de thèse ; et enfin le docteur Serge Pérez en tant que président de ce jury.

En plus des remerciements d'usage, rédiger la suite de cette page constitue pour moi un véritable calvaire émotionnel. Ainsi, je tiens à adresser à hommage à Lilian Jacquamet qui nous brutalement quitté le 17 février 2008. Je ne reviendrai pas sur toutes ses qualités, mais plus qu'un encadrant, il restera mon « MENTOR ». Il m'a lancé des défis et m'a appris à m'en sortir, et sa disparition constitue l'ultime test qu'il m'aura fait subir.

Pour le reste, mes sincères remerciements vont à tous les membres de deux laboratoires dans lesquels j'ai effectué ce travail. Je suis venu comme étudiant, j'ai trouvé une famille avec des « Frelons d'or » et des « Pompes à vélo ». Mes remerciements à mes amis, de près comme de loin, à ma famille, et aux autres que je n'ai pas eu le temps citer.

A tout ce beau monde, « aw ni tché kossèbè ! »

à Lilian JACQUAMET

25 Mars 1971 - 17 Février 2008

« Tout prodige cache un fait scientifique dont le sens nous échappe »

SOMMAIRE

TIENS TIENS!
QUE NOUS CACHAIS-TU LÀ, OCTOPODE GREDIN ?
UN COFFRE ?
OOOH!

Table des matières

CHAPITRE I : Introduction Bibliographique..... 15

1.| Le stress oxydant : formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et conséquences 17

1.1.| L'oxygène et les espèces réactives de l'oxygène : le paradoxe de la vie aérobie..... 17

1.2.| Les espèces réactives de l'oxygène..... 18

1.3.| La notion de stress oxydant..... 19

1.4.| Réactivité des ROS et conséquences liées à leur accumulation 20

1.5.| ROS et signalisation cellulaire..... 23

2.| Mécanismes de défense : dégradation des ROS 24

2.1.| Les Superoxyde Dismutases (SOD)..... 24

2.2.| Les Superoxyde Réductases (SOR) 25

2.3.| Les catalases..... 26

2.4.| Les peroxydases à thiol..... 27

3.| Les régulateurs senseurs de H_2O_2 28

3.1.| La protéine OxyR chez *Escherichia coli*..... 28

3.2.| Le relais Orp1-Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiae*..... 30

3.3.| La réponse aux peroxydes chez *Bacillus subtilis* 33

4.| Analyse structurale des métallo-régulateurs bactériens 43

4.1.| La famille des régulateurs ArsR (ArsR/SmtB)..... 43

4.2.| La famille des régulateurs MerR..... 47

4.3.| La famille des régulateurs CsoR 51

4.4.| La famille des régulateurs CopY..... 52

4.5.| La famille des régulateurs NikR 53

4.6.| La famille des régulateurs DtxR 56

4.7.| La famille des régulateurs Fur..... 59

4.8.| Bilan de l'analyse structurale des métallo-régulateurs..... 65

5.| Présentation du travail de thèse 68

6.| Références Bibliographiques – Chapitre I 69

CHAPITRE II : Méthodes Cristallographiques et Spectroscopiques .. 81

1.| La cristallographie aux rayons X des protéines 83

1.1.| Principe de la cristallographie..... 83

1.2.| La condition de diffraction 84
1.3.| La cristallogenèse 86
1.4.| L'enregistrement et le traitement des données de diffraction 88
1.5.| La résolution de la structure d'une protéine 91
1.6.| Les critères d'évaluation d'un modèle atomique 95

2.| La spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX) 96

2.1.| Principe de la SAX 96
2.2.| L'enregistrement des données SAX 100
2.3.| Le traitement des données SAX 101

3.| Références Bibliographiques – Chapitre II 105

CHAPITRE III : L'apoproteine 107

1.| Obtention et caractérisation de la protéine 110

1.1.| Expression et purification 110
1.2.| Caractérisation de la protéine 111

2.| Cristallisation de la protéine 111
3.| Configuration de l'expérience de diffraction 112
4.| Publication 113
5.| Discussion 127
6.| Références Bibliographiques – Chapitre III 131

CHAPITRE IV : De l'apoproteine à la proteine active 133

1.| Les premiers tests de cristallisation 135
2.| Homogénéité des échantillons 135
3.| Nouvelle méthode d'expression de la protéine 136
4.| Structure de la protéine PerR-Zn-Mn 137

4.1.| Cristallogenèse de PerR-Zn-Mn : des conditions inédites 137
4.2.| Résolution de la structure de PerR-Zn-Mn 137
4.3.| Les sites métalliques 139

5.| SAX de PerR-Zn-Fe 140

5.1.| L'expérience 140
5.2.| Le Préseuil (analyse des pré-pics) 141
5.3.| Le XANES 142
5.4.| L'EXAFS 143

6.| Cristallogenèse de PerR-Zn-Fe **147**
7.| Conclusions – Discussion **147**
8.| Références Bibliographiques – Chapitre IV **151**

CHAPITRE V : PerR et la 2-oxo-histidine 153

1.| Localisation de l'oxydation **155**
2.| Expression et purification de la protéine oxydée **155**
3.| Cristallogenèse et cristallographie **156**
4.| Publication **157**
5.| Discussion **187**
6.| Références Bibliographiques – Chapitre V **193**

CHAPITRE VI : PerR et la PerR-box : interactions ADN/protéine.. 195

1.| Test d'interactions ADN/PerR **197**
2.| Cristallogenèse du complexe ADN/PerR **198**
2.1.| Préparation des échantillons 198
2.2.| Oligonucléotides utilisés 198
2.3.| Résumé de la cristallogenèse 200
3.| Modélisation du complexe ADN/PerR **202**
3.1.| Les acides aminées potentiellement impliqués 202
3.2.| Les nucléotides potentiellement impliqués 203
3.3.| Le modèle structural du complexe ADN/PerR 204
4.| Conclusions - Discussion **207**
5.| Références Bibliographiques - Chapitre VI **209**

CHAPITRE VII : Conclusion Generale & Discussion 211

CHAPITRE VIII : Methodes Biochimiques et Biophysiques 219

1.| Obtention de la protéine **221**
1.1.| Expression de la protéine 221
1.2.| Purification de la protéine 222
2.| Caractérisations de la protéine **223**

2.1.| Analyse des métaux 223
2.2.| La spectrométrie de masse des protéines 224
2.3.| Analyses électrophorétiques..... 224

3.| Interactions ADN/PerR 225

3.1.| Marquage radioactif des oligonucléotides..... 225
3.2.| Réaction d'interaction ADN/PerR 225
3.3.| Préparation du complexe ADN/PerR pour la cristallogenèse 225

Résumé 228
Abstract 228

CHAPITRE I

Introduction Bibliographique

1.| Le stress oxydant : formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et conséquences

1.1.| L'oxygène et les espèces réactives de l'oxygène : le paradoxe de la vie aérobie.

L'oxygène est à la fois indispensable et dangereux pour les êtres vivants qui l'utilisent. C'est le paradoxe de la vie aérobie. Ainsi, lorsque la concentration en oxygène moléculaire s'est élevée sur terre, il y a environ 2 milliards d'années, de nombreux organismes ont vraisemblablement été victimes d'une extermination par l'oxygène. Au cours de l'évolution, l'oxygène moléculaire est ensuite devenu le principal accepteur d'électrons dans le métabolisme cellulaire des organismes aérobies. Ainsi, le pouvoir oxydant de l'oxygène est utilisé dans la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale permettant la production efficace d'énergie. Au cours de ce processus, l'oxygène moléculaire est totalement réduit de manière contrôlée en molécule d'eau par l'apport de 4 électrons. Cette adaptation au milieu a engendré quelques problèmes pour lesquels les organismes ont dû trouver rapidement des parades. En effet, cette réduction conduit à des espèces intermédiaires appelées « **R**eactive **O**xygen **S**pecies » (Espèces Réactives de l'Oxygène) qui sont le radical anion superoxyde **($O_2^{\bullet -}$)**, le peroxyde d'hydrogène **(H_2O_2)** et le radical hydroxyle **($HO^{\bullet}$)** (Figure I.1). Ces dérivés réactifs de l'oxygène sont dangereux pour les cellules car ils peuvent s'attaquer aux protéines, aux acides nucléiques ainsi qu'aux lipides (Halliwell, 1996).

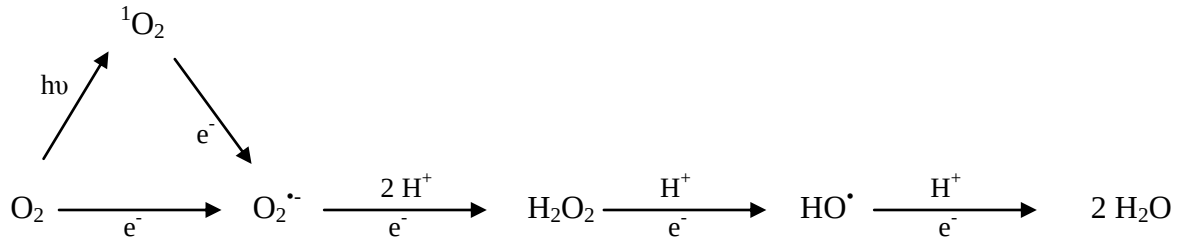


Figure I.1 : Réduction mono-électronique de l'oxygène moléculaire en eau. Cette réduction s'accompagne de la formation d'espèces partiellement réduites et réactives de l'oxygène.

1.2.| Les espèces réactives de l'oxygène

De part sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est avide d'électrons (d'où son caractère oxydant). Néanmoins, un blocage cinétique limite la réactivité du dioxygène, sinon nous nous enflammerions instantanément à l'air. Ce blocage cinétique s'explique par la structure électronique de l'oxygène (Figure I.2). Bien qu'il possède un nombre pair d'électrons, l'oxygène moléculaire présente deux électrons non appariés. Ces deux électrons ont le même nombre quantique de spin (spins parallèles). Cette « restriction de spin » impose donc une restriction du pouvoir oxydant de l'oxygène moléculaire vis-à-vis des molécules organiques non radicalaires. De ce fait, l'oxygène moléculaire ne peut transférer qu'un seul électron à la fois dans les réactions de transfert d'électrons, ce qui conduit à la formation des ROS.

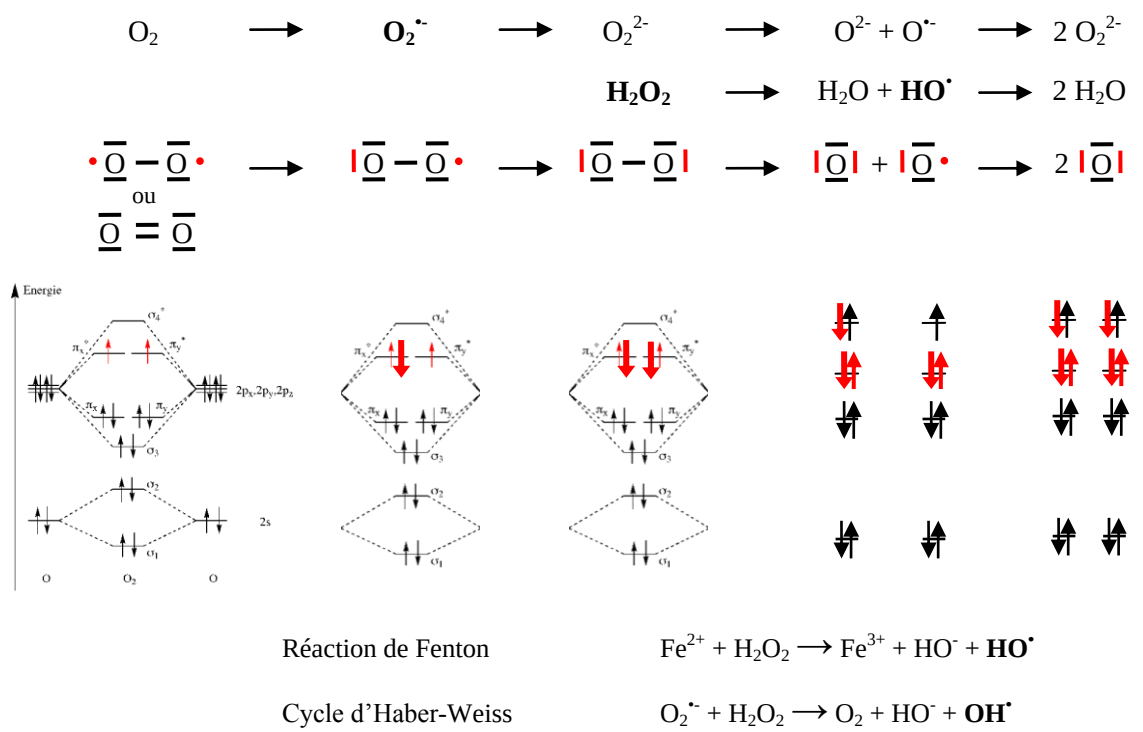


Figure I.2 : La réduction de l'oxygène moléculaire expliquée par le diagramme d'énergie des orbitales moléculaires. La réduction de l'oxygène se fait par l'apport d'un seul électron à la fois. La réduction du peroxyde d'hydrogène est catalysée le plus souvent par la réaction de Fenton.

L'activation de l'oxygène est possible par voie enzymatique ou par voie photochimique. La voie photochimique permet l'obtention de l'oxygène singulet ($^1O_2$) par irradiation UV, c'est le cas dans le photosystème II des chloroplastes.

Le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est obtenu par la réduction à un électron du dioxygène dans divers processus de photo-oxydation, chaîne mitochondriale de transport d'électrons, défense immunitaire ou encore oxydation de xénobiotiques (Fridovich, 1978a).

L'oxygène singulet et le radical anion superoxyde sont les intermédiaires réactifs de l'oxygène les plus abondants en biologie. $O_2^{\bullet-}$ est la principale source de tous les autres ROS (Scandalios, 2005).

Le peroxyde d'hydrogène est essentiellement formé par la dismutation de $O_2^{\bullet-}$. Cette dismutation peut être spontanée mais elle est le plus souvent catalysée par des enzymes appelées Superoxyde dismutases (Fridovich, 1978b; Fridovich, 1995). Le peroxyde d'hydrogène est également produit au cours des processus de respiration, de β-oxydation des acides gras et de défense immunitaire. Contrairement aux autres ROS, c'est une espèce non radicalaire et relativement stable en absence de métaux de transition ou de peroxydases.

Le radical hydroxyle est le plus puissant oxydant à un électron connu en biologie. Il est formé à partir de H_2O_2 en présence de cations métalliques comme le Fe^{2+} ou le Cu^+ par la réaction de Fenton (Figure I.2). $OH^\bullet$ peut-être formé par une réaction entre $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2. Cette réaction peut être spontanée ou catalysée par le fer ferreux *via* la réaction d'Haber-Weiss. Ces radicaux $HO^\bullet$ diffusent très peu car ils réagissent sur le lieu même de leur formation.

1.3.| La notion de stress oxydant

Le métabolisme normal de la cellule produit sans cesse des dérivés réactifs de l'oxygène. Les systèmes utilisant un transfert d'électrons (normalement étroitement contrôlé) sont parfois le lieu de fuites électroniques. La chaîne respiratoire, les oxydases (xanthine oxydase, NADPH oxydase, …) et les réductases sont responsables d'une production permanente d'espèces oxydantes (Gralla, 1997; Richter and Schweizer, 1997). Donc pour empêcher l'accumulation des ROS, la cellule utilise des systèmes antioxydants. De simples molécules anti-radicalaires comme les vitamines C et E, mais aussi des enzymes de détoxication comme la Superoxyde Dismutase (dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et O_2) et la catalase (dismutation de H_2O_2 en O_2 et H_2O) sont utilisées. La glutathion peroxydase, la quinone réductase et l'hème oxygénase sont des enzymes également impliquées dans la détoxication des ROS (Scandalios, 2005).

La notion de stress oxydant traduit un déséquilibre de la balance « ROS – Systèmes antioxydants ». L'accumulation de ROS peut être causée par un changement brutal d'environnement comme une surexposition à O_2, une élévation de la température, une carence nutritive, des radiations UV, des polluants métalliques ou gazeux, ou encore une exposition à des xénobiotiques (Scandalios, 2005). Ce stress peut provenir aussi d'une défaillance des systèmes antioxydants.

1.4.| Réactivité des ROS et conséquences liées à leur accumulation

1.4.1.| Le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)

Les propriétés réductrices et oxydantes du radical anion superoxyde sont évidentes dans la dismutation. Le radical anion superoxyde occupe une place suffisamment négative dans l'échelle des potentiels d'oxydoréduction pour se comporter comme un réducteur efficace vis-à-vis d'une série de molécules et de cations métalliques (Keyer and Imlay, 1996). Il présente néanmoins une réactivité spécifique vis-à-vis du fer (Figure I.2) ou d'autres cations métalliques comme le cuivre (II). En tant qu'oxydant, il entraîne en particulier la destruction (totale ou partielle) des centres fer-soufre (Fridovich, 1997). L'oxydation de ces centres conduit à l'inactivation de plusieurs enzymes (parmi lesquelles certaines ont des activités essentielles au métabolisme cellulaire) et à une libération massive de fer. Le métal ainsi relargué peut conduire à la production de radicaux hydroxyles. Pouvant se comporter indifféremment comme oxydant ou réducteur, le radical anion superoxyde est peu toxique par lui-même, mais sa toxicité se trouve accrue par sa capacité à former des radicaux hydroxyles.

1.4.2.| Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Bien que présentant une réactivité assez limitée, l'une des caractéristiques essentielles d'H_2O_2 est sa réactivité spécifique avec les résidus cystéine ou méthionine des protéines (Gilbert, 1990). L'oxydation d'une cystéine par H_2O_2 entraine la formation d'un acide sulfénique (Cys-SOH). Celui-ci peut réagir avec une autre cystéine pour former un pont disulfure, ou s'oxyder en acide sulfonique (Cys-SO_2H) ou sulfinique (Cys-SO_3H).

Le peroxyde d'hydrogène est aussi responsable de certains dommages : pontages ADN/protéines ou lésions de l'ADN provoqués par les radicaux formés par la réaction de Fenton (Imlay *et al.*, 1988; Imlay and Linn, 1988).

1.4.3.| Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle, incontestablement le plus agressif des ROS, peut réagir avec l'ensemble des composants cellulaires. Les réactions d'additions conduisent par exemple à l'hydroxylation des bases puriques, pyrimidiques et de certains acides aminés aromatiques. $HO^{\bullet}$ peut également arracher un électron, le plus souvent sous forme $H^{\bullet}$ à une autre molécule qui devient à son tour radicalaire ($ROOH + HO^{\bullet} \rightarrow ROO^{\bullet} + H_2O$). Ce phénomène est par exemple impliqué dans l'initiation des réactions en chaîne responsables de la peroxydation lipidique (Halliwell and Gutteridge, 1984; Lai and Piette, 1978).

1.4.4.| Conséquences

Les ROS étant capables de réagir à différents niveaux dans les cellules (Figure I.3), les conséquences liées à leur accumulation peuvent être très graves (Berlett and Stadtman, 1997; Dean *et al.*, 1997; Stadtman and Berlett, 1997). Les dommages sur les lipides, principalement ciblés sur les acides gras de la bicouche membranaire, entraînent une cassure des parois cellulaires. L'oxydation d'un ou plusieurs acides aminés des protéines peut conduire d'une part à une inactivation de celles-ci et d'autre part à des pontages protéine-protéine ou ADN/protéine. Cette oxydation augmente alors la sensibilité à la protéolyse (Berlett and Stadtman, 1997; Dean *et al.*, 1997; Stadtman and Berlett, 1997). Les dommages oxydatifs sur les acides nucléiques entraînent des mutations et des dégradations des bases pouvant provoquer le clivage d'un brin d'ADN. Les pontages ADN/protéine générés par oxydation de l'ADN ou de la protéine peuvent provoquer un dérèglement de la machinerie réplicative (Beckman and Ames, 1997; Burrows and Muller, 1998). Toutes les réactions engendrées par ces dommages oxydatifs peuvent être la cause de mutations, de cancers et au final provoquer la mort cellulaire.

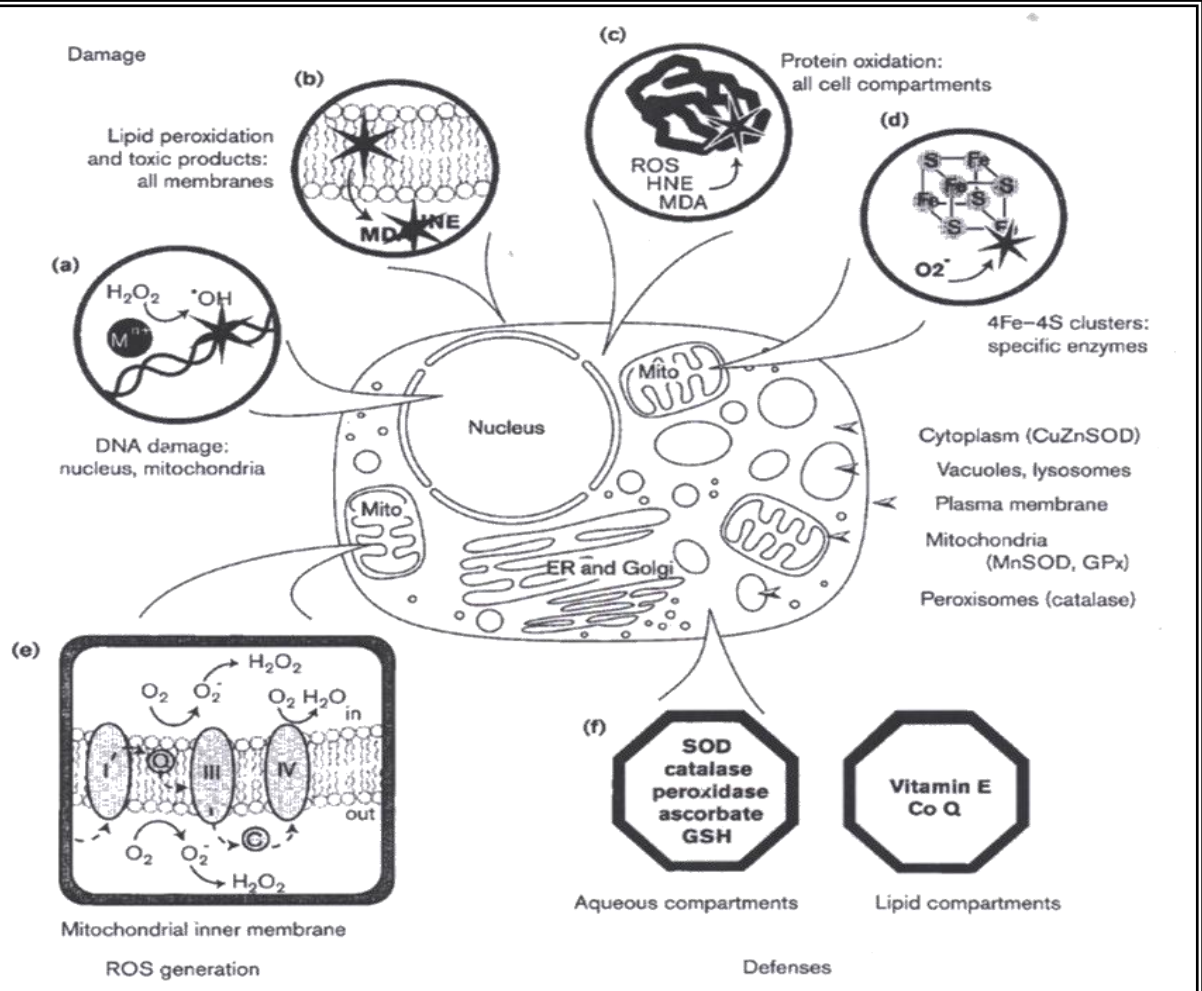


Figure I.3 : Représentation schématique de certaines voies conduisant au phénomène de stress oxydant et de certains systèmes de défense dans une cellule procaryote (figure tirée de Valentine *et al.*, 1998). Il existe quatre classes de dommages oxydatifs : **(a)** Dommages sur l'ADN provoqués par des oxydations spécifiques dues aux radicaux hydroxyles engendrés par la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et certains ions métalliques. **(b)** Peroxydation lipidique, entrainant des dommages sur les membranes. Ce mécanisme engendre également d'autres produits toxiques comme le malondialdehyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) qui peuvent réagir avec d'autres composants cellulaires. **(c)** Dommages provenant de l'oxydation directe des protéines par les espèces réactives de l'oxygène ou de sous-produits provenant des peroxydations lipidiques. **(d)** Réaction directe entre l'anion superoxyde et certains agrégats fer-soufre des protéines. Ces réactions entraînent le désassemblage de ces agrégats, l'inactivation des enzymes correspondantes et la libération de fer. Cette libération peut engendrer d'autres dommages oxydatifs catalysés par la réaction de Fenton. **(e)** Représentation schématique de la principale source intrinsèque de peroxyde d'hydrogène et d'anion superoxyde dans la cellule. Des fuites électroniques peuvent avoir lieu au sein de la chaîne de transport d'électrons. **(f)** Molécules de défense : la localisation cellulaire de chacune d'entre elles est indiquée.

1.5.| ROS et signalisation cellulaire

La majeure partie des publications concernant le stress oxydant démontre clairement les effets toxiques des ROS. Il ne faut cependant pas négliger que de manière très fortement contrôlée, les ROS jouent des rôles cruciaux dans certaines fonctions cellulaires (Scandalios, 2004). $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 sont notamment décrits comme étant des messagers secondaires dans des mécanismes tels que la division cellulaire, la signalisation par les facteurs de croissance, le transport d'ions (Ca^{2+}), l'activation des facteurs de transcription et l'apoptose. Ainsi, les ROS ne sont pas que des « déchets » issus de l'adaptation des organismes à l'oxygène. Il est désormais admis qu'ils font partie intégrante des mécanismes de signalisation cellulaire et de l'homéostasie redox (Delaunay *et al.*, 2000; Lander, 1997; Scandalios, 2004; Zheng and Storz, 2000).

Comme exemples, les facteurs de transcription NF-κB (Nuclear Factor κB) et AP-1 (Activator Protein-1) sont activés par l'action directe de H_2O_2. Ces protéines ont un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la morphogenèse. Certaines plantes produisent de façon rapide et transitoire d'abondantes quantités de ROS pour lutter contre une invasion de pathogènes (Scandalios, 1997).

L'activation des systèmes permettant la mise en place des mécanismes de dégradation des ROS est finement contrôlée par des régulateurs spécifiques. Ces régulateurs réagissent le plus souvent de façon directe avec l'espèce réactive concernée. Quelques systèmes de régulation seront décrits dans la suite du manuscrit. Auparavant, nous nous intéresserons aux systèmes permettant de palier une accumulation de ROS dans la cellule.

2.| Mécanismes de défense : dégradation des ROS

En condition de stress oxydant, la réponse naturelle la mieux adaptée pour l'organisme est la mise en place de mécanismes de détoxication. Ces mécanismes reposent essentiellement sur l'expression d'enzymes capables de prendre en charge et d'éliminer ces ROS. (Dalton *et al.*, 1999; Scandalios, 2004). Afin de palier aux effets toxiques des ROS, les organismes disposent d'un arsenal de défenses antioxydants à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Les défenses non enzymatiques sont en général de petites molécules comme les vitamines C et E, le glutathion et le β-carotène qui piègent les ROS. Les systèmes enzymatiques comme les Superoxyde Dismutases (SOD), les catalases et les peroxydases piègent le radical anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pour les convertir en espèces moins réactives et moins toxiques. Dans la suite de ce chapitre seuls les systèmes enzymatiques seront présentés.

2.1.| Les Superoxyde Dismutases (SOD)

Les Superoxyde Dismutases sont des métallo-enzymes qui catalysent la dismutation du radical anion superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène (Figure I.4). La dismutation s'effectue en deux étapes : le métal de transition présent au sein du site actif de l'enzyme est tout d'abord réduit par une première molécule de $O_2^{\bullet-}$, libérant O_2. Ensuite, une deuxième molécule de $O_2^{\bullet-}$ ré-oxyde le métal catalytique en libérant H_2O_2.

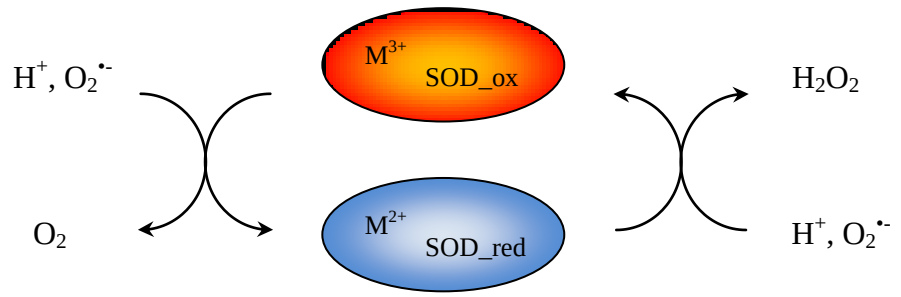


Figure I.4 : Cycle catalytique de la Superoxyde Dismutase. $M^{2+/3+}$ correspond au métal du site catalytique de l'enzyme. SOD_ox : SOD oxydée ; SOD-red : SOD réduite.

Les SOD ont été caractérisées chez de nombreux organismes. Il existe quatre différentes classes de SOD en fonction de la nature du métal de transition présent au sein du

site catalytique : les SOD à fer (Fe-SOD), les SOD à manganèse (Mn-SOD) (Weisiger and Fridovich, 1973), les SOD cuivre - zinc (Cu/Zn-SOD, le zinc jouant un rôle structural) (Crapo *et al.*, 1992) et les SOD à nickel (Ni-SOD) (Youn *et al.*, 1996). Les SOD étaient connues comme les seules enzymes capables d'éliminer le radical anion superoxyde, jusqu'à la découverte en 2000 des Superoxyde Réductase (SOR) (Lombard *et al.*, 2000).

2.2.| Les Superoxyde Réductases (SOR)

La Superoxyde Réductase est une enzyme qui élimine le radical anion superoxyde par réduction à un électron (Figure I.5). Cette enzyme a été identifiée chez des bactéries strictement anaérobies comme *Desulfoarculus baarsi*, *Archeoglobus fulgidus* ou encore *Treponema palildum*. La SOR est une métalloprotéine contenant un site actif à fer ferreux non-héminique (Lombard *et al.*, 2000; Niviere and Fontecave, 2004). La vitesse de réaction de réduction de $O_2^{\bullet-}$ au niveau du site catalytique de l'enzyme est de l'ordre de 10^9 M^{-1}. s^{-1} et permet de limiter efficacement la diffusion du radical anion dans la cellule.

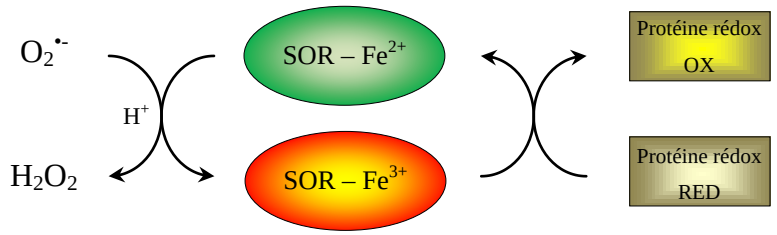


Figure I.5 : Cycle catalytique de la superoxyde réductase (Niviere and Fontecave, 2004). RED : réductrice ; OX : oxydante

Après réduction du radical anion, l'enzyme est régénérée car elle est capable d'accepter les électrons d'une large gamme de donneurs (NADPH-flavodoxine réductase Fpr, cytochromes, rubrédoxine). L'enzyme ne semble pas reconnaître un réducteur spécifique (Emerson *et al.*, 2003).

Les Superoxyde Dismutases et les Superoxyde Réductases permettent ainsi de prévenir la toxicité liée au radical anion superoxyde. Cependant, ces réactions de dismutation ou de réduction de $O_2^{\bullet-}$ conduisent à la formation de peroxyde d'hydrogène. Cette réponse peut sembler inappropriée car le peroxyde d'hydrogène formé est également toxique et peut

conduire à la formation de radicaux $HO^{\bullet}$ (Figure I.2). Les catalases interviennent alors pour dégrader le peroxyde d'hydrogène.

2.3.| Les catalases

Les catalases font partie des toutes premières enzymes caractérisées chez *E. coli* (Loewen, 1984; Skarstad *et al.*, 1985). Ce sont des protéines héminiques présentes dans tous les organismes. Localisées dans le peroxysome, elles possèdent une très forte affinité pour H_2O_2 permettant de limiter sa diffusion dans la cellule. (Scandalios, 2005).

La catalase est l'une des enzymes les plus efficaces du monde vivant. La réaction de décomposition de H_2O_2 est effectuée avec un « turnover » d'environ 10^7 min^{-1}. En fonction de la concentration en H_2O_2, la catalase présente une double activité. A forte concentration en peroxyde d'hydrogène, l'activité catalytique de l'enzyme s'effectue avec H_2O_2 qui intervient à la fois comme donneur et accepteur d'électrons (Figure I.6). Le cycle catalytique passe par un intermédiaire de type Fe(V)-oxo. A faible concentration en H_2O_2 (inférieure à 1 µM), elle agit comme une peroxydase, qui fait intervenir des cofacteurs donneurs d'électrons selon la réaction $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$.

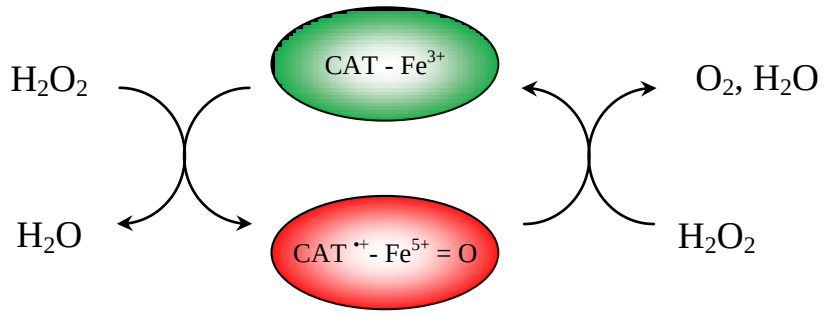


Figure I.6 : Représentation schématique du cycle catalytique de la catalase (Loewen *et al.*, 2004).

Les catalases sont uniques du fait qu'elles n'ont pas besoin de cofacteur réducteur, ce qui est plus économique d'un point de vue énergétique pour la cellule. En cas de stress impliquant une surproduction de H_2O_2, les catalases ont la capacité de dégrader rapidement et efficacement H_2O_2 et ceci sans consommer d'énergie. Ayant une très grande vitesse de réaction ($1{,}7.10^7$ $M^{-1}.$ s^{-1}), la protéine n'est jamais saturée en H_2O_2. Il a été proposé que les catalases soient les seules protéines impliquées directement dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène (Scandalios, 2005).

2.4.| Les peroxydases à thiol

Les peroxydases sont des enzymes qui catalysent la réduction des peroxydes en leur alcool correspondant. Le substrat optionnel pour ces enzymes est le peroxyde d'hydrogène mais le plus souvent, ces enzymes réduisent des peroxydes organiques suivant la réaction : $ROOH \rightarrow ROH + H_2O$.

Deux classes majeures de peroxydases à thiol sont connues : les peroxyrédoxines (Prx) (Poole, 1996) et les glutathion peroxydases (Gpx) (Ursini *et al.*, 1995). L'activité de ces enzymes repose sur la présence d'une cystéine réactive capable de réaliser une attaque nucléophile sur la fonction peroxyde. Cette réaction entraîne la libération d'une molécule d'alcool (ou H_2O), et la formation d'un acide sulfénique (Cys-SOH) au niveau du site catalytique (Wood *et al.*, 2003b). Cet acide sulfénique réagit ensuite avec une autre fonction thiol pour former un pont disulfure inter- ou intra-moléculaire, avec libération d'une deuxième molécule d'alcool (ou H_2O). Ces enzymes sont ensuite régénérées par réduction du pont disulfure par des thioredoxines (Holmgren, 1985; Holmgren and Bjornstedt, 1995).

Partant du constat que des ROS (H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$) peuvent être impliquées dans la régulation de certaines fonctions cellulaires, la cellule doit détecter la concentration seuil à partir de laquelle ces espèces peuvent devenir toxiques. La détection est effectuée par le biais de protéines senseurs spécifiques d'un ROS. Le dépassement du seuil se traduit le plus souvent par une réaction directe du ROS sur la protéine senseur. Dans la suite du processus, ces protéines convertissent alors ce signal en une réponse transcriptionnelle.

3.| Les régulateurs senseurs de H_2O_2

Le senseur du peroxyde d'hydrogène le mieux décrit dans la littérature est la protéine OxyR d'*E. coli*. La caractérisation des mécanismes moléculaires de l'activation d'OxyR a permis d'établir la spécificité du processus de détection de H_2O_2 (Green and Paget, 2004; Paget and Buttner, 2003). Alors qu'OxyR joue le rôle de senseur et de régulateur dans la réponse à H_2O_2, ces deux fonctions sont découplées pour le complexe Orp1-Yap1, son homologue chez la levure *S. cerevisiae*. Orp1 joue le rôle de détecteur et Yap1 celui d'activateur de la transcription (Toledano *et al.*, 2004). Chez *Bacillus subtilis*, la réponse aux peroxydes est contrôlée par trois facteurs de transcription : σ^B, OhrR et PerR. Les modes d'action de ces différents facteurs seront décrits en insistant plus particulièrement sur le cas de la protéine PerR de *B. subtilis* qui constitue l'objet de ce travail de thèse. Bien que les modes d'activation de ces régulateurs soient différents, les gènes régulés peuvent être communs, c'est par exemple le cas des gènes codant les catalases.

3.1.| La protéine OxyR chez *Escherichia coli*

La protéine OxyR est un senseur du peroxyde d'hydrogène chez la bactérie *E. coli*. Il a aussi été montré qu'OxyR est activable par des peroxydes organiques ou des peroxynitrites (Hausladen *et al.*, 1996). OxyR remplit parfaitement son rôle de senseur puisqu'elle peut détecter des concentrations très faibles d'H_2O_2 (excédant à peine la concentration physiologique : 20 nM) (Aslund *et al.*, 1999). De par cette sensibilité, OxyR est le principal senseur de la concentration intracellulaire en H_2O_2 (Belousov *et al.*, 2006). Plus d'une vingtaine de gènes régulés par OxyR sont dénombrés (Tao, 1997; Zheng *et al.*, 2001a; Zheng *et al.*, 2001b). Parmi ceux-ci se trouvent des gènes codant des protéines de détoxication comme une catalase (*katG*) et deux alkylhydroperoxyde reductase (*ahpC* et *ahpF*). Les gènes *grxA* et *gorA* sont également retrouvés et codent respectivement une glutaredoxine et une glutathion réductase. De la même façon, sont retrouvés, d'autres gènes codant d'importants régulateurs (*fur*) et le gène *oxyS* codant un petit ARN antisens. L'ARN antisens s'hybride sur les ARN messagers des gènes cibles afin de bloquer leur traduction. La protéine OxyR fonctionne comme un répresseur de sa propre fonction (Christman *et al.*, 1989).

Le mécanisme réactionnel de détection de H_2O_2 par OxyR repose sur l'oxydation d'un seul résidu, la cystéine 199, en acide sulfénique. Ce dernier réagit ensuite avec la cystéine 208

pour former un pont disulfure (Choi *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 1998)(Figure I.7). OxyR peut être réactivée par réduction de ce pont disulfure par la glutaredoxine Grx1. La vitesse de formation de l'acide sulfénique est très grande (~ 1.1 x 10^5 M^{-1}. s^{-1}) et reflète la grande sensibilité de la cystéine 199 vis-à-vis de H_2O_2 (Lee *et al.*, 2004).

Les études structurales (Choi *et al.*, 2001) ont permis de mettre en évidence le changement de conformation d'OxyR lors de son oxydation par H_2O_2 (Figure I.8). Dans la structure cristallographique de la protéine réduite, la cystéine 199 est enfouie dans une cavité hydrophobe et située à 17 Å de la cystéine 208. Après son oxydation, la cystéine se retrouve dans un envoironnement hydrophobe, qui, en combinaison avec les contraintes stériques, peut expliquer l'expulsion de cette dernière et le changement de conformation de la protéine. Suite à ce réarrangement, la cystéine 199 se retrouve à proximité de la cystéine 208, ce qui permet la formation du pont disulfure (Choi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Cette modification entraîne une réorganisation globale de la structure, qui permet la fixation d'OxyR sur les promoteurs des gènes régulés. Il est important de noter, que OxyR régule des gènes codant des enzymes de « feed-back » (*grxA* et *gorA*) chargées de régénérer OxyR.

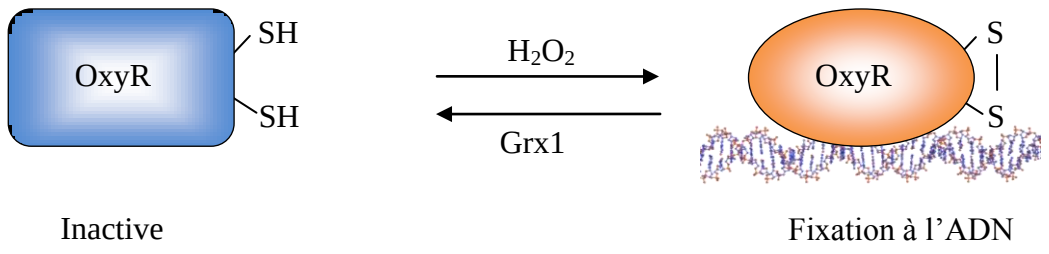


Figure I.7 : Mécanisme d'activation d'OxyR par H_2O_2. H_2O_2 oxyde la cystéine 199 de la protéine en acide sulfénique qui réagit ensuite avec la cystéine 208, formant un pont disulfure (Zheng *et al.*, 1998). Le changement de conformation induit par cette oxydation permet à la protéine de se fixer à l'ADN. OxyR est désactivée par la glutaredoxine-1 (Grx1).

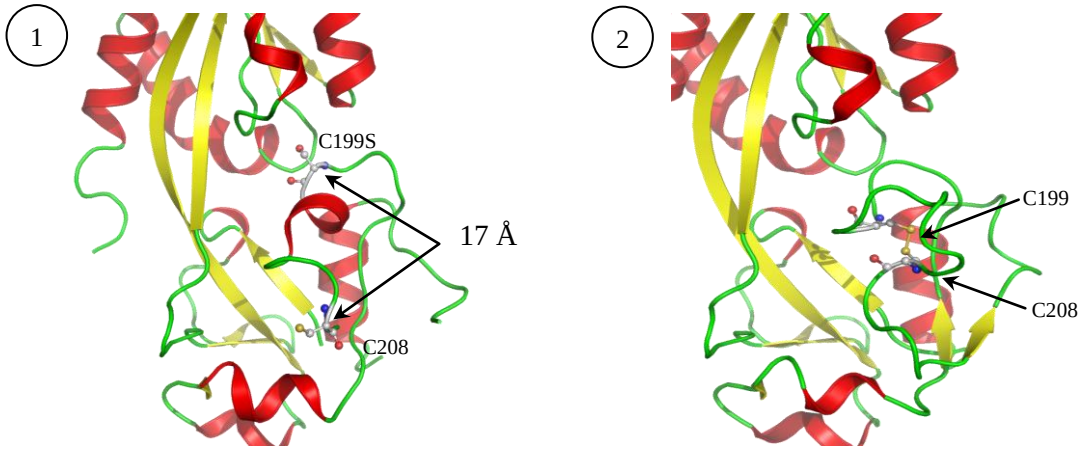


Figure I.8 : Zoom sur l'environnement des cystéines actives dans la structure cristallographique de la protéine OxyR (Choi *et al.*, 2001). ① OxyR réduite ; la cystéine 199 a été mutée en sérine pour éviter la formation du pont disulfure. ② OxyR oxydée avec présence du pont disulfure.

Le mécanisme d'activation décrit ici est valable pour la plupart des gènes régulés par OxyR à l'exception des gènes *oxyR* et *oxyS*. Dans ce cas, la protéine OxyR reste fixée à l'ADN et bloque la transcription. La réaction entre H_2O_2 et la protéine induit un changement conformationnel de la protéine qui se répercute sur la conformation de l'ADN. La polymérase peut alors accéder à l'ADN pour initier la transcription.

3.2.| Le relais Orp1-Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiae*

La détection et la réponse au peroxyde d'hydrogène chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* font intervenir deux protéines : la protéine Orp1 et le facteur de transcription Yap1. Les fonctions de détection et de régulation sont ainsi découplées chez *S. cerevisiae*, faisant du relais Orp1-Yap1 l'équivalent d'OxyR d'*E. coli* (Toledano *et al.*, 2004).

L'étude du régulon Yap1 par électrophorèse bidimensionnelle (Lee *et al.*, 1999) ou par la technique des puces à ADN (Gasch *et al.*, 2000) a permis d'identifier au moins soixante-dix protéines dont l'expression est contrôlée par Yap1 en réponse à H_2O_2. Parmi celles-ci, il existe une majorité de protéines anti-oxydantes (Carmel-Harel *et al.*, 2001; Collinson and Dawes, 1995; Grant *et al.*, 1996; Kuge and Jones, 1994; Morgan *et al.*, 1997) telles que GSH1 (une γ-glutamylcystéine synthétase), GLR1 (une glutathion réductase), GPX2 (une glutathion peroxydase), TRX2 (une thioredoxine), TRR1 (une thioredoxine réductase), TSA1 et AHP1 (deux thioredoxine peroxydases).

Le mécanisme réactionnel peut être scindé en deux parties : une étape de détection du peroxyde et une étape de régulation permettant la mise en place des systèmes de défense. Le mécanisme d'activation du relais Orp1-Yap1 est représenté sur la Figure I.9. Le système est initialement activé par la formation d'un acide sulfénique sur la cystéine 36 d'Orp1 sous l'effet de H_2O_2 (Figure I.9-①). Cette réaction conduit à la formation consécutive de deux ponts disulfures (inter- et intra-moléculaires) faisant intervenir les domaines N- et C-CRD-terminaux (Cystein Rich Domain) (Delaunay *et al.*, 2002) de Yap1 selon la séquence suivante : l'acide sulfénique Orp1-Cys38-SOH réagit avec la cystéine 598 de Yap1 formant le pont disulfure inter-moléculaire (Figure I.9-②); le second pont disulfure est formé par condensation des cystéines 598 et 303 de Yap1, suivi de la libération d'Orp1 qui se retrouve réduite (Figure I.9-③). Très récemment, la formation d'un deuxième pont disulfure intra-moléculaire a été mise en évidence entre les cystéines 310 et 629 dans Yap1 (Wood *et al.*, 2003a) (Figure I.9-④). Ce pont disulfure serait formé en suivant la même séquence que la formation du premier (celui impliquant les cystéines 303 et 598). Même si l'existence du dernier pont disulfure n'a pas été clairement établie *in vivo*, les auteurs suggèrent qu'il pourrait stabiliser la protéine Yap1 en la maintenant sous sa forme oxydée. Il a également été montré que l'oxydation de Yap1 par Orp1 fait intervenir la protéine Ypb1 dont la fonction n'est pas encore totalement décrite mais dont le rôle s'avère crucial dans l'activation de Yap1 par Orp1 (Gulshan *et al.*, 2005; Veal *et al.*, 2003). Ypb1 jouerait un rôle de chaperonne permettant le rapprochement de la cystéine 598 de Yap1 avec l'acide sulfénique Cys36-SOH d'Orp1. Elle pourrait aussi empêcher la formation d'un pont disulfure intra-moléculaire dans Orp1.

Outre ses domaines CRD, Yap1 possède un domaine NES (Nuclear Export Signal). En conditions normales, Yap1 interagit avec l'exportine Crm-1 (dans le noyau) et avec l'importine Pse1 (dans le cytoplasme) comme illustré par la Figure I.10. La formation du premier pont disulfure intra-moléculaire dans Yap1 induit un changement de conformation qui masque le NES, abolissant uniquement l'export (Kuge *et al.*, 1998). Ainsi, Yap1 s'accumule dans le noyau où elle active l'expression des gènes cibles. La fonction normale (d'import-export) de la protéine est réactivée grâce à l'intervention d'une thioredoxine (Trx2) (Carmel-Harel *et al.*, 2001; Delaunay *et al.*, 2000; Izawa *et al.*, 1999).

De façon indépendante à l'activation par Orp1, Yap1 peut être activée par des composés chimiques comme le diamide (Kuge and Jones, 1994) ou des métaux lourds tel que le cadmium (Wemmie *et al.*, 1994). La détection et la régulation de ces derniers se feraient selon un mécanisme différent de celui de H_2O_2.

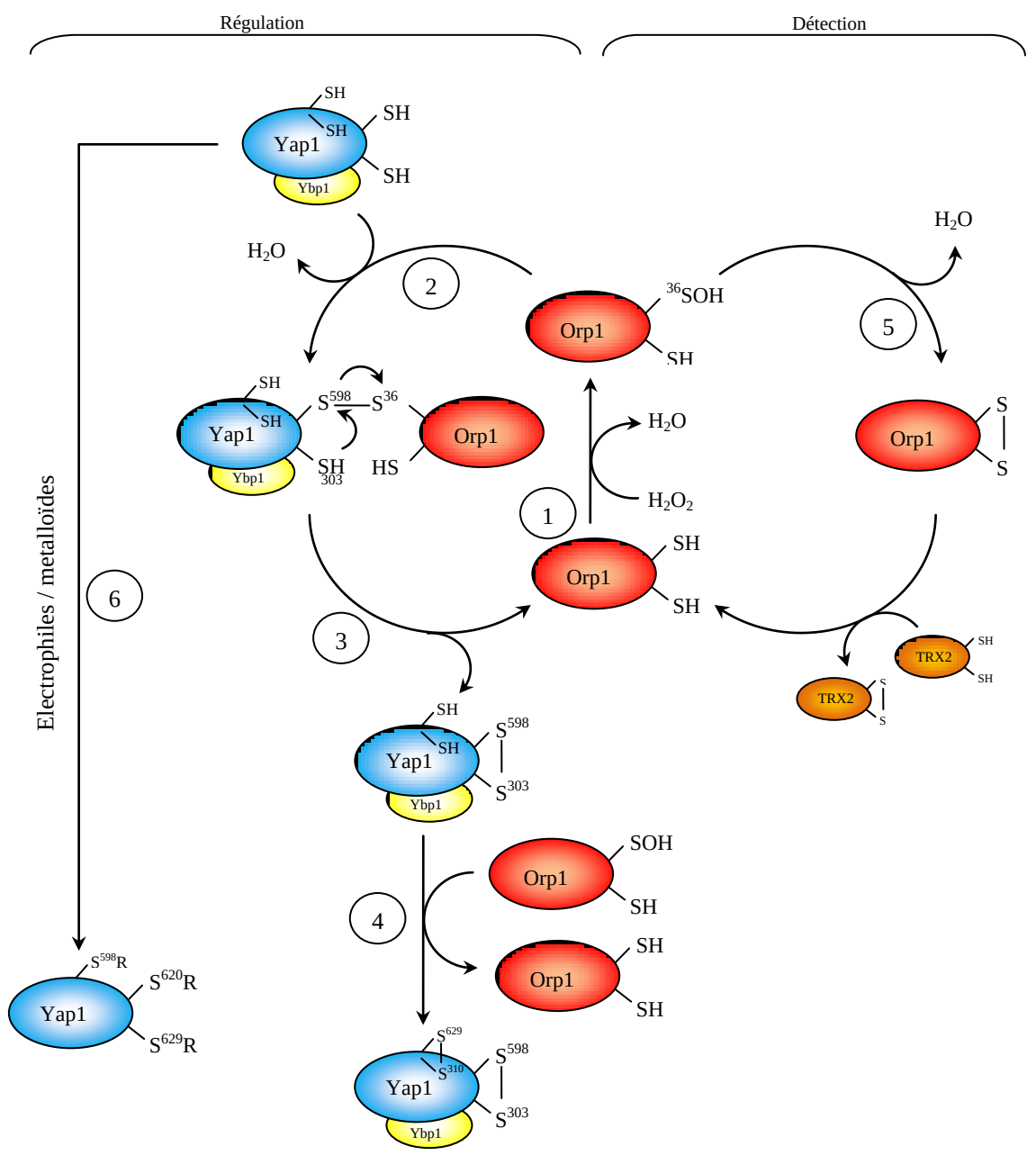


Figure I.9 : Représentation schématique de la réponse à H_2O_2 chez la levure *S. cerevisiase* par le relais Orp1-Yap1 (D'Autreaux and Toledano, 2007). A partir de ① Orp1 réagit avec H_2O_2 au niveau de la cystéine 36. L'acide sulfénique Cys36-SOH formé réagit avec la cystéine 598 du domaine C-CRD terminal de Yap1 pour former un pont disulfure inter-moléculaire (②). Ce pont est ensuite transposé par un échange de thiol entre la cystéine 36 d'Orp1 et la cystéine 303 du domaine N-CRD terminal, formant le premier pont disulfure intra-moléculaire dans Yap1 (③). Le deuxième pont disulfure de Yap1 (Cys310-Cys629) serait formé suivant le même chemin réactionnel faisant intervenir une deuxième molécule d'Orp1 oxydée (chemins réactionnels ① à ④). En ⑤ Orp1 peut également fonctionner selon le principe d'une peroxydase, avec un cycle catalytique faisant intervenir la cystéine 82 avec formation d'un pont disulfure intra-moléculaire qui est par la suite réduit par une thioredoxine. Il est intéressant de noter que le mutant C36S d'Orp1 est incapable d'activer Yap1. Par ailleurs, Yap1 peut être activée par des composés électrophiles ou par des métalloïdes ⑥.

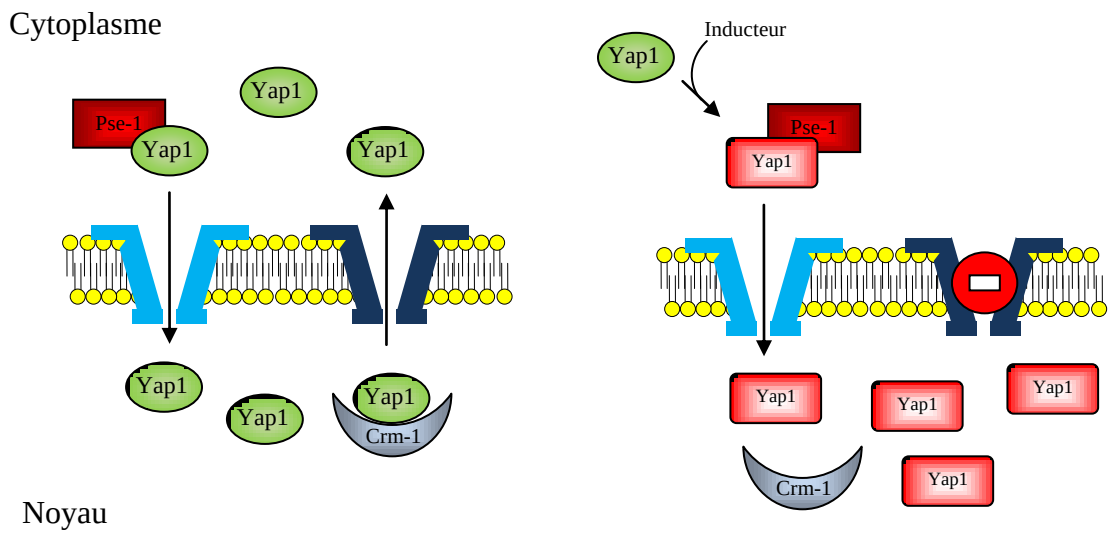


Figure I.10 : Localisation cellulaire de Yap1. En conditions normales, Yap1 est continuellement importée dans le noyau par l'importine Pse-1 et exportée hors du noyau par l'exportine Crm-1. En présence d'un stress H_2O_2, l'interaction entre Yap1 et Crm-1 est interrompue, et Yap1 s'accumule dans le noyau (Delaunay *et al.*, 2000).

3.3.| La réponse aux peroxydes chez *Bacillus subtilis*

Chez *Bacillus subtilis*, la réponse aux peroxydes est sous le contrôle de trois facteurs de transcription (Helmann *et al.*, 2003) : σ^B, OhrR et PerR. Les analyses par électrophorèse bidimensionnelle et par la technique des puces à ADN ont permis d'identifier l'ensemble des gènes exprimés (ou réprimés) lors d'une exposition à différents stress peroxydiques.

3.3.1.| Le facteur de transcription σ^B

Le facteur σ^B est activé chez *B. subtilis* dès que la bactérie est exposée à un stress. Le régulon σ^B contient plus de cent cinquante gènes impliqués dans la réponse à différents stress : choc thermique, stress acide, stress alcalin ou stress osmotique (Hecker and Volker, 2001). On retrouve aussi des protéines exprimées en réponse à un stress oxydant comme les catalases KatB, KatX, et la protéine Dps impliquée dans la protection de l'ADN. Ainsi, le facteur σ^B n'est pas spécifique d'une réponse à un stress oxydant. Ce facteur s'avère essentiel à la survie des bactéries Gram-positif en conditions non favorables. Les mécanismes d'activation de ce facteur en fonction d'un stimulus peroxydique sont à ce jour mal connus.

Chez *B. subtilis*, la réponse aux peroxydes est plus spécifiquement contrôlée par les deux facteurs décrits par la suite.

3.3.2.| La protéine OhrR

La protéine OhrR (**O**rganic **h**ydroperoxide **r**esistance **R**egulator) est un homo-dimère qui régule l'expression de gènes impliqués dans la défense contre les hydroperoxydes organiques. Cette protéine est un membre de la famille des protéines MarR (Multiple antibiotic resistance Regulator). Ces protéines contrôlent l'expression de gènes de résistance à différents agents toxiques (antibiotiques, solvants organiques, détergents) (Seoane and Levy, 1995; Sulavik *et al.*, 1995).

3.3.2.1.| Mécanisme d'activation

En conditions normales, OhrR réprime la transcription en restant constamment fixée sur le promoteur *ohrA* (codant la protéine OhrA, une peroxydase à thiol (Fuangthong *et al.*, 2001)). La levée de répression est induite en présence d'un hydroperoxyde organique (peroxydes lipidiques ou hydroperoxyde de cumène) qui réagit avec l'unique cystéine de la protéine (Cys15) pour donner un acide sulfénique (Cys15-SOH). En 2002, le groupe d'Helmann proposait que cette forme oxydée de la protéine suffisait à abolir la fixation à l'ADN (Fuangthong and Helmann, 2002). Récemment, le même groupe est revenu sur cette hypothèse en montrant que cette oxydation ne suffit pas pour lever la répression (Lee *et al.*, 2007). En effet, la protéine OhrR-Cys15-SOH se fixe toujours au promoteur *ohrA*. Les auteurs proposent ainsi trois voies réactionnelles qui découlent de la première oxydation permettant d'aboutir à une levée de répression (Figure I.11). D'une part, l'acide sulfénique peut être oxydé en acide sulfinique, puis acide sulfonique (respectivement $CysSO_2H$ et $CysSO_3H$). D'autre part, la fonction thiolate d'une petite molécule soufrée (cystéine ou glutathion) permettrait la formation d'un pont disulfure. Et enfin, la dernière voie serait la condensation d'un amide d'une liaison peptidique (N-Phe16) sur l'acide sulfénique pour former un sulfénamide.

La réduction de la cystéine activée par traitement avec un agent réducteur comme le DTT permet de retrouver la fixation de l'ADN. Les différents modes d'activation d'OhrR sont illustrés par la Figure I.11. D'après les derniers résultats publiés par Sonsanga *et al*, l'oxydation de l'acide sulfénique en acides sulfinique et sulfonique est irréversible

(Soonsanga *et al.*, 2008). Le mécanisme de détection des peroxydes serait réversible ou sacrificiel selon la nature de la molécule oxydante.

Contrairement à OxyR ou au système Orp1-Yap1, aucune formation de pont disulfure intra-moléculaire n'est observée (Fuangthong and Helmann, 2002).

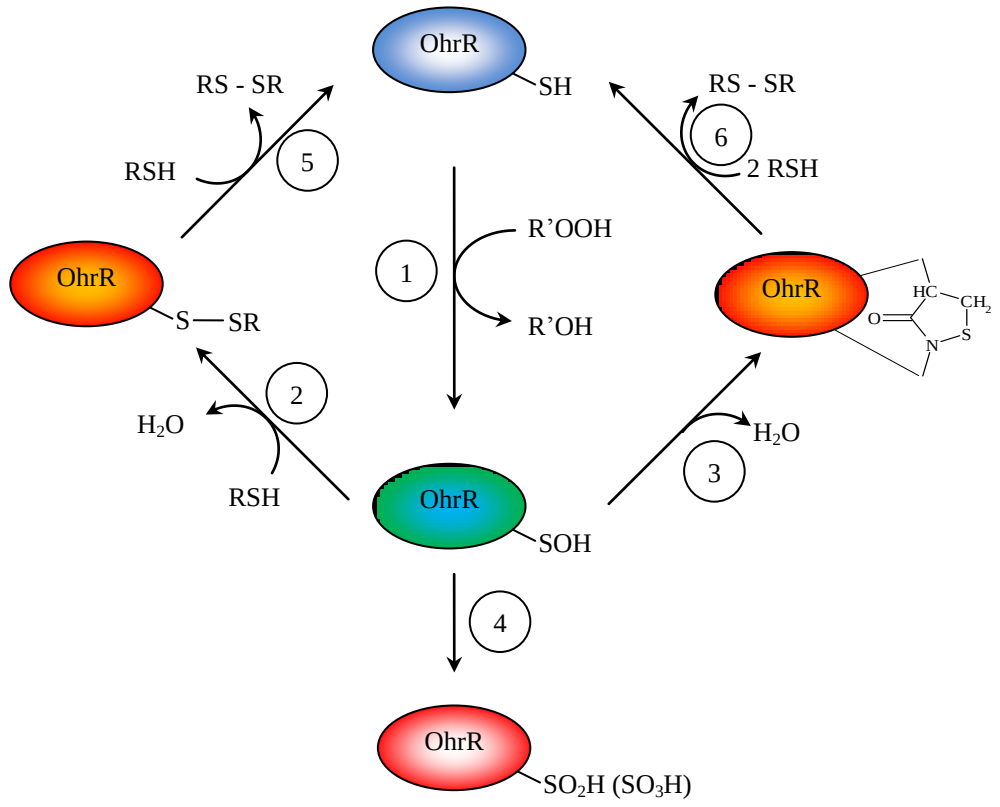


Figure I.11 : Mécanisme de détection des hydroperoxydes organiques par OhrR (Soonsanga *et al.*, 2008). OhrR réagit rapidement avec R'OOH pour former un acide sulfénique (①). Celui-ci peut réagir ensuite avec une fonction thiol (②) pour former un pont disulfure inter-moléculaire. L'acide sulfénique peut également réagir avec un amide d'une liaison peptidique pour former un sulfénamide (③). Si la concentration en thiols disponibles est trop faible, une suroxydation peut avoir lieu (④). Dans les deux cas (② et ③), la protéine est régénérée (⑤ et ⑥)

3.3.2.2.| Données structurales

Les structures cristallographiques d'OhrR (Figure I.12) et du complexe OhrR-*ohrA* (Figure I.13) ont été résolues (Hong *et al.*, 2005).

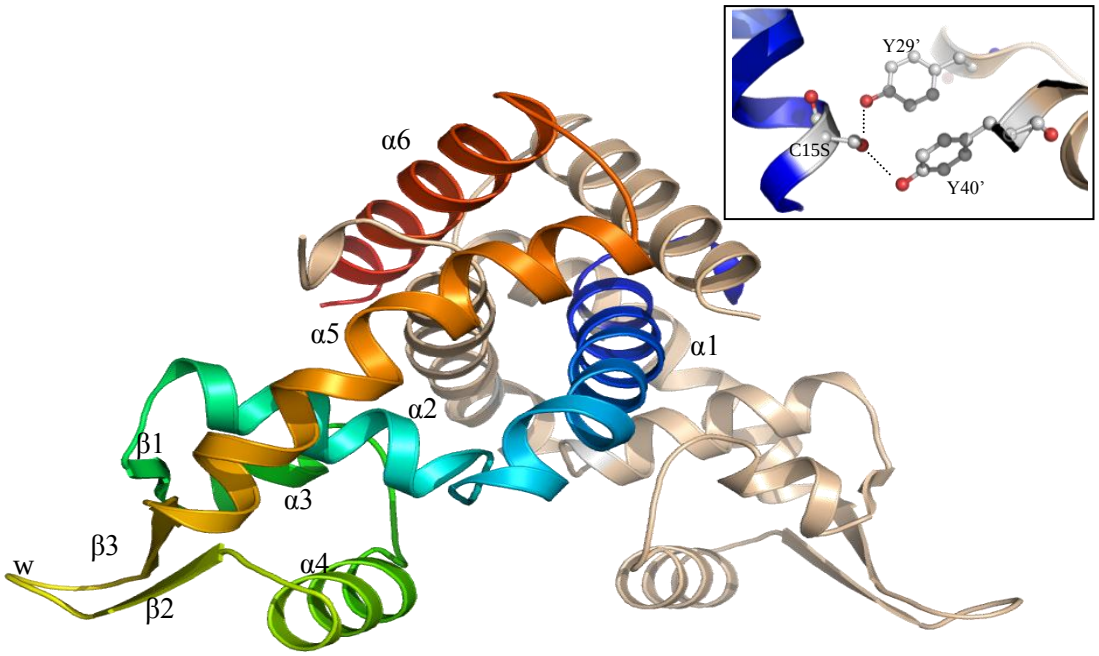


Figure I.12 : Structure cristallographique de la protéine réduite OhrR de *B. subtilis* (Hong *et al.*, 2005). Les structures secondaires sont annotées sur l'un des monomères. Dans l'encadré, zoom sur la cystéine réactive mutée en sérine.

