



Etudes fonctionnelles et structurales de l'ATPase-Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique de lapin et de la protéine recombinante exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae*

C. Montigny

► To cite this version:

C. Montigny. Etudes fonctionnelles et structurales de l'ATPase-Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique de lapin et de la protéine recombinante exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : . tel-00430785v2

HAL Id: tel-00430785

<https://theses.hal.science/tel-00430785v2>

Submitted on 12 Nov 2009

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

**Ecole Doctorale iViv (ED387)
« Interdisciplinaire pour le vivant »**

Spécialités : Biochimie et Biophysique

Présentée par
Cédric MONTIGNY

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Etudes fonctionnelles et structurales
de l'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique de lapin
et de la protéine recombinante exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae***

soutenue le 11 septembre 2009

devant le jury composé de :

Mme Elisabeth MINTZ
M. Alexandre GHAZI
M. Daniel PICOT
M. Germain TRUGNAN
M. Philippe CHAMPEIL

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président du jury
Directeur de thèse

Thèse réalisée dans

*L'Unité de Recherche Associée CNRS/CEA 2096
Institut de Biologie et de Technologies de Saclay
Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes
Laboratoire des Protéines Membranaires*

*Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay
91191 Gif sur Yvette*

 01 6908 9882

cedric.montigny@cea.fr

REMERCIEMENTS

Quand j'ai été recruté au CNRS en décembre 1999 comme technicien de laboratoire, rien ne m'aurait laissé penser que je préparerais un doctorat dix ans plus tard. Au cours de ces dix années passées à Saclay, j'ai été amené à rencontrer et à côtoyer de nombreuses personnes que je voudrais remercier ici pour leurs contributions et leur soutien.

Je souhaiterais tout d'abord remercier Alain Desbois, qui a été le directeur de l'unité de recherche associée CNRS/CEA 2096 pendant la plus grande partie de mon parcours au CNRS, ainsi que Bruno Robert, chef du Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes. Ils ont toujours été ouverts à la discussion et m'ont encouragé vivement dans mes démarches.

Je voudrais aussi remercier Marc le Maire, actuel directeur de l'URA 2096 et directeur du Laboratoire des Protéines Membranaires qui m'a tout d'abord accueilli dans son équipe lors de mon recrutement il y a dix ans et qui m'a ensuite accordé sa confiance sur de nombreux projets, sachant me motiver à chaque instant (y compris en approvisionnant le laboratoire avec les pommes et le miel récoltés par ses soins).

Je tiens bien sûr à remercier tout particulièrement Philippe Champeil sans qui ce doctorat aurait sans doute été différent. Je le remercie de m'avoir fait confiance il y a trois ans en acceptant d'être mon directeur de thèse. Même si nous avons eu déjà l'occasion de travailler ensemble auparavant, ces trois années auront été l'occasion pour moi de profiter de l'immense savoir-faire dont Philippe fait preuve concernant la manipulation de l'ATPase- Ca^{2+} et les nombreuses techniques permettant la caractérisation fonctionnelle de cette enzyme. En grand pédagogue, Philippe m'aura notamment appris à voir bien au-delà du résultat du jour, m'enseignant à avoir un regard critique et à prendre du recul aussi bien en amont qu'en aval des expériences que nous avons pu mener ensemble. J'espère avoir acquis une partie de ce sens critique et en faire bon usage dans les années à venir.

Merci à Martin Picard qui fut l'initiateur d'une partie des résultats que je présente ici. Je remercie aussi Guillaume Lenoir avec qui j'avais eu le plaisir de travailler de longues heures pendant sa propre thèse il y a déjà quelques années, et qui a rejoint notre équipe l'année passée. Malgré l'éloignement, Martin et Guillaume auront su suivre et accompagner de leurs conseils une partie du travail présenté dans ce manuscrit.

Ce doctorat a été aussi ponctué de nombreuses rencontres qui m'ont donné l'opportunité de partager au cours de longues discussions à la fois des aspects scientifiques mais aussi diverses réflexions quelque fois très éloignées du monde de la science : je remercie ici Manuel Garrigos pour les moments de rire partagés pendant la thèse et les années qui l'ont précédée, David McIntosh pour l'aventure FITC, Chikashi Toyoshima pour m'avoir fait partager ses interrogations en toute simplicité, les membres de l'équipe danoise parmi lesquels Jesper V. Møller, Claus Olesen, Jens Peter Andersen et Johannes Clausen (et tous ceux que j'oublie de citer ici...) pour leurs avis éclairés, ainsi que Alain Boussac pour ses éclaircissements concernant la photosynthèse et l'idée « bêtaïne ».

Ces années de doctorat auront été aussi pour moi l'occasion de « m'essayer » au métier d'enseignant. Je remercie Joël Cotton de l'Institut National des Sciences et Techniques du Nucléaire de m'accueillir et de m'offrir cette opportunité chaque année. Je remercie Maïté Paternostre et Christine Jaxel de m'avoir fait confiance en me confiant une partie des cours et des travaux pratiques. Cette expérience fut pour moi (et peut-être pour les étudiants ?) riche d'enseignements aussi bien scientifiques qu'humains, et j'espère pouvoir la poursuivre aussi longtemps que possible.

Je remercie Alexandre Ghazi d'avoir accepté d'être à la fois mon tuteur de thèse et l'un de mes rapporteurs. Je remercie également Elisabeth Mintz, Daniel Picot et Germain Trugnan d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

La vie du laboratoire ne s'arrête pas uniquement à la science, mais se prolonge bien au-delà avec tous les acteurs qui font vivre ce petit univers. Je remercie tout d'abord Estelle Marchal, ma « binôme » en de nombreuses occasions, qui a su égayer notre bureau, notamment au travers de nos petits moments de folie à 15h15 ☺. Je remercie aussi Bertrand Arnou, toujours de bonne humeur, qui m'a donné de nombreux coups de pouce (et qui a fait preuve de beaucoup de patience) pour me faire comprendre des rudiments de cristallographie. Merci également à Charlotte pour ses notes d'humour quotidiennes et ses dizaines (c'est peu dire !) de visites imprévisibles. A l'heure où je rends ce manuscrit, Charlotte est en train de peaufiner le sien. A ce titre, je lui souhaite bon courage pour la dernière ligne droite.

La fin de cette thèse aurait certainement été difficile sans le soutien de Thanh-Lan Lai, qui n'a pas hésité à me secouer dès que je commençais à perdre le rythme. Elle a aussi adouci mes longues journées de rédaction en proposant régulièrement (mais raisonnablement !) de petites « pauses-thé » revigorantes, au soleil, sur les toits du CEA.

Dans le plus grand désordre, je tiens à remercier aussi ceux qui sont là chaque jour pour partager un peu de leur expérience et sans qui le laboratoire ne serait pas tel qu'il est. Au risque d'oublier certains d'entre eux, je citerai : Véronica, Pierre, Ghada, Francis, Alain, Nadège, Béatrice ; et aussi tous ceux dont certains peut-être passeront seulement mais qui laisseront assurément une trace de leur passage : merci à Radu, Céline, Tiona, Arezki et Naoko, pour tous les moments partagés.

Je tiens à saluer Jean-Michel Neumann qui nous a quitté prématurément il y a maintenant plus d'un an. Jean-Michel savait prendre le temps de discuter avec les étudiants, les rassurant autant que nécessaire sur l'avancement de leur projet. Il aura toujours été ouvert à la discussion, qu'elle soit scientifique ou « musicale », et il nous aura plus d'une fois fait profiter de son humour à la table du café.

Merci aussi à mes parents pour leurs encouragements et leur soutien durant toutes ces années.

RÉSUMÉ

L'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique rapide (SERCA1a) est une protéine membranaire qui permet le transport actif de deux ions calcium depuis le cytosol jusque dans la lumière du réticulum. Depuis 2000, l'obtention de nombreuses structures à résolution atomique de cette enzyme a été un atout majeur pour comprendre son cycle catalytique (Toyoshima, Nakasako et al. 2000). Toutefois, avant 2007, les formes de cette enzyme cristallisées en absence de calcium avaient été obtenues en présence d'un inhibiteur fixé au domaine membranaire.

Nous avons d'abord montré, notamment par des techniques de spectroscopie de fluorescence et de protéolyse ménagée, que l'interaction de la protéine avec ces inhibiteurs, qui rend l'ATPase incapable d'adopter certaines des conformations présentes au cours de son cycle catalytique, avait certainement induit des biais significatifs dans la structure de certaines des formes cristallisées avant 2007 (Montigny, Picard et al. 2007). Nos résultats ont stimulé la recherche de structures nouvelles, en absence ou en présence d'inhibiteurs, dont l'analyse a pleinement confirmé nos conclusions.

L'utilisation de ces inhibiteurs pendant la cristallisation de la protéine solubilisée était jusque là jugée utile pour protéger celle-ci de son éventuelle inactivation irréversible en présence de détergent (Lund, Orłowski et al. 1989). Utilisant le glycérol pour ralentir cette inactivation, nous avons mis en évidence des conséquences inattendues de l'interaction de l'ATPase avec deux des détergents communément utilisés pour sa cristallisation, son isolement ou sa simple étude (Montigny, Arnou et al. 2008).

En présence de glycérol, nous avons également pu étudier certains traits de fonctionnement de trois mutants de l'ATPase, purifiés après expression hétérologue dans la levure *S. cerevisiae* : un mutant d'un des sites de fixation du calcium (*i.e.* capable de fixer un seul des deux calciums) (Montigny, Arnou et al. 2008) et deux autres mutants bloquant l'enzyme dans des états particuliers du cycle catalytique (Marchand, Winther et al. 2008).

Parallèlement à ces études, nous avons élucidé le mystère des propriétés de fluorescence anormales d'une forme particulière de l'enzyme SERCA1a marquée au FITC dans son site nucléotidique. Nous avons mis en évidence une phosphorylation imprévue du FITC lié, conduisant à une très faible fluorescence, particulièrement stable dans le temps. Les conditions de cette phosphorylation impliquent une réorganisation de l'orientation relative des domaines cytosoliques de l'ATPase lors de l'étape de relargage des ions calcium vers la lumière du réticulum (McIntosh, Montigny et al. 2008).

Dans toutes nos études, il nous a fallu évidemment tenir compte de la possible chélation des cations divalents interagissant avec l'enzyme (calcium, magnésium, ...) par les anions présents. Par pH-métrie et à l'aide de sondes colorées, nous avons vérifié que le magnésium n'était PAS chélaté par le tampon Mops classiquement utilisé, contrairement à ce qui était rapporté dans certaines tables de constantes d'association (Montigny and Champeil 2007). A cette occasion, mettant notre savoir-faire au service de collègues du laboratoire, nous avons également précisé les différents complexes formés par association entre le cadmium (Cd^{2+}) et le glutathion réduit (GSH^-) (Leverrier, Montigny et al. 2007), afin de mieux comprendre lesquels de ces complexes étaient le plus susceptibles de se former au cours de la détoxification cellulaire du Cd^{2+} .

Abréviations : ATPase, AdénosineTriPhosphatase ; SERCA1a, Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase, isoforme 1a ; FITC, fluorescéine isothiocyante ; Mops, acide 4-morpholinopropanesulfonique.

ABSTRACT

Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform 1a (SERCA1a), prepared from rabbit fast-twitch muscle, is a membrane protein which catalyses active transport of two calcium ions from the cytosol into the reticulum lumen. Since 2000, several high resolution structures for this protein have been obtained, and these structures have contributed a lot to the current understanding of the catalytic and transport cycle (Toyoshima, Nakasako et al. 2000). However, until 2007, all crystallized forms of the Ca^{2+} -deprived ATPase had been obtained in the presence of inhibitors, bound to the protein transmembrane domain.

First, we used fluorescence spectroscopy and proteolytic cleavage to demonstrate that inhibitors bound to membrane domain, which prevent the ATPase from exploring some of the «normal» conformations of its catalytic cycle, had probably induced biases in some of the structures published before 2007 (Montigny, Picard et al. 2007). Crystallization of new forms by our colleagues abroad, in the absence or presence of inhibitors, confirmed our findings.

These inhibitors had up to now been used to stabilize the protein during the crystallization process and prevent it from detergent-induced irreversible denaturation (Lund, Orłowski et al. 1989). By using glycerol alone, instead, to stabilize the detergent-solubilized protein, we were able to pinpoint specific and unexpected effects, on the protein, of some of the detergents commonly used in this field (Montigny, Arnou et al. 2008).

Again using glycerol, we were able to characterize various features of three particular mutants of the ATPase, previously expressed heterologously in the yeast *S. cerevisiae* and purified in detergent, one of these mutants being able to bind only one Ca^{2+} (Montigny, Arnou et al. 2008), and the two other mutants being blocked at particular steps in the ATPase catalytic cycle (Marchand, Winther et al. 2008).

Independently, we elucidated the reason for the previously-described extremely low fluorescence of FITC-labelled Ca^{2+} -ATPase under certain conditions: we found that the tethered fluorescein, unexpectedly, had become phosphorylated during catalysis. The experimental conditions required for such phosphorylation imply that the ATPase cytosolic domains have to reorganize before Ca^{2+} is released on the luminal side (McIntosh, Montigny et al. 2008).

In all the above experiments, to estimate the free concentrations of divalent cations like calcium and magnesium, we had to take in account the possibility that anionic species present could chelate these cations. Using pH-meter techniques and metallochromic probes, we checked that the classical Mops buffer does NOT bind magnesium (Montigny and Champeil 2007), contrarily to what has been previously reported. In collaboration with colleagues from our lab, we also used similar techniques to characterize complex formation between cadmium (Cd^{2+}) and reduced glutathion (GSH) (Leverrier, Montigny et al. 2007), a prerequisite for cadmium detoxification by cells.

Abbreviations : ATPase, Adenosine TriPhosphatase ; SERCA1a, Sarco-endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase, isoform 1a ; FITC, fluorescein isothiocyanate ; Mops, 4-morpholinopropanesulfonic acid.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : « ATP Binding Cassette », nom désignant une famille de protéines ayant en commun un repliement particulier et des séquences conservées permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP.

ADA : N-[2-acetamido] iminodiacetic acid,

ADP : adénosine 5'-diphosphate.

AMPPCP : adénosine 5'-(β,γ -méthylène-triphosphate).

ANS : 1-anilino-8-naphthalène sulfonate.

ATP : adénosine 5'-triphosphate.

ATPase- Ca^{2+} : adénosine triphosphatase calcium-dépendante.

BHQ : 2,5-di-tert-butyl-1,4-dihydroxybenzène (ou 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone, ou encore 2,5-di-tert-butylhydroquinone).

C_{12}E_8 : octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether.

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique.

CMC : Concentration Micellaire Critique.

CPA : *cyclopiazonic acid*, acide cyclopiazonique.

CSC : Concentration Solubilisante Critique.

DDM : n-dodecyl- β -D-maltopyranoside.

DLN : Domaine de Liaison du Nucléotide (voir NBD).

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

EDTA : acide éthylènediamine tétra-acétique.

EGTA : acide [éthylènebis-(oxyéthylènenitrilo)] tétra-acétique.

ER : *endoplasmic reticulum*, réticulum endoplasmique.

FITC : *Fluorescein 5'-isothiocyanate*.

FRET : Förster Resonance Energy Transfer (ou Fluorescence Resonance Energy Transfer).

LDH : lactate déshydrogénase.

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight.

MDR : *MultiDrug Resistance*, résistance multiple aux drogues.

Mes : acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique.

Mops : acide 4-morpholinopropanesulfonique.

MRP : *Multidrug resistance Related Protein*.

NADH : Nicotine-Adénine Dinucléotide réduit.

NBD : *Nucleotide Binding Domain* (voir DLN),

Ni-NTA : Ni^{2+} -acide nitrilo-triacétique.

PEP : phosphoénol pyruvate.

Pi : phosphate inorganique.

PK : pyruvate kinase.

PMCA : *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*.

PMR1 : *plasma membrane ATPase related Ca^{2+} -ATPase*.

PMSF : *phénylméthylsulfonyl fluorure*.

R.M.N. : Résonance Magnétique Nucléaire.

SAXS : *Small Angle X-ray Scattering* = diffusion des rayons X aux petits angles.

SDS : *sodium dodecyl-sulfate* = dodécyl-sulfate de sodium.

SDS-PAGE : *sodium dodecyl-sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*, électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (*i.e.* en conditions dénaturantes).

SERCA1a : Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, isoform 1a.

SPCA : Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase.

SR : réticulum sarcoplasmique.

TCA : acide trichloroacétique.

TEMED : N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine.

Tes : acide 2-{[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl]amino} éthanesulfonique.

Tg : thapsigargine.

Tris : tris(Hydroxyméthyl)aminométhane.

u.a. : unités arbitraires.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RESUME	III
ABSTRACT	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	V
TABLE DES MATIERES	VI

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
I. LA MEMBRANE BIOLOGIQUE ET SES CONSTITUANTS : SURVOL	1
1. <i>Bref historique</i>	1
2. <i>Quelques généralités sur les lipides</i>	2
a. Nature et structure chimique	2
b. Rôle des lipides dans la structure de la bicouche	3
c. Autres rôles des lipides dans les diverses fonctions cellulaires	3
3. <i>Inventaire de divers types de protéines membranaires</i>	4
a. Protéines impliquées dans les transferts d'information	4
b. Protéines impliquées dans les transferts d'énergies	6
c. Protéines impliquées dans les transferts de matière	7
4. <i>Exemple de la famille des transporteurs de type ABC</i>	13
a. Structure des transporteurs de type ABC	13
b. Rôle de certains transporteurs ABC pour la détoxification des métaux lourds	15
5. <i>Exemple de la famille des ATPases de type P</i>	16
a. Les différentes classes d'ATPases de type P	16
b. Bref aperçu des ATPases de type P _{II}	17
c. Le rôle des ATPases de type SERCA dans l'homéostasie du calcium : exemple des cycles de contraction / relaxation musculaire	18
II. FONCTION ET STRUCTURE DE L'ATPASE-CA ²⁺ SERCA1A	19
1. <i>Les différents gènes et les différentes isoformes SERCA</i>	19
2. <i>Le mécanisme de fonctionnement de SERCA1a : des premières études à la proposition d'un cycle catalytique)</i>	20
3. <i>Prédictions de repliement et premier modèle à basse résolution, après cristallisation à deux dimensions de l'ATPase en présence de vanadate et de thapsigargine</i>	21
a. Prédictions de repliement	21
b. Structure à très basse résolution en présence de vanadate	22
c. Structure à basse résolution en présence de vanadate et de thapsigargine	22
4. <i>Les deux premières structures tridimensionnelles de l'ATPase-CA²⁺ à résolution atomique</i>	24
5. <i>Quelques autres structures de l'ATPase-CA²⁺ à résolution atomique, en présence de différents ligands</i>	25
a. Cristallisation de l'ATPase en présence de calcium et de nucléotide	28
b. Cristallisation de l'ATPase en absence de calcium mais en présence d'inhibiteurs membranaires	29
c. Autres facteurs susceptibles d'influencer la conformation de la protéine, y compris au cours de la cristallogénèse	33
III. CONTENU DE CE MEMOIRE DE THESE	33

CHAPITRE II : PRINCIPALES METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE DANS LE CADRE DE CETTE THESE	37
I. PREPARATION DE VESICULES DE RETICULUM SARCOPLASMIQUE (SR), RICHES EN CA ²⁺ -ATPASE (SERCA1A), A PARTIR DE MUSCLE DE LAPIN	37
II. EXPRESSION HETEROLOGUE DE L'ATPASE-CA ²⁺ SAUVAGE OU MUTEE, ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	38
1. <i>Expression hétérologue dans la levure Saccharomyces cerevisiae</i>	38
a. Le vecteur d'expression	38
b. La souche W303.1b/GAL4	40
c. Expression des enzymes sauvages (WT) ou mutées	40
2. <i>Purification des enzymes sauvages (WT) ou mutées</i>	41
III. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ATPASIQUE	43

1. Le système à enzymes couplées PK/LDH	43
2. Compléments à propos de la pyruvate kinase	44
IV. COMPLEMENTS A PROPOS DE LA DETERMINATION DU CALCIUM LIBRE	45
1. La chélation du calcium par l'EGTA	45
2. Autres molécules pouvant interagir avec le calcium	46
V. SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE ET PROTOCOLES DE PROTEOLYSE MENAGEE	46
1. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	46
2. Protéolyses ménagées : coupure de l'ATPase- Ca^{2+} par la trypsine ou la protéinase K	47
a. La trypsine	48
b. La protéinase K	48
VI. UTILISATION DES PROPRIETES DE FLUORESCENCE DE L'ATPASE- Ca^{2+} POUR SUIVRE LA FIXATION DE LIGANDS	50
1. A propos de la fluorescence	50
2. Signaux de fluorescence intrinsèque de l'ATPase Ca^{2+}	51
3. Fluorescence extrinsèque de l'ATPase marquée à la Fluorescéine Isothiocyanate (FITC)	53
VII. MESURE PAR FILTRATION, AVEC DES TRACEURS RADIOACTIFS, DE LA FIXATION DE LIGANDS SUR L'ATPASE : EXEMPLE DE LA FIXATION DU $[\text{I}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ EN ABSENCE DE CALCIUM	53
VIII. AUTRES METHODES UTILISEES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL DE THESE	54

CHAPITRE III : INFLUENCE DES INHIBITEURS SUR LES CONFORMATIONS ADOPTÉES PAR L'ATPASE Ca^{2+} AU COURS DE LA CRISTALLOGENESE 57

I. LES INHIBITEURS MEMBRANAIRES FIGENT LE DOMAINE MEMBRANAIRE DE L'ATPASE- Ca^{2+} , EMPECHANT L'OUVERTURE LUMINALE DES SITES DE TRANSPORT ($\text{Ca}_2.\text{E}_2\text{-P} \leftrightarrow \text{E}_2\text{-P} + 2\text{Ca}^{2+}$)	57
1. Les inhibiteurs TG, CPA et BHQ bloquent la réponse des tryptophanes membranaires à la fixation du complexe Be.F_3	58
2. La forme « $\text{E}_2.\text{BeF}_3$ » est protégée de la protéolyse, même en présence de thapsigargine	60
3. Comparaison des structures « $\text{E}_2.\text{BeF}_3$ » obtenues en absence ou en présence de thapsigargine	62
a. Au niveau du domaine membranaire	62
b. Au niveau du domaine cytosolique	63
II. UNE RETOMBEE INATTENDUE DE NOS EXPERIENCES : UN ION MAGNESIUM SE FIXE AVEC LE CPA A LA SURFACE DU DOMAINE MEMBRANAIRE :	64
1. Préliminaires : probables ou possibles sites de fixation du Mg^{2+} sur l'ATPase	64
2. Mise en évidence du rôle du Mg^{2+} dans la fixation du CPA	66

MANUSCRIPT #1 : INHIBITORS BOUND TO Ca^{2+} -FREE SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} -ATPASE LOCK ITS TRANSMEMBRANE REGION BUT NOT NECESSARILY ITS CYTOSOLIC REGION, REVEALING THE FLEXIBILITY OF THE LOOPS CONNECTING TRANSMEMBRANE AND CYTOSOLIC DOMAINS 71

CHAPITRE IV : UTILISATION DU GLYCEROL ET DE LA BETAÏNE POUR STABILISER L'ATPASE- Ca^{2+} SOLUBILISEE, NOTAMMENT POUR DES ETUDES DE FLUORESCENCE INTRINSEQUE 73

I. PRELIMINAIRES : INFLUENCE DU GLYCEROL ET DE LA BETAÏNE SUR LA MICELLISATION DES DETERGENTS ET LEUR CAPACITE A SOLUBILISER LES MEMBRANES	75
1. Introduction générale sur les détergents	75
2. Détermination de la Concentration Micellaire Critique, effet du glycérol	76
a. Spectrophotométrie : utilisation du méthyl orange	78
b. Spectrofluorimétrie : utilisation du 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS)	79
3. Solubilisation des membranes biologiques : approche générale et effet du glycérol sur la solubilisation des membranes de réticulum sarcoplasmique	80
a. Solubilisation des membranes, étudiée par diffusion de la lumière	81
b. Effet du glycérol sur la pouvoir solubilisant des détergents vis à vis des membranes de réticulum	82
II. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE L'ATPASE- Ca^{2+} SOLUBILISEE EN PRESENCE DE GLYCEROL ET EN ABSENCE DE CALCIUM	84
1. Préliminaires : que sait-on de l'interaction des détergents avec l'ATPase ?	84
2. Stabilisation de l'ATPase- Ca^{2+} solubilisée en détergent, détectée en fluorescence intrinsèque	86
3. Détermination, à partir des signaux de fluorescence intrinsèque, de l'affinité pour le Ca^{2+} de l'ATPase solubilisée	88
a. à pH 7	88
b. à pH 6	89

4. Confirmation par des mesures d'activité ATPasique de l'effet spécifique du $C_{12}E_8$ sur l'affinité pour le Ca^{2+} de l'ATPase solubilisée	91
5. Détermination, à partir des signaux de fluorescence intrinsèque, de l'affinité pour le Mg.ATP de l'ATPase solubilisée	91
III. APPLICATION A L'ETUDE, AVANT CRISTALLISATION, DES ENZYMES RECOMBINANTS SERCA1A SAUVAGE (WT) OU MUTES (D351A ET P312A), EXPRIMES DANS LA LEVURE <i>S. CEREVISIAE</i>	93
1. La mutation de l'aspartate catalytique en alanine s'accompagne d'une augmentation de l'affinité pour le nucléotide sans pour autant affecter l'affinité pour le calcium	94
2. La flexibilité de l'hélice transmembranaire M4 est peut-être un facteur limitant dans la transition « $Ca_2.E1-P$ » $\rightarrow$ « $E2-P$ »	95
3. De l'expression hétérologue des protéines membranaires à leur cristallisation ?	96
IV. UTILISATION D'UN AUTRE AGENT STABILISANT POTENTIEL : LA BÉTAÏNE	97
1. Protection par la bétaine de l'ATPase solubilisée en absence de Ca^{2+}	98
2. Protection par la bétaine de l'ATPase solubilisée en présence de Ca^{2+}	99
3. Quelques mots concernant une éventuelle caractérisation fonctionnelle de l'effet de la bétaine	100
V. CONCLUSIONS	100
1. A propos de l'effet des détergents	100
2. A propos de la fixation des ions calcium aux sites de transport	102
3. A propos, plus généralement, des enzymes recombinantes	104
MANUSCRIPT #2 : USE OF GLYCEROL-CONTAINING MEDIA TO STUDY THE INTRINSIC FLUORESCENCE PROPERTIES OF DETERGENT-SOLUBILIZED NATIVE OR EXPRESSED SERCA1A.	107
MANUSCRIPT #3 : CRYSTAL STRUCTURE OF D351A AND P312A MUTANT FORMS OF THE MAMMALIAN SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+}-ATPASE REVEAL KEY EVENTS IN PHOSPHORYLATION AND Ca^{2+} RELEASE.	109
MANUSCRIPT #4 : GLYCYL BETAINE SLOWS DOWN IRREVERSIBLE DENATURATION OF DETERGENT-SOLUBILIZED SERCA1A.	111
 CHAPITRE V : ETUDE D'UNE FORME PARTICULIERE DE L'ATPASE-Ca^{2+} MARQUEE AU FITC : MISE EN EVIDENCE D'UN TRANSFERT INATTENDU DE PHOSPHATE DE L'ASPARTATE D351 VERS LA FLUORESCÉINE LIÉE	113
I. LA FLUORESCÉINE, LE FITC, ET LA FORME A BASSE FLUORESCENCE DE L'ATPASE MARQUEE AU FITC	113
II. LE MYSTERE DE LA FORME A BASSE FLUORESCENCE (« LFS ») ELUCIDE 25 ANS APRES SA MISE EN EVIDENCE	115
III. IMPLICATIONS DE CES RESULTATS POUR L'INTERPRETATION DU CYCLE CATALYTIQUE	117
MANUSCRIPT #5 : UNEXPECTED PHOSPHORYL TRANSFER FROM ASP TO FLUORESCÉIN ATTACHED TO LYS515 IN SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+}-ATPASE.	121
 CHAPITRE VI : CARACTERISATION DE L'ASSOCIATION D'UN DIVALENT AVEC SES CHELATEURS POTENTIELS : EXEMPLES DU MAGNESIUM (Mg^{2+}) ET DU CADMIUM (Cd^{2+}).	123
I. INTERACTION DES DIVALENTS AVEC LES TAMPONS : LE CAS DU MAGNESIUM	123
1. Le problème soulevé par les résultats de Azab et al. (2001)	123
2. Titration de l'interaction d'un divalent avec ses chélateurs potentiels : principes, et résultats pour l'interaction du Mg^{2+} avec divers tampons	124
a. Association entre un métal et ses ligands, mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un colorant : exemple de l'interaction du Mg^{2+} avec les tampons, mesurée à l'aide de l'antipyrilazo III	124
b. Association entre un métal et ses ligands, étudiée par pH-métrie : l'interaction du Mg^{2+} avec les tampons	126
II. DETERMINATION DE LA NATURE DES COMPLEXES « Cd^{2+} -GSH » POUVANT ETRE MIS EN JEU DANS LES PROCESSUS DE DETOXICATION CELLULAIRE	130
1. Utilisation des propriétés spectroscopiques de la liaison entre un groupement sulfhydryl et un métal	130
2. Utilisation de sondes colorées ou fluorescentes pour titrer la quantité de cadmium libre en présence de glutathion	133
3. Titration par pH-métrie de la formation des complexes « Cd -GSH »	137
4. Discussion et conclusions	139
a. Chélation du cadmium par le glutathion <i>in vitro</i>	139

b. Chélation du cadmium par le glutathion <i>in vivo</i> ?	139
c. Chélation du cadmium par d'autres ligands potentiels	139
d. Conclusion	140
III. CONCLUSION GENERALE	141
MANUSCRIPT #6 : USE OF METALLOCHROMIC DYES AND POTENTIOMETRIC PH-METER TITRATION TO DETECT BINDING OF DIVALENT CATIONS TO "GOOD'S" BUFFERS: 4-MORPHOLINEPROPANESULFONIC ACID (MOPS) DOES NOT BIND Mg^{2+}.	143
MANUSCRIPT #7 METAL BINDING TO LIGANDS: CADMIUM COMPLEXES WITH GLUTATHIONE REVISITED.	145
CONCLUSION, ET QUELQUES PERSPECTIVES OU REMARQUES	147
I. BILAN GENERAL ET PERSPECTIVES	147
II. UN MOT SUPPLEMENTAIRE SUR LA FLUORESCENCE INTRINSEQUE DES TRYPTOPHANES	149
BIBLIOGRAPHIE	153

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. LA MEMBRANE BIOLOGIQUE ET SES CONSTITUANTS : SURVOL

1. Bref historique

Les membranes délimitent les cellules et leurs compartiments internes. Cette compartimentation est indispensable pour attribuer à chaque cellule ou organelle sa spécificité fonctionnelle. Toutefois, il ne s'agit pas d'une barrière totalement imperméable, le passage de divers solutés de part et d'autre d'une membrane donnée étant souvent nécessaire pour assurer la communication entre les divers compartiments au sein d'une même cellule, voire d'une cellule à une autre au sein d'un organe particulier ou d'un organisme complet.

Ces membranes sont essentiellement composées de lipides et de protéines insérées ou simplement associées à ses membranes, et ces constituants membranaires sont le plus souvent insolubles dans l'eau (et de ce fait, leur extraction nécessite l'utilisation de détergents afin de les stabiliser en solution aqueuse, voir [Chapitre IV](#)). En 1925, Gorter et Grendel proposaient le premier modèle de membrane biologique où, déjà, ils suggéraient une organisation des lipides en bicouche, avec les chaînes aliphatiques tournées vers le centre de la membrane et les têtes polaires au contact du solvant. Toutefois, ce modèle ne tenait pas compte de la présence des protéines (voir [figure I.01](#)). En 1935, Davson et Danielli reprenaient l'idée de la bicouche lipidique en proposant cette fois que les protéines puissent s'associer à la surface de la bicouche, et ce modèle devait rester utilisé pendant près de 40 ans. En 1972, Singer et Nicolson proposaient finalement un modèle de « mosaïque fluide » où les lipides étaient disposés en une bicouche fluide et où les protéines pouvaient être soit intrinsèques, *i.e.* insérées dans cette bicouche, soit extrinsèques, *i.e.* seulement en contact avec l'une des monocouches ([Singer and Nicolson 1972](#)). Ce modèle est actuellement celui qui est retenu par l'ensemble de la communauté scientifique. Depuis, le principal fait marquant concernant la structure de ces membranes a sans doute été la découverte des « radeaux lipidiques », communément appelés « rafts » ([Simons and Ikonen 1997](#)) : lors d'expériences de solubilisation de membranes plasmiques, des agrégats lipidiques avaient été observés comme insolubles dans le détergent Triton X100 classiquement utilisé pour ce type d'expérience ([Brown and Rose 1992](#)). Ces agrégats contenaient essentiellement des sphingolipides et du cholestérol. Les auteurs ont conclu à une certaine hétérogénéité de la membrane, dans laquelle ces deux types de lipides seraient ségrégés dans des sous-domaines se déplaçant librement, comme des « radeaux », dans la membrane fluide. Depuis, les discussions s'articulent autour de deux hypothèses différentes mais complémentaires : une première hypothèse décrit ce phénomène comme un simple problème physique, ces lipides particuliers subissant une ségrégation passive au sein de membranes principalement composées de glycérophospholipides; l'autre hypothèse attribue un rôle fonctionnel à ces radeaux lipidiques, qui pourraient être impliqués dans le recrutement de complexes protéiques spécifiques et dans l'adressage de certaines protéines aux membranes ([Rajendran and Simons 2005](#)).

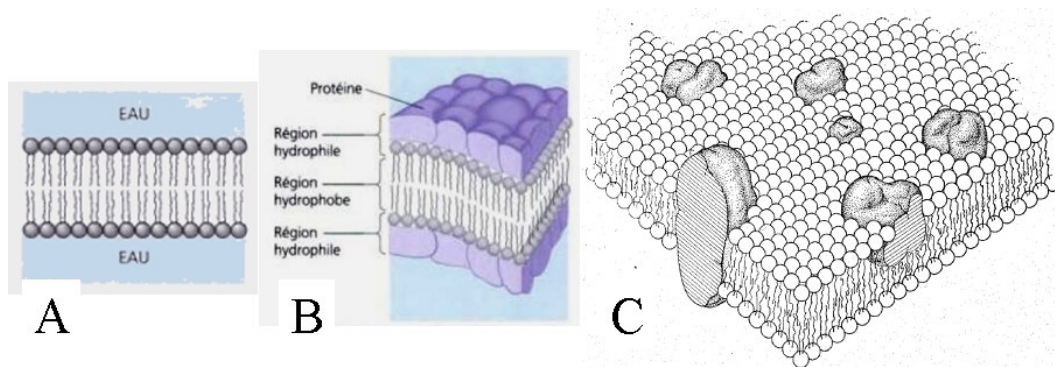


Figure I.01 : La membrane plasmique à travers les âges. A : Modèle de Gorter et Grendel (1925). B : modèle de Davson et Danielli (1935). C : Modèle de la « mosaïque fluide » de Singer et Nicolson (Singer and Nicolson 1972).

Je vais maintenant décrire rapidement les principaux constituants de ces membranes, les lipides et les protéines membranaires.

2. Quelques généralités sur les lipides

Les lipides des membranes sont des molécules amphiphiles, *i.e.* qui possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Dans les conditions physiologiques, ces lipides s'organisent en bicouches. De leurs propriétés physico-chimiques dépend la plasticité de la membrane ainsi que sa perméabilité sélective.

a. Nature et structure chimique

Par définition, on appelle « lipide » une molécule de poids moléculaire moyen (de 100 à 5000 Da) qui contient une forte proportion de chaînes aliphatiques ou de noyaux aromatiques. Dans la nature, on trouve des lipides neutres et des lipides polaires. Dans les membranes biologiques, le groupement polaire peut être de nature très varié (acide, amine, alcool, glycérol, glucide...), et les chaînes aliphatiques peuvent présenter des insaturations, *i.e.* des doubles liaisons de type $C=C$ dont la présence induit des propriétés dynamiques particulières pour la chaîne.

La plupart des lipides des membranes sont des di-acyl glycéro-phospholipides : la tête polaire est constituée d'un glycérol substitué en position 1 par un groupement phosphate et en position 2 et 3 par des chaînes aliphatiques. Le groupement phosphate peut lui-même être substitué par divers groupements chimiques (choline, éthanolamine, sérine, inositol...). On trouve aussi, mais de façon plus limitée, d'autres lipides comme les sphingolipides et les dérivés du cholestérol. Les sphingolipides les plus courants sont constitués d'un squelette sphingosine, substitué au niveau d'une amine par une chaîne aliphatique et au niveau de la fonction alcool primaire par un autre groupement chimique : s'il s'agit d'un phosphate lui-même associé à une choline, on parle de shingomyéline, s'il s'agit d'un sucre comme le galactose, on parle de cérébrosides. Ces deux lipides particuliers sont des éléments essentiels de la composition de la gaine de myéline au niveau des axones. Le cholestérol est présent dans sa forme de base dans les membranes, mais il peut également être substitué au niveau de sa fonction alcool par une chaîne aliphatique et servir comme précurseur dans la synthèse de certaines hormones stéroïdiennes (par exemple, le cholestéryl stéarate). A titre d'exemple, j'ai représenté quelques lipides dans la [figure I.02](#).