La structure de la protéine OhrR présente une forme globulaire triangulaire avec un motif de fixation à l'ADN de type wHTH (winged Helix-Turn-Helix) à deux des extrémités. La protéine présente une flexibilité du domaine N-terminal qui facilite les transitions entre fixation et dissociation de l'ADN (Lim *et al.*, 2002).

OhrR contient six hélices α et trois brins β par sous-unité. L'interface de dimérisation fait intervenir les domaines N (hélices α1 et α2) et C-terminaux (hélices α5 et α6). Le motif wHTH de fixation à l'ADN fait intervenir successivement α3, α4, β2 et β3.

La structure du complexe ADN/protéine révèle qu'OhrR bloque la transcription en empêchant l'approche de l'ARN polymérase dans la région -10 du promoteur *ohrA*. Les deux motifs wHTH fixent deux grands sillons consécutifs du promoteur (Figure I.13).

Cette étude structurale a également permis de décrire l'environnement de la cystéine active (pKa = 5,2). La forme thiolate, qui présente une importante accessibilité au solvant, est stabilisée par des liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles des tyrosines 29 et 40. Celles-ci sont situées respectivement sur les hélices α1 et α2 du deuxième monomère (encadré Figure I.12). L'importance des deux tyrosines 29 et 40 dans OhrR est soulignée par Soonsanga e*t al* grâce à des expériences de mutagenèse dirigée (Soonsanga *et al.*, 2007)

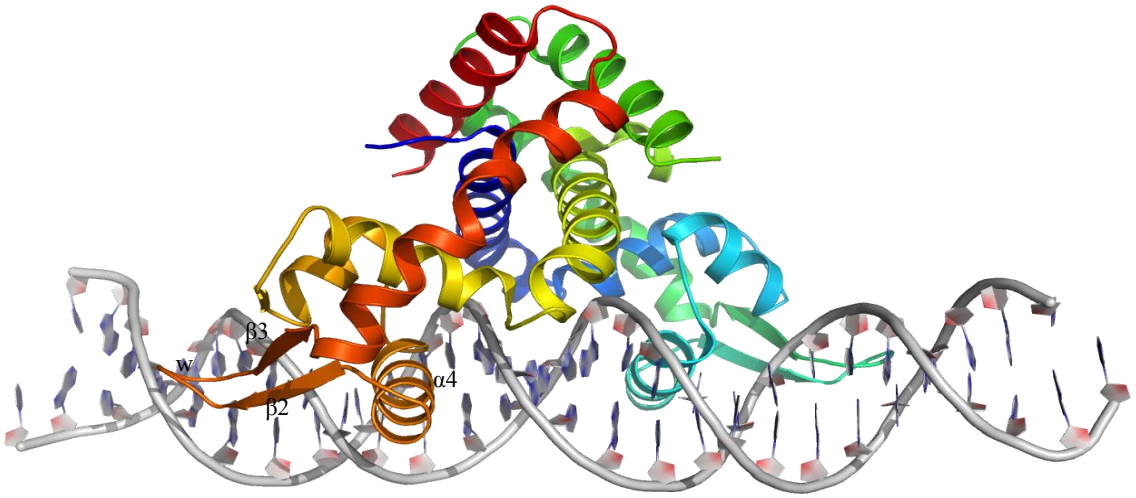


Figure I.13 : Structure cristallographique du complexe OhrR-*ohrA* (Hong *et al.*, 2005).

Le système OhrR-*ohrA* est peu sensible au peroxyde d'hydrogène. Ce facteur répond ainsi spécifiquement *in vivo* et *in vitro* aux hydroperoxydes organiques comme l'hydroperoxyde de cumène ou l'hydroperoxyde tertiobutylique (Soonsanga *et al.*, 2008). La présence d'une longue chaine continue d'acides aminés non polaires ($Y_{43}LALLLLW_{50}$), conservée chez les homologues d'OhrR explique probablement cette spécificité. Cette chaine d'acides aminés se comporterait comme une « piste d'atterrissage » pour le peroxyde organique. Les expériences de mutagenèse dirigée sur la protéine OhrR de *X. campestris* sur ces résidus hydrophobes confirment cette hypothèse (Klomsiri *et al.*, 2005).

3.3.3.| La protéine PerR

La protéine PerR (**Pe**roxide **r**esistance **R**egulator) est le senseur du peroxyde d'hydrogène chez *B. subtilis*. La protéine PerR a été identifiée pour la première fois chez *B. subtilis* comme répresseur métal-dépendant du gène *mrgA*. Ce dernier fortement réprimé en présence de plusieurs métaux dont le manganèse et le fer (Bsat *et al.*, 1998; Chen and Helmann, 1995), code une protéine de protection de l'ADN (MrgA) qui est un homologue de la protéine Dps d'*E. coli* (Hartford and Dowds, 1994). La protéine PerR a été caractérisée pour la première fois en tant que métalloprotéine appartenant à la famille Fur (**F**erric **u**ptake **r**egulator) (Bsat *et al.*, 1998; Chen and Helmann, 1995). Chez *B. subtilis*, la protéine PerR est le régulateur de la réponse à H_2O_2 et constitue l'analogue fonctionnel d'OxyR d'*E. coli*.

3.3.3.1.| Les différentes formes métallées de PerR

Comme la majorité des protéines « Fur-like », PerR est une protéine dimérique de deux fois cent quarante-cinq acides aminés. Des études biochimiques réalisées *in vivo* et *in vitro* indiquent la présence de deux sites métalliques : un site à zinc structural (Zn^{2+}) et un site dit de régulation qui présente une forte affinité pour le fer (Fe^{2+}) et le manganèse (Mn^{2+}). La protéine peut donc exister sous deux formes : PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn. En outre, la présence du métal dans le site de régulation est indispensable à la fixation à l'ADN (Fuangthong *et al.*, 2002).

3.3.3.2.| Les gènes régulés par PerR

La protéine PerR régule des gènes impliqués dans la résistance à H_2O_2. Les gènes régulés sont les suivants :

- *mrgA* : code la protéine MrgA qui séquestre le Fe^{2+} à proximité de l'ADN, l'empêchant de réagir avec H_2O_2 par réaction de Fenton.
- *katA* : code la catalase KatA.
- *ahpC et F* : codent deux alkylhydroperoxyde réductases.
- *hemA,X,C,D,B et L* : codent des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'hème.
- *zosA* : code un transporteur de zinc.
- *fur* : code la protéine Fur, impliquée dans l'homéostasie du fer.
- *perR* : code la protéine PerR qui régule sa propre expression.

3.3.3.3.| Mécanisme d'activation par H_2O_2

Dans les conditions physiologiques, PerR agit comme répresseur de la transcription des gènes cités. La séquence consensus reconnue par la protéine appelée « PerR-box » est un motif de type 7-1-7 (TTATAATNATTATAA, N = T ou A). Chacun des gènes régulés par PerR est précédé d'une ou plusieurs PerR-box (Fuangthong and Helmann, 2003).
In vitro, l'absence du métal régulateur empêche la fixation de l'ADN. PerR utilise donc le manganèse ou le fer comme corépresseur de la transcription (Fuangthong *et al.*, 2002).

Les tests d'expression de différents gènes régulés par PerR ont été effectués par le groupe d'Helmann. Ces expériences ont été réalisées en milieu minimum avec un excès de Mn^{2+} ou de Fe^{2+} en présence de H_2O_2 (Fuangthong *et al.*, 2002; Herbig and Helmann, 2001).

Les résultats indiquent que les deux formes de la protéine PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn diffèrent dans leur réponse au peroxyde d'hydrogène. En effet, la forme à fer est très réactive vis-à-vis d'H_2O_2 alors que la forme à manganèse l'est nettement moins. La protéine PerR-Zn-Mn joue essentiellement un rôle de répresseur. Ces travaux suggèrent donc que la forme à fer est le véritable senseur des peroxydes *in vivo* (Moore *et al.*, 2004). Ces auteurs mentionnent également que, parmi les gènes du régulon PerR, seuls *perR* et *fur* ne sont pas activés en présence d'H_2O_2 et donc très probablement réprimés par la protéine PerR-Zn-Mn. Ce résultat confirme que la protéine PerR peut exister, *in vivo*, sous différentes formes métallées et que les gènes régulés par PerR ne sont pas tous inductibles par le peroxyde d'hydrogène (Fuangthong *et al.*, 2002).

1.1.1.1.1.| Premières hypothèses sur le mécanisme d'inactivation de PerR par H_2O_2

Au début de ce travail, le mécanisme moléculaire d'inactivation de PerR par le peroxyde d'hydrogène n'était pas connu. Trois hypothèses avaient été émises pour expliquer les différentes étapes conduisant à la levée de la répression des gènes régulés par PerR (Gaballa and Helmann, 2002; Herbig and Helmann, 2001).

Dans une première hypothèse, H_2O_2 réagirait directement avec le métal de régulation. Celui-ci serait alors oxydé et relargué, entrainant la levée de répression. PerR pourrait ensuite fixer un autre métal divalent et s'associer à nouveau à l'ADN.

Dans une deuxième hypothèse, une ou plusieurs cystéines de PerR coordinées au métal de régulation réagiraient avec H_2O_2. Leur oxydation conduirait alors à la formation d'un pont disulfure entraînant la libération du métal de régulation. Ce modèle était fortement inspiré des senseurs tels qu'OxyR ou Orp1-Yap1.

Une dernière hypothèse propose que la réaction de H_2O_2 avec le métal de régulation (en l'occurrence Fe^{2+}) entraînerait la formation d'un radical hydroxyle (réaction de type Fenton). Le métal oxydé serait relargué et $OH^{\bullet}$ oxyderait un ou plusieurs ligands du site de régulation, conduisant à l'inactivation de la protéine. Cette dernière hypothèse permet d'expliquer la différence de sensibilité entre PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

3.3.3.3.1.| Le dernier mécanisme proposé

Dans deux études très récentes (Lee and Helmann, 2006a; Lee and Helmann, 2006b), les auteurs tranchent en faveur de la troisième hypothèse et excluent le rôle des cystéines dans le mécanisme d'activation.

Par homologie avec la structure de la forme active de la protéine Fur de *P. aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003), ces auteurs proposent que les quatre cystéines (Cys96, 99, 136 et 139) de chaque monomère coordinent un zinc structural (Lee and Helmann, 2006a). Cinq autres résidus sont proposés comme ligands du métal de régulation (les histidines 37, 91 et 93 et les aspartates 85 et 104). Des expériences de mutagenèse dirigée montrent que l'ensemble de ces résidus sont essentiels à l'activité de la protéine. Ces travaux soulignent également la différence de réactivité entre les formes PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn vis-à-vis de H_2O_2. Le mécanisme d'activation de la protéine PerR est illustré par la Figure I.14.

En présence de H_2O_2, une réaction du type Fenton conduirait à la formation d'un radical hydroxyle. Du fait de sa forte réactivité, ce dernier ne diffuse pas, il oxyderait alors sélectivement une histidine (37 et/ou 91) présente dans la première sphère de coordination du métal en 2-oxo-histidine.

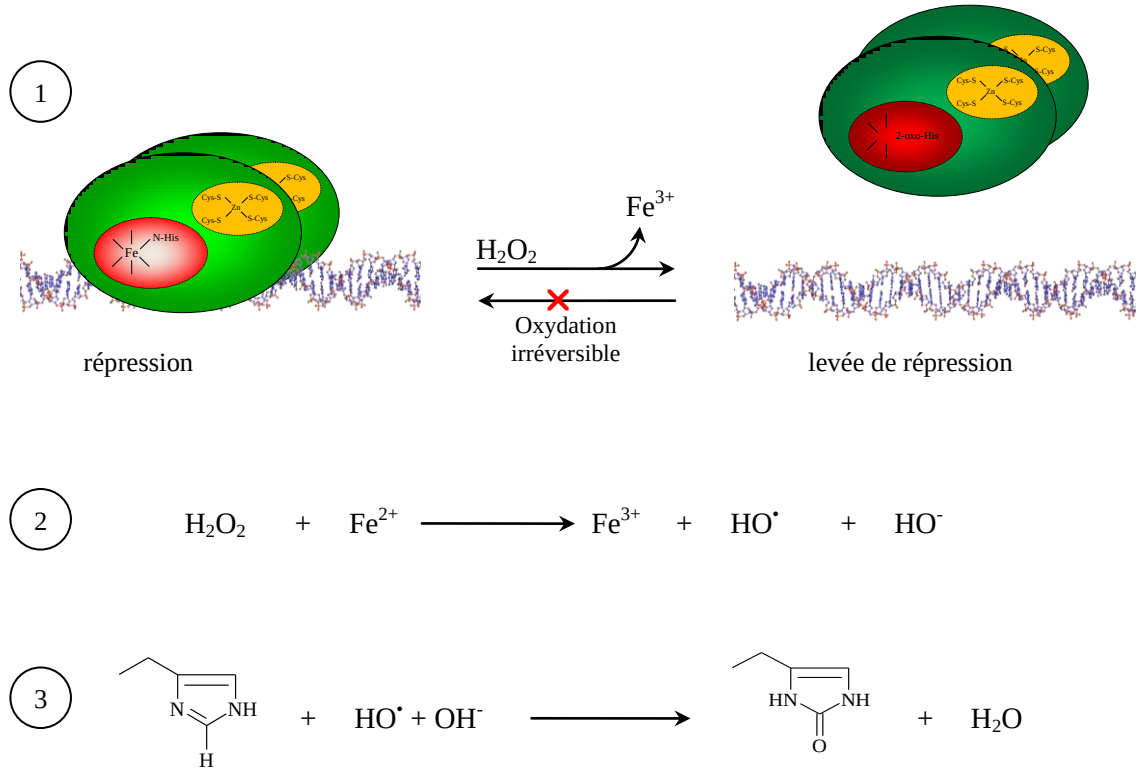


Figure I.14 : Mécanisme d'activation proposé pour la protéine PerR. ① En présence de H_2O_2, la réaction de H_2O_2 centrée sur le métal entraîne la levée de répression. ② La réaction de type Fenton a lieu au sein du site de régulation. Le radical hydroxyle ainsi formé, va réagir avec une des histidines présentes dans la première sphère de coordination du métal. ③ Oxydation de l'histidine par $HO^{\bullet}$ en 2-oxo-histidine.

Ce mécanisme d'oxydation centré sur le métal contraste de manière étonnante avec les autres senseurs de peroxydes qui réagissent au niveau de leur fonction thiol (Paget and Buttner, 2003). Au départ suspectée, cette oxydation est beaucoup trop lente *in vivo* pour être considérée comme le centre de la réactivité (Lee and Helmann, 2006a; Traore *et al.*, 2006a).

3.3.3.4.| PerR est présent chez de nombreux organismes

Les protéines PerR et « PerR-like » (protéines senseurs d'H_2O_2 de la famille de Fur) ont été décrites chez une grande variété d'organismes. PerR est notamment présent chez la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*. En plus de réguler, comme chez *B. subtilis*, l'expression des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant, PerR contrôle un régulon de stockage du fer (Horsburgh *et al.*, 2001). La répression de la transcription est liée de manière spécifique à la fixation du fer par la protéine. En présence de concentrations élevées en fer, il y a levée de répression (Horsburgh *et al.*, 2001; Morrissey *et al.*, 2004).

Chez *Streptococcus pyogenes* (organisme déficient en catalase), PerR est le seul membre de la famille de Fur (King *et al.*, 2000). Bien que PerR soit également le régulateur principal de la réponse à H_2O_2, les enzymes AhpC (alkyl-hydroperoxyde réductase) et GpoA (glutathion réductase) ne sont pas régulées par PerR (King *et al.*, 2000). PerR aurait aussi certaines fonctions de Fur telles que la répression du transporteur de complexes fer-hydroxamate FhuADBG (Brenot *et al.*, 2005).

Chez *Streptomyces coelicolor*, c'est une protéine « PerR-like », CatR, qui régule la transcription de la catalase KatA (Hahn *et al.*, 2000).

La protéine PerR a également été identifiée chez *Listeria monocytogenes* (Rea *et al.*, 2005) et chez *Campylobacter jejuni* (van Vliet *et al.*, 1999).

4.| Analyse structurale des métallo-régulateurs bactériens

Nous avons décrit dans les paragraphes précédents, quelques protéines impliquées dans la réponse à un stress oxydant. Parmi les senseurs de peroxydes, la protéine PerR présente un mécanisme d'activation inédit : les cystéines n'interviennent pas dans le mécanisme de détection de H_2O_2 et la réaction a lieu au sein d'un site métallique.

Comme les autres métallo-régulateurs de la famille Fur, PerR utilise un ion métallique comme corépresseur. A ce jour, la littérature fait état de sept familles majeures de métallo-régulateurs bactériens : **ArsS** (connue aussi sous le nom ArsS/SmtB) (Huckle *et al.*, 1993; San Francisco *et al.*, 1990), **MerR** (Brown *et al.*, 2003), **CsoR** (Liu *et al.*, 2007), **CopY** (Wunderli-Ye and Solioz, 1999), **NikR** (Chivers and Sauer, 1999), **DtxR** (Ding *et al.*, 1996) et **Fur** (Lee and Helmann, 2007). Les familles sont dénommées par le premier de ses représentants caractérisé, les autres sont identifiés par des analyses de séquence. De nombreuses structures cristallographiques ou RMN existent pour chacune de ces familles. Les travaux décrits dans ce chapitre sont principalement tirés de deux revues (Giedroc and Arunkumar, 2007; Pennella and Giedroc, 2005) et de deux thèses effectuées au laboratoire traitant des métallo-régulateurs (Fauquant, 2007; Pecqueur, 2005).

Sans détailler toutes les structures de ces métallo-régulateurs, les principales caractéristiques de ces familles de protéines seront décrites. Cette analyse permettra de mettre en évidence les caractéristiques communes et singulières sur la fixation des métaux, le mode d'activation et l'interaction de ces protéines avec l'ADN.

4.1.| La famille des régulateurs ArsR (ArsR/SmtB)

Les premiers membres de cette famille qui ont été découverts sont les protéines ArsR d'*E. coli* et SmtB de *Synechococcus* (Huckle *et al.*, 1993; San Francisco *et al.*, 1990). ArsR est un senseur de l'arsenic et de l'antimoine. SmtB est un senseur du zinc.

En conditions normales, la protéine ArsR est un répresseur de la transcription. La levée de répression est induite par la fixation d'un ion métallique. D'après une étude de phylogénie, les membres de cette famille dérivent tous d'un ancêtre commun. Chaque membre a ensuite évolué pour détecter des ions métalliques de rayons ioniques différents. Les caractéristiques des membres de cette famille sont résumées dans le Tableau I.I. Les protéines

dont les gènes sont régulés par les membres de la famille ArsR sont spécialisées dans l'export et la séquestration de polluants métalliques.

Répresseu	*organisme*	Gènes régulés (fonctions)	Activateurs *in vivo*	Références
SmtB	*Synechococcus*	*smtAB* (Metallothionéines)	Zn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}	(Erbe *et al.*, 1995)
ArsR	*E. coli*	*arsR*, *arsA-D* (ATPase d'export, Transporteur à diffusion, Arsenate réductase)	As^{3+}, Sb^{3+}	(Wu and Rosen, 1993)
ZiaR	*S. aureus*	*ziaAR* (ATPase d'export)	Zn^{2+}	(Kuroda *et al.*, 1999)
CadC	*S. aureus*	*cadAC* (ATPase d'export)	Cd^{2+}, Pb^{2+}, Bi^{2+}, Zn^{2+}	(Busenlehner *et al.*, 2001)
CzrA	*S. aureus*	*czrAB* (transporteur à diffusion)	Zn^{2+} Co^{2+}	(Eicken *et al.*, 2003)
NmtR	*Synechococcus*	*NmtAR* (ATPase d'export)	Ni^{2+} Co^{2+}	(Cavet *et al.*, 2002)

Tableau I.I : Caractéristiques de quelques régulateurs de la famille ArsR.

4.1.1.| Données structurales

Les structures cristallographiques (apo et/ou holo) de plusieurs membres de cette famille ont été résolues. Pour la protéine SmtB de *Synechococcus*, les structures de l'apoprotéine et de l'holoprotéine ont été résolues respectivement à 1,7 Å et 2,2 Å (Figure I.15 et Figure I.16) (Eicken *et al.*, 2003).

La protéine est constituée de deux monomères identiques et symétriques. Chaque sous-unité est composée de cinq hélices α et de deux brins β. Les deux hélices α3 et α4, associées aux brins β forment un motif wHTH avec α4 venant s'intercaler dans le grand sillon de l'ADN. Le motif wHTH (winged Helix-Turn-Helix) est un motif classique pour des protéines qui se fixent à l'ADN. L'interface de dimérisation de la protéine SmtB fait intervenir les hélices α1 et α5 de chaque sous-unité orientées de manière antiparallèle. Ces quatre hélices forment le cœur hydrophobe du domaine de dimérisation, qui est ensuite fermé par les hélices α2 de chaque monomère.

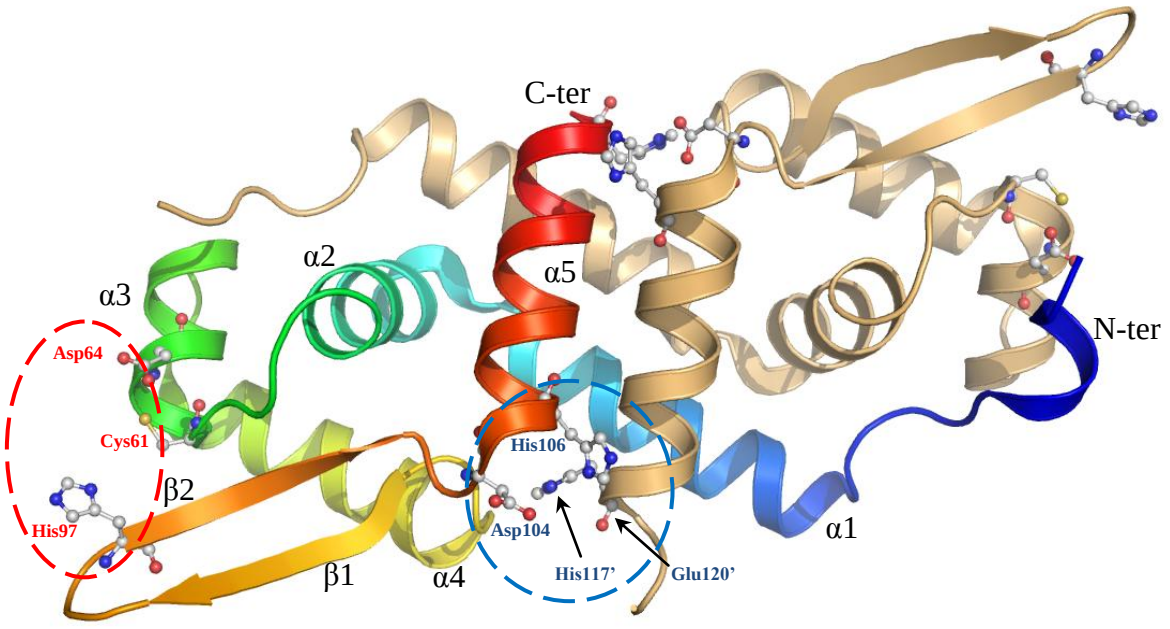


Figure I.15 : Structure cristallographique de SmtB (Eicken *et al.*, 2003). Les structures secondaires sont indiquées sur un monomère. Les résidus des sites potentiels de fixation des métaux sont indiqués : α3N en rouge et α5 en bleu.

Deux types de sites métalliques ont été identifiés dans la famille des régulateurs SmtB. La structure de la protéine apo-SmtB présente ces deux sites potentiels de fixation des métaux indiqués sur la Figure I.15. Le premier site appelé **α3N**, comprend les résidus Cys61, Asp64 de l'hélice α3 et His97 du brin β2. Le second site appelé **α5** est situé à l'interface de dimérisation et comprend les résidus Asp104 et His106 d'un monomère, ainsi que les résidus His117 et Glu120 de l'autre sous-unité.

Les sites **α3** et **α5** sont différents selon les régulateurs. Par exemple, ArsR présente un site α3 dont aucun ligand n'est issu du domaine N-terminal et NmtR présente un site **α5C** dans lequel certains ligands proviennent du domaine C-terminal. Les sites **α5**/**α5C** lient préférentiellement des cations Zn^{2+}, Ni^{2+} et Co^{2+} alors que les sites **α3**/**α3N** lient plutôt des cations Pb^{2+} et Bi^{2+}.

Certains régulateurs n'ont qu'une classe de site : ArsR (**α3**/**α3N**), CzrA/NmtR (**α5**/**α5C**) ; d'autres régulateurs comme SmtB, ZiaR, CadC ont les deux sites **α3N**/**α5** mais n'en utilisent qu'un pour la régulation.

Les structures des protéines CzrA de *S. aureus* (Eicken *et al.*, 2003) et de CadC de *S. aureus* (VanZile *et al.*, 2002b) indiquent que les caractéristiques structurales décrites pour SmtB semblent être communes à toutes les autres protéines de cette famille.

4.1.2.| Mécanisme d'activation

La structure Zn_2-SmtB (contenant deux ions Zn^{2+}) a été résolue à partir d'un mutant dans lequel site α3N n'existe plus et les métaux sont fixés dans les sites α5 du dimère. Comme pour la protéine sauvage, la fixation à l'ADN est abolie en présence de métal activateur. Le site α3N ne semble donc pas être essentiel à l'activité de la protéine SmtB.

A première vue, il n'y a aucune différence significative entre les formes apo et holo de SmtB (idem pour CzrA). L'organisation globale de la structure reste la même. Cependant, en superposant uniquement un monomère de chaque structure, on observe un déplacement du motif wHTH de fixation à l'ADN (Figure I.16). L'incorporation des métaux dans les sites α5 induit un mouvement suffisamment significatif pour diminuer l'affinité de la protéine envers sa séquence de reconnaissance (Eicken *et al.*, 2003; VanZile *et al.*, 2002a; VanZile *et al.*, 2002b).

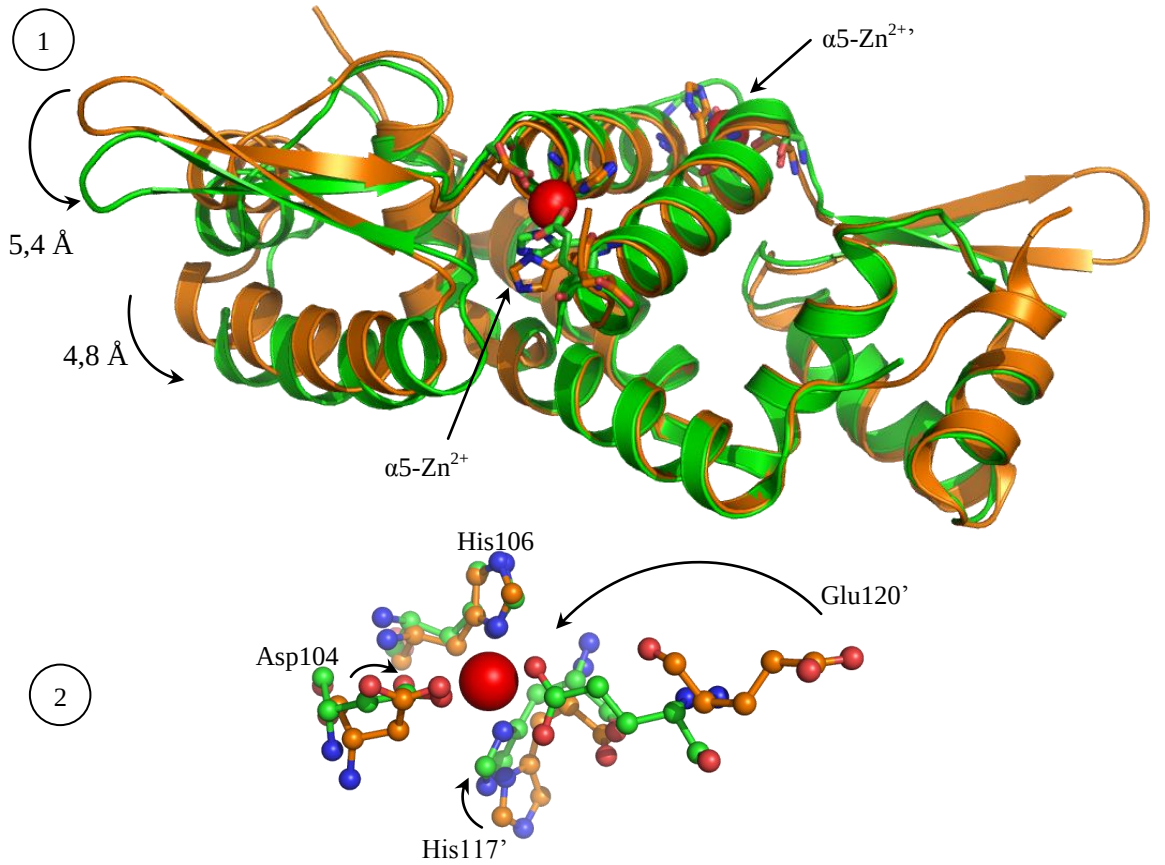


Figure I.16 : Changement de conformation induit par la fixation du métal de régulation dans SmtB (Eicken *et al.*, 2003). ① Superposition selon un monomère des structures apo (orange) et holo (vert) de SmtB. ② Zoom sur l'un des sites α5 dans la structure Zn_2-SmtB avec le réarrangement des acides aminés Glu120' et His117'.

4.2.| La famille des régulateurs MerR

Les protéines de la famille MerR sont des homodimères possédant un domaine N-terminal de fixation à l'ADN avec un motif de type wHTH et un domaine « coiled-coil » C-terminal responsable de la dimérisation et de la fixation du cofacteur. En revanche, les protéines de la famille MerR ne sont pas toutes métallo-régulatrices, certaines d'entre-elles fixent différentes drogues. Le Tableau I.II présente quelques membres de cette famille, ainsi que leurs effecteurs respectifs.

Répresseur	*organisme*	Gènes régulés (fonction)	Cofacteurs	Références
MerR	*R. metallidurans*	opéron *mer* (résistance au mercure)	Hg^{2+}	(Ansari *et al.*, 1995; Summers, 1992)
SoxR	*E. coli*	*soxRS*	Fe^{3+} stress oxydant ($O_2^{\bullet-}$)	(Amabile-Cuevas and Demple, 1991; Fuentes *et al.*, 2001)
BmrR **BltR**	*B. subtilis*	*bmr* et *blt* (résistance multi-drogue)	différentes drogues (TPP, …)	(Ahmed *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 1995; Baranova *et al.*, 1999; Godsey *et al.*, 2001; Heldwein and Brennan, 2001)
CueR	*E. coli*	*copA* (transporteur) *cueO* (oxydase à cuivre)	Cu^{+}, Ag^{+}, Au^{+}	(Outten *et al.*, 2000; Stoyanov and Brown, 2003; Stoyanov *et al.*, 2001)
ZntR	*E. coli*	*zntA* (transporteur)	Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}	(Brocklehurst *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002; Outten *et al.*, 1999)
PbrR	*R. metallidurans*	*pbrA* (transporteur)	Pb^{2+}	(Borremans *et al.*, 2001)

Tableau I.II : Exemples de régulateurs de la famille MerR.

4.2.1.| Données structurales

Bien que la protéine MerR ait été le premier membre décrit de cette famille (O'Halloran and Walsh, 1987), sa structure n'est pas encore déterminée contrairement à celle d'autre membres de la famille comme BmrR (Heldwein and Brennan, 2001), CueR (Changela *et al.*, 2003), ZntR (Changela *et al.*, 2003) et récemment SoxR (Watanabe *et al.*, 2008).

Ces structures révèlent une organisation très similaire pour ces différentes protéines. Notamment la topologie du domaine N-terminal de fixation à l'ADN (avec le motif wHTH) est très fortement conservée chez ces régulateurs. L'interface de dimérisation est formée par deux hélices antiparallèles provenant de chaque sous unité (coiled-coil). La longueur de ce coiled-coil est variable selon les régulateurs. En ce qui concerne le domaine de fixation de l'effecteur, il est plus ou moins volumineux suivant la protéine : pour SoxR (Figure I.17-①) il s'agit d'un agrégat [2Fe-2S] qui réagit avec $O_2^{\bullet -}$; pour BmrR, le domaine est protéique (Figure I.17-②) (il peut fixer *in vitro* le tetraphenylphosphonium (TPP)).

La structure du complexe SoxR-*soxS* sur laquelle on observe très nettement la torsion de l'ADN est illustrée par la Figure I.18. L'interaction avec l'ADN s'effectue par l'intermédiaire de l'hélice α2.

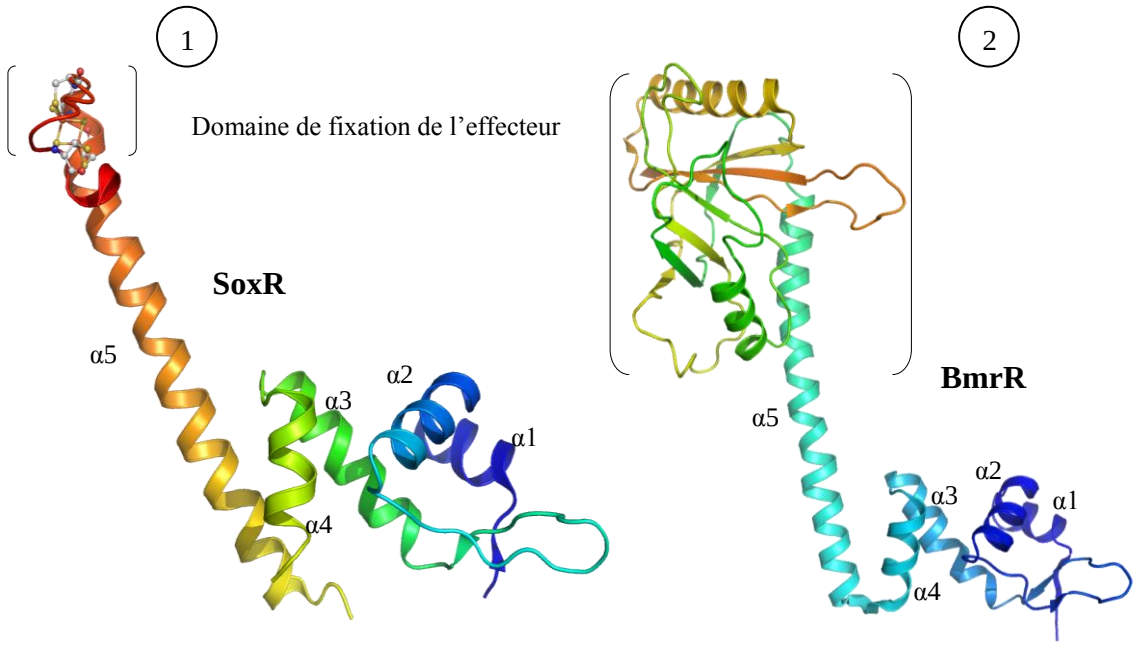


Figure I.17 : Structures cristallographiques de SoxR ① (Watanabe *et al.*, 2008) et de BmrR ② (Heldwein and Brennan, 2001). Sont uniquement représentés, un monomère de chaque protéine avec annotation des structures secondaires. Entre les crochets les domaines de fixation de l'effecteur : un agrégat [2Fe-2S] pour SoxR et un large domaine protéique pour BmrR.

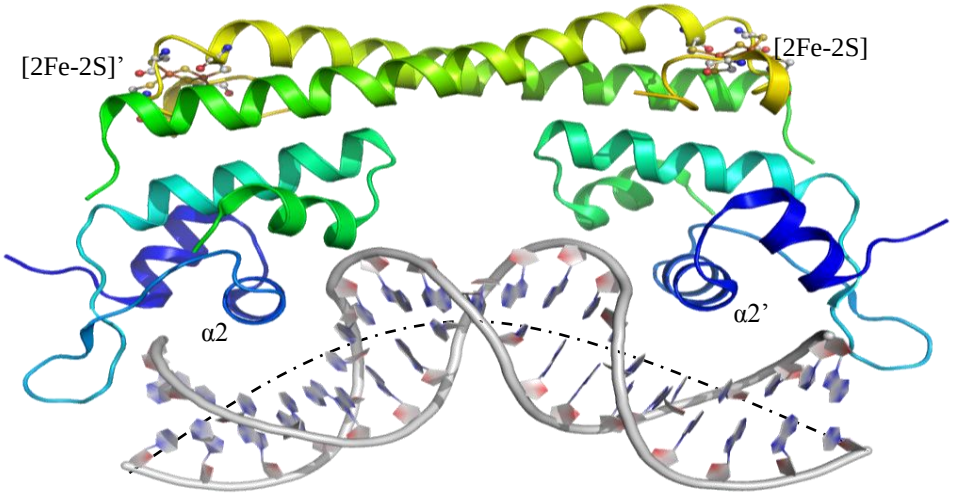


Figure I.18 : Structure cristallographique de SoxR fixé sur le promoteur *soxS* (Watanabe *et al.*, 2008). La torsion de la double hélice d'ADN est indiquée par les pointillés.

4.2.2.| Mécanisme d'activation

Les membres de la famille MerR régulent la transcription de gènes dont les promoteurs ont un espacement particulier entre les régions -35 et -10. Au lieu d'un espacement habituel de 17 ± 1 pb entre les régions -35 et -10 pour des promoteurs reconnus par le facteur de transcription, les promoteurs concernés par une régulation *via* les protéines de la famille MerR ont un espacement de 19-20 pb. La différence d'orientation entre deux régions pour un promoteur de 17 pb est une translation de 6,8 Å et une rotation de 72° autour de l'axe de l'hélice. Cet espacement pour un promoteur de 20 pb est une translation de 10,2 Å et une rotation de 108°. La transcription ne peut pas être initiée à cause de cette conformation particulière de l'ADN dans les promoteurs reconnus par les protéines de la famille MerR. Les études structurales viennent appuyer cette observation en montrant clairement la torsion particulière du promoteur (voir section **4.2.1.|** et Figure I.18 pour SoxR).

La protéine MerR est capable de se lier à l'opéron *mer*, même en absence de mercure et dans ce cas réprime la transcription. Cette fixation n'empêche pas l'approche de l'ARN polymérase, mais la transcription est bloquée à cause de l'espacement -35 et -10 qui n'est pas optimum. Plusieurs études ont mis en évidence la formation d'un complexe ternaire entre l'ADN, MerR (ou autres MerR-like) et l'ARN polymérase (Ansari *et al.*, 1995; Ansari *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2003; Condee and Summers, 1992). L'activation par le cofacteur entraîne une rotation des domaines de liaison à l'ADN autour d'un axe formé par le domaine de

dimérisation de la protéine (voir Figure I.17 et Figure I.18). Cette rotation se répercute sur la conformation de l'ADN et permet de mettre en phase les régions -35 et -10 du promoteur : la transcription est initiée. Le mode d'activation proposé pour la protéine MerR est illustré par la Figure I.19.

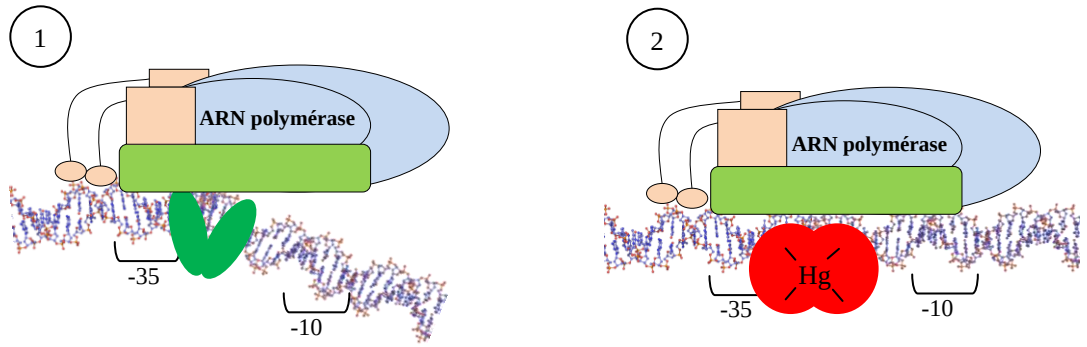


Figure I.19 : Mode d'activation de la protéine MerR (Brown *et al.*, 2003). ① La fixation de MerR à l'ADN n'empêche pas l'approche de l'ARN polymérase, mais la transcription n'a pas lieu. ② Le changement de conformation induit par la fixation du cofacteur (dans ce cas le Hg^{2+}) permet de mettre en phase les régions -35 et -10 de l'ADN pour une activation de l'ARN polymérase.

Les études menées sur SoxR démontrent que l'activation de la transcription s'effectue suivant un mécanisme similaire (Hidalgo and Demple, 1997; Hidalgo *et al.*, 1998). Il en est de même pour CueR (Reeve *et al.*, 2002; Stoyanov *et al.*, 2001) et ZntR (Brocklehurst *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002; Outten *et al.*, 1999).

4.3.| La famille des régulateurs CsoR

La protéine CsoR, très récemment identifiée chez *Mycobacterium tuberculosis* (Liu *et al.*, 2007), est le représentant d'une famille de protéines très peu caractérisées à ce jour. Seules les protéines CsoR (senseur de cuivre) et RcnR, (senseur de nickel) (Koch *et al.*, 2007) sont décrites dans la littérature. Ces deux protéines interviennent dans les mécanismes de détoxication des métaux.

4.3.1.| Données structurales

La protéine CsoR est un homodimère composé exclusivement d'hélices α, conférant à ces régulateurs un nouveau mode de fixation à l'ADN (« helical bundle »). L'ensemble de la protéine est globulaire sans distinction de domaines. Les hélices α1 sont responsables de la fixation à l'ADN. Dans Cu-CsoR, les ions Cu^+ sont coordinés par trois résidus (Cys36, Cys65' et His61') situés à l'interface des deux monomères (Figure I.20).

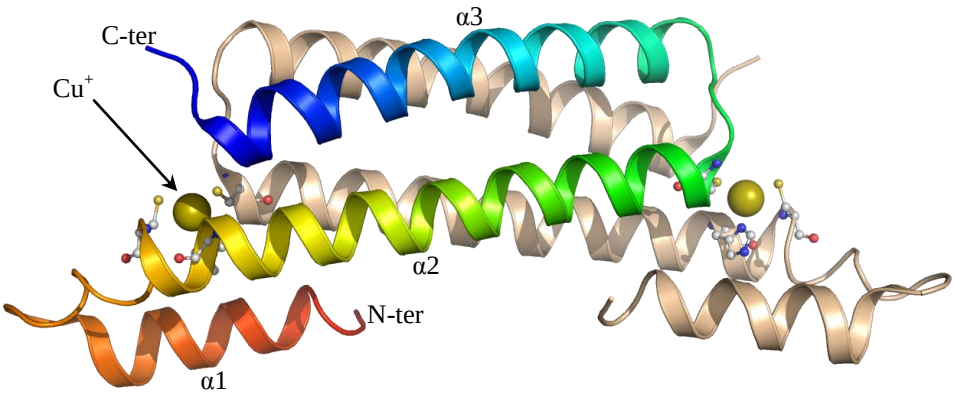


Figure I.20 : Structure cristallographique de CsoR de *Mycobacterium tuberculosis* (Liu *et al.*, 2007). Les structures secondaires sont indiquées pour un monomère.

4.3.2.| Mécanisme d'activation

Les études récentes indiquent que la protéine CsoR est un répresseur de la transcription (Smaldone and Helmann, 2007). La levée de répression est induite par la fixation d'ions Cu^+. Ce mode de régulation permet de pallier à une toxicité causée par l'accumulation de métaux libres.

4.4.| La famille des régulateurs CopY

La protéine CopY est une protéine intervenant dans l'homéostasie du cuivre chez *Enterococcus hirae* (Wunderli-Ye and Solioz, 1999). Cette protéine régule l'expression de quatre gènes organisés en opéron (l'opéron *copYZAB*). Les protéines régulées sont CopY, CopZ une chaperonne à cuivre, et deux ATPases à cuivre CopA et CopB. Les fonctions de chacune de ces protéines ont été largement étudiées (Magnani and Solioz, 2005; Solioz and Stoyanov, 2003). L'ensemble de ces protéines constitue un système d'import, de distribution et d'export du cuivre chez *Enterococcus hirae*.

In vitro, la protéine CopY fixe un ion Zn^{2+} par sous unité grâce à un motif $CxCx_4CxC$ et bloque la transcription. La protéine CopZ (la chaperonne) peut transférer deux ions Cu^+ à CopY. Les deux ions Cu^+ forment un site binucléaire qui se substitue au site à zinc. La forme Cu_2-CopY ne fixe plus l'ADN ce qui conduit à la levée de répression. *In vitro*, il est impossible de régénérer Zn-CopY à partir de Cu_2-CopY, cette dernière forme de CopY serait donc dégradée (Magnani and Solioz, 2005).

Parmi les familles de métallo-régulateurs décrits dans ce chapitre, la famille CopY est la seule pour laquelle aucune structure n'a pas encore été obtenue. La réalité physiologique de la forme Zn-CopY peut être mise en cause mais le zinc joue probablement un rôle structural en stabilisant le repliement de la protéine en absence de cuivre.

4.5.| La famille des régulateurs NikR

La protéine NikR d'*E. coli* régule le transport intracellulaire de nickel en réprimant la transcription de l'opéron *nik*, qui code le transporteur multiprotéique NikABCDE (Wu and Mandrand-Berthelot, 1986). Des protéines homologues à NikR ont été identifiées chez de nombreux organismes comme *H. pylori*, *B. japonicum*, *S. thyphimurium*, etc.

4.5.1.| Données structurales

Les protéines de la famille NikR sont des homotétramères (dimère de dimère) avec deux domaines fonctionnels par sous-unité : un domaine N-terminal de fixation de l'ADN et un domaine C-terminal de tétramérisation et de fixation du nickel.

Le domaine de fixation à l'ADN est un motif du type « Ribbon-Helix-Helix » (Ruban Hélice Hélice ou RHH). La liaison à l'ADN s'effectue par deux brins β antiparallèles (au lieu d'une hélice pour les autres régulateurs décrits). Chaque motif RHH est un homodimère formé par les domaines N-terminaux de deux sous unités.

Le domaine de fixation du métal, appelée MBD (Metal Binding Domain) forme le cœur de la protéine (avec les domaines C-terminaux de chaque sous-unité). Les deux motifs RHH sont situés aux extrémités de ce cœur.

Les structures cristallographiques de plusieurs protéines NikR ont été résolues. Les formes apo, métallées et le complexe ADN/protéine sont actuellement disponibles. Quelques unes de ces structures sont représentées sur la Figure I.21.

Différents types de sites de fixation des métaux ont été mis en évidence dans les structures cristallographiques des protéines de la famille NikR : sites dits de haute et basse affinité.

Dans la structure d'*Ec*-NikR, le site de haute affinité est localisé dans le MBD avec une géométrie plan carré impliquant les résidus His87, His89 et Cys95 d'un monomère et le résidu H76 du monomère adjacent. La fixation du métal dans ce site stabilise l'hélice α3 qui est mal structurée dans la forme apo de la protéine (Schreiter *et al.*, 2003; Schreiter *et al.*, 2006). D'autres structures cristallographiques du MBD montrent que ce site est capable de fixer d'autres métaux divalents (Phillips *et al.*, 2008).

La sphère de coordination du site de basse affinité est constituée par les résidus Asp34, Glu30 du domaine RHH et les carbonyles des résidus Ile116, Gln118 et Val-121 du MBD. Ce site est occupé par un ion potassium (K^+) à l'interface des domaines RHH et MBD dans *Ec*-

NikR (Figure I.21-③) et par un ion Ni^{2+} dans la structure de NikR de *Pyrococcus horikoshii* (Chivers and Tahirov, 2005). Cette capacité à fixer différents ions soulève la question de la spécificité des sites métalliques de NikR vis-à-vis du nickel.

4.5.2.| Mécanisme d'activation

Le mode de fixation de NikR à l'ADN a été largement étudié ces dernières années. Le mécanisme généralement admis propose que la fixation du nickel induise un basculement des domaines RHH par rapport au domaine MBD qui permet la liaison à l'ADN afin de réprimer l'expression des gènes (Bloom and Zamble, 2004; Chivers and Sauer, 2000; Chivers and Sauer, 2002; Schreiter *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Cependant, les constantes d'affinité associées à la fixation des métaux demeurent controversées. Chivers *et al* ont montré que la constante d'affinité de NikR pour la fixation de l'ion Ni^{2+} est de l'ordre du pM (Chivers and Sauer, 2002). Cependant, cette affinité est beaucoup trop élevée pour rendre compte que l'activité de senseur de la protéine NikR par rapport aux concentrations intracellulaires en nickel. Le groupe de S. Ciurli a montré que la constante de dissociation du nickel est plutôt de l'ordre de la centaine de nanomolaire (Zambelli et al., 2007). Des études récentes menées au laboratoire démontrent que l'affinité de NikR pour le nickel est plutôt sub-micromolaire (Diederix *et al.*, 2008). Ces derniers résultats semblent plus cohérents avec des aspects physiologiques.

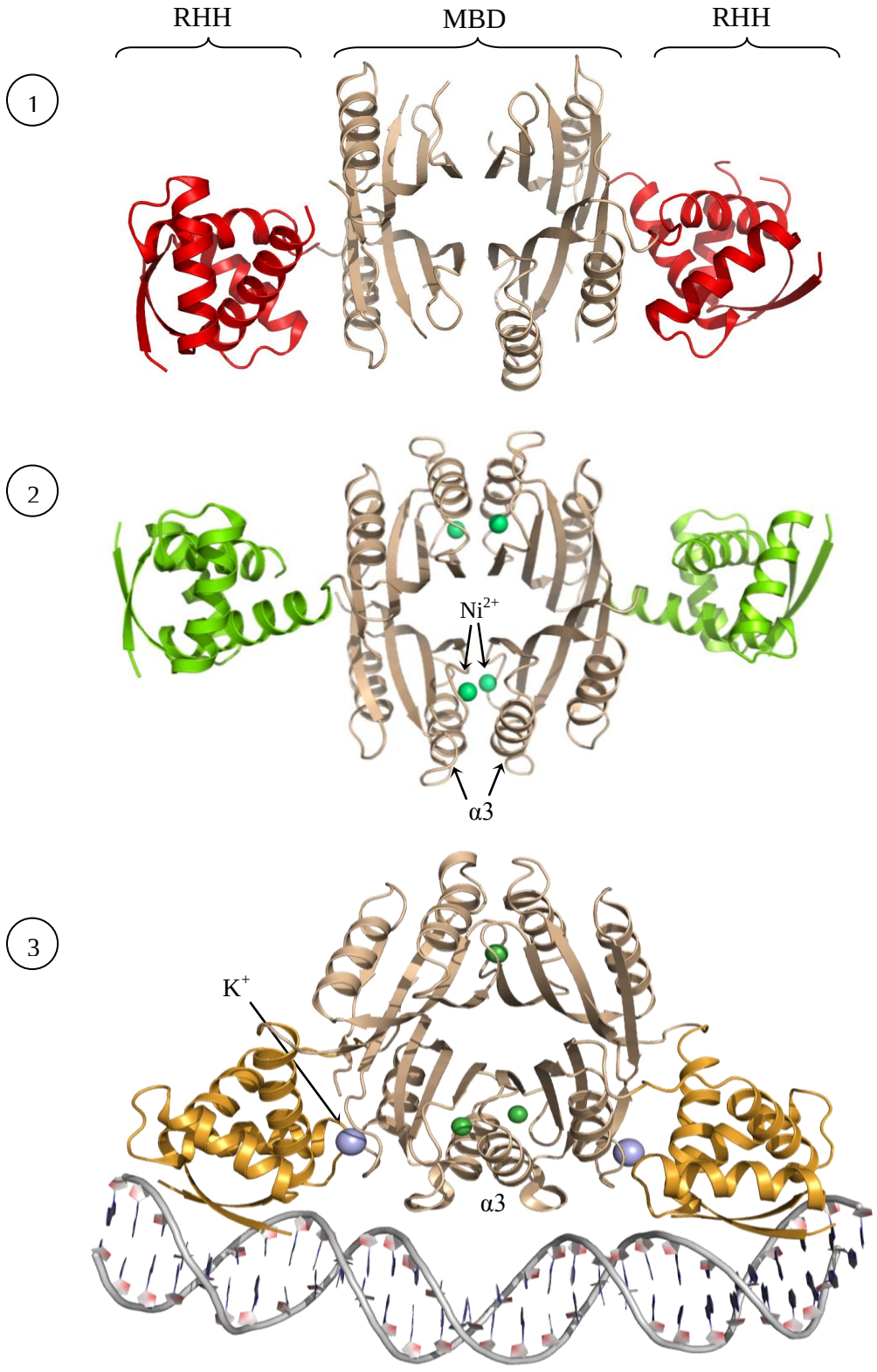


Figure I.21 : Structures cristallographiques d'*E. coli* (Schreiter *et al.*, 2006). ① apo-NikR, ② Ni-NikR et ③ le complexe NikR-ADN. RHH : domaine de liaison à l'ADN ; MBD : domaine de fixation du nickel.

4.6.| La famille des régulateurs DtxR

Les protéines de la famille DtxR sont des régulateurs qui fixent le fer ou le manganèse comme cofacteurs. La protéine DtxR de *Corynebacterium diphteriae* utilise les ions Fe^{2+} comme cofacteurs pour réprimer l'expression de gènes impliqués dans l'acquisition du fer et l'expression de la toxine diphtérique (Tao and Murphy, 1992; Tao *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Quelques protéines de la famille DtxR, ainsi que leurs cofacteurs respectifs sont répertoriées dans le Tableau I.III.

Régulateur	***organisme***	**Fonctions ou gènes régulés**	**Activateurs**	**Références**
DtxR	*C. diphteriae*	Homéostasie du fer et contrôle de la toxine diphtérique	Fe^{2+}	(Tao and Murphy, 1992; Wang *et al.*, 1994)
IdeR	*M. tuberculosis*	*mtbA-J, fxbAB, …* (homéostasie du fer et stress oxydant)	Fe^{2+}	(Dussurget *et al.*, 1996; Dussurget *et al.*, 1999; Fiss *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 2001)
MntR **AntR**	*B. subtilis* *B. anthracis*	*mntABCH* (homéostasie du manganèse)	Mn^{2+}	(Patzer and Hantke, 2001; Schmitt, 2002) (Sen *et al.*, 2006)
TroR	*T. palladium*	*troABCD* (système de transport de métaux)	Mn^{2+}	(Posey *et al.*, 1999)
EfaR	*E. faecalis*	Homéostasie du manganèse	Mn^{2+}	(Low *et al.*, 2003)

Tableau I.III : Quelques métallo-régulateurs membres de la famille DtxR.

4.6.1.| Données structurales

De nombreuses structures cristallographiques de régulateurs de cette famille ont été résolues. Les formes apo, holo (avec divers métaux activateurs) et des complexes ADN/protéine de plusieurs membres tels que DtxR (Schiering *et al.*, 1995), MntR (Glasfeld *et al.*, 2003) et IdeR (Pohl *et al.*, 1999a; Pohl *et al.*, 1999b; Wisedchaisri *et al.*, 2007) sont actuellement décrites.

Ces métallo-régulateurs présentent en général trois domaines distincts et deux sites de fixation des métaux (Figure I.22-①). Comme pour les familles déjà décrites, le domaine N-terminal est impliqué dans la fixation à l'ADN grâce à un motif de type wHTH. Le deuxième

domaine contient les sites de fixation des métaux (deux par monomère) et il est nécessaire à la dimérisation de la protéine. Les sites métalliques sont relativement semblables entre les protéines de cette famille mais leur localisation diffère. La protéine MntR, qui est probablement un cas unique, possède un site métallique binucléaire (Glasfeld *et al.*, 2003). Le troisième domaine est un domaine régulateur de type SH3 (tonneau β formé 4 par 5 ou brins β). Une des structures cristallographiques du complexe IdeR-ADN montre que les domaines SH3 ne sont pas indispensables à la fixation à l'ADN. Ce domaine est néanmoins important pour l'activité de DtxR et permettrait de stabiliser la protéine en absence de métal (Love *et al.*, 2004; Pohl *et al.*, 1999a). Ce domaine SH3 est absent dans les protéines MntR (Glasfeld *et al.*, 2003) et TroR (Hardham *et al.*, 1997).

4.6.1.| Mécanismes d'activation

La présence du métal activateur permet la fixation à l'ADN pour bloquer la transcription des gènes placés sous le contrôle du régulateur. La différence entre les structures apo et holo de ces protéines est minime, mais apparemment suffisante pour abolir la fixation à l'ADN. On observe dans DtxR un rapprochement de 2 Å entre les hélices α3 de fixation à l'ADN et un léger décalage d'un monomère par rapport à l'autre quand la protéine fixe les métaux (Figure I.22-②) (Pohl *et al.*, 1998). Une des particularités de cette famille de métallo-régulateurs est le mode de fixation à l'ADN. Comme illustré par la Figure I.22-③, deux dimères se fixent « tête bèche » sur une séquence d'ADN palindromique. La liaison à l'ADN s'effectue de manière coopérative (Chou *et al.*, 2004; Wisedchaisri *et al.*, 2007).

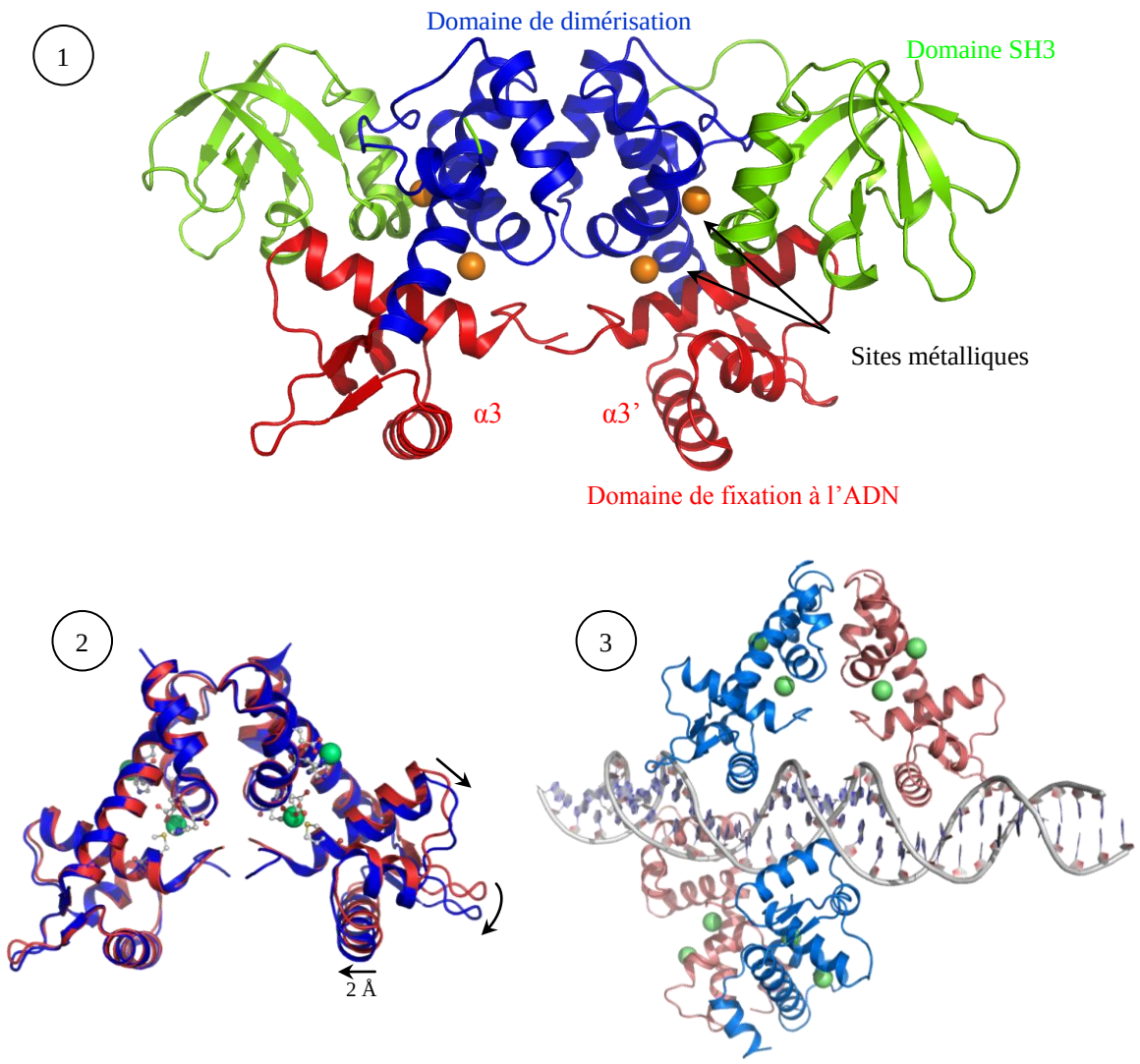


Figure I.22 : Structures cristallographiques de IdeR et de DtxR, membres de la famille DtxR. ① Structure de l'homodimère de la protéine IdeR avec les domaines SH3, de dimérisation et de fixation à l'ADN (Feese *et al.*, 2001). ② Structures de DtxR (Pohl *et al.*, 1998) avec en rouge l'apoprotéine et en bleu la protéine métallée avec des ions Ni^{2+}. ③ Structure du complexe Ni-DtxR-*tox* (White *et al.*, 1998).

4.7.| La famille des régulateurs Fur

La famille des régulateurs Fur comprend des senseurs du fer (Fur), du zinc (Zur), du manganèse (Mur), du nickel (Nur) et de H_2O_2 (PerR) (Lee and Helmann, 2007) (Tableau I.IV).

La protéine Fur d'*E. coli* a été la première découverte et elle est la mieux caractérisée de cette famille (Bagg and Neilands, 1987). Cette protéine régule l'expression de plus de cent gènes (Hantke, 2001). Soixante de ces gènes codent des protéines permettant l'acquisition du fer, d'autres gènes codent des protéines impliquées dans la réponse aux stress oxydant et nitrosatif et dans l'expression de facteurs de virulence.

Deux sites métalliques sont présents par sous-unité : un site dit structural et un site dit de régulation.

Régulateur	***organisme***	**Métaux structural/régulateur**	**Fonction des gènes régulés**	**Références**
Fur	*E. coli*	Zn^{2+} / Fe^{2+}	Homéostasie du fer, stress oxydant, stress NO, facteurs de virulence, homéostasie du nickel	(Bagg and Neilands, 1987)
	B. subtilis	Zn^{2+} / Fe^{2+}		(Bsat and Helmann, 1999)
	P. aeruginosa	Zn^{2+} / Fe^{2+}		(Pohl *et al.*, 2003)
	N. meningitidis	? / Fe^{2+}		(Delany *et al.*, 2004)
	H. pylori	? / Fe^{2+}		(Delany *et al.*, 2001)
Zur	*E. coli*	Zn^{2+} / Fe^{2+}	Import de zinc	(Outten *et al.*, 2001)
	B. subtilis			(Gaballa and Helmann, 1998)
Mur	*R. leguminosarum*	- / Mn^{2+} (Fe^{2+})	Homéostasie du manganèse	(Diaz-Mireles *et al.*, 2004)
Nur	*S. coelicolor*	? / Ni^{2+}	Import de nickel	(Ahn *et al.*, 2006)
PerR	*B. subtilis*	Zn^{2+} / Fe^{2+} (Mn^{2+})	Stress oxydant (H_2O_2)	(Lee and Helmann, 2006b)
	S. aureus	n.d. / Mn^{2+} (Fe^{2+} ?)		(Horsburgh *et al.*, 2001)
Irr	*B. japonicum*	- / Fe-heme	Import du fer Stress oxydant	(Hamza *et al.*, 1998) (Rudolph *et al.*, 2006)

Tableau I.IV : Quelques protéines de la famille Fur. ? le métal structural n'as pas été identifié avec certitude, - pas de site structural ; n.d. le métal n'a pas encore été identifié.

La présence de PerR parmi des senseurs de métaux pourrait paraître incongrue. Cependant, il faut noter que le stress oxydant et l'homéostasie du fer sont liés du fait de la

capacité du fer à catalyser la formation de radicaux hydroxyles à partir du peroxyde d'hydrogène (Moore and Helmann, 2005).

4.7.1.| Données structurales

Au début de nos travaux sur la protéine PerR, seule la structure cristallographique de Fur de *Pseudomonas aeruginosa* était décrite dans la littérature (Pohl *et al.*, 2003). D'autres structures sont apparues par la suite : la structure du domaine N-terminal de la protéine Fur d'*E coli* (Pecqueur *et al.*, 2006), la structure la protéine FurB, une protéine Fur-like senseur du zinc (Lucarelli *et al.*, 2007) et les structures issues de ce travail.

4.7.1.1.| Structure cristallographique de Pa-Fur

On distingue dans la structure cristallographique de *Pa*-Fur (Figure I.23) deux domaines par sous unité. Le domaine N-terminal contient le motif de fixation à l'ADN de type wHTH avec l'hélice α4 capable d'interagir avec l'ADN. Le domaine C-terminal est impliqué dans la dimérisation de la protéine. D'après les auteurs, cette structure correspond à la forme activée de la protéine capable de se lier à l'ADN.

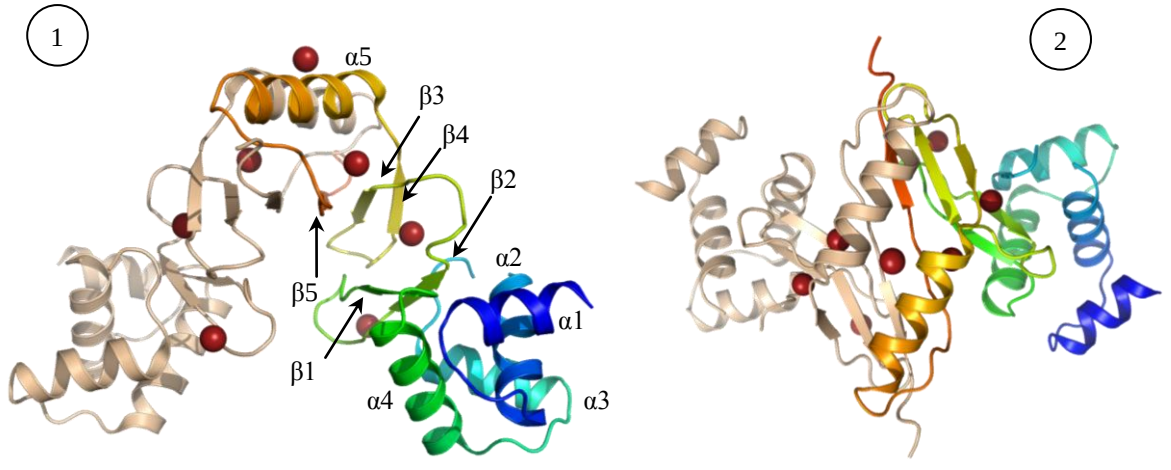


Figure I.23 : Structure cristallographique la protéine Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003). Les structures secondaires sont annotées sur un monomère. La protéine a été cristallisée avec quatre ions zinc par sous unité. L'atome placé au sommet de la figure ① se trouve sur l'axe de symétrie cristallographique. La figure ② est une vue selon l'axe de symétrie cristallographique.

4.7.1.2.| Les sites métalliques de Pa-Fur

La présence de deux sites métalliques attendus pour la protéine Fur (structural et régulateur) est confirmée par la structure cristallographique. La protéine *Pa*-Fur a été cristallisée avec quatre ions zinc par sous-unité (Figure I.23) (Pohl *et al.*, 2003). Le premier site possède un zinc coordiné par les résidus His32, Glu80, His89 et Glu100 dans une géométrie tétraédrique (Figure I.24-①). Le second site contient un zinc coordiné par les résidus His86, Asp88 (bidentate), Glu108 et His124 dans une géométrie octaédrique avec une molécule d'eau qui complète la sphère de coordination (Figure I.24-②). Les auteurs attribuent les deux autres sites à zinc observés à des artefacts de cristallisation car les ions zinc sont liés à des acides aminés peu conservés.

La structure ne permet pas d'attribuer clairement le rôle de chacun des sites. Plusieurs études contredisent en effet l'attribution des sites métalliques proposée par les auteurs de la structure. Des études antérieures à la structure cristallographique montrent que le résidu His89 est essentiel à la fonction de répression de *Pa*-Fur. En revanche, la mutation du résidu His86 ne perturbe pas l'activité de la protéine (Lewin *et al.*, 2002). Les études menées au laboratoire sur la protéine Fur d'*E. coli* montrent que le métal de régulation est coordiné par 6 ligands (3 histidines, 1 Glu/Asp et 2 autres ligands N/O). D'autre part, les histidines 32 et 89 sont indispensables à l'activité de la protéine et ont été proposées comme ligand du site de régulation. Le site à zinc structural est coordiné par 2 cystéines et deux autres ligands de type N/O et le rôle structural de ce site a clairement été démontré (Gonzalez de Peredo *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.*, 1998). En effet, la perte du zinc entraîne la perte de la structure dimérique de la protéine (D'Autreaux *et al.*, 2007).

Au final le site représenté sur la Figure I.24-① correspond au site de régulation et le site ② au site structural contrairement à l'attribution de Pohl *et al*.

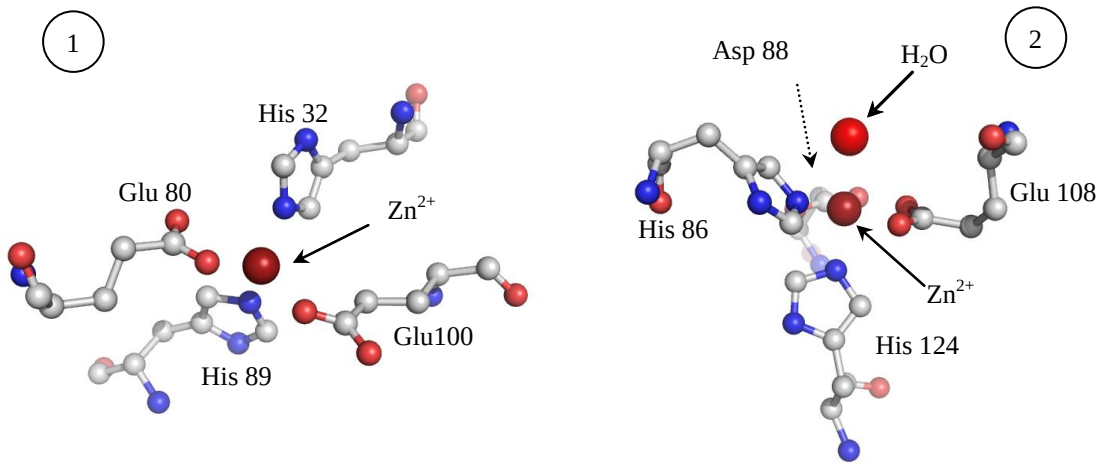


Figure I.24 : Sites métalliques de *Pa*-Fur d'après la structure cristallographique (Pohl *et al.*, 2003).

4.7.2.| Mécanisme d'activation

La protéine Fur d'*E. coli* ne lie le fer ferreux (Fe^{2+}) que lorsque la concentration de celui-ci atteint un seuil critique. En effet, pour la croissance optimale d'une bactérie, le fer doit être présent à une concentration de l'ordre du micromolaire et disponible pour les métalloprotéines dépendantes du fer dans la cellule. La concentration critique est atteinte lorsque toutes ces métalloprotéines ont reçu la quantité de fer qui leur est nécessaire. La protéine Fur fixe alors le Fe^{2+} excédentaire et réprime la transcription de gènes impliqués dans l'import de fer. Le blocage des mécanismes d'import permet de prévenir une accumulation de fer libre dans la cellule.

Cependant, étant donnée la variété d'espèces régulatrices dans la famille Fur (Tableau I.IV), il ne faut pas négliger le fait que le mécanisme puisse être beaucoup plus complexe.

Initialement qualifiés uniquement de répresseurs de la transcription, il a été récemment montré que les membres de cette famille de métallo-régulateurs contrôlaient l'expression des gènes par quatre mécanismes différents (Lee and Helmann, 2007). Ces mécanismes peuvent être de répression ou d'activation, directs ou indirects, dépendant ou non d'une métallation de la protéine. Ils sont illustrés par la Figure I.25. Le plus souvent, les protéines Fur-like fixent l'ADN en présence du cofacteur métallique. La protéine peut alors bloquer la transcription (mécanisme ①) ou activer la transcription directement (mécanisme ②). Dans certains cas (chez *H. pylori* par exemple), la forme « apo » lie l'ADN et empêche l'expression d'une protéine qui permet le stockage du fer (mécanisme ④). Dans le cas des protéines Fur d'*H.*

pylori et Irr de *B. japonicum*, l'apoprotéine fixe l'ADN et peut activer (mécanisme ③) ou réprimer (mécanisme ④) l'expression des gènes cibles. Le site structural et le site de régulation sont représentés avec respectivement un zinc et un ion M (M = Fe ou Mn) uniquement pour illustrer les différents mécanismes possibles de régulation de l'expression des gènes. Les cofacteurs respectifs de chaque protéine Fur-like sont rapportés dans le Tableau I.IV.

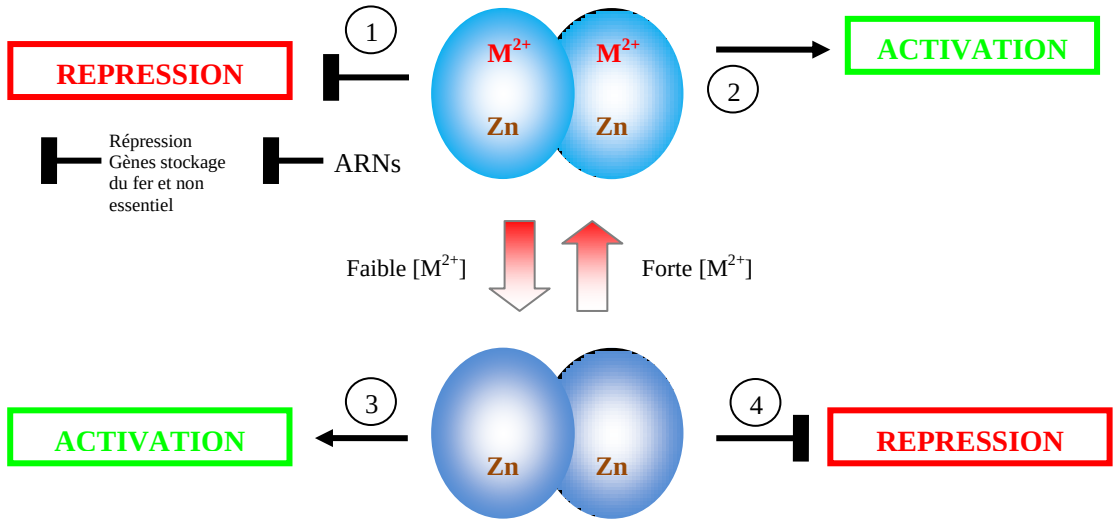


Figure I.25 : Les différents modes de régulation de l'expression des gènes par les protéines Fur-like (Lee and Helmann, 2007).

4.7.3.| Mode de fixation à l'ADN

Les Fur-box sont le plus souvent des séquences consensus de 19 pb contenant un double motif 7-1-7 (Figure I.26). Le chevauchement de deux motifs ou de plusieurs motifs 7-1-7 explique la fixation de deux ou plusieurs dimères de protéine sur les Fur-Box. Aucune structure cristallographique d'un complexe ADN/Fur-like n'est actuellement disponible. Un modèle de fixation à l'ADN a été proposé par le groupe de E. Pohl (Pohl *et al.*, 2003). Ce modèle fortement inspiré de celui de la famille DtxR, suggère une fixation coopérative de deux dimères sur l'ADN. Les auteurs précisent également que les domaines de dimérisation ainsi que l'orientation des hélices de fixation à l'ADN seraient différents entre les deux protéines.

Un modèle plus complet a pu être proposé grâce à une analyse par spectrométrie de masse des pontages ADN/protéine (Tiss *et al.*, 2005). Ces résultats montrent qu'une tyrosine, localisée dans l'hélice de reconnaissance et conservée dans toutes les protéines Fur-like interagit avec une thymine qui est également conservée dans toutes les Fur-box. Le mode de fixation proposé pour les protéines de la famille Fur est représenté sur la Figure I.26.

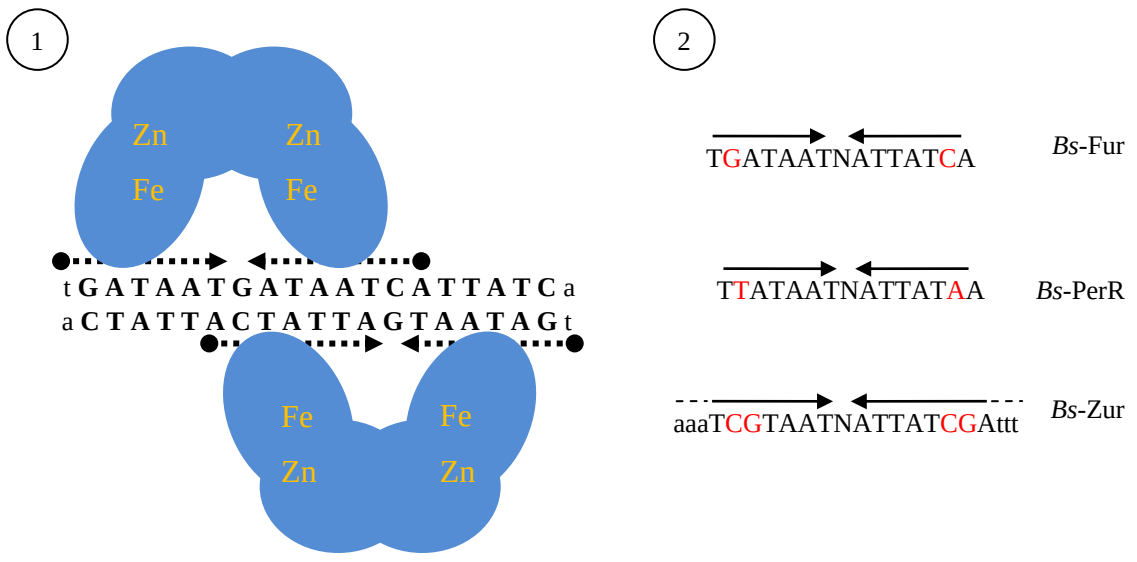


Figure I.26 : Mode de fixation à l'ADN des protéines Fur-like (Moore and Helmann, 2005). ① Les protéines Fur fixent une séquence consensus de 19 pb par deux dimères qui reconnaissent chacun un motif palindromique 7-1-7. ② Motifs reconnus par quelques protéines Fur-like. La mutation de chacun des nucléotides marqués en rouge altère fortement la fixation du régulateur (Fuangthong and Helmann, 2003).

4.8.| Bilan de l'analyse structurale des métallo-régulateurs.

L'analyse des métallo-régulateurs décrite dans ce chapitre, permet de dégager quelques caractéristiques importantes.

La première concerne la structure quaternaire de ces protéines. Elles se structurent en homodimères, à l'exception de NikR (dimère de dimère). Ce type de repliement confère à ces protéines un axe de symétrie d'ordre 2 permettant de fixer des séquences d'ADN palindromiques qui présentent elles aussi une symétrie d'ordre 2. La présence d'une symétrie aussi bien dans la protéine que dans l'ADN augmente la spécificité et l'affinité. Les formes monomères de ces protéines lient très peu ou pas du tout l'ADN.

Les principaux réarrangements conformationnels sont induits par la fixation des métaux. Même s'il n'existe pas vraiment de lien entre l'ion métallique coordiné et la nature des ligands, il y a bien naturellement une forte corrélation entre le métal de régulation et la fonction des gènes régulés par une protéine. C'est la géométrie et le nombre de coordination qui semblent dicter la spécificité ionique. A titre d'exemple, un ion Ni^{2+} sera préférentiellement coordiné en symétrie tétraédrique et un ion Cu^{+} en symétrie trigonale. Si les sites de fixation des métaux sont localisés à l'intérieur ou à proximité de l'interface de dimérisation, le métal permet alors de « verrouiller » le dimère et de moduler l'affinité de la protéine pour l'ADN. Ce contrôle de l'affinité se fait par la variation de la distance entre les deux domaines de reconnaissance de l'ADN. L'espacement entre les deux domaines de fixation à l'ADN doit être optimal pour la fixation à l'ADN. Dans les cas où les ions ne sont pas coordinés à l'interface de dimérisation, ils sont localisés entre les domaines N- et C-terminaux d'un même monomère. Cette position est également cruciale pour la régulation car le métal permet alors d'orienter les domaines de fixation à l'ADN.

Concernant la fixation à l'ADN proprement dite, le dénominateur commun à toutes ces familles de métallo-régulateurs est le motif wHTH (sauf pour NikR et CsoR). Le motif wHTH est un sous ensemble de la famille des motifs HTH qui est retrouvé généralement dans les protéines fixant l'ADN (Huffman and Brennan, 2002). Ce motif tient son nom de deux hélices successives reliées par une boucle formant un coude. La deuxième hélice du motif HTH opère la fixation à l'ADN en s'insérant dans le grand sillon. Une troisième hélice forme avec les deux autres un cœur hydrophobe. Cette hélice supplémentaire permet également d'orienter l'ensemble du motif pour une fixation à l'ADN.

Plusieurs autres motifs de fixation à l'ADN découlent de ce repliement de base (HTH) comme les wHTH ou les RHH. Les différentes topologies des motifs HTH de fixation sont décrites dans la revue *« The many faces of helix-turn-helix »* (Aravind *et al.*, 2005). Le mode de fixation à l'ADN décrit pour CsoR (α helical bundle) est également une variante des motifs HTH. Pour les wHTH, l'aile (d'où l'acronyme « winged »-HTH) est formé par deux brins β antiparallèles et confère une stabilité supplémentaire au complexe ADN/protéine. Pour les motifs RHH, l'interaction avec l'ADN s'opère par un ou plusieurs brins β.

Bien que ces motifs HTH soient retrouvés chez la plupart des métallo-régulateurs, les modes de fixation et de régulation sont loin d'être similaires. En conclusion, pour chaque famille de protéines capable de lier l'ADN, un mode particulier de fixation à l'ADN est envisageable.

Les familles de métallo-régulateurs décrits dans ce chapitre, leur mode d'interaction avec l'ADN et les métaux activateurs *in vivo* sont résumés dans le Tableau I.V. La fixation des métaux et le mode de fixation à l'ADN des protéines Fur-like en général et de la protéine PerR en particulier seront plus amplement discutés dans la suite du manuscrit.

Dans cette analyse, il est important de souligner le parallèle entre les protéines SoxR et PerR. En effet, ces deux protéines sont des senseurs du stress oxydant, mais surtout utilisent un cofacteur métallique pour traduire le message de l'espèce oxydante en réponse transcriptionnelle. Dans un cas, le radical anion superoxyde oxyde l'agrégat Fe/S (SoxR), dans l'autre cas, le peroxyde d'hydrogène oxyde le fer ferreux (PerR). Le changement de conformation au sein de la protéine induit par ces oxydations permet dans le cas de SoxR d'activer la transcription et dans le cas de PerR d'activer la transcription via une levée de répression. Ces deux modes de régulation, en plus des mécanismes de détection des hydroperoxydes par OxyR, Orp1, et OhrR révèlent la complexité et la spécificité des mécanismes mis en place par les micro-organismes en réponse à un stress oxydant.

Famille	Cofacteur métallique nécessaire à la régulation	Réponse induite par la fixation du métal	Motif de fixation à l'ADN	Topologie caractéristique
ArsR	Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Hg, Pb, Bi, Sb, As	Activation	wHTH#	
MerR	Cu, Zn, Ag, Cd, Au, Hg, Pb	Répression / Activation	wHTH	
CsoR	Ni, Cu	Activation	« α-helical bundle »	
CopY	Cu	Activation	wHTH	‡
NikR	Ni	Répression / Activation	RHH*	
DtxR	Mn, Fe	Répression / Activation	wHTH	
Fur	Mn, Fe, Ni, Zn	Répression / Activation	wHTH	

Tableau I.V : Récapitulatif des métallo-régulateurs bactériens présentés dans ce chapitre. # winged-Helix-Turn-Helix **; *** Ruban-Hélice-Hélice. ‡ proposé d'après la structure du BlaI de *S. aureus* (Giedroc and Arunkumar, 2007).

5.| Présentation du travail de thèse

La protéine PerR, au centre de ce travail de thèse est un senseur particulier du peroxyde d'hydrogène. Elle diffère des autres régulateurs de H_2O_2 par son mécanisme de détection de H_2O_2. En effet la réaction avec H_2O_2 fait intervenir un ion Fe^{2+} et non les fonctions thiols des cystéines de la protéine comme c'est le cas pour OxyR et OhrR. Au début de ce travail, la protéine était peu étudiée et aucune donnée structurale n'était disponible. La protéine PerR étant mal connue, des études biochimiques et structurales ont été entreprises au laboratoire afin de la caractériser. Mon travail de thèse a été orienté vers l'étude structurale de la protéine PerR. Deux techniques majeures ont été utilisées pour mener à bien ce projet de recherche : la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX). Les principes de bases et les aspects importants de ces deux techniques sont décrits dans le chapitre « Méthodes Cristallographiques et Spectroscopiques »

La première partie de mon travail a consisté à cristalliser et à résoudre de la structure tridimensionnelle de la protéine sous sa forme dite apo « PerR-Zn-apo ».

La deuxième partie des résultats concerne l'étude structurale des protéines PerR-Zn-Mn et PerR-Zn-Fe. Ces protéines coordinent respectivement un ion Mn^{2+} et un ion Fe^{2+} dans le site de régulation. La structure de la protéine PerR-Zn-Mn a été résolue. En complément de cette structure obtenue par diffraction aux rayons X, j'ai également effectué des expériences de spectroscopie d'absorption X sur la protéine PerR-Zn-Fe. Les résultats de la SAX ont permis d'obtenir des informations beaucoup plus précises sur la géométrie du site métallique et sur les distances métal-ligands.

La troisième partie de ce travail porte sur la forme oxydée de la protéine PerR, qui est obtenue après réaction avec le peroxyde d'hydrogène.

Un chapitre est consacré au mode de fixation de la protéine PerR à l'ADN et finalement, une conclusion générale discutera l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail.

Les résultats présentés dans ce manuscrit, rapportent les différentes structures de la protéine PerR qui ont été résolues. Ces structures ont permis de mettre à jour un certain nombre d'informations inédites, d'orienter certaines expériences biochimiques et d'expliquer plusieurs aspects mécanistiques.

6.| Références Bibliographiques – Chapitre I

Ahmed, M., Borsch, C. M., Taylor, S. S., Vazquez-Laslop, N., and Neyfakh, A. A. (1994). A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J Biol Chem* 269, 28506-28513.

Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P. N., Taylor, S. S., Vazquez-Laslop, N., and Neyfakh, A. A. (1995). Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J Bacteriol* 177, 3904-3910.

Ahn, B. E., Cha, J., Lee, E. J., Han, A. R., Thompson, C. J., and Roe, J. H. (2006). Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 59, 1848-1858.

Amabile-Cuevas, C. F., and Demple, B. (1991). Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res* 19, 4479-4484.

Ansari, A. Z., Bradner, J. E., and O'Halloran, T. V. (1995). DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* 374, 371-375.

Ansari, A. Z., Chael, M. L., and O'Halloran, T. V. (1992). Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR. *Nature* 355, 87-89.

Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M., and Iyer, L. M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 29, 231-262.

Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6161-6165.

Bagg, A., and Neilands, J. B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5471-5477.

Baranova, N. N., Danchin, A., and Neyfakh, A. A. (1999). Mta, a global MerR-type regulator of the *Bacillus subtilis* multidrug-efflux transporters. *Mol Microbiol* 31, 1549-1559.

Beckman, K. B., and Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272, 19633-19636.

Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., and Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3, 281-286.

Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316.

Bloom, S. L., and Zamble, D. B. (2004). Metal-selective DNA-binding response of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10029-10038.

Borremans, B., Hobman, J. L., Provoost, A., Brown, N. L., and van Der Lelie, D. (2001). Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of Ralstonia metallidurans CH34. *J Bacteriol* 183, 5651-5658.

Brenot, A., King, K. Y., and Caparon, M. G. (2005). The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 55, 221-234.

Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L., and Morby, A. P. (1999). ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31, 893-902.

Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., and Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27, 145-163.

Bsat, N., and Helmann, J. D. (1999). Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the dhb operator in vitro and in vivo. *J Bacteriol* 181, 4299-4307.

Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J. D. (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* 29, 189-198.

Burrows, C. J., and Muller, J. G. (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev* 98, 1109-1152.

Busenlehner, L. S., Cosper, N. J., Scott, R. A., Rosen, B. P., Wong, M. D., and Giedroc, D. P. (2001). Spectroscopic properties of the metalloregulatory Cd(II) and Pb(II) sites of S. aureus pI258 CadC. *Biochemistry* 40, 4426-4436.

Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A. P., Botstein, D., Brown, P. O., and Storz, G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 39, 595-605.

Cavet, J. S., Meng, W., Pennella, M. A., Appelhoff, R. J., Giedroc, D. P., and Robinson, N. J. (2002). A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J Biol Chem* 277, 38441-38448.

Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V., and Mondragon, A. (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 301, 1383-1387.

Chen, L., and Helmann, J. D. (1995). *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. *Mol Microbiol* 18, 295-300.

Chivers, P. T., and Sauer, R. T. (1999). NikR is a ribbon-helix-helix DNA-binding protein. *Protein Sci* 8, 2494-2500.

Chivers, P. T., and Sauer, R. T. (2000). Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni^{2+}-dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites. *J Biol Chem* 275, 19735-19741.

Chivers, P. T., and Sauer, R. T. (2002). NikR repressor: high-affinity nickel binding to the C-terminal domain regulates binding to operator DNA. *Chem Biol* 9, 1141-1148.

Chivers, P. T., and Tahirov, T. H. (2005). Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *J Mol Biol* 348, 597-607.

Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105, 103-113.

Chou, C. J., Wisedchaisri, G., Monfeli, R. R., Oram, D. M., Holmes, R. K., Hol, W. G., and Beeson, C. (2004). Functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* iron-dependent regulator. *J Biol Chem* 279, 53554-53561.

Christman, M. F., Storz, G., and Ames, B. N. (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3484-3488.

Collinson, L. P., and Dawes, I. W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene* 156, 123-127.

Condee, C. W., and Summers, A. O. (1992). A mer-lux transcriptional fusion for real-time examination of in vivo gene expression kinetics and promoter response to altered superhelicity. *J Bacteriol* 174, 8094-8101.

Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W., and Chang, L. Y. (1992). Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10405-10409.

D'Autreaux, B., Pecqueur, L., Gonzalez de Peredo, A., Diederix, R. E., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E., and Michaud-Soret, I. (2007). Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* 46, 1329-1342.

D'Autreaux, B., and Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 813-824.

Dalton, T. P., Shertzer, H. G., and Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 67-101.

Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 (Pt 1), 1-18.

Delany, I., Rappuoli, R., and Scarlato, V. (2004). Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 52, 1081-1090.

Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R., and Scarlato, V. (2001). The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 42, 1297-1309.

Delaunay, A., Isnard, A. D., and Toledano, M. B. (2000). H_2O_2 sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* 19, 5157-5166.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H_2O_2 receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471-481.

Diaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J. D., and Johnston, A. W. (2004). The Fur-like protein Mur of Rhizobium leguminosarum is a Mn^{2+}-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* 150, 1447-1456.

Diederix, R. E., Fauquant, C., Rodrigue, A., Mandrand-Berthelot, M. A., and Michaud-Soret, I. (2008). Sub-micromolar affinity of *Escherichia coli* NikR for Ni(II). *Chem Commun (Camb)*, 1813-1815.

Ding, X., Zeng, H., Schiering, N., Ringe, D., and Murphy, J. R. (1996). Identification of the primary metal ion-activation sites of the diphtheria tox repressor by X-ray crystallography and site-directed mutational analysis. *Nat Struct Biol* 3, 382-387.

Dussurget, O., Rodriguez, M., and Smith, I. (1996). An ideR mutant of *Mycobacterium smegmatis* has derepressed siderophore production and an altered oxidative-stress response. *Mol Microbiol* 22, 535-544.

Dussurget, O., Timm, J., Gomez, M., Gold, B., Yu, S., Sabol, S. Z., Holmes, R. K., Jacobs, W. R., Jr., and Smith, I. (1999). Transcriptional control of the iron-responsive fxbA gene by the mycobacterial regulator IdeR. *J Bacteriol* 181, 3402-3408.

Eicken, C., Pennella, M. A., Chen, X., Koshlap, K. M., VanZile, M. L., Sacchettini, J. C., and Giedroc, D. P. (2003). A metal-ligand-mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins. *J Mol Biol* 333, 683-695.

Emerson, J. P., Coulter, E. D., Phillips, R. S., and Kurtz, D. M., Jr. (2003). Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle. *J Biol Chem* 278, 39662-39668.

Erbe, J. L., Taylor, K. B., and Hall, L. M. (1995). Metalloregulation of the cyanobacterial smt locus: identification of SmtB binding sites and direct interaction with metals. *Nucleic Acids Res* 23, 2472-2478.

Evrard, C., Capron, A., Marchand, C., Clippe, A., Wattiez, R., Soumillion, P., Knoops, B., and Declercq, J. P. (2004). Crystal structure of a dimeric oxidized form of human peroxiredoxin 5. *J Mol Biol* 337, 1079-1090.

Fauquant, C. (2007) Propriétés de métallation et de la liaison à l'ADN de NikR d'*Escherichia coli* et de NikR et FUR d'*Helicobacter pylori*, *THESE*, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Feese, M. D., Ingason, B. P., Goranson-Siekierke, J., Holmes, R. K., and Hol, W. G. (2001). Crystal structure of the iron-dependent regulator from *Mycobacterium tuberculosis* at 2.0 Å resolution reveals the Src homology domain 3-like fold and metal binding function of the third domain. *J Biol Chem* 276, 5959-5966.

Fiss, E. H., Yu, S., and Jacobs, W. R., Jr. (1994). Identification of genes involved in the sequestration of iron in mycobacteria: the ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways. *Mol Microbiol* 14, 557-569.

Fridovich, I. (1978a). The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880.

Fridovich, I. (1978b). Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical. *Ciba Found Symp*, 77-93.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112.

Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O2-.), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272, 18515-18517.

Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., and Helmann, J. D. (2001). OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183, 4134-4141.

Fuangthong, M., and Helmann, J. D. (2002). The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6690-6695.

Fuangthong, M., and Helmann, J. D. (2003). Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185, 6348-6357.

Fuangthong, M., Herbig, A. F., Bsat, N., and Helmann, J. D. (2002). Regulation of the *Bacillus subtilis* fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J Bacteriol* 184, 3276-3286.

Fuentes, A. M., Diaz-Mejia, J. J., Maldonado-Rodriguez, R., and Amabile-Cuevas, C. F. (2001). Differential activities of the SoxR protein of *Escherichia coli*: SoxS is not required for gene activation under iron deprivation. *FEMS Microbiol Lett* 201, 271-275.

Gaballa, A., and Helmann, J. D. (1998). Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180, 5815-5821.

Gaballa, A., and Helmann, J. D. (2002). A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 45, 997-1005.

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.

Giedroc, D. P., and Arunkumar, A. I. (2007). Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans*, 3107-3120.

Gilbert, H. F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 63, 69-172.

Glasfeld, A., Guedon, E., Helmann, J. D., and Brennan, R. G. (2003). Structure of the manganese-bound manganese transport regulator of *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Biol* 10, 652-657.

Godsey, M. H., Baranova, N. N., Neyfakh, A. A., and Brennan, R. G. (2001). Crystal structure of MtaN, a global multidrug transporter gene activator. *J Biol Chem* 276, 47178-47184.

Gold, B., Rodriguez, G. M., Marras, S. A., Pentecost, M., and Smith, I. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 42, 851-865.

Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J. M., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (1999). Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* 38, 8582-8589.

Gralla, E. B. (1997). Superoxide dismutase: studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *In Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, J. G. Scandalios, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 495-525.

Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H., and Dawes, I. W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol* 21, 171-179.

Green, J., and Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* 2, 954-966.

Gulshan, K., Rovinsky, S. A., Coleman, S. T., and Moye-Rowley, W. S. (2005). Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J Biol Chem* 280, 40524-40533.

Hahn, J. S., Oh, S. Y., Chater, K. F., Cho, Y. H., and Roe, J. H. (2000). H_2O_2-sensitive fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* 275, 38254-38260.

Halliwell, B. (1996). Free radicals in biochemistry and medecine. *In Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medecine*, R. A. Meyers, ed. (Wiley-VCH, Weinheim, Germany), pp. 330-337.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 2, 1095.

Hamza, I., Chauhan, S., Hassett, R., and O'Brian, M. R. (1998). The bacterial irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J Biol Chem* 273, 21669-21674.

Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 172-177.

Hardham, J. M., Stamm, L. V., Porcella, S. F., Frye, J. G., Barnes, N. Y., Howell, J. K., Mueller, S. L., Radolf, J. D., Weinstock, G. M., and Norris, S. J. (1997). Identification and transcriptional analysis of a *Treponema pallidum* operon encoding a putative ABC transport system, an iron-activated repressor protein homolog, and a glycolytic pathway enzyme homolog. *Gene* 197, 47-64.

Hartford, O. M., and Dowds, B. C. (1994). Isolation and characterization of a hydrogen peroxide resistant mutant of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140 (Pt 2), 297-304.

Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J., and Stamler, J. S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 86, 719-729.

Hecker, M., and Volker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* 44, 35-91.

Heldwein, E. E., and Brennan, R. G. (2001). Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* 409, 378-382.

Helmann, J. D., Wu, M. F., Gaballa, A., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Fawcett, P., and Paddon, C. (2003). The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol* 185, 243-253.

Herbig, A. F., and Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* 41, 849-859.

Hidalgo, E., and Demple, B. (1997). Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the soxS gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor. *Embo J* 16, 1056-1065.

Hidalgo, E., Leautaud, V., and Demple, B. (1998). The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator. *Embo J* 17, 2629-2636.

Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54, 237-271.

Holmgren, A., and Bjornstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252, 199-208.

Hong, M., Fuangthong, M., Helmann, J. D., and Brennan, R. G. (2005). Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Mol Cell* 20, 131-141.

Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E., and Foster, S. J. (2001). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69, 3744-3754.

Huckle, J. W., Morby, A. P., Turner, J. S., and Robinson, N. J. (1993). Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol Microbiol* 7, 177-187.

Huffman, J. L., and Brennan, R. G. (2002). Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* 12, 98-106.

Imlay, J. A., Chin, S. M., and Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240, 640-642.

Imlay, J. A., and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-1309.

Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y., and Kimura, A. (1999). Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 28459-28465.

Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (1998). X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 2564-2571.

Keyer, K., and Imlay, J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13635-13640.

Khan, S., Brocklehurst, K. R., Jones, G. W., and Morby, A. P. (2002). The functional analysis of directed amino-acid alterations in ZntR from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 438-445.

King, K. Y., Horenstein, J. A., and Caparon, M. G. (2000). Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 182, 5290-5299.

Klomsiri, C., Panmanee, W., Dharmsthiti, S., Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2005). Novel roles of ohrR-ohr in Xanthomonas sensing, metabolism, and physiological adaptive response to lipid hydroperoxide. *J Bacteriol* 187, 3277-3281.

Koch, D., Nies, D. H., and Grass, G. (2007). The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *Biometals* 20, 759-771.

Kuge, S., and Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *Embo J* 13, 655-664.

Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N., and Nomoto, A. (1998). Crm1 (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 3, 521-532.

Kuroda, M., Hayashi, H., and Ohta, T. (1999). Chromosome-determined zinc-responsible operon czr in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiol Immunol* 43, 115-125.

Lai, C. S., and Piette, L. H. (1978). Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 190, 27-38.

Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J* 11, 118-124.

Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G., and Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1179-1185.

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274, 16040-16046.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006a). Biochemical characterization of the structural Zn^{2+} site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* 281, 23567-23578.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006b). The PerR transcription factor senses H_2O_2 by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363-367.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20, 485-499.

Lee, J. W., Soonsanga, S., and Helmann, J. D. (2007). A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8743-8748.

Lewin, A. C., Doughty, P. A., Flegg, L., Moore, G. R., and Spiro, S. (2002). The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology* 148, 2449-2456.

Lim, D., Poole, K., and Strynadka, N. C. (2002). Crystal structure of the MexR repressor of the mexRAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 277, 29253-29259.

Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S. K., Zhang, L., George, G. N., Talaat, A. M., Sacchettini, J. C., and Giedroc, D. P. (2007). CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat Chem Biol* 3, 60-68.

Loewen, P. C. (1984). Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of katE, a locus that affects catalase activity. *J Bacteriol* 157, 622-626.

Loewen, P. C., Carpena, X., Rovira, C., Ivancich, A., Perez-Luque, R., Haas, R., Odenbreit, S., Nicholls, P., and Fita, I. (2004). Structure of *Helicobacter pylori* catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 A resolution. *Biochemistry* 43, 3089-3103.

Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D., and Niviere, V. (2000). Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *J Biol Chem* 275, 115-121.

Love, J. F., vanderSpek, J. C., Marin, V., Guerrero, L., Logan, T. M., and Murphy, J. R. (2004). Genetic and biophysical studies of diphtheria toxin repressor (DtxR) and the hyperactive mutant DtxR(E175K) support a multistep model of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2506-2511.

Low, Y. L., Jakubovics, N. S., Flatman, J. C., Jenkinson, H. F., and Smith, A. W. (2003). Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol* 52, 113-119.

Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W., and Pohl, E. (2007). Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 282, 9914-9922.

Magnani, D., and Solioz, M. (2005). Copper chaperone cycling and degradation in the regulation of the cop operon of *Enterococcus hirae*. *Biometals* 18, 407-412.

Moore, C. M., and Helmann, J. D. (2005). Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 8, 188-195.

Moore, C. M., Nakano, M. M., Wang, T., Ye, R. W., and Helmann, J. D. (2004). Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J Bacteriol* 186, 4655-4664.

Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S., and Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 16, 1035-1044.

Morrissey, J. A., Cockayne, A., Brummell, K., and Williams, P. (2004). The staphylococcal ferritins are differentially regulated in response to iron and manganese and via PerR and Fur. *Infect Immun* 72, 972-979.

Niviere, V., and Fontecave, M. (2004). Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. *J Biol Inorg Chem* 9, 119-123.

O'Halloran, T., and Walsh, C. (1987). Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the merR gene: isolation and characterization. *Science* 235, 211-214.

Outten, C. E., Outten, F. W., and O'Halloran, T. V. (1999). DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274, 37517-37524.

Outten, C. E., Tobin, D. A., Penner-Hahn, J. E., and O'Halloran, T. V. (2001). Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry* 40, 10417-10423.

Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J., and O'Halloran, T. V. (2000). Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. *J Biol Chem* 275, 31024-31029.

Paget, M. S., and Buttner, M. J. (2003). Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* 37, 91-121.

Patzer, S. I., and Hantke, K. (2001). Dual repression by Fe^{2+}-Fur and Mn^{2+}-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn^{2+} transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 4806-4813.

Pecqueur, L. (2005) Etude du rôle du zinc et des cystéines dans la dimérisation de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulator) d'*E. coli*: une approche structurale par RMN, *THESE*, Univerité Joseph Fourier, Grenoble.

Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I., and Bersch, B. (2006). Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* 281, 21286-21295.

Pennella, M. A., and Giedroc, D. P. (2005). Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals* 18, 413-428.

Phillips, C. M., Schreiter, E. R., Guo, Y., Wang, S. C., Zamble, D. B., and Drennan, C. L. (2008). Structural basis of the metal specificity for nickel regulatory protein NikR. *Biochemistry* 47, 1938-1946.

Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47, 903-915.

Pohl, E., Holmes, R. K., and Hol, W. G. (1998). Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* 273, 22420-22427.

Pohl, E., Holmes, R. K., and Hol, W. G. (1999a). Crystal structure of a cobalt-activated diphtheria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH3-like domain. *J Mol Biol* 292, 653-667.

Pohl, E., Holmes, R. K., and Hol, W. G. (1999b). Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* 285, 1145-1156.

Poole, L. B. (1996). Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction. *Biochemistry* 35, 65-75.

Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J., and Gherardini, F. C. (1999). Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10887-10892.

Rea, R., Hill, C., and Gahan, C. G. (2005). *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl Environ Microbiol* 71, 8314-8322.

Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Kale, N. B., Dilworth, M. J., and Glenn, A. R. (2002). ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Mol Microbiol* 43, 981-991.

Richter, C., and Schweizer, M. (1997). Oxidative stress in mitochondria. *In Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, J. G. Scandalios, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 169-200.

Rudolph, G., Semini, G., Hauser, F., Lindemann, A., Friberg, M., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2006). The Iron control element, acting in positive and negative control of iron-regulated *Bradyrhizobium japonicum* genes, is a target for the Irr protein. *J Bacteriol* 188, 733-744.

San Francisco, M. J., Hope, C. L., Owolabi, J. B., Tisa, L. S., and Rosen, B. P. (1990). Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Res* 18, 619-624.

Scandalios, J. G. (1997). Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radic Biol Med* 23, 471-472.

Scandalios, J. G. (2004). Genomic responses to oxidative stress. *In Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medecine*, R. A. Meyers, ed. (Wiley-VCH, Weinheim, Germany), pp. 489-512.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38, 995-1014.

Schiering, N., Tao, X., Zeng, H., Murphy, J. R., Petsko, G. A., and Ringe, D. (1995). Structures of the apo- and the metal ion-activated forms of the diphtheria tox repressor from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9843-9850.

Schmitt, M. P. (2002). Analysis of a DtxR-like metalloregulatory protein, MntR, from *Corynebacterium diphtheriae* that controls expression of an ABC metal transporter by an Mn^{2+}-dependent mechanism. *J Bacteriol* 184, 6882-6892.

Schreiter, E. R., Sintchak, M. D., Guo, Y., Chivers, P. T., Sauer, R. T., and Drennan, C. L. (2003). Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol* 10, 794-799.

Schreiter, E. R., Wang, S. C., Zamble, D. B., and Drennan, C. L. (2006). NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13676-13681.

Sen, K. I., Sienkiewicz, A., Love, J. F., vanderSpek, J. C., Fajer, P. G., and Logan, T. M. (2006). Mn(II) binding by the anthracis repressor from *Bacillus anthracis*. *Biochemistry* 45, 4295-4303.

Seoane, A. S., and Levy, S. B. (1995). Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177, 3414-3419.

Skarstad, K., Steen, H. B., and Boye, E. (1985). *Escherichia coli* DNA distributions measured by flow cytometry and compared with theoretical computer simulations. *J Bacteriol* 163, 661-668.

Smaldone, G. T., and Helmann, J. D. (2007). CsoR regulates the copper efflux operon copZA in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 153, 4123-4128.

Solioz, M., and Stoyanov, J. V. (2003). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev* 27, 183-195.

Soonsanga, S., Fuangthong, M., and Helmann, J. D. (2007). Mutational analysis of active site residues essential for sensing of organic hydroperoxides by *Bacillus subtilis* OhrR. *J Bacteriol* 189, 7069-7076.

Soonsanga, S., Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2008). Oxidant-dependent switching between reversible and sacrificial oxidation pathways for *Bacillus subtilis* OhrR. *Mol Microbiol*.

Stadtman, E. R., and Berlett, B. S. (1997). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10, 485-494.

Stoyanov, J. V., and Brown, N. L. (2003). The *Escherichia coli* copper-responsive copA promoter is activated by gold. *J Biol Chem* 278, 1407-1410.

Stoyanov, J. V., Hobman, J. L., and Brown, N. L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 39, 502-511.

Sulavik, M. C., Gambino, L. F., and Miller, P. F. (1995). The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. *Mol Med* 1, 436-446.

Summers, A. O. (1992). Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol* 174, 3097-3101.

Tao, K. (1997). oxyR-dependent induction of *Escherichia coli* grx gene expression by peroxide stress. *J Bacteriol* 179, 5967-5970.

Tao, X., and Murphy, J. R. (1992). Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria tox operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from DNase I digestion. *J Biol Chem* 267, 21761-21764.

Tao, X., Schiering, N., Zeng, H. Y., Ringe, D., and Murphy, J. R. (1994). Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol Microbiol* 14, 191-197.

Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (2005). Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett* 579, 5454-5460.

Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004). Microbial H_2O_2 sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29, 351-357.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252, 38-53.

Valentine, J. S., Wertz, D. L., Lyons, T. J., Liou, L. L., Goto, J. J., and Gralla, E. B. (1998). The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr Opin Chem Biol* 2, 253-262.

van Vliet, A. H., Baillon, M. L., Penn, C. W., and Ketley, J. M. (1999). *Campylobacter jejuni* contains two fur homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J Bacteriol* 181, 6371-6376.

VanZile, M. L., Chen, X., and Giedroc, D. P. (2002a). Allosteric negative regulation of smt O/P binding of the zinc sensor, SmtB, by metal ions: a coupled equilibrium analysis. *Biochemistry* 41, 9776-9786.

VanZile, M. L., Chen, X., and Giedroc, D. P. (2002b). Structural characterization of distinct alpha3N and alpha5 metal sites in the cyanobacterial zinc sensor SmtB. *Biochemistry* 41, 9765-9775.

Veal, E. A., Ross, S. J., Malakasi, P., Peacock, E., and Morgan, B. A. (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* 278, 30896-30904.

Wang, S. C., Dias, A. V., Bloom, S. L., and Zamble, D. B. (2004). Selectivity of metal binding and metal-induced stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43, 10018-10028.

Wang, Z., Schmitt, M. P., and Holmes, R. K. (1994). Characterization of mutations that inactivate the diphtheria toxin repressor gene (dtxR). *Infect Immun* 62, 1600-1608.

Watanabe, S., Kita, A., Kobayashi, K., and Miki, K. (2008). Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4121-4126.

Weisiger, R. A., and Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248, 4793-4796.

Wemmie, J. A., Wu, A. L., Harshman, K. D., Parker, C. S., and Moye-Rowley, W. S. (1994). Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* 269, 14690-14697.

White, A., Ding, X., vanderSpek, J. C., Murphy, J. R., and Ringe, D. (1998). Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. *Nature* 394, 502-506.

Wisedchaisri, G., Chou, C. J., Wu, M., Roach, C., Rice, A. E., Holmes, R. K., Beeson, C., and Hol, W. G. (2007). Crystal structures, metal activation, and DNA-binding properties of two-domain IdeR from *Mycobacterium tuberculosis. Biochemistry* 46, 436-447.

Wood, M. J., Andrade, E. C., and Storz, G. (2003a). The redox domain of the Yap1p transcription factor contains two disulfide bonds. *Biochemistry* 42, 11982-11991.

Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003b). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32-40.

Wu, J., and Rosen, B. P. (1993). Metalloregulated expression of the ars operon. *J Biol Chem* 268, 52-58.

Wu, L. F., and Mandrand-Berthelot, M. A. (1986). Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie* 68, 167-179.

Wunderli-Ye, H., and Solioz, M. (1999). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *Adv Exp Med Biol* 448, 255-264.

Youn, H. D., Youn, H., Lee, J. W., Yim, Y. I., Lee, J. K., Hah, Y. C., and Kang, S. O. (1996). Unique isozymes of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*. *Arch Biochem Biophys* 334, 341-348.

Zambelli, B., Bellucci, M., Danielli, A., Scarlato, V., and Ciurli, S. (2007). The Ni2+ binding properties of *Helicobacter pylori* NikR. *Chem Commun (Camb)*, 3649-3651.

Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-1721.

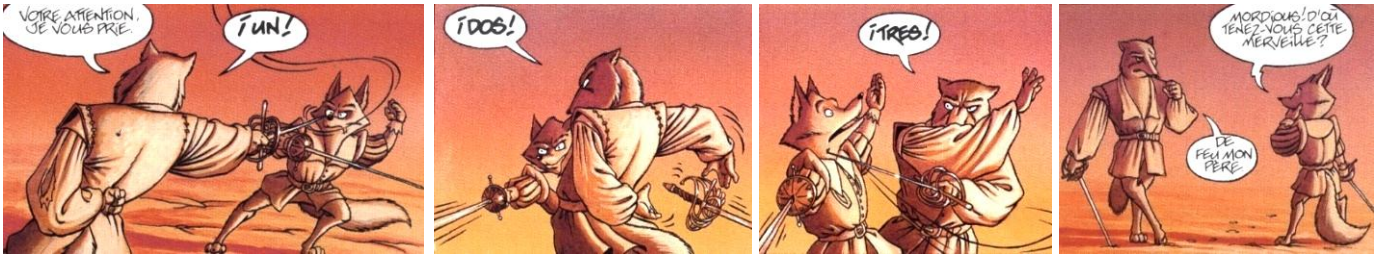
Zheng, M., and Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol* 59, 1-6.

Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K. A., Schneider, T. D., and Storz, G. (2001a). Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 4571-4579.

Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., and Storz, G. (2001b). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 183, 4562-4570.

CHAPITRE II

Méthodes Cristallographiques et Spectroscopiques



1.| La cristallographie aux rayons X des protéines

1.1.| Principe de la cristallographie

La cristallographie aux rayons X est une technique physique permettant d'observer la structure des macromolécules biologiques. La technique s'apparente au principe de fonctionnement d'un microscope optique : lorsque la lumière traverse l'objet observé, les rayons lumineux sont diffusés, puis reconcentrés par une série de lentilles, ce qui permet de reconstituer l'image (Figure II.1-①)

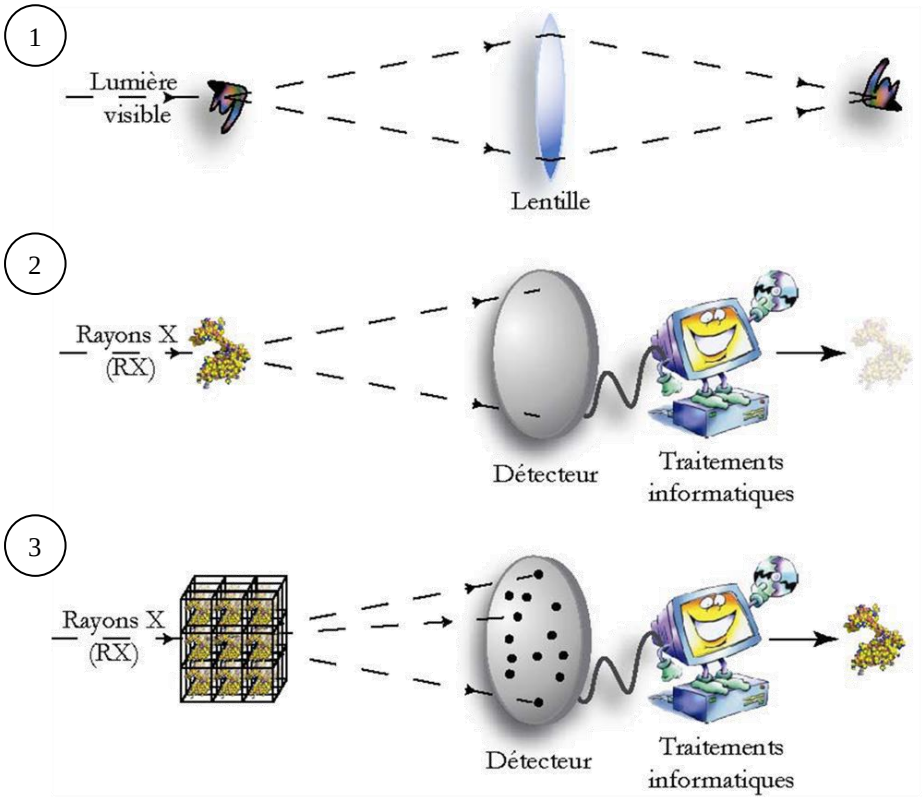


Figure II.1 : Principe de la cristallographie aux rayons X

Le même principe peut s'appliquer à l'observation des atomes, mais dans ce cas, il faut utiliser des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde est de l'ordre de grandeur de l'objet observé. Pour visualiser l'arrangement des atomes dans une molécule, on utilise donc les rayons X dont la longueur d'onde est de l'ordre de l'Angström (10^{-10} m). Il n'existe

pas à l'heure actuelle de lentilles capables de refocaliser les rayons X, et il est donc impossible d'appliquer directement le principe du microscope pour la visualisation d'atomes. La solution consiste à remplacer les lentilles par un traitement informatique (basé sur la transformation de Fourier). La transformée de Fourier de ces données génère l'image du nuage d'électrons qui correspond aux positions atomiques (Figure II.1-②). Cependant, la diffusion par une molécule isolée est trop faible pour fournir suffisamment de signal, ce qui oblige à faire diffuser un grand nombre de molécules simultanément afin d'additionner leurs contributions. Pour avoir une diffusion cohérente de toutes les molécules, celles-ci doivent être ordonnées dans l'espace. Cet état est atteint dans les cristaux qui sont constitués par un agencement périodique de molécules. L'utilisation d'un cristal entraîne l'apparition d'un phénomène de diffractions « discrètes » : les rayons ne sont plus diffusés dans toutes les directions, mais seulement dans un nombre limité de directions à cause des phénomènes d'interférences constructives et destructives du rayonnement. Ceci permet alors une amplification du signal de diffusion dans les directions d'interférences constructives. Les clichés enregistrés sont donc appelés clichés de diffractions (Figure II.1-③).

Avec l'avènement des synchrotrons, l'enregistrement des données de diffraction est pratiquement devenu une routine. Les systèmes robotisés de montage des échantillons permettent d'augmenter considérablement le nombre de cristaux testés sur les lignes de lumière. Dans ce chapitre, seuls certains éléments cruciaux seront présentés, quelques équations facilitant la compréhension du phénomène de diffraction seront mentionnées, suivis d'une présentation des techniques de résolution des structures et des programmes utilisés.

1.2.| La condition de diffraction

Comme mentionné, la diffraction est due à l'interaction entre les rayons X et la matière organisée de façon régulière. Le cristal peut être représenté comme le produit de convolution d'un motif (la macromolécule) par un réseau (caractérisé par la maille et le groupe d'espace du cristal). Le motif est répété à chaque nœud du réseau suivant les symétries du groupe d'espace. Lorsqu'un cristal est soumis aux rayons X, une partie du faisceau va être diffusé. La diffraction est due aux interférences constructives qui existent dans des directions particulières, en fonction de la maille du cristal et de son orientation. Les conditions générales de la diffraction sont définies par les **équations de Laue** et la **loi de Bragg**.

On considère $\mathbf{s_0}$ le vecteur d'onde incident et **s** le vecteur d'onde diffusé, schématisés sur la Figure II.2, faisant un angle entre eux de **2θ**. Le vecteur de diffusion **S** est défini comme $\mathbf{S = s - s_0}$. Avec **a**, **b** et **c**, les paramètres de maille, la diffraction n'est observée que dans les directions où le vecteur de diffusion S vérifie les équations de Laue :

$$S.a = h \ ; \ S.b = k \ ; \ S.c = l \ \text{avec}\, h, k, l \ \in \mathbb{N}$$

Les équations de Laue se transforment en :

$$S = ha^* + kb^* + hc^*$$

S est un vecteur du réseau réciproque ayant pour vecteurs de base a*, b* et c*. Le réseau réciproque est construit géométriquement à partir du réseau direct par les relations :

$$a^* = b \wedge c/V \ ; \ b^* = c \wedge a/V \ ; \ c^* = a \wedge b/V$$

V=a.b∧c est le volume de la maille du réseau direct. Chaque réflexion correspond à un nœud du réseau réciproque et peut être indexée par un jeu de trois indices h, k et l appelés indices de Miller.

La loi de Bragg formule de manière différente ces conditions, en introduisant le concept de plan réticulaire. La diffraction des rayons X est alors assimilée à une réflexion du faisceau sur une famille de plan réticulaires parallèles (perpendiculaire à S) d'indice h, k, l et de distance d_{hkl} se produisant aux angles 2θ vérifiant l'équation :

$$2d_{hkl} \sin\theta = n.\lambda$$

n un nombre entier et λ la longueur d'onde des rayons X.

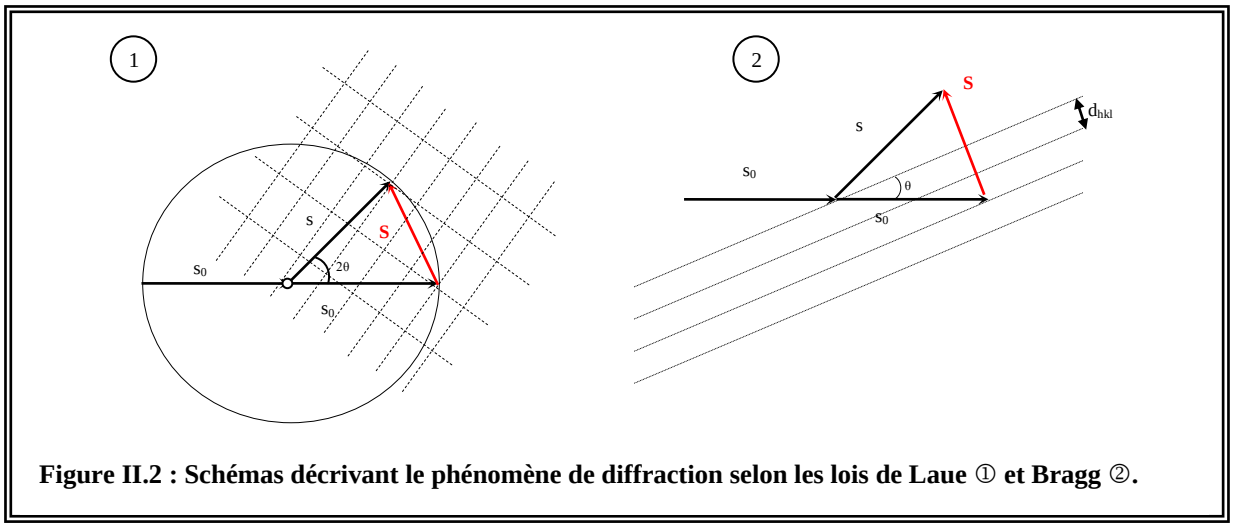


Figure II.2 : Schémas décrivant le phénomène de diffraction selon les lois de Laue ① et Bragg ②.

L'onde diffusée par une maille élémentaire du cristal est décrite par une amplitude et une phase reliées au facteur de structure $\mathbf{F_{hkl}}$ défini par la relation :

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^{n} q_j f_j e^{-B_j\left(\frac{\sin\theta}{\lambda}\right)^2} e^{2i\pi\left(hx_j + ky_j + lz_j\right)}$$

f_j, B_j, q_j x_j, k_j, z_j sont respectivement le facteur de diffusion, le facteur d'agitation thermique, l'occupation et les trois coordonnées de l'atome j dans la maille. Le facteur de structure peut s'exprimer sous la forme d'un nombre complexe mettant en avant les deux composantes de l'onde :

$$F_{hkl} = |F_{hkl}|e^{i\varphi_{hkl}}$$

Le facteur de structure F_{hkl} correspond à la transformée de Fourier de la densité électronique **ρ(x,y,z)**. Obtenue par transformée de Fourier inverse, cette densité électronique s'écrit donc :

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V}\sum_{h}\sum_{k}\sum_{l} F_{hkl}\, e^{-2\pi i\,(hx+ky+lz)}$$

1.3.| La cristallogenèse

1.3.1.| Principe de la cristallisation

La cristallisation d'une macromolécule est le passage de cette dernière d'un état liquide vers un état solide organisé. Aucune relation entre la nature d'une protéine et les conditions dans lesquelles elle cristallise n'a encore été mise en évidence. La cristallisation d'une protéine reste empirique et demeure largement limitante dans la méthode d'analyse de structure des protéines par cristallographie. On sait cependant que certains facteurs, comme par exemple le pH, la concentration protéique, la température, la présence de solvant organique, de sels, de polymères organiques, influencent les processus de cristallisation. La mise au point de nouvelles conditions de cristallisation et l'amélioration de celles-ci est aujourd'hui encore menée de manière très empirique et sous la forme d'essais-erreurs répétés. La technique de cristallisation la plus utilisée à ce jour est la diffusion de vapeur (gouttes assise ou suspendue).

1.3.2.| La diffusion en phase vapeur

La diffusion de vapeur à lieu entre une goutte contenant la protéine et une solution contenant les agents de cristallisation dans une enceinte hermétiquement fermée. Dans la technique de la goutte suspendue, la goutte est déposée sur une lamelle siliconée. Cette lamelle est retournée sur un puits contenant la solution du réservoir (Figure II.3-①). Dans la

technique de la goutte assise, la goutte est déposée sur un support fixé dans le réservoir avant de refermer le puits (Figure II.3-②).

La solution réservoir contient des agents précipitant : sels, tampon, polymères, détergents, alcools, etc. La goutte est réalisée en mélangeant la solution de protéine avec la solution du puits. La goutte est donc plus diluée que le réservoir, ce qui provoque une évaporation partielle de la goutte. La protéine qui ne s'échange pas avec le réservoir reste dans la goutte et par conséquent se concentre. L'équilibre s'établie entre la goutte et le réservoir par diffusion des espèces et dans les cas les plus favorables, des cristaux sont obtenus.

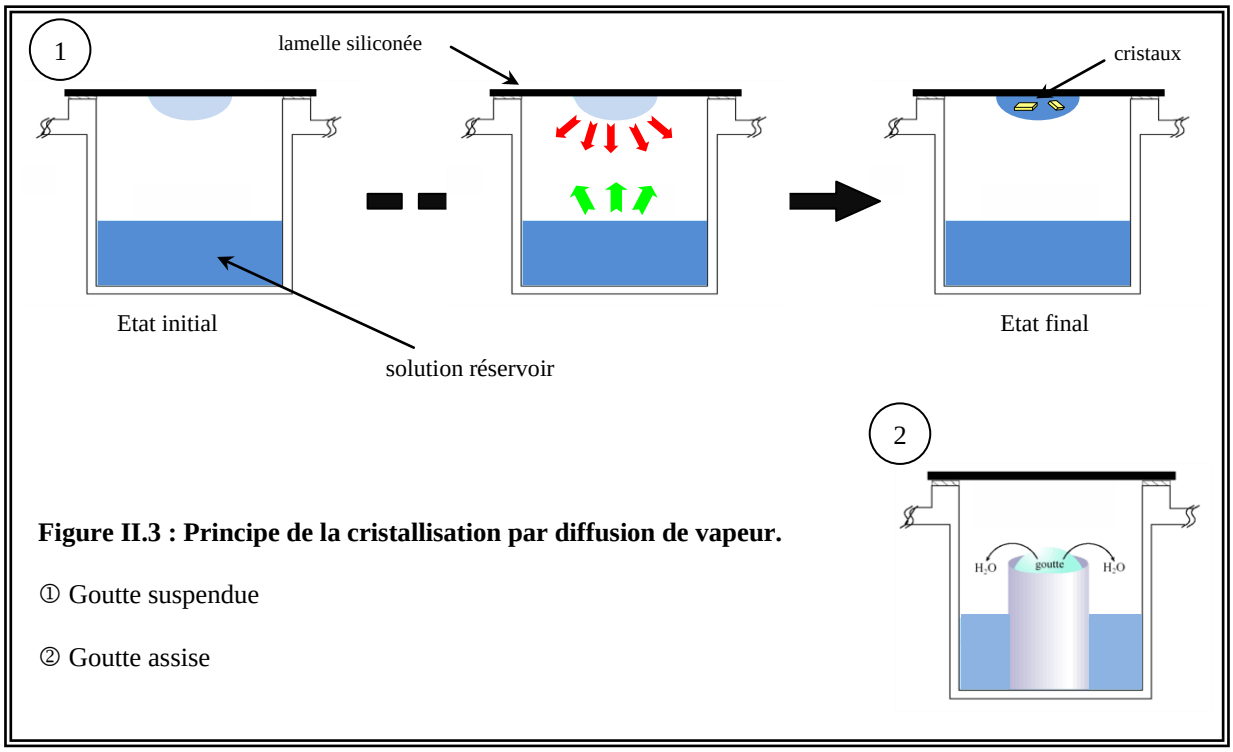


Figure II.3 : Principe de la cristallisation par diffusion de vapeur.

① Goutte suspendue

② Goutte assise

Comme mentionné ci-dessus, il n'existe aucune relation entre la nature d'une protéine et les conditions dans laquelle elle cristallise. Le criblage initial des conditions de cristallisation est facilité, de nos jours, par l'utilisation de robots de cristallisation. L'IBS dispose d'un robot TECAN Genesis qui réalise le remplissage des plaques de cristallisation et effectue les gouttes de cristallisation. Lorsque les quantités de protéine sont limitantes, le criblage est effectué par la plateforme de cristallisation de l'EMBL. Cette plateforme dispose d'un robot CARTESIAN qui fonctionne selon le même principe que le TECAN en consommant beaucoup moins de matériel (gouttes de 200 nL au lieu de 2 µL). Les criblages sont effectués dans des plaques Greiner 96 puits en gouttes assises. Chaque réservoir peut

recevoir trois échantillons de protéine différents, ce qui permet de tester simultanément 288 conditions différentes par plaque. Pour chaque échantillon, au moins 576 conditions de cristallisation ont été testées.

Le criblage permet de dégager assez rapidement les premières tendances de cristallisation du système en utilisant peu de matériel et en testant un grand nombre de paramètres. Dans les cas favorables, ces criblages permettent d'obtenir les premiers cristaux. Ces cristaux ne sont pas toujours propices à la diffraction et une optimisation est nécessaire. L'optimisation consiste ensuite à faire varier quelques paramètres (sels, pH, température, …) afin d'obtenir des cristaux de taille et de qualité suffisante à la diffraction.
Cette technique peut être appliquée non seulement aux protéines, mais aussi aux acides nucléiques, aux complexes ADN-protéine et même aux virus.

1.4.| L'enregistrement et le traitement des données de diffraction

1.4.1.| La cryo-cristallographie

Les sources synchrotron étant très intenses, l'utilisation des techniques de congélation est devenue quasi-systématique. En effet les sources de rayons X peuvent provoquer d'importants dommages, comme la formation de radicaux libres qui diffusent et endommagent les molécules du cristal (réduction des métaux, rupture des ponts disulfures, …) entrainant une diminution importante de la qualité de diffraction. Pour cela, le cristal est amené à une température inférieure à 100 K par refroidissement rapide dans de l'azote liquide ou gazeux, ou dans du propane liquide. Pendant l'exposition aux rayons X, le cristal est maintenu dans un flux d'azote gazeux à 100 K.