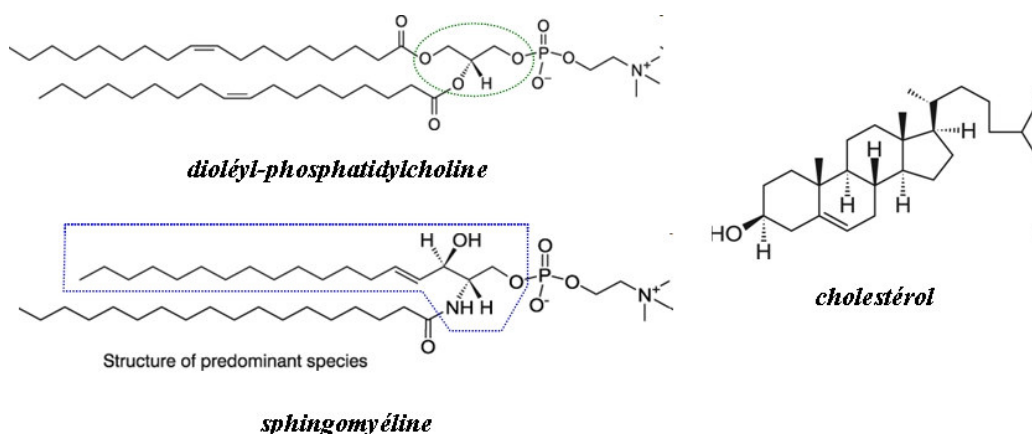


Figure I.02 : Exemples de lipides présents dans les membranes biologiques. A. *dioléyl-phosphatidylcholine (DOPC)* : la tête glycérol (*cerclée en pointillés verts*) est substituée en position 1 par la phosphocholine et en position 2 et 3 par des acides oléiques constitués de 18 carbones et portant une insaturation au niveau du carbone 9 (18:1 (Δ^9 -Cis)). B. *sphingomyéline* : le squelette sphingosine (*entouré de pointillés bleus*) est substitué au niveau de sa fonction alcool primaire par la phosphocholine et au niveau de sa fonction amine par un acide octadécanoïque saturé (18:0, appelé aussi acide stéarique). C. *cholestérol*. Les formules développées de ces lipides proviennent du site web de la société Avanti Polar Lipids (<http://www.avantilipids.com>).

b. Rôle des lipides dans la structure de la bicouche

Les lipides, en fonction de la longueur de leurs chaînes aliphatiques, de la taille de leur tête polaire et des conditions physicochimiques (température, pression...), sont capables d'adopter une grande variété d'organisations tridimensionnelles (Israelachvili and Mitchell 1975; Israelachvili, Mitchell et al. 1977). Cependant, dans les conditions physiologiques, les lipides s'organisent essentiellement en bicouche fluide. La [figure I.03](#) montre la répartition moyenne des fonctions chimiques dans l'épaisseur d'une bicouche de DOPC: la membrane a une épaisseur d'environ 50 à 60 Å, avec un cœur hydrophobe de l'ordre de 30 Å et, de part et d'autre du double feuillet, des zones d'interface d'une dizaine d'angströms, contenant les têtes polaires des phospholipides et les molécules d'eau. De cette répartition des polarités va dépendre le positionnement des protéines dans la bicouche. Je reviendrais plus loin sur l'impact de la phase membranaire sur les structures des protéines.

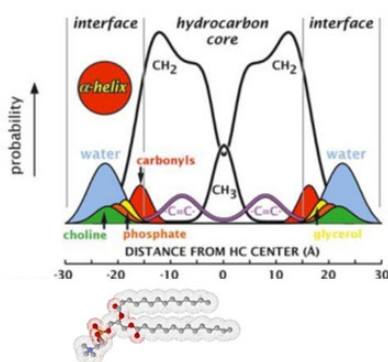


Figure I.03 : Répartition moyenne des fonctions chimiques dans une bicouche lipidique formée exclusivement de DOPC. L'abscisse indique la position des fonctions chimiques par rapport au centre de la membrane. Les ordonnées, en unités arbitraires, indiquent les probabilités avec laquelle les diverses fonctions chimiques vont occuper une position donnée : par exemple, les molécules d'eau se distribuent de 15 à 30 Å du centre de la bicouche. Une molécule de DOPC est schématisée en dessous de l'axe des abscisses pour montrer la répartition des groupes chimiques. Figure modifiée d'après (White 2001).

c. Autres rôles des lipides dans les diverses fonctions cellulaires

Au-delà de leur rôle dans la structuration des membranes, les lipides peuvent également jouer un rôle physiologique important. Par exemple, on sait que la phosphatidylsérine, un phospholipide anionique, va être exposée au feuillet externe de la membrane plasmique des cellules lorsque que celles-ci entrent en apoptose, et que cette exposition sera utilisée comme signal pour le système immunitaire afin d'éliminer la cellule (Kiss, Elliott et al. 2006). D'autres lipides vont être les substrats d'enzymes dont les produits seront les messagers de certaines voies

de signalisation : le phosphatidylinositol biphosphate, lipide minoritaire, est ainsi impliqué dans la transduction du signal parce que son hydrolyse par la phospholipase C conduit à la formation de diacylglycérol (DG) et d'inositol-triphosphate (IP_3) : le DG active certaines kinases et l' IP_3 induit la libération de calcium depuis les compartiments intracellulaires (Shechter 2000), le récepteur à l' IP_3 étant un récepteur-canal qui, après fixation d' IP_3 , laisse sortir le calcium du réticulum endoplasmique (Berridge 1993; Berridge 1993; Berridge, Lipp et al. 2000; Carafoli 2004). Certains lipides pourront également être des cofacteurs de protéines membranaires (Lee 2003; Lee 2004).

A cause de son épais cœur hydrophobe, une membrane purement lipidique serait une barrière difficilement franchissable pour les molécules hydrophiles. Heureusement, certaines protéines membranaires jouent un rôle primordial dans le passage des solutés ou des signaux de part et d'autre de la membrane.

3. Inventaire de divers types de protéines membranaires

Les protéines membranaires représentent 25 % des protéines codées par le génome : on dénombre environ 8000 protéines différentes chez l'homme (pour ~32000 protéines codées). Ces protéines sont impliquées dans des fonctions essentielles de communication entre les espaces délimités par la membrane : les transferts d'information (*via* notamment les récepteurs à signaux divers), les transferts d'énergie (*via* par exemple les complexes protéiques des chaînes de transfert d'électrons) et les transferts de matière (*via* les transporteurs et les canaux). Au travers des paragraphes qui vont suivre, je vais présenter rapidement les différentes familles de protéines mises en jeu dans ces transferts, en étant conscient que l'importance relative de ces différentes familles n'est pas reflétée par la place qui leur est allouée. J'accompagnerai la description de chaque famille d'un ou plusieurs exemples remarquables. Pour conclure, l'accent sera mis sur les transporteurs actifs, et plus particulièrement sur les ATPases de type P, dont l'ATPase SERCA1a qui nous intéresse ici est l'une des représentantes majeures.

a. Protéines impliquées dans les transferts d'information

Les récepteurs membranaires sont essentiels à la communication de la cellule avec le milieu environnant, y compris les autres cellules d'un organisme pluricellulaire. Ces récepteurs peuvent être classés selon trois grands groupes : les récepteurs canaux, les récepteurs à activité enzymatique et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

○ Les récepteurs canaux

L'interaction d'un ligand, souvent extracellulaire, avec ce type de récepteur, va conduire à un changement de conformation de la protéine et à l'ouverture d'une voie de passage au travers de la membrane. Pour cette raison, ces récepteurs appartiennent aussi au groupe des canaux à ouverture « ligand-dépendante ». L'un des représentants de cette famille de protéines est le récepteur nicotinique à l'acétylcholine : ce récepteur, essentiellement exprimé au niveau de la membrane post-synaptique, va fixer l'acétylcholine libérée depuis la cellule présynaptique. La fixation de l'acétylcholine induit alors l'ouverture d'un canal permettant aux ions (surtout sodium et potassium) de passer d'un côté à l'autre de la membrane et de créer ainsi localement un potentiel électrique (« potentiel d'action ») qui va ensuite se propager le long de l'axone (Unwin 2003). Depuis 2003, on dispose d'une structure à résolution atomique de ce récepteur (Miyazawa, Fujiyoshi et al. 2003; Unwin 2005) (voir figure I.04).

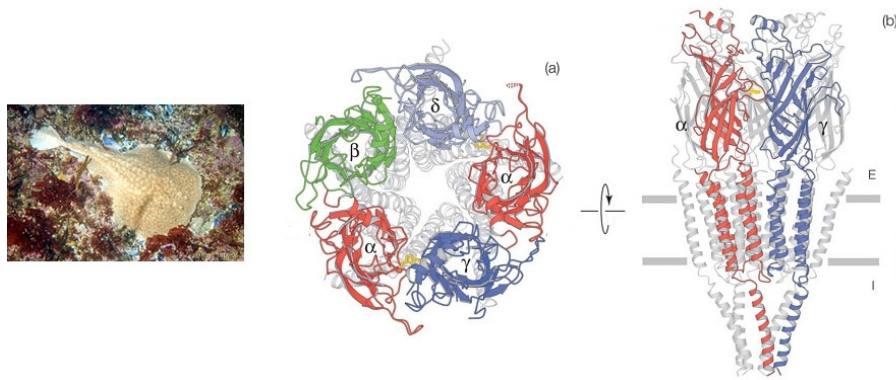


Figure I.04 : Structure (à 4 Å de résolution) du récepteur nicotinique à l'acétylcholine, obtenue par cristallographie en microscopie électronique et après affinage des données de diffraction (Unwin 2005). Le récepteur a été purifié à partir de membranes post-synaptiques de l'organe électrique du poisson électrique *Torpedo marmorata* (à gauche). Il s'agit d'un pentamère ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) avec pour chaque sous-unité, un domaine extracellulaire principalement replié en tonneaux β , deux passages transmembranaires en hélice α et une hélice α intracellulaire. (E), milieu extracellulaire ; (I), milieu intracellulaire.

○ Les récepteurs à activité enzymatique

L'interaction d'un ligand avec ce deuxième type de récepteur « active » le récepteur, qui va souvent s'autophosphoryler du côté cytosolique pour ensuite phosphoryler (ou déphosphoryler) une autre protéine en aval. En absence de ligand, le récepteur est le plus souvent monomérique ; la fixation du ligand permet un changement de conformation permettant la dimérisation du récepteur ; l'interaction des domaines cytosoliques va entraîner leur phosphorylation ; il s'ensuit alors la phosphorylation en aval d'une autre protéine de la cascade de signalisation cellulaire.

Cette famille de protéines regroupe les récepteurs à activité tyrosine kinase, notamment la plupart des récepteurs aux facteurs de croissance, impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire. On y trouve également le récepteur à l'insuline (qui est en permanence un hétéro-tétramère ! (Ward, Lawrence et al. 2008)), les récepteurs à activité tyrosine phosphatase (le récepteur CD45 des cellules B et T qui permet la stimulation de la réponse immune), les récepteurs à activité sérine ou thréonine kinase (les récepteurs de type « Transforming Growth Factor » TGF β , présents uniquement chez les vertébrés et particulièrement impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la formation osseuse), les récepteurs à activité guaninyl cyclase (qui n'ont pas d'activité kinase mais qui catalysent la synthèse de GMPc, impliqué dans la contraction/relaxation du muscle lisse et dans la transduction du signal visuel) et aussi un groupe de récepteurs qui n'ont pas d'activité enzymatique mais qui lient des enzymes solubles à activité tyrosine kinase (récepteurs aux interleukines par exemple).

○ Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Cette troisième famille de récepteurs est sans doute la plus grande famille de protéines membranaires, et on dénombre plusieurs centaines de ligands différents susceptibles de les activer. Ces protéines présentent un intérêt pharmacologique majeur puisque l'on estime que 25 à 40 % des traitements médicamenteux font intervenir un RCPG (Pebay-Peyroula 2008; Weis and Kobilka 2008). En général, le changement de conformation de la protéine faisant suite à son interaction avec son ligand active une protéine G sur la face interne de la membrane, protéine G qui va elle-même aller activer une autre protéine (membranaire ou soluble). Parmi ces récepteurs, on trouve notamment de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs, aux hormones peptidiques, ou à des molécules odorantes, l'activation de la protéine G conduisant à l'activation

finale de cibles tout aussi diverses, des adénycyclases, des phospholipases ou encore des canaux ioniques (Shechter 2000).

Le plus connu de ces RCPGs est sans aucun doute la rhodopsine. Pourtant son fonctionnement est différent de ce qui vient d'être décrit, puisque le fonctionnement de la rhodopsine ne fait pas intervenir un ligand, mais un photon : la rhodopsine est la protéine majeure de la membrane plasmique des cellules de la rétine de l'œil. Elle possède en son cœur une molécule de rétinol qui capte les photons, cette captation va entraîner l'activation de plusieurs protéines G et donc l'amplification du signal (Fung, Hurley et al. 1981). La structure de la rhodopsine a été obtenue par cristallographie à partir de la protéine extraite de l'œil de bœuf (Palczewski, Kumasaka et al. 2000). La figure I.05 présente cette structure. A cause son abondance dans le milieu naturel, cette protéine est utilisée comme modèle pour l'étude des autres RCPG qui ne sont pas aussi abondants.

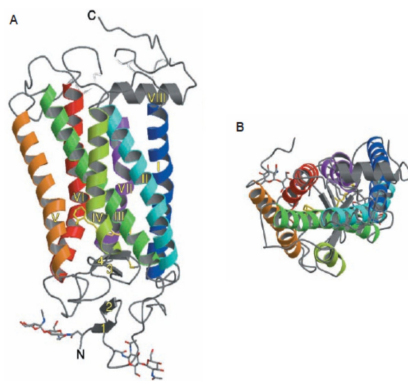


Figure I.05 : Structure à 2,8 Å de la rhodopsine de l'œil de bœuf, obtenue par cristallographie (Palczewski, Kumasaka et al. 2000). Il s'agit d'une protéine membranaire intrinsèque, avec 7 hélices transmembranaires. L'extrémité C-terminale se trouve du côté du cytosol. Le rétinol (*en jaune*) est situé au centre de la membrane, au cœur de la protéine. Ce rétinol capte les photons, subit une isomérisation conduisant à l'activation de la transducine, la protéine G cytosolique responsable de la transduction du signal visuel. (A), vue depuis la membrane ; (B), vue depuis le milieu extracellulaire, selon un axe perpendiculaire à la membrane.

b. Protéines impliquées dans les transferts d'énergies

Des bactéries à l'homme, en passant par les plantes, les cellules ont développé des chaînes de « transfert d'électrons », afin de synthétiser l'énergie nécessaire à leur fonctionnement et de régénérer les cofacteurs utilisés dans le catabolisme cellulaire. Ces chaînes correspondent à des séries de protéines (ou de complexes protéiques) membranaires dont les activités sont interdépendantes les unes des autres, le premier complexe de ces chaînes étant celui qui va capter l'énergie du milieu extérieur (photons, protons, électrons...).

○ Les chaînes de transfert d'électrons

Dans la cellule animale, la chaîne de transfert d'électrons, composée de 5 complexes protéiques (notés de I à V), est localisée à la membrane interne des mitochondries, au niveau des crêtes, et est communément appelée chaîne respiratoire : au niveau du premier complexe protéique, l'oxygène est utilisé pour ré-oxyder le NADH formé au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs, et les électrons libérés sont transférés au complexe protéique suivant (Dudkina, Sunderhaus et al. 2008). Il y a alors un couplage entre ce transfert d'électrons le long de la chaîne et un transport actif de protons par les complexes I, III et IV, depuis la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Ce phénomène conduit à l'instauration d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane. L'ATP synthase F₀-F₁ va utiliser cette force motrice, *i.e.* le retour des protons vers la matrice, pour synthétiser de l'ATP. Ces protéines et complexes protéiques sont particulièrement bien exprimés dans leurs membranes d'origine, ce qui a permis de procéder assez facilement à leur isolement. On dispose à ce jour de la structure à résolution atomique de la plupart de ces complexes protéiques (qui mettent en jeu de nombreux polypeptides, lipides et cofacteurs), obtenus à partir de cellules eucaryotes, de bactéries ou même de levures (pour référence, voir la *Stephen White's database for membrane protein of known 3D structure*, (White database updated monthly)). Seul le complexe I (la NADH-quinone oxydoréductase) n'a pas encore été cristallisé. De nombreuses bactéries non-photosynthétiques

utilisent des chaînes de transfert d'électrons très similaires, situées au niveau de la membrane plasmique, avec quelquefois des complexes qui peuvent être de tailles ou de natures différentes, voire être la fusion de deux complexes équivalents chez les eucaryotes. Les donneurs d'électrons initiaux et accepteurs finaux peuvent être différents, comme les bactéries du genre *Thiobacillus* qui peuvent utiliser soit les dérivés du soufre soit les ions ferreux comme donneurs d'électrons (Kelly, Shergill et al. 1997).

Chez les végétaux supérieurs et les bactéries photosynthétiques, le principe reste le même que pour la chaîne respiratoire, avec une série de quatre complexes protéiques. Cependant, il existe une différence majeure entre la provenance de l'énergie dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie et dans la chaîne photosynthétique. Dans la mitochondrie, les électrons transportés par la chaîne respiratoire proviennent de l'oxydation des nutriments. Ici, dans la photosynthèse, c'est l'énergie lumineuse, sous la forme de photons, qui va permettre l'activation de la chaîne de transfert d'électrons : une molécule de chlorophylle, associée au photosystème II (« PSII », qui est le premier complexe protéique mis en jeu dans cette chaîne de transfert d'électron) est excitée par les photons. Cette première chlorophylle excitée devient alors elle-même très réductrice et cède un électron à une molécule de phéophytine. Les transferts d'électrons résultant des différentes réactions d'oxydation entre les nombreux pigments associés au PSII résultent en un départ d'électrons du PSII. Ce déficit en électrons va être comblé par l'oxydation d'une molécule d'eau, catalysée par un agrégat constitué de quatre ions manganèses et d'un ion Ca^{2+} , et qui donne lieu à la libération de protons et de dioxygène dans le lumen (Rutherford and Boussac 2004 ; Goussias et al. 2002). Les électrons libérés par le PSII sont acheminés par des plastoquinones jusqu'au second complexe, le cytochrome b6f, où les réactions d'oxydo-réduction successives de nombreux cofacteurs vont également contribuer à l'instauration d'un gradient de protons entre le stroma et l'espace inter-membranaire. Ce gradient va être utilisé comme source d'énergie par une ATP synthase pour régénérer de l'ATP. Dans le même temps, et consécutivement à l'absorption d'un photon, le photosystème I (« PSI », le troisième complexe protéique de cette chaîne) va produire des électrons, utilisés via la ferrédoxine dans la régénération du pool de NADPH. A ce jour, on dispose de la structure à résolution atomique du photosystème II (Guskov, Kern et al. 2009), du cytochrome b6f (Kurusu, Zhang et al. 2003; Stroebel, Choquet et al. 2003) et du photosystème I (Jordan, Fromme et al. 2001).

○ Le cas particulier de la bactériorhodopsine

Dans des conditions limitantes en oxygène, l'archéobactérie *Halobacterium salinarum* développe une membrane particulière, la membrane pourpre¹, dans laquelle est surexprimée la bactériorhodopsine (BR). Avec ses 7 passages transmembranaires et la présence au centre de la protéine d'une molécule de rétinol, la BR est un homologue structural de la rhodopsine des eucaryotes. Ici, la création d'un gradient de protons nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase n'est pas couplée à un transfert d'électron : la protéine capte les photons *via* le rétinol qui va être isomérisé d'une forme all-trans à une forme cis, et c'est cette isomérisation qui va induire le relargage de protons (Pebay-Peyroula, Rummel et al. 1997 ; Pebay-Peyroula, Neutze et al. 2000; Neutze, Pebay-Peyroula et al. 2002).

c. Protéines impliquées dans les transferts de matière

Le transport de molécules au travers des membranes cellulaires est un processus essentiel qui inclut la prise en charge de nutriments et les échanges ioniques avec le milieu extérieur, l'efflux d'une grande variété de molécules, la sécrétion de protéines et probablement bien d'autres fonctions encore non démontrées à ce jour. La [figure I.06](#) résume les différents types de transport

¹ L'archéobactérie *Halobacterium salinarum* est halotolérante, i.e. elle se développe dans des milieux à très forte salinité. Le rétinol de la BR absorbe à 550-570 nm, donnant aux membranes de la bactérie leur couleur pourpre. Quelquefois, les tas de sels au bord des marais salants apparaissent de couleur rose : ceci révèle la présence d'*Halobacterium salinarum*.

connus. L'un des premiers constats en regardant cette figure est que la cellule est un milieu complexe qui n'est jamais vraiment à l'équilibre et qui assure une multiplicité d'échanges entre le cytosol et le compartiment extracellulaire, et également entre les différents compartiments internes.

En général, ces protéines ont pour fonction de transporter spécifiquement un unique soluté, ou un tout petit nombre de solutés. Il peut ainsi y avoir compétition entre divers solutés pour leur transport. Par exemple, l'ATPase- Ca^{2+} qui est une ATPase de transport catalysant le transport du calcium du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique, peut également transporter du strontium (Sr^{2+} , (Mermier and Hasselbach 1976; Guimaraes-Motta, Sande-Lemos et al. 1984; Holguin 1986)) ou du manganèse (Mn^{2+} , (Chiesi and Inesi 1980)), et il y a compétition entre le calcium et ces autres cations divalents. Certains transporteurs sont par contre capables de prendre en charge une très grande variété de molécules de formules chimiques différentes : c'est le cas des transporteurs multispécifiques de la famille des transporteurs de type ABC (voir ci-après §I.4.).

La concentration d'un soluté est évidemment un facteur limitant de son transport. En effet, son association avec la protéine est régie selon les règles fondamentales de tout équilibre, avec une constante d'association (voir Chap. II et Chap. VI). Si la concentration en ligand est trop faible par rapport à l'affinité du transporteur pour ce ligand, le transport sera ralenti voire inexistant.

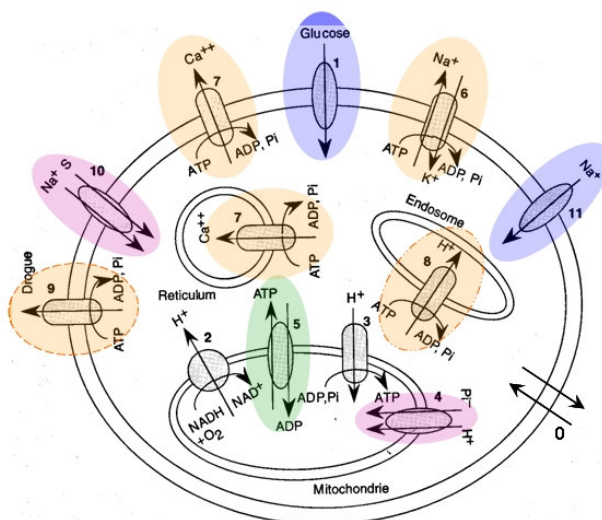


Figure I.06 : Quelques exemples de transports membranaires dans la cellule animale (adaptée d'après (Shechter 2000)).

Les mécanismes d'entrée à l'intérieur de la cellule sont nombreux, différents et souvent spécifiques d'une espèce donnée. Plusieurs mécanismes sont évoqués ici. *Le phénomène de diffusion passive* : il concerne certaines molécules le plus souvent amphiphiles qui vont pouvoir traverser la membrane sans l'aide d'une protéine (0). *Le transport passif par diffusion facilitée (en bleu)* : par exemple l'importateur du glucose (1) ou encore les canaux ioniques. *Le transport par échange (en vert)* : l'ATP/ADP translocase, par exemple, permet la sortie de l'ATP produit dans la mitochondrie, tout en assurant l'entrée d'ADP (5). *Le transport par co-transport (symport, en rose)* : par exemple, l'importateur du phosphate dans la mitochondrie (4) et de la plupart des importateurs de nutriments (*S pour substrats*) présents à la membrane plasmique (10), comme la lactose perméase (LacY) qui co-transporte le lactose avec un proton. *Les transporteurs actifs* : par exemple, les ATPases de transport ionique de type P (6, 7), l'ATPase ionique vacuolaire (8) ou encore les transporteurs d'import ou d'export de type ABC (9). Certains complexes de la chaîne de transfert d'électrons (NADH-quinone oxydoréductase (2), l'ATP synthase F0-F1 (3)) peuvent être assimilés à des transporteurs de protons.

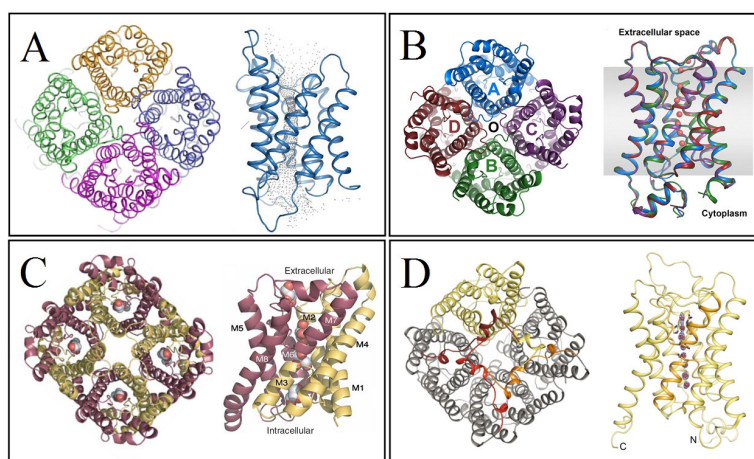
○ Transport passif par diffusion facilitée

Le transport passif par diffusion facilitée concerne des protéines qui laissent passer les solutés dans le sens imposé par le gradient électrochimique, sans nécessiter l'apport d'énergie. Ce groupe de transporteurs rassemble les canaux aqueux, certains transporteurs de nutriments comme l'importateur du glucose, ainsi que la grande famille des canaux ioniques. Je vais

présenter ici plus particulièrement les canaux aqueux que sont les aquaporines et le canal mécanosensible MscL.

L'eau est une ressource fondamentale de la cellule pour son bon fonctionnement. Les échanges en eau doivent être nombreux pour permettre le maintien de l'équilibre osmotique et l'hydratation de l'ensemble de l'organisme. Pour cela, les cellules ont développé divers systèmes protéiques membranaires afin de permettre ces échanges et les réguler.

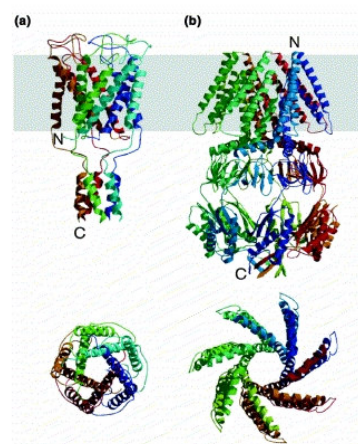
En 1992, l'équipe de P. Agre a décrit une nouvelle famille de « canaux » à eau, qui seront rapidement appelée les aquaporines (Preston, Carroll et al. 1992). Ces protéines interdisent généralement le passage des ions au travers du pore et semblent assurer le passage spécifique de l'eau, en restant ouvertes de façon stable (sans fluctuations, voir plus loin). Cependant, certaines isoformes, comme l'AQP3 humaine ou l'AQP1 de *Plasmodium falciparum*, semblent capable de laisser passer également l'urée ou le glycérol (Meinild, Klaerke et al. 1998; Newby, O'Connell et al. 2008). On dispose de nombreuses informations structurales, depuis la première structure obtenue par diffraction des rayons X en 2000 (Murata, Mitsuoka et al. 2000) : près d'une vingtaine d'autres ont suivi (White database updated monthly). La figure I.07 donne un aperçu de ces structures : sans entrer dans le détail du fonctionnement de ces transporteurs, le premier point frappant est de constater l'incroyable conservation des structures d'un règne à un autre, attestant du fait qu'en biologie, les structures efficaces dans son fonctionnement sont conservées au cours de l'évolution (même si les séquences peptidiques peuvent être très différentes). Il faut saluer cette année la publication de la structure de l'aquaporine « Aqp1 » de la levure *Pichia pastoris*, obtenue après surexpression homologue, tout d'abord parce qu'il s'agit de la première aquaporine de levure cristallisée mais surtout parce que sa structure a été obtenue à une résolution de 1,15 Å, inégalée jusqu'à aujourd'hui pour les protéines membranaires (Fischer, Kosinska-Eriksson et al. 2009). Cette excellente résolution a permis tout particulièrement d'attribuer précisément la position des chaînes latérales de la protéine ainsi que la position de nombreuses molécules d'eau, et ainsi de suivre « pas à pas » le cheminement des molécules au travers de la protéine.



L'autre grande famille de protéines membranaires réalisant le transport passif par diffusion facilitée est la famille des canaux fluctuant entre conformations ouvertes et conformations fermées. Ces protéines sont spécialisées dans le transport d'ions et de petits solutés. Cette famille est divisée en trois sous-familles. La première sous-famille correspond aux canaux voltage-dépendants : leur ouverture est induite par un changement de potentiel membranaire. Parmi ces canaux, on trouve par exemple les canaux sodiques et potassiques impliqués dans la transmission de l'influx nerveux. La seconde sous-famille renferme les canaux ligands-dépendants qui sont assimilés aux récepteurs canaux (voir [ci-dessus, §1.3.a.](#)), ces récepteurs s'ouvrant après fixation d'un ligand.

La troisième sous-famille correspond aux canaux mécanosensibles dont l'ouverture est induite par un changement de tension dans la membrane. Comme on l'a dit plus haut, ce sont des aquaporines qui assurent le transport de l'eau en régime stationnaire. Cependant, afin de supporter d'éventuels changements brusques de leur volume qui risqueraient de conduire à la rupture de la membrane et donc à la lyse cellulaire, les cellules (et surtout les procaryotes) ont développé des protéines fonctionnant comme des « soupapes de sécurité » : les canaux mécanosensibles. La bactérie *E. coli* possède ainsi dans sa membrane plasmique des canaux mécanosensibles parmi lesquels on trouve la protéine MscL (pour Mechano-sensitive channels of Large conductance). En condition hyper-osmotique, *i.e.* lorsque la concentration en solutés du milieu externe est supérieure à la concentration interne, la bactérie, afin d'éviter de perdre son eau, accumule des molécules dites osmoprotectantes qui peuvent être des sucres (tréhalose), la glycine-bétaïne (voir [Chap. IV, §IV](#)) ou du glutamate. Lors d'un choc hypo-osmotique, la bactérie doit immédiatement contrebalancer l'entrée massive d'eau pour ne pas éclater : l'augmentation de la tension de la membrane plasmique liée à l'augmentation de volume de la bactérie va déclencher l'ouverture des canaux mécanosensibles comme le MscL, qui vont laisser ressortir rapidement l'eau et d'autres solutés de la cellule afin de réduire la pression osmotique ([Perozo and Rees 2003](#); [Corry and Martinac 2008](#)). La protéine MscL fut purifiée pour la première fois en 1994 ([Sukharev, Blount et al. 1994](#)) et fut également la première protéine membranaire produite en système hétérologue dont la structure a été résolue à résolution atomique ([Chang, Spencer et al. 1998](#)). Ce canal fut également la première protéine membranaire à être exprimée dans un système *in vitro* ([Berrier, Park et al. 2004](#)). Un autre canal mécanosensible, le canal MscS (pour Mécanosensible ion channels of Small conductance) a été cloné puis cristallisé peu de temps après ([Levina, Totemeyer et al. 1999](#); [Bass, Strop et al. 2002](#)). La [figure I.08](#) compare rapidement la structure de ces deux canaux mécanosensibles.

Figure I.08 : Structures tridimensionnelles des canaux mécanosensibles bactériens MscL (a, ([Chang, Spencer et al. 1998](#))) et MscS (b, ([Bass, Strop et al. 2002](#))). La partie haute de la figure montre les canaux observés depuis la membrane (zone grisée), la partie basse montre une coupe du domaine transmembranaire de ces protéines, observé selon un axe perpendiculaire à la membrane. Depuis cette vue, on peut deviner le canal central, ici en position close. Les chaînes polypeptidiques sont symbolisées par des rubans. Ces deux protéines membranaires sont des homo-pentamères. Chaque monomère est coloré d'une façon différente. Figure adaptée d'après ([Perozo and Rees 2003](#)).



Le canal MscL est sans aucun doute le plus étudié de ces canaux mécanosensibles. Il a été très largement utilisé comme modèle pour caractériser l'interaction de la membrane avec les protéines membranaires, notamment par fluorescence. Les protéines qui le composent sont en

effet dotées d'une fluorescence intrinsèque surtout due à la présence de résidus tryptophanes, dont le niveau de fluorescence est sensible à leur environnement direct. Pour les protéines membranaires, ces tryptophanes sont très souvent placés en périphérie du domaine membranaire, au contact des lipides. En fonction des changements de conformation de la protéine, les hélices membranaires bougent et le niveau de fluorescence des tryptophanes peut alors en être affecté et ainsi renseigner sur la proximité des lipides (voir [Chap. IV](#)). Les canaux MscL contiennent en général peu de tryptophanes dans leur séquence, ceux de *E. coli* ou *M. tuberculosis* n'en contiennent aucun ([Powl, East et al. 2003](#)). Par mutagenèse dirigée, un résidu tryptophane a pu être inséré en différentes positions dans la protéine et les signaux de fluorescence résultant de cet ajout ont été décrits, pour diverses compositions en lipides de la membrane. Les auteurs ont notamment montré l'existence de sites fixation préférentielle de phospholipides anioniques (comme l'acide phosphatidique), ainsi qu'une certaine dissymétrie entre les types de lipides se trouvant sur l'un ou l'autre des deux feuillets de la membrane, au contact de la protéine ([Powl, Carney et al. 2005](#); [Powl, East et al. 2005](#)).

Pour finir, je citerai rapidement les porines, qui constituent une classe un peu particulière de protéines de transport facilité. La majorité d'entre elles sont trouvées dans la membrane externe des bactéries et sont impliquées dans l'import ou l'export de nutriments. L'une de leurs particularités est leur repliement en tonneau beta, qui fut pour la première fois révélé en 1992 avec la cristallisation de la protéine OmpF de *Rhodobacter capsulatus* ([Cowan, Schirmer et al. 1992](#)). Ce n'est que très récemment qu'a été obtenue la structure de la première porine eucaryote, la protéine VDAC (voltage-dependent anion channel) présente dans la membrane externe mitochondriale et impliquée dans le transport d'une grande variété de molécules qui entrent ou sortent de la mitochondrie ([Ujwal, Cascio et al. 2008](#)).

○ Echange

Certains transports se font avec échange obligatoire d'un autre soluté, transporté dans le sens inverse ; l'un des deux solutés suit alors le sens imposé par le gradient électrochimique, et l'autre peut soit faire de même soit « remonter » son propre gradient électrochimique. L'une des protéines bien caractérisées de ce groupe est l'ATP/ADP translocase (AAC pour ATP/ADP carrier), qui permet l'export vers le cytosol de l'ATP produit dans la matrice mitochondriale, tout en assurant l'entrée d'ADP ([Pebay-Peyroula and Brandolin 2004](#)) ([figure I.09](#)). Cette protéine représente environ 10 % des protéines de la membrane interne de la mitochondrie dans les cellules cardiaque, ce qui a facilité son isolement, sa caractérisation fonctionnelle et plus récemment sa cristallisation ([Pebay-Peyroula, Dahout-Gonzalez et al. 2003](#)). L'état d'oligomérisation de cette protéine dans la membrane native a donné lieu à de nombreuses discussions (les hypothèses étant variées à ce sujet, allant d'une organisation en monomères à une organisation en tétramères, voire en assemblages supramoléculaires beaucoup plus importants). De récents travaux ont montré que l'état d'oligomérisation est fortement influencé par les conditions de solubilisation de la protéine (nature du détergent, concentration), ce qui permet sans doute d'expliquer la plupart des résultats accumulés depuis la découverte de la protéine, sans pour autant répondre précisément à la question ([Nury, Manon et al. 2008](#)).

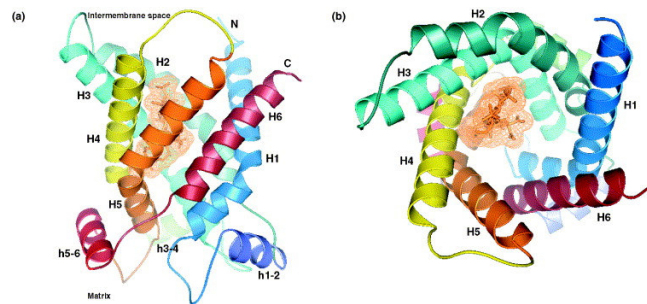


Figure I.09 : Structure tridimensionnelle de l'ATP/ADP translocase du cœur de bœuf (Pebay-Peyroula, Dahout-Gonzalez et al. 2003). L'ATP/ADP translocase est une protéine membranaire à 6 passages transmembranaires. Elle a été ici cristallisée en présence d'un inhibiteur spécifique, le carboxy-atractyloside (CATR, en orange au centre de la protéine), qui vient occuper le site de fixation du nucléotide. A, vue depuis la membrane. B, vue depuis l'espace intermembranaire.

On trouve également dans ce groupe l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*NCX exchanger*) de la membrane plasmique, impliqué dans la régulation de la concentration intracellulaire en calcium (Ottolia, John et al. 2007; Kimura, Ono et al. 2009). Cet échangeur utilise le gradient de sodium ($[\text{Na}^+]_{\text{extracellulaire}} > [\text{Na}^+]_{\text{intracellulaire}}$) pour permettre la sortie du calcium : pour chaque ion calcium ainsi expulsé hors de la cellule, trois ions sodium rentrent. La régulation du calcium cytosolique sera abordée brièvement dans un chapitre ultérieur (voir §5.c.).