1.4.2.| L'enregistrement des données de diffraction

Les différentes données de diffraction sur les cristaux de PerR ont été enregistrées sur les lignes de lumière de l'ESRF (FIP-BM30a, ID14-eh1-4, ID23-eh1-2 et ID29). Pendant les périodes de maintenance de l'ESRF, certains tests ont été effectués sur le diffractomètre du laboratoire et certaines collectes sur la ligne X06SA à SLS (*Swiss Light Source*, Villigen, Suisse).

Les clichés de diffraction sont obtenus en appliquant au cristal une rotation selon un axe parallèle au plan du détecteur et perpendiculaire aux rayons X. Un cliché de diffraction correspond à une oscillation de 0,5 à 1°. Il convient ensuite d'enregistrer un nombre d'images

de diffraction permettant de mesurer un maximum de taches de diffraction. Le temps d'exposition dépend de l'intensité du faisceau et du pouvoir diffractant du cristal.

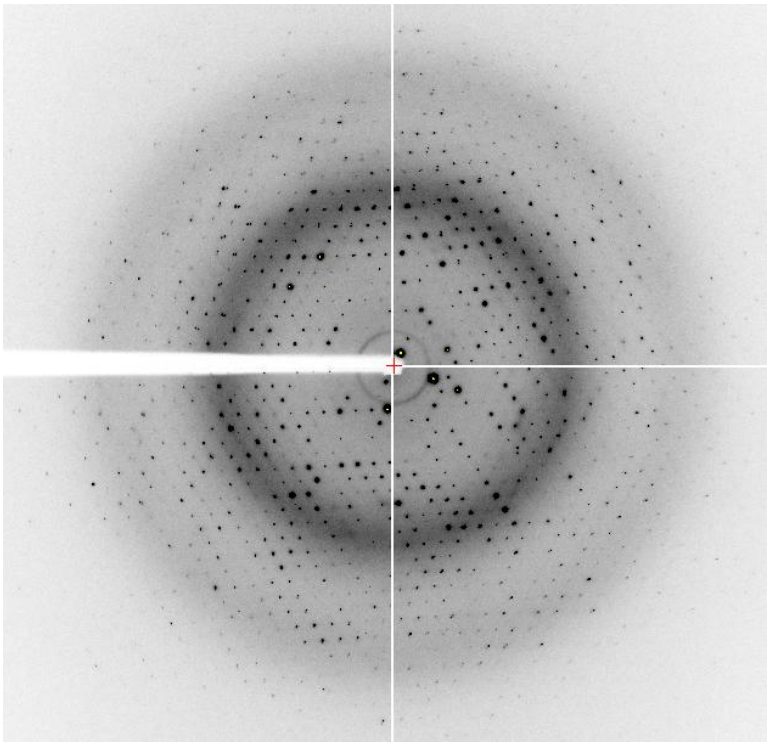


Figure II.4 : Un cliché de diffraction de la protéine PerR.

1.4.3.| Le traitement des données de diffraction

Lors de l'enregistrement des clichés de diffraction d'un cristal nous observons sur le détecteur des « taches de diffraction » : il s'agit des pixels du détecteur qui ont été excités par des rayons X diffractés. Les clichés obtenus permettent de déterminer l'intensité de l'onde diffractée dans une direction h, k, l qui est proportionnelle au carré du module du facteur de structure :

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2$$

En revanche, l'information concernant la phase φ_{hkl} ne peut pas être mesurée directement, on ne peut donc pas calculer la carte de densité à partir des clichés de diffraction. Nous aborderons ce problème de la phase dans la section 1.5.1.| de ce chapitre.

L'étape d'**indexation** permet de mesurer les vecteurs entre les pics de diffraction ce qui permet de déterminer la maille du cristal. Chaque tache est indexée avec les indices h k l.

L'étape d'**intégration** permet de mesurer l'intensité des taches. L'ensemble des intensités est ensuite **mis à l'échelle** et réduit en corrigeant les contributions des réflexions équivalentes par symétrie ou enregistrées plusieurs fois et en tenant compte de l'intensité moyenne du rayonnement incident pour chacune des images de l'enregistrement. Il est enfin possible de calculer le module du facteur de structure de chaque réflexion.

Plusieurs programmes existent pour réaliser le traitement des clichés. Toutes nos données ont été traité avec le programme XDS (Kabsch, 1993). Ce programme a l'avantage de calculer un profil tridimensionnel des taches de diffractions, permettant une meilleure intégration.

1.4.4.| Critères d'évaluation des données de diffraction

Le premier critère est la **résolution**. Plus la résolution est haute, plus la structure obtenue est précise (distances, angles, etc). La résolution dépend de la qualité du cristal et de la configuration de l'expérience. La résolution maximale choisie est celle pour laquelle le rapport signal sur bruit est supérieur ou égal à 3. Ce choix est variable selon les besoins. A titre d'exemple, pour résoudre une structure par remplacement moléculaire, il est préférable de limiter la résolution entre 3,5 et 2,5 Å, même si les taches de diffraction vont au delà.

Le rapport signal sur bruit, **I/σ(I)**, rend compte de la précision des mesures où I est l'intensité des réflexions et σ(I) l'écart type des intensités de ces réflexions (bruit de fond). Plus ce rapport est élevé, meilleures sont les estimations des intensités et des facteurs de structure.

Le facteur $\mathbf{R_{sym}}$ ($\mathbf{R_{merge}}$ quand il y a plusieurs cristaux), représente le désaccord entre l'intensité des réflexions équivalentes par symétrie selon la formule :

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} I_{hkl}}$$

Plus ce facteur est bas, meilleure est la cohérence des données de diffraction. Classiquement, au dessus de 10 % pour la valeur globale du R_{sym}, la qualité des données est discutable. Seules les réflexions des tranches de résolution n'excédant pas un seuil compris entre 35 et 50 % sont prises en comptes en fonction des besoins. De la même manière, la limite de résolution est choisie en fonction des besoins (MAD ou remplacement moléculaire).

La **complétude** est le rapport entre le nombre de réflexions uniques effectivement mesuré et le nombre théorique de réflexions uniques qui pourrait être mesuré à une résolution donnée. Ce facteur, exprimé en pourcentage, doit être le plus élevé possible, typiquement au dessus de 90 %.

La **redondance** est le nombre de fois où chacune des réflexions est mesurée. Plus une réflexion est mesurée un grand nombre de fois, meilleure est l'estimation de son intensité moyenne I, plus petit sera son écart type σ(I) et donc meilleure sera la qualité des données.

1.5.| La résolution de la structure d'une protéine

Pour résoudre une structure par cristallographie aux rayons X, il faut calculer une carte de densité électronique de la macromolécule. Dans ce calcul, les éléments essentiels sont les facteurs de structure et les phases de chaque réflexion h, k, l. Comme indiqué précédemment, l'enregistrement des clichés de diffraction permet d'avoir accès au module du facteur de structure, mais l'information concernant chacune des phases des ondes diffractées est perdue. Plusieurs techniques existent pour déterminer les phases des facteurs de structures. Dans notre cas, nous avons utilisé la méthode MAD (*multiple anomalous dispersion*) et la méthode du remplacement moléculaire.

1.5.1.| Résolution du problème de la phase

1.5.1.1.| La méthode MAD

Cette méthode de phasage utilise les propriétés particulières d'un atome lourd excité à une longueur d'onde proche de son seuil d'absorption. On parle de diffusion anomale. La diffusion anomale est un phénomène dû au fait que le facteur de diffusion de l'atome lourd varie fortement, en module et en phase, dans la région du seuil d'absorption de l'atome. Le facteur de diffusion de l'atome s'exprime alors sous la forme d'un nombre complexe qui dépend de la longueur d'onde du rayonnement incident :

$$f = {}^{0}f + {}^{\lambda}f' + i\,{}^{\lambda}f''$$

${}^{0}f$ est indépendant de la longueur d'onde ; f' et f'' prennent des valeurs significatives dans des longueurs d'onde proches du seuil d'absorption. Le diffuseur anomal brise alors la loi de Friedel selon laquelle les modules des facteurs de structure F_{hkl} et F_{-h-k-l} sont égaux. Ce non respect de la loi de Friedel est illustré sur la Figure II.5.

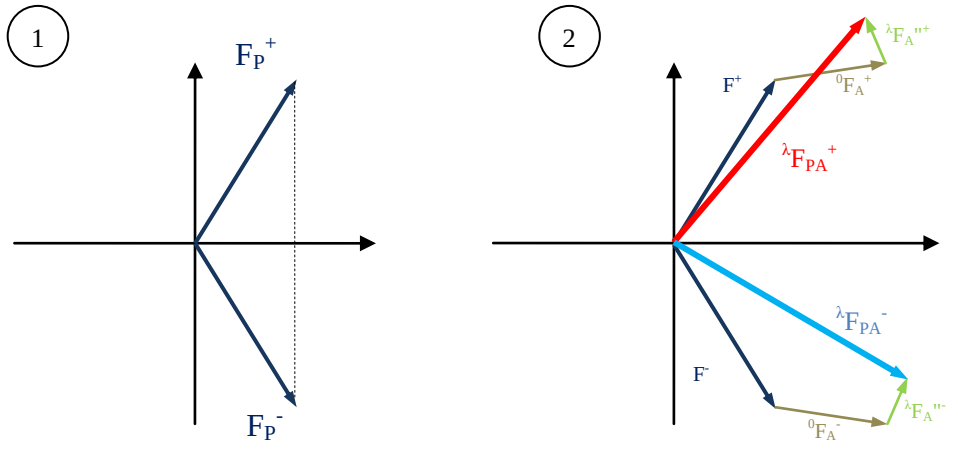


Figure II.5 : Représentation vectorielle des facteurs de structure de la protéine. ① En absence de diffuseur anomal $|F_{hkl}| = |F_{-h-k-l}|$ ($F_P^+ = F_P^-$). ② La composante imaginaire introduite par le diffuseur anomal, $^{\lambda}F_A''$, est en avance de $+\pi/2$ par rapport à F_A; ce qui induit une différence d'amplitude entre $^{\lambda}F_{PA}^+$ (en rouge) et $^{\lambda}F_{PA}^-$ (en bleu) ce qui implique $|F_{hkl}| \neq |F_{-h-k-l}|$ ($F_P^+ \neq F_P^-$).

Lors d'une expérience MAD, on utilise au moins trois longueurs d'onde : une première pour laquelle la différence entre les F^+ et les F^- est la plus grande (maximum de f''), une seconde correspondant au minimum de f' et une dernière longueur d'onde loin du seuil d'absorption du diffuseur anomal permettant de déterminer le facteur structure de la protéine native. Ces enregistrements à plusieurs longueurs d'onde permettent de lever l'ambiguïté sur la phase.

Tout d'abord la présence et la position des atomes sont déterminées grâce à la fonction de Patterson. La fonction de Patterson P(*x*,*y*,*z*) est la fonction d'auto-corrélation de la densité électronique et elle se calcule par la formule :

$$P(x,y,z) = \frac{1}{V}\sum_{hkl}(F_{hkl})^2\, e^{2\pi i\,(hx+ky+lz)}$$

Cette fonction représente en quelque sorte les vecteurs interatomiques d'un cristal, chacun d'eux correspondant à un pic dans la fonction de Patterson. La hauteur des pics est proportionnelle au produit des numéros atomiques Z des atomes concernés. Les pics dans la fonction de Patterson sont très nombreux en raison du grand nombre d'atomes contenus dans la protéine. On utilise alors la fonction de différence de Patterson qui peut être considérée comme la fonction de Patterson de l'atome lourd seul :

$$P(x,y,z) = \frac{1}{V}\sum_{hkl}(|F_{PAhkl}| - |F_{Phkl}|)^2\, e^{2\pi i\,(hx+ky+lz)}$$

Dans la mesure où $F_A << F_P$, la différence $(|F_{PA}| - |F_P|)^2$ est approximativement proportionnelle à $|F_A|^2$. Cette fonction permet donc de localiser les atomes lourds dans la maille du cristal dans les sections de Harker. On trouve dans ces sections, les pics correspondant aux vecteurs interatomiques entre un atome et son symétrique par les opérations de symétrie du cristal.

Une fois la position des atomes localisée, on peut déterminer les phases φ_{FP} comme illustré par la Figure II.6. Le module du facteur de structure F_P de la protéine est connu par la mesure des intensités de diffraction à la longueur d'onde loin du seuil d'absorption du diffuseur anomal. On peut tracer le cercle de rayon correspondant au module de F_P (cercle bleu). La position des atomes lourds donne accès au module et à la phase de F_{A1} (vecteur rouge). A une deuxième longueur d'onde de l'expérience, on connait le module du facteur de structure F_{PA1} de la protéine avec le diffuseur anomal (cercle rouge). L'intersection entre les deux cercles rouge et bleu donne deux solutions possibles pour la phase φ_{FP}. L'enregistrement à la troisième longueur d'onde permet d'avoir le module de F_{A2} et F_{PA2} (vecteur vert, puis cercle vert). Ces derniers permettent au final de lever l'ambiguïté sur la phase de FP (intersection des cercles bleu, rouge et vert).

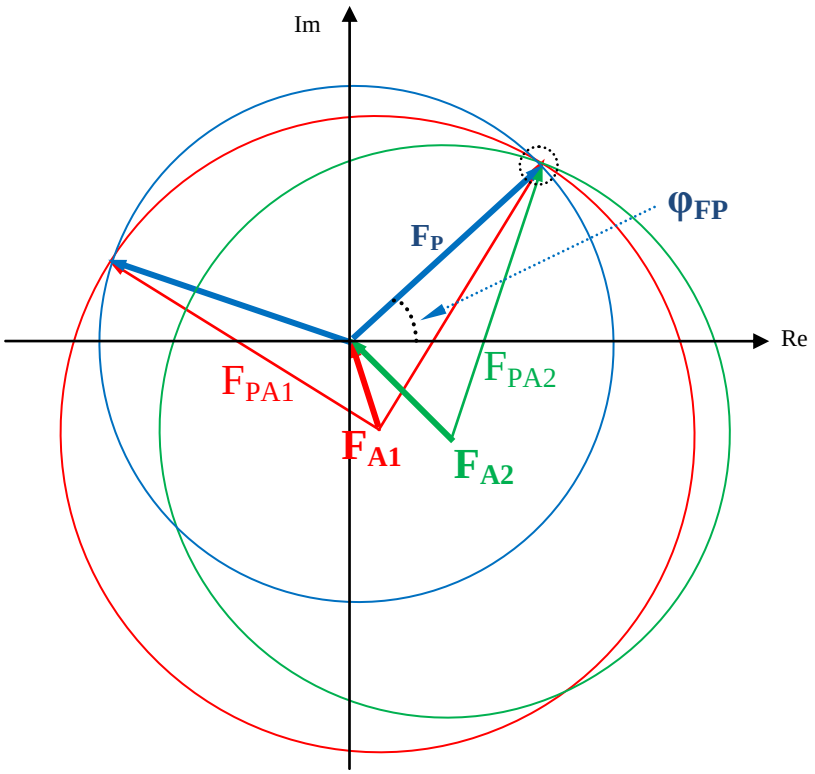


Figure II.6 : Construction de Harker montrant la détermination graphique de la phase par la méthode MAD.

Les phases pour la protéine PerR-Zn-apo ont été obtenues en utilisant indépendamment les programmes SOLVE/RESOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) et HLK2MAP (interface graphique pour SHELX (Sheldrick, 2008)). Les données ont été enregistrées en utilisant le zinc de la protéine comme diffuseur anomal. Les structures PerR-Zn-Mn et PerR-Zn-ox ont été résolues par remplacement moléculaire avec en utilisant la structure PerR-Zn-apo comme modèle de référence.

1.5.1.2.| Le remplacement moléculaire

Le remplacement moléculaire est une méthode utilisée quand on dispose d'une structure cristallographique d'une protéine possédant typiquement plus de 25 % d'identité de séquence avec la protéine d'intérêt. L'homologie de séquence n'est pas le seul critère pour résoudre une structure par remplacement moléculaire; c'est surtout l'homologie structurale qui permet d'utiliser les phases de la protéine modèle pour résoudre la structure de la protéine inconnue, mais cette homologie structurale n'est pas estimable *a priori*.

La méthode du remplacement moléculaire consiste à calculer les fonctions de Patterson pour le modèle cristallographique et pour la structure recherchée. La première étape consiste à déterminer la matrice de rotation pour laquelle la corrélation entre la fonction de Patterson du modèle orienté et celle issue de la structure inconnue est maximale (Rossman and Blow, 1962), c'est la **fonction de rotation**. La deuxième étape consiste à repositionner le modèle par **translation** (x, y, z) pour maximiser la corrélation entre les facteurs de structures calculés et mesurés. Les phases sont ainsi extraites. Le modèle de la protéine obtenue est néanmoins biaisé par le modèle de départ. Le modèle doit ensuite être affiné.

1.5.2.| Construction du modèle et affinement

A partir des phases expérimentales déterminées soit par la méthode MAD, soit par remplacement moléculaire, on dispose d'une carte de densité électronique dans laquelle on peut construire un modèle de la structure recherchée. En général, des programmes comme ARP/WARP (Morris *et al.*, 2003) ou RESOLVE (Terwilliger, 2003) permettent une construction automatique si les phases sont de bonne qualité et la résolution suffisamment haute (moins de 2,5 Å). La procédure d'affinement permet de corriger le modèle initial afin d'obtenir un accord optimal entre les facteurs de structure observés et ceux calculés à partir du modèle construit. En pratique, la reconstitution manuelle du modèle et les étapes d'affinement sont alternées jusqu'à obtenir le modèle final. Les programmes d'affinement CNS (Brunger *et*

al., 1998) et REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) affinent les paramètres x, y, z, et le facteur d'agitation thermique de chaque atome. Il est important de contrôler le nombre de paramètres à affiner en imposant certaines contraintes comme la stéréochimie, les distances et les angles de liaison.

L'affinement du modèle est suivi et validé par les facteurs R et R_{free}. Ces deux facteurs permettent de contrôler l'accord entre les facteurs de structures observés (F_{obs}) et les facteurs de structures calculés à partir du modèle construit (F_{calc}) d'après la formule :

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - |F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

Le facteur R diminue nécessairement au cours de l'affinement car on optimise l'accord entre facteur de structure observé et calculé. Le facteur R_{free} moins biaisé que le facteur R, est calculé sur un ensemble de réflexions exclues de la procédure d'affinement. Ces réflexions sont choisies de manière aléatoire et représentent le plus souvent 5 % des réflexions totales.

1.5.3.| Analyse des structures

Les structures obtenues peuvent être visualisées et analysées avec des logiciels comme Coot (Emsley and Cowtan, 2004) et PyMol (DeLano, 2002). Coot permet la visualisation des cartes de densité électronique, puis la construction et l'affinement des structures (grâce à un couplage avec REFMAC5). PyMol est optimisé pour la réalisation des figures. Toutes les figures présentées dans cette thèse ont été créées avec PyMol.

1.6.| Les critères d'évaluation d'un modèle atomique

Afin d'évaluer et de valider un modèle, plusieurs critères doivent être surveillés :

- pendant l'enregistrement des données : la résolution, R_{sym} (ou R_{merge}), le rapport signal sur bruit I/σ(I) et la complétude ;
- pendant la construction et l'affinement : les statistiques d'affinement R et R_{free} ; les déviations moyennes des distances et les angles entre les liaisons.
- pour le modèle final, une structure est estimée correcte quand les écarts moyens n'excèdent pas 2° pour les angles et 0,02 Å pour les distances. La stéréochimie de la chaîne polypeptidique est estimée par le diagramme de Ramachandran (Ramakrishnan and Ramachandran, 1965).

2.| La spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX)

La spectroscopie d'Absorption X (SAX) est une technique qui permet d'apporter des informations électroniques et structurales sur un élément chimique considéré. En sondant sélectivement les états électroniques du métal et son environnement local, elle permet alors d'accéder à son état de spin et au degré d'oxydation, en plus des informations structurales que sont la géométrie autour de l'élément sondé, la distance entre ce même élément et ses voisins, ainsi que le nombre et la nature de ces derniers.

Seuls les principes de bases de l'analyse des spectres SAX sont décrits dans ce paragraphe. Pour une explication plus détaillée, le lecteur pourra se référer à quelques ouvrages traitant de la SAX comme :

- *Basic principles and data analysis*, B.K. Teo, Spinger-Verlag (1985)
- *Rayonnement Synchrotron dans le domaine des rayons X*, J. Petiau, P. Lagarde, Ecole d'Aussois, CNRS (1986).
- *X-ray Absorption Spectroscopy*, A. Fontaine, Cours Hercules, Vol. I, Ch. XV, p 323 (1994)

Cette technique est particulièrement adaptée à l'étude des métalloprotéines puisqu'elle permet d'obtenir des informations structurales locales, en particulier pour des échantillons en solution. La SAX s'est révélée être une technique complémentaire à la cristallographie puisqu'elle permet d'avoir accès à des informations supplémentaires telles que la géométrie et les distances (à faible résolution) entre le métal et ses ligands.

2.1.| Principe de la SAX

La SAX trouve son origine dans le processus général d'interaction entre le rayonnement et la matière. Lorsqu'un photon d'intensité I_0 interagit avec la matière, plusieurs processus d'interaction existent (Figure II.7) : les processus de diffusion élastique (de Thomson) et inélastique (de Compton), par interaction des photons avec les électrons constituants les atomes de la matière cible ; la photoémission d'un électron par le photon incident ; la fluorescence (d'intensité I_f) du à l'étape de relaxation qui suit toujours la photoémission (l'atome perd, en une ou plusieurs étapes, l'excès d'énergie qu'il contient par émission d'un photon).

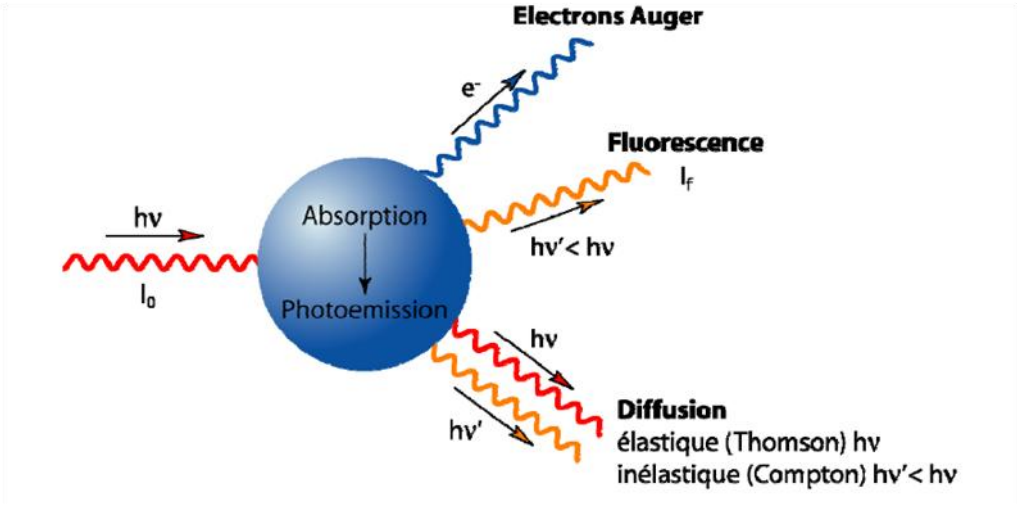


Figure II.7 : Représentation schématique de l'interaction entre le rayonnement et la matière.

La SAX exploite ce phénomène de photoémission. L'excitation puis l'éjection d'un photoélectron de cœur de l'ion métallique étudié (ou l'élément) par le faisceau de photons incident entraîne une absorption de ce faisceau : on parle d'absorption X. L'électron va alors sonder, suivant l'énergie incidente du photon X, les états liés puis l'environnement de l'ion métallique, donnant lieu aux différentes structures d'interférences dans le spectre d'absorption.

Expérimentalement, le spectre d'absorbance **μx** de l'échantillon en fonction de l'énergie incidente du rayonnement est obtenu soit par mesure de l'absorption du faisceau incident (mode transmission), soit par mesure de l'intensité de fluorescence de l'échantillon quand celui-ci est présent en faible concentration (mode fluorescence) (Figure II.8).

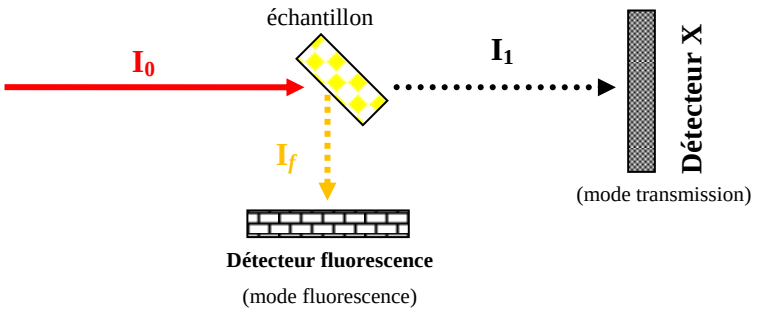


Figure II.8 : Modes d'enregistrement d'un spectre SAX.

En mode transmission, l'absorbance est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$I_1 = I_0 e^{-\mu x}$$

μ est le coefficient d'absorption massique, x est l'épaisseur de l'échantillon et I_0 et I_1 sont respectivement les intensités des faisceaux incident et transmis.

En mode fluorescence, l'absorbance est donnée par la relation :

$$\mu x \approx \frac{I_f}{I_0}$$

I_f est l'intensité du rayonnement de fluorescence mesuré. Pour un atome donné, les coefficients d'absorption présentent des augmentations brutales à certaines valeurs de l'énergie, appelées seuils d'absorption. Dès que l'énergie du photon incident atteint ou dépasse l'énergie du seuil d'absorption E_0, un électron est éjecté de l'atome absorbeur. Dans un gaz monoatomique, au-delà du seuil d'absorption, la décroissance du coefficient d'absorption est monotone. En revanche, pour tout autre composé, l'environnement de l'atome étudié va induire des oscillations dans la décroissance de coefficient d'absorption après le seuil.

La Figure II.9 représente le spectre d'absorption X de la protéine PerR-Zn-Fe avec les différentes zones caractéristiques du spectre d'absorption : on y visualise le préseuil, le XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) et l'EXAFS (Extented X-ray Absorption Fine Structure).

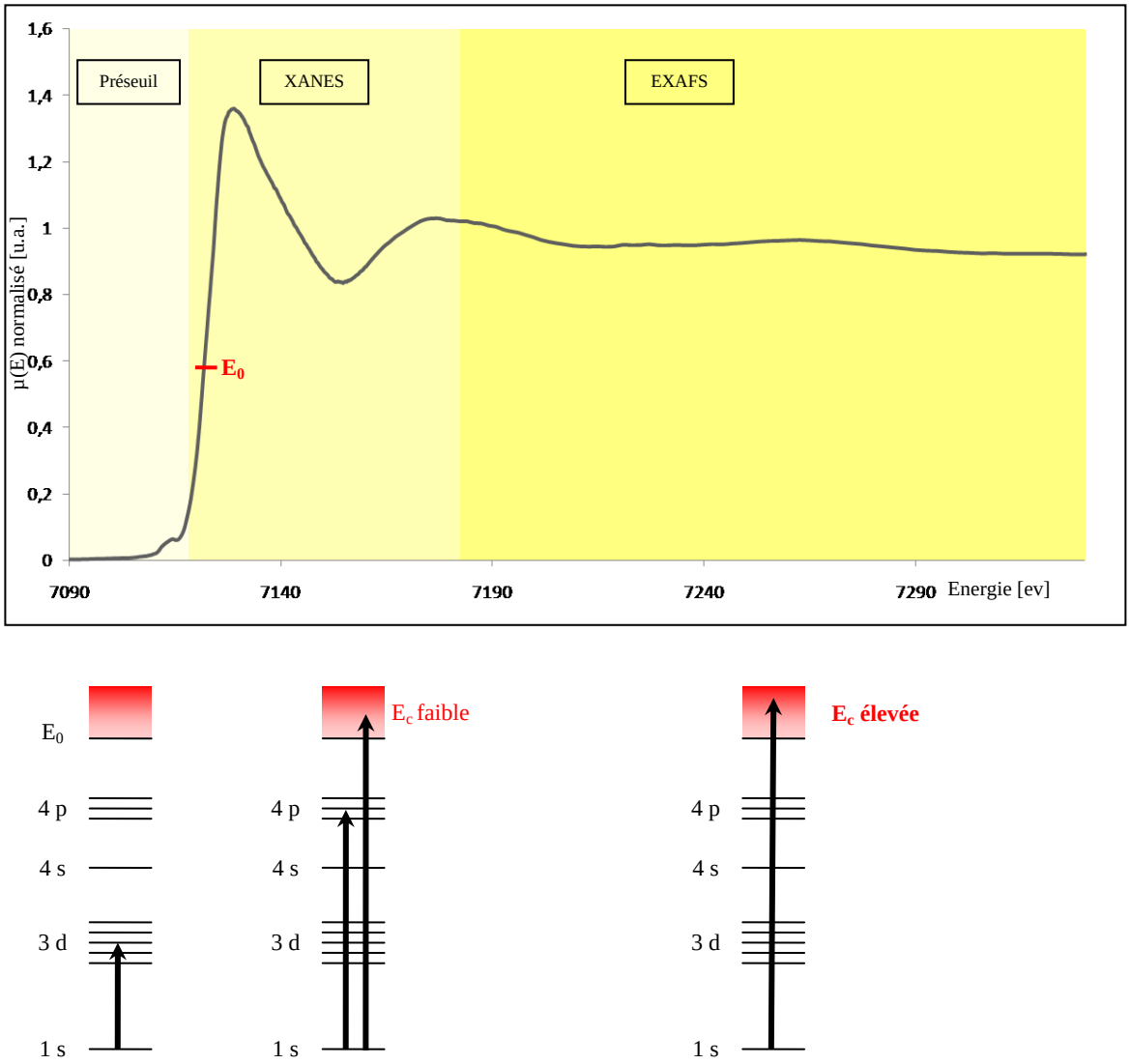


Figure II.9 : Spectre d'absorption X normalisé de la protéine PerR-Zn-Fe (seuil K du fer). Les différents domaines du spectre sont indiqués sur la figure avec les transitions électroniques associées. E_c est l'énergie cinétique du photoélectron et E_0 l'énergie du seuil d'absorption. La flèche noire permet de visualiser l'énergie du photoélectron. La zone rouge schématisée pour des énergies supérieures à E_0 correspond au continuum d'états inoccupés.

Le préseuil est défini pour des énergies inférieures à environ 10 eV en dessous de l'énergie du seuil d'absorption E_0. Le préseuil donnera des informations électroniques telles que l'état de spin et le degré d'oxydation de l'ion métallique, puis des informations telles que la géométrie et le nombre de coordination.

Le XANES s'étend de quelques eV en dessous de E_0 jusqu'à 50 eV au-delà de E_0. L'énergie absorbée par l'électron est suffisante pour que l'électron excité transite vers les premières orbitales non occupées. En particulier, pour un ion métallique de transition de la première ligne du tableau périodique, les orbitales 3d sont incomplètes et s'hybrident avec les

états p vers lesquelles le photoélectron transite. A ces transitions 1s vers 3d correspondent des pics appelés pré-pics. Pour des énergies un peu plus élevées, mais toujours dans le domaine XANES, le photoélectron monte sonder les couches électroniques supérieures de l'atome (4p), puis les états p du continuum au-delà du niveau de Fermi. Le XANES permet donc d'accéder aux informations électroniques telles que le degré d'oxydation (position du seuil…), la géométrie du site et le nombre de coordination.

L'EXAFS s'étend à partir de 50 eV au-delà de E_0. L'énergie du photon étant supérieure au seuil E_0, l'électron est éjecté de l'ion métallique avec une énergie cinétique. L'onde électromagnétique de l'électron éjecté va se propager et interagir avec les atomes voisins. Ces atomes vont alors rétrodiffuser l'onde incidente. Les interférences constructives et destructives vont donner lieu aux structures dans la partie EXAFS, plus connues sous le nom d'oscillation EXAFS. Ces oscillations EXAFS sont dépendantes de la géométrie autour de l'ion métallique, de la distance entre cet ion métallique et ses voisins, ainsi que du nombre et la nature de ces voisins. Il est alors possible d'extraire une distance moyenne entre l'ion métallique et ses voisins, il est par contre difficile de distinguer en EXAFS deux éléments possédant des numéros atomiques proches (par exemple O, N, ou C).

2.2.| L'enregistrement des données SAX

Les données SAX ont été enregistrées au seuil K du fer en mode fluorescence sur la ligne FAME-BM30b à l'ESRF. Les échantillons sont transférés dans une matrice en téflon et congelés dans l'azote liquide. La cryogénie est utilisée pour préserver l'intégrité des échantillons protéiques pendant l'enregistrement des spectres et pour diminuer l'agitation thermique. Cette cryogénie est contrôlée grâce à un cryostat à hélium. Le montage expérimental de la ligne FAME-BM30b est présenté sur la Figure II.10.

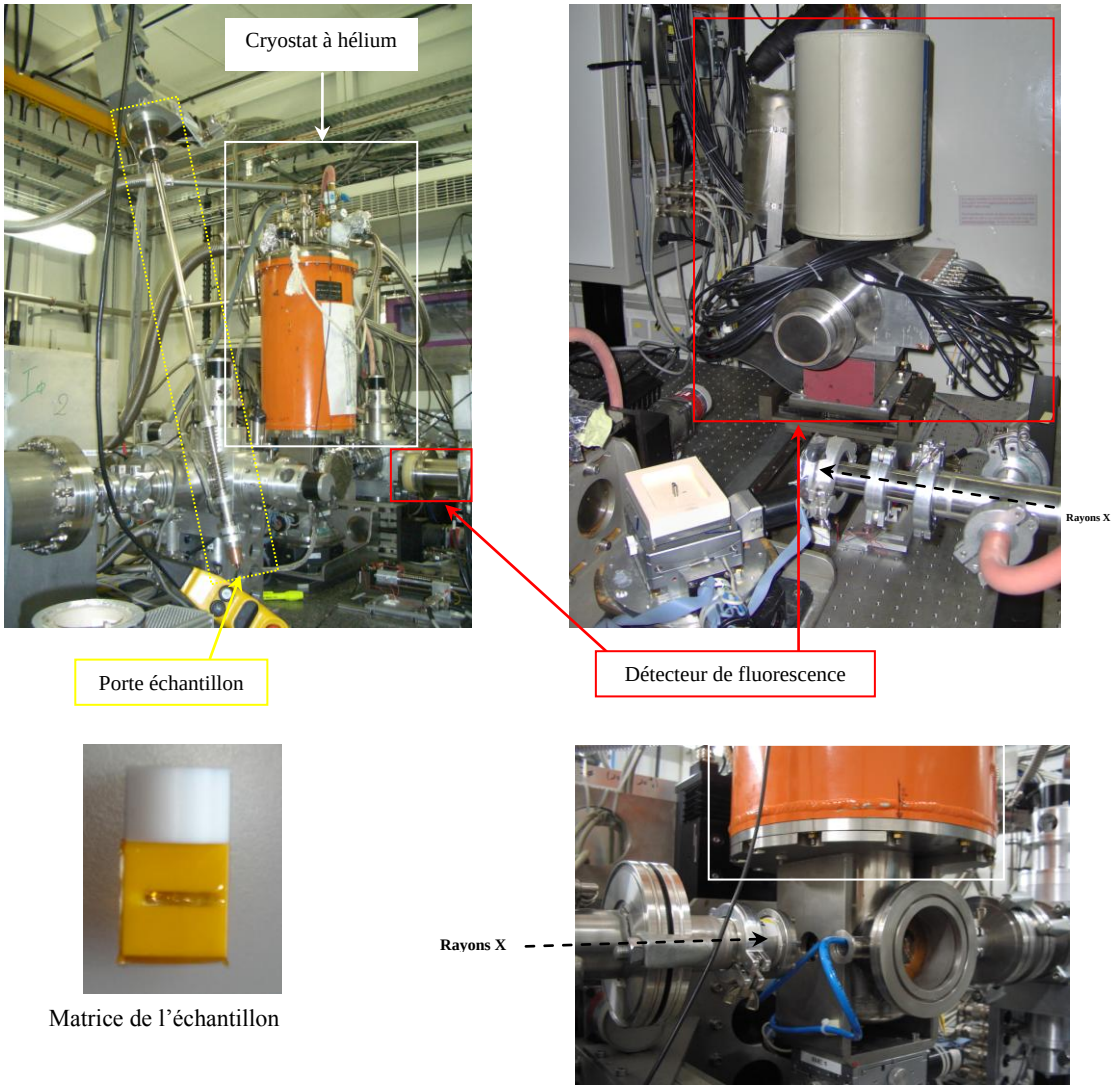


Figure II.10 : Cabine expérimentale de la ligne de lumière FAME-BM30b.

2.3.| Le traitement des données SAX

Le traitement se décompose en cinq étapes illustrées par la Figure II.11.

Etape 1 : L'énergie du seuil E_0 est déterminée par le maximum de la dérivée du spectre d'absorption dans le domaine du XANES.

Etape 2 : La normalisation du spectre : cette étape permet de réaliser une comparaison facile et significative entre différents spectres d'absorption.

Etape 3 : La conversion du coefficient d'absorption μ(E) dans l'espace réciproque [$Å^{-1}$] puis l'extraction de la fonction EXAFS χ(k) par soustraction d'une ligne de base $\mu_0(k)$: le spectre dans l'espace des énergies est converti dans l'espace réciproque par la relation :

$$k = \sqrt{\frac{2m_e \times (E - E_0)}{\hbar^2}}$$

k est le nombre d'onde de l'électron exprimé en Å^{-1}, $\hbar$ la constante de Planck réduite et m_e la masse de l'électron.

La fonction EXAFS χ(k) normalisée est calculée suivant la relation :

$$\chi(k) = \frac{\mu(k) - \mu_0(k)}{\mu_0(k)}$$

μ_0(k) est la ligne de base qu'il faut soustraire du spectre pour en extraire les oscillations.

Etape 4 : La transformée de Fourier de l'espace réciproque dans l'espace réel [Å].

Etape 5 : La transformée de Fourier inverse donne la distribution des atomes autour de l'ion métallique. Une simulation de la transformée de Fourier inverse de la première couche d'atomes est réalisée. Plusieurs simulations sont effectées jusqu'à l'obtention de la meilleure superposition avec la fonction $k^3\chi(k)$ du spectre expérimental. La formule EXAFS est donnée par la relation (pour un absorbeur *j* entouré de plusieurs couches *i*) :

$$k_\chi(k) = -S_0^2 \sum_i \frac{N_i}{R_i^2} |f_i(k,R)| e^{-2\sigma_i^2 k^2} e^{-\frac{2R_i}{\lambda(k)}} \sin\left(2kR_i + \varphi_{ij}(k,R)\right)$$

S_0^2 représente le terme de réduction d'amplitude due aux effets multiélectroniques, N_i le nombre de voisins de type *i* à la distance R_i, $f_i(k)$ l'amplitude de rétrodiffusion de l'atome de type *i*, σ_i le facteur Debye-Waller dans l'approximation d'une gaussienne, λ(k) le libre parcours moyen de l'électron excité et $\varphi_{ij}(k)$ le déphasage de l'onde photoélectronique entre l'ion métallique absorbeur *j* et les voisins de type *i*. L'utilisation de composés modèles proches du composé échantillon avec des paramètres structuraux connus est indispensable pour calculer certains paramètres tels que $f_i(k)$, $\varphi_{ij}(k)$ et $\lambda(k)$. On déduit de cette dernière étape le nombre R_i, la nature N_i des voisins et les distances interatomiques. L'incertitude classique sur les paramètres structuraux en EXAFS est de 0,02 Å pour R_i et 20 % pour N_i.

Compte tenu du nombre important de paramètres et des corrélations entre ces différents paramètres, nous avons appliqué une méthode développée et décrite par Lilian Jacquamet pendant sa thèse (Jacquamet, 1999).

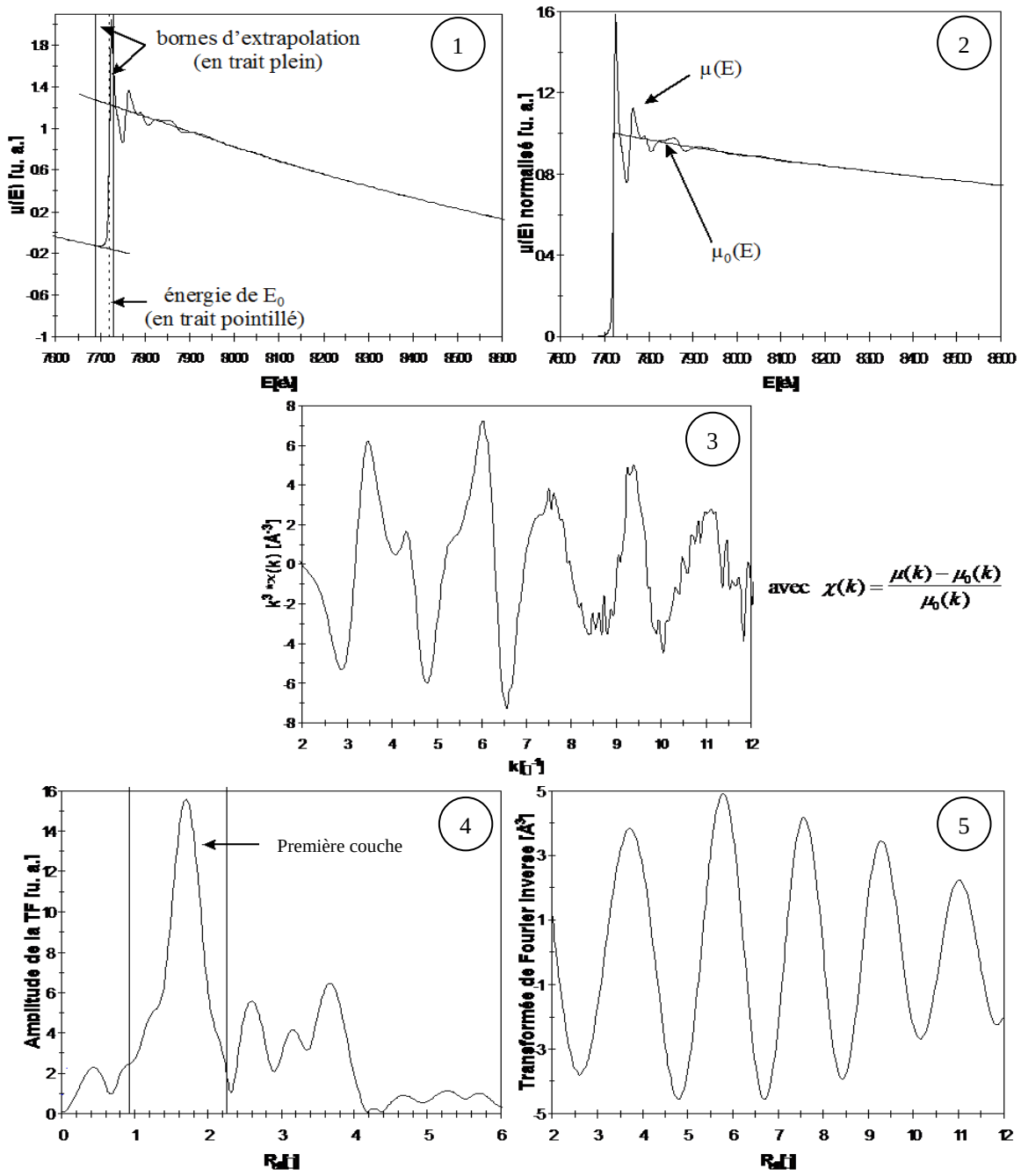


Figure II.11 : Extraction des informations structurales du spectre d'absorption X.

3.| Références Bibliographiques – Chapitre II

Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-921.

DeLano, W. L. (2002). http://www.pymol.org.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

Jacquamet, L. (1999) Etudes structurales de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation) d'*Escherichia coli* par spectroscopie d'absorption des rayons X: XANES et EXAFS, *THESE*, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* 26, 795-800.

Morris, R. J., Perrakis, A., and Lamzin, V. S. (2003). ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Methods Enzymol* 374, 229-244.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.

Ramakrishnan, C., and Ramachandran, G. N. (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys J* 5, 909-933.

Rossman, M. G., and Blow, D. M. (1962). The detection of sub-unit within the crystallographic asymetric unit. *Acta Cryst* 15, 24-31.

Sheldrick, G. M. (2008). A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* 64, 112-122.

Terwilliger, T. C. (2003). Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 38-44.

Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 849-861.

CHAPITRE III

L'apoprotéine

Les données biochimiques sur la protéine PerR présentes dans la littérature au début de ce travail ont été présentées dans la section 3 du chapitre I. L'essentiel de cette caractérisation biochimique a été effectuée par le groupe de J. D. Helmann sur la protéine PerR de *B. subtilis*. En ce qui concerne la caractérisation structurale de PerR, aucune donnée n'était disponible dans la littérature. La seule structure publiée, dans cette famille de métalloprotéines, était celle de la protéine Fur de *P. aeruginosa* par le groupe de E. Pohl. (Pohl *et al.*, 2003)

L'étude cristallographique d'une protéine est conditionnée par l'obtention de cristaux de taille et de qualité suffisantes à partir d'une solution protéique très pure et homogène. Dans ce sens, de gros efforts ont été effectués pour produire la protéine PerR avec de bons rendements. Un protocole aboutissant à un lot pur et homogène de protéine a été mis au point. Ce travail a été compliqué par le fait que la protéine peut être sensible à l'oxydation lors des étapes d'expression et de purification. L'oxydation de la protéine conduit en général à la formation d'une espèce dont la masse présente un incrément de +16 Da par rapport à la protéine sauvage. L'analyse par spectrométrie de masse (ESI en conditions dénaturantes) a montré que le pourcentage d'oxydation de PerR est variable d'un lot à l'autre. Dans les cas les plus défavorables, il peut aller jusqu'à environ 40 % (Lee and Helmann, 2006b). L'oxydation de PerR sera discutée dans le chapitre V.

Dans un premier temps, la protéine PerR de *B. subtilis* a été exprimée dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli*. PerR a été exprimée puis purifiée sous forme d'apoprotéine (PerR-Zn-apo) selon le protocole décrit par Helmann *et al* (Herbig and Helmann, 2001). Les résultats présentés dans ce chapitre sur la protéine PerR-Zn-apo ont été obtenus avec un lot de protéine exprimée en milieu LB. Cette purification conduit à un mélange dont le rapport protéine sauvage/protéine oxydée est de 80/20.

L'étude structurale de PerR-Zn-apo a été effectuée à l'aide des plateformes de cristallisation de l'IBS et de l'EMBL. Ma présence au sein du Groupe Synchrotron du LCCP, dans lequel j'ai effectué une grande partie de mes travaux, m'a permis de me former à la cristallographie des protéines. Ce travail a bénéficié d'un accès privilégié à la ligne de lumière FIP-BM30a de l'ESRF. Cette ligne est prise en charge par une partie du personnel du Groupe Synchrotron.

Je présenterai, dans un premier temps, les étapes préliminaires à l'étude cristallographique de PerR-Zn-apo qui sont l'expression et la purification de la protéine et les

essais de cristallisation. La mise en place de l'expérience de diffraction sera brièvement décrite puis les résultats décrits dans l'article seront discutés.

1.| Obtention et caractérisation de la protéine

1.1.| Expression et purification

Le gène *perR* a été cloné dans le vecteur pET30c. L'expression de la protéine PerR est effectuée dans une souche *E. coli* BL21 (DE3) en milieu LB. Deux étapes sont nécessaires à sa purification : une colonne échangeuse d'anions et une colonne de tamisage moléculaire. Les échantillons sont choisis à partir des chromatogrammes et des analyses électrophorétiques sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le protocole d'expression et de purification est détaillé dans le chapitre « Méthodes Biochimiques et Biophysiques ».

La Figure III.1-① illustre l'analyse électrophorétique des différentes étapes de la purification. Le profil d'élution sur colonne de tamisage moléculaire analytique est présenté sur la Figure III.1-②. La protéine est obtenue sous la forme dimérique avec un poids moléculaire apparent de 32 kDa.

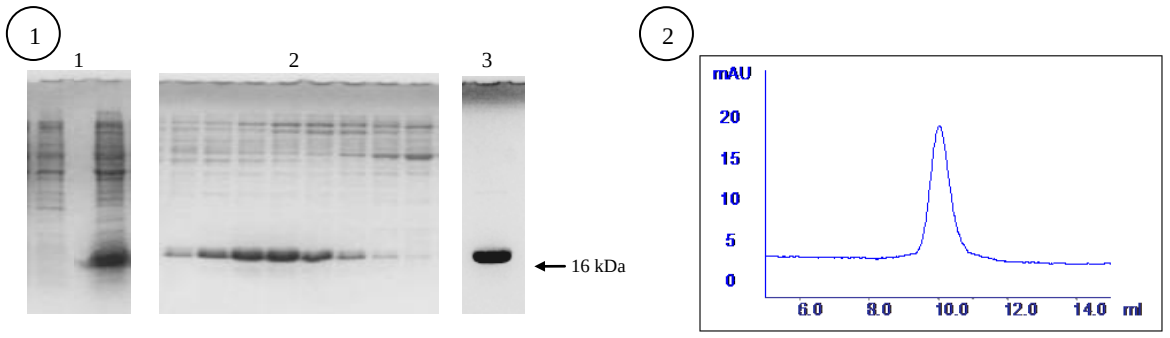


Figure III.1 : Purification de la protéine PerR. ① Analyses électrophorétiques sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes ; 1 : Test d'expression (avant et après induction) ; 2 : fractions issues du passage sur la colonne échangeuse d'anions ; 3 : après passage sur colonne de tamisage moléculaire. ② Profil d'élution de la protéine purifiée sur colonne de tamisage moléculaire analytique.

Ces conditions d'expression et de purification conduisent à environ 15 mg de protéine purifiée par litre de culture. La concentration de la protéine est estimée en spectroscopie UV-Visible en utilisant le coefficient d'extinction molaire de PerR à 277 nm (9020 M^{-1} cm^{-1}).

1.2.| Caractérisation de la protéine

1.2.1.| Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse en spectrométrie de masse indique la présence de deux espèces : une espèce majoritaire (80 %) d'un poids moléculaire de 16292 Da et une deuxième espèce (20 %) d'un poids moléculaire de 16308 Da. D'après la séquence en acides aminés de la protéine PerR, la masse théorique de la protéine est de 16423,5 Da. L'écart entre la masse théorique et la masse de l'espèce majoritaire obtenue s'explique par l'excision de la méthionine N-terminale (131 Da) par la bactérie. La deuxième espèce présente un incrément de +16 Da par rapport à la protéine et correspond à la forme oxydée de PerR ayant incorporée un atome d'oxygène.

1.2.2.| Contenu en métal de la protéine

Le contenu en métal de la protéine est déterminé par spectrométrie d'absorption atomique. Deux échantillons de protéine issus de la purification ont été analysés (Tableau III.I-① et ②). Ces analyses montrent la présence d'un ion Zn^{2+} par sous unité de protéine. Les rapports [Fe]/[PerR] et [Mn]/[PerR] sont négligeables. Ce résultat suggère que l'ion zinc est fortement lié à la protéine. Malgré la présence d'EDTA dans les tampons pendant la purification, l'ion Zn^{2+} reste complexé. Le protocole de purification décrit ci-dessus permet d'obtenir PerR sous sa forme apo, sans le métal du site de régulation.

	[PerR] (µM)	[Zn] (µM)	[Zn]/[PerR]	[Fe] (µM)	[Fe]/[PerR]	[Mn] (µM)	[Mn]/[PerR]
①	50	40	**0,80 (5)**	0,55	0,01	0,02	4.10^{-4}
②	78	61	**0,78 (5)**	1,5	0,02	0,1	1.10^{-3}

Tableau III.I : Dosages par absorption atomique des métaux dans la protéine PerR purifiée.

2.| Cristallisation de la protéine

Les premiers essais de cristallisation ont été réalisés avec la protéine PerR-Zn-apo concentrée à 10 mg/mL. Le criblage initial des conditions de cristallisation a été effectué sur la plateforme de cristallisation de l'IBS. Environ 600 conditions issues des kits commerciaux (Hampton® et Qiagen®) ont été testées.

Les premiers cristaux sont apparus dans une dizaine de conditions différentes après seulement 24 heures. L'analyse de ces conditions a permis de mettre en évidence quelques éléments nécessaires à la cristallisation de la protéine, comme la présence de polyéthylène glycol, un pH compris entre 7,5 et 8,5 et la présence d'un sel (LiCl, NaCl ou $NH_4(SO_4)_2$). Les cristaux du premier criblage sont souvent difficiles à « pêcher ». La reproduction et l'optimisation de ces derniers est nécessaire. L'optimisation consiste à faire varier quelques paramètres dans les conditions de cristallisation comme la concentration en protéine, le pH des solutions tampon, la température, etc.

Les cristaux présentant la meilleure qualité de diffraction sont obtenus à 20 °C par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue en mélangeant 1 µL de protéine concentrée à 10 mg/mL dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, 2 mM EDTA avec 1 µL du réservoir contenant 25 % PEG 6000, 1,5 M LiCl, 100mM Tris-HCl pH 8,0. Des cristaux de la protéine PerR-Zn-apo sont présentés sur la Figure III.2.

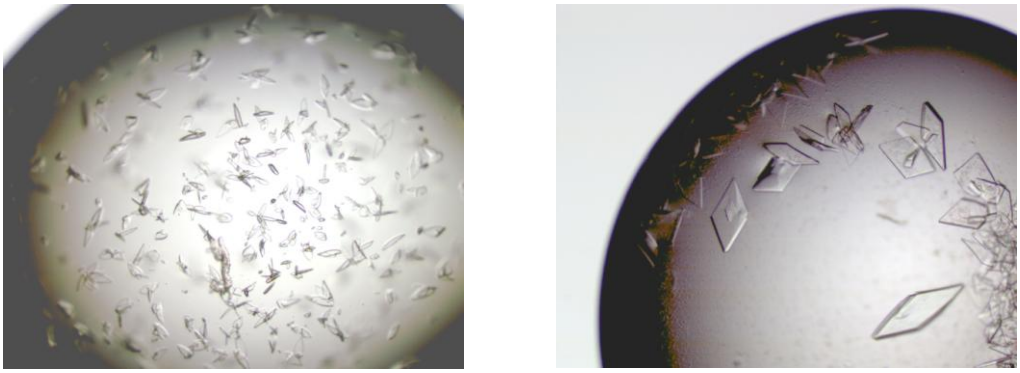


Figure III.2 : Cristaux de la protéine PerR-Zn-apo obtenus avant et après optimisation des conditions de cristallisation.

3.| Configuration de l'expérience de diffraction

Les cristaux de la protéine ont été transférés dans une solution contenant, en plus de la solution de cristallisation, 25 % de glycérol comme agent cryoprotectant avant d'être congelés dans l'azote liquide. Les clichés de diffraction ont été enregistrés sur la ligne de lumière FIP-BM30a de l'ESRF. La structure de PerR-Zn-apo a été résolue par la méthode MAD avec le zinc de la protéine comme diffuseur anomal. Les données ont donc été enregistrées au seuil K du zinc. Les longueurs d'onde ont été choisies à l'aide des spectres de fluorescence

expérimentaux (Figure III.3). Les longueurs d'ondes choisies sont de 1,2824 Å pour le pic (maximum de *f''*) et de 1,2828 Å et pour le point d'inflexion (minimum de *f'*). La troisième longueur d'onde (loin du seuil) a été fixée à 0,97 Å. L'ensemble des données à été enregistré sur un seul cristal. Les statistiques de l'enregistrement de ces données, la résolution de la structure et les statistiques d'affinement sont résumés dans le **Tableau 1** de l'article.

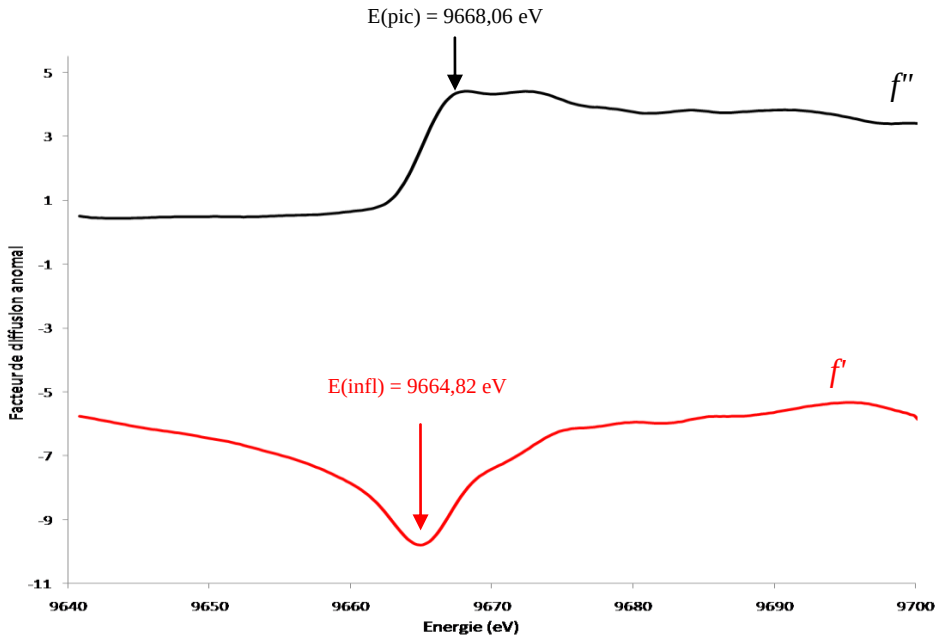


Figure III.3 : Calcul *f'*et *f''* pour le phasage MAD. Le spectre de fluorescence à été enregistré à partir d'un cristal de la protéine PerR-Zn-apo au seuil K du zinc. Les longueurs d'onde correspondantes au maximum de *f''* et au minimum de *f'* ont été choisies pour l'enregistrement des données de diffraction.

4.| Publication

La structure de la protéine PerR-Zn-apo est décrite dans l'article « *Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from Bacillus subtilis* » publié dans la revue *Molecular Microbiology*. L'ensemble des données structurales et biochimiques nous a permis de mettre en évidence le rôle structural du site à zinc de PerR.

Molecular Microbiology (2006) **61**(5), 1211–1219
doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05313.x
First published online 1 August 2006

Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*

Daouda A. K. Traoré,[1,2†] Abdelnasser El Ghazouani,[1†] Sougandi Ilango,[1] Jérôme Dupuy,[2] Lilian Jacquamet,[2] Jean-Luc Ferrer,[2] Christelle Caux-Thang,[1] Victor Duarte[1*] and Jean-Marc Latour[1*]
[1]*DRDC/Laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie, UMR 5155 CEA-CNRS-UJF, CEA-Grenoble, 38054 Grenoble Cedex 9, France.*
[2]*Laboratoire de Cristallographie et de Cristallogenese des Proteines/Groupe Synchrotron, Institut de Biologie Structurale J. P. Ebel, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.*

Summary

Bacteria adapt to elevated levels of Reactive Oxygen Species (ROS) by increasing the expression of defence and repair proteins, which is regulated by ROS responsive transcription factors. In *Bacillus subtilis* the zinc protein PerR, a peroxide sensor that binds DNA in the presence of a regulatory metal Mn^{2+} or Fe^{2+}, mediates the adaptive response to H_2O_2. This study presents the first crystal structure of apo-PerR-Zn which shows that all four cysteine residues of the protein are involved in zinc co-ordination. The $Zn(Cys)_4$ site locks the dimerization domain and stabilizes the dimer. Sequence alignment of PerR-like proteins supports that this structural site may constitute a distinctive feature of this class of peroxide stress regulators.

Introduction

Oxidative stress is generated by exposure to elevated levels of Reactive Oxygen Species (ROS), such as superoxide anion, hydrogen peroxide and the highly toxic hydroxyl radical which can damage proteins, nucleic acids and cell membranes (Storz and Imlay, 1999). To avoid or counter the harmful effects of ROS, cells constitutively express proteins to protect themselves and repair the damages. These proteins are under negative control of specific regulators which are the central pieces of the adaptive and inducible responses to oxidative stress present in cells (Mongkolsuk and Helmann, 2002). These regulators sense the increase of ROS and transduce the signal into increased expression of defence activities. Among the best-understood regulators of oxidative stress responses in bacteria is OxyR which is the hydrogen peroxide sensor in *Escherichia coli.* The OxyR regulon includes genes involved in peroxide metabolism and protection (*katG*, *ahpCF*, *dps*), redox balance (*gorA*, *grxA*, *trxC*) and important regulators such as *fur* and *oxyS* RNA (Zheng *et al.*, 2001a,b). From thorough crystallographic and biochemical analyses, Storz and coworkers (Zheng *et al.*, 1998) have proposed a mechanism based on a H_2O_2-induced thiol–disulphide switch (Choi *et al.*, 2001). However, The Stamler group has given a different picture for the activation of OxyR. Kim *et al.* (2002) find no evidence for an intramolecular disulphide bond but instead demonstrate that Cys-199 of OxyR can undergo different stable chemical modifications in response to oxidative or nitrosative stress. These authors have shown that these modifications affect OxyR DNA binding *in vitro* and suggested that distinct chemical modifications will lead to fine tuning of OxyR activity.

Bacillus subtilis displays an adaptive response to hydrogen peroxide. In this Gram-positive bacteria, the metalloprotein PerR was identified in Helmann's laboratory as a member of the Fur (Ferric uptake regulator) family (Mongkolsuk and Helmann, 2002). PerR is the major regulator of the peroxide stress response, a property that makes it functionally analogous to OxyR. Insight into the mechanism controlling the peroxide stress response in *B. subtilis* emerged from analysis of *mrgA* regulation. This gene encodes a protective DNA binding protein which is a Dps homologue (Chen and Helmann, 1995; Chen *et al.*, 1995). It was initially demonstrated that expression of *mrgA* is subjected to metal regulation. The *mrgA* gene repression, elicited by growth with either added manganese or iron (Chen *et al.*, 1993), is mediated by PerR (Bsat *et al.*, 1998). The *B. subtilis* PerR regulon includes genes coding for MrgA, the major vegetative catalase (KatA), an alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF), haem biosynthesis enzymes (HemAXCDBL), a Zn^{2+} uptake P-type ATPase (ZosA), PerR and Fur (Fuangthong *et al.*, 2002). Like other Fur-like homologues, PerR is a small dimeric protein which contains two metal ions per monomer (Herbig and

Accepted 29 June, 2006. *For correspondence. E-mail jean-marc.latour@cea.fr or victor.duarte@cea.fr; Tel. (+33) 438 784 407; Fax (+33) 438 783 462. †These authors contributed equally to this work.

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd

Helmann, 2001). One of the metal binding sites co-ordinates a zinc ion that is generally assigned a structural role, whereas the second site binds a regulatory metal required for DNA binding. *In vivo*, there is evidence that PerR can exist in two metallated forms, PerR-Zn-Fe and PerR-Zn-Mn, where either Fe^{2+} or Mn^{2+} functions as corepressor of gene expression. It was shown that H_2O_2 induces PerR dissociation from DNA. However, these two forms of PerR differ dramatically in their response to hydrogen peroxide. In Mn^{2+}-added medium the PerR regulon is strongly repressed and peroxide induction is inefficient. In contrast, with Fe^{2+}-supplemented medium, peroxide induction is maximal and comparable with that of *perR* null mutant strains (Herbig and Helmann, 2001; Fuangthong *et al.*, 2002). PerR and PerR-like regulators have been identified in a wide variety of organisms including *Campylobacter jejuni* (van Vliet *et al.*, 1999), *Streptomyces reticuli* (Ortiz de Orué Lucana and Schrempf, 2000), *Streptomyces coelicolor* (Hahn *et al.*, 2000), *Streptococcus pyogenes* (King *et al.*, 2000), *Staphylococcus aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001) and *Borrelia burgdorferi* (Boylan *et al.*, 2003).

Concerning the activation of PerR by H_2O_2, several hypotheses were first advanced (Herbig and Helmann, 2001; Mongkolsuk and Helmann, 2002). However, very recently, Lee and Helmann (2006) reported that PerR senses H_2O_2 by metal-catalysed histidine oxidation. PerR oxidation, mediated by a bound ferrous ion, leads to the incorporation of one oxygen atom into His-37 or His-91, two of the residues that are supposed to co-ordinate the bound Fe^{2+}. This oxidation would lead to iron release and dissociation of the PerR DNA adduct. The proposed mechanism relies on the reduction of H_2O_2 by Fe^{2+} and the generation of highly reactive hydroxyl radicals (Fenton reaction). By analogy to metal-catalysed oxidative reactions with histidine-containing enzymes and model peptides (Schoneich, 2000; Uchida and Kawakishi, 1993; 1994), the authors propose that the hydroxyl radical reacts with histidine and generates the 2-oxo-histidinyl radical intermediate which finally leads to the 2-oxo-histidine.

In this report we present the crystal structure of *B. subtilis* apo-PerR-Zn (PerR-Zn). To our knowledge this is the first structure of a metalloprotein involved in the inducible peroxide stress response. Interestingly, the zinc ion of PerR-Zn is co-ordinated by the four cysteine residues of the protein. The $Zn(Cys)_4$ site plays a crucial role in the stability of the protein by locking the dimerization domain. Molecular modelling of the present PerR-Zn structure allows us to propose a model for the active form of PerR. Moreover, taking advantage of the latter model and the sequence alignment of more than twenty PerR-like proteins we have been able to identify a potential binding site for the regulatory metal.