○ Co-transport

Les transporteurs passifs par co-transport (symport) couplent le transport d'un soluté avec le transport d'un Na^+ ou H^+ dans la même direction. C'est le cas de l'importateur du phosphate dans la mitochondrie (4) et de la plupart des importateurs de nutriments (S pour substrats) présents dans la membrane plasmique (10), comme la lactose perméase (LacY) qui co-transporte le lactose en tirant profit du gradient électrochimique de protons. Cette famille de protéines membranaires est la deuxième plus importante après celle des transporteurs actifs de type ABC (voir ci-après, §I.4.) (Saier, Beatty et al. 1999). La structure tridimensionnelle de la lactose perméase de la bactérie *E. coli* a été obtenue en 2003 (Abramson, Smirnova et al. 2003) en présence d'un analogue du lactose. Une caractéristique étonnante de cette protéine est sa dépendance vis-à-vis d'un lipide, la phosphatidyléthanolamine (PE) : le groupe de W. Dowhan a montré que le repliement de la lactose perméase ne pouvait être correct qu'en présence de PE (Bogdanov and Dowhan 1995; Bogdanov, Sun et al. 1996; Bogdanov, Umeda et al. 1999). La protéine surexprimée et purifiée en absence de PE peut cependant être ré-activée *in vitro* par ajout du lipide (Bogdanov and Dowhan 1998). L'importance des lipides chargés (anionique ou cationique) dans le repliement des protéines membranaires est un fait discuté depuis de nombreuses années (von Heijne 1986; van Klompenburg, Nilsson et al. 1997), et donc apparemment confirmé ici pour le repliement de Lac Y (pour revue, voir (Dowhan and Bogdanov 2009)).

○ Transport actif

Les transporteurs actifs catalysent le transport d'un soluté contre son gradient électrochimique, en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Parmi ces transporteurs, on trouve les ATPases de transport ionique de type P, l'ATPase à protons vacuolaire ou encore les transporteurs (d'import ou d'export) de type ABC. Les paragraphes suivants vont développer tout particulièrement deux de ces trois types de protéines : i) les ATPases de la famille ABC auxquelles je me suis intéressé au cours de mon année de Master et à propos desquelles je me suis intéressé à la caractérisation des complexes que forme le cadmium avec le glutathion (voir Chap. VI, §II), ii) et les ATPases de type P, avec notamment l'ATPase-

Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique dont l'étude structurale et fonctionnelle a été au cœur de ces trois années de doctorat.

4. Exemple de la famille des transporteurs de type ABC

Les systèmes de transport à « ATP Binding Cassette » (ABC) constituent la plus grande famille de transporteurs membranaires, et on les retrouve dans tout le règne du vivant (pour revue, voir (Higgins 1992; Rees, Johnson et al. 2009)). Les transporteurs de cette famille utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour catalyser l'import ou l'export unidirectionnel au travers des membranes d'une variété considérable de substrats, des ions jusqu'aux macromolécules. A ce jour, on ne connaît des systèmes ABC d'import que chez les procaryotes, alors que les systèmes ABC d'export sont présents dans tout le vivant.

Les transporteurs ABC sont importants du fait de leur implication dans de nombreuses manifestations pathologiques. Ils peuvent être inactivés par une mutation, cette mutation provoquant une maladie génétique : c'est par exemple le cas de la mutation du résidu F508 du transporteur de chlore CFTR, à l'origine des déficiences liées à la mucoviscidose. Aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes, ils peuvent être également surexprimés, par exemple en réponse à des traitements médicamenteux, et ils induisent alors des phénomènes de résistance à ces médicaments. Chez l'homme, la surexpression des transporteurs multi-spécifiques (*i.e.* capable de transporter une très grande variété de molécules), la « *P-glycoprotéine* » (P-gp) et la « *Multidrug associated Resistance Protein-1* » (MRP1) entre autres, conduit ainsi au développement de résistances « multi-spécifiques » des cellules tumorales aux molécules cytotoxiques (MDR), ce qui expliquerait la majorité des échecs thérapeutiques de chimiothérapies anti-tumorales (Gottesman and Ambudkar 2001).

a. Structure des transporteurs de type ABC

Au cours de ces dernières années, le nombre de structures à résolution atomique de transporteurs ABC n'a cessé de croître. On compte à ce jour 10 structures de protéines différentes, dont 7 systèmes d'import et 3 systèmes d'export (Aller, Yu et al. 2009; Rees, Johnson et al. 2009). Le premier succès doit être attribué² au groupe du Pr D.C. Rees qui publia en 2002, avec le Dr K. Locher, la structure de l'importateur de la vitamine B₁₂ de la bactérie *E. coli* (Locher, Lee et al. 2002).

² Jusqu'en 2006, le premier succès était attribué à Goeffrey Chang avec la publication en 2001 de la structure du transporteur de lipide bactérien, MsbA (Chang, 2001). Cependant, ces travaux ont fait l'objet d'une demande de rétractation en 2006 (Chang, 2006), le programme « maison » utilisé pour l'interprétation des données de diffraction des rayons X par les cristaux (Chang, 2001 ; Chang, 2003 ; Pornillos, 2005) ayant introduit des erreurs dans les structures déduites. Après correction, les données initiales ont été réinterprétées récemment (Chang, 2007 ; Ward, 2007), avec un repliement en accord avec les structures de K. Locher.

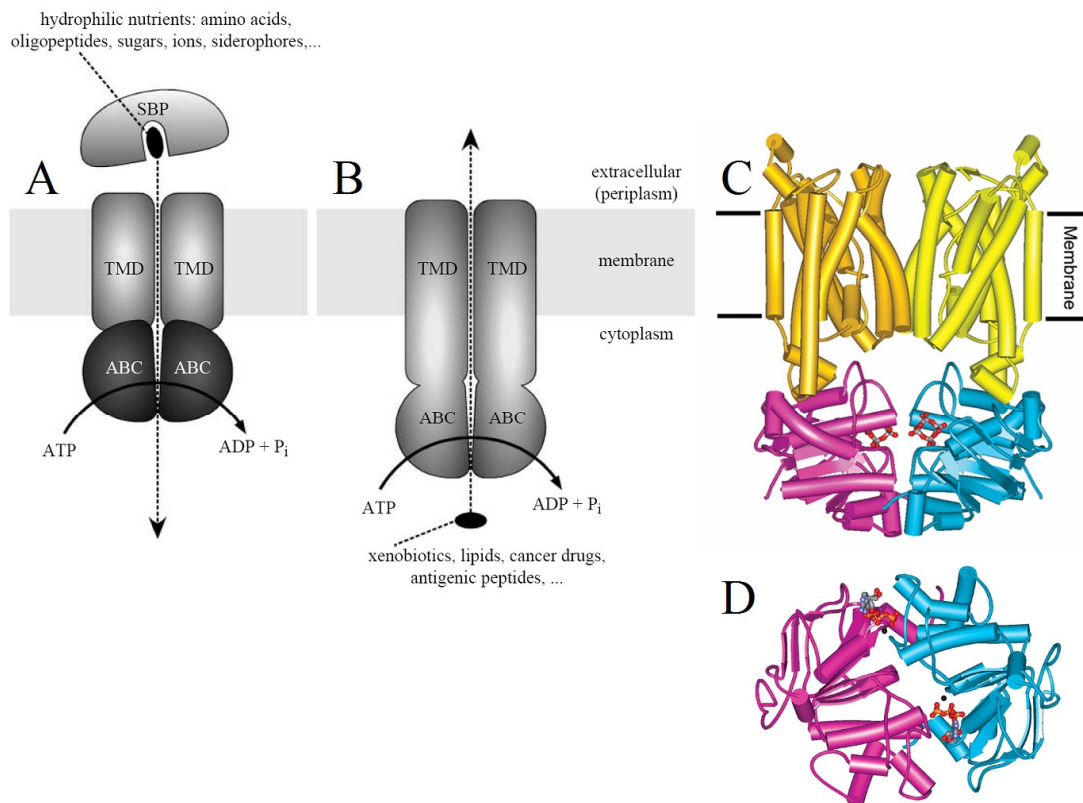


Figure I.10 : Structure tridimensionnelle des transporteurs de type ABC. *A & B : Structure schématique des transporteurs de type ABC. A, transporteurs d'import. Ces transporteurs n'ont jusqu'ici été identifiés que chez les procaryotes. Dans ces transporteurs, les domaines de fixation des nucléotides (NBD) sont des protéines distinctes, qui catalysent l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au passage du substrat de transport du périplasma vers le cytosol. Ces transporteurs d'import font intervenir une protéine accessoire (SBP, substrate binding protein) pour la prise en charge du substrat dans le périplasma et son acheminement vers le site de fixation membranaire. B, transporteurs d'export. Dans ces transporteurs, les domaines de fixation des nucléotides sont fusionnés aux domaines membranaires. Les substrats de transport sont pris en charge côté cytosolique, du côté des NBDs, et expulsés à l'extérieur de la cellule. C & D, un exemple: le complexe BtuCD d'import de la vitamine B₁₂. C, les deux TMDs (BtuC) et les deux NBDs (BtuD) forment l'hétérotétramère symétrique (BtuCD). Les TMDs sont représentés en jaune et orangé. Les NBDs sont colorés en bleu et rose. Chaque TMD est composé de 10 hélices transmembranaires et l'ensemble forme dans la membrane une cavité ouverte vers le milieu extracellulaire. Les NBDs s'associent tête-bêche, mettant en contact leurs sites de fixation des nucléotides. D, les domaines de liaison des nucléotides, vus selon un axe perpendiculaire à la membrane. Les deux molécules d'ATP avec leurs atomes de magnésium liés (sphères noires) sont prises en « sandwich » à l'interface du dimère. Leur positionnement est coordonné par des résidus appartenant aux deux domaines. Figures adaptées de (Locher 2009) et (Higgins and Linton 2004).*

Cette structure et les suivantes ont confirmé une organisation symétrique de ces protéines (figure I.10). On trouve deux domaines transmembranaires (TMD, TransMembrane Domains) de taille variable, avec 10 à 14 hélices transmembranaires par domaine selon la protéine ; on trouve aussi deux domaines de liaison du nucléotide (NBD, Nucleotide Binding Domains) se faisant face. Ces derniers contiennent les deux motifs de Walker (Walker A et B ; (Walker, Saraste et al. 1982)) présents dans de nombreuses protéines fixant l'ATP et un motif LSGGQ rapporté comme étant la signature spécifique des protéines de la famille ABC. Les nucléotides sont piégés à l'interface des deux NBDs par des résidus de ces deux domaines impliqués à la fois dans la fixation et la catalyse des deux molécules. Ces données structurales ont permis à différents groupes de proposer des modèles pour le mécanisme de transport par ces transporteurs ABC (Locher 2009).

Récemment, la première structure à résolution atomique d'un transporteur ABC de mammifère a été publiée : il s'agit de la structure de la P-glycoprotéine (P-gp) de la souris (Aller, Yu et al. 2009). Cette structure représente une avancée majeure dans la compréhension du

transport d'une multiplicité de substrats par la même protéine, et donc *in vivo* du phénotype de résistance multiple aux drogues (MDR, Multidrug Resistance ; voir plus haut).

b. Rôle de certains transporteurs ABC pour la détoxification des métaux lourds

Les métaux « lourds » (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} ...), peuvent être toxiques pour la cellule (pour revue voir (Jarup 2003)). Par exemple, l'un des effets majeurs du cadmium (Cd^{2+}) est d'entrer en compétition avec le zinc : le Cd^{2+} perturbe l'activité de nombreuses enzymes en allant se fixer au niveau des motifs de reconnaissance des acides nucléiques (« doigts de zinc »). La présence de cadmium, par ailleurs, induit un stress oxydant au niveau du cytosol. Ces effets toxiques sont en général neutralisés par chélation du cadmium au glutathion (Hughes and Poole 1991).

Certains des transporteurs « de type ABC », dont la protéine Yor1p, un transporteur de la levure *S. cerevisiae* (Nagy, Montigny et al. 2006) que j'avais commencé à étudier durant mon année de Master, sont susceptibles de participer à la détoxification des métaux lourds, notamment du cadmium, après une interaction préliminaire du cadmium avec le glutathion.

○ Le rôle du glutathion dans la détoxification du cadmium

Découvert il y a plus d'un siècle par un chimiste français (de Rey-Pailhade 1888; Meister 1988), le glutathion (GSH : L- γ -glutamyl-L-cystéinyl glycine, figure I.11) est une molécule que l'on retrouve des procaryotes jusqu'aux eucaryotes supérieurs, chez les animaux comme chez les plantes. Il est présent dans le cytosol des cellules à des concentrations allant de quelques dizaines de micromolaires à plusieurs dizaines de millimolaires. Son rôle principal semble être de protéger la cellule des espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres et peroxydes) *via* sa fonction sulfhydryle, qui lui confère un fort pouvoir antioxydant.

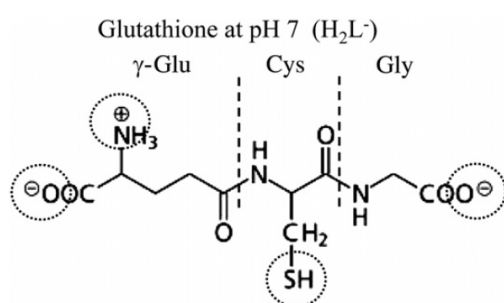


Figure I.11 : Forme prédominante du glutathion, à pH physiologique. A pH 7, le glutathion présente deux charges négatives, portées par les groupements carboxyl ($\text{pK}_a = 2,1$ et $3,5$), ainsi qu'une charge positive, due à la protonation de la fonction ammonium ($\text{pK}_a = 8,6$). La fonction sulfhydryle reste protonée dans ces conditions ($\text{pK}_a = 9,5$). On définit donc cette espèce comme la forme H_2L^- du glutathion (l'écriture « GSH » fait traditionnellement référence à la protonation du groupe sulfhydryl). Figure issue de (Leverrier, Montigny et al. 2007). Pour les valeurs de constantes d'acidité, voir (Martell and Smith 1982). NB : La forme oxydée du glutathion, GSSG, non représentée ici, résulte de la liaison covalente de deux GSH *via* la fonction sulfhydryl.

Parmi ses nombreux autres rôles dans le métabolisme cellulaire, le glutathion a une grande importance dans les processus de détoxification cellulaire parce qu'il est susceptible d'être couplé chimiquement à certaines molécules toxiques, afin de permettre soit l'efflux de ces dernières dans le milieu extracellulaire, soit l'accumulation de ces complexes dans la vacuole (chez les levures et les plantes). Les métaux lourds, notamment, et en particulier le cadmium, semble être éliminés de la cellule *via* des voies de détoxification dépendant du glutathion (pour revue voir (Meister 1988; Penninckx 2002)) : la délétion des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse du GSH rend en effet les cellules sensibles à la présence de métaux lourds, et notamment au cadmium (pour revue, voir (Leslie, Deeley et al. 2005)). La détermination des formes particulières sous lesquelles le cadmium peut se complexer au glutathion est évidemment une étape importante pour la compréhension de ces phénomènes de détoxification dépendant du glutathion. Cette détoxification est médiée par un transporteur membranaire, la protéine MRP1.

○ Détoxification du cadmium par la protéine MRP1

La protéine MRP1 est un transporteur exprimé dans la membrane plasmique par de nombreuses cellules eucaryotes supérieures. Cette protéine est impliquée dans la détoxification cellulaire, car elle réalise l'efflux actif de nombreux composés cytotoxiques, de tailles et de natures très différentes mais toujours conjugués au glutathion (GSH) (Leier, Jedlitschky et al. 1994; Muller, Meijer et al. 1994). Il a été démontré qu'elle peut également exporter le glutathion oxydé (GSSG) (Leier, Jedlitschky et al. 1996).

La délétion du gène codant la protéine MRP1 rend les cellules sensibles à la présence de métaux lourds, et notamment au cadmium. Cependant, il n'a pas été montré de façon indiscutable que cet effet protecteur de MRP1 vis-à-vis des métaux lourds était lié à sa capacité à transporter ces métaux à l'extérieur de la cellule (pour revue, voir (Leslie, Deeley et al. 2005; Ballatori, Krance et al. 2009)). Néanmoins, chez la levure *S. cerevisiae*, il existe deux protéines homologues, Yor1p et Ycf1p, qui présentent respectivement 33 et 32% d'homologie de séquence avec hMRP1 (les profils d'hydrophobicité réalisés à partir de leurs séquences sont similaires pour les trois protéines, avec une prédiction de 17 passages transmembranaires (Cui, Hirata et al. 1996)), et il a été démontré que la protéine Ycf1p, elle, normalement exprimée à la membrane de la vacuole de la levure, conférerait à celle-ci sa résistance au cadmium (Szczyпка, Wemmie et al. 1994), grâce à sa capacité à transporter ce métal sous la forme d'un complexe avec le glutathion (Li, Szczyпка et al. 1996; Li, Lu et al. 1997). La surexpression de hMRP1 dans des levures délétées pour Ycf1p permet en outre à ces levures de récupérer une résistance au cadmium (Tommasini, Evers et al. 1996; Ren, Furukawa et al. 2000). De plus, il a été récemment démontré *in vivo* que l'autre protéine homologue de MRP1 présente chez la levure, Yor1p, était également capable de transporter le cadmium en présence de glutathion, et ce probablement sous la forme d'un complexe $\text{Cd}(\text{GS})_2$ (Nagy, Montigny et al. 2006). Nous avons donc de bonnes raisons de penser que MRP1 transporte aussi le Cd^{2+} sous forme de complexe avec le GSH. La caractérisation fonctionnelle de hMRP1 est l'un des thèmes de recherche de notre collègue au laboratoire, Manuel Garrigos.

Néanmoins, la nature du ou des complexes formé(s) par le cadmium et le glutathion n'est pas encore bien établie, comme on peut le constater à la vue de la grande diversité de résultats présents dans la littérature. En collaboration avec Manuel Garrigos, nous avons mis à profit l'expérience du laboratoire dans la manipulation des ligands potentiels des cations divalents, pour essayer de préciser les valeurs des constantes de formation des complexes imaginables entre le cadmium et le GSH, ainsi que la nature des complexes les plus importants dans les conditions expérimentales utilisées le plus couramment par notre collègue. Le [chapitre VI](#) présentera en détail comment nous avons adapté nos protocoles pour tenter de répondre à cette question.

5. Exemple de la famille des ATPases de type P

a. Les différentes classes d'ATPases de type P

Les ATPases de type P constituent une famille d'enzymes homologues présentes dans tout le règne du vivant, des archéobactéries jusqu'aux eucaryotes supérieurs. Elles peuvent être localisées aussi bien dans les membranes plasmiques des cellules que dans les membranes d'organites internes. Ces protéines transportent une grande variété de cations (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ ...), mais il semble que dans les conditions physiologiques chaque ATPase soit spécifique d'un cation ou d'un couple de cations.

Toutes ces enzymes utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour réaliser le transport des ions au travers des membranes. Au cours de la catalyse enzymatique, ces protéines ont en commun de former transitoirement un intermédiaire phosphorylé à partir de l'ATP (pour revue voir (Møller, Juul et al. 1996)) : cette propriété a donné à cette famille de protéines le nom d'ATPases « de type P ». Certaines de ces ATPases (notamment l'ATPase- Na^+K^+ et l'ATPase-

H⁺,K⁺) possèdent, en plus de leur sous-unité catalytique α (la chaîne polypeptidique principale), une sous-unité β impliquée dans divers aspects de la vie de l'enzyme comme par exemple son repliement, son adressage à la membrane plasmique ou encore la régulation de la catalyse enzymatique (Geering 2001), et parfois même aussi une sous-unité γ impliquée également dans la régulation de l'activité de l'enzyme (Geering 2005). Jens Skou a été le premier à identifier un membre de cette famille en 1957, l'ATPase-Na⁺,K⁺ (Skou 1957), sa contribution à la compréhension de cette ATPase ayant été reconnue par l'attribution du prix Nobel de chimie en 1997.

Le résidu phosphorylé au cours du cycle est un aspartate, situé dans une séquence « signature » très fortement conservée au sein des ATPases de type P, la séquence DKTG. L'alignement des séquences de 159 ATPases de type P, ou tout au moins des régions communes à toutes ces ATPases (leur taille allant d'environ 68 à 200 kDa) a permis de les classer en 5 grands groupes (Axelsen and Palmgren 1998; Palmgren and Axelsen 1998). Cette étude phylogénétique conduit d'ailleurs à regrouper les diverses ATPases en fonction des ions (ou molécules) qu'elles transportent, et non pas en fonction des espèces où on les trouve (comme on aurait peut-être pu attendre). On dénombre ainsi cinq grandes familles d'ATPases de type P. Les ATPases impliquées dans le transport de calcium sont réunies dans les sous-familles de type P_{IIA} et P_{IIB}.

b. Bref aperçu des ATPases de type P_{II}

Les ATPases de type II sont subdivisées en quatre sous-familles.

Les ATPases de type II_A regroupent les ATPases de type SERCA (Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, voir ci-après, §1.5.c), présentes au niveau du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique, et les ATPases de type SPCA (Secretory Pathway Ca²⁺-ATPase), exprimées au niveau de l'appareil de Golgi. Ces deux groupes d'ATPases, pourtant présentes dans la même sous-famille, diffèrent sur plusieurs points. Comme je le développerai plus tard, les enzymes de type SERCA sont réputées assez spécifiques pour le calcium alors que les SPCA transportent aussi bien le calcium que le manganèse (Ton and Rao 2004). L'autre différence importante tient à la stœchiométrie de transport : les SERCAs catalysent le transport de 2 ions calcium par ATP hydrolysé, alors que les SPCAs ne transportent qu'un seul cation par ATP hydrolysé (on sait maintenant que les SPCAs, tout comme d'ailleurs les PMCAs, n'ont pas d'équivalent au « site I » de transport des SERCA (Wei, Chen et al. 2000; Fairclough, Dode et al. 2003)).

Les ATPases de type II_B sont les ATPases-Ca²⁺ de la membrane plasmique, de type PMCA (Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase). Ces pompes catalysent l'efflux vers le milieu extracellulaire d'un ion calcium par ATP hydrolysé. Leur activité est régulée par de nombreux facteurs, notamment la calmoduline en présence de calcium, calmoduline qui par ailleurs active de nombreuses autres protéines des voies de signalisation, et certains phospholipides, la phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique (Brodin, Falchetto et al. 1992), et peut-être aussi les shingolipides et le cholestérol, dont l'interaction avec la PMCA module l'affinité de la pompe pour le Ca²⁺ (Pinto Fde and Adamo 2002) (pour revue, voir (Di Leva, Domi et al. 2008)).

Les ATPases des sous-familles II_A et II_B « contre-transportent » des protons en échange du calcium, lors de la catalyse enzymatique. Dans le cas des PMCA, la stœchiométrie est réputée être de un proton par calcium transporté (Hao, Rigaud et al. 1994). En revanche, pour les ATPases de type SERCA, la stœchiométrie semble plus variée, le nombre de protons suggéré variant (jusqu'à deux ou trois) en fonction du pH ((Yu, Carroll et al. 1993) et voir ci-après, §II).

La sous-famille II_C, très proche du groupe II_A du point de vue de l'analyse phylogénétique, est représentée par l'ATPase-Na⁺,K⁺ et l'ATPase H⁺,K⁺. Pour effectuer leur fonction de transport, les ATPases de type II_C requièrent la présence d'une sous-unité régulatrice (β), en plus de la sous-unité (α) contenant les sites de fixation de l'ATP et de phosphorylation. Ces ATPases ne sont présentes que dans les cellules animales et remplacent probablement les ATPases à protons de la membrane plasmique des levures et des plantes (ATPases du sous-type

P_{III}, (Møller, Juul et al. 1996), telle l'ATPase-H⁺ d'*Arabidopsis thaliana* cristallisée en 2007 (Pedersen, Buch-Pedersen et al. 2007)). Découverte en 1957 (Skou 1957), l'ATPase-Na⁺,K⁺ est certainement l'ATPase de type P qui a été la plus étudiée, pour ses aspects tant biochimiques que physiologiques. Cette ATPase transporte vers le milieu extracellulaire 3 ions Na⁺ par ATP hydrolysé, et elle est particulièrement impliquée dans la régulation du volume cellulaire et le maintien des concentrations de Na⁺ et K⁺ de part et d'autre de la membrane, maintien nécessaire au potentiel de membrane. De plus, le gradient chimique de Na⁺ maintenu par la pompe est utilisé par divers transporteurs pour le transport secondaire de solutés ou nutriments, par exemple pour l'expulsion de Ca²⁺ par l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ de la membrane plasmique. En 2007, Une première structure presque complète de l'ATPase Na⁺/K⁺ a été obtenue par cristallographie : cette structure a révélé, comme attendu, un repliement de la sous-unité α proche de celui de l'ATPase-Ca²⁺ cristallisée 7 ans plus tôt, avec en plus les sous-unités régulatrices β et γ (Morth, Pedersen et al. 2007). Dans cette structure, la partie extracellulaire de la sous-unité β n'était pas suffisamment résolue pour permettre d'observer précisément ses interactions avec la sous-unité α . Ce manque a été comblé par la publication toute récente d'une nouvelle structure à meilleure résolution (2,4 Å au lieu de 3,5 Å), qui a mis en évidence la présence de nombreuses interactions entre les sous-unités β et γ et les boucles luminales de la sous-unité α : les auteurs suggèrent que ces interactions pourraient notamment agir sur l'occlusion des cations (Shinoda, Ogawa et al. 2009).

Les ATPases de type II_D, enfin, sont des transporteurs d'efflux de Na⁺, K⁺ et Li⁺ (Benito, Garciadeblas et al. 2002), et n'ont pour le moment été trouvés que chez les levures et les cellules végétales. Ces transporteurs pourraient être impliqués dans l'halotolérance et la résistance au pH alcalin, la délétion des gènes codant ces protéines conduisant à une hypersensibilisation des levures vis à vis de tels stress (pour revue, voir (Ruiz and Arino 2007)). Toutefois, il ne s'agit ici que d'une preuve indirecte, de nombreuses voies métaboliques pouvant être perturbées lors de telle délétion de gène. Le rôle physiologique de ces ATPases reste donc à préciser.

c. Le rôle des ATPases de type SERCA dans l'homéostasie du calcium : exemple des cycles de contraction / relaxation musculaire

Le calcium est un élément essentiel à la vie de la cellule, depuis les premières étapes de sa conception, en passant par toutes les voies de régulation et de signalisation mises en œuvre dans son fonctionnement, et jusqu'à sa mort par les voies de l'apoptose (Carafoli 2004). A l'état de « repos », la plupart des cellules de l'organisme maintiennent une concentration cytosolique en calcium libre très faible, de l'ordre de 100 à 200 nM, alors que la concentration en calcium libre peut être plus de 10000 fois plus importante (submillimolaire ou millimolaire) dans le milieu extracellulaire ou dans certains compartiments internes comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, ou encore la vacuole chez les plantes et les levures (Berridge, Lipp et al. 2000). La cellule doit donc posséder des systèmes de régulation efficace pour maintenir et contrôler ces fortes différences de concentrations.

Les différentes étapes qui entrent en jeu dans les cycles de contraction / relaxation du muscle squelettique au cours de l'effort fournissent un exemple typique de l'importance du calcium dans le fonctionnement cellulaire. On trouve trois types de muscles dans l'organisme : le muscle strié squelettique, responsable des mouvements du corps ; le muscle cardiaque, assurant le pompage permanent du sang ; et les muscles lisses, responsables des contractions « involontaires » de certains tissus comme les parois intestinales, l'estomac ou encore les muscles impliqués dans la respiration comme le diaphragme. Je ne vais présenter ici que le cycle contraction / relaxation du muscle squelettique.

Un potentiel d'action (changement de polarité momentanée de la membrane de la cellule nerveuse) est convoyé depuis le système nerveux central jusqu'à la cellule musculaire par ouverture successive des canaux sodiques voltage-dépendants tout le long de l'axone. Arrivé au

niveau de la synapse, ce potentiel d'action induit l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et donc l'entrée massive (mais localisée) de calcium dans le bouton pré-synaptique (*i.e.* l'extrémité de l'axone en contact de la fente synaptique). Cet influx de calcium va induire la fusion des vésicules contenant l'acétylcholine avec la membrane plasmique (pré-synaptique) de l'axone, permettant donc par exocytose le relargage de l'acétylcholine dans la fente synaptique. L'acétylcholine va se fixer sur un récepteur-canal (récepteur nicotinique à l'acétylcholine) situé sur la membrane plasmique (post-synaptique) de la cellule musculaire : l'entrée de sodium (et la sortie, cependant plus limitée de potassium) *via* ce récepteur-canal va dépolariser la membrane et induire en particulier l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants sur la même membrane plasmique de la cellule musculaire (VOC pour Voltage Operated Channels, également connus sous le nom de récepteurs à la dihydropyridine). En plus de permettre l'entrée d'une certaine quantité de calcium extracellulaire dans la cellule (particulièrement critique dans le muscle cardiaque), les VOCs ainsi activés vont également stimuler le relargage de Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique. La membrane plasmique des cellules musculaires squelettiques forme en effet de larges invaginations, « les tubules T », qui plongent entre les fibres musculaires et viennent au contact des « citernes terminales » du dense réseau de réticulum sarcoplasmique présent autour des fibres, et à cause de la proximité des invaginations de la membrane plasmique et avec les citernes du réticulum sarcoplasmique, il semble, au moins dans le muscle squelettique, que les VOCs soient en contact direct avec les canaux à la ryanodine (RyR) de la membrane du réticulum : l'activation des VOCs peut stimuler directement l'ouverture des canaux à la ryanodine. L'ouverture de ces derniers entraîne un relargage auto-entretenu et donc massif (c'est le « calcium-induced calcium release ») de calcium depuis la lumière du réticulum, où la concentration en calcium est millimolaire, vers le cytosol, où la concentration en calcium qui était jusque là sub-micromolaire va désormais atteindre quelques micromolaires voire, localement, plusieurs dizaines de micromolaire (Berridge 1997; Berridge 2002). Ce calcium cytosolique déclenche la contraction musculaire.

Les ATPases- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (SERCA) sont également activées dès que la concentration en calcium cytosolique s'élève. Lorsque la dépolarisation de la membrane plasmique prend fin (notamment après la dégradation de l'acétylcholine), le relargage de calcium dans le cytosol va cesser et les SERCA vont rapidement re-pomper le calcium cytosolique pour le ré-accumuler dans la lumière du réticulum. Les sarcomères sont alors rapidement déplétés en calcium et la contraction prend fin : c'est la relaxation du muscle.

II. FONCTION ET STRUCTURE DE L'ATPASE- Ca^{2+} SERCA1A

1. Les différents gènes et les différentes isoformes SERCA

Les différentes isoformes de l'ATPase- Ca^{2+} de type SERCA sont issues de la traduction de trois gènes différents chez l'homme, *ATP2A1*, *ATP2A2* et *ATP2A3*, et donnent lieu après épissage alternatif à 10 (à ce jour !) protéines différentes, notées respectivement SERCA1a et 1b, SERCA2a et 2b, et SERCA3a à 3f (Bobe, Bredoux et al. 2005; Muthu Periasamy and Anuradha Kalyanasundaram 2007). Ces isoformes sont toujours exprimées au niveau du réticulum endoplasmique, mais de façon très variable dans les différents types cellulaires ; l'isoforme SERCA1a est la forme majoritaire dans le muscle squelettique, la SERCA2a est majoritaire dans le muscle cardiaque et dans le muscle lisse, la forme SERCA2b est ubiquitaire, la forme SERCA3d est également ubiquitaire alors que les autres SERCA3 sont exprimées essentiellement dans les cellules sanguines, le poumon, le rein et le pancréas (pour revue, voir (Bobe, Bredoux et al. 2005)).

Le gène *ATP2A1* a été pour la première fois isolé et cloné en 1985 par Mac Lennan (MacLennan, Brandl et al. 1985), ce qui a permis de connaître la séquence polypeptidique

complète de la protéine (MacLennan, Brandl et al. 1985). Un gène *ATP2A1* défectueux pourrait être à l'origine d'une maladie héréditaire, la maladie de Brody. Les symptômes qui caractérisent cette pathologie sont une altération de la relaxation musculaire après la pratique d'un exercice physique, ce qui se traduit par une rigidité corporelle et des crampes (Brody 1969). Les études réalisées sur différents malades ont montré que la maladie pourrait être liée soit à l'expression d'une ATPase tronquée (Odermatt, Taschner et al. 1996; Odermatt, Taschner et al. 1997), soit à la mutation ponctuelle du résidu P789 en leucine (Odermatt, Barton et al. 2000) (ce résidu se trouvant à l'extrémité de l'hélice transmembranaire M6, côté luminal – voir les structures décrites ci-dessous) : dans tous les cas, l'ATPase exprimée n'est pas fonctionnelle. Cependant, ce ne sont certainement pas les seuls facteurs à l'origine de la maladie, étant donné que certaines familles atteintes des mêmes troubles ne présentent pas de mutations du gène *ATP2A1* ou de modification du niveau d'expression de l'ATPase- Ca^{2+} .

2. Le mécanisme de fonctionnement de SERCA1a : des premières études à la proposition d'un cycle catalytique

L'ATPase SERCA1a est la protéine la plus abondante du réticulum sarcoplasmique, où elle représente 70 à 80 % des protéines membranaires (voir Chap. II). Grâce à cette grande disponibilité, elle a pu être très rapidement isolée, ce qui a permis l'étude détaillée de son fonctionnement. En 2000, elle a été également la première ATPase de type P dont la structure tridimensionnelle à haute résolution a été résolue (Toyoshima, Nakasako et al. 2000) (voir ci-après §II.4, figure I.15).

Au début des années 60, Hasselbach et Makinose (Hasselbach and Makinose 1961) et Ebashi et Lipmann (Ebashi and Lipmann 1962) observent un transport « actif » de Ca^{2+} radioactif ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), *i.e.* contre son gradient de concentration et catalysé par l'ATP, dans des vésicules de réticulum sarcoplasmique. Hasselbach et Makinose mesurent la stoechiométrie de ce transport, montrant que 2 ions Ca^{2+} sont transportés du cytosol vers le lumen lors de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Hasselbach and Makinose 1963), et ils montrent ensuite que ce transport est réversible, donnant lieu à la synthèse d'ATP lorsque des vésicules préalablement chargées avec du Ca^{2+} sont mises en présence d'ADP + Pi (Barlogie, Hasselbach et al. 1971). Quelques années plus tard, il est établi qu'au cours du cycle de transport, l'enzyme est phosphorylée de façon transitoire (Yamamoto and Tonomura 1968), au niveau d'un résidu aspartate (Bastide, Meissner et al. 1973; Degani and Boyer 1973; Allen and Green 1976) comme cela avait été démontré auparavant sur l'ATPase Na^+, K^+ (Post and Kume 1973). Makinose propose un premier modèle de cycle catalytique dès 1973, dans lequel on retrouve tous les éléments fondateurs des modèles actuels, avec le transport de deux ions calcium couplé à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, une fixation des ions calcium indispensable pour la phosphorylation transitoire par l'ATP, et le caractère réversible et dynamique de la totalité des équilibres (Makinose 1973). Les différents intermédiaires phosphorylés formés seront ensuite précisés, avec notamment la définition de formes « ADP-sensible » ou au contraire « ADP-insensible », l'une pouvant réagir avec l'ADP pour reformer de l'ATP, et l'autre ne le pouvant pas (Shigekawa, Dougherty et al. 1978a; Shigekawa and Dougherty 1978b; Shigekawa and Dougherty 1978c). De Meis et Vianna construisent un cycle catalytique plus détaillé faisant apparaître les formes de haute affinité pour le calcium avec leurs sites de transport ouverts côté cytosolique, et les formes de basse affinité pour le calcium avec leurs sites de transport ouverts côté luminal (de Meis and Vianna 1979). Entretemps, les recherches parallèles sur l'ATPase Na^+, K^+ ont engendré le schéma dit « Albers-Post », avec également ses deux « conformations » principales (« E1 » et « E2 ») différentes adoptées par l'ATPase au cours de son cycle. Un trait remarquable des modèles actuels est que l'ATPase passe, au cours de son cycle catalytique, par une conformation où les ions calcium sont « occlus », *i.e.* inaccessibles depuis le cytosol comme depuis le lumen. La figure I.12 présente une version adaptée de tous ces schémas.

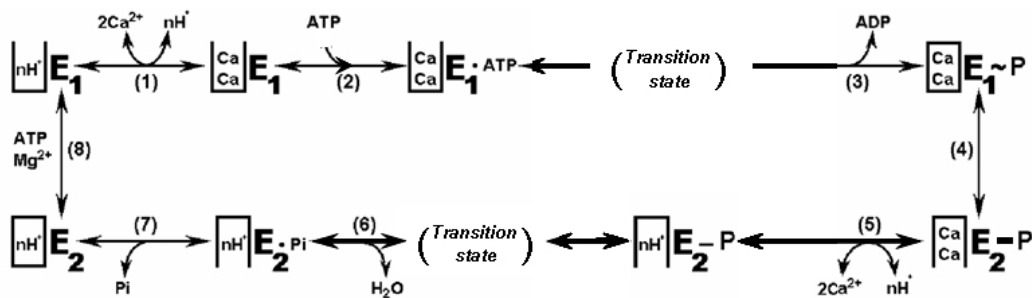


Figure I.12 : Cycle catalytique de l'ATPase- Ca^{2+} , adapté d'après (de Meis and Vianna 1979). La forme de haute affinité pour le calcium (« E1 ») fixe deux ions Ca^{2+} depuis le cytosol (1) ainsi qu'une molécule d'ATP (2). Le γP du nucleotide est transféré à l'aspartate D351, donnant lieu à la formation de l'état intermédiaire (liaison acyl-phosphate), « énergisé » (3). Cette « énergie » va servir à la réorientation des sites de transport côté luminal (4). Le calcium est relargué dans la lumière du réticulum parce que dans cette conformation, l'affinité des sites de transport pour le calcium a fortement diminué. Les ions Ca^{2+} sont alors remplacés par des protons (5). La forme dépourvue de calcium et ainsi protonée est ensuite déphosphorylée (6) jusqu'à la forme E2 (7), avant de revenir à l'état E1 initial. L'ATP est connu pour accélérer la transition de E2 vers E1 (8). L'affinité forte de la forme E2 pour l'ATP suggère que dans un milieu physiologique, l'enzyme n'est en fait jamais dépourvue d'ATP, et qu'elle peut donc fixer l'ATP avant même le Ca^{2+} .

L'un des points majeurs abordés par de nombreux travaux de recherche à propos de SERCA1a a été de comprendre comment l'hydrolyse d'ATP, qui a lieu au sein du domaine cytosolique, pouvait induire la réorganisation de sites membranaires situés à plusieurs dizaines d'Angströms du site catalytique. Ces efforts ont mis en jeu une grande variété d'approches, que ce soit pour l'ATPase native dans son environnement membranaire (de Meis and Vianna 1979), ou bien en présence de détergents (Champeil, le Maire et al. 1986), ou bien encore après mutation de certains résidus (Andersen and Vilsen 1995)... (pour revue, voir (Møller, Juul et al. 1996; Mintz and Guillain 1997)). L'apport des techniques de biologie structurale, notamment avec l'obtention des structures tridimensionnelles de l'ATPase, a évidemment été précieux. Toutes ces approches et les résultats obtenus ont progressivement permis de fructueuses avancées et suscité de nombreuses nouvelles discussions.

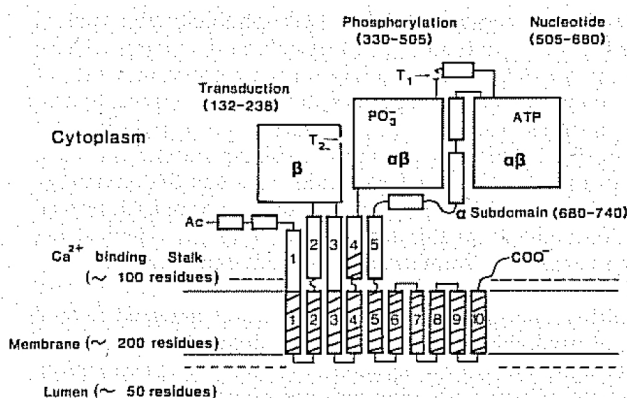
3. Prédictions de repliement et premier modèle à basse résolution, après cristallisation à deux dimensions de l'ATPase en présence de vanadate et de thapsigargine

a. Prédictions de repliement

L'obtention par MacLennan de la séquence complète du gène ATP2A1 codant l'ATPase- Ca^{2+} a permis dans le même temps d'obtenir la séquence polypeptidique complète de l'ATPase- Ca^{2+} : il s'agit de l'assemblage de 996 acides aminés pour une masse moléculaire totale d'environ 110 kDa (MacLennan, Brandl et al. 1985). Sur la base de la séquence, un modèle topologique a pu être proposé, suggérant la présence de 10 segments transmembranaires, d'un large domaine cytosolique (renfermant notamment l'aspartate catalytique) et d'un domaine luminal très réduit, limité aux boucles de connections des passages transmembranaires (MacLennan, Brandl et al. 1985) (voir figure I.13).

Figure I.13 : Modèle structural de l'ATPase- Ca^{2+} , prédit à partir de son profil d'hydrophobicité (MacLennan, Brandl et al. 1985).

Ce modèle contient déjà la plupart des éléments principaux de la structure de l'ATPase telle que nous la connaissons aujourd'hui, avec ses 10 passages transmembranaires, le large domaine cytosolique subdivisé en trois sous-domaines (deux domaines distincts pour la fixation du nucléotide et la phosphorylation -mais l'enchevêtrement réel de ces deux domaines n'est pas tel que cette prédiction le décrivait- et un domaine ici dit de « transduction » -qui contrairement à l'idée originale ne couple pas hydrolyse de l'ATP et transport de Ca^{2+} , mais joue pourtant bel et bien un rôle essentiel pour le cycle catalytique-), et un domaine luminal très réduit et peu structuré.



b. Structure à très basse résolution en présence de vanadate

Le vanadate (Na_3VO_4) est un analogue du phosphate, inhibiteur de nombreux types d'ATPases (dont les ATPases de type ABC et celles de type P) (O'Neal, Rhoads et al. 1979), qui se fixe au niveau du site catalytique (Pick 1982). Il a été utilisé très tôt pour essayer de figer l'ATPase membranaire dans une conformation « de type E2 » (Dux and Martonosi 1983a). Même si le vanadate n'est pas suffisant pour stabiliser l'enzyme solubilisée durant plusieurs jours (voir figure 4C dans (Pikula, Mullner et al. 1988)), il a permis, à partir d'images de cryo-électron microscopie de cette ATPase membranaire cristallisée à deux dimensions, d'obtenir la première structure tridimensionnelle de la protéine, reconstruite en premier lieu à faible résolution (30 Å), puis à 14 Å (Toyoshima, Sasabe et al. 1993), qui permettait pour la première fois de discerner clairement le domaine cytosolique du domaine membranaire.

c. Structure à basse résolution en présence de vanadate et de thapsigargine

La thapsigargine (TG) est extraite des racines³ de la plante *Thapsia garganica* L. (Christensen, Rasmussen et al. 1980). La première raison de l'intérêt des physiologistes pour la TG a été que cette molécule stimulait les réactions inflammatoires, son injection dans l'organisme induisant un relargage important d'histamine, notamment par les cellules du système immunitaire mais également par les cellules de nombreux tissus (Patkar, Rasmussen et al. 1979). L'activation de cette sécrétion d'histamine fut rapidement associée à une augmentation importante des concentrations intracellulaire en calcium (Ali, Christensen et al. 1985). En 1990, Thastrup et al. montraient que cette augmentation rapide et importante de la concentration cytosolique en calcium était causée par une inhibition très efficace des ATPases- Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (Thastrup, Cullen et al. 1990). Ce mécanisme d'inhibition a été particulièrement étudié : l'interaction de la thapsigargine avec les SERCAs est rapide,

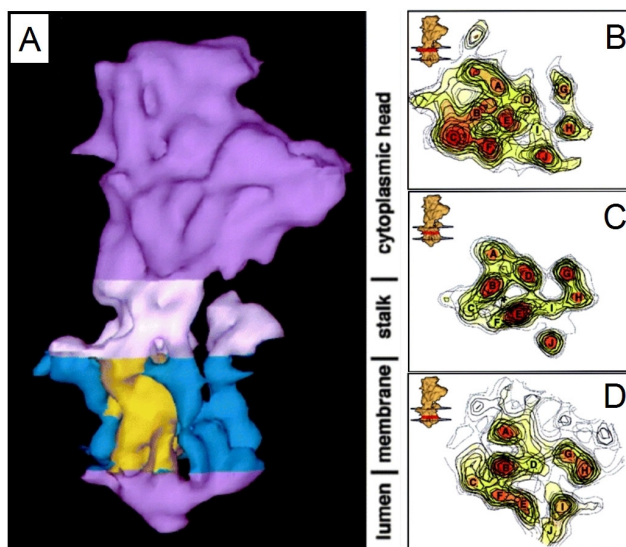
³ *Thapsia garganica* L. est utilisée en médecine traditionnelle depuis l'Antiquité, et la plante est déjà citée pour ses propriétés purgatives dans les manuscrits d'Hippocrate (Hippocrates, - 400 av. J.C. ; Christensen, 1980). Dans la médecine traditionnelle arabe, les racines sont utilisées pour préparer aussi bien des purgatifs que des onguents permettant de soulager les douleurs articulaires, ou encore comme cataplasme pour calmer les inflammations dues à des morsures d'animaux venimeux (Christensen, 1982 ; Boullard, 2001). Dans la culture kabyle, à l'occasion de la fête du printemps, on prépare, de façon sans doute plus traditionnelle que médicinale, un couscous dépuratif cuit à la vapeur de différentes plantes, dont les racines de *Thapsia garganica* L. (« aderyis » en kabyle) (Dépêche de Kabylie, 2004 ; Boualem, 2009).

stœchiométrique, quasiment irréversible (Fortea, Soler et al. 2001), et se produit avec une affinité sub-nanomolaire (Kijima, Ogunbunmi et al. 1991; Lytton, Westlin et al. 1991; Sagara and Inesi 1991). La thapsigargine empêche la fixation de calcium ($E + 2 \text{Ca} \leftrightarrow \text{Ca}_2\text{E}$), mais aussi la phosphorylation par le Pi de l'enzyme dépourvue de calcium ($E + \text{Pi} \leftrightarrow \text{E-P}$) : la TG se fixerait à la forme « E2 » de l'ATPase pour emmener la protéine vers une voie « sans issue » (Sagara, Wade et al. 1992; Wictome, Michelangeli et al. 1992; Wictome, Khan et al. 1995).

Le site d'interaction de la thapsigargine avec l'ATPase- Ca^{2+} a pu être identifié à l'aide de la biologie moléculaire. Une première approche, consistant à construire des protéines chimères entre l'ATPase- Na^+/K^+ -insensible à la thapsigargine- et l'ATPase- Ca^{2+} , a permis de démontrer une interaction de la TG avec le domaine membranaire de l'ATPase- Ca^{2+} (Sumbilla, Lu et al. 1993) au niveau de l'hélice transmembranaire M3 (cette hélice M3 est d'ailleurs celle qui présente le moins d'homologie avec l'hélice correspondante de l'ATPase- Na^+/K^+ (Norregaard, Vilsen et al. 1994)). Parmi ces acides aminés, on trouve la phénylalanine F²⁵⁶, qui sera plus tard reconnue comme étant très importante pour la fixation de la TG (Yu, Zhang et al. 1998).

Lorsque l'ATPase des vésicules de réticulum sarcoplasmique est traitée au vanadate en présence de TG, le complexe stable « E2.TG.VO₄ » s'organise de façon régulière pour former des cristaux bidimensionnels d'ATPase similaires à ceux formés en présence de vanadate mais en absence de thapsigargine (Sagara, Wade et al. 1992; Stokes and Lacapere 1994). En 1998, l'utilisation d'un dérivé de la thapsigargine (dansyl-TG) a rendu possible l'obtention à partir de tels cristaux bidimensionnels d'une structure tridimensionnelle à 8 Å de résolution (Zhang, Toyoshima et al. 1998), laissant deviner la présence effective de dix hélices transmembranaires (voir figure I.14).

Figure I.14 : Structure de l'ATPase- Ca^{2+} à 8 Å de résolution, obtenue par reconstitution tridimensionnelle à partir d'images en microscopie électronique de cristaux bidimensionnels préparés en présence de vanadate et de dansyl-TG. A : Représentation de l'enveloppe reconstruite de la protéine entière. On distingue quatre régions principales, de bas en haut sur la figure : la partie luminale (*lumen*), le domaine membranaire (*membrane*), le « pied » (*stalk*) et le domaine cytosolique (*cytosolic head*). La coloration en bleu et jaune du domaine membranaire indique les groupes d'hélices transmembranaires que l'on peut individualiser. B-D : Vues en coupe du domaine membranaire. La molécule entière est dessinée en haut à gauche de chaque panneau, avec deux plans symbolisant les faces de la membrane et une zone de 2 Å d'épaisseur, colorée en rouge, correspondant à la région observée. On peut « deviner » la position de dix segments transmembranaires, étiquetés de A à J. Figure adaptée d'après (Zhang, Toyoshima et al. 1998).



Jusqu'à ce jour, le vanadate n'a cependant pas permis l'obtention d'une structure de l'ATPase cristallisée à partir de sa forme solubilisée : il est probable que l'immobilisation de la tête cytosolique ne stabilise pas suffisamment le domaine membranaire, qui reste relativement labile en présence de détergent. Par la suite, l'utilisation d'inhibiteurs qui se fixent dans la région membranaire de l'ATPase a permis de compenser cette instabilité probable. Les succès de la cristallogénèse et l'analyse des cristaux par diffraction aux rayons X ont permis d'affiner les modèles à basse résolution pour tenter de décrire le mécanisme de transport à une échelle véritablement moléculaire.

4. Les deux premières structures tridimensionnelles de l'ATPase- Ca^{2+} à résolution atomique

En 2000, Chikashi Toyoshima publiait la première structure d'une ATPase de type P, l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a, cristallisée à trois dimensions en présence de détergent, de lipides et de calcium (« $\text{Ca}_2\text{E1}$ », (Toyoshima, Nakasako et al. 2000)). Dans un premier temps, cette structure confirma la plupart des prédictions précédentes : la protéine possède bien dix hélices transmembranaires au sein desquelles se trouvent les sites de transport du calcium. Le domaine cytosolique est divisé en trois sous-domaines, le domaine de fixation du nucléotide (N), le domaine de phosphorylation (P) au sein duquel se trouve l'aspartate catalytique (D^{351}), et le domaine A (pour « actuator » en anglais) particulièrement indispensable à la déphosphorylation (voir figure I.15). En revanche, l'ouverture extrêmement large de ce domaine cytosolique, avec les 30 à 50 Å qui séparent les sous-domaines N et A, laissait supposer une très grande flexibilité de son organisation, pour que les résidus qui avaient été décrits comme impliqués dans les processus de phosphorylation et de déphosphorylation puissent se rapprocher au bon moment.

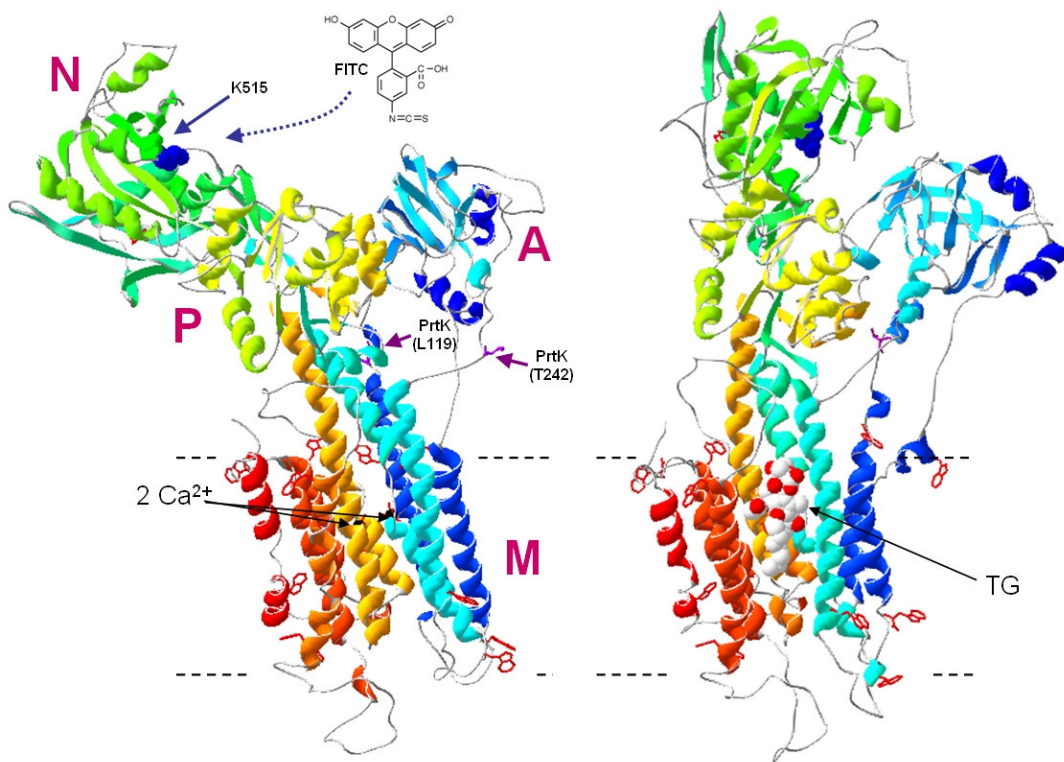


Figure I.15 : Structure tridimensionnelle de l'ATPase- Ca^{2+} . *A gauche, structure obtenue en présence de calcium (Toyoshima, Nakasako et al. 2000) : les positions des deux sites principaux de coupure par la protéinase K sont indiqués par les flèches violettes. Les chaînes latérales des résidus tryptophanes sont colorées en rouge. La chaîne latérale de la lysine K515, qui peut être marquée par la fluoresceine-5-isothiocyanate (FITC), est colorée en bleu. N : domaine de fixation du nucléotide ; P : domaine de phosphorylation ; A : domaine « actuator » ; M : domaine membranaire. A droite, structure obtenue en absence de calcium et en présence de thapsigargine (TG) (Toyoshima and Nomura 2002). Dans les deux cas, les lignes pointillées indiquent la probable position de la surface de la membrane.*

La publication en 2002 d'une seconde structure (« E2.TG »), cette fois obtenue en absence de calcium mais en présence de thapsigargine (toujours en présence de détergent et de lipides) a révélé une structure beaucoup plus compacte, où les trois sous-domaines cytosoliques sont accolés les uns aux autres (structure résolue à 3,1 Å, PDB #1IWO, (Toyoshima and Nomura 2002) ; voir figure I.15). Comme de nombreuses expériences l'avaient suggéré (pour revue, (Bigelow and Inesi 1992; Møller, Juul et al. 1996)), cette structure a définitivement prouvé qu'il existait de larges changements structuraux dans la protéine entre les états « E2.TG » et « $\text{Ca}_2\text{E1}$ », illustrant l'interdépendance des sites de transport, membranaires, et du site

catalytique, situé environ 50 Å plus haut dans le domaine cytosolique (pour revue, (Toyoshima, Nomura et al. 2003; Toyoshima 2008)). Cette structure a aussi montré l'existence d'une poche hydrophobe formée par les hélices M3, M5 et M7, et dans laquelle vient se glisser la thapsigargine, et a confirmé l'interaction particulière de la chaîne latérale phényle du résidu F256 avec le cycle sesquiterpène lactone de la TG (voir figure I.16). Cette poche n'est pas structurée dans la forme « Ca₂.E1 » car l'hélice M3 y est très éloignée des hélices M5 et M7, ce qui explique pourquoi la TG ne peut sans doute pas interagir avec les formes « E1 » du cycle catalytique (Toyoshima and Nomura 2002).

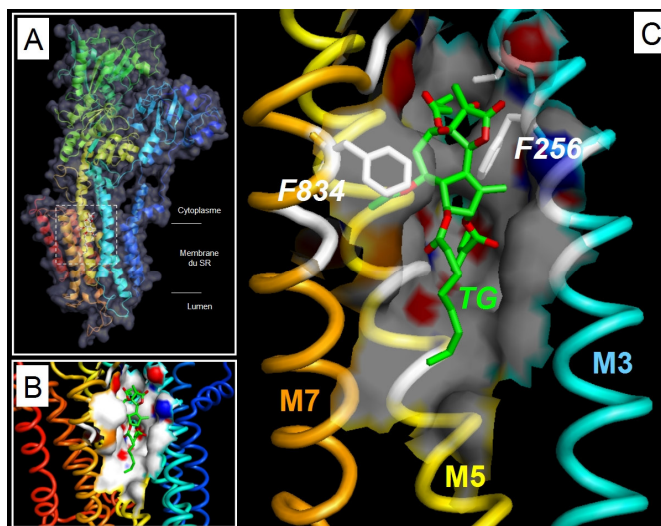


Figure I.16 : Site de fixation de la thapsigargine (TG). A, représentation de la structure à résolution atomique de l'ATPase-Ca²⁺ obtenue en présence de thapsigargine (PDB #1IWO, (Toyoshima and Nomura 2002)), avec sa chaîne polypeptidique représentée par des rubans colorés (du bleu au rouge, du N- vers le C-terminal) et son volume total en gris. La thapsigargine est fixée, dans le domaine membranaire, entre les hélices M3 (bleu ciel), M5 (jaune) et M7 (orangée). B, agrandissement de la zone pointillée du panneau A. La TG est fixée au sein d'une poche hydrophobe. Les atomes formant la poche sont colorés en rouge pour les oxygènes, bleu pour les azotes et blanc pour les carbones : la poche est essentiellement hydrophobe. La TG est aussi colorée selon la nature des atomes (ici, dans un souci de clarté, le vert remplace le blanc pour les carbones). C, image identique à B mais seules les hélices M3, M5 et M7 sont maintenant représentées, par souci de simplification. Les chaînes latérales des phénylalanine F256 et F834 enserrant la TG et interagissent via leurs cycles phényles avec le cycle sesquiterpène lactone de la TG.

Les techniques « classiques », biochimiques ou spectroscopiques, de pontages chimiques ou de coupures enzymatiques ou chimiques, telles que je les ai utilisées moi-même dans le cadre de cette thèse, étaient et restent des techniques qui permettent de suivre les changements de conformation éventuels entre deux états de la protéine stabilisés par différents ligands. L'interprétation de ces résultats, cependant, a souvent des limites. La fantastique résolution par cristallographie de la structure tridimensionnelle de l'ATPase ouvrait la voie à une description plus moléculaire du mécanisme de transport, pourvu toutefois que l'on sache cristalliser les intermédiaires principaux du cycle catalytique. Le paragraphe suivant va détailler certaines des structures de ces autres intermédiaires, tout en mentionnant les limites et quelquefois les pièges de ces structures.

5. Quelques autres structures de l'ATPase-Ca²⁺ à résolution atomique, en présence de différents ligands

Pour comprendre en détail un système enzymatique, il est toujours intéressant d'essayer de relier les propriétés fonctionnelles des formes successives de l'enzyme, adoptées au cours de la catalyse enzymatique, avec leurs caractéristiques structurales. Depuis 2000, la publication de

nombreuses structures à résolution atomique pour l'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique a grandement contribué à la compréhension du déroulement des différentes étapes composant le cycle catalytique de l'enzyme. Ces structures ont permis de confirmer de nombreuses hypothèses émises au cours des vingt années précédentes concernant la topologie de la protéine et le positionnement des séquences indispensables au transport de Ca^{2+} et à l'hydrolyse d'ATP. L'utilisation d'une grande variété de ligands (calcium et autres cations divalents, nucléotides, complexes fluorés, inhibiteurs... , voir [figure I.17](#) ainsi que le tableau qui suit) a permis d'obtenir des analogues structuraux sans doute proches des formes intermédiaires adoptées par la protéine au cours de la catalyse ([Toyoshima, Nakasako et al. 2000](#); [Toyoshima and Nomura 2002](#); [Toyoshima, Nomura et al. 2003](#); [Olesen, Sorensen et al. 2004](#); [Sorensen, Møller et al. 2004](#); [Toyoshima and Mizutani 2004](#); [Toyoshima, Nomura et al. 2004](#); [Obara, Miyashita et al. 2005](#); [Jensen, Sorensen et al. 2006](#); [Moncoq, Trieber et al. 2007](#); [Olesen, Picard et al. 2007](#); [Takahashi, Kondou et al. 2007](#); [Toyoshima, Norimatsu et al. 2007](#); [Laursen, Bublitz et al. 2009](#)) (pour revue, voir ([Toyoshima 2008](#))). Dans le même temps, la mise au point d'un protocole de purification de l'ATPase Ca^{2+} après son expression de façon hétérologue dans la levure *S. cerevisiae* ([Jidenko, Lenoir et al. 2006](#); [Cardi, Montigny et al. 2009](#)) rendait possible la cristallisation non seulement de la protéine recombinante sauvage (dont la structure s'est avérée, comme espéré, semblable à celle de la protéine native du lapin ([Jidenko, Nielsen et al. 2005](#))), mais aussi de protéines recombinantes éventuellement mutées (afin éventuellement de comprendre le rôle particulier joué par les résidus modifiés ([Marchand, Winther et al. 2008](#))).

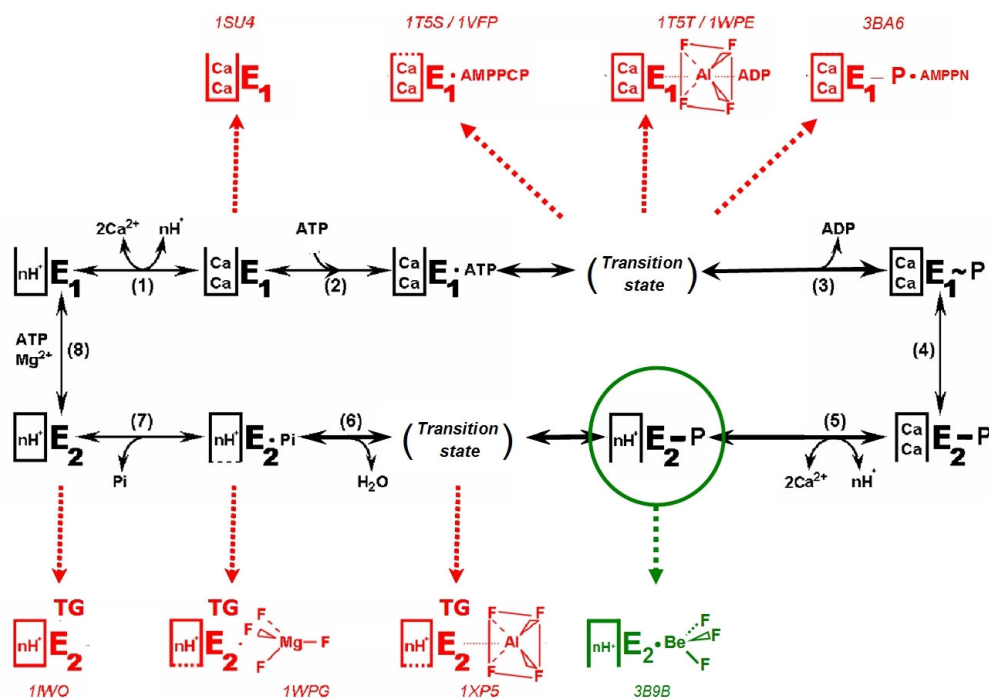


Figure I.17 : Cycle catalytique de l'ATPase- Ca^{2+} et formes cristallisées en 2007. Le cycle catalytique, présenté ici en noir, est adapté d'après ([de Meis and Vianna 1979](#)) et a été décrit en détail en introduction ([figure I.12](#)). Les différentes formes cristallines schématisées autour du cycle et indiquées en rouge ont été obtenues de 2000 à 2006, après cristallogénèse de la protéine extraite du lapin, (leurs codes d'entrée PDB sont indiqués au dessus pour les formes « E1 » et en dessous pour les formes « E2 »). Ces formes sont réputées être des analogues structuraux probablement assez fidèles des états intermédiaires adoptés par la protéine au cours de son cycle catalytique. La forme « $\text{E}_2 \cdot \text{BeF}_3$ » (en vert, PDB #3B9B ([Olesen, Picard et al. 2007](#))), a été obtenue *après* la publication de nos résultats démontrant la nécessité de cristalliser cette forme en absence de TG si l'on souhaitait obtenir une structure pertinente de son domaine membranaire (puisque la présence de TG aurait induit des biais dans la structure du domaine membranaire de cette forme supposée mimer l'état « $\text{E}_2\text{-P}$ », voir la présente thèse et ([Picard, Toyoshima et al. 2006](#); [Montigny, Picard et al. 2007](#))).

Etat des lieux des différentes formes cristallisées de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a (juillet 2009, d'après (Toyoshima 2008))					
Etat supposé	Ligands utilisés	Métal présent au domaine P	Ligands présents dans le domaine membranaire	Résolution (actuelle ^b), Å	Code d'entrée PDB et références
$\text{Ca}_2\text{E1}$	(TNP-AMP)		2 Ca^{2+}	2,4 (2,3)	1SU4 (Toyoshima, Nakasako et al. 2000), 2C9M (Sorensen, Olesen et al. 2006)
$\text{Ca}_2\text{E1}.\text{ATP}$	AMPPCP	Ca^{2+}	2 Ca^{2+}	2,6 (2,5)	1T5S (Sorensen, Møller et al. 2004), 1VFP (Toyoshima and Mizutani 2004)
$\text{Ca}_2\text{E1P}^*.\text{ADP}^c$	$\text{Mg}^{2+}.\text{ADP}$, AlF_4^-	Mg^{2+}	2 Ca^{2+}	2,4	2ZBD (Toyoshima and Mizutani 2004), 1T5T (Sorensen, Møller et al. 2004)
$\text{Ca}_2\text{E1} \sim \text{P}.\text{ADP}$	AMPPNP	Ca^{2+}	2 Ca^{2+}	2,8	3BA6 (Olesen, Picard et al. 2007)
E2P	BeF_3^-	Mg^{2+}	Mg^{2+}	2,65	3B9B (Olesen, Picard et al. 2007)
			-	3,8 (3,0)	2ZBE (Toyoshima, Norimatsu et al. 2007)
E2P* ^c	AlF_4^-	Mg^{2+}	TG ^a	2,4	2ZBF (Toyoshima, Norimatsu et al. 2007)
			TG	2,55	2ZBG (Toyoshima, Norimatsu et al. 2007), 1XP5 (Olesen, Sorensen et al. 2004)
E2P*.ATP ^c E2.Pi	AlF_4^- , AMPPCP	Mg^{2+}	-	3,0	3B9R (Olesen, Picard et al. 2007)
	MgF_4^- , ($\text{Mg}^{2+}.\text{ADP}$)	Mg^{2+}	TG	2,3	1WPG (Toyoshima and Mizutani 2004)
	MgF_4^-	Mg^{2+}	CPA	2,65	2O9J (Moncoq, Trieber et al. 2007)
	$\text{Mn}^{2+}.\text{AMPPCP}$	Mn^{2+}	CPA. Mn^{2+}	2,5	3FGO (Laursen, Bublitz et al. 2009)
E2			TG	3,1 (2,1)	1IWO (Toyoshima and Nomura 2002), 2C8L (Sorensen, Møller et al. 2004)
			TG+BHQ	2,4	2AGV (Obara, Miyashita et al. 2005)
			CPA	3,4	2OA0 (Moncoq, Trieber et al. 2007), 2EAS (Takahashi, Kondou et al. 2007)
			TG+CPA	2,9	2EAT (Takahashi, Kondou et al. 2007)
			CPA (+curcumine)	2,8	2EAU (Takahashi, Kondou et al. 2007)
E2.ATP	$\text{Mg}^{2+}.\text{AMPPCP}$	-	TG	2,8	2C8K (Jensen, Sorensen et al. 2006)
	$\text{Mg}^{2+}.\text{AMPPCP}$	Mg^{2+}	TG	2,5	2DQS (Inesi, Lewis et al. 2006)

^a La thapsigargine (TG), la 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (BHQ) et l'acide cyclopiazonique (CPA) sont tous des inhibiteurs de la SERCA1a qui se fixent au domaine membranaire

^b les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent à des résultats non publiés à ce jour

^c l'astérisque symbolise un état de transition de la phosphorylation

La communauté des laboratoires étudiant les ATPases de type P se trouve donc désormais à la tête d'un ensemble très significatif de structures permettant de commenter les différentes étapes du cycle catalytique.

Cependant, la cristallogénèse d'une protéine est très souvent réalisée dans des conditions très particulières, afin notamment d'assurer la stabilité du matériel biologique durant les longues périodes nécessaires à la croissance des cristaux. Dans le cas des protéines membranaires, les lipides qui composent la membrane sont des partenaires importants pour la stabilité de ces protéines. Or, pour la cristallogénèse d'une protéine membranaire, la protéine est tout d'abord solubilisée par un détergent (le C_{12}E_8 dans le cas de l'ATPase Ca^{2+}), éventuellement supplémentée en lipides si elle a été préalablement délipidée, et la formation des cristaux a donc finalement lieu dans un milieu mixte détergents-lipides. Mais on sait que l'ATPase dépourvue de ses ions calcium n'est pas stable lorsqu'elle est solubilisée en détergent (que ce soit avec le C_{12}E_8 ou le DDM, ou pire encore avec la plupart des autres détergents, voir (Lund, Orłowski et al. 1989) et Chap. IV pour des références complémentaires). Ce point essentiel a donc imposé un certain nombre de contraintes pour la cristallisation des formes de l'ATPase dépourvues de Ca^{2+} . De plus, les structures cristallographiques présentent des images statiques très éloignées de la réalité dynamique dans laquelle la protéine se trouve au cours de son cycle catalytique. Il se pose

alors la question évidente de savoir dans quelles mesures ces structures reflètent réellement la conformation intermédiaire qu'elles sont supposées mimer.

Cette question est d'autant plus justifiée quand la protéine a été cristallisée en présence de molécules n'intervenant normalement pas au cours du cycle catalytique, par exemple des analogues non-hydrolysables de l'ATP (Picard, Toyoshima et al. 2005; Picard, Jensen et al. 2007) ou encore des inhibiteurs (Picard, Toyoshima et al. 2006; Montigny, Picard et al. 2007). Pourtant, jusqu'à la publication fin 2007 de la forme « E2.BeF₃ » en absence d'inhibiteur⁴, la présence de ligands « non naturels » était jugée indispensable pour stabiliser la protéine, fragilisée par sa solubilisation, au cours de la cristallogénèse. En effet, comme je le rappellerai plus loin en détail (voir Chap. IV), l'ATPase-Ca²⁺ solubilisée par les détergents s'inactive très rapidement en absence de calcium (Møller, Lind et al. 1980; Andersen, Møller et al. 1982; McIntosh and Ross 1985; Vilsen and Andersen 1987; Lund, Orłowski et al. 1989; Champeil, Menguy et al. 2000). Pour obtenir des structures de la protéine en absence de calcium mimant les états « E2 » de la protéine, la solution adoptée pour compenser cette instabilité était d'ajouter à la protéine des inhibiteurs tels que la thapsigargine (TG, (Sagara, Wade et al. 1992)), la 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (BHQ, (Wictome, Michelangeli et al. 1992)) ou l'acide cyclopiazonique (CPA, (Seidler, Jona et al. 1989)). Ces inhibiteurs, qui se fixent au niveau du domaine membranaire, stabilisent les hélices transmembranaires, comme peuvent sans doute le faire les ions calcium lorsqu'ils sont présents au site de transport (voir Chap IV, §V.2) (on notera d'ailleurs ici que toutes les structures obtenues en absence de calcium et en présence d'inhibiteur présentent des domaines membranaires organisés de façon très semblable). Les paragraphes suivants pointent quelques-uns des biais possibles qui sont susceptibles de faire que certaines des pourtant si belles structures obtenues ne soient pas complètement représentatives.

a. Cristallisation de l'ATPase en présence de calcium et de nucléotide

L'ATPase en présence d'une certaine concentration de Ca²⁺, comme toute enzyme en présence d'une certaine concentration de l'un de ses ligands, est présente simultanément sous au moins deux formes en équilibre dynamique, dont les proportions respectives sont imposées par le rapport entre la concentration du ligand et une constante d'équilibre apparente (qui, dans un cas simple, correspondrait à l'affinité de l'enzyme pour le ligand : pour l'ATPase Ca²⁺, on décrit en général au moins l'état « E2 » dépourvu de calcium et l'état « Ca₂.E1 » avec ses sites de liaison du Ca²⁺ occupés). L'affinité de l'ATPase pour le calcium est de l'ordre de quelques micromolaires à pH 7, et de 20 à 40 μM à pH 6 (voir Chap. IV, II.3.a & b). Pour n'avoir, par exemple, que 1% des enzymes sous une forme dépourvue de Ca²⁺, il faut se placer très haut en concentration de ligand : par exemple, pour une fixation simple (un seul ion Ca²⁺), il faudrait se placer à une concentration de ligand 100 fois plus élevée que la constante de dissociation vraie.

Pour l'ensemble des cristaux qui ont été jusqu'ici obtenus en présence de calcium, depuis l'obtention des premières ébauches de cristaux tridimensionnels (Dux, Pikula et al. 1987) jusqu'à la publication en 2000 de la première structure à résolution atomique (« Ca₂.E1 », PDB #1SU4, (Toyoshima, Nakasako et al. 2000)), l'astuce des auteurs pour stabiliser l'enzyme a été de se placer à 10 mM de Ca²⁺, *i.e.* dans des conditions où l'immense majorité des enzymes sont sous la forme « Ca₂.E1 », et ainsi limiter à une toute petite fraction les ATPases dépourvues de calcium, qui en présence de détergent vont se dénaturer progressivement au cours de la cristallogénèse. Notons cependant que d'après les résultats qui seront décrits dans le chapitre IV, il est très

⁴ Jusqu'à octobre 2007, date à laquelle les expériences que je présente ici ont été réalisées et publiées, toutes les structures en absence de calcium avaient en effet été obtenues en présence d'un ou plusieurs inhibiteurs. Ce n'est que fin 2007 que le groupe danois de Poul Nissen et le groupe japonais de Chikashi Toyoshima, publiaient les premières structures de l'ATPase dépourvue de calcium mais obtenues en absence d'inhibiteurs : les formes « E2.BeF₃ » (codes PDB 3B9B et 2ZBE) et « E2.AMPPCP.AlF₄ » (code PDB 3B9R) (Olesen, 2007 ; Toyoshima, 2007) (voir Chap. III).

probable aussi que l'utilisation de $C_{12}E_8$ ait rendu ces 10 mM de Ca^{2+} encore plus indispensables à la stabilisation de la protéine, la solubilisation par le $C_{12}E_8$ (notamment à pH 6) réduisant considérablement l'affinité de l'ATPase pour le calcium (voir [Chap IV](#) et ([Montigny, Arnou et al. 2008](#))).

Néanmoins, l'utilisation systématique de ces 10 mM de calcium n'est pas sans effet sur la protéine.

D'un point de vue fonctionnel, l'effet de ces concentrations élevées sur l'activité ATPasique est connu depuis des années ([Ikemoto 1974](#)) : au-delà de quelques centaines de micromolaires de calcium, l'activité ATPasique de la protéine, membranaire ou solubilisée, est fortement inhibée, et ce phénomène tient à deux raisons majeures : d'une part la fixation rapide de calcium aux sites de transport côté luminal ([Ikemoto 1975](#)), qui entraîne un ralentissement de la déphosphorylation, et d'autre part une compétition au site catalytique entre $Ca.ATP$ et $Mg.ATP$, le $Ca.ATP$ étant un substrat moins rapidement hydrolysé par l'ATPase que le $Mg.ATP$ ([Vianna 1975](#)) : la présence de fortes concentrations de Ca^{2+} amène donc un ligand « non naturel », le Ca^{2+} , au site catalytique normalement occupé par le Mg^{2+} au cours de la catalyse.