Results

Purification, metal content analysis and DNA binding

PerR was overexpressed in *E. coli* and purified to homogeneity using a two-step protocol adapted from Herbig and Helmann (2001) (see *Experimental procedures* and Fig. S1 for details). Electrospray ionisation mass spectrometry, under denaturing conditions, indicated an m/z of 16 291.5 ($\pm$2.0) Da that corresponds to the expected mass with the missing first methionine residue (calculated m/z for the monomer = 16 292.5 Da). Metal content analysis was carried out by atomic absorption spectroscopy using purified PerR samples that were exchanged into Chelex-100-treated Tris-HCl buffer. The results indicate that zinc is present at a ratio of 0.8 ($\pm$0.15) mol of zinc per mol of PerR monomer. Through all preparations of PerR samples, iron and manganese were only detected in trace amounts. Our purification protocol leads exclusively to one form of PerR which retains a single zinc ion per monomer (PerR-Zn). When using Chelex-treated buffers for electrophoretic mobility shift assays, PerR-Zn was inactive and did not bind a DNA fragment containing the PerR box from the *mrgA* promoter. However, upon addition of 1.5 eq. of Mn^{2+} to PerR-Zn, we have been able to reconstitute an active PerR-Zn-Mn protein which binds the *mrgA* PerR box (Fig. S2).

Overall structure of PerR-Zn

The crystal structure of PerR-Zn protein was determined by multiwavelength anomalous diffraction (MAD) and refined to 1.75 Å at the zinc K edge (Table 1). The protein is a homodimer of 144-amino-acid residues (the initial methionine residue is missing). The asymmetric unit of the crystal contains two monomers related by a non-crystallographic twofold axis. Each monomer is composed of two domains, an N-terminal domain (residues 2–85, shown in red for monomer A in Fig. 1) containing the DNA binding motif and a C-terminal domain (residues 92–144, in orange for monomer A in Fig. 1) involved in the dimerization of the protein. The two domains are connected by a loop (residues 86–91). The N-terminal domain is composed of four α-helices (H1–H4) followed by a two-stranded anti-parallel β-sheet (S1, S2). The DNA binding domain of *Bs*-PerR-Zn was identified by structure superposition with other regulators including *Pseudomonas aeruginosa*-Fur (*Pa*-Fur) (Pohl *et al.*, 2003), *Corynebacterium diphtheriae*-DtxR (*Cd*-DtxR) (Pohl *et al.*, 1998), and *Mycobacterium tuberculosis*-IdeR (*Mt*-IdeR) (Pohl *et al.*, 1999a). As illustrated in Fig. S3, all four proteins share the same basic fold with the typical helix–turn–helix (H3–T–H4) motif which contains the putative DNA binding helix H4 (Val-56 to Ser-69 for *Bs*-PerR-Zn). As reported by Huffman and Brennan (2002), a third helix (H2) may sta-

© 2006 The Authors

Table 1. Crystallographic data and refinement statistics.

Data collection			
Space group	P1		
Cell dimensions			
a, *b*, *c* (Å)	40.8, 41.6, 53.9		
α, β, γ (°)	82.2, 80.1, 60.9		
	Peak	*Inflection*	*Remote*
Wavelength	1.2824	1.2828	0.9763
Resolution (Å)	30-2.0	30-2.0	30-1.75
R_{merge}	3.6 (17.1)	3.4 (17.6)	4.5 (26.6)
I / σI	12.5 (5.3)	12.8 (4.8)	12.7 (3.7)
Completeness (%)	81.8 (40.8)	85.5 (42.6)	93.3 (87.2)
Redundancy	1.2	1.2	2.4
Refinement			
Resolution (Å)	35.37-1.75		
No. reflections	28 332		
R_{work}/R_{free}	18.0/23.0		
No. atoms	2566		
Protein	2275		
Ligand/ion	2		
Water	289		
B-factors			
Protein	29.97		
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.012		
Bond angles (°)	1.261		

The values in parenthesis are for the highest resolution bin.
$R_{merge} = R_{work} = \Sigma_h\Sigma_i|I_{hi} - \langle I_h\rangle|/\Sigma_h\Sigma_i I_{hi}$, were I_{hi} is the *i*th observation of the reflection h, while $\langle I_h\rangle$ is the mean intensity of reflection h.
$R_{factor} = \Sigma||F_o| - |F_c||/|F_o|$. R_{free} was calculated with a small fraction (5%) of randomly selected reflections.
The Rfree was calculated from 5% of all data that were not used in the refinement.

bilize the helix–turn–helix motif as a compact globular domain. In addition, *Bs*-PerR-Zn and *Pa*-Fur (Pohl *et al.*, 2003) contain an additional N-terminal helix H1 (residues 5–15 for *Bs*-PerR-Zn and residues 2–9 for *Pa*-Fur) that may be involved in DNA recognition. The C-terminal part of each PerR-Zn monomer (Fig. 1) consists of a α/β domain with three anti-parallel β-strands (S3, S4 and S5) and two α-helices (H5, H6).

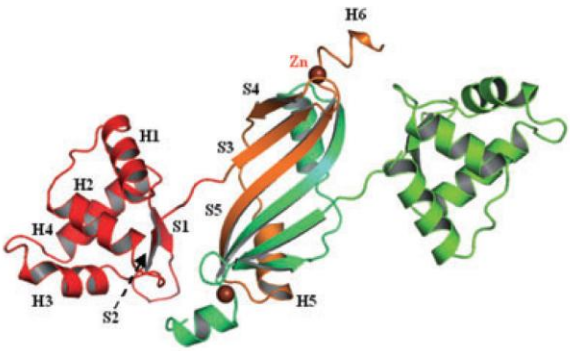


Fig. 1. Ribbon representation of the PerR-Zn dimer crystal structure. Secondary structure elements are annotated in the drawing. View along the non-crystallographic twofold axis. N-terminal and C-terminal domains of monomer A are in red and orange respectively. N-terminal and C-terminal domains of monomer B are in green and light green respectively.

Structure of the zinc binding site

The present data clearly show that one zinc ion is present per monomer and that all four cysteine residues of each monomer are involved in the Zn^{2+} co-ordination. The Zn^{2+} ion is co-ordinated in a tetrahedral fashion with the Zn-S distances ranging from 2.32 Å to 2.36 Å (Fig. 2). As a value of 2.31 Å is expected for a thiolate-Zn^{2+} distance (Simonson and Calimet, 2002), in *Bs*-PerR-Zn the zinc ion is most likely co-ordinated by four thiolates. This zinc binding site, located in the C-terminal domain, consists of two Cys-$(Xaa)_2$-Cys motifs involving Cys-96, Cys-99 and Cys-136, Cys-139 respectively. The two motifs are connected by a 36-residue-long oligopeptide. Cys-96 is the last residue of the S3 β-strand, while Cys-99 is located on the hairpin between the two S3 and S4 β-strands. Following the polypeptide chain to the C-terminal end, Cys-136 is located in the short coil between the S5 β-strand and the H6 α-helix, while Cys-139 belongs to H6 helix. The tertiary fold of the protein brings the three S3, S4 and S5

© 2006 The Authors

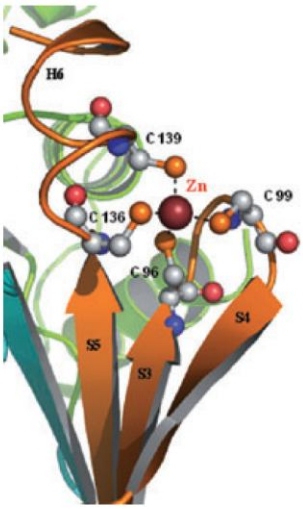


Fig. 2. Zinc binding site and dimerization domain of PerR-Zn. Close-up of the dimerization domain and the zinc binding site of PerR-Zn (monomer A). S3-5 β-strands, H6 helix and the zinc ion are annotated. Metal to cysteine ligand distances are 2.36, 2.31, 2.31 and 2.32 Å for Cys-96, Cys-99, Cys-136, Cys-139 respectively.

β-strands in close proximity so as to form a β-sheet and this arrangement is locked by the zinc binding site (Fig. 2). As the latter three β-strands are part of the dimerization domain, the zinc ion appears to play a crucial structural role in maintaining the stability of the dimer.

Role of the zinc site in the stability of the dimer

To check whether the $Zn(Cys)_4$ centre of PerR-Zn plays a structural role, oxidative reactions were performed with H_2O_2 and diamide, a thiol-specific oxidant. Oxidation of the protein was then evaluated by FPLC using a gel filtration column. For these experiments, all buffers were Chelex-treated to avoid any potential Fenton-like reactions which could damage the protein. The dimeric form of PerR elutes as a single peak with an elution volume of 10 ml (Fig. 3 insert). Oxidative treatment with either H_2O_2 or diamide leads to two new products, **II** and **III** (a typical profile of these reactions is shown in Fig. 3). The elution volumes observed for **II** (11.5 ml) and **III** (7.5 ml) suggest a monomeric and an oligomeric form of the protein respectively. It must be noted that the formation of **III** is prevented in the presence of a high ionic strength (0.5 M NaCl). Electrospray mass spectrometry analysis of **II**, obtained with either H_2O_2 or diamide treatment, led to an m/z of 16 287.5 (±2.0) Da which corresponds to the mass of the oxidized monomer. Interestingly, the latter mass value suggests that two disulphide bonds are formed upon oxidative treatment of PerR-Zn. Importantly, metal content analysis by flame atomic absorption revealed that zinc is not present in the oxidized monomer.

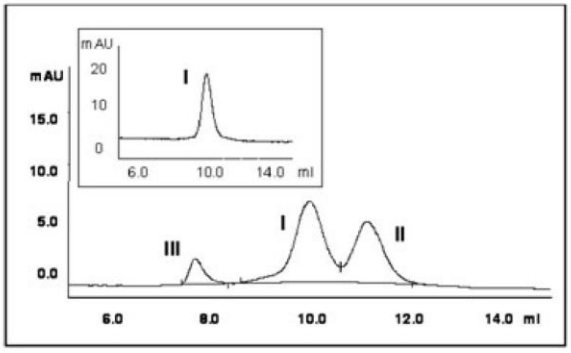


Fig. 3. Typical FPLC profile for the reaction of PerR-Zn with H_2O_2. Oxidation of PerR-Zn (20 μM) was carried out for 30 min at 37°C, in 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl solution, in the presence of 100 eq. H_2O_2. Analysis of the reaction was performed on a gel filtration Superdex-75 column. I, II and III are the dimer, monomer and oligomer species respectively. The profile of the starting dimeric protein is shown in insert.

To assess the decomposition rate constant of PerR-Zn under oxidative conditions, the fractional amount of the dimer was plotted in Fig. 4 as a function of time exposure to H_2O_2 or diamide. The concentration of the unreacted dimer was determined by evaluating the area under the peak in the FPLC chromatogram. The experimental points represent the average of at least three separate experiments. The dimer decomposition rate constant was calculated by fitting the experimental data to the monoexponential decay function: $Y = Y_0 + Ae^{(-kt)}$, where k is the decomposition rate constant. The calculated *k*-values for the reaction of PerR-Zn with either H_2O_2 or diamide are 0.96 (±0.12) and 1.08 (±0.12) h^{-1} respectively. Both values are within experimental errors, which suggest that the oxidation of the protein with H_2O_2 and diamide

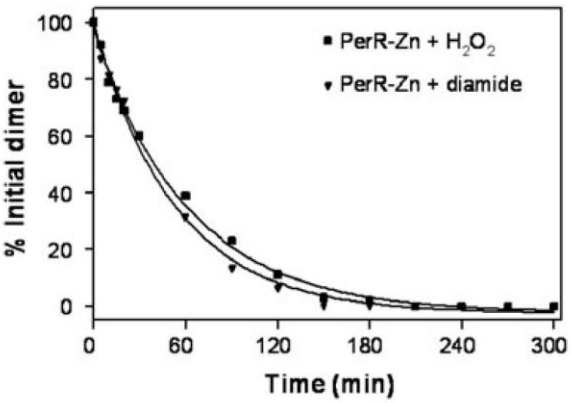


Fig. 4. Determination of the PerR-Zn dimer decomposition rate constant upon oxidative treatment. The fractional amount of dimeric protein (PerR-Zn) is plotted as a function of time of exposure to oxidant (H_2O_2 or diamide). The apparent rate constant for the decomposition of the dimer was estimated by fitting the experimental data with a one-phase exponential decay function.

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd, *Molecular Microbiology*, **61**, 1211–1219

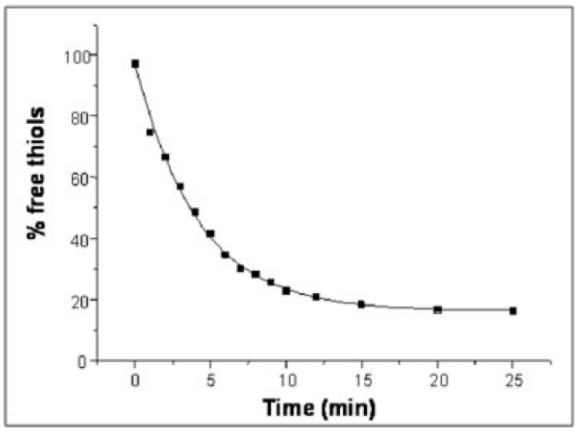


Fig. 5. Free thiol titration with DTNB. The percentage of free thiols is plotted as a function of time of exposure of PerR-Zn to H_2O_2. The apparent rate constant for the oxidation of the $Zn(Cys)_4$ site was estimated by fitting the experimental data with a one-phase exponential decay function.

proceed similarly. Oxidation of the $Zn(Cys)_4$ site was then examined by titration of free thiols with DTNB in the presence of H_2O_2. Figure 5 shows the percentage of thiols titrated with DTNB versus time exposure to H_2O_2 of PerR-Zn. As shown, more than 80% of the thiols are oxidized within 25 min with an estimated rate constant of 0.24 ($\pm$0.01) min^{-1}. This result confirms that the oxidized monomer species contains two disulphide bonds in agreement with the mass spectrometry analysis. Altogether these results demonstrate that the zinc ion in PerR-Zn plays a largely structural role because its loss upon oxidation of the four cysteine residues leads to the unfolding of the dimer.

Discussion

Overall structure

The present study provides the first structural description of a Fur-like metalloregulator, PerR from *B. subtilis*, involved in the regulation of the inducible peroxide stress response. Until now, the only structural information on a Fur protein, offered by Pohl *et al.* (2003), describes the structure of the Fur from *P. aeruginosa*. This work revealed significant similarities with related iron-dependent regulators, DtxR from *C. diphtheriae* (Pohl *et al.*, 1998, 1999b) and IdeR from *M. tuberculosis* (Pohl *et al.*, 1999a). Although there is only 26% sequence homology between *Pa*-Fur and *Bs*-PerR, the two proteins present structural similarities notably in the DNA-binding and the dimerization domains. Superposition of *Pa*-Fur and *Bs*-PerR-Zn N-terminal domains leads to an r.m.s. deviation of 1.41 Å (Fig. S3). Furthermore, the two putative DNA binding helices H4 of both regulators superimpose well with an r.m.s. deviation of 0.27 Å. Such a high structural similarity is also found for the α/β dimerization domain of both proteins. The 44 structurally equivalent C_α-atoms of strands S3, S4, S5 and helix H5, superimpose with an r.m.s.d. of 2.6 Å (Fig. S4).

PerR contains a $Zn(Cys)_4$ structural motif

The most striking structural difference between *Bs*-PerR-Zn and *Pa*-Fur resides in the zinc binding site. Indeed, as revealed by the present study, the zinc ion in PerR is bound by four cysteinates. By contrast, in the reported structure of *Pa*-Fur, two histidine (His-32, His-89) and two glutamate (Glu-80, Glu-100) residues co-ordinate the zinc ion (Pohl *et al.*, 2003). It is noteworthy that *Pa*-Fur is an exception within the Fur family because it lacks the Cys-95 and therefore the zinc avid Cys-$(Xaa)_2$-Cys motif (involving Cys-92, Cys-95 in *Ec*-Fur notation) which is found in most Fur proteins. Previous work in our laboratory has shown that this motif is indeed involved in zinc binding in *Ec*-Fur, the zinc co-ordination being complemented probably by two histidines residues (Jacquamet *et al.*, 1998; Gonzalez de Peredo *et al.*, 1999). Therefore, the two other cysteines of *Ec*-Fur protein which belong to a Cys-$(Xaa)_4$-Cys motif (involving Cys-132, Cys-137 in *Ec*-Fur notation and conserved in many Fur proteins from various origins) are not involved in metal binding. The present study has revealed that the $Zn(Cys)_4$ site in PerR-Zn locks together the three S3, S4 and S5 β-strands of each monomer to form the two parts of the dimer β-sheet. The importance of this structural role was confirmed through oxidation of the four cysteine residues which leads to the formation of two disulphide bonds, the zinc release and after all to the dimer disruption (Figs 3–5). Interestingly, sequence alignments of twenty PerR-like proteins from a wide variety of microorganisms reveal that the four cysteine residues are absolutely conserved and strictly organized as two Cys-$(Xaa)_2$-Cys motifs (Fig. S5, with Cys-96, Cys-99 and Cys-136, Cys-139 for *Bs*-PerR). Owing to the present structural results and the well-documented zinc avidity of the Cys-$(Xaa)_2$-Cys motif, it is likely that all these proteins contain a structural $Zn(Cys)_4$ site which may then appear as a distinctive feature of the PerR-like metalloregulators.

A model for the active form of PerR

In spite of the structural homologies between *Pa*-Fur and *Bs*-PerR, the overall dimer structures are different. This is illustrated in Fig. 6, where the superposition of the two central α/β motifs of both proteins leads to a divergent orientation of the two respective DNA-binding motifs. The relative orientation on opposite sides of the two H4 and H4′ helices of PerR-Zn (in red in Fig. 6), forced by the

© 2006 The Authors

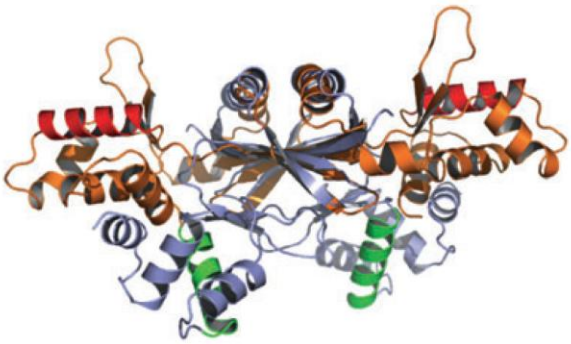


Fig. 6. Superposition of *Bs*-PerR-Zn and *Pa*-Fur. Comparison of the global dimer structure of *Bs*-PerR-Zn (orange with H4 helices in red) and *Pa*-Fur (blue with H4 helices in green) using the dimerization domains as the superposition matrix.

nearly flat structure of the protein, clearly shows that PerR-Zn cannot interact with DNA. In contrast, the structure of active *Pa*-Fur brings together the two putative DNA-binding helices H4 and H4′ with an almost perpendicular orientation which allows their interaction with DNA (in green in Fig. 6) (Pohl *et al.*, 2003). A crucial point to address is how the present PerR-Zn structure can account for the structure of the active protein which interacts with DNA upon binding the regulatory metal. Towards this goal, we built a model for the active PerR protein (Fig. 7A). The DALI algorithm [structural comparisons based on Distance matrix ALIgnment (Holm and Sander, 1996)] was used to perform structural comparisons between PerR-Zn and the available structures in the Protein Data Bank (PDB). The closest homologue of PerR-Zn was found to be *Pa*-Fur (Z-score of 13). As already mentioned, the similarities between both proteins are particularly located in the N-terminal domains (residues 1–88) with a Z-score of 13 and an r.m.s.d. of 1.4 Å for the 82 common C_α-atoms. The C-terminal domain of PerR-Zn (residues 89–144) was then compared separately with all protein folds in the PDB using DALI. Interestingly, only the *Pa*-Fur structure showed a Z-score value greater than 4.5. According to these two DALI hits the structural analysis by superposition of both independent domains of *Bs*-PerR-Zn with *Pa*-Fur leads to a model of the active PerR protein. This new model differs from PerR-Zn by a 160° rotation of the C-terminal domain towards the N-terminal end, and leads to a Z-score of 14.5 with an r.m.s.d. of 2.4 Å for the 130 common residues with *Pa*-Fur (Fig. S6). Interestingly the modelled PerR structure reveals that five residues (His-37, His-91, His-93, Asp-85 and Asp-104), conserved among the PerR-like family members (Fig. S5), are suitably located and are thus likely to form a high affinity binding site for the regulatory metal (Fig. 7B). This potential regulatory metal site is consistent with the recent results reported by Lee and Helmann (2006) who indicated through mutational analyses that the latter five residues proposed to be Fe^{2+} or Mn^{2+} ligands are essential for the repressor function of PerR *in vivo*.

By providing a five donor binding site PerR might have a strong affinity for Fe^{2+}. Moreover, it is noteworthy that among the five ligands, four belong to the C-terminus while one (His-37) belongs to the N-terminal domain of the protein. Therefore, the binding of His-37 onto the iron brings the N- and C-termini in close proximity so that the protein wraps around the regulatory metal which locks together the N- and C-terminal domains to allow for DNA binding. Conversely, peroxide oxidation of His-37 may abolish its iron binding ability and its dissociation from the metal would disrupt the DNA binding form of PerR that would adopt a relaxed structure similar to the presently reported PerR-Zn form.

Conclusion

A few zinc cysteinate redox switches have been described in the recent past and associated to a wide range of biological functions, many of them related to the oxidative

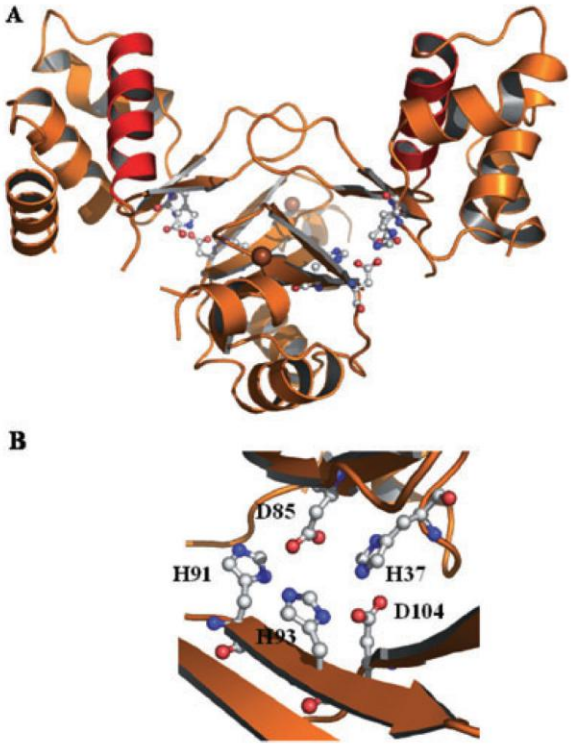


Fig. 7. Structural model of the active PerR protein.
A. Ribbon representation of the PerR dimer with the two putative DNA binding helices in red. The two zinc atoms are in brown. The five residues of the potential regulatory metal binding site are indicated.
B. Close-up of the regulatory metal binding site.

© 2006 The Authors

and the disulphide stress defences (Paget and Buttner, 2003; Barford, 2004). One of the best-characterized examples is the heat shock protein Hsp33 that behaves as a molecular chaperone and is activated in response to a redox stress. Jakob and coworkers showed that the reduced Hsp33 monomer contains a $Zn(Cys)_4$ site which releases the Zn^{2+} ion upon oxidation and consequently forms the oxidized dimer which is the active form of the chaperone (Jakob *et al.*, 1999; 2000; Barbirz *et al.*, 2000; Graumann *et al.*, 2001). In the case of the peroxide sensor PerR we have shown that the $Zn(Cys)_4$ site is oxidized in the presence of millimolar concentrations of H_2O_2, a level well above that needed to inactivate the PerR-Zn-Fe protein. Thus it is unlikely that oxidation of the $Zn(Cys)_4$ site would contribute, *in vivo*, to the inactivation of the protein and the subsequent induction of the peroxide stress response. In the case of an excess of Mn^{2+}, as PerR-Zn-Mn is much less sensitive to H_2O_2 than PerR-Zn-Fe, oxidation of the zinc binding site may contribute to Per-Zn-Mn inactivation under strong oxidative conditions. However, this hypothesis requires confirmation *in vivo*.

In summary, the present study has demonstrated that *B. subtilis* PerR possesses a $Zn(Cys)_4$ site which is crucial to stabilize the dimeric form of the protein. Sequence homologies of twenty PerR and PerR-like proteins, known to be involved in peroxide sensing in various organisms, strongly suggest that this $Zn(Cys)_4$ site is a distinctive feature of this class of peroxide regulators. Based on our structural data and the related *Pa*-Fur structure, we present a model of PerR which possesses a potential binding site for the regulatory metal and that may represent the active form of the protein that binds the DNA. Efforts are now directed at crystallizing the active protein and its DNA adduct.

Experimental procedures

Protein expression and purification

The *B. subtilis perR* gene was inserted between NdeI and XhoI restriction sites of pET-30c vector (Novagen). After sequence verification of each strand, the plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) competent cells (Sigma). The cells were grown aerobically at 37°C in 1 l of LB medium, containing 50 μg ml^{-1} kanamycin, until 0.6 OD at 600 nm. Production of PerR was induced by adding 1 mM IPTG, followed by 3 h incubation at 37°C. Cultures were then centrifuged at 5000 *g* for 10 min. From this point, all steps were performed at 4°C. Cells were resuspended in 30 ml of 100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT (buffer A) prior to sonication. The cell lysate was then centrifuged for 30 min at 35 000 *g*. The resulting supernatant was directly loaded onto a MonoQ column (Amersham Biosciences). Proteins were eluted with a linear gradient of 0.05–1 M NaCl in buffer A. The fractions containing PerR were pooled and concentrated by ammonium sulphate precipitation (80%) at 4°C overnight. After centrifugation at 25 000 *g* for 45 min, the pellet was resuspended in 4 ml 100 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 5 mM DTT and subjected to gel filtration using a Superdex-75 16/60 column (Amersham Biosciences). The fractions containing the dimeric protein were then collected and stored at –80°C. The concentration of PerR was calculated using an extinction coefficient of 9020 M^{-1} cm^{-1} at 277 nm.

Atomic absorption spectrometry

Prior to analysis, all the samples were buffer exchanged into Chelex-100 (Bio-Rad) treated 100 mM Tris-HCl pH 8. Buffer exchange was performed by using NAP-5 columns (Amersam Biosciences). The amount of zinc was determined by flame atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer 560 Norwalk) using an external calibration curve. Mn^{2+} content of PerR-Zn-Mn was determined by electrothermal atomic absorption spectrometry (Hitachi 8270, Tokyo, Japan) using a Zeeman background correction and matrix matched external calibration curve.

Crystallization and structure determination

Screening of the crystallization conditions was initially performed with the TECAN robot using various commercial screens of Hampton Research and Qiagen. Crystals were obtained at 20°C with 20% PEG 6000, 1 M LiCl, and 0.1 M Tris-HCl pH 8 of the PEG–LiCl screen from Hampton Research. Crystals were then optimized and grown at 20°C from a 1:1 μl mixture of a 10 mg ml^{-1} protein solution (100 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, 2 mM EDTA) with 25% PEG 6000, 1.5 M LiCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8. For data collection, the crystals were transferred into a solution composed of the mother liquor and 25% glycerol as cryoprotectant. PerR-Zn structure was determined using MAD X-ray diffraction data at 1.75 Å resolution collected around the Zn edge at 100 K on beam line FIP-BM30A (Roth *et al.*, 2002) of the European Synchrotron Radiation Facility. Data reduction was performed with the XDS program (Kabsch, 1993). The space group was P1 ($a = 40.8$ Å, $b = 41.6$ Å, $c = 53.9$ Å, $\alpha = 82.2°$, $\beta = 80.1°$, $\gamma = 60.9°$) with potentially two molecules per asymmetric unit (solvent content of 50%). Two Zn atom sites were found with the SOLVE program (Terwilliger and Berendzen, 1999) confirming the presence of two molecules in the asymmetric unit. After phase extension and solvent flattening with the RESOLVE program (Terwilliger and Berendzen, 1999), the quality of the electron density map allowed the automated construction of 87 residues out of 288 (using RESOLVE program). The model was completed manually with the coot molecular modelling package (Emsley and Cowtan, 2004). The refinement of this initial model was carried out with the Refmac5 program (Collaborative Computational Project, 1994) in the 30–1.75 Å resolution range without any NCS restraints. The final model contains residues His-4 to Asn-144 from monomer A and Ala-2 to Gly-145 from monomer B, both present in the asymmetric unit as well as 289 water molecules. The electron density is very well defined except for residues 49–53, 77–81 and 142–145 from monomer B located on a loop exposed to solvent. All residues

© 2006 The Authors

fall within the allowed regions of the Ramachandran plot as defined by the PROCHECK program (Laskowski *et al.*, 1993). Statistics for all the data collections and refinement of the different structures are summarized in Table 1. The atomic co-ordinates and structure factors for PerR-Zn have been deposited into the PDB under the accession number 2FE3.

Protein oxidation and determination of the decomposition rate constants

Chemical reactions and FPLC analyses were performed with Chelex-100 treated buffers. Oxidative reactions were carried out at 37°C in 100 µl solution of 100 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, containing 20 µM of PerR-Zn in the presence of 100 eq. H_2O_2. For the reaction between PerR-Zn and diamide a 1/100 (protein/oxidant) ratio was also used. The samples were subjected to FPLC analysis using a gel filtration Superdex 75 HR10/30 analytical column (Amersham Biosciences) with a linear gradient of 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl. The chromatograms were visualized and the different peaks were quantified using Unicorn software (Amersham Biosciences). The rate constant for the dimer decomposition was calculated by fitting the time evolution of the dimeric fraction to a one-phase exponential decay function.

DTNB titration of free thiols

The amount of thiol groups remaining in solution after exposure to H_2O_2 was determined by the Ellman's reagent (DTNB) using the $E_{412nm} = 13\,500\ M^{-1}cm^{-1}$ (calculated with B-mercaptoethanol). PerR (15 µM) was incubated with 100 eq. H_2O_2 for different times; reactions were stopped at different intervals by addition of 2 µl of HCl (1 M) into 10 µl reaction mixtures. Samples were neutralized by dilution (1:10) in a solution containing HEPES (1 M, pH 7.4) and DTNB (5 mM). Absorbance at 412 nm was immediately recorded.

Acknowledgements

We thank Josiane Arnaud for atomic absorption analyses, Christine Saint-Pierre for MALDI-TOF mass spectrometry measurements, David Lemaire for ESI-mass spectrometry analyses and Ludovic Champier for his help in cloning experiments during the initial stage of this work.

References

Barbirz, S., Jakob, U., and Glocker, M.O. (2000) Mass spectrometry unravels disulfide bond formation as the mechanism that activates a molecular chaperone. *J Biol Chem* **275:** 18759–18766.

Barford, D. (2004) The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* **14:** 679–686.

Boylan, J.A., Posey, J.E., and Gherardini, F.C. (2003) Borrelia oxidative stress response regulator, BosR: a distinctive Zn-dependent transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci USA* **100:** 11684–11689.

Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J.D. (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29:** 189–198.

Chen, L., and Helmann, J.D. (1995) *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps (PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. *Mol Microbiol* **18:** 295–300.

Chen, L., James, L.P., and Helmann, J.D. (1993) Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. *J Bacteriol* **175:** 5428–5437.

Chen, L., Keramati, L., and Helmann, J.D. (1995) Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc Natl Acad Sci USA* **92:** 8190–8194.

Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105:** 103–113.

Collaborative Computational Project No. 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst* **D50:** 760–763.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60:** 2126–2132.

Fuangthong, M., Herbig, A.F., Bsat, N., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis* fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J Bacteriol* **184:** 3276–3286.

Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J.-M., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (1999) Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli:* chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* **38:** 8582–8589.

Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K.A., Hoffmann, J.H., Vijayalakshmi, J., *et al.* (2001) Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33: a two-step mechanism. *Structure* **9:** 377–387.

Hahn, J.-S., Oh, S.-Y., Chater, K.F., Cho, Y.-H., and Roe, J.-H. (2000) H2O2-sensitive Fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* **275:** 38254–38260.

Herbig, A.F., and Helmann, J.D. (2001) Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41:** 849–859.

Holm, L., and Sander, C. (1996) Mapping the protein universe. *Science* **273:** 595–603.

Horsburgh, M.J., Clements, M.O., Crossley, H., Ingham, E., and Foster, S.J. (2001) PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69:** 3744–3754.

Huffman, J.L., and Brennan, R.G. (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* **12:** 98–106.

Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J.-L., Latour, J.-M., and Michaud-Soret, I. (1998) X-ray absorp-

© 2006 The Authors

tion spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37:** 2564–2571.

Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J.C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96:** 341–352.

Jakob, U., Eser, M., and Bardwell, J.C. (2000) Redox switch of Hsp33 has a novel zinc binding motif. *J Biol Chem* **275:** 38302–38310.

Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **26:** 795–800.

Kim, S.O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W.F. Jr, Keng, T., De Angelo, J., *et al.* (2002) OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* **109:** 383–396.

King, K.Y., Horenstein, J.A., and Caparon, M.G. (2000) Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **182:** 5290–5299.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* **26:** 283–291.

Lee, J.W., and Helmann, J.D. (2006) The PerR transcription factor senses H2O2 by metal-catalyzed histidine oxidation. *Nature* **440:** 363–367.

Mongkolsuk, S., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol Microbiol* **45:** 9–15.

Ortiz de Orué Lucana, D., and Schrempf, H. (2000) The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet* **264:** 341–353.

Paget, M.S., and Buttner, M.J. (2003) Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* **37:** 91–121.

Pohl, E., Holmes, R.K., and Hol, W.G. (1998) Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* **273:** 22420–22427.

Pohl, E., Holmes, R.K., and Hol, W.G. (1999a) Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* **285:** 1145–1156.

Pohl, E., Holmes, R.K., and Hol, W.G. (1999b) Crystal structure of a cobalt-activated diphtheria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH3-like domain. *J Mol Biol* **292:** 653–667.

Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M.L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47:** 903–915.

Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charrault, P., Pirocchi, M., *et al.* (2002) FIP: a highly automated beamline for multiwavelength anomalous diffraction experiments. *Acta Cryst* **D58:** 805–814.

Schoneich, C. (2000) Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *J Pharm Biomed Anal* **21:** 1093–1097.

Simonson, T., and Calimet, N. (2002) Cys(x)His(y)-Zn^{2+} interactions: thiol versus thiolate coordination. *Proteins* **49:** 37–48.

Storz, G., and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Current Opinion Microbiol* **2:** 188–194.

Terwilliger, T.C., and Berendzen, J. (1999) Automated structure solution for MIR and MAD. *Acta Cryst* **D55:** 849–861.

Uchida, K., and Kawakishi, S. (1993) 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett* **332:** 208–210.

Uchida, K., and Kawakishi, S. (1994) Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H2O2. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. *J Biol Chem* **269:** 2405–2410.

van Vliet, A.H., Baillon, M.L., Penn, C.W., and Ketley, J.M. (1999) *Campylobacter jejuni* contains two Fur homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J Bacteriol* **181:** 6371–6376.

Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279:** 1718–1721.

Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K.A., Schneider, T.D., and Storz, G. (2001a) Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183:** 4571–4579.

Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2001b) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183:** 4562–4570.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. Purification of PerR-Zn.
Fig. S2. Metal-dependent DNA binding of PerR-Zn.
Fig. S3. Superposition of the N-terminal domains.
Fig. S4. Superposition of PerR-Zn (orange) and *Pa*-Fur (blue) dimerization domains.
Fig. S5. CLUSTALW alignment of *Bs*-PerR with selected PerR-like proteins.
Fig. S6. Model of the active PerR protein (for clarity only one monomer is represented).

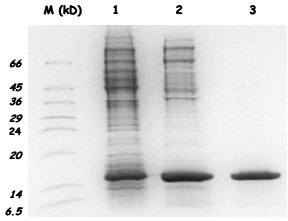
This material is available as part of the online article from http://www.blackwell-synergy.com

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd, *Molecular Microbiology*, **61**, 1211–1219

Supplementary material

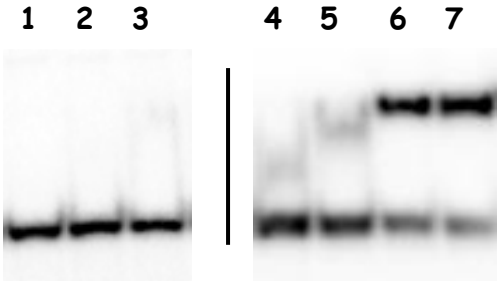
S1. Purification of PerR-Zn.

Lane 1, soluble fraction after IPTG induction and cell extraction. Lane 2, pooled fractions after MonoQ ion-exchange chromatography. Lane 3, final purified protein after Superdex-75 gel filtration.



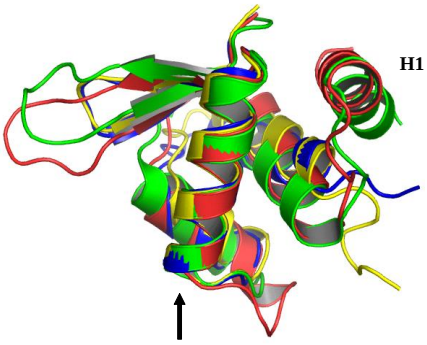
S2. Metal-dependent DNA binding of PerR-Zn.

200 pM of a 36 bp labelled DNA duplex was incubated with either PerR-Zn or PerR-Zn-Mn. Lane 1: no added protein; lane 2: 2 µM PerR-Zn; lane 3: 4 µM PerR-Zn; lanes 4-7: 1, 2, 3, 4 µM PerR-Zn-Mn, respectively. EMSA experiments were performed with Chelex-100 treated buffers (storage, binding and electrophoresis buffers). One strand of a 36 bp oligonucleotide duplex (Sygma Genosys) containing the PerR box from the *mrgA* promoter was initially ^{32}P-5'-end labelled using [γ-^{32}P]-ATP and T4-PNK (Amersham Biosciences). Annealing of both complementary strands was performed in 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl ; 0,05% triton X-100, by heating at 90 °C for 15 min followed by slow cooling to 20 °C. To ensure the duplex formation, the labelled single strand and the duplex were loaded on a native gel. Binding reactions were carried out for 15 min at 20 °C in 16 µL of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 0.05% triton X-100 that contained 0.2 nM duplex DNA and the indicated PerR-Zn or PerR-Zn-Mn concentrations. PerR-Zn-Mn was obtained by incubating 50 µM PerR-Zn with 1.5 eq. of $MnCl_2$ at 20 °C for 20 min in 20 µL of 100 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 5 mM DTT. Excess of free Mn^{2+} was removed by buffer exchange using a NAP-5 column (Amersham Biosciences). The samples were then subjected to electrophoresis on a 15% polyacrylamide, Tris-acetate pH 8.5 gel, for 75 min at 150 V and 4 °C. The gel was then exposed on a phosphorimaging screen, visualized using a Molecular Imager FX and analyzed using Quantity One software (Bio-Rad).

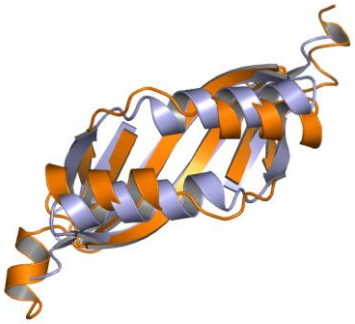


S3. Superposition of the N-terminal domains.

PerR-Zn (red), *Pa*-Fur (green), *Cd*-DtxR (blue) and *Mt*-IdeR (yellow). The N-terminal H1 helix for PerR-Zn and *Pa*-Fur is annotated. The arrow shows the putative DNA binding H4 helix for PerR-Zn and *Pa*-Fur.



S4. Superposition of PerR-Zn (orange) and *Pa*-Fur (blue) dimerization domains.



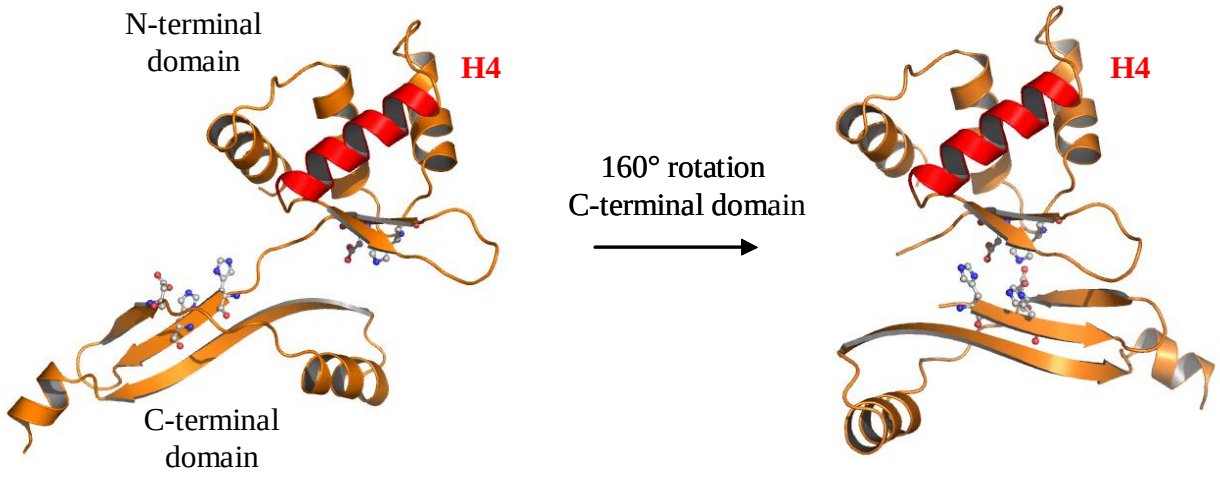
S5. ClustalW alignment of *Bs*-PerR with selected PerR-like proteins.

The sequence alignment extends, for *Bs*-PerR, from S34 to N144 residues. The conserved cysteine residues (C96, C99, C136 and C139) are marked in red. H37, D85, H91, H93 and D104 residues of *Bs*-PerR are indicated in green.

```
Bha BH0951   -SMTHPTADEIYK-ALEGRFPNMSVATVYNNLRVFKEAGIVKELTYG-DSSSRFD-CVTSD
Bce PerR     -SMTHPTADDIYK-ALEGKFPNMSVATVYNNLRVFKEVGLVKELTYG-DASSRFD-YVTSQ
Ban BA0537   -SMTHPTADDIYK-ALEGKFPNMSVATVYNNLRVFKEVGLVKELTYG-DASSRFD-YVTSQ
Lmo LMO1683  -SHTHPTADDIYR-ALEGNFPNMSVATVYNNLRVFRDAGLIKELSYG-DASSRFD-FSTSN
Lin LIN1791  -SHTHPTADDIYR-SLEGNFPNMSVATVYNNLRVFRDAGLIKELSYG-DASSRFD-FSTSN
Oih OB0905   -AMVHPTADEIYK-ALEGKFPNMSVATVYNNLRVLKDIGLVRELTYG-DSSSRFD-CNTSD
Sau PerR     -SHTHPTADEIYQ-ALSPDFPNISVATIYNNLRVFKDIGIVKELTYG-DSSSRFD-FNTHN
Sep SE1545   -SHSHPTADEIYQ-ALSPKFPNISVATIYNNLRVFKDIGIVKELTYG-DSSSRFD-FNTHN
Cje PerR     -RHEHPNIDELYI-EIKKEYPSISLATVYKNLNTLQEQGLVVEINVL-NQKTCYD-IYEEE
Spy PerR     -STEHPSADKIYR-DLQPNFPNMSLATVYNNLKVLVDEGFVSELKISNDLTTYYD-FMGHQ
Sav CatR     -DHVHLTADEVHARAV-VKLPEISRATVYNTLGELVSLGEVLEVATD-KRAKRYDPNAHRP
Sco CatR     -EHVHLTADEVHSRAV-DKLPEISRATVYNTLGELVSLGEVLEVATD-KRAKRYDPNAHRP
Sco FurA     -AGDHLDAEALTS-GVRRRVGHVSLQAVYDALHALTAARLVRRIEPP-GSPARFEGRVGDN
Sre FurS     -DGDHLGVEAIAS-GVRDRVGHISLQAVYEALHALTAAGLVRRIEPA-GHPARYEGRVGDN
Mma FurA     -DHPHADTETIYS-AVREILPDVSRQAVYDVLGALTSVGLVRAIQPS-GSVARYESRVGDN
Mtu FurA     -AHPHADTETIFG-AVRFALPDVSRQAVYDVLHALTAAGLVRKIQPS-GSVARYESRVGDN
Mbo FurA     -AHPHADTETIFG-VVRFALPDVSRQAVYDVLHALTAAGLVRKIQPS-GSVARYESRVGDN
Msm FurA     -AHPHADTDTVIR-AVREALPEVSHQAVYDSLHALAAARLVRRIQPS-GSVARYESRVGDN
                 H                                             D
Bsu PerR     -SMAHPTADDIYK-ALEGKFPNMSVATVYNNLRVFRESGLVKELTYG-DASSRFD-FVTSD
```

```
Bha BH0951   HYHVICEECGKIVDFHYP-GLDEVETLAEHVT---GFKVSSHRMEIY-GICPDCQKK--
Bce PerR     HYHVICEKCGKIVDFPYG-GLEQLEEEAAKTT---GFVINSHRLEIY-GVCPECHKA
Ban BA0537   HYHVICEKCGKIVDFPYG-GLEKLEEEAAKTT---GFVINSHRLEIY-GVCPECHKA
Lmo LMO1683  HYHAICNVCGKIVDFHYP-GLDEVEHFAAHMT---GYEIDNHRLEVY-GICPACKEKQS
Lin LIN1791  HYHAICNVCGKIVDFHYP-GLDEVEHFAAHVT---GYEIDNHRLEVY-GTCPECKEKQS
Oih OB0905   HYHIICNECGKIVDFHYP-SLNEVESLAEQVT---GFDVSHHRLEVY-GKCDDCQAVNT
Sau PerR     HYHIICEQCGKIVDFQYP-QLNEIERLAQHMT---DFDVTHHRMEIY-GVCKECQDK
Sep SE1545   HYHIICEKCGKIVDFHYP-QLDEVEQLAQHVT---DFDVTHHRMEIY-GVCKECKEEGN
Cje PerR     HIHVVCTKCGGIEDLSFK--DAKLYEYQEHLEKKIGNLVNHLSVCAYVDNCKKCH
Spy PerR     HVNVVCEICGKIADFMDV-DVMDIAKEAHEQT---GYKVTRIPVIAY-GICPDCQAKDQ
Sav CatR     HHHLVCARCGAIRDVH-PSGN-PLADLPDSER--FGFTVSDVEVTYR-GVCPNCAAA
Sco CatR     HHHLVCARCGAIRDVH-PTGN-PLADLPDSER--FGFTVSDVEVTYR-GTCPNCAAA
Sco FurA     HHHVLCRSCGALADVDCAVGDAPCLTASDDR----GFVIDEAEVIYR-GLCPDCSTPGS
Sre FurS     HHHIVCRSCGAVADVDCAVGDAPCLTAADDH----GFAIDEAEVVYW-GLCPDCSTGRS
Mma FurA     HHHVVCRSCGAIADIDCPVGEAPCLAPSDDSNVLDGFVVDEAEVIYW-GICPDCSTAMP
Mtu FurA     HHHIVCRSCGVIADVDCAVGEAPCLTASDHN----GFLLDEAEVIYW-GLCPDCSISDT
Mbo FurA     HHHIVCRSCGVIADVDCAVGEAPCLTASDHN----GFLLDEAEVIYW-GLCPDCSISDT
Msm FurA     HHHVVCRACGDIADVDCAVGEAPCLTGSDHH----ATPSDEAEVIYW-GTCPACAQDPT
             H H  C  C    D                                  C  C
Bsu PerR     HYHAICENCGKIVDFHYP-GLDEVEQLAAHVT---GFKVSHHRLEIY-GVCQECSKKEN
```

S6. Model of the active PerR protein (for clarity only one monomer is represented). Based on the DALI results, the model of the active PerR differs from the PerR-Zn protein by a 160° rotation of the C-terminal domain towards the N-terminal end. The H37, D85, H91, H93 and D104 residues are indicated.



5.| Discussion

La structure cristallographique de la protéine PerR-Zn-apo révèle une coordination de l'ion zinc par les quatre cystéines de la protéine. L'oxydation des cystéines était la première hypothèse de détection des peroxydes par PerR, en d'autres termes, le site à zinc était assimilé au site de régulation de la protéine (Herbig and Helmann, 2001).

Dans les métalloprotéines à zinc, l'ion Zn^{2+} est très souvent coordiné dans une géométrie tétraédrique. Cet ion peut avoir un rôle structural ou catalytique. Dans les sites catalytiques, il est coordiné par deux ou trois ligands (His ou Asp/Glu) avec une ou deux molécules labiles (molécules d'eau ou le substrat) qui complètent la sphère de coordination. Les sites $Zn(Cys)_x(His)_x$ sont généralement des sites structuraux (Harding, 2004; McCall *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les résidus cystéine, ils sont de bons candidats pour une réaction avec H_2O_2. La cystéine est un acide aminé qui présente une biochimie particulière liée à sa fonction thiol : stabilisation des protéines par la formation de ponts disulfures, coordination des métaux de transition, réactions d'oxydoréduction (Giles *et al.*, 2003a; Giles *et al.*, 2003b). Les senseurs de peroxydes comme OxyR, Orp1-Yap1, et OhrR mettent à contribution la réactivité particulière des résidus cystéines au centre de leurs mécanismes d'activation.

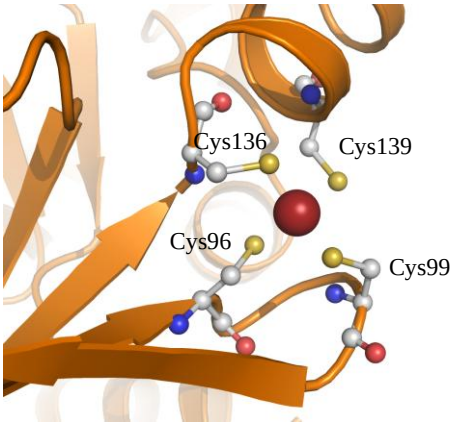
La protéine Fur d'*E. coli* possède un motif CX_2C et un motif CX_4C. Le zinc structural de la protéine *Ec*-Fur est coordiné par deux cystéines du motif CX_2C (Cys92 et Cys95) et par d'autres atomes de types N/O (Jacquamet *et al.*, 1998). Le motif CX_4C n'est pas essentiel à l'activité de la protéine. Le rôle structural du site à zinc a été clairement démontré, car il est indispensable à la stabilisation du dimère de la protéine Fur (Pecqueur *et al.*, 2006; D'Autreaux *et al.*, 2007).

La coordination du zinc par les quatre cystéines dans la protéine PerR n'était pas suspectée. L'analogie avec la protéine *Ec*-Fur prévoyait en effet la présence de deux cystéines. Contrairement à Fur, la protéine PerR possède un double motif CX_2C conservé dans la plupart des protéines de la famille des protéines PerR-like (Figure S5 de l'article). Et dans le cas de PerR, les deux motifs CX_2C sont indispensables à la stabilité de la protéine (Lee and Helmann, 2006a).

La constante de vitesse associée à la réaction d'oxydation des cystéines de PerR-Zn-apo est de 0,054 $M^{-1}.s^{-1}$ (Lee and Helmann, 2006a). A titre de comparaison, pour un senseur du peroxyde d'hydrogène comme OxyR chez *E. coli*, cette constante de vitesse est de 1,1 10^5

$M^{-1}.s^{-1}$ (Lee *et al.*, 2004). L'oxydation des cystéines dans la protéine PerR est beaucoup trop lente pour rendre compte de l'activité de PerR *in vivo*. Dans ce sens, la constante de vitesse obtenue pour l'inactivation de la protéine PerR-Zn-Fe par le peroxyde d'hydrogène est d'environ 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$. Ce résultat confirme donc que le site à fer de PerR est bien le site de détection de H_2O_2 (Lee and Helmann, 2006b).

Les surfaces d'accessibilité au solvant des cystéines peuvent être estimées à partir de la structure de PerR-Zn-apo avec le programme AeraImol (CCP4, 1994). Le tableau de la Figure III.4 montre des surfaces d'accessibilité avec quelques résidus exposés au solvant présentés à titre indicatif. D'après cette analyse, seule la cystéine 99 est potentiellement accessible. Ce résultat conforte donc la faible réactivité de ces cystéines.



Résidus	Surface accessible (Å^2)
Cys 96	3,8
Cys 99	76
Cys 136	1,4
Cys 139	17,3
Glu 15	**156**
Asp 194	**110**
Lys 141	**182**
monomère	**8536,4**

Figure III.4 : Sites à zinc et les surfaces accessibles au solvant dans la protéine PerR-Zn-apo. Le calcul est effectué avec le programme AreaImol pour une molécule de solvant avec 2,8 Å de diamètre.

L'ensemble des analyses présentées dans ce chapitre confirme le rôle purement structural du site à zinc de PerR. La structure cristallographique PerR-Zn-apo correspond à celle de la forme inactive. Dans cette structure, les hélices de reconnaissance sont dans une configuration plane et non optimale pour l'ADN. Un basculement de ces hélices est nécessaire pour une liaison à l'ADN et il est facilement imaginable que la fixation d'un ion métallique dans le site de régulation permettra ce réarrangement structural.

Une forme active de la protéine PerR a pu être modélisée à partir de la structure de PerR-Zn-apo et de son homologue structural le plus proche (*Pa*-Fur). La modélisation de la forme active a été possible en scindant la protéine PerR-Zn-apo en deux domaines distincts. Ce modèle met en avant l'hypothèse d'un changement de conformation. Pohl *et al* (2003),

indiquent que la structure de *Pa*-Fur correspond à la forme active de la protéine. Notre modèle, obtenu par rotation du domaine N-terminal par rapport au C-terminal, est parfaitement superposable à *Pa*-Fur et fait apparaître un site potentiel de fixation du métal de régulation impliquant les résidus H37, H91, H93, D85 et D104 à l'interface des deux domaines (Figure III.5). Les acides aminés formant ce site sont très fortement conservés dans les protéines PerR-like (Figure S5 de l'article) et sont importants pour l'activité de la protéine (Lee and Helmann, 2006b).

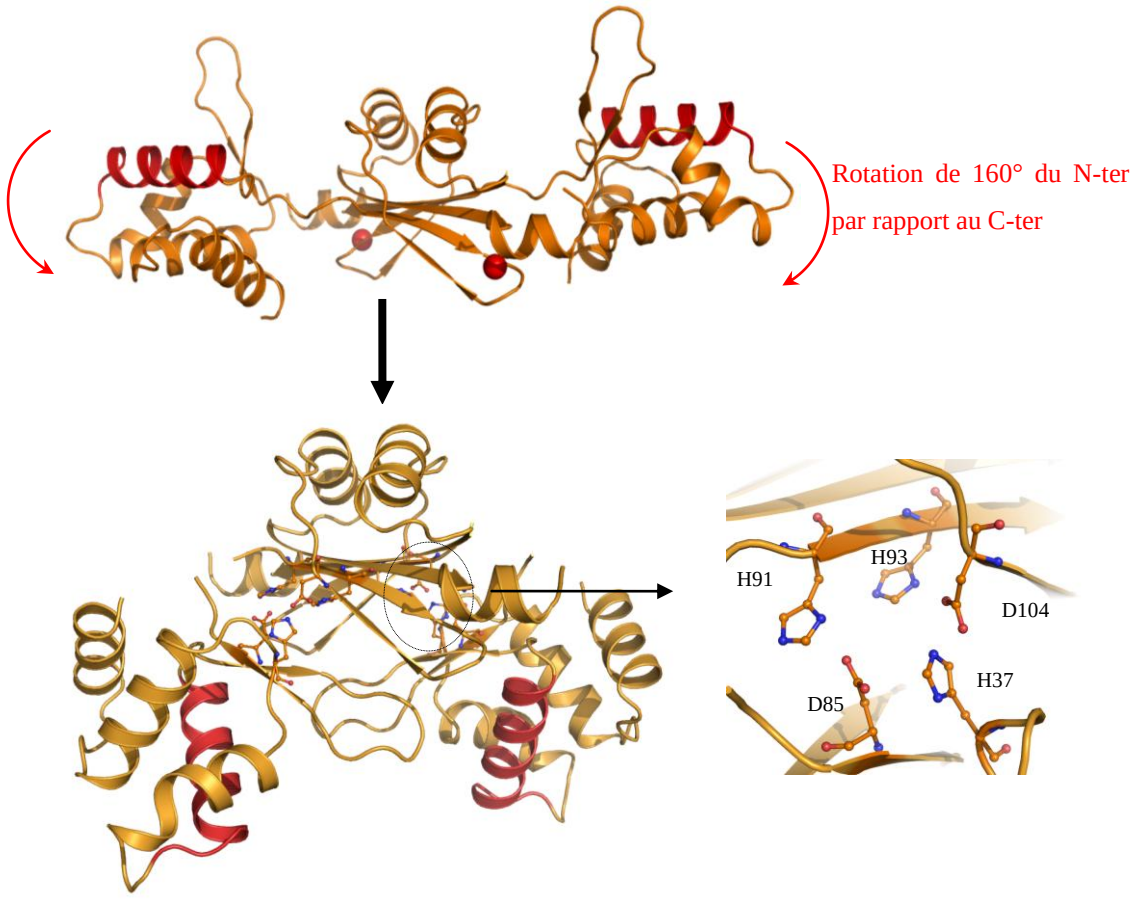


Figure III.5 : Modélisation de la forme active de la protéine PerR à partir de la structure PerR-Zn-apo.

6.| Références Bibliographiques – Chapitre III

CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-763.

D'Autreaux, B., Pecqueur, L., Gonzalez de Peredo, A., Diederix, R. E., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E., and Michaud-Soret, I. (2007). Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* 46, 1329-1342.

Giles, N. M., Giles, G. I., and Jacob, C. (2003a). Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 1-4.

Giles, N. M., Watts, A. B., Giles, G. I., Fry, F. H., Littlechild, J. A., and Jacob, C. (2003b). Metal and redox modulation of cysteine protein function. *Chem Biol* 10, 677-693.

Harding, M. M. (2004). The architecture of metal coordination groups in proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 849-859.

Herbig, A. F., and Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* 41, 849-859.

Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (1998). X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 2564-2571.

Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G., and Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1179-1185.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006a). Biochemical characterization of the structural Zn2+ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* 281, 23567-23578.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006b). The PerR transcription factor senses H2O2 by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363-367.

McCall, K. A., Huang, C., and Fierke, C. A. (2000). Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 130, 1437S-1446S.

Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I., and Bersch, B. (2006). Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* 281, 21286-21295.

Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47, 903-915.

CHAPITRE IV

De l'apoprotéine à la protéine active

Après la résolution de la structure de la protéine PerR-Zn-apo, l'objectif de ce travail était la caractérisation structurale de la protéine active avec un ion Mn^{2+} ou Fe^{2+} dans le site de régulation. A partir de la structure PerR-Zn-apo et de son homologue structural le plus proche, la protéine *Pa*-Fur, nous avons proposé un modèle pour la forme active de PerR. Ce modèle fait apparaitre, à l'interface des domaines N- et C-terminaux, un site potentiel de fixation pour le métal de régulation. Par ailleurs, ce modèle est compatible avec le mode de fixation à l'ADN proposé par E. Pohl pour *Pa*-Fur. L'étude présentée dans cette partie vise à caractériser la forme active de la protéine et donc d'identifier les résidus impliqués dans la coordination du métal du site de régulation. Deux techniques importantes ont été utilisées : la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie d'absorption X (SAX).

1.| Les premiers tests de cristallisation

Les premiers essais ont consisté à cristalliser la protéine PerR-Zn-Mn, le manganèse(II) étant moins sensible à l'oxydation à l'air que le fer(II).

La protéine active est obtenue à partir de la protéine PerR-Zn-apo à laquelle des ions Mn^{2+} ont été rajoutés. Après concentration, l'échantillon est utilisé pour le criblage des conditions de cristallisation. Les données de diffraction ont été enregistrées sur les premiers cristaux obtenus. Le traitement de ces données de diffraction montre que le groupe d'espace et les paramètres de mailles sont strictement identiques à ceux observés pour la protéine PerR-Zn-apo. Dans les structures résolues à partir de différents cristaux, seul le zinc structural a pu être localisé.

Ces résultats suggèrent fortement que l'ion Mn^{2+} n'est pas incorporé dans la protéine pendant la reconstitution.

2.| Homogénéité des échantillons

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, l'expression en milieu LB entraîne l'oxydation de la protéine. L'analyse par spectrométrie de masse de différents échantillons de protéine montre l'existence de deux espèces. La première espèce présentant un poids moléculaire de 16292 Da correspond à la forme native de la protéine PerR. La deuxième espèce présentant un poids moléculaire de 16308 Da correspond à la protéine sauvage avec un atome d'oxygène en plus.

Le rapport protéine sauvage/protéine oxydée est variable d'un lot à l'autre lorsque l'expression a lieu en milieu LB. Nous nous sommes attachés à mettre au point un protocole d'expression et de purification conduisant très majoritairement et de façon reproductible à la forme non oxydée de la protéine.

L'oxydation de PerR pendant l'étape d'expression sera discutée dans le chapitre V.

3.| Nouvelle méthode d'expression de la protéine

Deux protocoles d'expression et de purification de la protéine ont été mis au point, protocoles conduisant de façon exclusive à la forme native de la protéine (spectre de masse indiqué sur la Figure IV.1). Le premier protocole impose la manipulation de l'échantillon de protéine en boîte à gants sous atmosphère contrôlée depuis l'expression jusqu'à la dernière étape de purification. Dans le deuxième protocole, l'expression de la protéine a lieu dans un milieu minimum M9 modifié et en présence d'un chélateur spécifique des ions Fe^{3+} (la desferroxiamine). Les protocoles d'expression et de purification sont détaillés dans le chapitre « Méthodes Biochimiques et Biophysiques ».

La figure ci-dessous montre un spectre de masse de la protéine PerR purifiée en boîte à gants. Le protocole en boîte à gants est très lourd à mettre en place, c'est pour cela que seul le protocole M9 est actuellement utilisé au laboratoire.

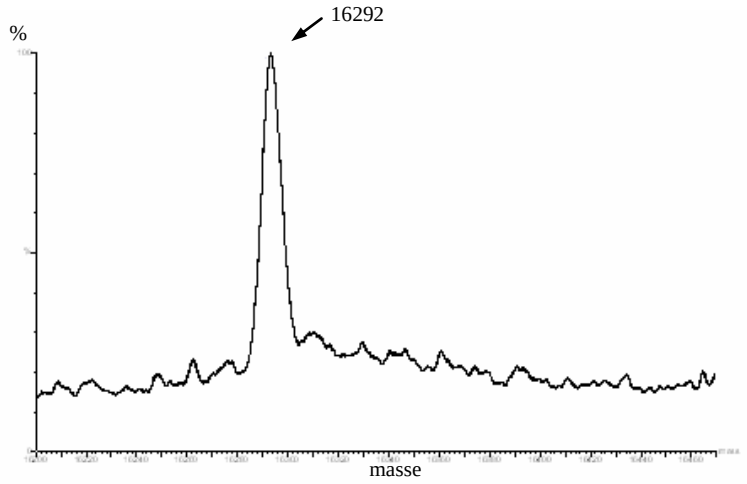


Figure IV.1 : Spectre de masse de la protéine PerR (ESI-TOF). L'expression et la purification ont été effectuées en boîte à gants.

4.| Structure de la protéine PerR-Zn-Mn

4.1.| Cristallogenèse de PerR-Zn-Mn : des conditions inédites

Le site de régulation de la protéine a été reconstitué en incubant la protéine PerR-Zn-apo avec un équivalent de $MnCl_2$ par monomère. Avant de lancer les tests de cristallisation, la protéine est concentrée à 10 mg/mL dans un tampon 100 mM Tris HCl pH 8,0, 250 mM NaCl traité Chelex-100. De façon très surprenante, la protéine cristallise dans les mêmes conditions que PerR-Zn-apo et de la même façon, aucun ion métallique supplémentaire n'est observé dans la carte de densité électronique. L'absence de manganèse suggère que la protéine PerR-Zn-Mn n'est pas assez stable pour cristalliser. Ce résulat indique qu'il y a dissociation du métal régulateur, l'équilibre serait alors déplacé vers la forme PerR-Zn-apo.

Les difficultés rencontrées dans la cristallisation de PerR-Zn-Mn nous ont orientés vers la cristallogenèse de la protéine avec l'ADN. Plusieurs oligonucléotides contenant la séquence de reconnaissance de la protéine PerR (la PerR-box) ont été testés. Les oligonucléotides utilisés ont des tailles comprises entre 17 et 21 pb. Après le criblage des conditions de cristallisation, des cristaux sont apparus au bout de 48 heures. Ces cristaux ont été testés sur la ligne FIP-BM30a directement dans les plaques de cristallisation. Aucune diffraction n'a pu être observée, mais ce constat a permis d'emblée d'exclure la présence de cristaux de sels. Ces cristaux ont donc été reproduits et optimisés. Les meilleurs cristaux sont obtenus avec une solution de réservoir composée de 10 % PEG 1000 et 100 mM Hepes pH 7,5. Les données de diffraction ont été enregistrées sur la ligne de lumière ID29 de l'ESRF. Ces cristaux diffractent jusqu'à 3,2 Å et appartiennent au groupe d'espace $P2_1$ avec les paramètres de maille a = 49,2 Å, b = 63,3 Å, c = 66,7 Å et β = 80,4°. Les statistiques des données de diffraction sont présentées dans le Tableau IV.I.