D'un point de vue structural, ce large excès de calcium peut également induire quelques biais. Les structures « $Ca_2.E1.AMPPCP$ » publiées simultanément par deux laboratoires en 2004 ([Sorensen, Møller et al. 2004](#); [Toyoshima and Mizutani 2004](#)), PDB#1VFP et #1T5S) présentent des sites de transport tout aussi inaccessibles que dans les structures (résolues en parallèle par les deux mêmes laboratoires) où ces ions Ca^{2+} sont réellement immobilisés dans un analogue de l'état de transition (« $Ca_2.E1.AIF_4.ADP$ »). Cette observation était en opposition avec des résultats plus anciens ([Orlowski and Champeil 1991a](#)) montrant qu'à concentration de Ca^{2+} plus modérée, l'AMPPCP (un analogue non-hydrolysable de l'ATP, ([Cable, Feher et al. 1985](#))) n'empêchait pas la dissociation des ions calcium de l'ATPase, résultats suggérant donc que les sites de fixation du Ca^{2+} n'étaient pas occlus en présence d'AMPPCP (probablement présent sous forme de $Mg.AMPPCP$, vu les concentrations millimolaires de Mg^{2+} utilisées). De fait, Martin Picard a montré durant sa thèse que l'utilisation conjointe de 10 mM de calcium et d'AMPPCP induisait un déplacement de l'équilibre conformationnel de l'ATPase, dans le sens de l'occlusion des ions calcium ([Picard, Toyoshima et al. 2005](#)). Un nouvel examen des données de diffraction des cristaux révélera finalement la présence, en lieu et place du $Mg.AMPPCP$ attendu, d'un complexe $Ca.AMPPCP$ au site catalytique ([Picard, Jensen et al. 2007](#)).

b. Cristallisation de l'ATPase en absence de calcium mais en présence d'inhibiteurs membranaires

Comme rappelé précédemment, l'ATPase- Ca^{2+} n'est pas stable lorsqu'elle est solubilisée en absence de calcium (voir aussi [Chap IV](#)). L'astuce alors choisie pour stabiliser l'ATPase durant sa cristallogénèse (ou d'autres protéines d'ailleurs, comme par exemple l'ATP/ADP translocase ou la lactose perméase citées en introduction, voir §I.3.c) a alors généralement été de recourir à l'utilisation d'inhibiteurs.

L'utilisation de la thapsigargine a ainsi pendant longtemps été indispensable à la cristallogénèse des formes dépourvues de calcium : grâce à sa très forte affinité, la TG déplace complètement l'équilibre « E1/E2 » pour former un complexe « E2.TG », et ce complexe, même en détergent, est préservé de la dénaturation irréversible qui se produit normalement en absence de calcium ([Seekoe, Peall et al. 2001](#)). Le calcium et la thapsigargine agissent probablement de façon assez similaire : en effet, la TG, logée dans la poche hydrophobe formée par M3, M5 et M7, limite certainement les mouvements de ces trois hélices transmembranaires, stabilisant ainsi le domaine membranaire ([Seekoe, Peall et al. 2001](#); [Toyoshima and Nomura 2002](#)) comme le font sans doute les deux ions calcium lorsqu'ils sont présents aux sites de transport et qu'ils « pontent », eux, les hélices M4, M5, M6 et M8 ([Juul, Turc et al. 1995](#); [Toyoshima, Nakasako et al. 2000](#)). A l'inverse, l'instabilité de l'ATPase- Ca^{2+} solubilisée par les détergents en absence de

TG suggère qu'en absence d'un ligand pour maintenir la cohésion entre les hélices, la dynamique du domaine membranaire, liée essentiellement à l'agitation thermique, est suffisamment importante pour exposer certaines régions à l'eau et amorcer ainsi l'inactivation irréversible de l'ATPase. Je montrerai plus loin que de tels mouvements des hélices, en présence de détergent, peuvent être suffisamment amples pour perturber le domaine cytosolique (voir [Chap. IV, §V.1](#)). A l'inverse, la présence de thapsigargine, en « gelant » les hélices transmembranaires, pourrait bien en avoir perturbé l'organisation en certains points critiques. Nous étudierons cela dans le [chapitre III](#).

Il existe cependant d'autres inhibiteurs des SERCAs, très différents de la TG du point de vue de leur nature chimique ([figure I.18](#)) mais bloquant l'accumulation de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique avec un mode d'action apparemment similaire à celui de la TG, tout en se fixant probablement en des endroits différents ([Mason, Garcia-Rodriguez et al. 1991](#)) : la 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (BHQ, ([Wictome, Michelangeli et al. 1992](#))) et l'acide cyclopiazonique (CPA, ([Seidler, Jona et al. 1989](#))).

- Un autre inhibiteur de l'ATPase plus récemment utilisé pour la cristallogénèse : la 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (BHQ)

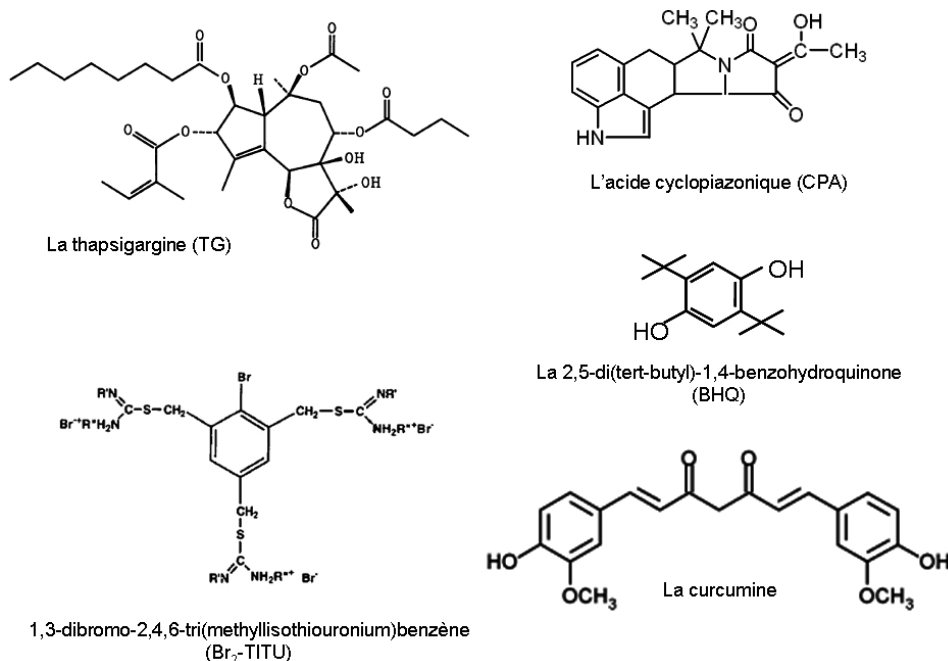


Figure I.18 : Structure chimique de quelques inhibiteurs de l'ATPase- Ca^{2+} .

La BHQ, utilisé à l'origine comme un antioxydant ([PubChem_database](#)), est également un inhibiteur des ATPases de type SERCA ([Wictome, Michelangeli et al. 1992](#)). Cet inhibiteur se fixe au domaine membranaire de l'ATPase, mais différemment de la TG ([Khan, Wictome et al. 1995](#)), en se plaçant, comme on le sait dorénavant, entre les hélices transmembranaires M3 et M4, *via* des liaisons hydrogènes, au niveau de l'interface membrane cytosol (voir [figure I.19](#)). L'utilisation de la BHQ en sus de la thapsigargine a permis notamment l'obtention d'une structure de l'ATPase- Ca^{2+} à 2,4 Å (PDB #2AGV, ([Obara, Miyashita et al. 2005](#))). Globalement, cette structure présente un repliement identique à celle publiée auparavant en présence uniquement de TG (à l'exception notable du positionnement de la chaîne latérale du résidu E309) ([Toyoshima and Nomura 2002](#)). Toutefois, l'amélioration de la résolution a révélé la position de nombreuses molécules d'eau à proximité des sites de transport, ce qui a permis aux auteurs de proposer un modèle détaillant le contre-transport de protons qui intervient au cours du cycle catalytique (voir [figure I.12](#), ([Madeira 1978](#); [Chiesi and Inesi 1980](#))) (ce modèle est en

accord avec les données expérimentales publiées, sans pour autant préciser le nombre de protons transportés (Levy, Seigneuret et al. 1990; Yu, Carroll et al. 1993; Hauser and Barth 2007; Karjalainen, Hauser et al. 2007; Andersson, Hauser et al. 2008)). Sur cette même structure « E2.TG.BHQ », les auteurs ont également identifié trois densités électroniques correspondant apparemment aux têtes de trois phosphatidyléthanolamine (PE). Deux de ces lipides sont situés en périphérie du domaine membranaire, et le troisième est inséré au cœur du domaine, à proximité du site de fixation de la BHQ. Etant donné que c'est seulement de la phosphatidylcholine qui a été ajoutée pour la formation de ces cristaux, ces PE, dans cette interprétation-là des densités électroniques, auraient été entraînées avec la protéine depuis la purification de l'ATPase à partir des membranes natives : certaines études (Bick, Youker et al. 1991) suggèrent effectivement une interaction préférentielle de l'ATPase avec la PE (d'autres groupes ne sont cependant pas convaincus de l'existence de telles interactions préférentielles, l'activité de l'enzyme pouvant être conservée même après délipidation complète (le Maire, Moller et al. 1976)).

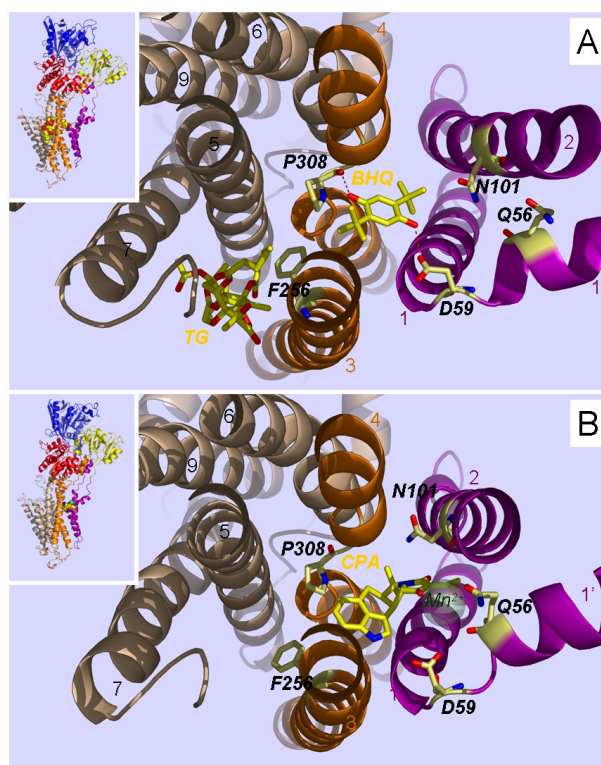


Figure I.19 : Site de fixation de la 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (BHQ) et de l'acide cyclopiazonique (CPA). Les structures « E2.TG.BHQ » (panneau A, PDB #2AGV, (Takahashi, Kondou et al. 2007)) et « E2.CPA.AMPPCP.MgF₄ » (panneau B, PDB #3FGO, (Laursen, Bublitz et al. 2009)) sont représentées en rubans avec la même orientation pour leurs domaines C-terminaux (hélices transmembranaires M7 à M10). Le domaine membranaire ici représenté est observé depuis le cytosol, selon un axe perpendiculaire à la membrane (le domaine cytosolique a été masqué). Les hélices transmembranaires M1 à M9 sont visibles et annotées de 1 à 9, ainsi que la partie 1' de M1 orientée dans un plan parallèle à la membrane dans ces conformations (M1 et M2 en violet, M3 et M4 en orangé, M5 à M10 en blanc). Les chaînes latérales des acides aminés sont indiquées en gras et italique, et les atomes sont colorés en rouge pour les oxygènes, en bleu pour les azotes et en blanc pour les carbones. Les inhibiteurs, TG, BHQ et CPA, sont indiqués en orange et colorés selon le même code couleur avec cependant les carbones en jaune. A : La thapsigargine occupe, comme attendu, la poche formée par les hélices M3, M5 et M7, avec une interaction majeure avec la phénylalanine F256 (voir figure I.16). La BHQ est enchâssée au sein des hélices M1 à M4, pontant les deux hélices M1 et M4 *via* des liaisons hydrogènes avec les résidus aspartate D59 et proline P308, ce qui semble stabiliser les cassures de ces deux hélices. B : En présence de CPA, les hélices M1 et M2 sont réorganisées de façon faible mais significative (comparer avec le panneau A). Le CPA se positionne également entre les hélices M1 à M4 et bloque la protéine en structurant un réseau de liaisons hydrogènes, *via* des molécules d'eau non représentées ici, avec les résidus asparagine N101, glutamine Q59 et aspartate D59. La surprise de cette structure a été de montrer la présence d'un ion manganèse (en vert, symbolisé par une sphère semi-transparente) au centre de ce réseau d'interactions.

- Encore un autre inhibiteur de l'ATPase plus récemment utilisé pour la cristallogénèse : l'acide cyclopiazonique (CPA)

Le CPA, quant à lui, est une mycotoxine qui peut contaminer les produits de l'agriculture (céréales, fromages) et présenter un réel risque toxicologique pour les animaux et les humains⁵. Il inhibe spécifiquement les ATPases de type SERCA (Goeger, Riley et al. 1988; Seidler, Jona et al. 1989), et comme la TG et la BHQ, bloque l'enzyme dans une conformation proche de l'état « E2 » (Plenge-Tellechea, Soler et al. 1997; Soler, Plenge-Tellechea et al. 1998) en se fixant à l'interface entre le domaine membranaire et le cytosol (voir figure I.19.B et les prédictions préexistantes de (Ma, Zhong et al. 1999)). En 2007, plusieurs structures ont été obtenues en présence de CPA, seul ou associé à d'autres inhibiteurs (Moncoq, Trieber et al. 2007; Takahashi, Kondou et al. 2007), en présence de magnésium fluorure et éventuellement d'un nucléotide (Moncoq, Trieber et al. 2007; Laursen, Bublitz et al. 2009). Les premières structures « E2.CPA » ont été publiées simultanément par deux groupes différents (PDB #2EAS, (Takahashi, Kondou et al. 2007); PDB #2OA0 (Moncoq, Trieber et al. 2007)) mais, de façon surprenante, le CPA se fixe au même endroit mais avec des orientations opposées dans les structures proposées par les deux groupes ! La chaîne polypeptidique a également une structure légèrement différente de celle obtenue en présence de thapsigargine, seule (Toyoshima and Nomura 2002) ou associée au BHQ (Obara, Miyashita et al. 2005) : le domaine cytosolique est légèrement redressé et les hélices M1 à M4 sont partiellement réarrangées. Pourtant, ces trois structures, « E2.TG », « E2.TG.BHQ » et « E2.CPA » sont théoriquement des analogues du même état « E2 » : l'ATPase- Ca^{2+} , dans cette supposée conformation « E2 », et malgré la présence des inhibiteurs membranaires, conserve donc une certaine plasticité permettant à la partie cytosolique de la molécule d'explorer certaines conformations (agitation thermique). On notera que le CPA interagit essentiellement avec les hélices M1 et M2, reliées au domaine cytosolique *via* des boucles souples qui ont un rôle certain dans la communication entre le domaine membranaire et la « tête » cytosolique de l'ATPase (Toyoshima 2008).

Tout récemment, une nouvelle structure a été publiée, « E2.CPA.AMPPCP. MnF_4 » (dont la figure I.19.B est dérivée), mimant l'état « E2.Pi.ADP » (Laursen, Bublitz et al. 2009). Les auteurs ont réalisé la cristallisation en présence de fluorure et de *manganèse*, connu pour pouvoir se substituer au magnésium (et aussi au calcium, éventuellement) pour se fixer à l'ATPase (Chiesi and Inesi 1980), et qui offre l'avantage de présenter un signal de « diffusion anormale » pour certaines longueurs d'onde des rayons X. Ceci a permis d'une part de préciser la structure du site catalytique, autour du MnF_4 . D'autre part, et de façon plus imprévue, cette structure, en révélant la présence d'un deuxième ion Mn^{2+} , a montré qu'en fait le CPA se fixait à la protéine sous la forme d'un complexe CPA.Metal^{2+} (voir figure I.19.B). Ceci n'avait pas été reconnu sur les précédentes structures (Moncoq, Trieber et al. 2007; Takahashi, Kondou et al. 2007), réalisées en présence de Mg^{2+} , et c'était sans doute la non prise en compte de ce métal inattendu fixé avec le CPA qui était responsable du désaccord entre les deux groupes quant à l'orientation du CPA dans son site. Par contre, comme on va le voir, l'existence de ce complexe CPA.Mn^{2+} est pleinement en accord avec nos données de fluorescence, qui nous avaient fait suspecter que la fixation du CPA à l'ATPase dépendait du Mg^{2+} (Montigny, 2007 #112} et discussion ci-après).

⁵ L'acide cyclopiazonique (CPA) est une mycotoxine principalement produite par les champignons *Aspergillus flavus* et *Penicillium cyclopium*. Le CPA est un métabolite secondaire (toxique) issu de la voie de biosynthèse du tryptophane (Holzapfe, 1971), qui a été découvert et identifié suite à l'intoxication répétée de canards nourris avec des céréales stockées dans des silos à grains trop humides (Holzapfe, 1968), la chaleur et l'humidité étant des facteurs favorables au développement de ces champignons. Ce type d'intoxication entraîne de sévères désordres neurologiques, rénaux et musculaires, chez l'animal et chez l'homme (Morrissey, 1985 ; Nishie, 1985). NB : Les souches *Penicillium camembertii* et *Penicillium roquefortii*, indispensables à la fermentation de nos camemberts et roqueforts, peuvent elles aussi éventuellement produire du CPA ! Cependant le contrôle des différentes étapes du processus de production permet de limiter la production de la toxine.

c. Autres facteurs susceptibles d'influencer la conformation de la protéine, y compris au cours de la cristallogénèse

Jusqu'à aujourd'hui, l'ATPase- Ca^{2+} a toujours été cristallisée en présence d'un mélange de lipides et de détergents : dioléyl-phosphatidylcholine (DOPC) et octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether (C_{12}E_8). Or, comme je le rappellerai par la suite, la présence de certains détergents perturbe l'activité de la protéine de façon spécifique (Andersen, le Maire et al. 1983; Champeil, le Maire et al. 1986) ; voir le Chap. IV). Les détergents pourraient donc également influencer la structure des différents intermédiaires.

On peut également s'interroger sur la nature du lipide présent pendant la cristallisation. Même si la dioléyl-phosphatidylcholine est un lipide qui permet une stabilisation correcte de l'activité ATPasique (Sorensen, Olesen et al. 2006), le DOPC n'est pas très représentatif des lipides de la membrane du réticulum sarcoplasmique (ou d'ailleurs du réticulum endoplasmique de la cellule eucaryote), où on trouve 60 % de phosphatidylcholines à chaînes grasses diverses et une proportion non négligeable de phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol (PI) (représentant à eux deux 30 % des lipides totaux). Il est connu que certaines protéines membranaires ont leur repliement et leur activité qui dépendent de la présence de certains lipides dans les membranes : c'est le cas notamment de la lactose perméase (Lac Y) dont l'activation dépend de la présence de phosphatidyléthanolamine (PE) (Bogdanov and Dowhan 1995; Bogdanov, Sun et al. 1996; Bogdanov, Umeda et al. 1999), des aquaporines où un lipide semble participer à la structuration des homotétramères (Horsefield, Norden et al. 2008), ou encore de la rhodopsine dont l'activité serait dépendante de la présence de phosphatidylsérine (PS) ou PE (Soubias, Teague et al. 2006). Concernant les ATPases de type P (Esmann and Marsh 2006) et plus particulièrement l'ATPase- Ca^{2+} , le rôle de certains lipides dans l'activation de ces enzymes est sujet à controverse. Il semblerait que l'ATPase- Ca^{2+} ne soit pas sensible à la nature de la tête du phospholipide (tout le monde n'est cependant pas d'accord) mais uniquement à la longueur de sa chaîne aliphatique (Caffrey and Feigenson 1981; East and Lee 1982). En effet, de cette longueur dépend l'épaisseur de la bicouche et donc la façon dont la protéine va s'insérer dans cette bicouche. La plasticité de la bicouche lui permettrait de se positionner au mieux autour de la protéine pour « envelopper » le domaine hydrophobe de la protéine. Toutefois, quand la bicouche atteint un certain degré de déformation, il ne lui serait plus possible de s'adapter et c'est la protéine qui changerait alors de position dans la membrane pour éviter l'exposition de ses régions hydrophobes au milieu aqueux. Les changements de conformation alors réalisés se traduiraient par une modification de l'activité de l'enzyme (Lee 2002; Lee 2003; Lee 2004). Néanmoins le débat a été relancé avec la découverte dans plusieurs structures cristallines de la présence de lipides co-cristallisés avec l'ATPase : plusieurs structures obtenues depuis 2000 ont montré la présence de PC (Toyoshima and Mizutani 2004; Picard, Jensen et al. 2007), pouvant provenir du milieu de cristallisation, mais également de PE (Obara, Miyashita et al. 2005) qui ne peut provenir que des membranes de réticulum sarcoplasmique d'origine (voir la BHQ ci-dessus, §II.5.b), ce qui suggérerait une interaction forte de ce lipide avec l'ATPase (au moins dans cette conformation).

III. CONTENU DE CE MEMOIRE DE THESE

Comme je viens de l'exposer, la compréhension du fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} s'est accélérée ces dix dernières années avec l'obtention des nombreuses structures à résolution atomique ; cependant, j'ai mentionné aussi que ces structures ont soulevé de nombreuses autres questions, liées notamment à l'influence possible des conditions de cristallogénèse sur la conformation adoptée par la protéine dans le cristal.

La première partie de mon travail de thèse s'est déroulée dans la continuité de la thèse de Martin Picard, qui avait commencé à s'intéresser à l'effet de la thapsigargine sur la conformation du domaine membranaire de l'ATPase. Mon travail a alors consisté à étudier l'effet de la

thapsigargine mais aussi de la BHQ et du CPA sur ce domaine membranaire, notamment dans la forme « E2.BeF₃ » qui est supposée mimer la forme phosphorylée « E2P » de l'enzyme, cette forme dans laquelle l'ATPase se doit d'avoir ses sites de transport accessibles depuis le lumen pour permettre le relargage des ions calcium (voir [Chap. III](#)).

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé cette thèse s'intéressait également à utiliser l'expression hétérologue d'ATPases de type P dans la levure *S. cerevisiae* pour obtenir soit des mutants de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a, soit d'autres ATPases de types P qui ne soient pas aussi facilement disponibles dans la nature que l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a du réticulum sarcoplasmique de lapin. Cependant, certaines techniques de caractérisation fonctionnelle des enzymes recombinants étaient rendues difficiles par leurs conditions de préparation. Mon travail a donc alors consisté à transposer certains de ces protocoles, jusqu'à présent utilisés sur l'ATPase du SR membranaire, sur une ATPase solubilisée par les détergents, dans les conditions les plus proches possibles de celles utilisées pour les enzymes recombinants purifiés en détergent. Ce travail a permis d'une part de trouver de nouvelles conditions de mesure et de les mettre en application sur plusieurs mutants de l'ATPase, et d'autre part de montrer l'effet spécifique de certains détergents sur certaines étapes du cycle ATPasique (voir [Chap. IV](#)).

Enfin, ces trois années ont été également l'occasion de réaliser plusieurs travaux en collaboration, soit en interne au laboratoire, avec les projets de cristallisation de mutants de l'ATPase-Ca²⁺ déjà mentionnés et la caractérisation des complexes formés par divers divalents avec divers ligands (et notamment par le cadmium avec le glutathion), soit en externe, avec David McIntosh au Cap, pour la caractérisation d'une forme particulière de l'ATPase-Ca²⁺ marquée au FITC.

CHAPITRE II : PRINCIPALES METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE DANS LE CADRE DE CETTE THESE

Comme je l'ai souligné dans l'introduction, il existe une grande variété de techniques permettant d'étudier l'ATPase- Ca^{2+} . Dans le présent chapitre, je ne ferai pas une revue systématique des techniques que j'ai pratiquées pendant ces trois années de doctorat, mais je mettrai l'accent sur certaines d'entre elles, en incluant des données parfois oubliées de la bibliographie et pourtant indispensables à la compréhension des résultats voire des problèmes pouvant survenir.

Les autres « Matériels et Méthodes » utilisés dans le cadre de cette thèse sont décrits dans les publications jointes à ce mémoire : les protocoles que j'ai utilisés sont le plus souvent détaillés dans les légendes de figures

I. PREPARATION DE VESICULES DE RETICULUM SARCOPLASMIQUE (SR), RICHES EN Ca^{2+} -ATPASE (SERCA1A), A PARTIR DE MUSCLE DE LAPIN

Comme je l'ai déjà dit, certaines membranes naturelles dans le muscle squelettique, très spécialisées, sont remarquablement riches en ATPases- Ca^{2+} : SERCA1a représente près de 70 % des protéines des fragments de réticulum sarcoplasmique que l'on peut préparer à partir de muscle squelettique de lapin. Ces fragments membranaires sont préparés selon le protocole décrit dans (Champeil, Guillain et al. 1985), dérivé essentiellement de la méthode employée initialement par (de Meis and Hasselbach 1971).

Deux lapins sont mis à jeun pendant 48 h, afin de limiter la quantité de glycogène et de phosphorylase (enzyme très abondante responsable de l'hydrolyse du glycogène en glucose-1-phosphate) associée aux membranes du réticulum. Après sacrifice des lapins, on récupère les muscles des cuisses et du râble, muscles essentiellement à fibres rapides qui sont les plus riches en réticulum sarcoplasmique (muscles « blancs », dans lesquels les fibres permettent un effort puissant mais peu endurant comme le bond ou la fuite rapide chez le lapin (Sherwood 2000)). Ces muscles sont broyés et homogénéisés dans du KCl 0.1M, en présence d' α -amylase ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) pour hydrolyser les traces de glycogène par l'intermédiaire duquel la phosphorylase est associée au réticulum. Le broyat est centrifugé tout d'abord à basse vitesse pour éliminer les débris de cellules, de membranes plasmiques ou de mitochondries (typiquement 30 minutes pour 400 ml dans un rotor Beckman Coulter JA10 à 9.500 rpm, i.e. $15000 g_{\text{max}}$), puis le surnageant est ultracentrifugé pour récupérer les microsomes « bruts » (160 minutes pour 70 ml dans un rotor Beckman Coulter 45Ti à 40.000 rpm, i.e. $100000 g_{\text{max}}$). Ces culots membranaires vont ensuite être remis en suspension en veillant à limiter la formation de mousse (pour éviter l'exposition des protéines à des interfaces air-liquide qui pourraient entraîner la dénaturation des protéines membranaires). Cette resuspension des culots membranaires se fait dans un milieu ne contenant que 0,5 M saccharose, et dans lequel les membranes sont laissées une bonne heure : la faible force ionique favorise probablement l'agrégation sélective des tubules T (qui sont les invaginations de la membrane plasmique, en contact avec le SR) et des citernes terminales du réticulum (qui contiennent, proportionnellement, davantage de récepteurs à la ryanodine (Meissner 1975) et moins de SERCA1a). Une centrifugation à basse vitesse (de nouveau 9500 rpm, rotor Beckman Coulter JA10, typiquement 30 minutes pour 200 ml) permet alors d'éliminer le culot brunâtre qui résulte de cette agrégation. On porte ensuite la concentration en KCl du surnageant à 0,6 M pour décrocher les éventuelles protéines extrinsèques de la membrane et solubiliser la myosine qui serait agrégée, et on re-centrifuge de nouveau à plus haute vitesse

pendant la nuit (par exemple ~ 34000 g_{max}, rotor Beckman Coulter 45Ti, pendant 15 h pour 70 ml) pour récupérer cette fois les microsomes purifiés, riches en SERCA1a.

Ces microsomes sont resuspendus dans un tampon 10 mM Tes-NaOH pH 7.4 contenant 0,3 M de sucrose, pour minimiser le choc osmotique et préserver les protéines des effets fâcheux de futures congélations trop lentes. La concentration en protéine est estimée par mesure de l'absorption à 280 nm (absorption des résidus aromatiques) en présence de 1 % de SDS, en prenant pour règle de conversion - particulièrement agréable pour les calculs de tête ☺ - qu'une absorption de 1 dans une cuvette de 1 cm de chemin optique correspond à une concentration de 1 mg de protéine par ml.

Ces fragments membranaires se sont refermés spontanément sous la forme de vésicules étanches, de tailles relativement homogènes (60 à 200 nm de diamètre), à la surface desquelles les protéines sont présentes à une très forte densité (voir [figure II.01](#), à gauche). L'analyse par SDS-PAGE montre que l'ATPase- Ca^{2+} est la protéine majeure de ces membranes (voir [figure II.01](#), à droite) : les contaminants visibles (moins de 30 % des protéines totales) sont notamment les protéines M55 et calséquestrine, qui ont une masse molaire d'environ 55 et 45 kDa et sont retenues à l'intérieur des vésicules. Compte tenu de ces protéines contaminantes, et l'ATPase ayant une masse molaire d'environ 110 kDa, on peut donc estimer qu'il faut environ 150 000 g de protéines de SR pour trouver 1 mole d'ATPase : un milligramme de membrane contient donc 6 à 7 nmoles d'ATPase (certaines s'étant éventuellement dénaturées lors de la préparation des vésicules).

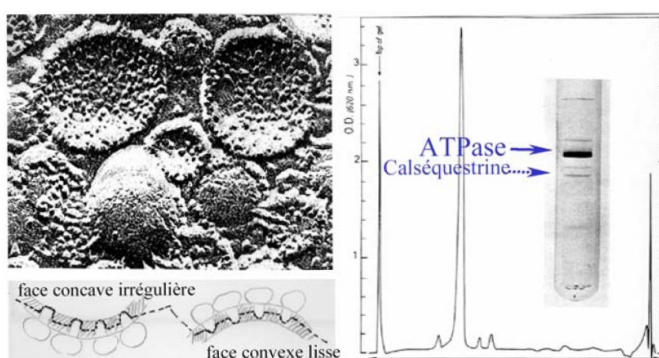


Figure II.01 : Vésicules de réticulum sarcoplasmique. À gauche, observation par microscopie électronique, après cryofracture, (adaptée de ([Scales and Inesi 1976](#))). À droite, séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE et analyse par densitométrie (le profil d'absorption, du haut vers le bas du gel, se lit de la gauche vers la droite du tracé).

II. EXPRESSION HETEROLOGUE DE L'ATPASE- Ca^{2+} SAUVAGE OU MUTEE, ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

1. Expression hétérologue dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

a. Le vecteur d'expression

Le vecteur d'expression pYedP60 dont nous disposons provient à l'origine du laboratoire du Dr Denis Pompon, où il a été initialement utilisé pour l'expression de cytochromes P450 ([Pompon, Louerat et al. 1996](#)). Ce vecteur d'origine a été optimisé à plusieurs reprises au laboratoire, notamment pour permettre l'expression de l'ATPase- Ca^{2+} avec des étiquettes facilitant sa purification ultérieure : étiquette polyhistidine à l'extrémité C-terminale dans nos protocoles initiaux ([Lenoir, Menguy et al. 2002](#)), et plus récemment domaine de biotinylation à la même extrémité C-terminale ([Jidenko, Lenoir et al. 2006](#)) (voire même à l'extrémité N-terminale, pour préserver l'extrémité C-terminale de certaines nouvelles isoformes étudiées au laboratoire ([Cardi, Montigny et al. 2009](#))).

Ce vecteur contient tous les éléments nécessaires à l'amplification des séquences dans *E.coli* et au maintien du vecteur dans la levure *S. cerevisiae*, ainsi que la cassette permettant l'expression des protéines ([figure II.02](#)). Ce type de vecteur « épisomal » (avec une origine de

réplication 2μ) est présent, dans la levure transformée, avec un nombre de copies relativement limité, de 5 à 20 copies par cellule. Son système d'expression présente la particularité de mettre en jeu des marqueurs d'auxotrophie et de complémentation : pYeDP60 contient le gène *URA3*⁶ qui pallie l'auxotrophie pour l'uracile de la souche de levure W303.1b que nous utilisons (voir plus loin). Grâce à la présence du gène *URA3*, il est possible de sélectionner sur milieu minimum ne contenant pas d'uracile des clones de levures transformées par ce vecteur : une levure non-transformée ne pourra pas se développer en absence d'uracile. L'autre marqueur, *ADE2*, est un marqueur de complémentation : il permet la synthèse d'adénine. Il trouve son utilité à haute densité de levure, lorsque les milieux de cultures, même « riches », deviennent carencés en adénine (Pompon, Louerat et al. 1996) : un milieu carencé en adénine aura tendance à sélectionner les levures possédant le vecteur pYeDP60, *i.e.* celles pouvant synthétiser elle-même leur adénine⁷.

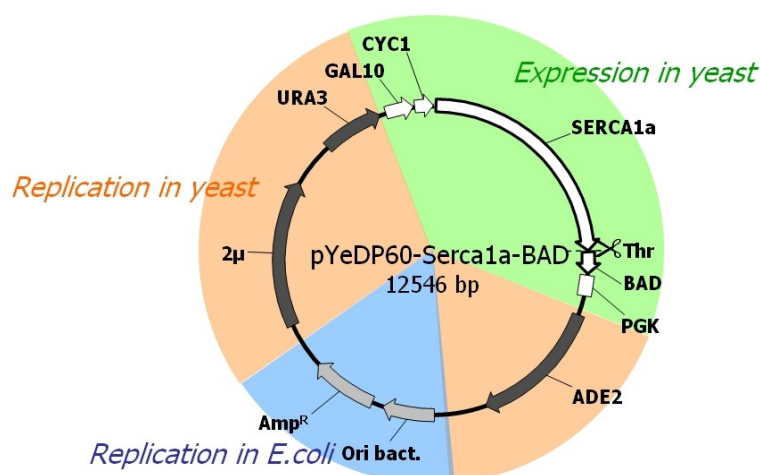


Figure II.02 : Vecteur d'expression utilisé pour l'expression hétérologue de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a dans la levure *S. cerevisiae*. Ce vecteur est découpé en trois parties, de rôles différents. (1) *Amplification dans la bactérie E. coli (bleu)* : une origine de réplique bactérienne (Ori Bact.) qui assure la réplique du plasmide dans la bactérie, et un gène qui confère la résistance à l'ampicilline (Amp^R) pour la sélection de bactéries contenant le plasmide. (2) *Maintien et multiplication du vecteur dans la levure (orange)* : une origine de réplique de levure (2μ) qui permet la réplique autonome du vecteur (on parle alors de vecteur navette car il peut être répliqué à la fois dans la bactérie et la levure), un marqueur d'auxotrophie (*URA3*) permettant à la souche de levure déficiente que nous utilisons de se développer sur un milieu exempt d'uracile, et un marqueur de complémentation pour la synthèse de l'adénine (*ADE2*). (3) *Expression de SERCA1a (vert)* : le gène codant SERCA1a est sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur fort hybride GAL10-CYC1⁸, inductible par le galactose et réprimé par le glucose. Le gène codant SERCA1A est fusionné en 3' avec une séquence codant pour un site de clivage par la thrombine (Thr) ainsi que pour un domaine de biotinylation (BAD, Biotin Acceptor Domain). La « cassette » d'expression se termine par le terminateur de la phosphoglycérate kinase (PGK).

⁶ Chez *S. cerevisiae*, les gènes de type sauvage sont notés en capitales italiques (ex : *URA3*), les allèles mutants du gène correspondant sont notés en minuscules italiques lorsqu'ils sont récessifs (*ura3*), les gènes délétés sont écrits selon la même typographie mais on ajoute un « - » en exposant (*ura3*⁻). La protéine codée porte le même sigle mais la première lettre est une majuscule et la dernière un p pour « protéine » (Ura3p).

⁷ Le gène *ADE2* de la levure code pour une carboxylase (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, Ade2p) impliquée dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine. Cette enzyme catalyse la carboxylation de l'acide imidazole ribotidique (AIR) en acide carboxyimidazole ribotidique (CAIR). Dans les levures *ade2*⁻, l'AIR va donc s'accumuler dans les cellules. En conditions d'aérobiose, ce composé va être rapidement oxydé pour donner un pigment rouge à l'origine d'une couleur caractéristique pour ces levures lorsqu'elles sont carencées en adénine. En revanche, sur un milieu contenant de l'adénine, ces mêmes levures auront leur couleur « blanc cassé » habituelle (Pol, 1997 ; Thuriaux, 2004).

⁸ GAL10-CYC1 est un promoteur fort hybride, construit par fusion de la séquence activatrice du promoteur GAL1-GAL10 (Schultz, 1987) de la levure (voir ci-après la souche de levure W303.1b Gal4-2 utilisée) et des séquences d'initiation de la transcription du cytochrome c1 (Hahn, 1985).

b. La souche W303.1b/*GAL4*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* W303.1b d'origine (*a*, *leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2*⁻, *can*^r, *cir*⁺)⁹ nous a également été donnée par Denis Pompon (CGM, Gif-sur-Yvette) (Pompon, Louerat et al. 1996). Cette souche a été modifiée (W303.1b/*GAL4*) de façon à surexprimer la protéine Gal4p si on ajoute du galactose (Pedersen, Rasmussen et al. 1996).

En effet, Gal4p est un facteur de transcription qui active différents promoteurs (dont l'un s'appelle *GAL10*). Dans la souche d'origine, W303.1b, Gal4p est très peu exprimée, et en outre, en absence de galactose (ou en présence de glucose), un répresseur (Gal80p) piège les rares protéines Gal4p présentes, bloquant leur rôle activateur de transcription. Dans le génome de notre souche, une autre copie du gène *GAL4* codant pour Gal4p a été ajoutée, et elle a été placée sous contrôle d'un promoteur *GAL10* : la transcription de *GAL4* (en Gal4p) étant activée (*via GAL10*) par le produit de cette même transcription, la synthèse de ce produit (Gal4p) est ainsi auto-amplifiée. Cette amplification est sous le contrôle du galactose parce qu'en présence de galactose, le galactose se fixe sur le répresseur Gal80p et libère Gal4p, qui va donc pouvoir aller activer les promoteurs de type *GAL10* contrôlant la synthèse d'autres Gal4p sur le génome de W303.1b/*GAL4*.

Mais cette levure W303.1b/*GAL4* va être transformée avec un vecteur d'expression, pYeDP60, dans lequel l'expression de SERCA1a a été placée elle aussi sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur de type *GAL10* (activé par Gal4p). En absence de galactose (ou en présence de glucose), cette voie est réprimée, toujours parce que le répresseur (Gal80p) piège les quelques protéines Gal4p présentes. En revanche, en présence de galactose, le Gal4p désormais produit va pouvoir activer également (*via* le promoteur de type *GAL10*) la surexpression de SERCA1a sur le vecteur pYeDP60.

c. Expression des enzymes sauvages (WT) ou mutées

Les levures sont transformées avec des plasmides contenant les séquences codant pour les ATPases sauvages (WT) ou mutées en utilisant la méthode classique décrite par Geitz *et al.*, et qui consiste à précipiter les ADNs plasmidiques par l'acétate de lithium, en présence d'un ADN entraîneur, et à faire entrer le précipité dans les levures par un choc thermique, ces levures ayant été précédemment partiellement perméabilisées avec le polyéthylèneglycol (PEG) (Gietz, Schiestl et al. 1995). Les levures transformées sont sélectionnées après étalement sur un milieu minimum « S6 » (0,1 % yeast nitrogen base, 0,7 % bactocasmino, 1 % glucose et 1,5 % agar) et incubation 48 à 72 heures à 28°C. La sélection des clones, l'expression des protéines recombinantes et la préparation des membranes de levures ont été réalisées comme décrit précédemment (Lenoir, Menguy et al. 2002; Lenoir 2004). Le niveau d'expression des protéines mutées est équivalent à celui de la protéine sauvage, *i.e.* environ 0,1 mg de protéine recombinante par g de levures (~ 4 mg.L⁻¹ de culture).

Le domaine BAD fusionné en C-terminal de SERCA1a est un domaine de biotinylation bactérien (Cronan 1990; Consler, Persson et al. 1993) qui va être biotinylé *in vivo* par la levure *S. cerevisiae*. Toutefois, il existe chez la levure trois autres protéines biotinylées connues : l'acétyl-CoA carboxylase et la pyruvate carboxylase, qui sont deux enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (Al-Feel, DeMar et al. 2003; Pendini, Bailey et al. 2008), et la protéine

⁹ Selon les règles exposées dans les notes précédentes, la levure W303.1b (*a*, *leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2*⁻, *can*^r, *cir*⁺) possède des allèles mutants récessifs pour la synthèse de la leucine, de l'histidine, du tryptophane et de l'uracile. Elle est totalement délétée pour l'enzyme codée par le gène *ADE2*. Cette souche est résistante à la canavanine qui est un compétiteur naturel de la L-arginine (*can*^r, gène codant une perméase, est muté pour empêcher l'entrée de la canavanine). Cette souche « *cir*⁺ » supporte le vecteur épisomaux (2μ), alors qu'une souche « *cir*⁻ » serait incapable de multiplier ces vecteurs, qui finiraient par être dégradés. Le petit « *a* » indiqué en début de génotype indique le sexe de la levure (« Mat a » ou « Mat α ») : rappelons que la levure haploïde peut se multiplier soit par simple division de type mitose (comme lors de notre phase d'expression), soit après fusion avec une levure de sexe différent, où elle passe donc par un stade diploïde.

Arc1p qui est impliquée dans la biosynthèse des ARNt (Simos, Segref et al. 1996). Ces protéines biotinylées dans la levure ne sont pas elles-mêmes membranaires, et une grande partie d'entre elles est éliminée au cours des premières étapes de purification ; mais une petite partie reste cependant associée aux membranes.

NB : Au cours de la période couvrant mes années de thèse, j'ai installé un fermenteur de 20 litres au laboratoire, dans lequel j'ai transposé ce protocole d'expression et qui a permis d'augmenter significativement les rendements d'expression de l'ATPase- Ca^{2+} et de ses autres isoformes étudiées au laboratoire. L'utilisation de ce fermenteur s'est révélée indispensable pour répondre aux besoins croissants en protéines recombinantes du laboratoire, notamment pour les expériences de cristallogénèse. Cette méthode optimisée a fait l'objet d'un article de méthode qui sera publié cette année (Cardi, Montigny et al. 2009). J'ai choisi de ne pas intégrer ce volet de mon travail au présent manuscrit de thèse, ceci faisant partie des missions qui m'étaient confiées au titre d'assistant-ingénieur CNRS dans le laboratoire (et non pas d'étudiant en thèse).

2. Purification des enzymes sauvages (WT) ou mutées

Comme décrit dans les précédentes publications du laboratoire, la fraction de membranes de levure récupérée à l'issue du fractionnement cellulaire et contenant les protéines recombinantes est tout d'abord « lavée » une fois avec le tampon, afin d'éliminer la majeure partie des protéines biotinylées de la levure (qui ne sont pas fortement associées aux membranes), puis les membranes ainsi « lavées » sont solubilisées par le DDM (Lenoir, Menguy et al. 2002; Jidenko, Lenoir et al. 2006) (voir figure II.03). Après solubilisation, les protéines biotinylées présentes sont récupérées sur une résine Streptavidine Sepharose (la streptavidine immobilisée interagissant fortement avec la biotine), puis éluées par action de la thrombine, directement ajoutée à la résine, ce qui permet d'éliminer le domaine de biotinylation qui reste fixé à la résine tout en décrochant l'ATPase recombinante, que l'on récupère alors par simple rinçage de la résine (Marchand, Winther et al. 2008). Les protéines éluées sont concentrées 15 à 20 fois par ultrafiltration sur des unités Centriprep 30 (Millipore), jusqu'à une concentration finale de l'ordre de $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, dans un tampon 40 mM Mops-Tris, 80 mM KCl et 40 % glycérol, à pH 7. La présence de 40 % de glycérol est indispensable à la stabilisation de la protéine solubilisée, y compris lors de son éventuelle congélation pour stockage à -80°C .

Je présente ici à titre d'exemple une figure permettant de suivre la purification du mutant E309Q. Toutefois, les préparations de la protéine sauvage et des autres mutants ont donné lieu à des résultats semblables avec le même rendement de purification.

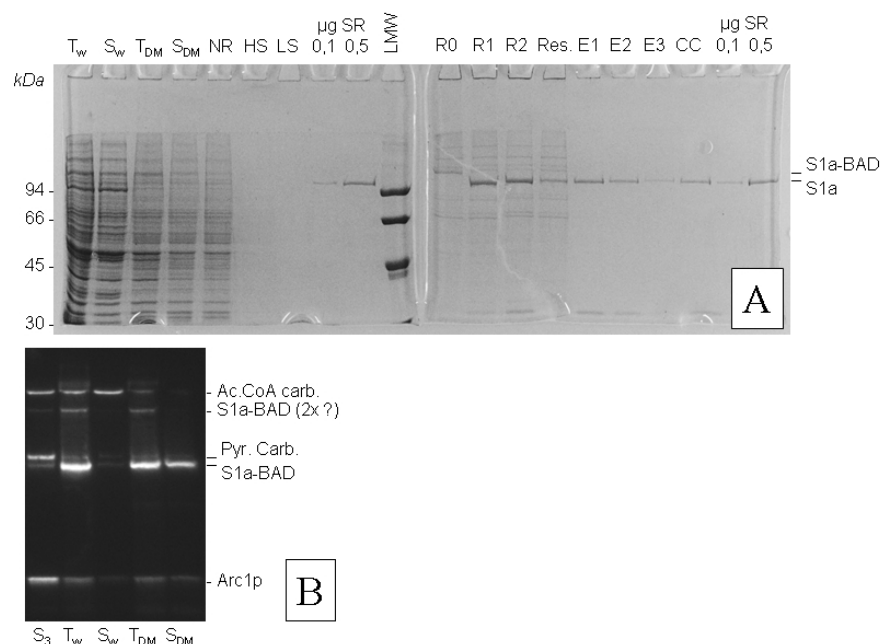


Figure II.03 : Analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, panneau A) et détection par une sonde avidine couplée à une peroxydase (Av-HRP, Avidine–Horse Raddish Peroxydase, panneau B) des différentes étapes de purification de l’ATPase mutée (ici, E309Q). A. *SDS-PAGE* : séparation sur un gel d’acrylamide à 8 % des différentes fractions récupérées au cours de la purification. Les conditions d’électrophorèses sont détaillées ci-après, §IV.1. Les masses moléculaires des marqueurs LMW (Low Molecular Weight, GE Healthcare) sont indiquées en kDa à gauche. « S1a-BAD » correspond à la position de l’ATPase SERCA1A avec son domaine de biotinylation fusionné en C-terminal (MW=119kDa), alors que « S1a » correspond à la position de l’ATPase SERCA1A native, sans l’addition d’un domaine de biotinylation (MW=110kDa). T_w , membranes totales avant lavage ; S_w , surnageant de l’étape de lavage (éliminé) ; T_{DM} , culot « total » des membranes lavées, resuspendu dans le tampon de solubilisation contenant du DDM ; S_{DM} , protéines solubilisées après incubation à température ambiante pendant 1 heure de cet échantillon « total », et récupérées, après une nouvelle centrifugation, dans le surnageant, et qui seront déposées sur la résine Streptavidine Sepharose ; NR, protéines non-retenues sur la colonne ; HS et LS, lavages de la résine en haut sel (1 M NaCl) puis bas sel (100 mM KCl) ; R0, R1, R2 et Res., matériel présent sur la résine, avant (R0) addition de la thrombine (ici, la quantité de résine était faible ; seule est significative la position de la bande), ou bien après (R1, R2) 30’ ou 60’ d’incubation avec la thrombine, ou bien encore après élution de l’ATPase (Rés.) ; E1-E3, fractions éluées ; CC, fractions précédentes poolées et concentrées par ultrafiltration ; 0,1 et 0,5 μg de membranes de SR sont déposées pour servir d’étalon pour l’estimation des quantités de protéines purifiées. B. *Détection à l’aide de la sonde Avidine-HRP*. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF. La sonde avidine couplée à la peroxydase HRP va se fixer aux protéines biotinylées et elle y est révélée par chimioluminescence à l’aide du système ECL (GE Healthcare). S_3 , surnageant de la dernière étape de la préparation de membranes, qui contient les protéines biotinylées endogènes de la levure, qui sont des protéines solubles : Ac.CoA carb., acétyl-CoA carboxylase (MW=250 kDa) ; Pyr. Carb., pyruvate carboxylase (MW=131 kDa) ; et la protéine Arc1p (MW=42 kDa). Une fraction de ces protéines est néanmoins entraînée avec le culot membranaire contenant S1a-BAD (T_w). La première étape de lavage, qui consiste uniquement à diluer ces membranes dans le tampon et à les centrifuger de nouveau, permet d’éliminer (S_w) la majeure partie de Ac.CoA carb. et de Pyr Carb., qui, sinon, posent des problèmes de compétition avec S1a-BAD lors de la chromatographie d’affinité. T_{DM} , de nouveau, représente le culot de membranes lavées, resuspendu dans le tampon de solubilisation contenant du DDM ; et S_{DM} , de nouveau, représente les protéines solubilisées récupérées dans le surnageant après incubation et nouvelle centrifugation : l’ATPase- Ca^{2+} est la protéine biotinylée majeure dans cette fraction. Bilan de l’expression : 80 g de levures récupérées à partir de 2 litres de culture ont donné, dans la fraction membranaire enrichie en ATPase- Ca^{2+} , 750 mg de protéines totales et 15 mg d’ATPase. Bilan de la purification : on récupère 0,68 mg d’ATPase purifiée à partir des 15 mg exprimés, soit un rendement de l’ordre de 4-5 %. Notons que 50 % des protéines sont perdues à la solubilisation et que 50 % des protéines fixées à la résine ne peuvent pas être éluées ; de plus, une partie des protéines, probablement celles en partie dénaturées, ne se fixent pas à la résine.

III. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ATPASIQUE

L'une des premières mesures simples permettant de vérifier l'intégrité de la protéine exprimée et purifiée, ou encore bien sûr l'activité de la protéine préparée à partir de lapin, est de mesurer sa capacité à hydrolyser l'ATP en présence de calcium. La méthode la plus utilisée au laboratoire consiste à suivre l'oxydation du NADH en NAD^+ , oxydation associée à l'hydrolyse de l'ATP *via* un système enzymatique. Ce système « d'enzymes couplées » a été décrit pour la première fois en 1960 (Pullman, Penefsky et al. 1960) et a été depuis adapté à différents types d'enzymes hydrolysant l'ATP. Le protocole que nous utilisons pour l'ATPase- Ca^{2+} est dérivé de cette méthode de base (Møller, Lind et al. 1980; Lund, Orłowski et al. 1989).

1. Le système à enzymes couplées PK/LDH

Le schéma de principe de ce système est décrit en figure II.04 : l'ATPase hydrolyse l'ATP en ADP et phosphate inorganique. La pyruvate kinase (PK) régénère le stock d'ATP en rephosphorylant, à partir du phosphoénolpyruvate (PEP), l'ADP qui vient juste d'être produit. Le pyruvate résultant de cette réaction est alors transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), qui, pour le faire, consomme du NADH. Si l'on fait le bilan de cette chaîne de réaction, on a une molécule de NADH qui disparaît pour une molécule d'ATP hydrolysée. Le NADH absorbe à 340 nm, mais pas le NAD^+ produit: en suivant en fonction du temps l'absorbance du milieu à 340 nm, on mesure donc directement la vitesse d'hydrolyse de l'ATP. Les changements d'absorbance sont mesurés en $\Delta\text{absorbance.s}^{-1}$. Sachant que le coefficient d'extinction molaire du NADH est égal à $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et que les mesures sont réalisées dans une cuvette de 1 cm de chemin optique, on peut convertir la valeur mesurée en activité enzymatique spécifique (AS) de notre ATPase, en multipliant ($\Delta\text{absorbance.s}^{-1}$) par 60 pour convertir les secondes en minutes, divisant par 6,2 pour convertir les absorbances en $\mu\text{mol/ml}$, divisant par la concentration d'ATPase, exprimée en $\mu\text{g.ml}^{-1}$, et multipliant par 1000 si on veut exprimer l'activité par mg de SERCA1a plutôt que par μg ; soit, finalement, en $\mu\text{mol d'ATP hydrolysé par mg d'ATPase (ou de protéine, selon la convention) et par min}$:

$$\text{AS} = (\Delta\text{absorbance.s}^{-1}) \times 9600 / [\text{ATPase}],$$

avec [ATPase] (ou [protéine]) exprimée en $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

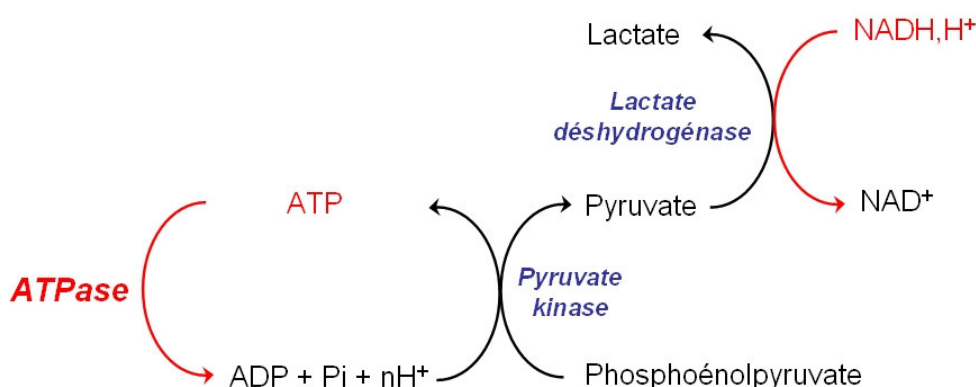


Figure II.04 : Principe du système d'« enzymes couplées » permettant de suivre l'hydrolyse d'ATP par spectrophotométrie.

Ces mesures sont réalisées sur un spectrophotomètre à barrettes de diodes HP8453A, avec un support de cuve thermostaté par circulation d'eau et contenant un agitateur magnétique permettant d'agiter le contenu de la cuve en permanence (et donc de mélanger les différents ajouts le plus efficacement possible). Pour une mesure classique, on se place à 5-10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de

membrane de réticulum sarcoplasmique dans un milieu 50 mM Tes-Tris, 100 mM KCl, 1 mM Mg^{2+} , 100 μM Ca^{2+} et 50 μM EGTA, et 5 mM de Mg.ATP, le tout à pH 7,5 et 20°C. Ce mélange contient également les composantes du système d'enzymes couplées, soit 1 mM de PEP, 0,05-0,1 mg.ml⁻¹ de PK et de LDH, et 0,15 à 0,3 mM de NADH (soit une absorbance initiale de l'ordre de 1 à 2). Dans de telles conditions, l'activité mesurée est de l'ordre de 4-6 μmol d'ATP hydrolysé.mg⁻¹ de protéine (pour le SR).min⁻¹.

2. Compléments à propos de la pyruvate kinase

Le protocole décrit ci-dessus est celui utilisé en routine pour vérifier l'activité de l'ATPase. Cependant, il est très souvent nécessaire de travailler dans des conditions expérimentales différentes, afin de caractériser plus précisément la dépendance de cette activité vis-à-vis de paramètres comme le pH, la présence ou l'absence de KCl ou d'autres monovalents, la concentration en calcium, en nucléotides... Dans ces cas-là, toutefois, il est indispensable de s'assurer que le système d'enzymes couplées est suffisamment « robuste » pour ne pas être perturbé par les nouvelles conditions expérimentales.

Dans la gamme de conditions où nous avons travaillé, la LDH est peu influencée par les conditions physico-chimiques (données non-présentées). En revanche, la PK¹⁰ est une enzyme relativement sensible aux conditions expérimentales, et dont l'activité peut devenir limitante dans la réaction : la [figure II.05](#) montre par exemple le comportement de la PK que nous avons pu observer dans certaines des conditions que nous avons eu à utiliser lors de la caractérisation des étapes du cycle catalytique de l'ATPase (dans toutes ces mesures, l'activité est mesurée à pH 6 et 20°C), comportement cohérent avec les résultats décrits il y a déjà bien longtemps (Boyer, Lardy et al. 1942; Kachmar and Boyer 1953; Suelter, Singleton et al. 1966; Wilson, Evans et al. 1967). Le potassium est par exemple un cation indispensable à l'activation de la PK : nous avons bien retrouvé une activité optimale à 100 mM de KCl, comme décrit dans la littérature. En présence de 100 mM de KCl, une concentration de 80-100 mM de LiCl réduit l'activité de la PK de moitié (Kachmar and Boyer 1953; Wilson, Evans et al. 1967). L'expérience présentée dans le panneau C montre la dépendance en calcium de l'activité de la PK : on constate que des concentrations supérieures au millimolaire ont un réel effet inhibiteur sur l'activité de l'enzyme, ceci en présence de 1 mM de Mg^{2+} . Le panneau D confirme que le magnésium, comme le potassium, est indispensable à la PK (Suelter, Singleton et al. 1966), l'activité étant nulle en absence de ce cation (en présence d'EDTA), et maximale pour des concentrations de l'ordre de 20 mM..

Etant donné que l'activité de notre ATPase- Ca^{2+} dépend des concentrations en calcium, magnésium, KCl, etc..., il faut donc être attentif à la capacité de la PK de répondre suffisamment rapidement dans tous les cas. Toutefois, l'activité normalisée à 1 dans la [figure II.05](#) correspond à une activité de 5 à 10 $\mu moles$ d'ATP produit.mg⁻¹ de PK.min⁻¹, soit 0,25 à 1 $\mu moles$ d'ATP régénéré par min si on utilise 0,05 – 0,1 mg.ml⁻¹ de PK : l'activité de l'ATPase- Ca^{2+} étant au plus de l'ordre de 5 $\mu moles$ d'ATP hydrolysées.mg⁻¹ d'ATPase- Ca^{2+} .min⁻¹, soit 0,01 à 0,05 $\mu moles$ d'ATP hydrolysé par min si on utilise 0,002 – 0,01 mg.ml⁻¹ de SR), la capacité maximale de régénération de l'ATP par la PK semble excéder très largement (d'un facteur 20) la vitesse d'hydrolyse par l'ATPase. Cependant, dans des conditions « réalistes » de mesure de l'activité ATPasique, la vitesse de régénération de l'ATP par la PK est bien inférieure aux valeurs ci-dessus (déduites de la [figure II.05](#)), parce que celles-ci ont été mesurées en présence de 150 μM d'ADP, alors que l'on demande à la PK de « travailler » dès que l'ATPase a produit ses premiers μM d'ADP. A très faible [ADP], la PK régénère en fait moins vite l'ATP que

¹⁰ La pyruvate kinase est la dernière enzyme entrant en jeu dans la glycolyse. Elle catalyse la déphosphorylation du phosphoenolpyruvate en pyruvate, transférant le phosphate à une molécule d'ADP pour former de l'ATP. L'affinité de la pyruvate kinase pour le PEP et l'ADP est respectivement de 1-3 mM et de 100 +/- 20 μM (pour exemple, (Mildvan, 1966)).

l'ATPase ne produit d'ADP, et un « lag » de l'oxydation du NADH par rapport à l'hydrolyse d'ATP peut donc apparaître. En tout état de cause, à une concentration donnée de PK (conditionnant le coût de la mesure !), la concentration d'ADP à l'état stationnaire n'est pas nulle (et peut atteindre le μM ou un peu plus dans nos conditions habituelles).

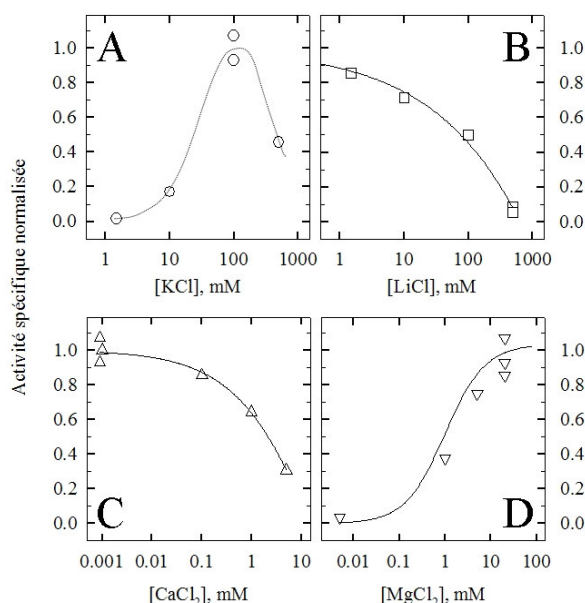


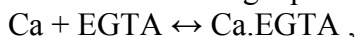
Figure II.05 : Dépendance de l'activité de la pyruvate kinase en fonction de la concentration en potassium (A), en lithium (B), en calcium (C) et en magnésium (D). La PK est suspendue à $0,005 \text{ mg.ml}^{-1}$ dans un tampon qui contient ici 50 mM Mes-Tris, 0,3 mM NADH $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ LDH, 1 mM PEP, 100 mM KCl (excepté pour la dépendance en KCl où la concentration finale est indiquée en abscisse, *panneau A*) et 20 mM MgCl_2 (excepté pour la dépendance en MgCl_2 où la concentration finale est indiquée en abscisse, *panneau D*), à pH 6 et 20°C . Les différentes mesures ont été réalisées en ajoutant à la cuvette la concentration souhaitée de l'ion testé (à partir de solutions stocks concentrées : 3 M KCl, 3 M LiCl, 1 M CaCl_2 ou 2 M MgCl_2). L'activité reportée ici (après normalisation aux conditions standard) correspond à la vitesse initiale de la disparition du NADH induite lors d'une addition de $150 \mu\text{M}$ d'ADP. L'activité normalisée à 1 correspond à une activité spécifique de l'ordre de $5 \text{ à } 10 \mu\text{mol d'ADP phosphorylé.mg}^{-1} \text{ de PK.min}^{-1}$.

IV. COMPLEMENTS A PROPOS DE LA DETERMINATION DU CALCIUM LIBRE

1. La chélation du calcium par l'EGTA

Les concentrations en calcium libre, critiques pour la mesure de l'activité ATPasique et plus largement pour l'occupation des sites de transport de l'ATPase, sont généralement imposées en ajoutant un excès d'EGTA au calcium total, et en se basant sur la constante de dissociation (ou d'association) du Ca.EGTA dans les conditions ioniques et de température considérées (le pH joue notamment beaucoup) (Martell and Smith 1975) : dans nos conditions les plus fréquemment utilisées, à pH 7,5 et 100 mM de KCl à 20°C , on a $K^d_{\text{Ca.EGTA}} \approx 4 \times 10^{-8} \text{ M}$ (la constante d'équilibre est ici écrite comme une constante de dissociation). Dans des conditions données de Ca^{2+} total et d'EGTA total, la concentration libre en calcium peut être calculée soit à l'aide d'un logiciel approprié, par exemple « Maxchelator » (freeware disponible à l'adresse <http://maxchelator.stanford.edu> ; (Bers, Patton et al. 1994)), soit éventuellement en faisant une approximation rapide, comme développé ci-dessous.

L'association du calcium et de l'EGTA est en effet régie par l'équilibre suivant :



avec des équations de conservation de la matière :

$$[\text{Ca}]_{\text{total}} = [\text{Ca}]_{\text{libre}} + [\text{Ca.EGTA}] \quad \text{et} \quad [\text{EGTA}]_{\text{total}} = [\text{EGTA}]_{\text{libre}} + [\text{Ca.EGTA}]$$

et avec sa loi d'action de masse :

$$\{ [\text{Ca}]_{\text{libre}} \times [\text{EGTA}]_{\text{libre}} \} / [\text{Ca.EGTA}] = K^d_{\text{Ca.EGTA}},$$

qui peut aussi s'écrire, rigoureusement :

$$[\text{Ca}]_{\text{libre}} = K^d_{\text{Ca.EGTA}} \times \{ [\text{Ca.EGTA}] / [\text{EGTA}]_{\text{libre}} \}$$

Mais dans beaucoup de conditions expérimentales, on peut faire l'approximation que le $[\text{Ca}]_{\text{libre}}$ sera négligeable devant le $[\text{Ca}]_{\text{total}}$. Dès lors,

$$[\text{Ca.EGTA}] \approx [\text{Ca}]_{\text{total}}, \quad [\text{EGTA}]_{\text{libre}} \approx [\text{EGTA}]_{\text{total}} - [\text{Ca}]_{\text{total}}$$

Et au final on a l'expression suivante :

$$[\text{Ca}]_{\text{libre}} \approx K^d_{\text{Ca.EGTA}} \times \{ [\text{Ca}]_{\text{total}} / ([\text{EGTA}]_{\text{total}} - [\text{Ca}]_{\text{total}}) \}$$

Cette approximation permet de réaliser une estimation rapide des concentrations en Ca^{2+} libre. Elle est valable tant que les concentrations totales en EGTA et calcium sont suffisamment différentes, et aux pH pour lesquels l'affinité de l'EGTA pour le Ca^{2+} est suffisamment forte. Notons en particulier que si $[\text{EGTA}]_{\text{total}} = 2 \cdot [\text{Ca}]_{\text{total}}$, on a $[\text{Ca}]_{\text{libre}} \approx K^d_{\text{Ca.EGTA}}$.

2. Autres molécules pouvant interagir avec le calcium

Tous les composants d'un milieu, et notamment ceux qui sont chargés négativement, sont susceptibles d'interagir avec les divalents. Les nucléotides, y compris l'ATP, peuvent notamment fixer le calcium. A pH 7,5, l'affinité de l'ATP pour le calcium n'est que deux fois plus faible que pour le magnésium ($K^d_{\text{Ca.ATP}} \sim 160 \mu\text{M}$, $K^d_{\text{Mg.ATP}} \sim 80 \mu\text{M}$) : si l'on travaille en présence de 5 mM d'ATP_{total}, de 6 mM de Mg_{total} (environ 5 mM de MgATP) et de 100 μM de Ca_{total}, la concentration en calcium libre ne sera par exemple que d'environ 40 μM : il faut donc tenir compte de la présence du nucléotide si l'on veut déterminer précisément la dépendance en calcium de l'activité ATPasique.

Je reviendrai plus en détail sur la chélation des divalents dans le [chapitre VI](#), notamment pour le magnésium (Mg^{2+}) et aussi le cadmium (Cd^{2+}).

V. SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE ET PROTOCOLES DE PROTEOLYSE MENAGEE

1. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines (ou les produits de protéolyses, voir ci-après) peuvent être séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Nous utilisons un protocole dérivé de ([Laemmli 1970](#)) et en partie adapté à partir de ([Sambrook, Fritsch et al. 2001](#)). L'électrophorèse est réalisée sur des appareils de type « Miniprotean 3 » (Bio-Rad). Les gels sont préparés comme suit :

Le gel de séparation contient 375 mM de tampon Tris-Cl à pH 8,8, 0,1% de SDS et la quantité souhaitée d'un mélange acrylamide/bisacrylamide (29/1, solution stock à 30 %) pour atteindre le niveau de réticulation du gel souhaité (en général, entre 7 et 10 % dans nos conditions). Ce mélange est additionné de 0,1 % de persulfate d'ammonium et 0,08 % de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine) ¹¹ pour polymériser l'acrylamide.

¹¹ La polymérisation de l'acrylamide est une réaction catalysée par la présence de radicaux libres en solution. Le persulfate d'ammonium est appelé « l'initiateur » : il forme spontanément des radicaux en solution, *i.e.* des espèces chimiques oxydantes, mais cette réaction est lente. C'est pour cela que l'on ajoute le TEMED, « l'accélérateur », qui

Le gel de concentration contient 125 mM de tampon Tris-Cl à pH 6,8, 0,1% de SDS et 5 % acrylamide/bisacrylamide (29/1, solution stock à 30 %). Comme le gel de séparation, ce mélange est additionné de 0,1 % de persulfate d'ammonium et 0,1 % de TEMED.

Dans certains cas, notamment pour améliorer la séparation de certains fragments après protéolyse, 1 mM de Ca^{2+} est ajouté avant polymérisation (dans les deux gels).

Les échantillons, qui pour nos gels peuvent contenir de 0,1 à 50 μg de protéines dans un volume de 20 μl , sont préparés dans un milieu qui contient au final 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,7 M β -mercaptoéthanol, 0,2 % SDS, 2,5 mM EDTA, 4 M urée et 0,25 % de bleu de bromophénol (Soulié, Møller et al. 1996). Si l'électrophorèse est faite après une protéolyse ou si l'on craint les protéases de la levure, les échantillons sont immédiatement chauffés 1 minute à 95-100°C afin de dénaturer les éventuelles protéases qui pourraient encore, malgré le SDS, dégrader les protéines dénaturées par le SDS et l'urée.

Le tampon de migration contient 20 mM de Tris, 250 mM de glycine et 1 % de SDS (w/w), à pH 8,6 (pH atteint après mélange, sans ajustement particulier de pH). Pour ce format de gels (~9 x 7 cm), la tension et l'intensité maximale imposées sont de 150 V et 25 mA par gel, afin de limiter l'échauffement des gels au cours de la migration (qui pourrait altérer la séparation).

Le gel est ensuite, si nécessaire, coloré avec une solution contenant 0,1% de bleu de Coomassie R250 dissous dans un mélange 40 % méthanol et 10 % acide acétique. Après 10 minutes, le gel est rincé à l'eau et décoloré ensuite dans une solution à 10 % méthanol, 10 % acide acétique et 1 % glycérol.

2. Protéolyses ménagées : coupure de l'ATPase- Ca^{2+} par la trypsine ou la protéinase K

Cette technique consiste à observer des profils de protéolyse dans différentes conditions de milieu pour la protéine, notamment en fonction des ligands qui lui sont fixés et donc de sa conformation. Selon la conformation adoptée par l'ATPase, certaines boucles de la chaîne polypeptidique se retrouvent en effet sans doute plus ou moins exposées et donc plus ou moins susceptibles d'être clivées par une protéase. Ces protéolyses sont dites « ménagées » car on ne s'intéresse qu'aux coupures les plus précoces de la chaîne. Deux enzymes ont été particulièrement utilisées pour étudier par cette technique les changements de conformation de l'ATPase- Ca^{2+} : la trypsine, et la protéinase K.

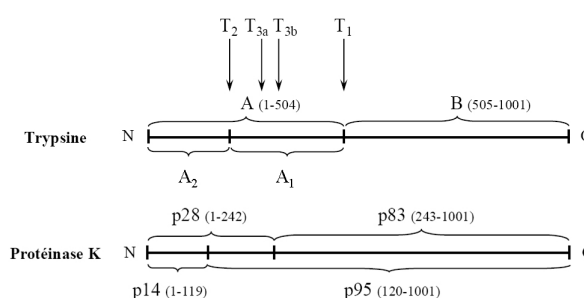


Figure II.06 : Sites de coupure de l'ATPase- Ca^{2+} par la trypsine, la protéase V8 et la protéinase K. Représentation linéaire de la chaîne polypeptidique avec le N-terminal (N) à gauche et le C-terminal (C) à droite. *Trypsine* : T₁, T₂, T_{3a} et T_{3b} sont les sites de clivage les plus précoces; A, B, A₁ et A₂ les peptides qui résultent des coupures en T₁ et T₂. *Protéinase K* : les peptides résultant des coupures sont numérotés selon leur masse moléculaire (p95 = peptide de 95 kDa). Les nombres indiqués entre parenthèse correspondent aux numéros des acides aminés présents aux extrémités des peptides correspondants.

va catalyser la formation des radicaux libres et ainsi accélérer la polymérisation des molécules d'acrylamide et de bisacrylamide entre elles. Cette réaction est particulièrement sensible à la température (lente à froid et plus rapide à chaud) ; la réticulation des gels peut également être différente en fonction de la température et donc influencer la séparation des protéines. Les conditions décrites ici permettent une polymérisation du gel en 20 minutes à 20°C.

a. La trypsine

La trypsine est une protéase extrêmement utilisée en biochimie, notamment pour la préparation de peptides en spectrométrie de masse pour le séquençage et l'identification de protéines. La trypsine clive les chaînes polypeptidiques en aval des résidus lysine et arginine. Dans le cadre d'une protéolyse ménagée, elle clive l'ATPase- Ca^{2+} au niveau de deux sites majeurs, les sites T₁ (R505) et T₂ (R198), les peptides générés étant notés A et B, A donnant ensuite A₁ et A₂ (Thorley-Lawson and Green 1977). Deux coupures supplémentaires aux sites T_{3a} et T_{3b} génèrent les fragments A_{2a} et A_{2b} (Imamura, Saito et al. 1984; Saito, Imamura et al. 1984) (voir figure II.06). La coupure au site T₁ est rapide et n'est pas affectée par la présence de calcium ou de nucléotide, suggérant que ce site est exposé de la même façon dans toutes les conformations explorées dans le cycle catalytiques. En revanche, les formes E1 de l'ATPase, stabilisées en présence de calcium (et éventuellement d'un analogue non-hydrolysable de l'ATP) sont plus sensibles à la protéolyse par la trypsine au niveau du site T₂, suggérant que ce site se trouve exposé après la fixation de calcium au site de transport : un changement de conformation du domaine cytosolique est induit par la fixation des ions calcium aux sites de transport membranaires (Imamura, Saito et al. 1984; Saito, Imamura et al. 1984). L'utilisation de cette protéase nous a été récemment utile pour la caractérisation d'une forme particulière de l'ATPase- Ca^{2+} marquée par le FITC (Fluorescein IsoThioCyanate, voir Chap. V).

b. La protéinase K

La protéinase K n'est pas une protéase très spécifique : elle coupe la chaîne peptidique préférentiellement en aval des résidus aromatiques ou aliphatiques à chaîne latérale non-ramifiée. En ce qui concerne l'ATPase- Ca^{2+} , cette protéase a été tout particulièrement utilisée pour suivre l'exposition des boucles qui relient le domaine membranaire au domaine cytosolique : elle va couper de façon préférentielle juste avant les résidus K120 (en L119-K120) et E243 (en T242-E243) situés dans les boucles reliant le domaine A aux hélices transmembranaires M2 et M3, respectivement (voir figure II.06). En présence de calcium (figure II.07, gel A, piste 2-5), on observe une coupure majoritaire au site T242-E243, faisant notamment apparaître le grand fragment p83C. En présence d'un large excès d'EGTA (et donc en absence de calcium, (gel A, piste 6-9), le profil change, révélant une coupure supplémentaire au niveau du site L119-K120 et faisant ainsi apparaître simultanément deux grands fragments, p95C et p83C (Juul, Turc et al. 1995).

Ces coupures ont notamment été utilisées par Danko *et al.* pour suivre la conformation de l'ATPase au cours des étapes du cycle catalytique (Danko, Daiho et al. 2001). L'ATPase était préalablement incubée en présence de différents ligands, afin de stabiliser la conformation souhaitée, avant protéolyse. L'étape de phosphorylation par le phosphate ou au contraire de déphosphorylation (« E2-P → E2 ») a notamment été étudiée de façon détaillée, en stabilisant des analogues des espèces formées au cours de cette étape, et en étudiant donc soit l'enzyme phosphorylée par le phosphate inorganique, soit des complexes fluorés décrits comme mimant les états de transition de la déphosphorylation (Danko, Yamasaki et al. 2004). Ces protéolyses par la protéinase K ou la trypsine ont conforté l'hypothèse d'une réorientation du domaine A de la protéine lors de l'étape de transconformation « $\text{Ca}_2\text{E1}\sim\text{P} \rightarrow \text{E2-P}$ », ce qui a été confirmé par la cristallisation de formes analogues de ces états, les formes « $\text{Ca}_2\text{E1.ADP.AIF}_4$ » (Sorensen, Møller et al. 2004; Toyoshima and Mizutani 2004) puis « $\text{Ca}_2\text{E1}\sim\text{P.AMPPN}$ » (Olesen, Picard et al. 2007), et la forme « E2.BeF_3 » (Olesen, Picard et al. 2007) (voir figure I.17).