4.2.| Résolution de la structure de PerR-Zn-Mn

La structure de la protéine PerR-Zn-Mn a été résolue par remplacement moléculaire en utilisant les coordonnées atomiques de PerR-Zn-apo comme modèle de recherche. La protéine est un homodimère de 144 acides aminés par sous unité. Les cinq derniers résidus et le troisième brin β sont mal définis dans la carte de densité électronique. Néanmoins, l'organisation globale des structures secondaires est similaire à PerR-Zn-apo. Les domaines N- et C-terminaux sont identiques, mais les structures diffèrent par l'orientation de ces

domaines l'un par rapport à l'autre. Les statistiques de l'affinement de la structure sont présentées dans le Tableau IV.I. La structure cristallographique de PerR-Zn-Mn est illustrée par la Figure IV.2.

Les essais de cristallisation de la protéine PerR-Zn-Mn ont été réalisés en présence d'ADN. Cependant, aucune densité électronique pouvant correspondre à l'oligonucléotide n'est observée, suggérant que seule la protéine PerR-Zn-Mn a cristallisé. On peut considérer dans ce cas que l'ADN a joué le rôle d'additif dans la condition de cristallisation de PerR-Zn-Mn. Il existe en effet des paramètres qui ne sont toujours pas contrôlés dans la cristallogenèse d'une protéine. Dans le cas de PerR-Zn-Mn, l'ADN utilisé permettrait de bloquer la protéine dans une conformation favorable à la cristallisation sans participer à l'empilement cristallin.

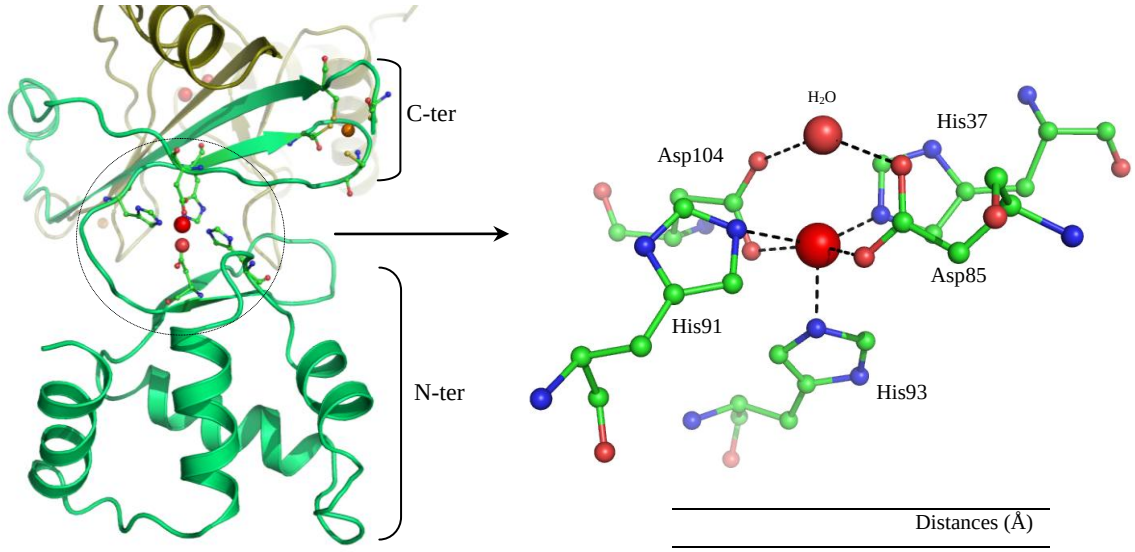
Enregistrement des données			
Ligne de lumière (longueur d'onde)	ID29 (0,9762 Å)		
Groupe d'espace	$P2_1$		
Paramètres de mailles			
a, b, c (Å)	49,2	63,3	66,7
α, β, γ (°)	90,0	80,4	90,0
Résolution	50 – 3,15		
Complétude	99,2 (99,8)		
I/σ(I)	11,8 (2,2)		
R_{sym}	10,5 % (39,9 %)		
Affinement			
Résolution	20 - 3,2		
R / R_{free}	27,9 / 0,32		
Déviations			
Distances (Å)	0,012		
Angles (°)	1,88		

Tableau IV.I : Statistiques des données de diffraction de PerR-Zn-Mn. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

Figure IV.2 : Structure cristallographique de PerR-Zn-Mn résolue à 3,2 Å. Les monomères sont colorés d'une couleur différente, les ions zinc sont en orange et les ions manganèse en rouge.

4.3.| Les sites métalliques

Comme attendu, la protéine PerR-Zn-Mn possède deux sites métalliques. Le site structural avec un ion Zn^{2+} coordiné par les quatre cystéines de la protéine (voir chapitre précédent). Ce site est localisé dans le domaine C-terminal. L'autre site correspond au site de régulation avec un ion Mn^{2+} coordiné par les résidus H37, H91, H93, D85 et D104. Ce site est situé à l'interface des domaines N- et C-terminaux. Le site de régulation est représenté sur la Figure IV.3. Une molécule d'eau bien définie dans la carte de densité est observée à proximité de ce site dans le monomère A, mais elle est absente dans le monomère B. Au vu de la distance Mn-O = 2,67 Å, il semble par contre que cette molécule d'eau ne soit pas liée au métal. Cette molécule d'eau est très proche des atomes d'oxygène non liés au manganèse des aspartates D85 et D104 (avec respectivement des distances de 2,47 et 2,37 Å). Ces distance indiquent la présence de liaisons hydrogène très fortes. Cependant, la résolution à laquelle a été obtenue cette structure (3,2 Å) limite grandement la portée de l'analyse des distances entre l'ion métallique et ses ligands.



	Distances (Å)
Mn - Nε2(H37)	2,20
Mn - Oε1(D85)	2,23
Mn - Nε2 (H91)	2,26
Mn - Nε2 (H93)	2,02
Mn - Oε1(D104)	2,22
Mn - H_2O	2,67
H_2O - Oε2(D85)	2,47
H_2O - Oε2(D104)	2,37

Figure IV.3 : Site de régulation de la protéine PerR. Les distances métal - ligands mesurées dans la structure cristallographique de PerR-Zn-Mn sont rapportées dans le tableau ci-contre.

5.| SAX de PerR-Zn-Fe

A défaut d'avoir obtenu des cristaux de la forme PerR-Zn-Fe, des expériences de spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX) ont été entreprises afin de mieux caractériser la coordination du métal régulateur dans la protéine PerR-Zn-Fe. L'un des avantages majeurs de cette technique est la possibilité de travailler sur des échantillons en solution.

5.1.| L'expérience

Le spectre de la protéine PerR-Zn-Fe ainsi que celui du composé modèle $[Fe(Imidazole)_6]Cl_2$ (FeIm6) ont été enregistrés sur la ligne de lumière FAME-BM30b de l'ESRF. Le spectre de la protéine de référence Fe-Fur d'*E. coli* a été fourni par Lilian Jacquamet (Jacquamet, 1999).

Dans le complexe FeIm6, l'ion Fe^{2+} est coordiné par 6 molécules d'imidazole dans une symétrie octaédrique. L'étude de la protéine Fe-Fur a montré que l'ion Fe^{2+} est coordiné

par 6 ligands (3 histidines, 1 aspartate/glutamate et 2 autres atomes N/O) dans une symétrie octaédrique allongée selon les ligands axiaux (Adrait *et al.*, 1999; Jacquamet, 1999).
Les structures des composés de référence sont illustrées par la Figure IV.4.

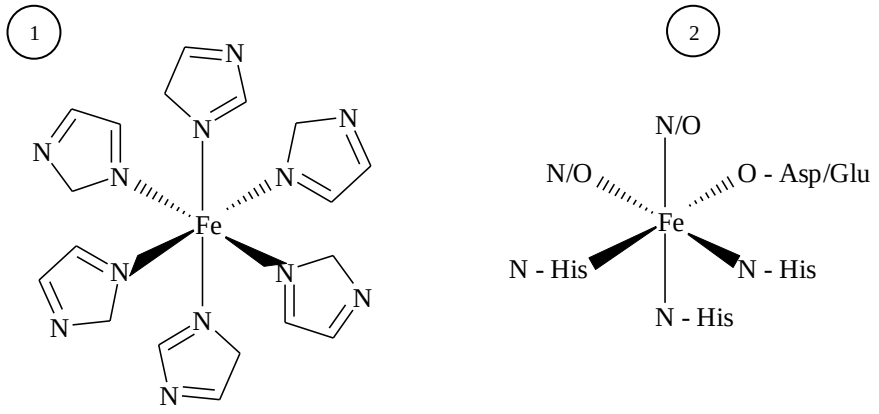


Figure IV.4 : Structures des composés de référence. ① FeIm6 ② Site de régulation de la protéine Fur d'*E. coli* (Adrait *et al.*, 1999; Jacquamet, 1999).

5.2.| Le Préseuil (analyse des pré-pics)

Le pré-seuil d'un spectre d'absorption X contient d'importantes informations sur la géométrie et la coordinence d'un ion métallique. Il a été montré que l'aire (A) du pré-seuil varie en fonction du nombre de coordination comme suit :

- hexacoordination : A < 6 eV ;
- pentacoordination : 9 eV < A < 14 eV ;
- tétracoordination : A > 16 eV.

Le pré-seuil du spectre d'absorption X de la protéine PerR-Zn-Fe est présenté sur la Figure IV.5. La ligne de base a été calculée à partir de fonctions polynomiales sur le domaine de 7100 - 7120 eV, puis soustraite au spectre. L'aire ainsi obtenue pour le pré-seuil est égale à 13 eV. Cette aire est compatible avec une pentacoordination.

Le pré-seuil peut être déconvolué en deux gaussiennes centrées à 7112,17 et 7114,10 eV. Ces valeurs sont compatibles avec celles observées pour des composés modèles à centre ferreux (Westre et al., 1997) et proches des valeurs observées dans Fe-Fur (Jacquamet et al., 2000). Et de façon intéressante, l'écart entre les deux pics (environ 2 eV) est caractéristique des centres ferreux dans un environnement en symétrie pyramidale à base carrée.

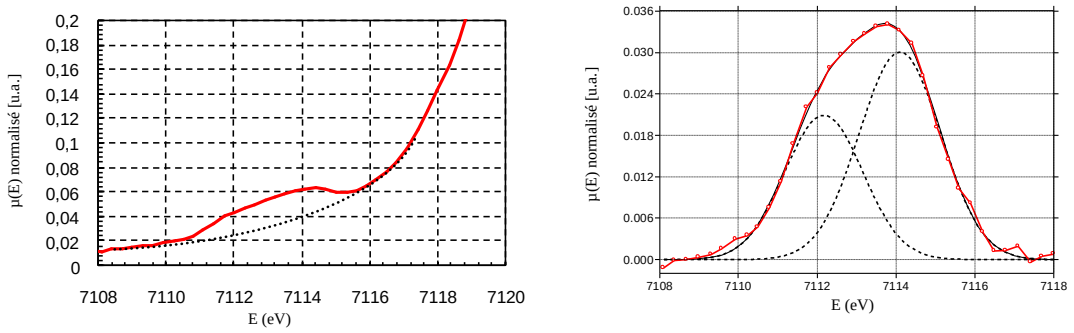


Figure IV.5 : Préseuil du spectre de la protéine PerR-Zn-Fe. A gauche le préseuil du spectre normalisé en rouge et une ligne de base simulée en pointillés. A droite, spectre obtenu après soustraction de la ligne de base.

5.3.| Le XANES

Le XANES (énergies comprises entre 7110 et 7170 eV) est également sensible au nombre de coordination de l'ion métallique sondé. La hauteur de la raie blanche correspond à des transitions électroniques 1s → 4p et augmente avec le nombre de ligands. Les spectres normalisés de PerR-Zn-Fe, Fe-Fur et FeIm6 sont représentés sur la Figure IV.6. L'ion Fe^{2+} est hexacoordiné dans la protéine Fe-Fur et dans le composé modèle FeIm6. L'intensité de la raie blanche de PerR-Zn-Fe est moins intense que les deux échantillons de référence et suggère une coordinence moindre de l'ion métallique (4 ou 5 ligands).

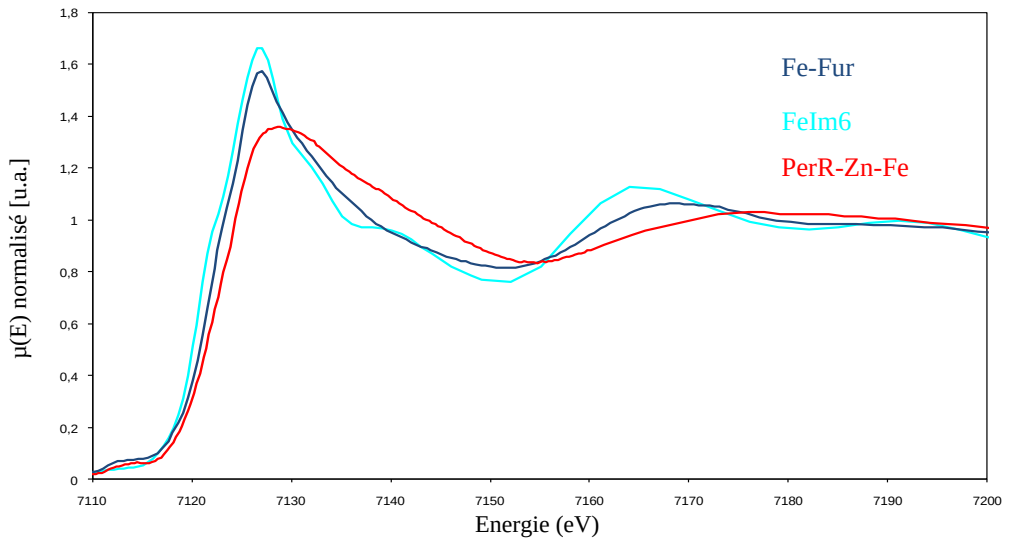


Figure IV.6 : Spectres normalisés des protéines PerR-Zn-Fe et Fe-Fur et du composé modèle FeIm6.

5.4.| L'EXAFS

L'étude de la partie EXAFS (de 7150 eV et au-delà) permet de déterminer la nature des ligands de la sphère de coordination de l'ion métallique étudié. Les transformées de Fourier des spectres EXAFS de PerR-Zn-Fe, Fe-Fur et de FeIm6 sont représentées sur la Figure IV.8.

La transformée de Fourier de l'EXAFS de FeIm6 présente un premier pic centré à R_{eff} égal à 1,7 Å, pic qui correspond à la diffusion simple des atomes de la première sphère de coordination. Ce pic est suivi de trois pics secondaires centrés à R_{eff} ~ 2,7, 3,2 et 3,8 Å ; l'ensemble de ces trois pics est attribué à des groupements imidazole. Ces pics proviennent des diffusions simples et multiples des atomes de la deuxième et de la troisième sphère de coordination du métal (Figure IV.7).

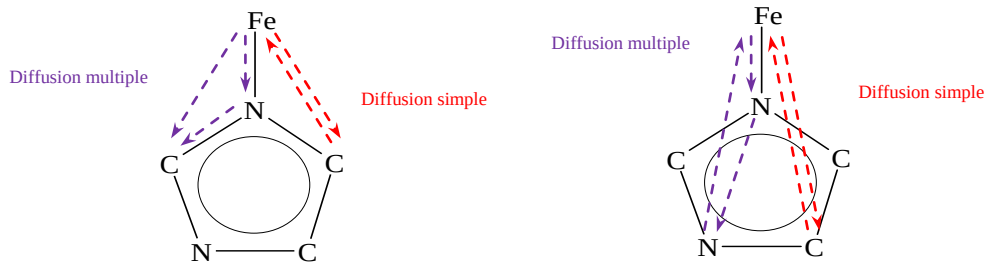


Figure IV.7 : Représentation schématique d'un groupe imidazole lié au fer et des chemins de diffusion simples et multiples prépondérants dans cette structure.

La transformée de Fourier de l'EXAFS des deux protéines présente un profil similaire. Le premier pic, centré à 1,6 Å dans les deux cas, suggère un environnement similaire pour l'ion Fe^{2+} dans les deux protéines. Dans la protéine Fe-Fur, l'ion métallique est coordiné par des ligands N/O. Par conséquent, la sphère de coordination de l'ion Fe^{2+} dans PerR-Zn-Fe n'est constituée que d'atomes N/O. Les trois pics (R_{eff} ~ 2,7, 3,2 et 3,8 Å) observés dans la transformée de Fourier de FeIm6 sont retrouvés dans la transformée de Fourier des deux protéines : leurs positions sont identiques mais avec une intensité moindre. La coordination de l'ion Fe^{2+} dans PerR-Zn-Fe implique donc des résidus histidines mais la faible intensité des pics indique que le nombre d'histidines impliquées est inférieur à 6. Pour la protéine Fe-Fur, il a été montré que trois histidines se trouvent dans la sphère de coordination du métal de régulation. La comparaison des transformées de Fourier des spectres EXAFS des protéines PerR-Zn-Fe, Fe-Fur et du composé FeIm6 suggère donc la présence d'atomes de type N/O exclusivement avec deux ou trois résidus histidine autour du fer dans la protéine PerR-Zn-Fe.

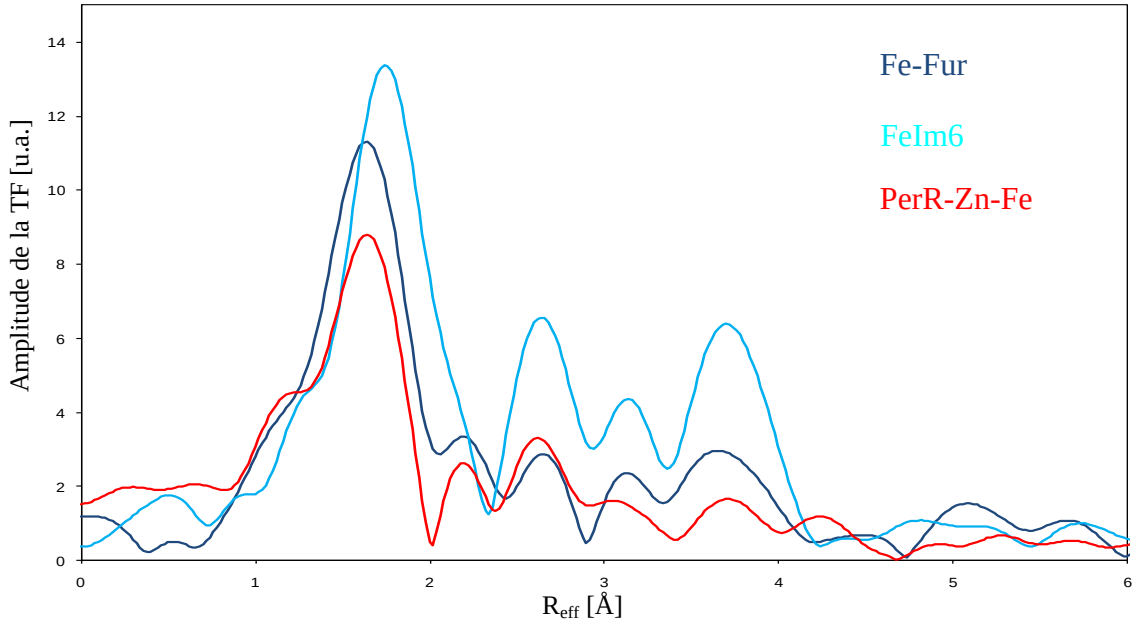


Figure IV.8 : Transformées de Fourier de l'EXAFS des protéines PerR-Zn-Fe, Fe-Fur et du composé modèle FeIm6.

Pour valider les informations structurales obtenues sur le site de coordination de l'ion Fe^{2+} et pour évaluer les distances métal - ligand, une simulation de la transformée inverse de la transformée de Fourier de peut être réalisée. Il s'agit d'affiner dans l'espace de Fourier, les paramètres du modèle (nombre, nature des ligands et distances métal - ligand). Ces paramètres sont ajustés afin d'obtenir le meilleur fit avec la transformée inverse du premier pic de la transformée de Fourier de PerR-Zn-Fe. Les paramètres structuraux obtenus pour les différentes coordinations possibles autour de l'ion Fe^{2+} sont présentés dans le Tableau IV.II.

D'après ces résultats, il s'avère que les ajustements pour les coordinations 6 et 4 diffèrent du spectre expérimental notamment en amplitude et que ces coordinations donnent des Fit index moins bons que pour la coordination 5. Les simulations pour les coordinations 5 avec les différentes combinaisons xO/yN (avec x + y = 5) donnent des fit index comparables, les meilleurs σ^2 étant obtenus pour les simulations 2O/3N et 3O/2N. L'une de ces simulations est illustrée par la Figure IV.9. L'analyse de ces différents paramètres permet de conclure sans ambiguïté à la présence de 5 atomes de types N/O, sans pour autant pouvoir discriminer les différentres combinaisons 2O/3N et 3O/2N. A ce stade de l'analyse, la distance moyenne entre l'ion Fe^{2+} et ses 5 ligands peut-être déterminée en moyennant les distances obtenues pour les simulations 5O et 5N : cette distance est de 2,08 Å.

Coordination	1ère couche		2ème couche		Fit index (10^2)
	R(Å)	σ^2 ($x10^3$)	R(Å)	σ^2 ($x10^3$)	
6N	2.088	12.89			8.04
5N	2.086	10.09			4.95
5O	2.065	12.93			6.94
4O – 1N	2.047	15.57	2.077	14.05	4.01
3O – 2N	2.041	19.20	2.082	4.52	3.99
2O – 3N	2.043	20.34	2.083	6.60	4.14
1O – 4N	1.971	14.06	2.091	7.50	3.91
4N	2.080	7.57			4.99

Tableau IV.II : Paramètres structuraux de PerR-Zn-Fe obtenus par ajustement. R correspond à la distance entre l'ion métallique et les ligands, σ^2 le facteur Debye-Waller et le Fit index correspond à la qualité de l'ajustement donnée par la formule $\boldsymbol{FI} = \frac{X^2}{\sum_i^n \chi_{exp}(k_i)}$ avec $\boldsymbol{X^2} = \sum_i^n \left[\left(k_i^3 \text{ x } \left(\chi_{exp}(k_i) - \chi_c(k_i)\right)\right)/\sigma_i\right]^2$.

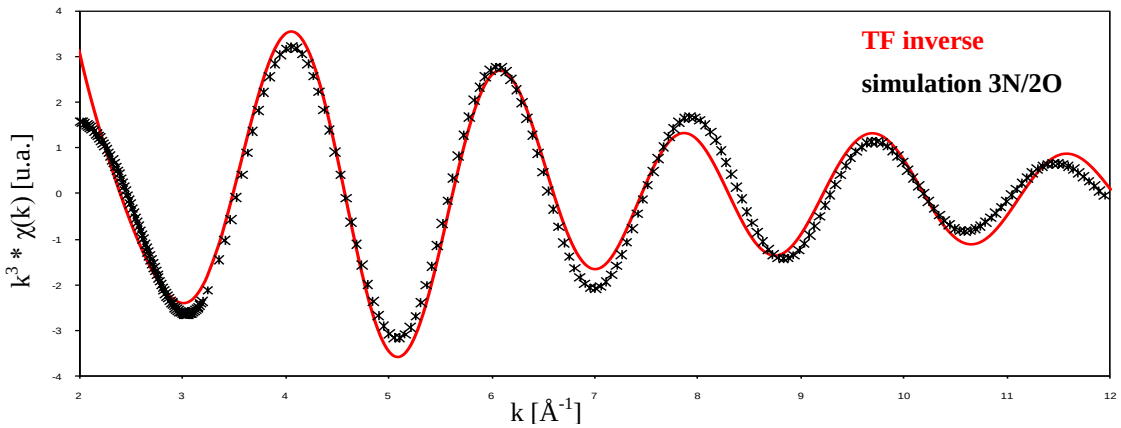


Figure IV.9 : Simulation de la transformée inverse du premier pic de la transformée de Fourier du spectre EXAFS de PerR-Zn-Fe.

Cette étude spectroscopique conclut donc à la présence de 5 ligands (3N/2O ou 2O/3N) autour de l'ion Fe^{2+} à une distance moyenne de 2,08 Å dans une symétrie pyramidale à base carrée.

6.| Cristallogenèse de PerR-Zn-Fe

La protéine PerR-Zn-Fe est préparée selon le protocole utilisé pour PerR-Zn-Mn, avec le sel de Mohr comme source d'ions Fe^{2+}. Toute l'expérience est menée en boîte à gants dédiée à la cristallisation de protéines sensibles à l'oxygène (métallation, criblage des conditions de cristallisation, optimisation, etc). Des cristaux ont été observés dans quelques conditions mais malheureusement ils n'ont pas pu être reproduits.

Les essais de cristallisation de PerR-Zn-Fe en présence d'ADN ont également été effectués dans la boîte à gants mais aucun cristal exploitable n'est apparu.

7.| Conclusions – Discussion

Nous avons entrepris au cours de ce travail des essais de cristallisation de la forme active PerR-Zn-Mn. Les premiers essais ont montré que cette forme n'était pas suffisamment stable pour cristalliser. L'introduction d'ADN dans les conditions de cristallisation stabilise la protéine PerR-Zn-Mn : les cristaux obtenus ont permis de résoudre la structure de cette protéine.

La structure de PerR-Zn-Mn a été résolue par remplacement moléculaire en prenant pour modèle la structure de PerR-Zn-apo. Cependant, la structure de PerR-Zn-apo ne peut être utilisée que si elle est traitée en séparant les deux domaines N- et C-terminaux, dans le but de calculer indépendamment les fonctions de rotation et de translation propres à chaque domaine. Le repliement global de la protéine est très similaire au modèle de forme active proposé *in silico* (Chapitre III). Le passage de la forme inactive à la forme active capable de se lier à l'ADN s'effectue par une rotation des domaines N-terminaux par rapport au domaine de dimérisation (Figure IV.10). Cette rotation est possible grâce à la boucle flexible (résidus 86 à 90) reliant les deux domaines. L'étude des changements structuraux de la protéine en solution lors de sa métallation a été menée en parallèle au laboratoire (El Ghazouani, 2007). Cette étude a été réalisée par spectroscopie de fluorescence sur le mutant PerR-Y77W en présence ou en absence d'ADN. L'introduction d'un résidu tryptophane en position 77 à proximité de la boucle flexible reliant les deux domaines N- et C-terminaux a permis de suivre les modifications d'émission de fluorescence lors de l'activation de PerR par le métal régulateur. Le mutant PerR-Y77W joue un véritable rôle de sonde structurale. Le résidu W77 voit son environnement modifié lors du passage de la forme inactive à la forme active de PerR. Ce

résultat conforte les hypothèses de réarrangements structuraux provoqués par l'incorporation du métal de régulation.

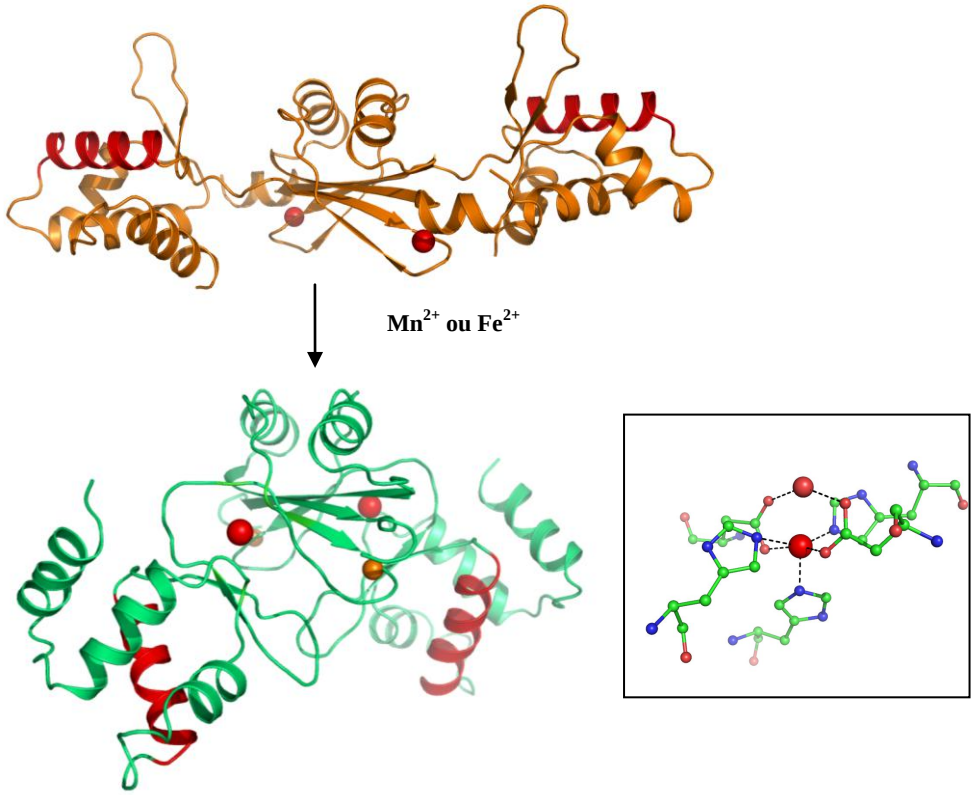


Figure IV.10 : Changement de conformation induit par la fixation du métal de régulation. PerR-Zn-apo (orange) et PerR-Zn-Mn (vert). Les ions zinc sont en orange, les ions manganèse et les hélices de fixation à l'ADN sont en rouge. Dans l'encadré, zoom sur le site régulation avec la pyramide à base carrée.

La position du site de régulation s'avère déterminante pour la fonction de la protéine. Ce site est à l'interface des deux domaines N- et C-terminaux (Figure IV.3). Cependant, compte tenu de la résolution (3,2 Å), les distances mesurées à partir de la structure ne sont pas exploitables. C'est pourquoi l'analyse par SAX du site de régulation à été menée. Cette analyse indique une distance moyenne de 2,08 Å entre le métal et ses plus proches voisins. La combinaison de tous ces résultats permet de conclure à une géométrie pyramidale à base carrée présentant une distortion par rapport à une pyramide parfaite. Cette coordination du métal de régulation permet d'envisager une approche du peroxyde d'hydrogène pour compléter à 6 ligands la sphère de coordination de l'ion Fe^{2+}.

L'homologue le plus proche de la protéine PerR dont la structure est connue est la protéine Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003). La superposition des deux structures révèle une forte homologie structurale (rmsd 2,7 Å) et notamment la localisation

identique des sites de régulation (Figure IV.11-①). Cette comparaison de structures souligne la mauvaise attribution des différents sites structuraux et régulateurs par les auteurs de la structure de *Pa*-Fur. Néanmoins, le site de régulation de *Pa*-Fur est tétracoordiné tandis que le site de PerR est pentacoordiné (Figure IV.11-②). L'atome de zinc présent dans la structure de *Pa*-Fur n'étant pas le métal de régulation présent *in vivo*, il est probable que ce soit cet atome qui dicte la géométrie tétraédrique à ce site dans la structure. De plus, l'histidine H87 de *Pa*-Fur (H91 dans PerR) est mal définie dans la carte de densité électronique. Ce résidu est très probablement ligand du métal de régulation. La géométrie imposée par l'ion Zn^{2+} ne lui permet pas de participer à la coordination. Le site de régulation peut donc être différent en présence d'ion Fe^{2+}.

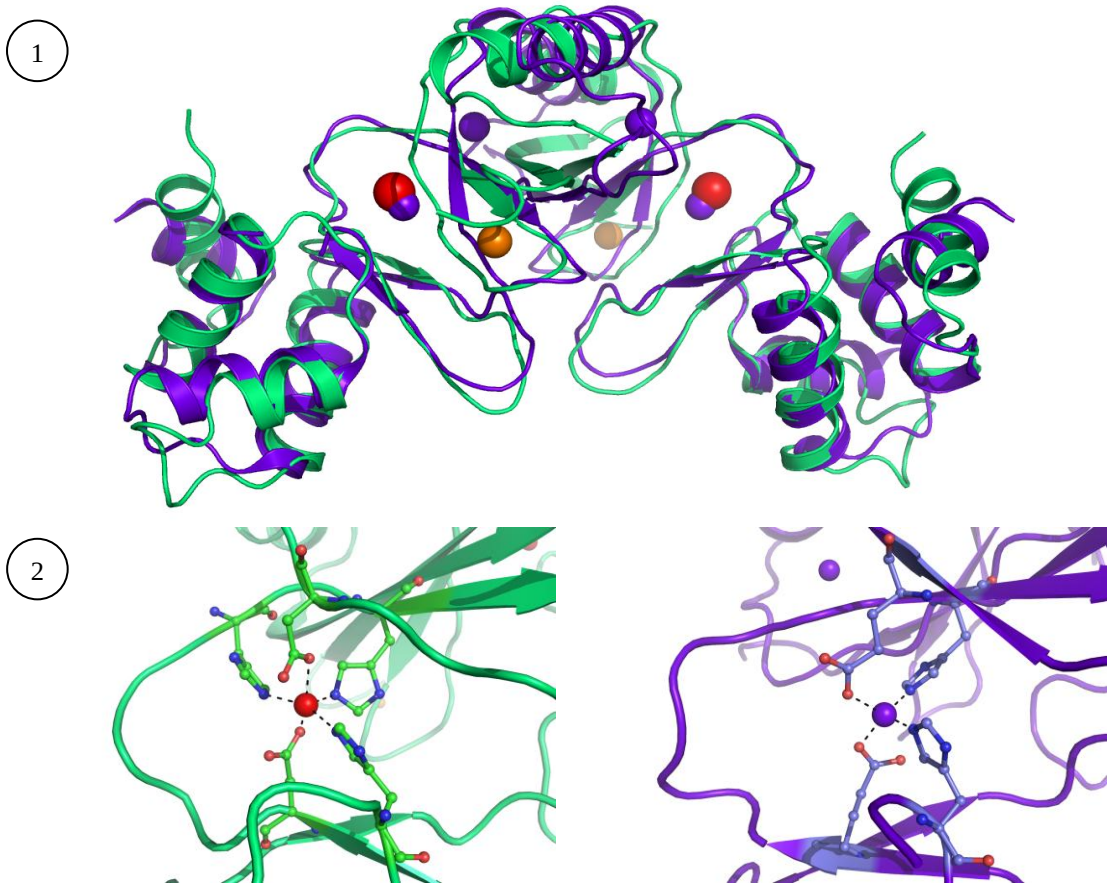


Figure IV.11 : ① Superposition des structures cristallographiques des protéines PerR-Zn-Mn (vert) et *Pa*-Fur (violet). ② Zoom sur le site de régulation de chaque protéine.

Il a été montré que la protéine Fur est très peu sensible au peroxyde d'hydrogène (Lee and Helmann, 2006b). Il est impossible d'expliquer la différence de réactivité entre les deux protéines en se basant uniquement sur les structures. Cependant la perte du métal, conduisant

dans un cas comme dans l'autre à une levée de répression est compréhensible par la localisation des sites de régulation à l'interface entre des domaines N- et C-terminaux.

Les résultats obtenus sur les formes actives PerR-Zn-Mn et PerR-Zn-Fe montrent que le modèle proposé à partir de PerR-Zn-apo n'est finalement pas une « chimère ». Dans le mécanisme d'activation de la transcription par la protéine PerR, l'oxydation d'un ou plusieurs acides aminés provoque la perte du métal de régulation et conduit à une forme inactive de la protéine, non optimale pour une liaison à l'ADN. Nous nous intéresserons dans la suite du manuscrit, à la nature de cette oxydation.

8.| Références Bibliographiques – Chapitre IV

Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (1999). Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 6248-6260.

D'Autreaux, B., Pecqueur, L., Gonzalez de Peredo, A., Diederix, R. E., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E., and Michaud-Soret, I. (2007). Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* 46, 1329-1342.

El Ghazouani, A. (2007) Etude biochimique et fonctionnelle de la protéine PerR de *Bacillus subtilis*: un senseur bactérien du peroxyde d'hydrogène, *THESE*, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Jacquamet, L. (1999) Etudes structurales de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation) d'*Escherichia coli* par spectroscopie d'absorption des rayons X: XANES et EXAFS, *THESE*, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Jacquamet, L., Dole, F., Jeandey, C., Oddou, J. L., Perret, E., Le Pape, L., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Michaud-Soret, I., and Latour, J. M. (2000). First spectroscopic sharacterization of FeII-Fur, the physiological active form of the Fur protein. *J Am Chem Soc* 122, 394-395.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006b). The PerR transcription factor senses H2O2 by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363-367.

Loeb, K. E., Westre, T. E., Kappock, T. J., Mitic, N., Glasfeld, E., Caradonna, J. P., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I. (1997). Spectroscopic characterization of the catalytically competent ferrous site of the resting, activated, and substrate-bound forms of phenylalanine hydroxylase. *J Am Chem Soc* 119, 1901-1915.

Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47, 903-915.

Westre, T. E., Kennepohl, P., DeWitt, J. G., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I. (1997). A multiplet analysis of Ke-edge 1s->3d pre-edge features of iron complexes. *J Am Chem Soc* 119, 6297-6314.

CHAPITRE V

PerR et la 2-oxo-histidine

Les structures des protéines PerR-Zn-apo et PerR-Zn-Mn ont été décritres dans les chapitres précédents. Ces résultats ont permis d'identifier les deux sites métalliques de la protéine : le site à zinc structural coordiné par 4 cystéines et le site de régulation impliquant 3 histidines et 2 aspartates. En ce qui concerne le mécanisme de détection du peroxyde d'hydrogène par PerR, l'hypothèse la plus récente a été formulée par le groupe de J.D. Helmann. Dans les travaux publiés en 2006 (Lee and Helmann, 2006), ce groupe propose une réaction localisée sur le métal, entraînant l'oxydation d'un résidu ligand du métal de régulation. Cette oxydation entraînerait alors la perte du métal de régulation et la dissociation du complexe ADN-protéine. Les auteurs proposent une réaction de type Fenton au sein du site de régulation. Le radical $HO^{\bullet}$ ainsi formé, oxyde sélectivement une histidine présente dans le site de régulation. Cependant, la nature du produit de l'oxydation et le rôle du radical hydroxyle n'ont pas été clairement démontrés.

1.| Localisation de l'oxydation

Nous avons mentionné dans le chapitre III que l'expression de la protéine PerR dans les conditions classiques en milieu LB conduit à un lot de protéine non homogène en termes d'oxydation de l'échantillon. Le ratio entre la forme native et oxydée est variable selon les lots de protéine. Après digestion par des endoprotéases (trypsine et LysC), l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des fragments obtenus montre que l'oxygène supplémentaire est localisé sur deux peptides : un peptide contenant l'histidine H37 et un autre peptide contenant les histidines H91 et H93, chaque peptide est partiellement oxydé. Dans le but de vérifier la nature et la position précise de l'oxydation, nous avons entamé des études structurales sur la protéine oxydée. Pour cela, un protocole d'expression et de purification conduisant très majoritairement à la forme mono-oxydée de la protéine a été mis au point.

2.| Expression et purification de la protéine oxydée

Le protocole initial d'expression de la protéine en milieu M9 a été utilisé et modifié pour conduire à une forme majoritairement oxydée de la protéine. Contrairement au protocole conduisant à la forme sauvage (forme non oxydée), la culture des bactéries est effectuée en milieu M9 en présence de fer, sans ajout de desferroxiamine. En effet, la présence de fer conduit *in vivo* à la formation de la protéine PerR-Zn-Fe qui réagit avec le peroxyde

d'hydrogène généré dans le milieu. Dans ces conditions, la protéine fonctionne selon son mode d'activation normal. L'analyse du spectre de masse (ESI-TOF) de la protéine ainsi obtenue montre que la protéine est très majoritairement oxydée (Figure V.1). La protéine mono-oxydée (PerR-Zn-ox) est obtenue avec un rendement de l'ordre de 10 mg par litre de culture.

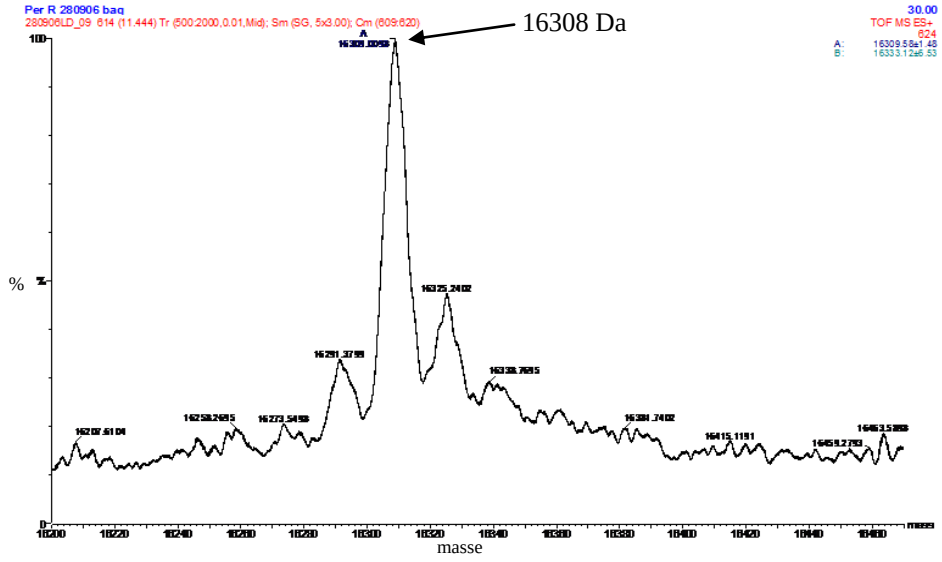


Figure V.1 : Spectre de masse ESI-TOF de PerR-Zn-ox.

3.| Cristallogenèse et cristallographie

Dans un premier temps, la cristallisation de PerR-Zn-ox a été testée dans les conditions de cristallisation de PerR-Zn-apo. Ces tentatives se sont avérées infructueuses et un nouveau criblage des conditions de cristallisation a été entrepris. Suite à l'optimisation des premières conditions détectées, des cristaux de bonne qualité ont été obtenus dans la condition 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 20 % PEG 3350, 200 mM NaCl. Ces cristaux appartiennent au groupe d'espace P1 avec les paramètres de maille a = 41.3 Å, b = 42.2 Å, c = 53.3 Å, α = 82.2°, β = 80.1, γ = 60.9°. La structure de PerR-Zn-ox a été résolue par remplacement moléculaire en utilisant les coordonnées atomiques de PerR-Zn-apo comme modèle de recherche.

4.| Publication

La caractérisation biochimique et structurale de la protéine PerR-Zn-ox est discutée dans un article soumis à publication dans la revue *Nature Chemical Biology*.

Les protéines PerR-Zn-ox et PerR-Zn-apo ont été analysées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Les protéines sont préalablement digérées par des endoprotéases (LysC ou trypsine). L'analyse des fragments peptidiques a permis de localiser la position de l'oxydation. Les peptides P1 (qui contient H37) et P2 (qui contient H91 et H93) sont partiellement oxydés (addition de 16 Da). Ces peptides sont oxydés à 50 % et 25 % respectivement par rapport à la masse totale de protéine. Le séquençage des peptides P1 et P2 par spectrométrie de masse en mode tandem (ESI-MS/MS) montre que seules H37 et H91 sont concernées par l'oxydation.

Les structures cristallographiques de PerR-Zn-ox et PerR-Zn-apo sont parfaitement superposables (rmsd = 0,2 Å). La principale différence, demeure dans la présence d'un résidu 2-oxo-histidine. Ce résidu modifié a été localisé dans la carte de densité électronique calculée à partir des données de diffraction. D'après la spectrométrie de masse, les résidus H37 et H91 sont concernées par cette modification. Dans la structure cristallographique de PerR-Zn-ox, l'atome d'oxygène supplémentaire est clairement identifié sur le résidu H37, par contre, ce n'est pas le cas pour le résidu H91. Cette différence peut être corrélée au taux d'oxydation de ces résidus. Le taux d'oxydation de 25 % de H91 d'oxydation est difficilement détectable dans la structure, qui est une moyenne de toutes les molécules présentes dans la maille cristalline.

Une analyse par HPLC, couplée à la spectrométrie de masse, des protéines PerR-Zn-ox et PerR-Zn-apo a permis d'identifier clairement la 2-oxo-histidine comme le produit d'oxydation de la protéine PerR. Pour cette analyse, une méthode de synthèse de la 2-oxo-histidine a été préalablement mise au point.

Unambiguous identification of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein by X-ray crystallography and mass spectrometry

Daouda A. K. Traoré,[1,2,3,5] Abdelnasser El Ghazouani,[1,2] Lilian Jacquamet,[3,5] Franck Borel,[3,5] Jean-Luc Ferrer,[3,5]* David Lascoux,[4,5] Jean-Luc Ravanat,[6,7] Michel Jaquinod,[8,9] Geneviève Blondin,[1,2] Christelle Caux-Thang,[1,2] Victor Duarte[1,2]* and Jean-Marc Latour[1,2]

[1] CEA, iRTSV, LCBM, PMB, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

[2] CNRS, UMR 5249 CEA-CNRS-UJF, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

[3] CEA, IBS, LCCP, GS, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.

[4] CEA, IBS, LSMP, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.

[5] UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.

[6] CEA, INAC, SCIB, LAN, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

[7] UJF, LCIB, UMR-E3 CEA-UJF,

[8] CEA, iRTSV, LEDyP, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

[9] INSERM U880, LEDyP, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

* For correspondence, Email victor.duarte@cea.fr or jean-luc.ferrer@ibs.fr

Abstract

In *Bacillus subtilis*, the PerR protein is a metal-dependent sensor of hydrogen peroxide that regulates the adaptive response to H_2O_2. PerR is a dimeric zinc protein with a regulatory metal-binding site that coordinates either Fe^{2+} (PerR-Zn-Fe) or Mn^{2+} (PerR-Zn-Mn). While most of the peroxide sensors use redox-active cysteines to detect H_2O_2, it has been shown that reaction of PerR-Zn-Fe with H_2O_2 leads to the oxidation of one histidine (H) residue that binds the Fe^{2+} ion. This metal-catalyzed oxidation of PerR leads to the incorporation of one oxygen atom into H37 or H91. However the exact position of the added oxygen is still unknown. This study presents the crystal structure of the oxidized PerR protein (PerR-Zn-ox) that clearly shows a 2-oxo-histidine residue in position 37. 2-oxo-histidine formation is also demonstrated and quantified by HPLC-MS/MS. Interestingly, EPR experiments indicate that PerR-Zn-H37ox retains a significant affinity for the regulatory metal while PerR-Zn-H91ox shows a drastically reduced affinity for the metal ion. In spite of these significant differences in terms of metal binding affinity, oxidation of H37 and/or H91 in PerR, prevents DNA binding.

Introduction

An unavoidable consequence of aerobic life is the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, which are capable of damaging numerous cellular components, including nucleic acids, proteins and lipids[1]. To counter oxidative stress, organisms activate several functions that detoxify ROS and repair the damages. The intracellular concentration of peroxide (H_2O_2 and organic peroxides) in micro-organisms is tightly maintained at very low levels in face of endogenous production by cellular metabolism and large extra-cellular variations. To achieve this homeostasis, proteins, mostly transcription factors, function as switches that are specifically activated in response to peroxides[2,3]. In many cases, these switches exploit the unique chemistry of cysteine residues to flip from the thiol state to disulfide upon exposure to peroxides[4]. The best understood sensor of H_2O_2 is OxyR from *Escherichia coli*. From crystallographic and biochemical analyses, Storz and coworkers[5] have proposed a mechanism based on a H_2O_2-induced disulfide linkage in which the oxidized form of the protein contains a single intramolecular disulfide bond whereas the inactive form contains thiols[6]. The active cysteine (Cys199) is located in a hydrophobic cavity that enhances its nucleophilicity. Upon action of H_2O_2 it is transformed in a sulfenic acid that is expelled from the cavity and trapped by the so-called resolving cysteine (Cys208) thus forming a disulfide. In *Saccharomyces cerevisiae* the transcription factor Yap1 confers the cellular response to H_2O_2. Similarly to OxyR, cysteine residues are required to detect the increased level of hydrogen peroxide. However, unlike OxyR, which functions as both a peroxide sensor and a transducer, Yap1 itself does not react with H_2O_2. Toledano et al.[2,7] have nicely shown that Yap1 is part of a two-component system that relays ROS levels to gene expression via the peroxide sensor Orp1. Upon reaction with H_2O_2 a single cysteine residue of Orp1 (Cys36) is converted into its sulfenic acid form (Cys36-SOH) that then condenses with Cys598 of Yap1 to form a transitory intermolecular disulfide linkage. At this stage, a thiol-disulfide exchange reaction between Cys36 of Orp1 and Cys303 of Yap1 (mediated by a third protein Ybp1) converts the Orp1-Yap1 disulfide bond to a Cys303-Cys598 intramolecular disulfide bond in Yap1 which represents the active form of this regulator.

Bacillus subtilis also displays an adaptive response to peroxide stress that is mainly under control of two proteins OhrR and PerR[3,7]. The OhrR protein controls the expression of a thiol-dependent peroxidase that detoxifies organic hydroperoxides by reduction to the corresponding alcohol. Oxidation of the single conserved cysteine of OhrR by organic peroxides leads to the formation of a sulfenic acid intermediate that further reacts to generate

a mixed disulfide or a protein sulfenamide derivative, essential for DNA derepression and regeneration of the active protein[8]. PerR regulates the response to hydrogen peroxide in *B. subtilis* and other pathogenic bacteria[3]. It operates on a different and cysteine-independent way[9]. As a member of the Fur family, PerR comprises an N-terminal DNA-binding domain that contains a winged helix motif and a C-terminal domain, involved in the dimerization of the protein, that harbors two metal binding sites[10,11]. The crystal structure of the PerR-Zn-apo form of the protein reveals that the C-terminal domain, contains a structural $Zn(Cys)_4$ site that stabilizes the dimer[11,12]. Sequence alignment of PerR-like proteins supports that this structural site constitutes a distinctive motif of this class of peroxide regulators within the Fur super-family. The regulatory site of PerR, which accommodates either Fe^{2+} or Mn^{2+}, is required for DNA binding. Interestingly the metal content of the regulatory site dictates the ability of PerR to sense hydrogen peroxide[10,13]. The PerR-Zn-Fe protein is highly sensitive to H_2O_2 while the peroxide induction of the PerR regulon is inefficient with the PerR-Zn-Mn protein. Insights into the regulatory site of PerR emerged from mutational analyses[9] and structural modeling based on the PerR-Zn-apo structure[11]. Both studies suggest that five residues (H37, H91, H93, D85 and D104), all conserved within PerR family members, are involved in the coordination of the regulatory metal.

Lee and Helmann demonstrated that, in contrast to redox switches based on reactive-cysteines, PerR senses H_2O_2 by metal-catalyzed histidine oxidation[9]. PerR inactivation leads to the incorporation of one oxygen atom into H37 or H91, two of the residues that are supposed to coordinate the bound Fe^{2+}. This oxidation would lead to iron release and dissociation of the PerR-DNA adduct. The proposed mechanism relies on the reduction of H_2O_2 by Fe^{2+} and the generation of a highly reactive hydroxyl radical (Fenton reaction). By analogy to metal catalyzed oxidation (MCO) reactions with histidine-containing enzymes and model peptides[14-16], the authors propose that the hydroxyl radical generated by the Fenton reaction reacts rapidly with histidine. The pathway of oxygen incorporation is proposed to proceed via the 2-oxo-histidinyl radical intermediate that finally leads to the formation of the 2-oxo-histidine. As pointed out by Lee and Helmann, PerR is highly susceptible to oxidative inactivation during purification[9]. For example, PerR purified under redox cycling conditions, in the presence of a thiol-reducing agent in EDTA lacking buffers, was found to be oxidized at multiple sites. This multiple oxidation is significantly reduced in the absence of both EDTA and DTT during sample preparation. Under these conditions, in addition to the unoxidized protein, the oxidation of PerR typically leads to a protein having incorporated a single oxygen

atom into either H37 or H91 residues. Nevertheless, variable amounts of singly oxidized and unoxidized PerR are obtained depending on the preparation.

In this study we describe a reproducible procedure that leads mostly to the oxidized form of PerR (PerR-Zn-ox) containing a single oxygen atom adduct. This allowed us to crystallize PerR-Zn-ox and to solve the corresponding X-ray crystal structure. As expected, a 2-oxo-histidine has been identified on H37 that is supposed to coordinate the regulatory metal. To our knowledge, this is the first X-ray crystal structure of a protein containing a 2-oxo-histidine described in the Protein Data Bank. Moreover, the formation of a 2-oxo-histidine residue has been unambiguously demonstrated and quantified by HPLC coupled to tandem mass spectrometry. EMSA experiments clearly indicate that in contrast to the wild type protein, PerR-Zn-ox does not bind the DNA. Interestingly, EPR monitoring of Mn^{2+} binding suggests that PerR-Zn-H37ox is still able to coordinate the latter regulatory metal ion while PerR-Zn-H91ox does not show a significant affinity. Whereas these results support Lee and Helmann findings on PerR inactivation by histidine oxidation, they bring new insights about how PerR oxidation is linked to metal and DNA dissociation.

Results

Purification and mass spectrometry analysis of PerR protein samples

In order to perform X-ray structural studies with a pure and homogeneous oxidized PerR sample, we have made major efforts to establish a reproducible expression and purification procedure that leads mostly to a protein that has added a single oxygen atom. We first attempted to grow the cells in Luria Bertani medium followed by a purification protocol in the absence of both EDTA and a thiol reducing agent. Under these conditions, PerR-Zn-ox was obtained together with a significant amount of the non-oxidized PerR protein and an over oxidized protein. Finally we settled on a protocol where the cells were grown in minimal medium with 50 µM Fe^{3+} and 100 µM Mn^{2+} followed by a purification step in buffers containing high EDTA concentrations (10 mM). Electrospray ionisation mass spectrometry analysis (under denaturing conditions) of the latter protein sample showed a major peak at m/z of 16307.7 (0.7) Da that corresponds to the mass of the monomer with the missing first methionine residue (calculated m/z = 16292.5 Da) and a mass increase corresponding to one oxygen atom (**Fig. 1**, I). Under these conditions, PerR-Zn-ox was typically obtained with 10 % of both PerR-Zn-apo (**Fig. 1**, II) and an over-oxidized form of PerR with an addition of two oxygen atoms (**Fig. 1**, III). We used MALDI-TOF mass spectrometry to identify the sites of

PerR-Zn-ox oxidation after LysC digestion of the protein (**Figs. 2, S1**). As expected, one oxygen atom was incorporated into either P1 (residues 15-45) or P2 (residues 74-101) peptides predicted to contain residues involved in the coordination of the regulatory metal[9,11]. We found that 55 % of P1 (**Fig. 2a**) and 25 % of P2 (**Fig. 2c**) have added an oxygen atom as revealed by the associated 16 Da mass increase. The peptide map of PerR-Zn-ox presented Fig. S1 (see supplementary information) clearly shows that there is no oxygen addition products in other peptides. For comparison, MALDI-TOF mass spectrometry analysis of PerR-Zn-apo indicated that P1 and P2 peptides were not modified (**Fig. 2b, 2d**).

To further localize the sites of oxidation in H37 and H91/H93 containing peptides, sequencing of the oxidized tryptic peptides was performed by using tandem mass spectrometry (ESI-LC-MS/MS). As expected the additional oxygen is incorporated into H37 on H25-K45 peptide (T1 peptide in supplementary **Fig. S2**). In the case of the F84-K101 peptide (T2 in **Fig. S2**), the analysis of the y ion series indicates that H91 is the site of oxidation (**Fig. 3**). Indeed, The y ions that do not contain H91 (y3 to y10) appear at the predicted m/z value. In contrast the y11 ion presents a 16 Da m/z increment in comparison to the unmodified peptide. The y9 and y10 ions that appear at the predicted m/z values clearly indicate that H93 is not oxidized in this fragment. Our present results, which indicate the partial oxidation of H37 and H91 in oxidized PerR, are consistent with Lee and Helmann published data [9].

Identification of a 2-oxo-histidine residue in the crystal structure of PerR-Zn-ox

The crystal structure of PerR-Zn-ox has been solved at a 2.0 Å resolution by molecular replacement using the PerR-Zn-apo coordinate file as a starting model. The protein is a homodimer of 144 residues (the initial methionine residue being missing). The asymmetric unit of the PerR-Zn-ox crystal contains two monomers related by a non crystallographic two-fold axis. As reported for the PerR-Zn-apo form, the structure of PerR-Zn-ox lacks the regulatory metal and retains its structural $Zn(Cys)_4$ site. The structures of PerR-Zn-apo and PerR-Zn-ox are highly superimposable as reflected by the root mean square deviation value of 0.20 Å for the two C-α backbone of the proteins (**Fig. 4a**).

Based on the mass spectrometry analysis of the digested PerR-Zn-ox protein (**Figs. 2, S2, 3**), the oxidation of PerR leads to the formation of an oxidized histidine residue on positions 37 and 91. Thus, we focused the analysis of the PerR-Zn-ox structure on the identification of a 2-oxo-histidine at these positions. Interestingly, the molecular replacement maps show an additional electron density near the H37 C-ε in both monomers which could be

attributed to the oxygen atom of 2-oxo-histidine (**Fig. 4b**, left). To confirm that this additional electron density was not fortuitous further verifications have been performed. First the 2-oxo-histidine entity was introduced in the refinement process with the occupancy ratio of 55 % (for the oxygen carried by the C-ε) determined by mass spectrometry. As a result, inspection of the corresponding electron density maps clearly reveals that the electron density near the H37-C-ε is now accounted for by the model indicating the presence of a 2-oxo-histidine on position 37 for PerR-Zn-ox (**Fig. 4b**, middle). Second, when the same procedure was performed with the PerR-Zn-apo protein, the presence of a 2-oxo-histidine was clearly ruled out by the map analysis (**Fig. 4b**, right). As mentioned above, the mass spectrometry analysis of PerR-Zn-ox indicated also a partial oxidation (about 25 %) of H91. Thus to identify a 2-oxo-histidine residue at this position, we applied the same procedure as for H37 with an occupancy ratio of 25 % for H91. After refinement, the corresponding map did not allow us to confirm or rule out the presence of a 2-oxo-histidine in position 91. As a consequence, the crystallographic data clearly demonstrate histidine oxidation in position 37, but in contrast to the mass spectrometry data (see above) neither confirms nor rules out histidine oxidation in position 91.

In summary, the present structural data clearly supports that the oxidation of PerR is a selective event that affects mainly the H37 histidine residue most likely involved in the coordination of the regulatory metal.

Detection and quantification of 2-oxo-histidine by HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

In order to obtain a definite quantitative analysis of PerR oxidation, we devised a new quantification procedure of 2-oxo-histidine. Detection of free 2-oxo-histidine has been previously reported in completely hydrolyzed samples of proteins using HPLC with electrochemical detection[15,17]. In addition, HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry[18,19] has been used to detect 2-oxo-histidine containing peptides. In the present study, we developed a HPLC-MS/MS method to identify and quantify unambiguously a 2-oxo-histidine residue within PerR-Zn-ox subsequently to quantitative acidic hydrolysis of the protein. The sensitivity of the detection method was first optimized by infusing a standard of pure 2-oxo-histidine, which was synthesized and purified as previously described[15,20]. The collision induced dissociation mass spectra of the protonated ions of histidine and 2-oxo-histidine $[M+H]^+$ at m/z = 156.1 and 172.1, respectively, exhibit an intense fragment, corresponding to the loss of 46 uma, at m/z = 110.1 and 126.1, respectively[21]. Therefore, to

simultaneously detect histidine and 2-oxo-histidine in the hydrolyzed protein samples, the tandem mass spectrometer was used in the multiple reaction monitoring (mrm) mode using transitions 156.1→110.1 and 172.1→126.1 to detect histidine[21] and 2-oxo-histidine, respectively. In order to perform a quantitative analysis, a calibration curve was established using histidine samples spiked with increasing amounts of 2-oxo-histidine ranging from 0 to 10 %. This range is justified by the fact that oxidation of PerR-zn-ox is a selective event affecting on average a single histidine residue among the ten present in the protein. Since decomposition of 2-oxo-histidine may occur during protein hydrolysis prior to HPLC-MS/MS analysis [20], the samples for the calibration curve were dried and treated with 6M HCl for 24h under the conditions used for protein hydrolysis. In order to prevent the oxidation of the 2-oxo-histidine, the hydrolysis was performed in the presence of 40 mM DTT. Under these conditions, no significant decomposition (less than 5%) of 2-oxo-histidine was observed. Thus a linear calibration curve was obtained (R^2=0.995) indicating that the developed assay allows the quantitative determination of 2-oxo-histidine in spiked histidine samples with a limit of sensitivity estimated around 0.02 % (using 10 nmol of histidine). The calibration curve was then used to determine the amount of 2-oxo-histidine relatively to histidine in the hydrolyzed protein samples (using 1 nmol of protein). As expected, HPLC-MS/MS analysis of PerR-Zn-apo did not show any significant level of 2-oxo-histidine (**Fig. 5**). However, HPLC-MS/MS experiments performed with three separate PerR-Zn-ox samples led to a 2-oxo-histidine/histidine ratio of 9.22 % (**Fig. 5**). This result indicates that approximately 90 % of the sample contains on average one 2-oxo-histidine among the total ten histidine residues of the protein. This result is in good agreement with the mass spectrometry analysis (**Fig. 2, S1, S2, 3**). The present HPLC-MS/MS data provides the first definite demonstration and quantification of 2-oxo-histidine formation upon metal catalyzed oxidation of PerR. Moreover, these results indicate that the additional oxygen on PerR-Zn-ox can be quantitatively accounted for by 2-oxo-histidine formation.

PerR-Zn-ox does not bind DNA in the presence of a regulatory metal

EMSA experiments were done to assess the possibility for PerR-Zn-ox to bind DNA in the presence of a regulatory metal (Mn^{2+}). A 33 bp labelled DNA duplex containing the PerR box from the *mrgA* promoter was used with increasing concentrations of PerR-Zn-apo and PerR-Zn-ox in the presence of 500 µM Mn^{2+}. Figure 6a shows the formation of the PerR-Zn-Mn-DNA complex for protein concentrations as low as 1 nM (lanes 2-7). The estimated value for the dissociation constant is Kd = 3.5 nM (data not shown). The corresponding data

for the PerR-Zn-ox protein (**Fig. 6b**) showed that a large excess of 100 and 1000 eq of oxidized protein (lanes 6, 7) was required to form respectively, 15 and 62 % of protein-DNA complex. As we have mentioned, the present PerR-Zn-ox sample contains approximately 10 % of PerR-Zn-apo, thus we cannot exclude that the observed DNA binding is accounted for by the remaining non oxidized protein. Indeed, a PerR-Zn-ox concentration of 200 nM, which contains approximately 20 nM of PerR-Zn-apo, leads to 62 % of DNA binding (**Fig. 6b**, lane 7), a value quite consistent with the observed 70 % of DNA binding when using 20 nM of PerR-Zn-apo (**Fig. 6a**, lane 6). Interestingy, this result suggests that the partial oxidation of H37 and H91 abolishes the DNA binding of PerR-Zn-ox. To address further this hypothesis we have expressed and purified both PerR-Zn-H37A and PerR-Zn-H91A mutated proteins and evaluated their ability to bind DNA. As shown in figure 6 (**6c, 6d**), under the conditions used (200 pM DNA, 500 µM $MnCl_2$ and protein concentrations from 200 pM to 200 nM) neither PerR-Zn-H37A nor PerR-Zn-H91A binds DNA. These results obtained with the mutated proteins suggest that either PerR-Zn-ox may not be able to bind the regulatory Mn^{2+} ion or if it does bind the Mn^{2+} ion it would not adopt a conformation suitable to bind DNA. The possibility for PerR-Zn-ox to bind the regulatory metal was thus investigated by performing room temperature EPR experiments.