Dans le même temps, Møller *et al.* ont montré que l'ATPase coupée en T242-E243 restait capable de fixer deux ions calcium, de fixer l'ATP et de se phosphoryler et de former l'intermédiaire « E1~P » ADP-sensible (*i.e.* encore capable de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP selon une réaction réverse). En revanche, cette ATPase clivée est ensuite incapable de

relarguer rapidement ses ions calcium et n'est pas capable non plus de former les formes analogues de type E2-P. Cette série d'expériences montrait donc de nouveau la perturbation occasionnée par la coupure dans la transmission des changements de conformation entre domaine membranaire et les domaines P et A cytosoliques (Møller, Lenoir et al. 2002). Selon la même approche, les auteurs ont ensuite caractérisé l'ATPase coupée en L119-K120. L'enzyme reste capable d'hydrolyser l'ATP, mais lentement : l'étape de déphosphorylation est ralentie de façon dramatique, les autres étapes étant peu affectées. Des expériences de filtration sur gel ont démontré que les deux fragments de l'ATPase restaient associés après coupure, probablement grâce aux interactions fortes existant entre ces fragments dans le domaine membranaire (même en présence de détergent). Là encore, ces expériences rappellent l'importance majeure de la mobilité et du positionnement du domaine A dans les étapes de déphosphorylation (Lenoir, Picard et al. 2004).

L'utilisation de cette protéase nous a été récemment utile pour suivre les changements de conformation induits par la présence d'inhibiteurs de l'ATPase au niveau du domaine membranaire (voir également Chap. III). L'expérience réalisée sur le second gel (figure II.07, gel B) montre l'effet de la thapsigargine (TG) et de l'acide cyclopiazonique (CPA) sur les profils de protéolyse observés en absence de calcium. Ces deux inhibiteurs membranaires de l'ATPase sont décrits comme se fixant à l'état « E2 » de la protéine (voir Chap.I, §II.5.b). On observe que cette fixation ralentit la coupure en T242-E243 (p83C apparaît moins rapidement que dans le gel A, l'ATPase intacte disparaît plus lentement, et p95C s'accumule davantage). Cet effet des inhibiteurs sur le profil de protéolyse suggère que la TG et le CPA stabilisent une conformation « E2 » particulière, différente de la conformation moyenne adoptée en absence d'inhibiteurs, dans laquelle la boucle portant T242-E243 est différemment exposée à la protéase. On verra que l'utilisation de ces inhibiteurs peut d'ailleurs avoir d'autres effets sur les structures (voir Chap.I, §II.5.b et Chap. III).

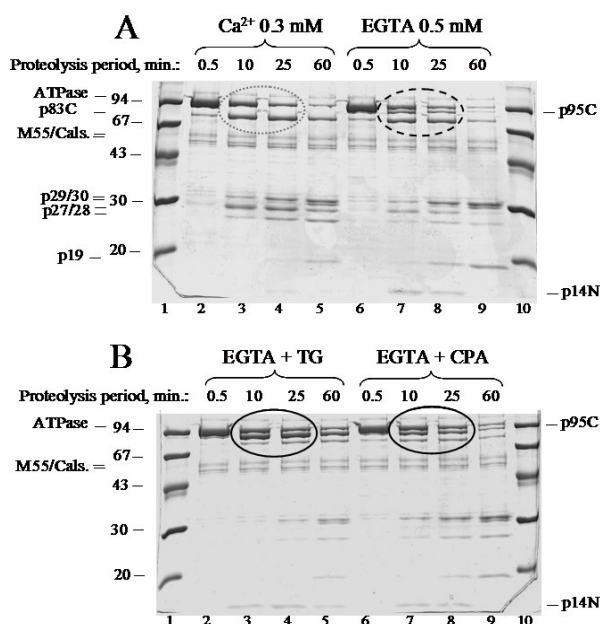


Figure II.07 : Coupure par la protéinase K de l'ATPase- Ca^{2+} en absence ou en présence de calcium, et effet de la thapsigargine (TG) et de l'acide cyclopiazonique (CPA) sur le profil de protéolyse en absence de Ca^{2+} . Le SR est suspendu à 2 mg.ml^{-1} (soit $12\text{-}14 \text{ }\mu\text{M}$) dans le tampon 100 mM Mops-NaOH et 5 mM MgCl_2 , à pH 6,5 et 20°C , en présence de 0.3 mM de calcium (gel A, pistes 2 à 5) ou de $0,5 \text{ mM}$ d'EGTA (gel A, pistes 6 à 9) avec éventuellement, en plus de l'EGTA, $0,02 \text{ mg.ml}^{-1}$ de TG ($30 \text{ }\mu\text{M}$; gel B, pistes 2 à 5) ou $0,02 \text{ mg.ml}^{-1}$ de CPA ($60 \text{ }\mu\text{M}$; gel B, pistes 2 à 5). La protéinase K est ajoutée à $0,03 \text{ mg.ml}^{-1}$ et les échantillons sont incubés pendant le temps indiqué sur chaque piste. La protéolyse est stoppée par addition de 5 mM de PMSF. On dépose alors des aliquots ($4 \text{ }\mu\text{g}$ de protéine) dans les puits d'un gel SDS-PAGE à $12 \text{ }\%$ d'acrylamide (voir ci-après pour la préparation des échantillons et les conditions d'électrophorèse). Les pistes 1 et 10 contiennent les marqueurs de masse moléculaire (« Low Molecular Weight Marker », GE Healthcare).

VI. UTILISATION DES PROPRIETES DE FLUORESCENCE DE L'ATPASE- CA²⁺ POUR SUIVRE LA FIXATION DE LIGANDS

1. A propos de la fluorescence

Certaines molécules en solution, lorsqu'elles sont excitées par des radiations lumineuses, restituent tout ou partie de l'énergie reçue sous forme de photons : c'est de la photoluminescence. Lorsque les temps de vie de l'état excité sont courts (nanosecondes), on appelle ces molécules des fluorophores, émettant de la fluorescence. Cependant, une partie de l'énergie est perdue au cours des diverses transitions entre les états excités et fondamentaux, ce qui a pour conséquence que les spectres d'excitation (énergie absorbée) et d'émission (énergie restituée) de ces molécules ne sont pas superposables : les photons émis ont toujours une énergie plus faible que ceux qui sont absorbés, et donc une longueur d'onde plus élevée (voir [figure II.08](#)).

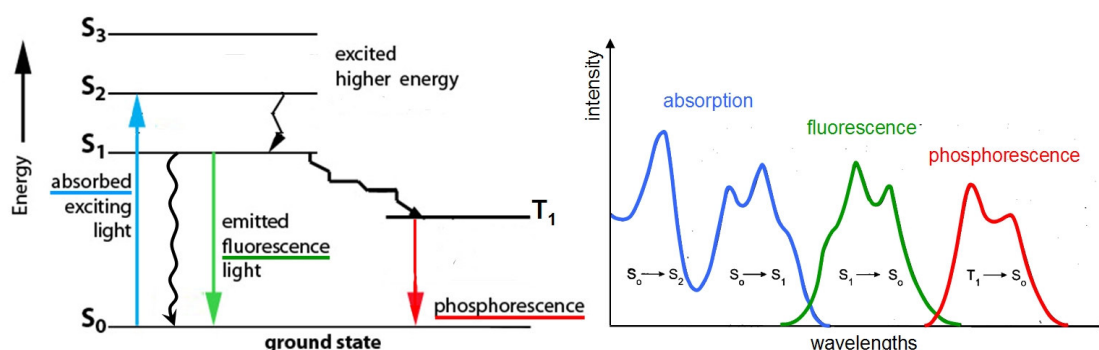


Figure II.08 : Diagramme de Perrin-Jablonski (à gauche) et spectres types d'absorption et de fluorescence (et aussi de phosphorescence) (à droite). Aleksander Jablonski, rejoint quelques années plus tard par Francis Perrin, a proposé en 1935 ([Jablonski 1935](#)) une représentation des différents niveaux énergétiques et des sauts entre ces niveaux qui sont associés aux phénomènes d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence (*à gauche*) : les niveaux S_n représentent les différents niveaux d'énergie électronique de la molécule, l'état S₀ étant l'état fondamental dans lequel la plupart des molécules se trouvent à température ambiante, et les états S₁ à S_n étant les états excités, explorés après captation de l'énergie d'un photon incident (*flèche bleue*). Cette captation est suivie de processus variés de désexcitation permettant de revenir à l'état fondamental. Le plus courant de ces processus est non-radiatif, *i.e.* sans émission de lumière, et peut avoir lieu ou bien entre les états excités (on parle alors de conversion interne, *flèche noire de S₃ à S₁*), ou bien en redescendant jusqu'à S₀, *flèche noire de S₁ à S₀*). Mais il est aussi possible qu'entre S₁ et S₀, cette énergie soit restituée sous forme de lumière : on parle alors d'émission de fluorescence (*flèche verte*). L'énergie du photon émis est alors évidemment plus faible que celle du photon absorbé. Dans certaines conditions particulières, des transitions normalement interdites peuvent amener la molécule dans un état excité intermédiaire, appelé état triplet. Dans ce cas, l'émission de photon qui en résulte est appelée phosphorescence, et ne se produit qu'après un délai (temps de vie de l'état triplet) plus long (car de nouveau normalement interdit).

Le schéma de droite représente les spectres des différentes phases décrites : le spectre d'excitation d'un fluorophore est le plus souvent très souvent proche de son spectre d'absorption (*spectre bleu*). Le spectre d'émission de fluorescence (*spectre vert*) est symétrique de la partie du spectre d'absorption qui correspond à la transition de l'état fondamental à l'état excité S₁, mais décalé vers les longueurs d'onde plus élevées comme expliqué ci-dessus. Le spectre de phosphorescence (*spectre rouge*) est encore davantage décalé vers la droite, pour les mêmes raisons.

La [figure II.09](#) donne un schéma de principe du spectrophotomètre de fluorescence que nous utilisons (SPEX fluorolog, HORIBA Jobin Yvon). Il possède comme source d'excitation une lampe Xénon allumée en continu, dont la lumière tombe sur un monochromateur séparant les différentes longueurs d'onde. Une petite fraction du faisceau incident est réfléchi par une lame semi-transparente et tombe sur un détecteur de référence qui permet de suivre l'intensité du faisceau incident (« r »). Ce détecteur permet de corriger en continu l'intensité du signal observé (« s ») pour les éventuelles fluctuations de l'intensité émise par la lampe (dans des mesures à longueur d'onde incidente fixe) ou pour son intensité variable selon la longueur d'onde incidente (dans des mesures à longueur d'onde incidente variable), en calculant directement le rapport « s / r ».

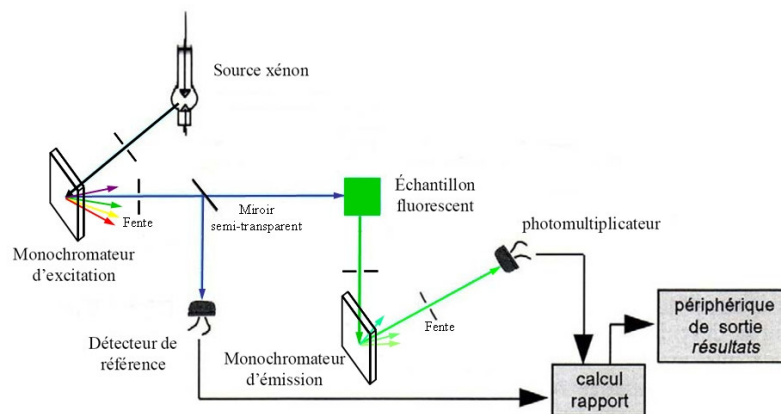


Figure II.09 : Schéma de principe d'un spectrofluorimètre à deux détecteurs, l'un servant à mesurer l'intensité du faisceau incident (détecteur de référence, souvent une diode) et l'autre la fluorescence émise par l'échantillon (un détecteur plus sensible : un photomultiplicateur) (schéma adapté d'après (Rouessac and Rouessac 2000)).

2. Signaux de fluorescence intrinsèque de l'ATPase Ca^{2+}

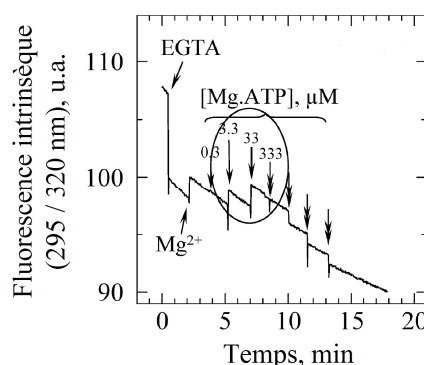
Les groupements fluorescents sont relativement rares dans les systèmes biologiques. Néanmoins, les protéines possèdent une fluorescence intrinsèque dans l'UV proche : les acides aminés cyclique que sont la phénylalanine, la tyrosine et les tryptophanes sont d'abord responsables des propriétés d'absorption des protéines dans l'UV (autour de 280 nm), mais ils sont également capables de restituer une partie de cette énergie sous la forme de fluorescence. Lorsqu'une protéine est éclairée aux alentours de 280-290 nm, elle émet en général une fluorescence dont le maximum d'émission est centré vers 320-340 nm, à laquelle les tryptophanes sont les plus gros contributeurs.

L'ATPase- Ca^{2+} contient 13 résidus tryptophanes, dont 12 situés dans le domaine membranaire, essentiellement à l'interface entre membrane et cytosol ou membrane et lumen. Le signal de fluorescence intrinsèque lié à ces résidus a très tôt été utilisé pour suivre les différentes étapes du cycle, les changements de conformation de la protéine donnant lieu à des variations de l'intensité de sa fluorescence (Dupont 1976) : lors de l'addition de ligands (fixation du calcium, fixation du nucléotide, phosphorylation par le P_i , formation des complexes fluorés...), ces variations sont faibles (quelques pour cent) mais néanmoins parfaitement observables. Jusqu'à présent, ces signaux, sauf exceptions (Miras, Cuillel et al. 2001; Jidenko, Lenoir et al. 2006; Lenoir, Jaxel et al. 2006), étaient surtout exploités sur l'ATPase native, en membrane ou en présence de quantités non-solubilisantes de détergent. Je montrerai plus loin comment nous avons optimisé les conditions expérimentales pour pouvoir observer ces signaux également sur les ATPases solubilisées, y compris les ATPases recombinantes purifiées (voir Chap. IV).

Pour nos mesures de fluorescence de tryptophane, les échantillons sont généralement excités à 290-295 nm, notamment pour éliminer la contribution des résidus tyrosine qui à pH ordinaire n'absorbent pas dans cette zone (voir aussi plus loin). La longueur d'onde d'émission est choisie selon le signal observé, la contribution des différents tryptophanes (dont les spectres peuvent être légèrement décalés selon la polarité des environnements) pouvant être différente selon les ligands et les conditions expérimentales (Guillain, Gingold et al. 1982; Champeil, Henao et al. 1997). Les fentes sont classiquement ouvertes à 2 nm pour l'excitation (ouverture faible permettant de limiter la photolyse de l'échantillon) et à 5 à 20 nm pour l'émission (afin d'augmenter la statistique de comptage des photons en fonction de l'intensité de fluorescence, sans pour autant saturer le photomultiplicateur). Le rapport signal/bruit peut être amélioré si nécessaire en augmentant le temps d'acquisition jusqu'à 5 s par point. La cuve de fluorescence est placée dans un support thermostaté à 20°C (par un système de circulation d'eau), et le contenu de cette cuve est agité en continu à l'aide d'un barreau aimanté.

Les tryptophanes répondent à l'addition de nombreux ligands par des changements de l'intensité de leur fluorescence (voir [Chap. IV](#)). On peut enregistrer en continu le signal de fluorescence de ces tryptophanes, et ajouter dans la cuvette de fluorescence, directement pendant l'acquisition, les différents ligands souhaités (voire détergents ou lipides...). Dans ce type d'expérience, il faut s'assurer qu'aucune des molécules ajoutées au cours de l'expérience ne présente, à la longueur d'onde d'excitation utilisée, une absorption qui viendrait masquer la fluorescence de la protéine (ni évidemment ne présente une fluorescence qui viendrait s'ajouter à celle de la protéine). Par exemple, dans le cas de l'étude de l'effet des nucléotides (fixation de l'ATP, de l'ADP ou de leurs analogues non-hydrolysables l'AMPPCP ou AMPPNP), la longueur d'onde d'excitation est choisie dans le pied de la bande d'excitation des tryptophanes (plutôt 295 nm que 290 nm) pour éviter que les changements de fluorescence recherchés lors de l'addition du nucléotide ne soient masqués en partie par l'absorption de la lumière excitatrice par le nucléotide ajouté ($\lambda_{\text{max}} \sim 260$ nm): à forte concentration de nucléotide, *i.e.* au-delà de quelques centaines de micromolaires, cet effet de « filtre interne » serait en effet très significatif. En fin d'expérience, l'importance de ce filtre éventuel du signal de fluorescence peut être estimée par des additions supplémentaires de nucléotide, et cette estimation permet de corriger les variations de fluorescence observées lors des additions précédentes (voir pour exemple la [figure II.10](#) ainsi que la [figure 7](#) dans ([Montigny, Arnou et al. 2008](#))).

Figure II.10 : Exemple de mesure de l'effet de divers ligands sur la fluorescence de l'ATPase : effet de la chélation du Ca^{2+} , suivie de la fixation du Mg^{2+} et du Mg.ATP en absence de calcium. Au milieu de mesure, qui contient 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de SR suspendus dans un tampon 50 mM Mops-Tris, 100 mM KCl et 100 μM de Ca^{2+} à pH 7 et 20°C, on ajoute d'abord 2 mM d'EGTA pour chélater le Ca^{2+} contaminant. On ajoute ensuite 5 mM de Mg^{2+} , puis des concentrations croissantes de Mg.ATP (les concentrations finales sont indiquées sur la figure, en μM). Les doubles flèches correspondent à des additions de 300 μM supplémentaires: ces additions répétées d'un excès de nucléotide permettent d'évaluer l'effet de filtre interne (la diminution de l'intensité de fluorescence observée correspond à la fraction de l'intensité incidente qui a été absorbée). Le tracé a été corrigé pour les faibles variations d'intensité correspondant aux dilutions liées à l'addition de ligands. La valeur 100 est fixée, arbitrairement, au niveau d'intensité observé à un moment donné, correspondant ici à l'ATPase dépourvue de calcium, *i.e.* après addition de l'EGTA.



La [figure II.10](#) montre aussi qu'indépendamment de l'addition de ligands, l'intensité de fluorescence observée est affectée d'une dérive régulière. Cette dérive peut révéler la photolyse des tryptophanes, mais aussi parfois la lente adsorption des membranes sur les parois de la cuvette, voire même dans certains cas une inactivation plus ou moins rapide des ATPases et les changements d'exposition au solvant qui en résultent pour les tryptophanes, voire enfin une dérive en température.

L'utilisation de ces marqueurs intrinsèques que sont les résidus tryptophanes présente l'avantage de ne pas nécessiter de traitement particulier de l'échantillon, ces traitements pouvant éventuellement entraîner une modification des propriétés de la protéine. Cependant, dans le cas de l'ATPase- Ca^{2+} avec ses 13 résidus tryptophanes, il est difficile voire impossible d'attribuer les changements de fluorescence observés à l'un ou l'autre des tryptophanes en particulier. Seules des expériences additionnelles de mutagenèse dirigée permettraient de choisir la position

des tryptophanes « reporters ». La mutagenèse du résidu W552, situé dans le domaine nucléotidique, a ainsi déjà montré que ce résidu ne contribuait pas aux variations de fluorescence correspondant à l'addition des ligands les plus classiques (calcium, magnésium, nucléotide) (Lenoir, Jaxel et al. 2006). Ceci suggère que tous les tryptophanes ne sont pas équivalents et qu'ils contribuent différemment, selon leur localisation, à la réponse en fluorescence de la protéine. L'utilisation de marqueurs extrinsèques, *i.e.* ajoutés à la protéine et réagissant de façon covalente, si possible en un seul point de celle-ci, permet également de suivre les changements de conformation de l'enzyme, à ce site particulier de marquage, au cours des différentes étapes du cycle catalytique.

3. Fluorescence extrinsèque de l'ATPase marquée à la Fluorescéine Isothiocyanate (FITC)

Dans les années 80, il a été montré que le FITC pouvait être un inhibiteur de certaines ATPases de type P (Pick and Karlsh 1980; Jackson, Mendlein et al. 1983; Farley, Tran et al. 1984). Cette inhibition est due à la fixation covalente du FITC sur la chaîne latérale d'une lysine, proche du site de fixation du nucléotide et conservée dans les diverses ATPases de type P (la lysine K515 pour l'ATPase- Ca^{2+} (Mitchinson, Wilderspin et al. 1982)), le FITC venant loger son cycle dans le site de fixation du nucléotide. Le signal de fluorescence de cette sonde extrinsèque varie en fonction de la conformation adoptée par la protéine en présence des différents ligands ajoutés au milieu (Pick and Bassilian 1981a; Pick 1981b).

Comme pour les mesures de fluorescence intrinsèques, la fluorescence de l'enzyme marquée au FITC est suivie en continu, à 20°C, les différentes additions de ligands étant réalisées dans une cuvette dont le contenu est maintenu sous agitation. Le signal est enregistré aux longueurs d'onde correspondant au maxima d'excitation et d'émission de l'ATPase marquée, 495 et 520 nm respectivement.

Ce marquage au FITC présente l'avantage de donner un signal de fluorescence particulièrement intense et dans une région spectrale où les principaux effecteurs de l'ATPases n'absorbent pas, ce qui limite les éventuelles interférences entre signal de fluorescence et effets de filtre interne. En revanche, le FITC est un fluorophore relativement sensible au photoblanchiment (photolyse): on choisira donc de travailler avec une largeur de fente en excitation la plus réduite possible. Par ailleurs, toutes les étapes de la catalyse enzymatique ne sont pas accessibles avec le FITC, puisque l'occupation du site catalytique par la sonde empêche la fixation des nucléotides. Toutefois, on pourra utiliser l'acétylphosphate comme source d'énergie, à la place de l'ATP (voir Chap. V).

VII. MESURE PAR FILTRATION, AVEC DES TRACEURS RADIOACTIFS, DE LA FIXATION DE LIGANDS SUR L'ATPASE : EXEMPLE DE LA FIXATION DU $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ EN ABSENCE DE CALCIUM

L'expérience consiste dans un premier temps à incuber des vésicules de réticulum sarcoplasmique en présence d'un mélange contenant le ligand radioactif (par exemple $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ou $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$) et une deuxième molécule, inerte et marquée d'un isotope différent, le $[^3\text{H}]\text{glucose}$ par exemple, cette dernière molécule servant de marqueur pour estimer le « volume mouillant » des filtres (voir plus loin). Pour rendre plus fiable le double comptage final, l'activité totale de l'isotope d'énergie la plus faible, le $[^3\text{H}]$, doit être plus élevée que l'activité totale de l'isotope d'énergie la plus forte, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ou ^{32}P . Après un temps d'incubation choisi, les vésicules sont déposées sur un ou plusieurs filtres superposés, faits d'une matière adéquate pour que les membranes s'y adsorbent (par exemple filtres en esters de cellulose, par exemple avec des pores de diamètre 0.45 μm comme les filtres Millipore de type HA) et placés sur un fritté connecté à

un piège, lui-même couplé à une pompe à vide qui engendre une dépression. Des expériences parallèles doivent vérifier que l'ATPase reste pour l'essentiel adsorbée sur le filtre supérieur. Les filtres, non rincés pour éviter toute dissociation du ligand fixé à l'ATPase, sont placés chacun dans une fiole de comptage qui est ensuite remplie de liquide scintillant, et la radioactivité de chacun des deux isotopes présents est estimée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman Coulter LS3801 ou LS5801).

Dans le cas où l'on souhaite étudier la fixation d'ATP, il est bien sûr nécessaire que ce ligand (également substrat de l'enzyme) ne soit pas hydrolysé pendant l'expérience : un excès d'EGTA permet de chélater le calcium éventuellement présent et ainsi d'empêcher l'hydrolyse de l'ATP.

Avec ce protocole, on est confronté à un problème lié à l'absence délibérée de rinçage du filtre : l'estimation nécessaire mais difficile de la quantité de ligand piégé dans le liquide « mouillant » le filtre (mais pas lié à la protéine). Cette quantité doit évidemment être soustraite du ligand total compté afin d'estimer le ligand vraiment « lié » à la protéine. De plus, chaque filtre est unique et surtout il est plus ou moins bien aspiré, et il ne va donc pas retenir exactement la même quantité de liquide « mouillant ». Pour résoudre ce problème, nous utilisons le [^3H]glucose mentionné plus haut. Le glucose n'interagit aucunement avec les membranes adsorbées. En revanche, il va se répartir de façon homogène dans le milieu, alors que la protéine va fixer une partie de son ligand radioactif. Le premier filtre va récupérer la totalité des vésicules avec leur ligand radioactif lié ainsi qu'un certain volume de tampon (le « volume mouillant ») contenant le ligand radioactif libre et du [^3H]glucose. Ce [^3H]glucose va servir de marqueur interne pour quantifier le volume mouillant. Le second filtre va permettre de vérifier que toutes les protéines ont bien été adsorbées sur le premier filtre (et va également homogénéiser le volume mouillant retenu par le premier filtre dans les diverses mesures). Des expériences similaires sont décrites dans (Champeil, Riollet et al. 1988; Picard, Toyoshima et al. 2006). Dans mon travail de thèse, j'ai par exemple utilisé cette méthode pour montrer que le domaine cytosolique pouvait fixer l'ATP même après la fixation préalable des inhibiteurs membranaires, TG, BHQ et CPA (voir figure 6 dans (Montigny, Picard et al. 2007)).

VIII. AUTRES METHODES UTILISEES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL DE THESE

Au cours de ces trois années, j'ai également été amené à utiliser de nombreuses autres techniques, que ce soit par exemple dans le cadre de la caractérisation des propriétés physico-chimiques des détergents (voir Chap. IV) ou dans le cadre de l'étude de l'association des divalents avec diverses molécules (voir Chap. VI). Afin de simplifier la lecture et l'interprétation des résultats, ces techniques seront décrites au sein même des chapitres de résultats correspondants.

CHAPITRE III : INFLUENCE DES INHIBITEURS SUR LES CONFORMATIONS ADOPTEES PAR L'ATPASE Ca^{2+} AU COURS DE LA CRISTALLOGENESE

Comme je l'ai présenté en introduction, l'obtention de formes cristallisées de l'ATPase a évidemment été une avancée majeure pour la compréhension du mécanisme catalytique permettant le transport des ions calcium. Inévitablement, ces formes ont néanmoins suscité quelques polémiques, avec notamment la question récurrente de savoir si ces structures cristallines statiques reflétaient assez bien les états intermédiaires dynamiques explorés par l'ATPase au cours du cycle catalytique. L'une des contributions que nous avons pu apporter, en tant que « fonctionnalistes », à ce débat, a été de tester la pertinence des conditions de cristallisation, pour si possible faire le tri entre ce qui, dans ces structures, devait ou ne devait pas être pris en compte pour la description du fonctionnement de l'enzyme. (voir [Chap. I, §II.5](#)).

Dans le cadre de la précédente thèse réalisée au laboratoire, Martin Picard avait montré que l'addition d'inhibiteurs (TG, BHQ ou CPA) à l'analogue « E2.BeF_3 » de la forme phosphorylée E2-P empêchait la fixation des ions Ca^{2+} du côté luminal, peut-être en bloquant l'ouverture des sites de transport côté luminal (ouverture indispensable, pendant le cycle de transport du Ca^{2+} , à la libération de cet ion du côté luminal). Cette observation amenait à prédire qu'il serait probablement impossible, en présence de ces inhibiteurs, d'obtenir par cristallogénèse la structure d'une ATPase montrant la « porte de sortie » des ions calcium ouverte du côté luminal ([Picard, Toyoshima et al. 2006](#)).

Le travail présenté dans ce chapitre s'inscrit directement dans le prolongement de ces observations. En exploitant simultanément les propriétés de fluorescence des résidus tryptophanes intrinsèques de la protéine, et celles d'un marqueur extrinsèque fixé sur la lysine K515 dans le domaine cytosolique (le FITC, fluorescein 5'-isothiocyanate), et grâce à des mesures de contrôle critiques, notamment par protéolyse ménagée, nous avons suivi les changements de conformation de la protéine induits par les trois inhibiteurs (TG, CPA et BHQ) dans le domaine transmembranaire et le domaine cytosolique, respectivement.

I. LES INHIBITEURS MEMBRANAIRES FIGENT LE DOMAINE MEMBRANAIRE DE L'ATPASE- Ca^{2+} , EMPECHANT L'OUVERTURE LUMINALE DES SITES DE TRANSPORT ($\text{Ca}_2.\text{E2-P} \leftrightarrow \text{E2-P} + 2\text{Ca}^{2+}$)

Au cours de son cycle catalytique, l'ATPase doit passer par une forme intermédiaire ayant ses sites de transport du calcium « ouverts » vers le côté luminal, ces sites ayant alors une affinité très faible pour le calcium (de l'ordre du millimolaire), afin de permettre le relargage des ions calcium dans la lumière du réticulum, contre leur gradient de concentration. Cette forme particulière de l'ATPase est le plus souvent désignée sous le nom de « $\text{Ca}_2.\text{E2-P}$ » (pour revue, voir ([Møller, Nissen et al. 2005](#); [Toyoshima 2008](#))).

Par ailleurs, on sait qu'il est parfois possible de mimer des états de transition de la phosphorylation et de la déphosphorylation d'un enzyme donné en faisant interagir avec lui des complexes fluorés résultant de la combinaison entre les ions fluorures et certains ions métalliques ([Chabre 1990](#)) comme le béryllium (« E2.BeF_3 », ([Murphy and Coll 1993](#))), l'aluminium (« E2.AlF_4 », ([Troullier, Girardet et al. 1992](#))) ou le magnésium (« E2.MgF_4 », ([Coll and Murphy 1992](#); [Murphy and Coll 1992a](#); [Murphy and Coll 1992b](#); [Daiho, Kubota et al. 1993](#); [Kubota, Daiho et al. 1993](#); [Yamasaki, Daiho et al. 2002](#))). En 2001, puis en 2004, [Danko et al.](#) ont montré que l'ATPase interagissant avec ces divers complexes fluorés était particulièrement résistante à la protéinase K, ce qui suggérait un état extrêmement compact du domaine

cytosolique dans ces états (Danko, Daiho et al. 2001). Les intermédiaires successifs de la réaction de déphosphorylation, « E2-P $\leftrightarrow$ E2.Pi », auraient comme analogues, dans cet ordre, E2.BeF₃ puis E2.AlF₄ et enfin E2.MgF₄ (Danko, Yamasaki et al. 2004), *i.e.* la forme « E2.BeF₃ » serait la forme la plus proche de la forme « E2-P », supposée avoir ses sites de transports ouverts vers le côté luminal. Une différence, cependant, entre les formes fluorées et les intermédiaires « naturels », et que les complexes fluorés sont particulièrement stables (Troullier, Girardet et al. 1992), avec des temps de demi-vie de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes, beaucoup plus longs que dans les intermédiaires phosphorylés pour laquelle la liaison acyl-phosphate formée avec la chaîne latérale de l'aspartate D351 est labile (Hokin, Sastry et al. 1965) (temps de demi-vie inférieur à la seconde dans de nombreuses conditions).

Les cristallographes ont donc utilisé ces complexes fluorés pour essayer d'obtenir le plus grand nombre possibles de structures susceptibles d'illustrer les diverses formes intermédiaires adoptées par l'ATPase au cours de sa déphosphorylation. Afin de stabiliser encore davantage ces complexes fluorés, ils les ont initialement combinés à la thapsigargine (ou au CPA, ou au BHQ) pour préserver complètement la protéine de l'inactivation irréversible induite par les détergents ((Yamasaki, Daiho et al. 2002) et pour revue, (Toyoshima 2008)). Cependant, le résultat restait assez décevant car quelle que soit la combinaison complexe/inhibiteur utilisée, les cristaux obtenus montraient quasiment la même structure pour le domaine membranaire.

Dans le cadre de son travail de thèse réalisé au laboratoire, Martin Picard a suggéré une explication à cela : bien que l'ATPase portant le complexe BeF₃ soit très probablement un bon analogue de la forme « E2-P », avec ses sites de fixation du calcium ouverts vers le côté luminal, la fixation de la thapsigargine sur cet état E2.BeF₃ avait pour conséquence d'empêcher la fixation du calcium, et donc peut-être de refermer ces sites luminaux (Picard, Toyoshima et al. 2006).

Un premier axe de mon travail de thèse a donc été d'estimer l'ampleur des changements de conformation induits par la thapsigargine, le BHQ ou le CPA, malgré la fixation préalable de ligands fluorés (voire d'autres ligands) sur l'ATPase. Pour cela, nous avons utilisé de façon complémentaire les techniques de protéolyse ménagée et la spectrophotométrie de fluorescence, soit en utilisant les propriétés de fluorescence intrinsèque de l'ATPase, soit en marquant celle-ci avec le FITC.

1. Les inhibiteurs TG, CPA et BHQ bloquent la réponse des tryptophanes membranaires à la fixation du complexe Be.F₃

Nous avons d'abord souhaité suivre la formation du complexe « E2.BeF₃ » en utilisant les changements du niveau de fluorescence des tryptophanes. En effet, on sait que la fixation du phosphate inorganique ou de ses analogues fluorés se traduit par des variations de fluorescence intrinsèque différents pour les différents complexes (Danko, Yamasaki et al. 2004; Picard, Toyoshima et al. 2006).

La figure III.01A montre une expérience de référence. Tout d'abord, en guise de calibration interne, on vérifie la sensibilité de la fluorescence des tryptophanes à la concentration de Ca²⁺ libre. Une première addition de calcium donne lieu à une augmentation seulement marginale de cette fluorescence, qui indique que presque toutes les ATPases ont déjà, au démarrage de l'expérience, en présence des quelques micromolaires de calcium qui contaminent le tampon, leurs sites de fixation du Ca²⁺ occupés. Dans les conditions de cette expérience (à pH 7, en présence de 100 mM de KCl et de 5 mM de Mg²⁺), la constante apparente de dissociation du Ca²⁺ pour sa fixation sur l'ATPase est en effet inférieure à la concentration du calcium contaminant, même en présence de 20 % de DMSO qui déplace légèrement l'équilibre « Ca₂.E1 $\leftrightarrow$ E2 » en faveur de « E2 » (de Meis, Martins et al. 1980; Champeil, Guillain et al. 1985). Une deuxième addition, cette fois d'EGTA en large excès par rapport au Ca²⁺ total, vise à réduire à presque rien la concentration libre en calcium : le Ca²⁺ se détache alors de la totalité des

ATPases et la fluorescence de celles-ci chute de quelques pour cent, comme attendu. On procède ensuite à la formation du complexe fluoré, en ajoutant successivement le fluorure puis le béryllium : on confirme que la formation du complexe « E2.BeF₃ » se traduit bien par une augmentation de fluorescence similaire à celle que l'on peut observer lors de la formation à partir de phosphate inorganique de la « vraie » forme « E2-P » ((Danko, Yamasaki et al. 2004; Picard, Toyoshima et al. 2006), et voir aussi la figure 2D dans (Montigny, Picard et al. 2007)). La suite de l'expérience illustrée sur la figure III.01A montre alors que l'ajout de thapsigargine, qui interdit la fixation du Ca²⁺ luminal (Picard, Toyoshima et al. 2006), induit également une diminution significative de la fluorescence des tryptophanes, probablement due à un changement de conformation de la protéine : ce signal traduit sans doute la refermeture des sites de fixation lumineux (Picard, Toyoshima et al. 2006). Il en est de même lorsqu'on ajoute la BHQ ou le CPA plutôt que la TG (données non présentées).

Les trois autres panneaux de la figure III.01A montrent que l'addition *préliminaire* de l'un ou l'autre des trois inhibiteurs membranaires (TG, panneau B ; BHQ, panneau C ; CPA, panneau D) entraîne une absence de réponse (TG) ou une très faible réponse (BHQ et CPA) des tryptophanes membranaires à l'ajout ultérieur de fluorure et de béryllium (en fait, dans le cas du BHQ et du CPA, on observe tout de même une petite variation du niveau de fluorescence, trop faible pour affirmer qu'il s'agit d'une véritable réponse des tryptophanes, voire de signe inverse dans le cas du CPA).

Incidemment, on remarquera ici le signal lent qui fait suite à l'addition du seul CPA (panneau D) : la conséquence pour l'enzyme de la fixation du CPA (ou encore cette fixation elle-même) est lente, et nous verrons plus loin qu'elle est sans doute dépendante du magnésium.