EPR monitoring of Mn^{2+} binding by PerR-Zn-ox, PerR-Zn-H37A and PerR-Zn-H91A

A 100 µM PerR-Zn-ox solution was incubated in the presence of a variable number of equivalents of $MnCl_2$. The amount of free Mn^{2+} ions in solution was monitored by room-temperature EPR. The EPR spectrum of $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ at room-temperature shows a typical six-line hyperfine pattern. However, when Mn^{2+} ions are bound to a protein, the perturbation of the octahedral ligand field of the bound metal by the protein induces strong zero-field effects that induce a broadening of the EPR signal beyond detection[22]. Therefore, the amplitude of the six-line signal in a protein Mn^{2+} solution can be used to assess the amount of unbound Mn^{2+} and to determine the affinity of the protein for Mn^{2+}. PerR-Zn-ox protein was titrated with increasing equivalents of $MnCl_2$ and these EPR experiments allowed us to evaluate the binding affinities for Mn^{2+} of both oxidized forms of the protein PerR-Zn-H37ox and PerR-Zn-H91ox. The mass spectrometry data indicate that the oxidized protein is a mixture of 10 % of the unoxidized protein, 55 % of PerR-Zn-H37ox and 25 % of PerR-Zn-H91ox (accounting for 80 % of monooxidized protein) and 10 % of a doubly oxidized protein. Since the sites of oxidation were not identified in the latter protein form and it weighed only 10 %, we have assumed that it was not able to bind the metal. The Mn^{2+} affinity of the

unoxidized protein was fixed at the value reported by Lee and Helmann (Kd = 2.8 µM). The data were simulated according to equation **(1)** given in the Methods Section. Three components of the protein able to fix the metal were introduced with the percentage given above and only two dissociation constants were taken as adjustable parameters. As shown in **fig. 7** an excellent fit of the data was obtained that revealed that the two oxidized forms of the protein have drastically different Mn^{2+} affinities. Indeed, the protein oxidized on H37 PerR-Zn-H37ox has an affinity (Kd = 17 µM) six-fold reduced with respect to the unoxidized protein but still significant. Interestingly this affinity is very similar to that independently measured for the PerR-Zn-H37A mutant protein (Kd = 15 µM). It is therefore likely that the two proteins bind the Mn^{2+} ion in the regulatory site that now includes only four ligands H91, H93, D85 and D104, thereby leading to a reduced affinity. By contrast, the protein oxidized on H91 (PerR-Zn-H91ox) has a very low Mn^{2+} affinity (Kd $\geq$ 470 µM) that is probably not physiologically significant. We can not exclude that the observed binding is unspecific and not in the regulatory site. Interestingly, the PerR-Zn-H91A mutant exhibits an intermediate affinity for the Mn^{2+} ion (Kd = 120 µM). This result indicates that the mutation of the H91 residue strongly destabilizes the regulatory site of PerR, probably because of its internal position in between D85 and H93. But the effect of histidine oxidation is even more drastic and almost abolishes the binding affinity, most probably causing metal release in physiological conditions.

Discussion

Bacillus subtilis PerR has been shown recently to sense H_2O_2 by a new mechanism that does not rely on cysteine-disulfide exchange. Indeed PerR oxidation by H_2O_2 leads to the rapid incorporation of one oxygen atom into either H37 or H91 residues that are supposed to bind the regulatory metal Fe^{2+}. Lee and Helmann proposed that a metal-catalyzed histidine oxidation was taking place in the reaction of PerR with H_2O_2 and accounted for the ability of PerR to detect hydrogen peroxide[9]. This mechanism would rely on the production of a hydroxyl radical through the Fenton reaction. Similar formation of 2-oxo-histidine has been reported in the inactivation of Cu,Zn-SOD and in metal-catalyzed oxidations of histidine-containing enzymes and model peptides[14-16]. Nevertheless, the reaction of histidine with hydroxyl radicals is complex and all the oxidation products have not been fully characterized[23]. In the case of PerR, the exact position of the added oxygen atom was not determined.

As previously reported PerR is highly susceptible to oxidation during sample preparation and the extent of oxidation is poorly reproducible[9,10,12]. Moreover, the presence of EDTA is a key parameter that dictates the final oxidation state of the protein[9,12]. In order to structurally characterize the oxidized form of PerR and to clearly identify the 2-oxo-histidine modified residue, we devised a reproducible protocol for the preparation of PerR that leads to the singly oxygenated protein. Interestingly, we observed that when the cells were grown in minimal medium, the oxidation state of PerR was related to the presence of added iron during the cell culture. Indeed, the presence of 50 µM Fe^{3+} in the culture media leads upon purification in buffers containing 10 mM EDTA to a singly oxygenated PerR protein. Since 10 mM EDTA strongly reduces the oxidation of PerR during the purification step[9,12], these results suggest that PerR is highly susceptible to *in vivo* oxidation during its overexpression. ESI mass spectrometry analysis of several PerR-Zn-ox samples indicated that the latter expression and purification procedure leads mostly and reproducibly to an oxidized PerR protein that has added a single oxygen atom.

We were able to definitely identify 2-oxo-histidine as the product of this oxygenation by combining amino acid analyses and X-ray crystallography. HPLC coupled to tandem mass spectrometry experiments, using a synthesized standard of 2-oxo-histidine, clearly showed that metal-catalyzed oxidation of histidine in PerR leads to the formation of a 2-oxo-histidine. Moreover by this technique, we were able to accurately quantitate this oxidation and we found that on average a single histidine is oxidized among the 10 present in PerR. This definitely shows that PerR inactivation is a single event. Combined MALDI-TOF and tandem ESI-MS mass spectrometry analyses of PerR-Zn-ox digestion indicated that the oxygen atom is distributed between two residues with a favoured oxidation of H37 (55 %) (**Figs. 2, S2**) over H91 (25 %) (**Figs. 2, 3**). The crystal structure of PerR-Zn-ox is consistent with the mass spectrometry data. Careful examination of the electron density maps points out the presence of a 2-oxo-histidine residue on position 37 of PerR-Zn-ox. However, it failed to reveal oxidation of histidine H91. This is probably due to the combination of the low oxidation level of this site (25 %) and the limited resolution of the crystal structure.

As mentioned above iron release from oxidized PerR has been proposed as a major event leading to dissociation of the PerR–DNA complex and derepression of PerR regulon. EMSA experiments (**Fig. 6**) demonstrate that, in presence of excess Mn^{2+}, the metallated PerR-Zn-ox protein was not able to bind DNA. The observed residual DNA binding (**Fig. 6b**) can be accounted for by the low extent of unoxidized PerR protein in the sample. This observation leads to conclude that neither of the two oxidized forms PerR-Zn-H37ox and

PerR-Zn-H91ox can bind DNA, albeit one of them PerR-Zn-H37ox is able to bind the Mn^{2+} ion. Indeed, our EPR experiments showed that PerR-Zn-H37ox has a significant affinity for Mn^{2+} (Kd = 17 µM). While this affinity is reduced with respect to that of the unoxidized protein (Kd = 2.8 µM), it still warrants that PerR-Zn-H37ox is metallated in the EMSA conditions ([Mn^{2+}] = 500 µM, [PerR-Zn-H37ox] varying from 0 to 200 nM). Interestingly, the mutant PerR-Zn-H37A has a Mn^{2+} affinity (Kd = 15 µM) very similar to that of PerR-Zn-H37ox. This indicates that both proteins may bind Mn^{2+} at the same site. The significant affinity for the metal ion suggests that this binding occurs at a specific site and the most logical candidate is the altered regulatory site that still possesses four ligands: D85, H91, H93 and D104. The reduced number of ligands may account for the reduced affinity with respect to the unoxidized protein. As a consequence the failure of PerR-Zn-H37ox (and PerR-Zn-H37A) to bind DNA must be linked to the fact that H37 is unable to coordinate the metal. In this respect, it is worth noting that among the five residues of the regulatory site, four (D85, H91, H93 and D104) belong to the C-terminus whereas H37 belongs to the N-terminal domain of PerR that contains the DNA binding motif. Binding of H37 to the regulatory metal induces a drastic reorientation of the two domains that allows the interaction with the DNA. Therefore H37 plays a key role in stabilizing PerR active form. As a consequence, oxidation of H37 may cause its dissociation from the regulatory metal. This would induce a conformational change of the protein that would lose its ability to bind DNA. Since PerR-Zn-H37ox is still able to bind the regulatory metal (albeit with reduced affinity in comparison to PerR-Zn-apo) but no longer able to bind DNA, these data are consistent with the observed disparity between loss of DNA binding and loss of Fe^{2+} reported by Lee and Helmann[9].

Oxidation of H91 might not be as dramatic. Indeed, PerR by providing four ligands would still bind the regulatory metal, albeit with a lower affinity. However, our EPR experiments showed that oxidation of H91 significantly reduces Mn^{2+} binding. A similar effect, although less pronounced, is observed in the PerR-Zn-H91A mutant. It is therefore reasonable to think that the impossibility of PerR-Zn-H91ox to bind DNA is due to its incapacity to bind the metal, even present in the high concentrations of the EMSA experiments. With an empty regulatory site, PerR does not adopt a conformation suitable to bind the DNA. As a consequence, while oxidations of H37 and H91 both abolish DNA binding, they may not achieve it by the same manner: loss of H37 coordination or loss of metal, respectively.

A further point worth discussing is the unreactivity of H93. Indeed Lee and Helmann[9] have shown that this residue was not oxidized and neither our crystallography or our mass

spectrometry studies provided evidence of its reactivity. There is no obvious chemical rationale to explain H93 insensitivity to H_2O_2. But this could be explained easily on structural grounds. Indeed the five residues identified as potential ligands of the regulatory site may constitute a square pyramidal environment of the metal in which H93 occupies the apical position. In such a case H93 would be in the trans position with respect to the incoming H_2O_2 molecule, whereas H37 and H91 would be in cis positions. These different positions of the various histidine ligands within the coordination sphere of the iron would immediately rationalize their observed respective (un)reactivity.

In summary, we have provided definite evidences for the formation of 2-oxo-histidine in the oxidative inactivation of PerR and shown that it is a single oxidative event. Furthermore, we solved the structure of the oxidized PerR-Zn-ox protein which is the first X-ray structure of a protein possessing a 2-oxo-histidine. In addition, we provided a complete analysis of the binding of Mn^{2+} to the regulatory site of PerR-Zn-ox. It revealed that the site of oxidation (H37 vs H91) influences the metal binding properties of the oxidized protein, while leading to the loss of DNA binding. Amino acid oxygenations are observed in many instances and are generally carried out by a few non heme iron enzymes, either as part of their biological function or as self-hydroxylating processes in the absence of substrate[24]. In this respect, a parallel can be drawn between PerR that uses histidine oxygenation as a response to H_2O_2 and the Hypoxia Inducible Factor that uses proline oxygenation to signal hypoxia[25]. In this respect it is worth noting that a new function of PerR in aerotolerance has been recently described[26].

Methods

Expression and purification of PerR-Zn-ox

The *B. subtilis perR* gene was inserted between NdeI and XhoI restriction sites of pET-30c vector (Novagen). After sequence verification of each strand, the plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) competent cells (Stratagene). The cells were grown aerobically at 37 °C in 1 L of Na_2HPO_4/KH_2PO_4 buffered M9 medium containing 9 mM NaCl, 19 mM NH_4Cl, 1 mM $MgSO_4$, 100 µM $CaCl_2$, 100 µM $MnCl_2$, 50 µM $ZnSO_4$, 50 µM $FeCl_3$, 4 g/L glucose, 1 mg/L pyridoxine-HCl, 1 mg/L folic acid, 1 mg/L choline chloride, 1 mg/L niacinamide, 1 mg/L D-biotin, 1 mg/L D-pantothenic acid, 0.1 mg/L (-)-riboflavin, 5 mg/L thiamine-HCl and 50 µg/mL Kanamycin, until 0.5 OD at 600 nm. Production of PerR-Zn-ox protein was then induced by adding 1 mM IPTG, followed by 3 h incubation at 37 °C. Cultures were then centrifuged at 7000 g for 10 min. From this point, all steps were performed at 4°C. Cells were resuspended in 30 mL of 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM NaCl, 10 mM EDTA (buffer A) prior to sonication. The cell lysate was then centrifuged for 30 min at 35000 g. The resulting supernatant was directly loaded onto a Hiload 16/10 Q sepharose High Performance column (GE Healthcare). Proteins were eluted with a linear gradient of 0.02-1 M NaCl in buffer A. The fractions containing PerR-Zn-ox were pooled and concentrated by ammonium sulfate precipitation (80%) at 4°C overnight. After centrifugation at 25000 g for 45 min, the pellet was resuspended in a 4 mL solution of chelex-100 (Bio-Rad) treated 100 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl and subjected to gel filtration using a Superdex-75 column (GE Healthcare). The fractions containing the dimeric protein were then collected and stored at -80°C. The concentration of PerR-Zn-ox was calculated using an extinction coefficient of 9020 M^{-1} cm^{-1} at 277 nm.

PerR-Zn-H37A and PerR-Zn-H91A mutated proteins have been produced by using the pET-30c-*perR* plasmid and the QuickChange II Site-Directed mutagenesis Kit (Stratagene) according to the supplier procedure. The following oligonucleotides: 5'-CTCGTTAACTCTATGGCTGCTCCAACAGCGGACG and 5'-CGATTTTGTCACATCCGATGCCTATCACGCGATTTGCG, together with their corresponding complementary stands were used for PerR-Zn-H37A and PerR-Zn-H91A, respectively. After sequence verification of each strand, the plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) competent cells (Stratagene). The cells were grown aerobically at 37 °C in 1 L of LB medium, containing 50 µg/mL Kanamycin, until 0.6 OD at 600 nm. Protein

production was then induced by adding 1 mM IPTG, followed by 3 h incubation at 37 °C. From this point the purification protocol is similar to that described above for PerR-Zn-ox.

Mass spectrometry analysis of the PerR-Zn-ox protein

Electrospray ionization mass spectrometry was used to monitor protein oxidation using a Q-TOF Micro (Micromass, Manchester, UK). It operated with a needle voltage of 3000V and sample and extraction cone voltages of 60 and 0.2V. For standard acidic denaturing conditions, the proteins were diluted to 1 µM in a 0.2% formic acid solution, and desalted for 5 min with a protein C4-MicroTrap cartridge (Michrom Biosresources, Auburn, CA). The proteins were then eluted on a Poroshell 300SB-C8 column (Agilent technologies, CA). Mass spectra were recorded in the 500-1600 mass-to-charge (m/z) range. The spectra were acquired and the data processed by using MassLinx 4.0 (Waters). Sites of PerR-Zn-ox oxidation were mapped by endoproteinase LysC or trypsin digestion followed by MALDI-TOF mass spectrometry analysis using an Autoflex mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) in the reflectron mode. Prior to analysis, 9 µL of 0.1 mg/mL PerR-Zn-ox in buffer A were incubated either with 1 µL of 0.1 mg/mL endoproteinase LysC (Roche Applied Science) or 1 µl of 10 µg/mL of trypsin (Sigma-Aldrich) at 37 °C for 15 h. Lysats were then diluted to 0.5 µM with the matrix solvent (H_2O_2/acetonitrile/formic acid: 50/50/0.2). A volume of 0.5 µL of the sample was then mixed with an equal volume of matrix (α-Cyano-4-hydroxy cinnamic acid) on the target plate and allowed to air dry. Tryptic peptides were further analyzed by positive ion ESI LC/MS/MS on a triple-quadrupole (Qq linear ion trap) mass spectrometer (QTRAP 4000; Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) to identify the sites of oxidation on T1 and T2. Peptide separation was performed on a Dionex Dual nanoflow system. Injected samples (6µl) were first trapped and desalted isocratically on a PepMap µC_{18} precolumn cartridge 65mm (300µm id, 5µm and 100 Å, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Chromatographic separation was accomplished by loading 0.15 µg peptide mixture onto a 15 cm fused silica C_{18} column (75 µm id, 3 µm, 100 Å and 360 µm od; Dionex) using an autosampler. Peptide elution was achieved using the following linear gradient: (i) from 10% to 40% solvent B [ACN/Water 90/10 (v/v) containing 0.1% FA] for 40 min, (ii) from 40% to 90% solvent B for 5 min, (iii) the remaining percentage of the elution solvent is made of solvent A [Water/ACN 95/5 (v/v) containing 0.1% FA]. The mass spectrometer instrument was set up to cycle through one full-scan mass spectrum enhanced MS (EMS), with Q0 trapping activated. For the EMS scan, masses between 400 and 1,400 amus were scanned at a scan rate of 1,000 amus per cycle. In order to determine the charge state, Enhanced

Resolution mode (ER) was scanning at 250 Da/s and the ion of interest was selected in Q1. Charge state determination up to four was possible. MS/MS spectra of the 3 most intense peaks with two to four charges in the MS scan were automatically acquired in information-dependent acquisition with previously selected peaks excluded for 60 sec. Specific instrument settings were as follows: ESI = 2100, DP = 85, EP = 10, Curtain gas (CUR) = 100, CAD gas = 4, Interface Heater Temperature (IHT) = 150°C. Experimentally derived mass spectrometric datasets were evaluated by database searches using the MASCOT™ (Version 2.2, Matrix Science, London, UK) search algorithm. Peak lists were generated by Analyst 1.4 (QTRAP 4000) software plug-ins (mascot.dll; Matrix Science).

Detection and quantification of the 2-oxo-histidine residue by HPLC-MS/MS

A pure standard of 2-oxo-histidine was synthesized and purified following the initial protocol described by Uchida and Kawakishi[15] and the modifications reported by Lewish and Levine[20]. The 2-oxo-histidine sample was then calibrated by using NMR with a calibrated solution of THF. Electrospray ionisation tandem mass spectrometry experiments were carried out on a API3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems) in the positive ionisation mode using a turbo spray ion source. Analyst software version 1.4 was used for data acquisition. The ionisation voltage used was 5500 V and the turbospray source was set at 500°C. Two transitions were monitored (dwell time 400 ms) for the detection of 2-oxo-histidine (172.1→126.1) and histidine (156.1→110.1) using a collision energy of 19 and 21 eV, respectively. 1 nmol of PerR-Zn-ox was hydrolyzed during 24h at 105 °C in the presence of a 6M solution of HCl and 40 mM DTT. The sample was then dried under vacuum and re-suspended in 100 µl of a 0.1 % TFA solution. Amino acids separation of acid hydrolysed protein samples was achieved using a 100 x 2.1 mm I.D. 5 µm Hypercarb column (Thermo) using a linear gradient of CH_3CN (from 0 up to 40 % in 15 min) in 0.1 % TFA. Under these conditions, histidine and 2-oxo-histidine were found to be eluted at 4.3 and 7.2 min, respectively.

DNA binding of PerR-Zn-apo and PerR-Zn-ox

200 pM of a 33 bp labelled DNA duplex was incubated with either PerR-Zn-apo, PerR-Zn-ox, PerR-Zn-H37A or PerR-Zn-H91A in the presence of 500 µM $MnCl_2$. EMSA experiments were performed with Chelex-100 treated buffers (storage, binding and electrophoresis buffers). One strand of the 33 bp oligonucleotide duplex (Sigma Genosys) containing the PerR box from the *mrgA* promoter was initially ^{32}P-5'-end labelled using [γ-^{32}P]-ATP and T4-

PNK (GE Healthcare). Annealing of both complementary strands was performed in 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl ; 0,05% triton X-100, by heating at 85 °C for 15 min followed by slow cooling to 20 °C. To ensure the duplex formation, the labelled single strand and the duplex were loaded on a native gel. Binding reactions were carried out for 15 min at 20°C in 16 µL of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 0.05% triton X-100 that contained 0.2 nM duplex DNA and the indicated protein concentations concentrations. The samples were then subjected to electrophoresis on a 15% polyacrylamide, Tris-acetate pH 8.5 gel, for 75 min at 150 V and 4 °C. The gel was then exposed on a phosphorimaging screen, visualized using a Molecular Imager FX and analyzed using Quantity One software (Bio-Rad).

Room temperature EPR analysis of Mn^{2+} binding

A 20 µL sample of 100 µM PerR-Zn-apo or PerR-Zn-ox in 100 mM Tris-HCl pH8, 250 mM NaCl chelex-100 treated buffer was titrated with a 10 µL aqueous solution of $MnCl_2$ up to 4 equivalents. Spectra of 0-4 equivalents of a 10 µL aqueous solution of $MnCl_2$ with 20 µL of the same buffer were recorded on a Bruker EMX spectrometer under non saturated conditions. Measurements of the peak-to-trough height of the first and last Mn-hyperfine lines of all these spectra allowed to draw a calibration curve of the $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ signal intensity versus the Mn^{2+} concentration. The $MnCl_2$ containing protein samples were incubated at 20°C for 10 min prior room temperature EPR analysis. All spectra were recorded at 9.4 GHz, using a microwave power of 10 mW and a modulation amplitude of 10 G. The background signal, obtained for the buffer in the absence of $MnCl_2$ and protein, was systematically subtracted. Uncertainty in the concentration of solvated Mn^{2+} can be estimated to ±2 µM. We assume that the protein exists under different components able to fix the metal in a 1:1 ratio with different affinities. For the ith component, with starting concentration $c^0(P_i)$, the dissociative constant $K_{d(i)}$ is defined by:

$$K_{d(i)} = \frac{|P_i||Mn|}{|P_i - Mn|}$$

where $|Mn|$ stands for the concentration in solvated Mn^{2+} (namely $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$) and $|P_i - Mn|$ and $|P_i|$ for the concentration in the metalated and non metalated forms of ith component of the protein, respectively. One thus may write:

$$c^0(P_i) = |P_i| + |P_i - Mn| = |P_i - Mn|\left\{\frac{K_{d(i)}}{|Mn|} + 1\right\}$$

which gives

$$|P_i - Mn| = c^0(P_i)\left\{\frac{|Mn|}{|Mn| + K_{d(i)}}\right\}$$

The Mn^{2+} ion, initialy introduced at concentration $c^0(Mn)$, exists in one solvated form with concentration $|Mn|$ and several bounded forms. This can be summarized in the following equation:

$$c^0(Mn) = |Mn| + \sum_i |P_i - Mn|$$

One thus may deduce the following relation:

$$c^0(Mn) = |Mn| + \sum_i c^0(P_i)\left\{\frac{|Mn|}{|Mn| + K_{d(i)}}\right\} \qquad \textbf{(1)}$$

To reproduce the variations of the solvated Mn^{2+} concentration as a function of the starting Mn^{2+} concentration, one has to find the zero of this last equation. No analytical solution exists when two or more different components of the protein coexist. Consequently, only numerical solutions can be obtained that where determined by dichotomy.

Crystallization and structure determination of PerR-Zn-ox

Screening of crystallization conditions have been performed with a Tecan robot using various commercial screens from Hampton Research and Qiagen. After optimization of the first detected conditions, well diffracting crystals of PerR-Zn-ox were obtained in PEG 3350 20 %, NaCl 0.5 M, Tris-HCl pH 8.5. For data collection, crystals were transferred into a solution composed of the mother liquor plus 25 % of glycerol as cryoprotectant. The crystals were fished and frozen in liquid nitrogen inside loops mounted on 18 mm stainless steel microtubes. Finally, the crystals were transferred to the CATS sample changer[27] available on FIP-BM30A at the ESRF[28]. All the crystals were tested by X-rays and the data have been collected on the best one. The PerR-Zn-ox space group is triclinic with the following cell dimension: a = 41.3 Å, b = 42.2 Å, c = 53.3 Å, α = 82.2°, β = 80.1°, γ = 60.9°. Diffraction data were processed with XDS[29]. We first tried to solve the structure of PerR-Zn-ox by molecular replacement using PHASER[30] with the PerR-Zn-apo structure as a starting model (PDB ID: 2FE3). The latter method allowed us to solve the structure of PerR-Zn-ox. The outputs of the molecular replacement were then refined using REFMAC[31]. Building of the model including the 2-oxo-histidine residue was performed with COOT[32]. Since, no library of the 2-oxo-histidine was available in databases, we have created a specific library for the

refinement of the 2-oxo-histidine residue by using the Monomer Library Sketcher tool from the CCP4 suite[31]. The atomic co-ordinates and structure factors for PerR-Zn-ox have been deposited into the PDB under the accession number 2RGV.

Acknowledgments

We thank Olivier Sénèque for the calibration of the 2-oxo-histidine standard solution by NMR and Christine Saint-Pierre for mass spectrometry measurements at the initial stage of this work.

References

1. Storz, G. & Imlay, J.A. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 188-194 (1999).
2. Toledano, M.B., Delaunay, A., Monceau, L. & Tacnet, F. Microbial H_2O_2 sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 351-357 (2004).
3. Mongkolsuk, S. & Helmann, J.D. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.* **45**, 9-15 (2002).
4. Paget, M.S. & Buttner, M.J. Thiol-based regulatory switches. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 91-121 (2003).
5. Zheng, M., Aslund, F. & Storz, G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**, 1718-1721 (1998).
6. Choi, H. et al. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**, 103-113 (2001).
7. Toledano, M.B. & D'Autréaux, B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 813-824 (2007).
8. Lee, J.W., Soonsanga, S. & Helmann, J.D. A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 8743-8748 (2007).
9. Lee, J.W. & Helmann, J.D. The PerR transcription factor senses H_2O_2 by metal-catalyzed histidine oxidation. *Nature* **440**, 363-367 (2006).
10. Herbig, A.F. & Helmann, J.D. Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.* **41**, 849-859 (2001).
11. Traoré, D.A.K. et al. Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1211-1219 (2006).
12. Lee, J.W. & Helmann, J.D. Biochemical Characterization of the Structural Zn^{2+} Site in the *Bacillus subtilis* Peroxide Sensor PerR. *J. Biol. Chem.* **281**, 23567-23578 (2006).
13. Fuangthong, M., Herbig, A.F., Bsat, N. & Helmann, J.D. Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bacteriol.* **184**, 3276-86 (2002).
14. Schoneich, C. Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 1093-1097 (2000).
15. Uchida, K. & Kawakishi, S. Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H_2O_2. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. *J. Biol. Chem.* **269**, 2405-2410 (1994).
16. Uchida, K. & Kawakishi, S. 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett.* **332**, 208-210 (1993).
17. Meister Winter, G.E. & Butler, A. Inactivation of vanadium bromoperoxidase: formation of 2-oxohistidine. *Biochemistry* **35**, 11805-11811 (1996).
18. Schoneich, C. & Williams, T.D. Cu(II)-catalyzed oxidation of beta-amyloid peptide targets His13 and His14 over His6: Detection of 2-Oxo-histidine by HPLC-MS/MS. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 717-722 (2002).

19. Hovorka, S.W., Biesiada, H., Williams, T.D., Hühmer, A. & Schoneich, C. High sensitivity of Zn^{2+} insulin to metal-catalyzed oxidation: detection of 2-oxo-histidine by tandem mass spectrometry. *Pharm. Res.* **19**, 530-537 (2002).
20. Lewisch, S.A. & Levine, R.L. Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis. *Anal. Biochem.* **231**, 440-446 (1995).
21. Piraud, M. et al. Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 1587-1602 (2005).
22. Reed, G.H. & Cohn, M. Electron paramagnetic resonance spectra of manganese (II)-protein complexes. Manganese (II)-concanavalin A. *J. Biol. Chem.* **245**, 662-664 (1970).
23. Xu, G. & Chance, M.R. Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chem. Rev.* **107**, 3514-3543 (2007).
24. Farquhar, E.R., Koehntop, K.D., Emerson, J.P. & Que, L.J. Post-translational self-hydroxylation: a probe for oxygen activation mechanisms in non-heme iron enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 230-239 (2005).
25. Schofield, C.J. & Ratcliffe, P.J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 343-354 (2004).
26. Hillmann, F., Fischer, R.J., Saint-Prix, F., Girbal, L. & Bahl, H. PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe Clostridium acetobutylicum. *Mol. Microbiol.* **68**, 848-860 (2008).
27. Ohana, J. et al. CATS: a Cryogenic Automated Transfer System installed on the beamline FIP at ESRF. *J. Appl. Cryst.* **37**, 72-77 (2004).
28. Roth, M. et al. FIP: a highly automated beamline for multiwavelength anomalous diffraction experiments. *Acta Cryst.* **D58**, 805-814 (2002).
29. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800 (1993).
30. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C. & Read, R.J. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Cryst.* **D61**, 458-464 (2005).
31. Collaborative Computational Project, N. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763 (1994).
32. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132 (2004).

Figure legends

Figure 1. Electrospray mass spectrometry analysis of PerR. PerR over-expressed in minimal medium with 50 µM Fe^{2+} and purified in the presence of 10 mM EDTA mostly contains one additional oxygen atom (I: PerR-Zn-ox). 10% of both the unoxidized protein (II: PerR-Zn-apo) and the over-oxidized PerR that contains two additional oxygens (III) are also obtained. The presented data is based on deconvoluted ESI analysis.

Figure 2. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of PerR-Zn-ox**.** Spectrum for the endoproteinase LysC digests of PerR-Zn-ox (A, C) and PerR-Zn-apo (B, D). P1 and P2 peptides contain the E15-K45 and E74-K101 residues, respectively.

Figure 3. Identification of H91 oxidation by tandem MS. **a:** Predicted m/z values of b- and y-fragment ions of unmodified T2 peptide (H91 is in red). **b:** Tandem MS spectrum of [T2 + 16] fragment. The parent ion $[T2 + 16 + 2H]^{2+}$ = 1051.8 is indicated with an asterix (*). b- and y-fragment ions are shown in blue and red, respectively.

Figure 4. a: Ribbon representation of the PerR-Zn-ox and PerR-Zn-apo crystal structures. Superposition of the global dimer structures of PerR-Zn-apo (orange) and PerR-Zn-ox (blue). **b**: Stick representation of H37 with the corresponding density maps and highlight of the 2-oxo-histidine by density map analysis. The histidine residue was used prior to map calculation in PerR-Zn-ox **(left)**. The histidine residue was replaced by the 2-oxo-histidine prior to map calculation in PerR-Zn-ox **(middle)** and PerR-Zn-apo **(right)**. The 2Fo-Fc map contoured at 1.0 σ is blue and the Fo-Fc map contoured at 2.5 σ is green for positive density or red for negative density.

Figure 5. HPLC-MS/MS analysis of the 2-oxo-histidine/histidine ratio for the completely hydrolyzed PerR-Zn-apo and PerR-Zn-ox proteins.

Figure 6. DNA binding affinity of PerR-Zn-apo, PerR-Zn-ox, PerR-Zn-H37A and PerR-Zn-H91A in the presence of Mn^{2+}. EMSA experiments were carried out with 0, 200 pM, 1 nM, 2 nM, 4 nM, 20 nM and 200 nM (lanes 1-7) of PerR-Zn-apo **(a)**, PerR-Zn-ox **(b)**, PerR-Zn-H37A **(c)** or PerR-Zn-H91A **(d)**.

Figure 7. Room temperature EPR analysis of the Mn^{2+} binding by PerR-Zn-ox. Experimental (black points) and theoretical (solid line) variations of the concentration in solvated Mn^{2+} ions as deduced from EPR studies as a function of the starting concentration in Mn^{2+} ions for a 100 µM PerR-Zn-ox solution. The theoretical curve was drawn according to equation **(1)** based on 10% of unoxidized protein, 55% of PerR-Zn-H37ox and 25% of PerR-Zn-H91ox with 2.8, 17 and 470 µM Kd values, respectively. 10% of the protein, corresponding to a doubly oxidized form was assumed to be non metallated.

Figure 1 Duarte

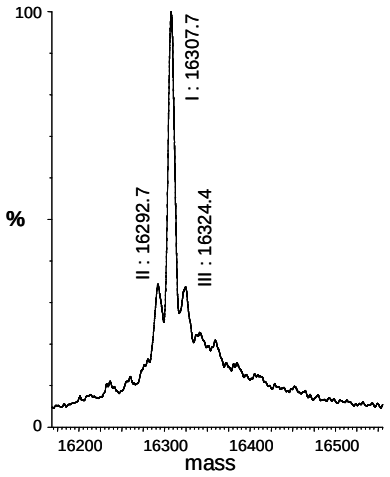


Figure 2 Duarte

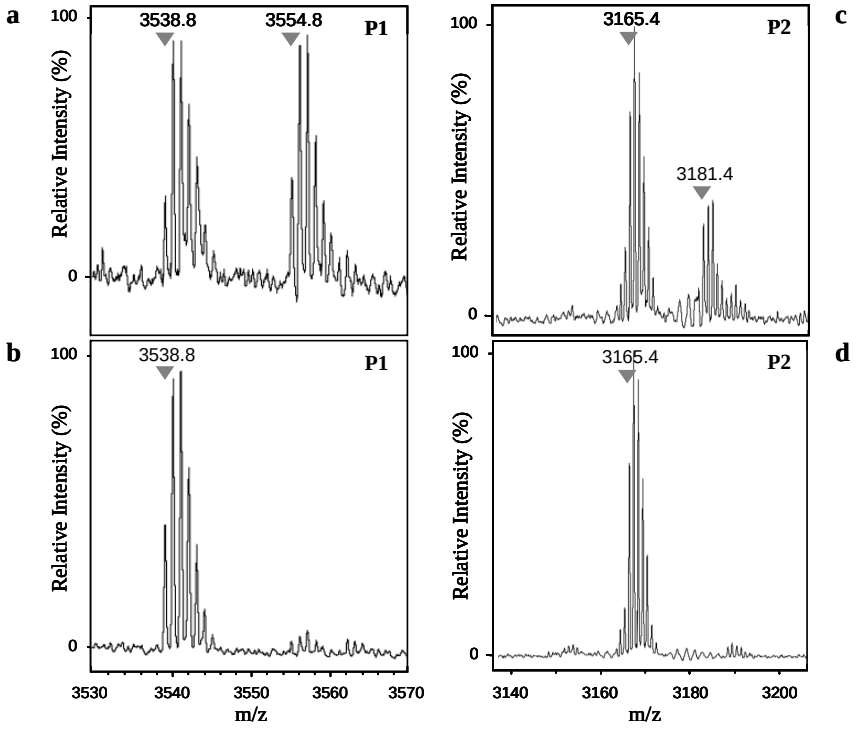


Figure 3 Duarte

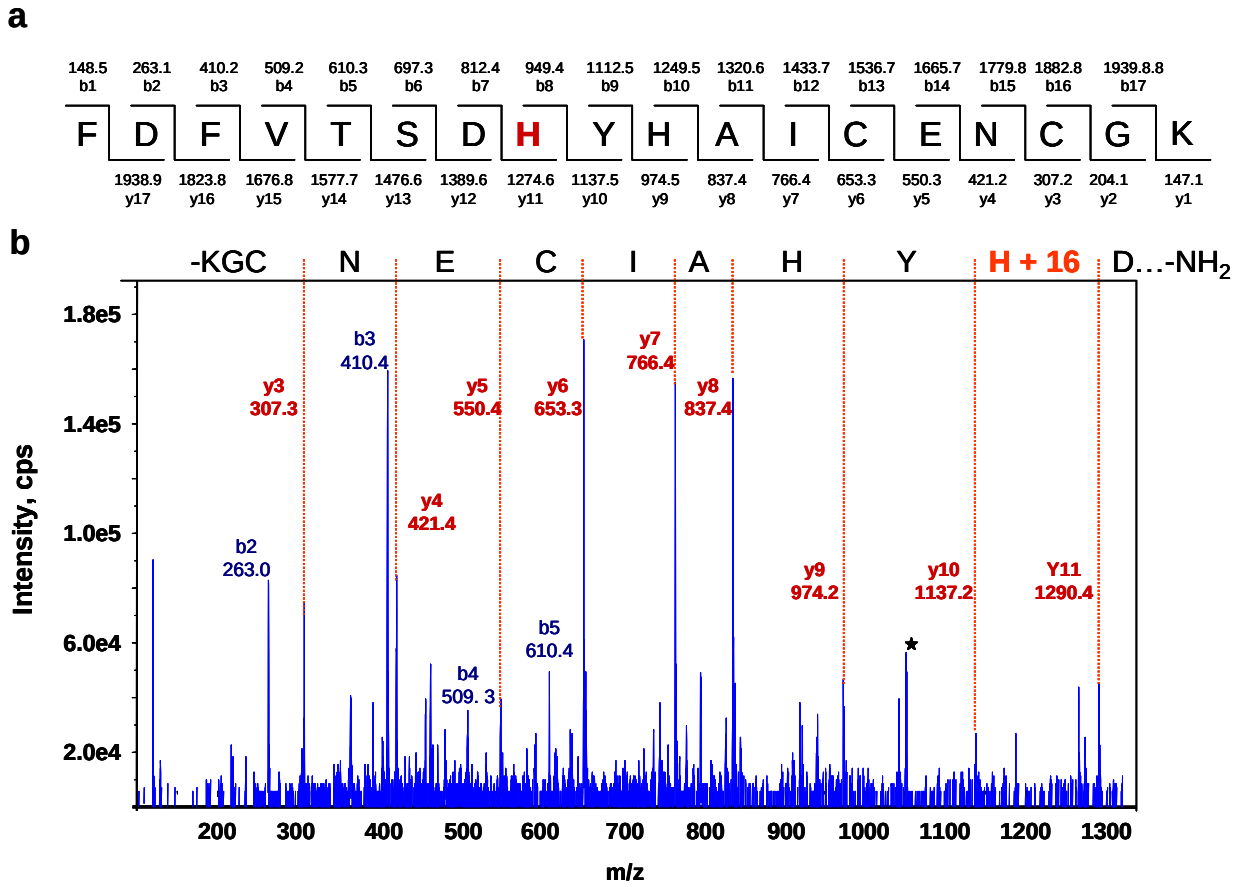


Figure 4 Duarte

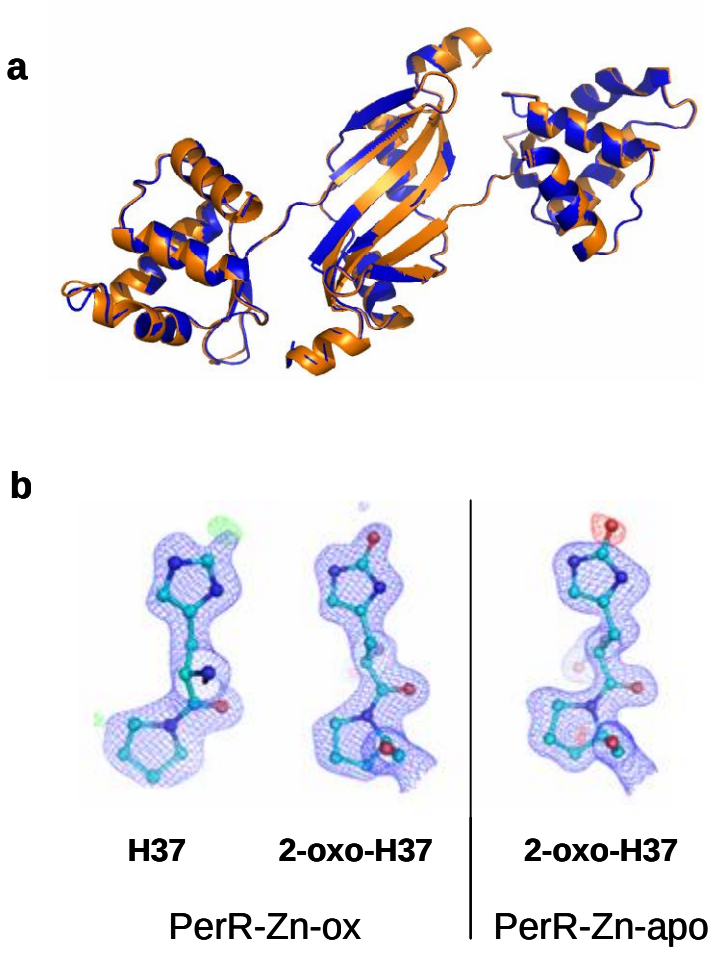


Figure 5 Duarte

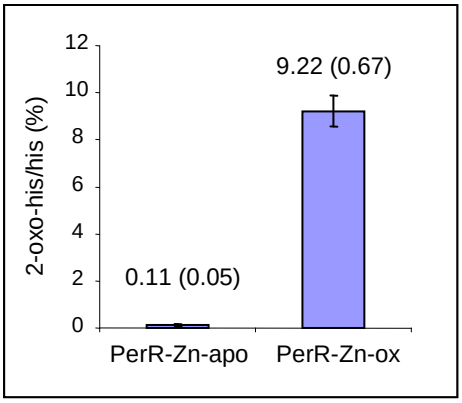


Figure 6 Duarte

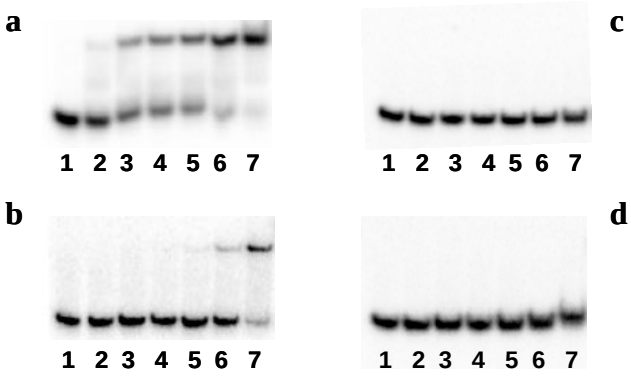
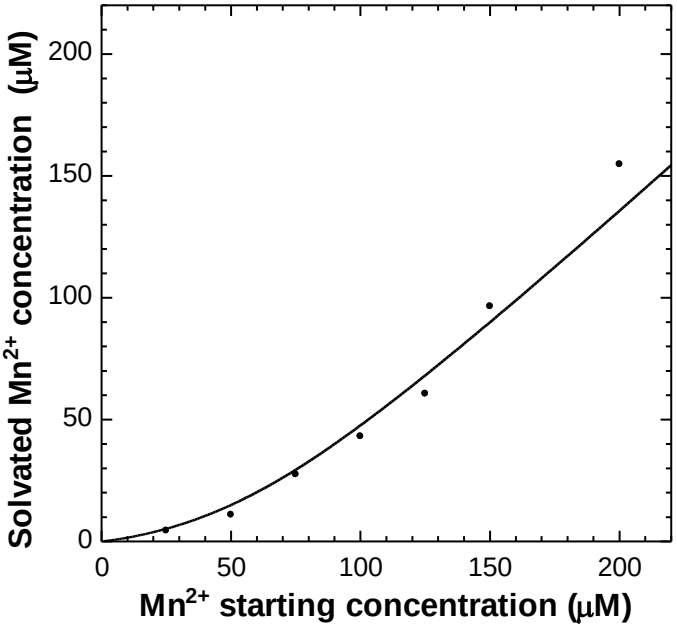


Figure 7 Duarte



Supplementary Figures for :

Unambiguous identification of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein by X-ray crystallography and mass spectrometry

By Daouda A. K. Traoré, *et al.*,

Supplementary Figure 1. MALDI-TOF MS analysis of oxidized PerR after LysC digestion. a: LysC fragments of PerR-Zn-ox. Calculated monoisotopic m/z values are shown for fragments with m/z > 1000. H37 and H91/H93 containing P1 and P2 peptides, respectively are in red. **b:** MALDI-TOF spectrum of LysC digested PerR-Zn-ox. P1 and P2 peptides, which present a 16 Da mass increment, are indicated. The peak with an asterix (*****) at m/z = 2116.1 corresponds to the V125-K142 fragment with a missed cleavage at K141 (calculated m/z = 2116.04).

Supplementary Figure 2. Identification of H37 oxidation by tandem MS.
a: Tryptic fragments of PerR-Zn-ox. Calculated monoisotopic m/z values are indicated for H37 and H91/H93 containing T1 and T2 peptides, respectively. **b:** Predicted m/z values of b- and y-fragment ions of unmodified T1 peptide (H37 is in red). **c:** Tandem MS spectrum of [T1 + 16] fragment. The parent ion $[T1 + 16 + 2H]^{2+}$ = 1208.9 is indicated with an asterix (*). b- and y-fragment ions are shown in blue and red, respectively. Analysis of the y ion serie indicates that H37 is the site of oxidation in T1. The y ions that do not contain H37 (y2 to y8) appear at the predicted m/z value. In contrast the y9 to y12 ions present a 16 Da m/z increment in comparison to the unmodified peptide.

Supplementary Figure 3. Room temperature EPR analysis of the Mn^{2+} binding by PerR-Zn-H37A and PerR-Zn-H91A. Experimental (black points) and theoretical (solid lines) variations of the concentration in solvated Mn^{2+} ions as deduced from EPR studies as a function of the starting concentration in Mn^{2+} ions for a 100 µM PerR-Zn-H37A (left) or a 200 µM PerR-Zn-H91A (right) solution. The theoretical curves were drawn according to equation **(2)** with K_d = 15 µM or 120 µM for the H37A or H91A PerR-Zn mutants, respectively. EPR spectra were recorded under the same conditions as those used for PerR-Zn-ox and analyzed using a similar methodology (see Methods Section). A single component was assumed to constitute the His-Ala mutant samples. This leads to the following expression for the concentration in solvated Mn^{2+} (noted $|Mn|$) as a function of the starting concentration in Mn^{2+}:

$$|Mn| = \frac{1}{2}\left\{c^0(Mn) - c^0(PerR-Zn-HA) - K_d + \sqrt{\Delta}\right\} \quad \textbf{(2)}$$

with $\Delta = \left[c^0(Mn) + c^0(PerR-Zn-HA) + K_d\right]^2 - 4\,c^0(Mn)c^0(PerR-Zn-HA)$

where $c^0(Mn)$ and $c^0(PerR-Zn-HA)$ stand for the starting concentration in Mn^{2+} and His-Ala PerR-Zn mutants, respectively. K_d is the dissociative constant of the metalated form of the PerR-Zn-HA mutant. This expression can indeed be deduced from equation **(1)** given in the Methods Section.

Fig. S1

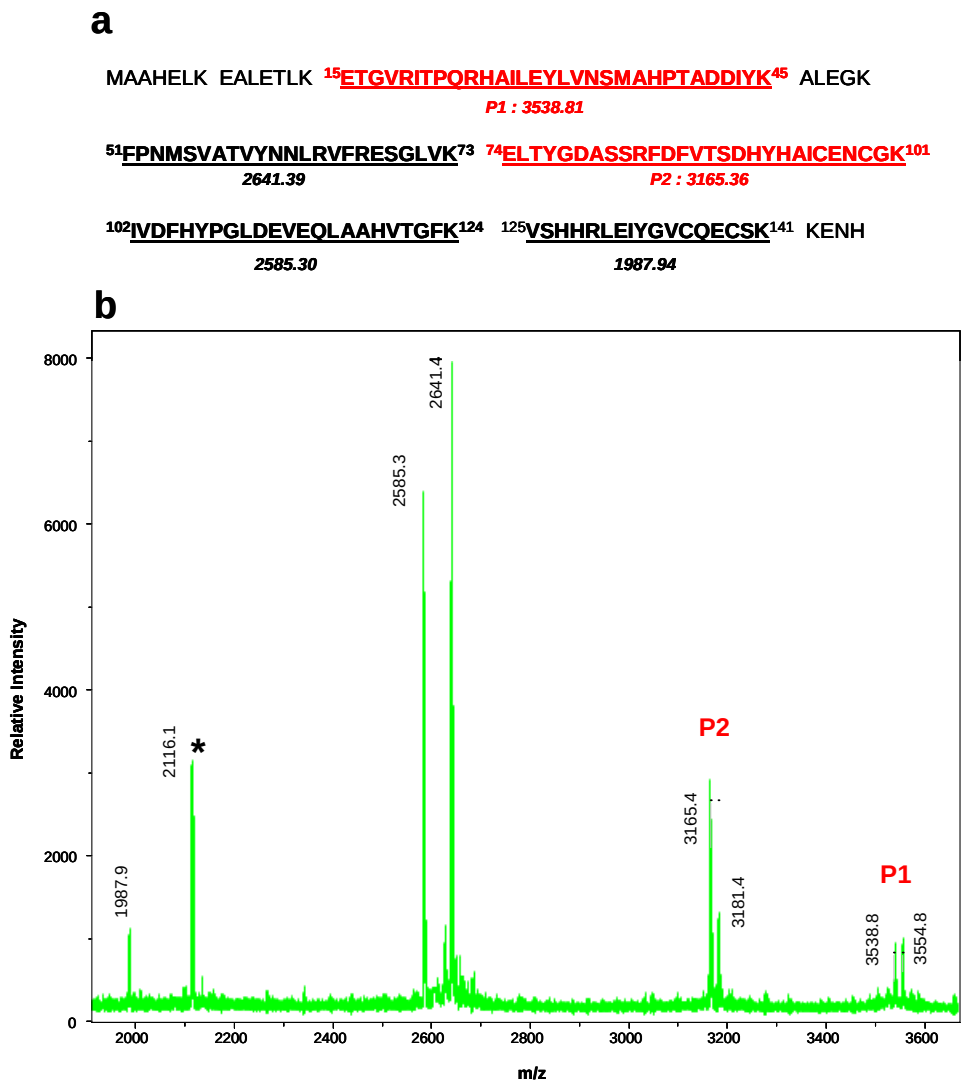

a
MAAHELK EALETLK 15ETGVRITPQRHAILEYLVNSMAHPTADDIYK45 ALEGK
P1 : 3538.81
51FPNMSVATVYNNLRVFRESGLVK73 74ELTYGDASSRFDFVTSDHYHAICENCGK101
2641.39
P2 : 3165.36
102IVDFHYPGLDEVEQLAAHVTGFK124 125VSHHRLEIYGVCQECSK141 KENH
2585.30
1987.94
b
Relative Intensity
m/z
1987.9
2116.1
*
2585.3
2641.4
P2
3165.4
3181.4
P1
3538.8
3554.8

Fig. S2

a

MAAHELK EALETLK ETGVR ITPQR [25]HAILEYLVNSMAHPTADDIYK[45]

T1 : 2401.19

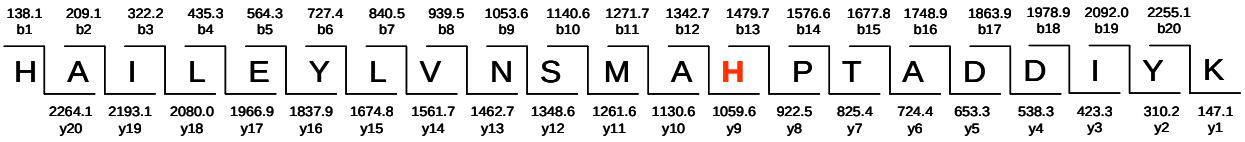
ALEGK [51]FPNMSVATVYNNLR[64] VFR ESGLVK [74]ELTYGDASSR[83]

[84]FDFVTSDHYHAICENCGK[101] [102]IVDFHYPGLDEVEQLAAHVTGFK[124]

T2 : 2085.88

VSHHR [130]LEIYGVCQECSK[141] KENH

b



c

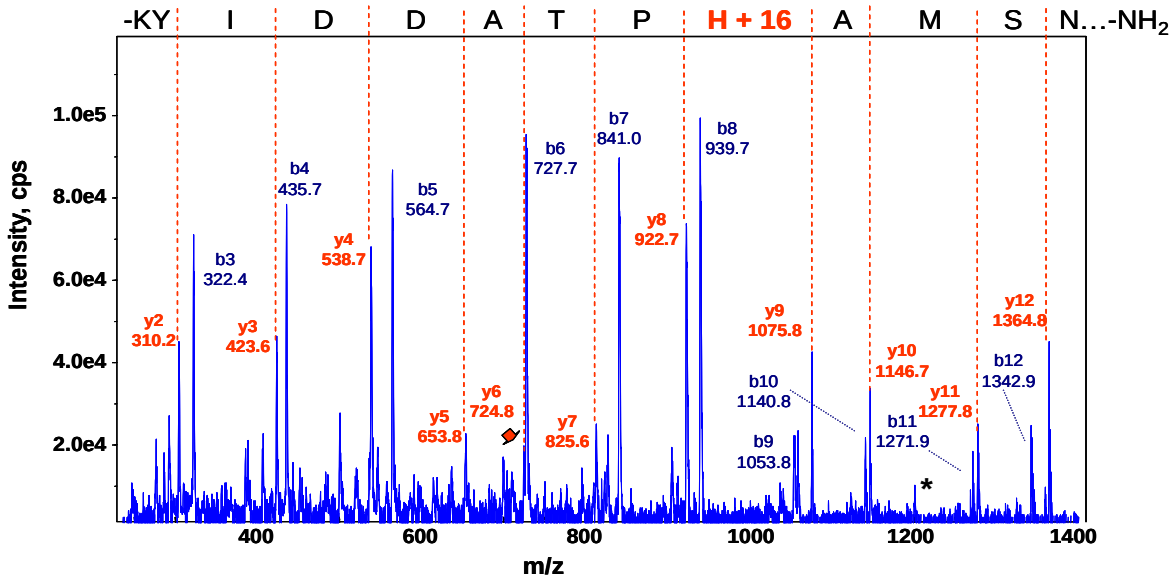
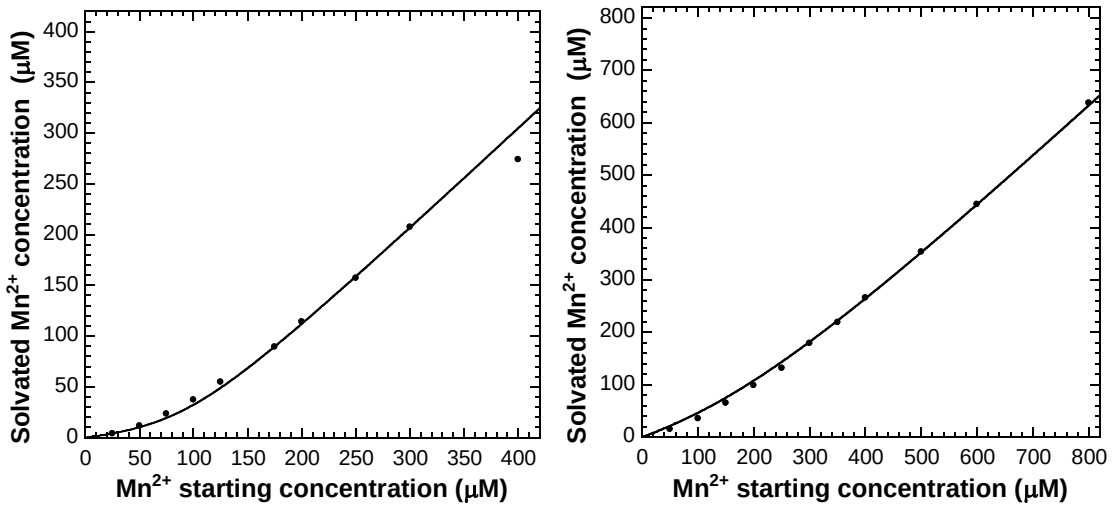


Fig. S3



5.| Discussion

La protéine PerR est un senseur du peroxyde d'hydrogène : son mécanisme original de détection du peroxyde ne fait pas intervenir les cystéines de la protéine. La réaction est centrée sur le métal de régulation (Fe^{2+}). Nos analyses biochimiques et structurales présentées dans l'article ont permis d'identifier clairement la 2-oxo-histidine comme le produit de l'oxydation de la protéine PerR.

La fixation à l'ADN de la protéine (native et oxydée) a été vérifiée par la technique du retard sur gel (ou EMSA pour ElectroMobility Shift Assay). Cette technique repose sur le fait qu'un complexe ADN/protéine migre moins vite dans un gel non-dénaturant que l'ADN libre. Ce retard de migration permet de juger rapidement si la séquence d'ADN a été reconnue par la protéine. La séquence d'ADN utilisée pour ce test contient la PerR-box du gène *mrgA* portant un marquage radioactif (^{32}P) qui permet de révéler le gel par autoradiographie. Les résultats obtenus sont illustrés par Figure V.2.

La Figure V.2-① présente la formation du complexe PerR-Zn-Mn/ADN en fonction de la concentration en protéine. L'ADN est à une concentration de 0,2 nM. La bande retardée correspond au complexe protéine/ADN. Cette expérience nous a permis d'évaluer la constante de dissociation du complexe PerR-Zn-Mn/ADN qui est de l'ordre de 15 nM en présence de 100 µM d'ions Mn^{2+}. La Figure V.2-② montre l'interaction entre PerR-Zn-ox et l'ADN en présence d'ions Mn^{2+}. Dans ce cas, aucune bande retardée n'apparait avant une concentration en protéine supérieure à 20 nM. Ce résultat indique que la protéine PerR-Zn-ox n'est pas capable de lier l'ADN. La bande retardée observée pour une concentration de 200 nM en protéine, est liée à la faible quantité (10 %) de protéine non oxydée présente dans l'échantillon (voir spectre de masse Figure V.1). Ce résultat met en évidence le lien entre l'oxydation de la protéine et la fixation de l'ADN, et de façon indirecte l'incorporation du métal de régulation. Les expériences d'interaction avec l'ADN réalisées avec les mutants PerR-Zn-H37A et PerR-Zn-H91A (Figure V.2-③ et -④) confirment que la modification d'un des résidus H37 ou H91 entraine la dissociation du complexe PerR/ADN.

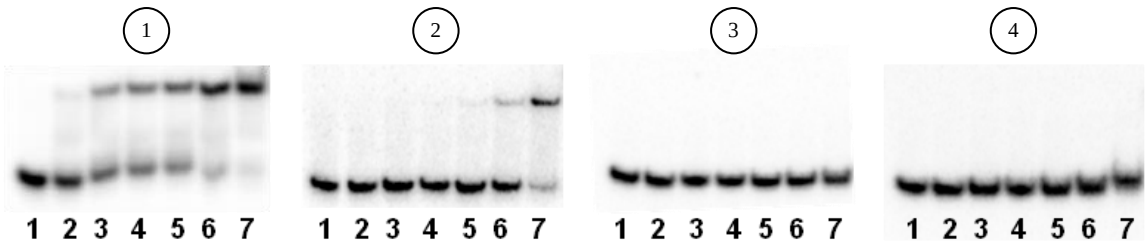


Figure V.2 : Analyse de l'interaction PerR/ADN par la technique du retard sur gel. Les tests d'interaction sont effectués avec des échantillons correspondant à 0, 200 pM, 1 nM, 2 nM, 4 nM, 20 nM et 200 nM (lignes 1 à 7) de protéine (① PerR-Zn-apo, ② PerR-Zn-ox, ③ PerR-Zn-H37A et ④ PerR-Zn-H91A) en présence de 0,2 nM d'ADN et de 100 µM $MnCl_2$

En ce qui concerne l'incorporation du métal de régulation, Lee et Helmann (2006a) ont déterminé une constante de dissociation (Kd) de 2,8 µM de PerR-Zn-apo pour le manganèse. Les expériences de RPE à température ambiante (décrits dans l'article ci-dessus) nous ont permis d'évaluer les Kd des protéines oxydées PerR-Zn-H37ox et PerR-Zn-H91ox pour l'ion Mn^{2+}. Les valeurs sont respectivement de 15 µM et 470 µM (limite inférieure). Ce résultat indique qu'une protéine oxydée sur H37 peut très probablement fixer le métal sur les quatre autres résidus du site de régulation (H91, H93, D85 et D104). A l'inverse, une protéine oxydée sur H91 présente une affinité très faible pour le métal de régulation.

En conclusion, nous pouvons avancer que l'événement conduisant à la dissociation de l'ADN de PerR-Zn-ox est différent selon la position de l'oxydation. Dans le cas de PerR-Zn-H37ox, c'est la dissociation de H37 du site actif qui entraîne la libération de l'ADN alors que pour PerR-Zn-H91ox c'est la perte du métal de régulation qui conduit à la dissociation de l'ADN.

L'oxydation de PerR est catalysée par le métal de régulation. Cette réaction d'oxydation permet à la protéine PerR de se distinguer des senseurs de peroxydes comme OxyR et Orp1-Yap1. Ces dernières utilisent en effet une cystéine pour détecter le peroxyde. Dans le cas de PerR, l'oxydation des cystéines est beaucoup trop lente pour rendre compte de l'activité de PerR *in vivo* (Chapitre III). Le mécanisme d'inactivation de PerR n'est pas la seule particularité de ce senseur. En effet, les senseurs de H_2O_2 décrits dans l'introduction du manuscrit, régulent des enzymes de « feed-back ». Dans le cas où il y a formation de ponts disulfures intra- ou inter-moléculaires, des enzymes peuvent réduire ces ponts et ramener le système dans son état initial. C'est le cas par exemple de OxyR et Orp1-Yap1 (Lee *et al.*,

2004 ; Carmel-Harel *et al.*, 2001). A priori, l'oxydation d'une histidine en 2-oxo-histidine est un phénomène irréversible. A ce titre, on peut donc considérer la protéine PerR comme un facteur de transcription « sacrificiel ». Il faut noter que la protéine PerR régule sa propre expression et qu'une protéine néo-synthétisée peut donc de nouveau jouer son rôle de répresseur.

Une fois oxydée, la protéine est probablement dégradée comme c'est le cas, de la glutamine synthétase. Cette protéine est une enzyme de la voie de biosynthèse de la glutamine. Elle incorpore la seconde molécule d'ammoniac pour former la chaîne latérale de la glutamine. L'enzyme est inactivée par une oxydation (catalysée par le fer ferreux du site actif) de l'histidine 269 (ligand du fer) en 2-oxo-histidine (Farber and Levine, 1986; Lewisch and Levine, 1995). L'oxydation d'une histidine de cette protéine augmente sa sensibilité aux protéases telles que la subtilisine (Levine *et al.*, 1981). Pour la protéine PerR, la protéase responsable de sa dégradation reste à déterminer.

La formation de la 2-oxo-histidine dans la protéine PerR est maintenant démontrée, cependant le passage par un mécanisme de type Fenton reste à confirmer. Le rôle du radical hydroxyle est postulé dans plusieurs exemples d'oxydation de l'histidine en 2-oxo-histidine. C'est, le cas de la superoxyde dismutase à Cu/Zn (Kurahashi *et al.*, 2001) et de la glutamine synthétase (Levine *et al.*, 1981).

Les études réalisées sur la glutamine synthétase ont montré que l'oxydation est très sélective. La réactivité localisée sur le site métallique implique que les résidus liés au métal sont généralement la cible de l'oxydation (Amici *et al.*, 1989). Malgré la présence d'autres acides aminés proches, susceptibles d'être oxydés (Met-His_{269}-Cys-His-Met), l'histidine 269 est le seul résidu modifié détecté. Dans cette étude, le rôle de $HO^{\bullet}$ a été proposé dans l'oxydation de l'histidine. De façon générale, les radicaux hydroxyles diffusent très peu et réagissent sur le lieu même de leur formation (Stadtman and Berlett, 1991). $HO^{\bullet}$ formé réagit avec le premier acide aminé rencontré. Le mécanisme d'oxydation de l'histidine en 2-oxo-histidine est illustré par la Figure V.3.

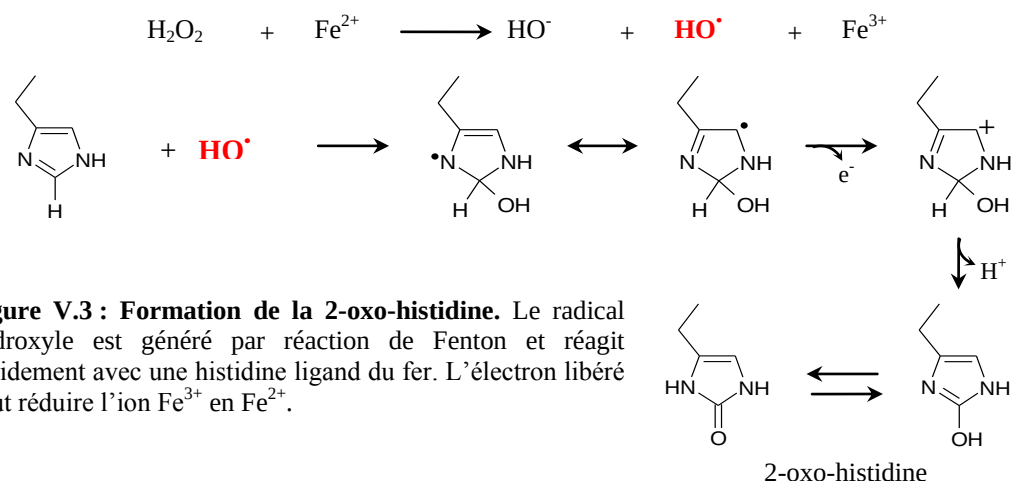


Figure V.3 : Formation de la 2-oxo-histidine. Le radical hydroxyle est généré par réaction de Fenton et réagit rapidement avec une histidine ligand du fer. L'électron libéré peut réduire l'ion Fe^{3+} en Fe^{2+}.

La géométrie du site de régulation de la protéine PerR convient parfaitement à l'approche du peroxyde d'hydrogène pour compléter à 6 la coordination de l'ion Fe^{2+}. La réaction de Fenton conduirait alors à la formation du radical hydroxyle, qui réagirait ensuite avec l'histidine la plus proche : H37 ou H91.

Une autre voie possible qui pourrait expliquer l'oxydation d'un résidu histidine de PerR est le passage par un intermédiaire Fe-oxo à haut degré d'oxydation. Un tel intermédiaire a été mis en évidence dans l'étude de protéines à fer non héminique comme TauD (taurine α-cétoglutarate dioxygénase) d'*E. coli* (Farquhar *et al.*, 2005). Cette enzyme réalise le couplage de la réduction de l'oxygène moléculaire avec l'hydroxylation du substrat et la décarboxylation du cofacteur (α-cétoglutarate). Cette réaction a lieu au sein du site à fer, qui est coordiné par deux histidines et un aspartate. Certains intermédiaires réactionnels ont été caractérisés dans TauD (Krebs *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2003). Les auteurs ont réussi à mettre en évidence la présence d'une espèce Fer(IV)-oxo responsable de l'oxydation du substrat de l'enzyme.

De manière analogue à TauD, on peut envisager, dans le cas de PerR, un mécanisme en sphère interne, avec une espèce à haut degré d'oxydation générée par la réaction d'H_2O_2 sur l'ion Fe^{2+}. La Figure V.4 illustre ce mécanisme qui se décompose en cinq étapes : le peroxyde d'hydrogène viendrait compléter à 6 la sphère de coordination de l'ion Fe^{2+} (Figure V.4-①) ; l'intermédiaire fer(IV)-oxo serait formé avec libération d'une molécule d'eau (Figure V.4-②) ; l'entité fer(IV)-oxo est très oxydante et arracherait un atome d'hydrogène à l'un de ses voisins les plus proches (H37 ou H91) (Figure V.4-③) ; l'hydroxyle formé se fixerait au radical histidinyl pour former la 2-oxo-histidine (Figure V.4-④ et -⑤).

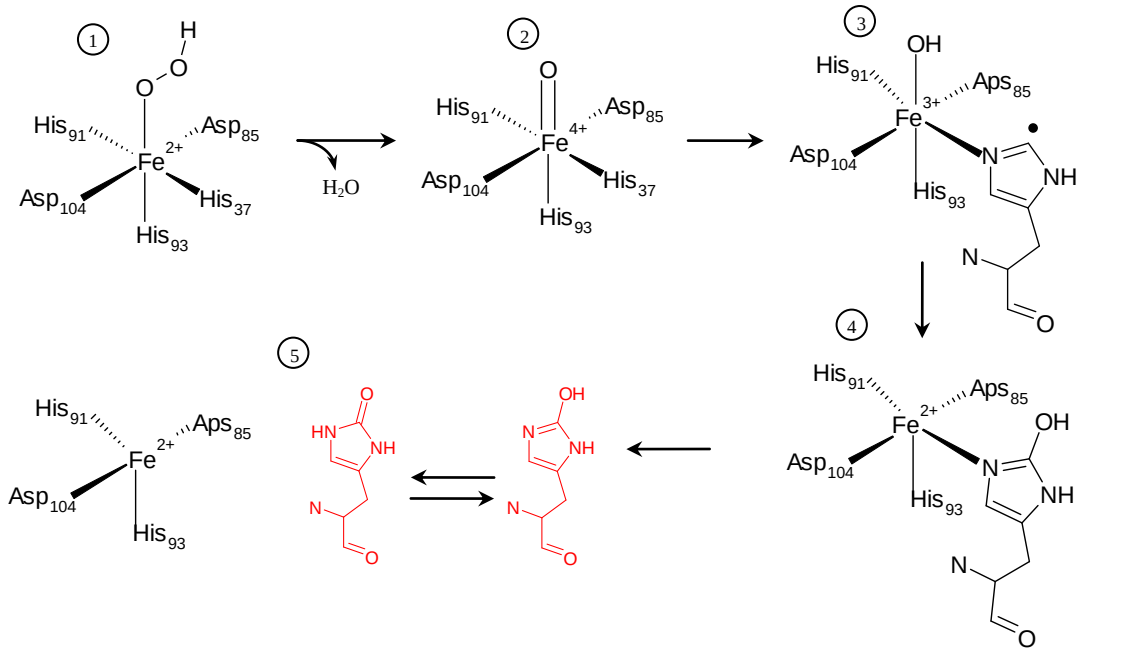


Figure V.4 : Mécanisme d'oxydation de l'histidine de PerR. Ce mécanisme est inspiré du mécanisme réactionnel de TauD (Krebs *et al.*, 2005).

Les deux mécanismes proposés pour l'oxydation de PerR permettent d'expliquer la non oxydation de l'histidine H93. La réactivité de ce résidu est imposée par la géométrie du site de régulation. Le résidu H93 est en position apicale dans le site de symétrie pyramidale à base carrée (voir chapitre IV). De part cette position, dans mécanisme de type Fenton, le radical hydroxyle ne diffuse pas jusqu'à l'histidine 93 et il réagit principalement sur les résidus H37 et/ou H91, qui eux sont en position équatoriale. Dans le mécanisme passant par une entité Fe(IV)-oxo, la position en *trans* de l'histidine 93 n'est pas favorable à l'attaque de l'hydroxyle.

La formation d'un résidu 2-oxo-histidine en position 37 ou 91 perturbe le site de régulation. Le métal du site de régulation est coordiné par un résidu du domaine N-terminal et 4 résidus du domaine C-terminal. La perte d'un ligand entraîne un réarrangement global de la protéine qui provoque la dissociation de l'ADN.

A ce jour, aucune structure de protéine de la famille Fur avec l'ADN n'a été résolue. Une grande partie du travail de thèse a donc été consacrée à la cristallisation du complexe PerR-ADN, les résultats obtenus sont décrits dans le chapitre suivant.

6.| Références Bibliographiques – Chapitre V

Amici, A., Levine, R. L., Tsai, L., and Stadtman, E. R. (1989). Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem* 264, 3341-3346.

Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A. P., Botstein, D., Brown, P. O., and Storz, G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 39, 595-605.

Farber, J. M., and Levine, R. L. (1986). Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J Biol Chem* 261, 4574-4578.

Farquhar, E. R., Koehntop, K. D., Emerson, J. P., and Que, L., Jr. (2005). Post-translational self-hydroxylation: a probe for oxygen activation mechanisms in non-heme iron enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 230-239.

Krebs, C., Price, J. C., Baldwin, J., Saleh, L., Green, M. T., and Bollinger, J. M., Jr. (2005). Rapid freeze-quench 57Fe Mossbauer spectroscopy: monitoring changes of an iron-containing active site during a biochemical reaction. *Inorg Chem* 44, 742-757.

Kurahashi, T., Miyazaki, A., Suwan, S., and Isobe, M. (2001). Extensive investigations on oxidized amino acid residues in H_2O_2-treated Cu,Zn-SOd protein with LC-ESI-Q-TOF-MS, MS/MS for the determination of the copper-binding site. *J Am Chem Soc* 123, 9268-9278.

Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G., and Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1179-1185.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006a). Biochemical characterization of the structural Zn^{2+} site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* 281, 23567-23578.

Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006b). The PerR transcription factor senses H_2O_2 by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363-367.

Levine, R. L., Oliver, C. N., Fulks, R. M., and Stadtman, E. R. (1981). Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2120-2124.

Lewisch, S. A., and Levine, R. L. (1995). Determination of 2-oxo-histidine by amino acid analysis. *Anal Biochem* 231, 440-446.

Price, J. C., Barr, E. W., Glass, T. E., Krebs, C., and Bollinger, J. M., Jr. (2003). Evidence for hydrogen abstraction from C1 of taurine by the high-spin Fe(IV) intermediate detected during oxygen activation by taurine:alpha-ketoglutarate dioxygenase (TauD). *J Am Chem Soc* 125, 13008-13009.

Stadtman, E. R., and Berlett, B. S. (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* 266, 17201-17211.

CHAPITRE VI

PerR et la PerR-box : interactions ADN/protéine

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont apporté d'importantes informations sur la protéine PerR. Les données structurales sur PerR-Zn-apo, PerR-Zn-Mn/Fe et PerR-Zn-ox constituent un ensemble de résultats qui décrit différents aspects de la protéine PerR et vient étayer les hypothèses émises sur le mécanisme d'activation de la protéine sous l'effet du peroxyde d'hydrogène. A ce stade, il reste à élucider la structure du complexe ADN/PerR.

La cristallogenèse des complexes ADN/protéine présente une difficulté supplémentaire : le choix de la longueur de l'oligonucléotide. Ce paramètre est en effet crucial car l'ADN ne doit être ni trop court pour permettre la formation du complexe ADN/protéine, ni trop long pour que l'ADN ne soit pas trop flexible. Une flexibilité trop importante de l'ADN peut en effet perturber la formation d'un empilement cristallin (Wisedchaisri *et al.*, 2004). Et de la même manière que pour tous les paramètres influençant la cristallisation, il n'existe aucune relation directe entre la longueur d'un oligonucléotide et l'éventuelle cristallisation du complexe ADN/protéine. D'importants efforts ont été consacrés à la cristallisation des complexes PerR-Zn-Mn/ADN et PerR-Zn-Fe/ADN, ce chapitre décrit les résultats obtenus.

1.| Test d'interactions ADN/PerR

La formation d'un complexe entre l'ADN et la protéine PerR a été préalablement vérifiée par des expériences de retard sur gel. La Figure VI.1 présente la formation du complexe PerR-Zn-Mn/ADN en fonction de la concentration en protéine (lignes 2 à 7). L'ADN est à une concentration de 0,2 nM. Une bande retardée commence à apparaître à partir d'une concentration en protéine de 5 nM (ligne 3). Cette bande correspond à la formation du complexe ADN/PerR. L'ADN est complètement complexé pour une concentration en protéine supérieure à 20 nM (lignes 5-6).

Cette expérience démontre que la protéine purifiée est bien capable de fixer sa séquence de reconnaissance. En absence du métal de régulation ou en présence d'EDTA (1 mM), il n'y a pas formation du complexe. La présence du métal de régulation est indispensable à la fixation de la protéine sur l'ADN. Dans les conditions de l'expérience, la constante de dissociation du complexe ADN/PerR en présence de 100 µM d'ions Mn^{2+} est de l'ordre de 15 nM (El Ghazouani, 2007).

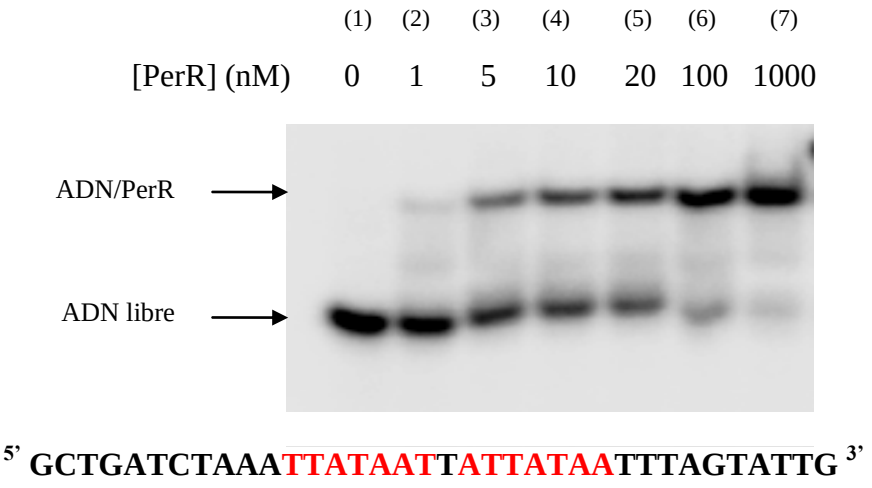


Figure VI.1 : Interaction ADN/PerR. L'interaction entre PerR et l'ADN est visualisée par la technique du retard sur gel. La séquence de l'oligonucléotide utilisée pour les tests est indiquée (PerR-box en rouge). Pour les conditions expérimentales, se reporter au chapitre « Méthodes Biochimiques et Biophysiques ».

2.| Cristallogenèse du complexe ADN/PerR

La cristallisation des complexes ADN/protéine implique le test de plusieurs longueurs d'oligonucléotides. La séquence minimale de reconnaissance de la protéine PerR est indiquée en rouge sur la Figure VI.1. Les essais de cristallisation ont été effectués avec des oligonucléotides inspirés de la PerR-box du gène *mrgA*, la variation de la longueur se fait en ajoutant des nucléotides en amont et en aval du motif 7-1-7.

2.1.| Préparation des échantillons

Les premiers essais de cristallisation ont été effectués avec la protéine PerR-Zn-Mn pour éviter l'oxydation à l'air. Certaines conditions ont ensuite été testées en boîte à gants avec la protéine PerR-Zn-Fe. La préparation des échantillons est détaillée dans le chapitre « Méthodes Biochimiques et Biophysiques ».

2.2.| Oligonucléotides utilisés

Les oligonucléotides utilisés pour la cristallisation du complexe ADN/PerR sont présentés dans le tableau ci-dessous.

17pb	G T T A T A A T T A T T A T A A G
19pb	G G T T A T A A T T A T T A T A A G A
19pb*	A A G T T A T A A T T A T T A T A A G
21pb	A A G T T A T A A T T A T T A T A A G A A
25pb	T C T A A A T T A T A A T T A T T A T A A T T T A
26pb*	T C T A A A T T A T A A T T A T T A T A A T T T A G
28pb*	T G A T C T A A A T T A T A A T T A T T A T A A T T T A
32pb	C T G A T C T A A A T T A T A A T T A T T A T A A T T T A G T A
33pb*	C T G A T C T A A A T T A T A A T T A T T A T A A T T T A G T A G

Tableau VI.I : Oligonucléotides utilisés pour la cristallogenèse du complexe ADN/PerR (PerR-box en rouge).

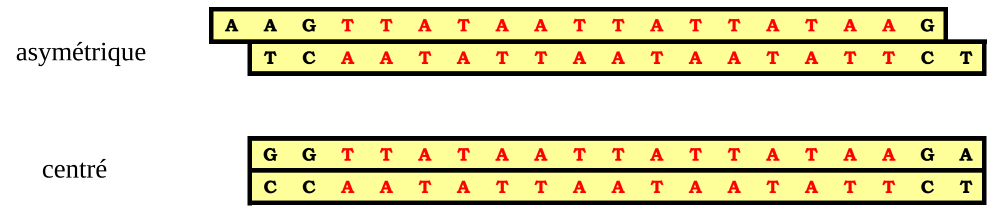


Figure VI.2 : Design des oligonucléotides (cas du 19pb* et du 19pb).

Le design des oligonucléotides permet de générer deux types de doubles brins : symétriques (centrés) et asymétriques (Figure VI.2). Les doubles brins asymétriques, marqués d'un astérisque dans le Tableau VI.I sont décalé d'une base. Ce décalage pourrait induire la formation de polymères d'ADN par l'imbrication de plusieurs doubles brins. Ces polymères pourraient influencer la cristallisation. Une telle stratégie s'est avérée déterminante pour la cristallisation du complexe ADN/IdeR (Wisedchaisri *et al.*, 2004).

2.3.| Résumé de la cristallogenèse

Les criblages des conditions de cristallisation ont été effectués sur les plateformes de cristallisation de l'IBS et de l'EMBL. Les résultats obtenus sont très variables selon la longueur de l'oligonucléotide. Au cours des expériences de cristallisation du complexe ADN/PerR, des cristaux ont été obtenus. Les résultats peuvent être résumés par trois familles de cristaux qui sont illustrés par la Figure VI.3.

- **17pb, 19pb, 19pb*, 21pb (Figure VI.3-①)**

Pour les quatre oligonucléotides 17pb, 19pb, 19pb* et 21pb, des cristaux sont obtenus dans les mêmes conditions de cristallisation. Les meilleurs cristaux sont obtenus après optimisation dans la condition 10 % PEG 1000 et 100 mM Hepes pH 7,5. Ces cristaux diffractent jusqu'à environ 3 Å sur les lignes de lumière ID de l'ESRF. Ils appartiennent au groupe d'espace $P2_1$ avec les paramètres de maille a = 49,2 Å, b = 63,3 Å, c = 66,7 Å et β = 80,4 °. Plusieurs jeux de données de diffractions ont été enregistrés à partir de ces cristaux. Après résolution des structures, aucune densité électronique pouvant correspondre à l'oligonucléotide n'est observée. Ces données correspondent à la structure de PerR-Zn-Mn seule (voir Chapitre IV).

- **25pb (Figure VI.3-②)**

Pour cet ADN, des cristaux sont obtenus dans la condition 45 % MPD, 100 mM bis-Tris pH 5,5, 200 mM $CaCl_2$ mais ils diffractent au mieux à 8 Å. Malgré les nombreuses tentatives d'optimisation de ces cristaux, la qualité de diffraction n'a pu être améliorée.

- **28pb (Figure VI.3-③)**

Pour cet ADN de 28pb, de cristaux sont obtenus dans la condition 20 % PEG 6000, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM $MgCl_2$. Ils ont une taille comparable à celle des cristaux de « PerR-Zn-Mn ». Aucune diffraction n'est observée sur les premiers cristaux observés et leur reproduction s'est avérée impossible.

Les différentes tentatives de cristallisation du complexe ADN/PerR se sont malheureusement avérées infructueuses. Cependant, les cristaux obtenus pendant cette étude ont permis de résoudre la structure de la forme active PerR-Zn-Mn.

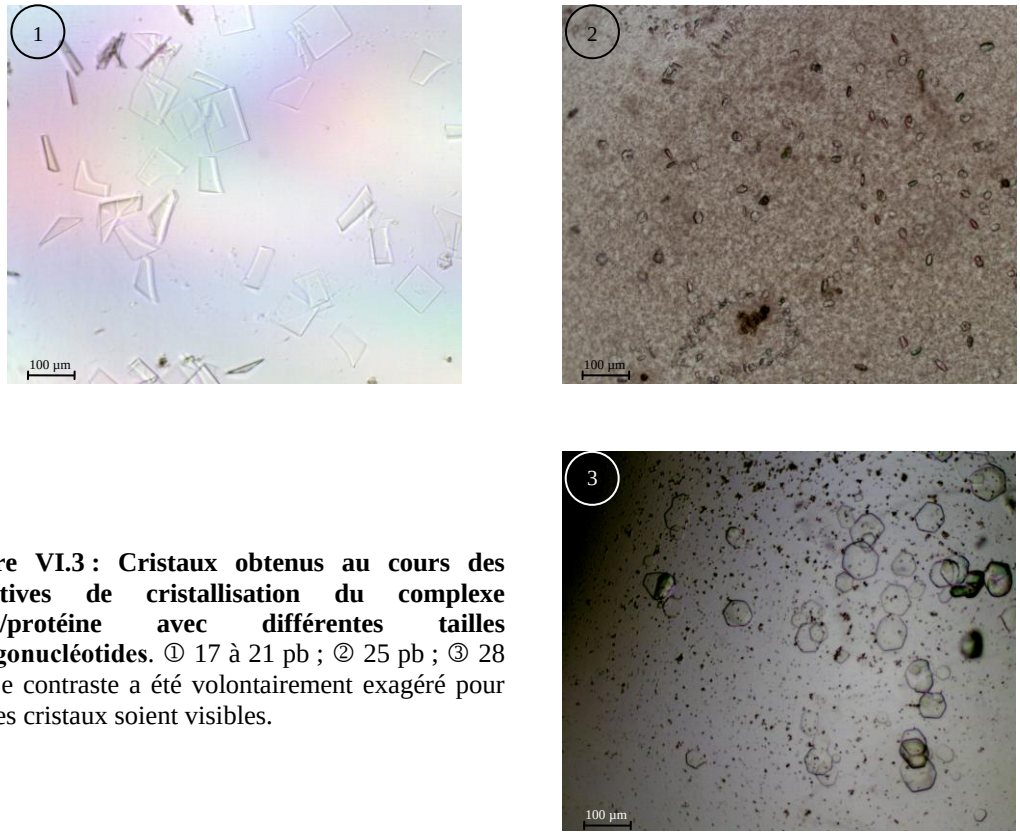


Figure VI.3 : Cristaux obtenus au cours des tentatives de cristallisation du complexe ADN/protéine avec différentes tailles d'oligonucléotides. ① 17 à 21 pb ; ② 25 pb ; ③ 28 pb. Le contraste a été volontairement exagéré pour que les cristaux soient visibles.

Dans les chapitres précédents de ce manuscrit, quelques éléments importants ont été mis en évidence pour la fixation de PerR à l'ADN (l'hélice H4, le changement de conformation). Des études biochimiques menées au laboratoire par des pontages ADN/protéine (El Ghazouani, 2007) et les données de la littérature sur la protéine Fur d'*E. coli* (Tiss *et al.*, 2005) apportent également de précieuses informations sur le mode la fixation à l'ADN. Afin de proposer un modèle complet pour le complexe ADN/PerR, toutes ces données ont été compilées. La modélisation a été faite de façon manuelle avec les logiciels Pymol (DeLano, 2002) et Coot (Emsley and Cowtan, 2004) car, à ce jour, les programmes de « docking » ne sont pas encore suffisamment adaptés aux interactions ADN/protéine.

3.| Modélisation du complexe ADN/PerR

3.1.| Les acides aminées potentiellement impliqués

Dans l'introduction bibliographique, nous avons discuté du motif wHTH de fixation à l'ADN. Même si les acides aminés qui forment ce motif dans les protéines PerR et *Pa*-Fur ne sont pas strictement conservés, le repliement est fortement conservé (Figure VI.4-① et -②). La zone d'interaction potentielle de PerR avec l'ADN se situe dans l'hélice α4 constituée des résidus 55 à 69.

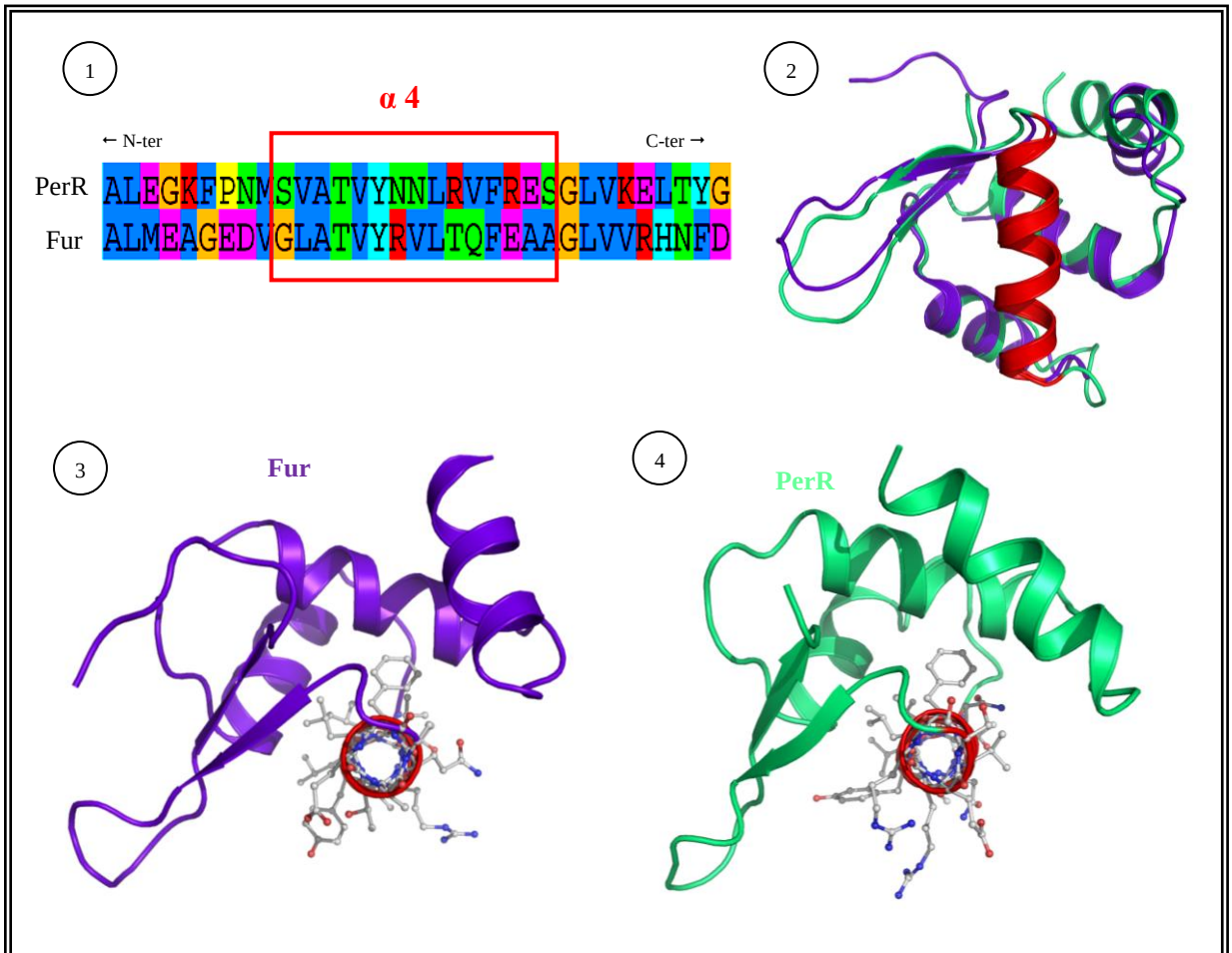


Figure VI.4 : Motifs de fixation à l'ADN des protéines PerR et *Pa*-Fur. ① Alignements des séquences des deux protéines dans la région de l'hélice de reconnaissance. ② Superposition des domaines N-terminaux de PerR (vert) et Fur (violet) ; l'hélice α4 de chaque protéine est en rouge. ③-④ Vue le long de l'axe de l'hélice α4 ; les résidus hydrophobes pointent majoritairement vers le cœur de l'hélice et les résidus hydrophiles vers l'extérieur.

Les motifs wHTH des protéine PerR et *Pa*-Fur ont une topologie très similaire (Figure VI.4-③ et -④). Les chaînes latérales des résidus hydrophobes de l'hélice α4 pointent vers le

cœur du motif wHTH. Les chaînes latérales des résidus hydrophiles sont toutes dirigées vers l'extérieur de ce cœur. Ces résidus hydrophiles sont potentiellement capables d'effectuer des contacts avec les bases de l'ADN.

Dans le cas de la protéine Fur d'*E. coli*, Tiss et *al* ont montré que la tyrosine 55 interagit avec des bases de l'ADN (Tiss *et al.*, 2005). La tyrosine est présente dans un motif TXY (X = V/I) conservée dans la famille des régulateurs Fur (Figure VI.5). Cette observation suggère que ce motif présent dans l'hélice α4 est très important pour la fixation à l'ADN.

Dans le cas de la protéine PerR, El Ghazouani et coll. ont mis en évidence que certains acides aminés de l'hélice α4 étaient indispensables à la fixation à l'ADN : Y60, N61, R64, R67. En effet, la mutation de chacun de ces résidus en alanine abolit la fixation à l'ADN. D'après l'analyse des séquences, la tyrosine (Y60 dans PerR et Y55 dans *Ec*-Fur) est strictement conservée chez les protéines Fur-like (Figure VI.5). Les résidus 61, 64 et 67 sont donc probablement responsables de la spécificité de reconnaissance de la PerR-box par PerR.

Figure VI.5 : Alignement des séquences de quelques protéines de la famille Fur.

3.2.| Les nucléotides potentiellement impliqués

Dans le cas de la protéine *Ec*-Fur, la tyrosine 55 du motif TVY est située à proximité des thymines notées 15 et 16 (Figure VI.6). De même que pour le motif TXY, cette paire de thymine est fortement conservée dans les séquences consensus de reconnaissance des protéines Fur-like. Dans la PerR-box, ces thymines sont numérotées 10 et 11 (différence de numérotation des séquences).

Par ailleurs, pour la protéine PerR, la thymine 2 et l'adénine 3 sont indispensables à la fixation de la protéine (El Ghazouani, 2007). Ces deux nucléotides ne sont pas conservés et semblent donc impliqués dans la spécificité de reconnaissance de l'ADN par PerR.

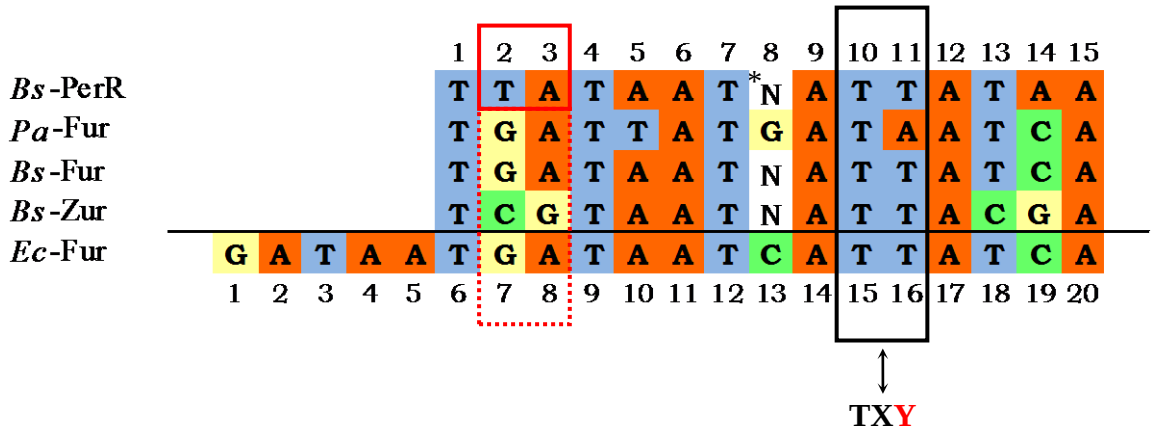


Figure VI.6 : Séquences consensus d'ADN reconnues par quelques protéines Fur-like. * N = A, T, C ou G.

3.3.| Le modèle structural du complexe ADN/PerR

Afin de construire un modèle structural du complexe ADN/PerR, un ADN double brin a été généré en utilisant le logiciel Coot avec la séquence CTAAATTATAATTATTATAATTTAG (centrée sur la PerR-box). La structure de la protéine PerR-Zn-Mn a été utilisée. Un modèle tenant compte des contraintes suivantes a ensuite été élaboré dans le logiciel Pymol :

- la tyrosine Y60 est située à proximité des thymines 10 et 11 de la PerR-box ;
- les nucléotides T2 et A3 de la PerR-box interagissent avec l'hélice α4 ;
- les chaînes latérales des résidus N61, R64 et R67 interagissent avec l'ADN.

Il est intéressant de noter que les bases T2-A3 et A4-A6 de la PerR-box forment avec leurs complémentaires respectifs A14'-T13' et T11'-T10' un grand sillon. Par ailleurs, nous supposons que les chaînes latérales des résidus Y60, N61, R64 et R67 sont orientées vers le grand sillon, en profitant de la topologie imposée le motif wHTH (Figure VI.4). La protéine a été placée sur l'ADN en plusieurs étapes. Dans un premier temps, l'hélice α4 d'une sous unité a été orientée de sorte à avoir un maximum de contacts entre les acides aminés et les bases :

distances interatomiques comprises entre 2,5 et 3,5 Å (Figure VI.7-①). Dans cette configuration, les contacts de type liaisons hydrogènes établis sont : Y60-T10', R64-A12', R64-A5, R67-T13'.

Cependant, l'hélice α4 de l'autre sous unité est légèrement décalée par rapport au grand sillon. Afin de remettre correctement cette dernière, une translation de 5 Å a donc été appliquée au monomère suivie d'une légère rotation Figure VI.7-②.

Le modèle proposé montre que la protéine chevauche l'ADN comme une « pince » centrée sur la PerR-box. Dans ces conditions, il est impossible de placer un deuxième dimère qui prend en compte les mêmes contraintes. L'espacement entre les deux hélices α4 est cohérent avec la liaison à deux grands sillons consécutifs : la distance entre le centre des deux hélices est de 35 Å et la distance inter-sillon est de 34 Å. Cependant, pour que cet espacement soit compatible, il a fallu décaler une des deux hélices.

D'après ces observations, la protéine PerR-Zn-Mn est potentiellement capable de se lier à l'ADN mais un réarrangement est nécessaire. Ce réarrangement a été opéré sur la protéine, cependant une courbure de la double hélice d'ADN est également envisageable.

D'après le modèle présenté sur la Figure VI.7 un seul dimère de PerR se lie par motif 7-1-7. Il a été proposé que *Pa*-Fur, l'homologue structural le plus proche, fixe l'ADN avec deux dimères placés « tête bêche » de part et d'autre de l'ADN. Pour envisager un mode de fixation similaire, la présence de deux PerR-box chevauchantes est indispensable. Ce mode de fixation a été mis en évidence pour certains régulateurs comme IdeR et DtxR (Wisedchaisri *et al.*, 2004; White *et al.*, 1998)

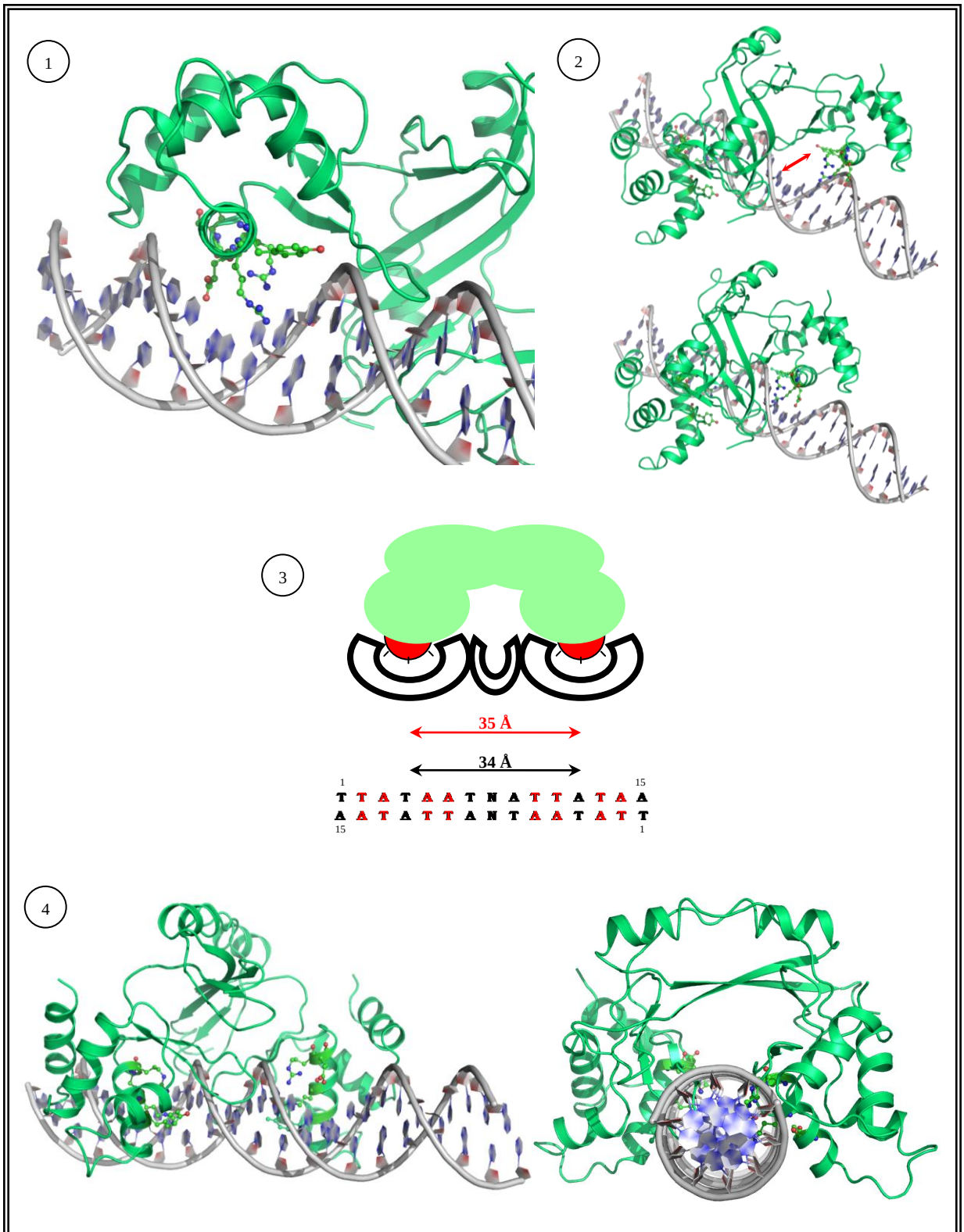


Figure VI.7 : Modèle de fixation de la protéine PerR à l'ADN. ① L'hélice α4 d'un monomère a d'abord été placée. ② L'hélice α4 du second monomère est légèrement décalée pour coïncider avec le grand sillon. ③ Représentation simplifiée du complexe avec les hélices α4 qui se fixent dans deux grands sillons consécutifs. ④ Vue d'ensemble du complexe ADN/PerR.

4.| Conclusions - Discussion

Les cristaux obtenus lors de la cristallogenèse du complexe ADN/PerR n'ont pas permis de résoudre sa structure mais un modèle tenant compte de toutes les données biochimiques a pu être établi. Ce modèle est cohérent avec le mode de fixation des métallo-régulateurs en général : l'espacement entre les deux hélices de reconnaissance doit être compatible avec l'espacement imposé par la séquence de reconnaissance (Chapitre I).

La protéine PerR et la protéine Fur sont toutes les deux présentes *Bacillus subtilis*. Le repliement de ces deux protéines est probablement très similaire (72 % d'homologie de séquence) et leur séquence de reconnaissance ne diffère que par deux bases sur les 15. *In vivo* et *in vitro*, ces protéines ne fixent qu'une seule séquence consensus : la PerR-box ou la Fur-box. Cette spécificité permet aux protéines de ne pas interférer dans leurs mécanismes de régulation. Cette différence peut s'expliquer par la nature des acides aminés de l'hélice de reconnaissance. Par exemple, les deux arginines de l'hélice α4 dans PerR (R61 et R67) qui pointent vers les bases de l'ADN sont respectivement un glutamate et une thréonine dans *Bs*-Fur. Le deuxième nucléotide de la PerR-box (la thymine) est une guanine dans la Fur-box. Pour conserver une structure palindromique, l'adénine 14 de la PerR-box est substituée par une cytosine dans la Fur-box. Ces différences traduisent très probablement la spécificité de formation du complexe ADN/protéine.

D'autres paramètres peuvent être à l'origine de la spécificité de reconnaissance de l'ADN. Chez *B. subtilis*, les PerR-box sont généralement isolées alors que deux ou plusieurs Fur-box contigües sont le plus souvent observées pour les gènes régulés par Fur (Baichoo and Helmann, 2002). Cette observation suggère que la coopérativité au niveau des sites de fixation est importante pour l'activité de répresseur de Fur. D'autres facteurs de régulation peuvent également influencer le comportement de ces métallo-régulateurs. Il a été montré, par exemple, que des protéines « histone-like » contribuent à la régulation de Fur chez *E. coli*, en modifiant très probablement la conformation de l'ADN (Atlung and Ingmer, 1997; Dubrac and Touati, 2000).

5.| Références Bibliographiques - Chapitre VI

Atlung, T., and Ingmer, H. (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* 24, 7-17.

Baichoo, N., and Helmann, J. D. (2002). Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184, 5826-5832.

DeLano, W. L. (2002). http://www.pymol.org.

Dubrac, S., and Touati, D. (2000). Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the sodB promoter. *J Bacteriol* 182, 3802-3808.

El Ghazouani, A. (2007) Etude biochimique et fonctionnelle de la protéine PerR de *Bacillus subtilis*: un senseur bactérien du peroxyde d'hydrogène, *THESE*, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

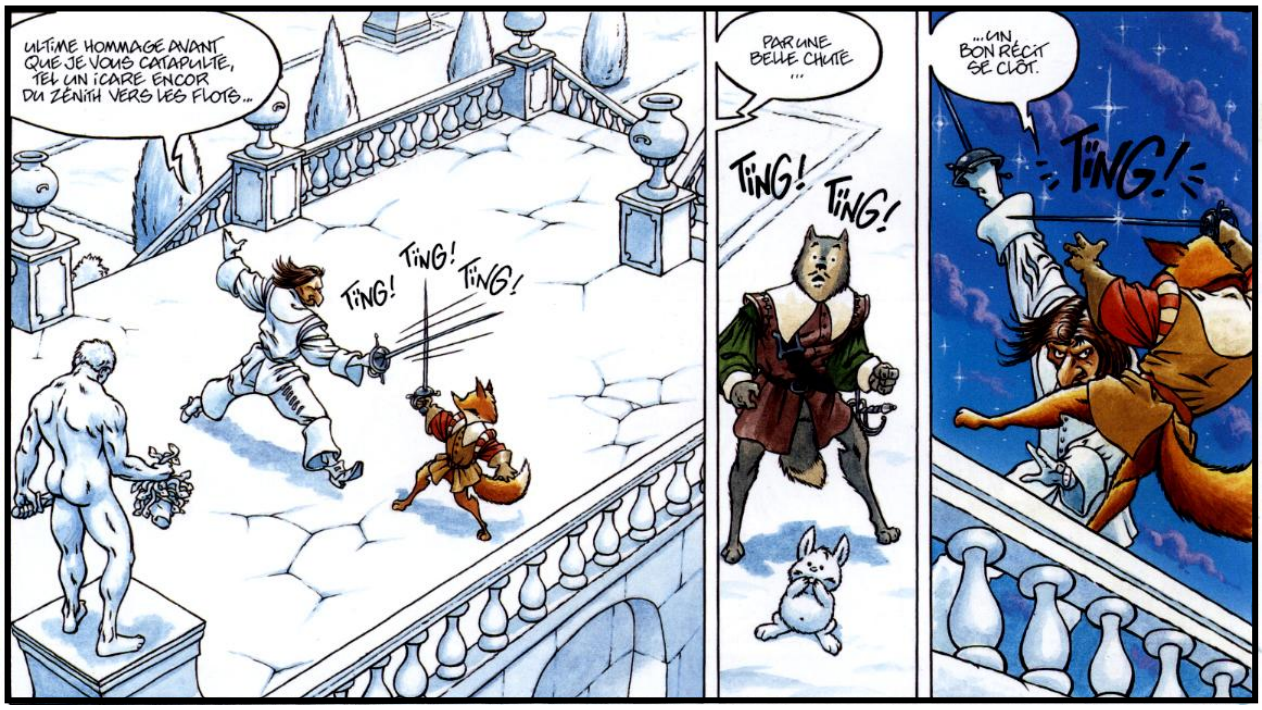
Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (2005). Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett* 579, 5454-5460.

White, A., Ding, X., vanderSpek, J. C., Murphy, J. R., and Ringe, D. (1998). Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. *Nature* 394, 502-506.

Wisedchaisri, G., Holmes, R. K., and Hol, W. G. (2004). Crystal structure of an IdeR-DNA complex reveals a conformational change in activated IdeR for base-specific interactions. *J Mol Biol* 342, 1155-1169.

CHAPITRE VII

Conclusion Générale & Discussion



Les organismes aérobies utilisent l'oxygène moléculaire en tant qu'accepteur d'électrons dans le processus de respiration pour produire efficacement de l'énergie. L'utilisation de l'oxygène en tant que principal accepteur d'électrons a engendré quelques problèmes auxquels les organismes ont pu trouver des solutions. Les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS) qui sont le radical anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, peuvent être très néfastes pour l'organisme si leur concentration intracellulaire devient trop élevée. En conditions normales, la concentration de ces espèces est maintenue à un niveau basal par des systèmes de régulation qui sont entre autres des vitamines, des catalases et des alkylhydroperoxyde réductases. Le taux de ces ROS peut cependant augmenter brutalement en cas de stress oxydant. Ce stress se manifeste par une défaillance des systèmes antioxydants ou alors par une accumulation des intermédiaires à cause d'un changement brusque d'environnement (surexposition à O_2 par exemple). Pour faire face à ce stress et se protéger des effets néfastes des ROS, la cellule active des systèmes enzymatiques complémentaires capables de dégrader les espèces réactives et de réparer certains dommages causés. Pour optimiser ces mécanismes, la cellule ne met en place ces systèmes que lorsque le stress est présent. La détection du stress est assurée par des senseurs spécifiques. Les senseurs les mieux décrits en réponse à un stress peroxydique sont les protéines OxyR d'*E. coli* et Yap1 de *S. cerevisaie*. Chez *B. subtilis*, la protéine PerR est l'analogue fonctionnel de ces deux protéines. Au début de ce travail, peu de données étaient disponibles sur cette protéine. Le mécanisme moléculaire de détection du peroxyde d'hydrogène par cette protéine n'était pas élucidé.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont pour objectif l'étude structurale de la protéine PerR. Les différentes structures présentées dans ce manuscrit constituent un ensemble complet de données permettant de décrire différents états de la protéine. En parallèle à cette étude structurale, des études biochimiques ont été menées au laboratoire.

Au début de nos travaux, nous avons été confrontés à un problème d'expression de la protéine. Le protocole d'expression et de purification initialement mis en place conduisait à une protéine partiellement oxydée. Ce protocole a ensuite été modifié afin d'obtenir exclusivement la forme native de la protéine. Cette oxydation est vraisemblablement le résultat de la réaction entre la protéine PerR-Zn-Fe et H_2O_2 via son mécanisme de détection du peroxyde d'hydrogène. Ce travail préliminaire nous a permis de cristalliser et de résoudre les structures tridimensionnelles de PerR-Zn-apo et de PerR-Zn-Mn qui sont respectivement les formes « inactive » et « active » de la protéine PerR.

La structure de PerR-Zn-apo a été la première structure d'une métalloprotéine senseur de H_2O_2 appartenant à la famille des régulateurs Fur. Cette structure confirme la topologie de base des protéines Fur-like. Deux domaines distincts sont présents dans la protéine : un domaine N-terminal contenant un motif de fixation à l'ADN de type wHTH et un domaine C-terminal où s'établit la dimérisation. L'ion Zn^{2+} coordiné par les quatre cystéines est localisé dans le domaine C-terminal. Le rôle purement structural de ce site a été prouvé. D'une part, par sa position particulière, il permet de verrouiller l'ensemble du dimère. D'autre part, les cystéines qui le constituent sont très peu accessibles au solvant et la réaction d'oxydation de celles-ci est beaucoup trop lente pour qu'elles soient impliquées dans le mécanisme de détection de H_2O_2.

La structure de PerR-Zn-Mn a permis de mettre en évidence les résidus impliqués dans la coordination du métal de régulation : H37, D85, H91, H93 et D104. Les analyses par spectroscopie d'absorption des rayons X ont permis de décrire une géométrie pyramidale à base carrée avec une distance moyenne de 2,08 Å entre le métal et ses ligands. Le site de régulation est situé à l'interface entre les domaines N- et C-terminaux. La position de ce site de régulation permet d'expliquer le mode de fixation de la protéine à l'ADN. En effet, l'apoprotéine est incapable de lier l'ADN et la fixation du métal de régulation permet de mettre les hélices responsables de la fixation à l'ADN dans une conformation favorable. La distance entre ces deux hélices dans la structure de PerR-Zn-Mn convient parfaitement à la fixation sur la séquence consensus d'ADN reconnue par la protéine. Un modèle du complexe ADN/protéine a pu être proposé en tenant compte des résultats obtenus au laboratoire sur la fixation de PerR à l'ADN et des données de la littérature.

Nous avons mis à profit la propriété de la protéine PerR à s'oxyder pendant son expression pour nous intéresser à la nature du produit de l'oxydation. En modifiant les conditions d'expression et de purification, la forme oxydée de la protéine a été obtenue très majoritairement. En présence d'ion Fe^{2+} dans le site de régulation, H_2O_2 oxyde une histidine via une réaction catalysée par le métal. Cette forme oxydée de la protéine a été cristallisée et la structure a permis de localiser une oxydation majoritaire sur le résidu en position 37. Une oxydation résiduelle est également observée sur l'histidine 91 alors que l'histidine 93 n'est pas touchée. Cette structure a mis en évidence pour la première fois la 2-oxo-histidine dans une structure cristallographique. La différence de réactivité des histidines peut être expliquée par la géométrie du site de régulation : les histidines 37 et 91 sont en position *cis* et équivalentes alors que l'histidine 93 est en position *trans* par rapport à l'approche du peroxyde.

La protéine PerR est un senseur particulier du peroxyde d'hydrogène. Tandis que les senseurs de peroxyde comme OxyR, Yap1 et OhrR utilisent les propriétés redox des fonctions thiols des cystéines pour détecter les peroxydes, la protéine PerR utilise un site métallique à fer ferreux. La réaction de H_2O_2 au sein du site de régulation provoque l'oxydation de l'histidine en position 37. La protéine oxydée présente une affinité beaucoup plus faible pour le métal de régulation. Le relargage de celui-ci induit alors la levée de répression car les hélices ne sont plus positionnées correctement pour fixer à l'ADN. Une autre particularité de la protéine réside dans son caractère « sacrificiel ». En effet, il n'existe, aucun système connu de régénération d'une histidine à partir d'une 2-oxo-histidine. L'autorégulation de PerR compense son caractère sacrificiel.

La Figure VII.1 résume différents états de la protéine PerR pendant la détection du peroxyde d'hydrogène.

Des études complémentaires restent à être menées pour compléter ce mécanisme. En effet la structure cristallographique du complexe ADN/protéine pourrait permettre de mettre en évidence les contacts précis entre les acides aminés et les bases de l'ADN. Ces contacts permettront d'expliquer la spécificité de reconnaissance des protéines Fur-like pour l'ADN. Une étude cinétique *in cristallo* peut également être envisagée afin d'étudier l'approche du peroxyde d'hydrogène au site de régulation. Cette expérience serait possible en faisant diffuser H_2O_2 dans les cristaux.

La protéine PerR est présente chez certains organismes pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*. La compréhension du mode d'action de cette protéine pourrait permettre à long terme d'utiliser cette dernière comme une cible thérapeutique potentielle.

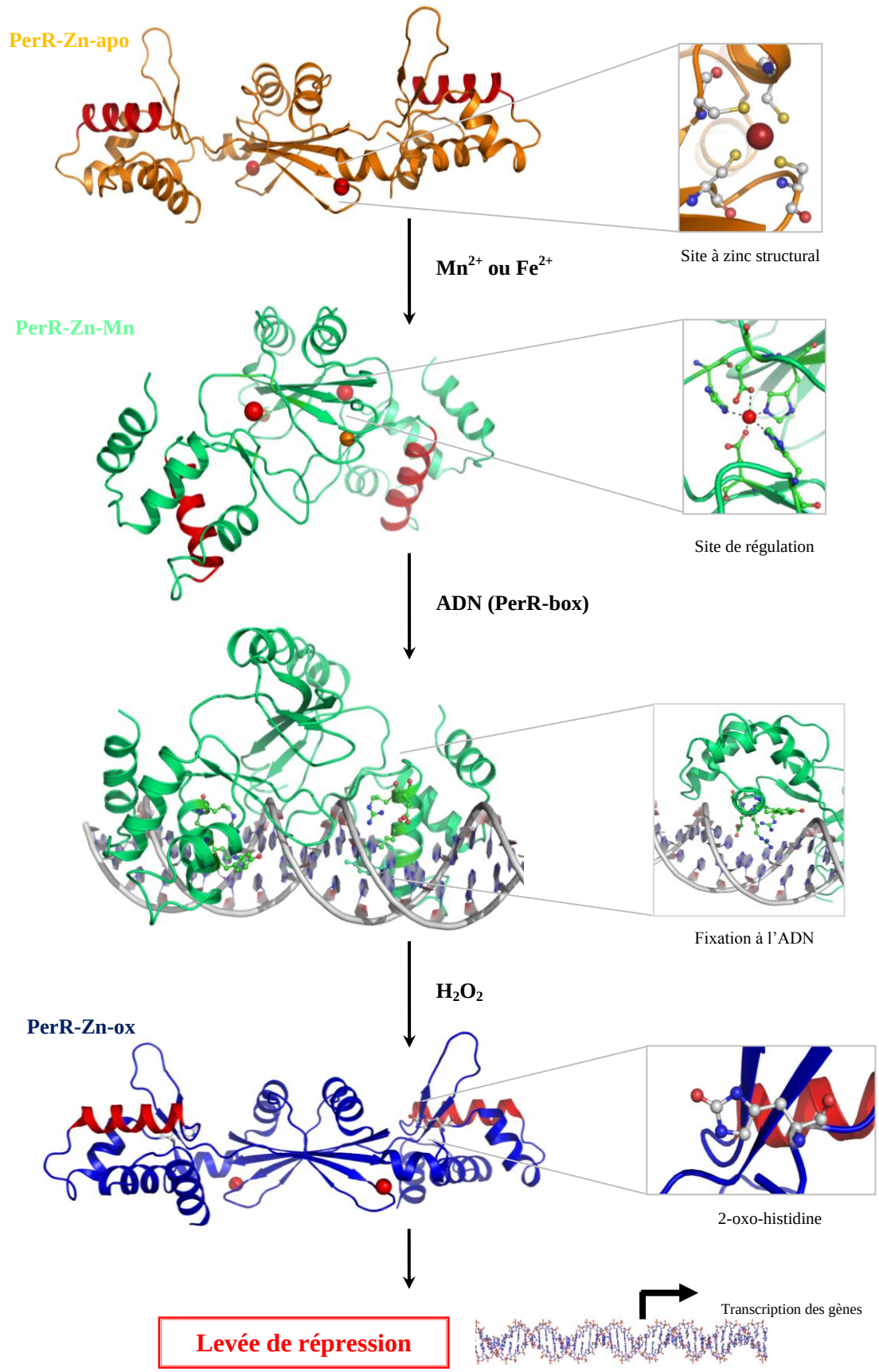


Figure VII.1 : Résumé des différents états conformationnels de la protéine PerR.

CHAPITRE VIII

Méthodes Biochimiques et Biophysiques

1.| Obtention de la protéine

1.1.| Expression de la protéine

L'expression de la protéine PerR de *B. subtilis* est réalisée dans la souche *E. coli* BL21 (DE3), transformée par le vecteur pET30c-*perr* (El Ghazouani, 2007). Ce vecteur contient, en plus du gène codant la protéine PerR, un gène de résistance à la kanamycine permettant la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide. Les colonies de bactéries sont obtenues sur milieu solide (LB + agar 20 g/L + kanamycine 50 µg/mL).

1.1.1.| Culture en milieu LB

Une colonie est prélevée pour inoculer 25 mL de milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine. Cette préculture placée sous agitation à 37 °C pendant une nuit sert ensuite à inoculer 1 L de milieu de culture. La synthèse de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG à 0,5 mM dans le milieu de culture lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance (DO_{600} d'environ 0,6). Après induction, la croissance se poursuit durant 3h à 37°C.

1.1.2.| Culture en milieu minimum

La culture est réalisée en milieu minimum M9 afin de contrôler la concentration en ions métalliques. La composition du milieu est notée dans le tableau ci-dessous.

			Concentration finale
	Glucose		**4 g/L**
	$MgSO_4$		**1 mM**
	$MnCl_2$, $CaCl_2$		**0,1 mM**
	Kanamycine, $ZnSO_4$		**50 µM**
	Desferrioxamine		**5 µM**
Sels	KH_2PO_4		**3 g/L**
	NaH_2PO_4, 7 H_2O		**10 g/L**
	NaCl		**0,5 g/L**
	NH_4Cl		**1 g/L**
	Vitamines	Composition pour 50 mL de solution	**2 mL/L**
	Pyridoxine, Biotine, Panthothenate, Acide folique, Chlorure de choline, Niacineamide	25 mg / vitamine	
	Riboflavine	2,5 mg	
	Thiamine	125 mg	

Ce milieu est ensuite modifié en fonction de la protéine que l'on veut exprimer. Dans le cas de PerR-Zn-apo, la desferrioxamine est ajoutée à une concentration de 5 µM afin de complexer les traces de fer (Fe^{3+}). En ce qui concerne la protéine PerR-Zn-ox, une solution de $FeCl_3$ est ajoutée à une concentration finale de 50 µM et la culture est effectuée sans de desferrioxamine.

1.1.2.1.| Obtention de la protéine PerR-Zn-apo

Une colonie obtenue sur milieu LB solide est prélevée pour inoculer 10 mL de milieu LB contenant la kanamycine. Cette préculture est laissée sous agitation à 37 °C pendant la journée. Les cellules sont alors centrifugées à 2500 g pendant 5 minutes puis reprises dans 100 mL de milieu M9 contenant la kanamycine (50 µg/mL). La culture se poursuit sur la nuit à 37 °C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 2500 g puis reprises dans 1 L de milieu M9 contenant toujours la kanamycine à 50 µg/mL. Ce litre de culture est placé à 37 °C sous agitation. La synthèse de PerR est induite par ajout de l'IPTG à 0,5 mM lorsque l'absorbance à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,4 et 0,5.

1.1.2.2.| Obtention de la protéine PerR-Zn-ox

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour PerR-Zn-apo à l'exception de la composition du milieu de culture comme nous l'avons mentionné ci-dessus.

1.1.3.| Préparation de l'extrait brut de protéines

Le milieu de culture est centrifugé à 7000 rpm pendant 10 min à 6 °C. A ce stade, les culots peuvent être conservés à -80 °C.
Pour l'extraction des protéines, les cellules sont resuspendues dans le tampon de lyse (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 20 mM NaCl) et lysées par sonication (5 cycles de 30 s). L'extrait brut de protéines est obtenu après centrifugation à 35000 x g pendant 30 min à 6 °C, ce qui permet l'élimination des débris cellulaires.

1.2.| Purification de la protéine

La première étape de purification de la protéine est une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose-FastFlow (GE Healthcare). Cette colonne permet la séparation des protéines d'un extrait brut en effectuant un gradient en sels avec un tampon de

haute force ionique. L'extrait brut de protéines est déposé sur la colonne préalablement équilibrée avec du tampon A (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 20 mM NaCl). Après plusieurs lavages avec ce tampon, les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de 10 à 80 % de tampon B (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 M NaCl). La protéine PerR est éluée entre 100 et 200 mM de NaCl. Les fractions à retenir sont choisies d'après les chromatogrammes et les analyses électrophorétiques en conditions dénaturantes.

La seconde et dernière étape de purification consiste à injecter l'extrait de protéine sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex 75 (résolutive entre 5000 et 70000 Da). Le processus de purification est basé sur la séparation des protéines en fonction de leur taille. Les fractions retenues lors de la première étape de purification sont concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation sous agitation modérée à 4 °C sur la nuit. La solution est alors centrifugée à 25000 g pendant 45 min à 6°C et resuspendue dans le tampon C composé de 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl traité sur une résine Chelex-100 pour chélater les ions métalliques. L'échantillon est ensuite injecté sur une colonne Superdex 75 (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon C. Les protéines sont éluées avec le même tampon et les fractions retenues sont analysées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. La concentration de la protéine est estimée par mesure de l'absorbance à 277 nm en utilisant le coefficient d'absorption (ε = 9020 M^{-1} cm^{-1}) déterminé expérimentalement.

2.| Caractérisations de la protéine

2.1.| Analyse des métaux

Avant l'analyse, les échantillons sont passés sur une colone de type NAP-5 (GE Healthcare) afin de changer le tampon. Le tampon utilisé (100 mM Tris-HCl pH 8,0) est traité Chelex-100. La quantité de métaux présente dans les échantillons est déterminée par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Cette technique est basée sur le fait que chaque atome libre absorbe une longueur d'onde donnée. La détermination des espèces atomiques est réalisée à partir d'un échantillon à l'état gazeux. Le zinc présent dans les échantillons est dosé par SAA de flamme, la chaleur nécessaire pour faire passer l'échantillon à l'état gazeux étant générée par une flamme. Le fer et le manganèse sont dosés par SAA de four de graphite. Dans ce cas, l'atomisation de l'échantillon est réalisée dans un four de graphite à l'aide d'un atomiseur électrothermique. Ces analyses ont été effectuées au Département de Biologie Intégrée du Centre Hospitalier Universitaire de La Tronche.

2.2.| La spectrométrie de masse des protéines

Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées au Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines à l'IBS. Deux méthodes ont été utilisées :

L'**ESI-TOF** (ElectroSpray Ionization – Time Of Flight) nous a permis de vérifier le poids moléculaire de la protéine purifiée ainsi que l'existence d'éventuelles modifications. La protéine à une concentration de 10 µM est directement analysée dans le tampon de purification.

Le **MALDI-TOF** (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight) a été choisi pour déterminer la localisation de l'oxydation de la protéine. Dans ce cas, la protéine à une concentration de 25 µM dans le tampon de purification, est digérée par une endoprotéase (la trypsine ou la LysC). La digestion s'effectue à 18 °C pendant 18 heures avec un rapport masse de l'enzyme sur masse de la protéine égal à 4 %.

2.3.| Analyses électrophorétiques

2.3.1.| En conditions dénaturantes

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de poly-acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE contenant 15 % (v/v) de poly-acrylamide). L'électrophorèse est effectuée dans un tampon contenant 25 mM Tris-HCl pH 8,8, glycine 192 mM et SDS 0,1 % (p/v). La coloration des protéines est réalisée avec une solution de bleu de Coomassie R-250.

2.3.2.| En conditions non dénaturantes (natives)

En conditions natives, les échantillons sont séparés par électrophorèse sur gel de poly-acrylamide (PAGE contenant 15 % (v/v) poly-acrylamide). L'électrophorèse est effectuée dans un tampon contenant 400 mM Tris-acetate pH 8,5. Les échantillons étant marqués radioactivent (ADN marqué au ^{32}P), le gel est révélé par autoradiographie.

3.| Interactions ADN/PerR

3.1.| Marquage radioactif des oligonucléotides

La réaction de marquage est réalisée en présence de 1 pmol de l'un des deux oligonucléotides simple brin, de 2 µL d'ATP-γ-^{32}P (20 nCi) et de 3 unités de T4 polynucléotide kinase (Sigma-Aldrich). Le mélange réactionnel est placé pendant 30 minutes à 37°C. Le tampon de la réaction est composé de 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT. Les nucléotides non incorporés à l'ADN sont ensuite éliminés par purification sur colonne microspin G25 (GE Healthcare).

L'hybridation est effectuée en ajoutant 1,5 équivalents de l'oligonucléotide complémentaire non marqué afin de complexer tous l'ADN marqué. La réaction a lieu dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 % glycérol, 0,05 % triton. Le mélange comprenant 20 nM du brin marqué et 30 nM du brin complémentaire est chauffé à 90 °C pendant 15 minutes. La température est ensuite diminuée de manière progressive jusqu'à 25 °C. Après 2 heures à 25 °C, le mélange est placé pendant une nuit à 4 °C. La formation du duplex est ensuite vérifiée sur gel de poly-acrylamide non dénaturant.

3.2.| Réaction d'interaction ADN/PerR

La réaction d'interaction se fait à température ambiante. La protéine est incubée en présence de 0,2 nM d'ADN dans le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 % glycérol, 0,05 % triton pendant 20 minutes. Les échantillons sont alourdis et colorés avec du tampon de dépôt (20 % sucrose, XC, BBP) puis soumis à une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide en conditions non dénaturantes. Un film photosensible (Phosphor screen Biorad) est placé pendant quelques heures sur le gel. Ce film est ensuite analysé à l'aide d'un PhosphorImager (Biorad) et du logiciel Quantity One.

3.3.| Préparation du complexe ADN/PerR pour la cristallogenèse

La formation de l'ADN double brin est effectuée en associant un équivalent de chaque simple brin dans le tampon 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl traité Chelex-100. Ce mélange est chauffé à 95 °C pendant 10 minutes. La température est ensuite diminuée de manière progressive jusqu'à 25 °C. Après 2 heures à 25 °C, le mélange est placé pendant une

nuit à 4 °C. La réaction de complexation est effectuée en mélangeant un équivalent de protéine dimère, avec un équivalent d'ADN double brin et un équivalent d'ions métallique ($MnCl_2$ ou $Fe(NH_4)_2(SO4)_2$ pour PerR-Zn-Fe). Le criblage des conditions de cristallisation est fait avec un complexe ADN/PerR à une concentration de 10 mg/mL.

* merci

Résumé

Les systèmes de défense bactériens face à un stress oxydant reposent essentiellement sur l'expression d'enzymes capables de dégrader les espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène, le radical anion superoxyde et le radical hydroxyle. La protéine PerR a été identifiée chez *Bacillus subtilis* comme senseur de H_2O_2 appartenant à la famille des métallo-régulateurs Fur. La protéine PerR est un homodimère contenant deux sites métalliques par sous unité : un site à zinc structural et un site de régulation pouvant coordiner un ion Fe^{2+} ou Mn^{2+}. La protéine PerR se fixe à l'ADN en présence de ses deux métaux pour réprimer la transcription de certains gènes. Contrairement à d'autres senseurs du peroxyde d'hydrogène comme la protéine OxyR chez *Escherichia coli* et le complexe Orp1-Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiaie,* la caractérisation structurale et biochimique de la protéine PerR n'était pas aussi avancée.

Les travaux présentés dans ce manuscrit rapportent les études structurales menées sur la protéine PerR par cristallographie aux rayons X et par spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX). Les différentes structures résolues au cours de ce travail (l'apoprotéine, les formes active et inactive de la protéine) permettent de mieux caractériser la protéine PerR. Le mode de fixation à l'ADN de la protéine PerR est également discuté.

De façon intéressante, tandis que les protéines OxyR et Orp1-Yap1 utilisent des résidus cystéine pour détecter le peroxyde, le mécanisme d'activation de PerR fait intervenir un résidu histidine qui est oxydé en 2-oxo-histidine. Cette oxydation est catalysée par le métal de régulation (Fe^{2+}). Les quatre cystéines de la protéine coordinent l'ion zinc et ne participent pas à la détection du peroxyde. La structure de la forme oxydée de la protéine est également présentée : cette structure met en évidence, pour la première fois dans la PDB, une 2-oxo-histidine dans une structure cristallographique.

Mots clés : stress oxydant, métalloprotéine, complexe ADN/protéine, cristallographie, SAX, EXAFS, XANES.

Abstract

Bacterial defense mechanisms towards oxidative stress are mainly based on expression of enzymes able to eleminate the reactive oxygen species such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. The PerR protein, which belongs to the Fur family, was identified as a sensor of the hydrogen peroxide in *Bacillus subtilis*. PerR is a dimeric zinc protein with a regulatory metal binding site that coordinates either Fe^{2+} or Mn^{2+}. Unlike other peroxide sensors such as OxyR from *Escherichia coli* and Orp1-Yap1 from *Saccharomyces cerevisiaie*, either the structural or the biochemical characterization of PerR was not as complete.

The present work reports the structural studies of the PerR protein by X-ray crystallography and X-ray absorption spectroscopy (XAS). The resolved structures (the apoprotein, metal bound and the inactivated forms) further characterize the PerR protein. The DNA binding mode of PerR is also discussed in the manuscript.

Interestingly, while most of the peroxide sensors use redox-active cysteines to detect H_2O_2, the reaction of PerR with H_2O_2 involve two histidine residues. The oxidation of PerR is catalyzed by the regulatory metal (Fe^{2+}) and leads to the formation of a 2-oxo-histidine residue. The four cystein residues of the protein that are involved in the coordination of the zinc ion do not participate to the hydrogen peroxide detection. The crystal structure of the oxidized protein showing a 2-oxo-histidine residue is the first example of a 2-oxo-histidine containing structure reported in the PDB.

Keywords: oxidative stress, metalloprotein, DNA/protein complex, crystallography, XAS, EXAFS, XANES