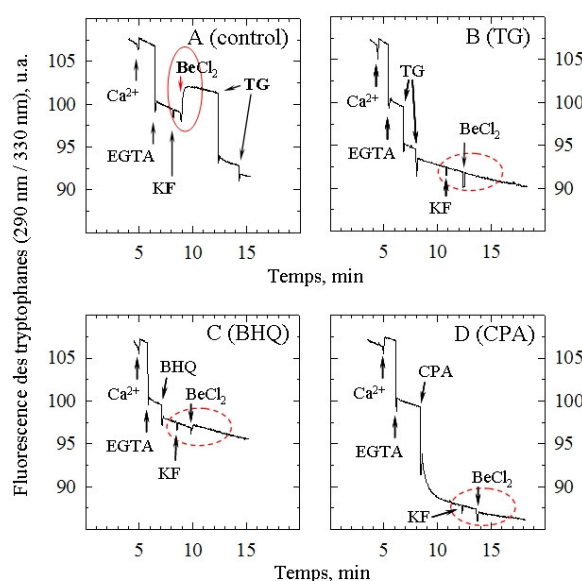


Figure III.01 : Les inhibiteurs TG, CPA et BHQ bloquent la réponse des tryptophanes membranaires à la fixation du complexe Be.F₃. La cuvette du fluorimètre contient 0,1 mg.ml⁻¹ de membranes de SR, dans un tampon contenant 50 mM de Mops-Tris, 100 mM de KCl, 20 % de DMSO (w/w) et 5 mM de MgCl₂, à pH 7 et 20°C. Le signal de fluorescence est enregistré en continu avec les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 290 et 330 nm, respectivement. Dans les quatre expériences, à titre de contrôle interne, on ajoute d'abord 100 µM de Ca²⁺ pour saturer complètement les sites de transport des ATPases qui ne seraient pas déjà occupés par le Ca²⁺ contaminant le tampon, puis 2 mM d'EGTA pour chélater la totalité du calcium ([Ca²⁺]_{libre} < 0,02 µM). A : Control. On ajoute alors successivement 1 mM de KF et 50 µM de BeCl₂. La formation du complexe « E2.Be.F₃ » donne lieu à une augmentation du niveau de fluorescence, ici soulignée d'un trait continu rouge. On réalise ensuite deux ajouts successifs de 1,5 µM de TG (~1 µg.ml⁻¹). B, C et D : Ajout des inhibiteurs *avant* addition des complexes fluorés. La thapsigargine (1,5 µM par ajout), le BHQ (30 µM par ajout) ou le CPA (1 µM par ajout) sont ajoutés avant addition du KF et du BeCl₂, qui ne donnent ensuite plus guère lieu à augmentation de fluorescence (pointillés rouges). Les niveaux de fluorescence ont été corrigés pour la dilution liée aux différents ajouts.

2. La forme « E2.BeF₃ » est protégée de la protéolyse, même en présence de thapsigargine

Un des effets possibles de ces trois inhibiteurs, dépendant, qui pourrait expliquer le résultat précédent, serait que leur fixation induise un changement de conformation suffisant pour chasser le complexe fluoré du domaine cytosolique ou lui interdire d'y accéder (figure III.01A) : les tryptophanes deviendraient incapables de révéler la formation du complexe E2.BeF₃ (figure III.01B-D) simplement parce que ce complexe ne se formerait plus ! Nous avons eu recours à la protéolyse ménagée pour *exclure* cette hypothèse.

Comme je l'ai présenté en introduction, les techniques de protéolyse ménagée permettent de suivre certains « changements de conformation » de l'ATPase. La protéinase K est parmi les protéases couramment utilisées dans ce type d'expérience (Juul, Turc et al. 1995). Cette enzyme n'est pas très spécifique d'une séquence peptidique particulière, elle va plutôt cliver la chaîne polypeptidique, selon la conformation adoptée par la protéine, au niveau de régions particulièrement accessibles. Quelques sites de clivage ont été bien étudiés : la protéinase K peut notamment cliver les boucles reliant le domaine A aux hélices transmembranaires M2 et M3 d'une part au niveau des résidus L119-K120 pour donner un fragment majoritaire de 95 kDa (« p95C », (Lenoir, Picard et al. 2004)), d'autre part au niveau des résidus T242-E243 pour donner un fragment majoritaire de 83 kDa (« p83C », (Møller, Lenoir et al. 2002)).

En 2004, Danko *et al.* ont montré que les formes de l'ATPase portant un complexe fluoré étaient résistantes à la protéinase K (Danko, Yamasaki et al. 2004). Nous avons mis à l'épreuve cette résistance à la protéolyse, mais en ajoutant différents inhibiteurs soit avant soit après formation du complexe fluoré (figure III.02). Une première expérience contrôle est réalisée en absence d'inhibiteurs et de complexe fluoré (toujours en présence d'EGTA): on obtient le profil de protéolyse attendu, avec ses produits de coupure à 83 kDa (bande majoritaire) et 95 kDa, et une bande correspondant à l'ATPase intacte très minoritaire (*panneau A, piste 2 vs piste 1*). Dans une deuxième expérience contrôle, dans laquelle la protéolyse est menée en présence d'un inhibiteur comme la thapsigargine, mais toujours en absence de complexe fluoré (*piste 3*), la coupure est significativement ralentie, avec dorénavant une bande majoritaire correspondant à l'ATPase intacte et les deux bandes p83C et p95C désormais présentes en quantité équivalente, mais la protection de l'ATPase vis à vis de la protéolyse n'est que partielle. Par contre, la formation préliminaire du complexe fluoré rend l'ATPase *complètement* résistante à la protéolyse, que se soit en absence (troisième expérience, *panneau A, piste 4*) ou en même en présence (*panneau A, piste 5*) d'un inhibiteur. Ce résultat démontre que l'addition subséquente de TG n'a *pas* « chassé » le complexe fluoré du domaine cytosolique.

Une seconde série d'expériences, présentée dans le gel B, montre que l'on obtient un résultat identique si la thapsigargine est ajoutée à la protéine *avant* la formation du complexe fluoré : la thapsigargine, qui fige le domaine membranaire, n'empêche donc *pas* la fixation du BeF₃ au domaine cytosolique.

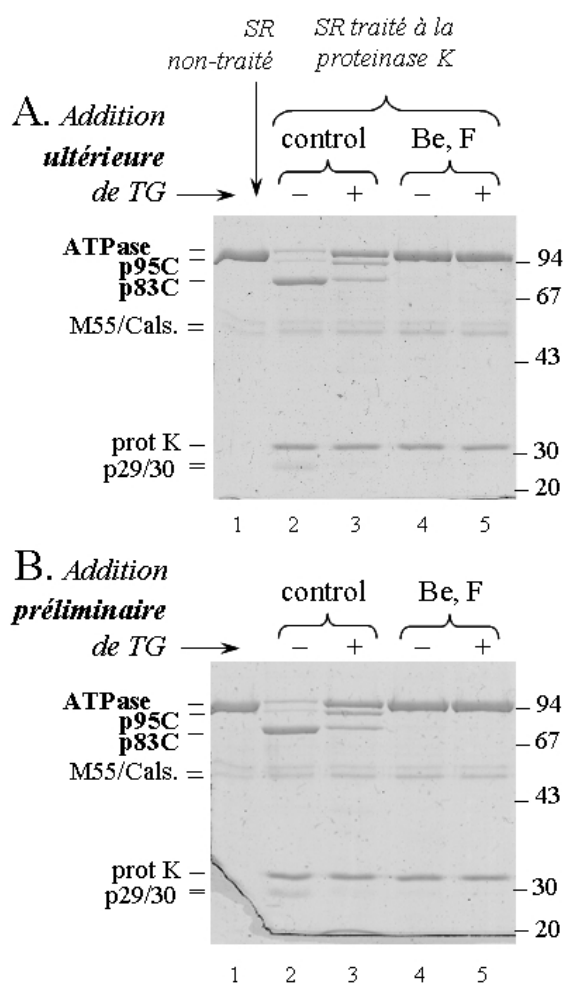


Figure III.02 : La forme « E2.Be.F₃ » est résistante à la coupure par la protéinase K, que ce soit en absence ou en présence de thapsigargine, ajoutée avant ou après formation du complexe fluoré. Les membranes de SR sont suspendues à 1 mg.ml⁻¹ dans un tampon contenant 150 mM de Mops-Tris, 100 mM de KCl, 20 % de DMSO (w/w) et 5 mM de MgCl₂, 0,5 mM EGTA, à pH 7 et 20°C. *A* : Addition de TG après formation des complexes fluorés. Les membranes sont incubées pendant 10 minutes en absence (« control », pistes 2 et 3) ou en présence de 0,05 mM BeCl₃ et 1 mM KF (« Be,F », pistes 4 et 5). Ensuite, la thapsigargine est ajoutée (+) ou non (-) à certains de ces échantillons, à raison de 0,01 mg/ml, et l'incubation avec la TG dure 10 minutes. Enfin, on ajoute 0,3 mg.ml⁻¹ de protéinase K à tous les échantillons (pistes 2-5), pour une protéolyse de 60 minutes. *B* : Addition préliminaire de TG. On procède de la même façon qu'en A, sauf que la TG est ajoutée et préincubée avant que BeCl₃ et KF ne soient ajoutés. Dans les deux séries d'expériences (A & B), la protéolyse est arrêtée par addition de 1 mM de PMSF, puis les échantillons sont dénaturés (voir Chap. II) et 2 µg de protéines sont finalement déposés sur un gel SDS-PAGE à 9% d'acrylamide. Les marqueurs de masse moléculaire sont indiqués sur la droite du gel (LMW, GE Healthcare, 94, 67, 43, 30 et 20 kDa). Les principales espèces visibles sur le gel sont indiquées sur la gauche du gel : ATPase, ATPase-Ca²⁺ non-clivée ; p95C, fragment C-terminal de l'ATPase issu de la coupure en K120 ; p83C, fragment C-terminal issu de la coupure en E243 ; p29/30, fragments de protéolyse correspondant approximativement au domaine « N », obtenus après coupure multiple de l'ATPase ; prot K, protéinase K ; M55/Cals, protéine M55 et calséquestrine, deux des protéines minoritaires présentes dans les vésicules de SR (voir Chap. II).

Cette relative indépendance des changements de conformation du domaine cytosolique de l'ATPase (indiqués par l'acquisition d'une résistance complète à la protéolyse) vis à vis de son domaine transmembranaire (que les tryptophanes suggèrent relativement « figé ») est constatée également en présence d'aluminium fluorure (AlF₄), de magnésium fluorure (MgF₄), d'un nucléotide (MgATP) ou bien encore de vanadate, que ce soit avec la thapsigargine, le BHQ ou le CPA (pour les expériences correspondantes, voir les figures 1, S1, S7 dans (Montigny, Picard et al. 2007)).

De plus, si l'on utilise une ATPase marquée par le FITC au niveau de la lysine K515 de son domaine N, on peut observer lors de l'addition de fluorure + béryllium des changements de fluorescence correspondant à la formation des complexes fluorés au sein du domaine cytosolique, ainsi que des signaux correspondant à la fixation préliminaire ou subséquente de TG au domaine membranaire : cela suggère que la thapsigargine, qui bloque le domaine membranaire, induit également dans le même temps une réorganisation du domaine cytosolique, malgré la présence des fluors au sein de ce domaine.

Peu de temps après la publication de nos résultats, l'obtention fin 2007 de cristaux de l'ATPase préparés en présence de BeF₃ mais en absence (ou en présence) de thapsigargine (PDB #3B9B et #2ZBF, (Olesen, Picard et al. 2007; Toyoshima, Norimatsu et al. 2007)) a permis de révéler définitivement les changements de conformation induits par la thapsigargine.

3. Comparaison des structures « E2.BeF₃ » obtenues en absence ou en présence de thapsigargine

a. Au niveau du domaine membranaire

Ces deux structures ont confirmé que la présence de thapsigargine induisait un changement de conformation important du domaine membranaire, conduisant à la fermeture des sites de transport côté luminal (Picard, Toyoshima et al. 2006; Montigny, Picard et al. 2007) : dans la forme « E2.BeF₃ » cristallisée en absence de TG, les extrémités lumineuses des hélices transmembranaires (M1-5 et M7), ainsi que les boucles qui les relient, sont écartées et forment un véritable « canal », ouvert depuis le lumen jusqu'aux sites de transport (figure III.03, à gauche). Il est d'ailleurs possible alors, depuis le lumen, « d'apercevoir » les sites de transport (dont les résidus clefs (Andersen and Vilsen 1995; Vilsen and Andersen 1998) sont colorés en rouge et orangé sur la figure). En revanche, dans la forme « E2.BeF₃.TG » cristallisée en présence de TG, les hélices M3 et M4 sont « tordues », l'hélice M4 se déplaçant de plus de 11 Å pour venir obstruer la voie de sortie des ions calcium. Les boucles lumineuses L1-2 et L7-8 sont également repliées vers l'intérieur suite à un basculement d'environ 10 Å (figure III.03, au centre). La superposition des deux structures montre des sites de transports « dissimulés » derrière M4 (figure III.03, en bas à droite).

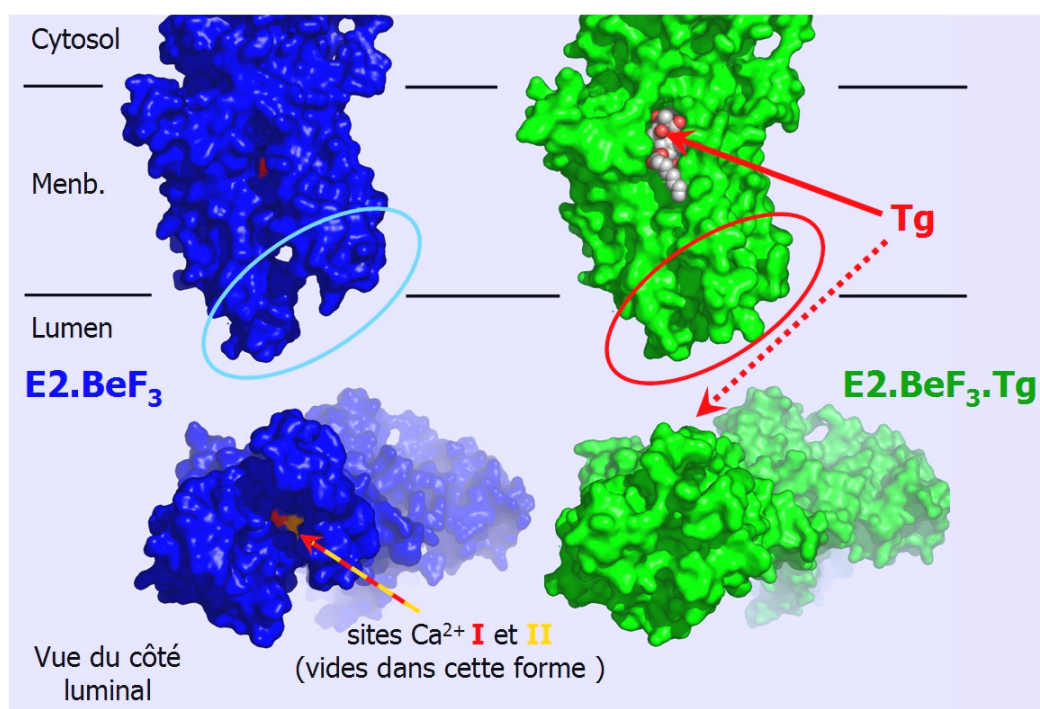


Figure III.03 : La thapsigargine referme les sites luminaux de la forme « E2.BeF₃ ». Les densités électroniques des structures « E2.BeF₃ » obtenues en absence (bleue, PDB #3B9B, (Olesen, Picard et al. 2007)) ou en présence de thapsigargine (verte, #2ZBF, (Toyoshima, Norimatsu et al. 2007)) sont représentées, soit vues parallèlement à la membrane (*en haut*), soit observées à partir du côté luminal selon un axe perpendiculaire à la membrane (*en bas*). La thapsigargine (dans la structure centrale) est représentée par des sphères selon la convention suivante : les atomes d'oxygène en rouge, les atomes de carbone en bleu. Les emplacements des sites de transport I et II du calcium sont indiqués respectivement en rouge et en orangé (visibles uniquement dans la structure « E2.BeF₃ » sans TG, à gauche). Les deux structures ont été alignées suivant leurs séquences C-terminales (hélices M5-M10), réputées immobiles au cours du cycle catalytique. La comparaison de ces structures est raisonnable parce que les résolutions (2,65 et 2,4 Å) et les « facteurs B » de température sont du même ordre d'une structure à l'autre, région par région (de 60 à 220 Å² selon les régions, soit un écart de position maximum de 0,9 à 1,65 Å pour un résidu donné), bien inférieur au mouvement d'ensemble observé.

b. Au niveau du domaine cytosolique

Ces structures, comparées à la structure « E2.TG » (Toyoshima and Nomura 2002), permettent également de comprendre la différence de sensibilité de ces différentes formes à la protéinase K. Dans la structure « E2.BeF₃ », les deux sites de clivage sont complètement dissimulés dans la protéine, le site L119-K120 étant notamment bloqué entre les domaines N et P (figure III.04, en haut à gauche), et le site T242-E243 étant dissimulé sous le domaine P (figure III.04, en bas à gauche). L'addition de thapsigargine sur cette forme entraîne un déplacement des deux sites (symbolisé par les flèches vertes sur les panneaux du centre). Cependant, ce complexe « E2.BeF₃.TG » reste insensible à la protéolyse (figure III.02, piste 5 vs piste 3). Dans cette forme, les sites ne sont donc pas suffisamment accessibles pour permettre la coupure par la protéinase K. En présence de thapsigargine et en absence de BeF₃, *i.e.* dans la forme « E2.TG » (panneaux de droite), seul le site p95C a changé de position par rapport à la forme insensible « E2.BeF₃.TG » : ceci suggère que seul le site L119-K120 est accessible dans un premier temps, le second site T242-E243 ne devenant accessible qu'après une première coupure en L119-K120. Ces structures sont donc complètement compatibles avec nos observations faites par protéolyse qui montrent une coupure préférentielle en L119-K120 en présence d'un des trois inhibiteurs, la thapsigargine (figure III.02), la BHQ (supplemental figure S7 dans (Montigny, Picard et al. 2007)) ou encore le CPA (données non présentées).

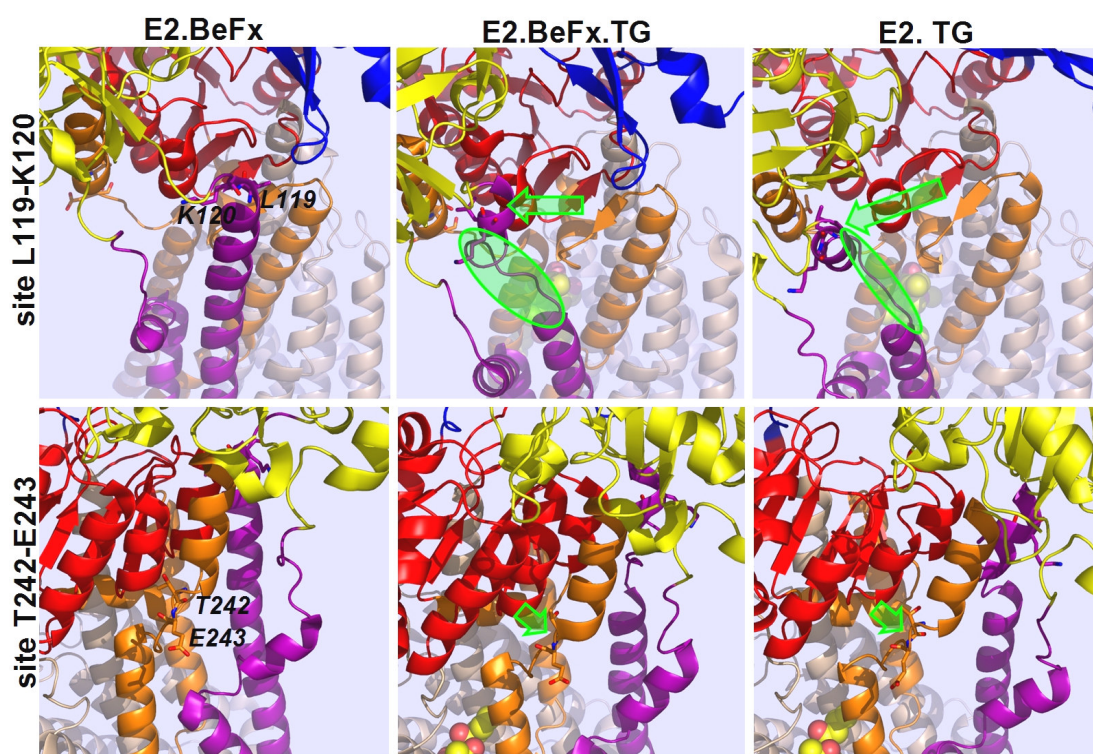


Figure III.04 : Effet de la thapsigargine sur l'accessibilité des sites de coupure par la protéinase K, L119-K120 et T242-E243. Les structures « E2.BeF₃ » (PDB #3B9B, (Olesen, Picard et al. 2007)), « E2.BeF₃.TG » (#2ZBF, (Toyoshima, Norimatsu et al. 2007)) et « E2.TG » (PDB #1IWO, (Toyoshima and Nomura 2002)) sont alignées sur leurs séquences C-terminales (hélices M5-M10) et colorées comme suit : le domaine de fixation du nucléotide est coloré en bleu, le domaine de phosphorylation en rouge et le domaine dit « actuator » en jaune. Les hélices du domaine membranaire sont colorées comme suit : M1 & M2 en violet, M3 & M4 en orange et M5 à M10 en gris. La thapsigargine, fixée entre les hélices transmembranaires M3, M5 et M7, est symbolisée par des sphères avec les atomes de carbone colorés en jaune et les atomes d'oxygène en rouge. Les flèches vertes symbolisent le déplacement du site de coupure par rapport à la structure « E2.BeF₃ » à gauche. Les ellipses vertes entourent la partie déstructurée de l'hélice M2, qui est complètement formée dans la structure « E2.BeF₃ » alors qu'elle est largement dépliée en présence de TG.

II. UNE RETOMBEE INATTENDUE DE NOS EXPERIENCES : UN ION MAGNESIUM SE FIXE AVEC LE CPA A LA SURFACE DU DOMAINE MEMBRANAIRE :

A la faveur des expériences réalisées avec le CPA, le travail précédent, initialement consacré à l'effet des inhibiteurs membranaires, a été l'occasion d'une incursion dans un champ un peu différent, celui de la possible fixation du Mg^{2+} à la surface du domaine membranaire.

1. Préliminaires : probables ou possibles sites de fixation du Mg^{2+} sur l'ATPase

La dépendance du cycle catalytique vis-à-vis du magnésium est un fait connu depuis de nombreuses années, le substrat hydrolysé par l'ATPase étant une molécule de $Mg.ATP$ (Makinose 1972). Comme attendu, différentes structures de la protéine obtenues en présence de nucléotides ont montré l'existence d'un ou de deux site(s) majeur(s) de fixation pour les divalents à proximité de l'aspartate catalytique D351, des résidus D703 et D707, à proximité de la chaîne polyphosphate du nucléotide (Olesen, Sorensen et al. 2004; Sorensen, Møller et al. 2004 ; Toyoshima and Mizutani 2004; Jensen, Sorensen et al. 2006; Toyoshima, Norimatsu et al. *to be published*)), au sein du site catalytique et du domaine de fixation du nucléotide.

On considère également depuis longtemps que le magnésium pourrait interagir avec des chaînes latérales anioniques d'acides aminés ailleurs sur la protéine, peut-être par exemple aux sites de transport du calcium. Le magnésium est en effet un compétiteur reconnu du calcium pour la fixation aux sites de transport : on observe en effet, une diminution de l'affinité de l'ATPase pour le calcium en présence de magnésium, le magnésium semblant stabiliser un état « $Mg.E1$ » dépourvu de calcium, et on a longtemps pensé que cette possible fixation du Mg^{2+} sur un site Ca^{2+} était peut-être bien la cause des signaux de fluorescence intrinsèque observés en réponse à l'addition du Mg^{2+} à une ATPase en absence de Ca^{2+} (Vianna 1975; Guillain, Gingold et al. 1982 ; Champeil, Gingold et al. 1983; Forge, Mintz et al. 1993b). Toutefois, la fluorescence intrinsèque du mutant E309Q de l'ATPase, qui ne fixe plus de calcium au site II, continue à répondre à l'addition de magnésium (Lenoir, Jaxel et al. 2006 ; Montigny, Arnou et al. 2008), ce qui laisse penser que le magnésium pourrait se fixer autre part sur la protéine, au site catalytique comme décrit ci-dessus, ou encore au niveau d'autres sites non décrits jusqu'à présent (l'argument n'est cependant pas définitif : cette mutation pourrait n'être pas suffisante pour empêcher totalement la fixation du magnésium au site II, puisque le Ca^{2+} requiert 5 ligands mais le Mg^{2+} seulement 4). C'est peut-être un tel site, imprévu, qui a été révélé par nos expériences avec le CPA.

Mais avant de décrire ces résultats, mentionnons aussi, pour mémoire, la description récente de la fixation du Mg^{2+} au voisinage des sites Ca^{2+} lorsque ceux-ci sont ouverts vers la lumière du réticulum : dans « $E2.BeF_3$ », le Mg^{2+} peut se fixer à proximité des sites de transport (depuis le lumen) et stabiliser le domaine membranaire. La publication de la structure $E2.BeF_3$ par le groupe de P. Nissen (Olesen, Picard et al. 2007) a en effet révélé de façon non ambiguë l'existence d'un ion magnésium fixé dans le domaine membranaire, à proximité des sites de transport du calcium (figure III.05). Ce magnésium est lié au résidu E90. Comme il faut en tout 4 ligands pour stabiliser un magnésium, le carbonyle de la chaîne latérale du E309 et deux molécules d'eau semblent être les trois autres probables ligands, car ils sont situés à moins de 2.4 Å du magnésium.

Notons que dans cette structure E2.BeF₃, tous les autres résidus des sites de transport I et II sont impliqués dans un réseau de liaisons faibles qui stabilisent probablement les hélices transmembranaires les unes par rapport aux autres : l'asparagine N768 de M5 est liée simultanément au glutamate E309 et à l'alanine A305 de M4, verrouillant ainsi la partie non structurée de cette dernière hélice ; le glutamate E771 est lié avec l'asparagine N796, pontant l'hélice M5 à l'hélice M6. Les ligands des résidus T799, D800 et E908 sont plus difficiles à identifier mais semblent bien correspondre à certains des NH peptidiques du squelette de la protéine. On notera que dans l'ATPase-H⁺-K⁺¹², les résidus équivalents aux résidus critiques pour la fixation du calcium sur l'ATPase-Ca²⁺ sont eux aussi impliqués dans un réseau de liaisons faibles quand l'enzyme est placée dans un état conformationnel équivalent à l'état « E2 » des SERCAs (Swarts, Hermesen et al. 1998; Swarts, Koenderink et al. 2005).

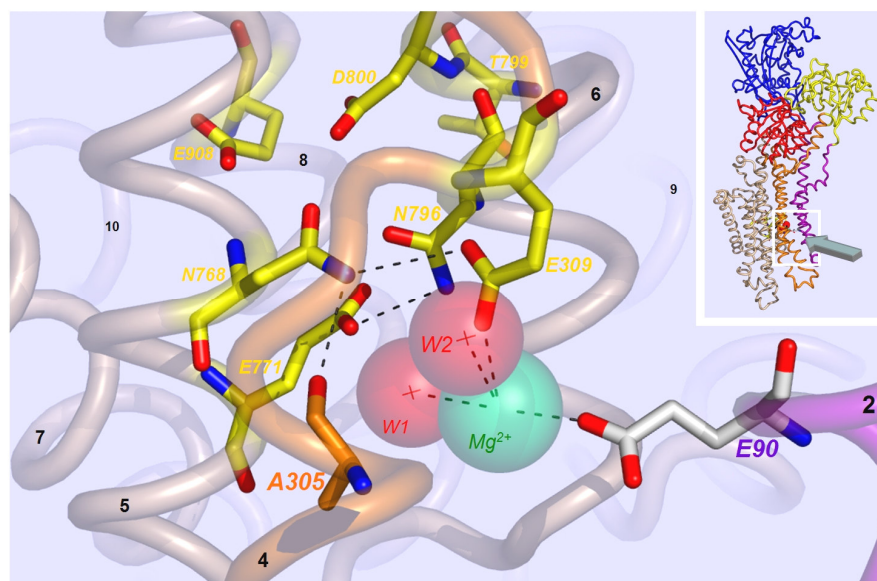


Figure III.05 : Dans « E2.BeF₃ », le magnésium contribue à un réseau de liaisons inter-hélices dans le domaine membranaire. La structure « E2.BeF₃ » entière est représentée en insert (PDB #3B9B, (Olesen, Picard et al. 2007)) et colorée comme précédemment : le domaine de fixation du nucléotide est coloré en bleu, le domaine de phosphorylation en rouge et le domaine dit « actuator » en jaune. Les hélices du domaine membranaire sont colorées comme suit : M1 & M2 en violet, M3 & M4 en orange et M5 à M10 en grisé. La région des sites de transport est observée depuis les hélices M1 et M2, parallèlement à la membrane (flèche grisée). Les chaînes latérales des résidus composant les sites de transport sont colorés avec les carbones en jaune, les oxygènes en rouge et les atomes d'azote en bleu. Dans un souci de différenciation, les carbones des résidus alanine A305 et glutamate E90 sont respectivement colorés en orange et en blanc. Le magnésium est symbolisé par une sphère verte. Deux molécules d'eau sont symbolisées par des sphères rouges. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par des lignes pointillées. Les numéros des hélices sont indiqués en noir sur chaque chaîne. La taille des caractères a été choisie en fonction de la distance à laquelle se trouve les objets du point d'observation, les éléments à l'avant étant écrits en plus gros que ceux se trouvant à l'arrière.

Lorsque le complexe E2.BeF₃ a été cristallisé en présence de TG (structure « E2.BeF₃.TG »), ce réseau est fortement perturbé, et le principal ligand du magnésium, E90, est éloigné à cause d'un glissement vertical de plus de 7 Å de l'hélice M2 vers le lumen (mouvement d'ailleurs en partie responsable de la fermeture des sites côté luminal). Dans le même temps, la partie basse de M4 (en amont de l'alanine A305) est basculée d'environ 20° vers l'extérieur, ce qui induit un éloignement de la chaîne latérale de l'asparagine N768 à plus de 5 Å de l'aspartate E309 : dans ces conditions, le réseau de liaisons inter-hélice est rompu. Seule la thapsigargine assure alors la stabilisation du domaine membranaire. On constate encore ici un des biais occasionné par la présence de l'inhibiteur.

¹² L'ATPase-H⁺-K⁺, plus communément appelée ATPase gastrique, est la principale ATPase de type P de l'épithélium interne de l'estomac. Elle permet l'acidification de la cavité stomacale en catalysant l'efflux des protons, processus qui est indispensable à la digestion. En retour, elle contre-transporte du potassium (Sachs, 1976).

Pour interpréter cet ion Mg^{2+} , il faut noter que les cristaux « E2.BeF₃ » ont été obtenus en présence de 25 mM de magnésium, une concentration bien supérieure aux concentrations « physiologiques » (au plus de l'ordre du millimolaire). Or, Bishop et Al-Shawi ont naguère proposé que le magnésium pouvait également être un compétiteur du calcium pour la fixation aux sites de transport *depuis le lumen* (Bishop and Al-Shawi 1988), au moins à pH alcalin (*i.e.* en absence de protons pouvant venir occuper les sites de transport). Le site de fixation membranaire du Mg^{2+} vu dans la structure E2.BeF₃ pourrait bien illustrer cette possible compétition Mg^{2+}/Ca^{2+} du côté luminal de l'ATPase, d'autant qu'il semble que le Mg^{2+} , au moins dans cet état « E2P like », ne puisse avoir accès à ce site qu'à partir de ce côté luminal. Notons toutefois que dans cette structure, le magnésium n'interagit pas avec les résidus critiques classiques des sites de fixation du Ca^{2+} (localisés sur les hélices transmembranaires M4, M5, M6 et M8), mais essentiellement avec le glutamate E90 qui se situe sur l'hélice M2.

2. Mise en évidence du rôle du Mg^{2+} dans la fixation du CPA

Les mesures de fluorescence intrinsèque effectuées à l'occasion de nos expériences précédentes consacrées aux différents inhibiteurs membranaires de l'ATPase ont montré un comportement inattendu du CPA : sa sensibilité à la présence de magnésium. Ceci, dont on a déjà vu une conséquence sur la [figure III.01D](#), est montré plus explicitement sur la [figure III.06](#).

Dans une expérience contrôle, on regarde les changements de fluorescence liés à l'addition de magnésium à une ATPase dépourvue de calcium : on retrouve l'augmentation significative de fluorescence qui a été décrite depuis longtemps (Guillain, Gingold et al. 1982) (*panneau A, signal repéré par une ellipse*). Une addition ultérieure de calcium permet de revenir au niveau initial (« Ca₂E1 ») de fluorescence (sans pour autant nous dire si le magnésium a été « chassé » de la protéine).

Si l'on ajoute de la thapsigargine (ou de la BHQ, données non présentées ici) à l'ATPase dépourvue de calcium (*panneau B*), il s'ensuit une diminution brusque de la fluorescence qui illustre l'interaction rapide de l'inhibiteur avec l'enzyme, à la suite de laquelle les additions de magnésium et de calcium restent sans effet (*panneau B, ellipse pointillée*), laissant supposer que le magnésium ne se fixe plus (ou que les tryptophanes ne réagissent plus à sa fixation au domaine cytosolique, voir plus haut, §I.1. et ci-après [figure III.07](#)), pas plus que le Ca^{2+} ne le fait ensuite. De semblables résultats ont déjà été montrés, tant avec la TG qu'avec la BHQ ([figure III.06](#) et figures 3D, 5D et S5C dans (Montigny, Picard et al. 2007) ; voir aussi (Davidson and Varhol 1995) pour la TG et (Khan, Wictome et al. 1995) pour la BHQ).

En revanche, on observe un profil différent avec le CPA (*panneau C*) : l'addition de CPA à l'ATPase dépourvue de calcium donne lieu à une première diminution rapide du signal mesuré, suivie d'une diminution faible et plus lente. Et lorsqu'ensuite on ajoute le magnésium, on observe une nouvelle phase, lente et très significative, de diminution de la fluorescence, qui peut sans doute être attribuée à une augmentation de l'interaction du CPA (ou CPA. Mg^{2+}) avec l'ATPase. Dans le cas du CPA (comme d'ailleurs pour la BHQ), l'inhibition n'est pas complètement irréversible, comme le montre le fait que l'addition finale d'un excès de calcium se traduit par une lente ré-augmentation de fluorescence.

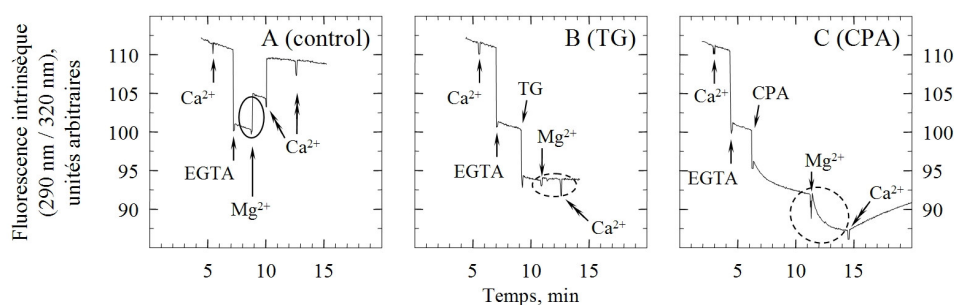


Figure III.06 : La TG inhibe complètement la réponse des tryptophanes à l'addition ultérieure de magnésium ; par contre, en présence de CPA, l'effet du Mg^{2+} semble être d'augmenter l'interaction du CPA avec la protéine. La cuvette du fluorimètre contient $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ de membranes de SR suspendues dans le tampon 150 mM Mops-Tris à $\text{pH } 7$ et 20°C . Les différentes additions sont effectuées comme suit : *panneau A* : $100 \text{ }\mu\text{M}$ de Ca^{2+} , 1 mM d'EGTA, 20 mM de Mg^{2+} puis une ou deux additions de 1 mM de Ca^{2+} . *Panneau B* et *C* : on intercale l'addition d'un inhibiteur entre l'addition d'EGTA et celle de Mg^{2+} : ou bien $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ de TG (*B*), ou bien $0,3 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ de CPA (*C*). La longueur d'onde d'excitation est fixée à 290 nm et celle d'émission à 320 nm , afin d'optimiser la réponse des tryptophanes à l'addition de magnésium (Guillain, Gingold et al. 1982). Les traces ont été corrigées pour les faibles dilutions dues aux différentes additions. Cette figure est adaptée de la figure 5 dans (Montigny, Picard et al. 2007).

Dans l'expérience ci-dessus, la cuvette contenait initialement le Mg^{2+} contaminant inévitablement les milieux et les membranes. Dans une autre expérience, initialement destinée à étudier la fixation d'ATP en présence ou en absence de magnésium, en présence ou en absence d'inhibiteurs, nous avons pu observer l'effet de l'addition du CPA en absence totale de Mg^{2+} (figure III.07).

Dans une expérience contrôle (figure III.07), en présence de magnésium et en absence d'inhibiteur (*panneau A*), des additions croissantes d'ATP conduisent à une augmentation du niveau de fluorescence à partir duquel il est possible d'estimer une affinité de la protéine pour le nucléotide ($K_{d_{Mg,ATP}} \sim 3 \text{ }\mu\text{M}$). En présence d'EDTA (et donc en absence de magnésium, *panneau B*), l'affinité pour le Na_2ATP est de l'ordre de quelques dizaines de micromolaires. En présence de thapsigargine, que ce soit en présence ou non de magnésium (*panneaux C* et *D*), les tryptophanes membranaires ne répondent plus à la fixation de nucléotides (voir fixation de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$, (Montigny, Picard et al. 2007)). En présence de CPA et de Mg^{2+} , les tryptophanes ne répondent plus que de façon lente et limitée à la fixation d'ATP (*panneau E*), alors qu'en présence de CPA mais en absence de Mg^{2+} , les tryptophanes répondent à la fixation d'ATP comme en absence d'inhibiteur (*panneau F*). En outre, alors qu'en présence de magnésium (*panneau E*), on observe de nouveau (comme sur la figure III.06C) une variation en deux temps du niveau de la fluorescence, une première phase rapide suivie d'une seconde phase plus lente, en absence de magnésium (*panneau F*) la phase lente a complètement disparu. Et la phase rapide s'avère être simplement due, dans tous les cas, à un effet de filtre interne du CPA (absorption par le CPA de la lumière excitatrice de la fluorescence des tryptophanes) (voir *Supplemental figures S5C et D* dans (Montigny, Picard et al. 2007)). Il semble donc qu'en absence complète de Mg^{2+} , le CPA ou bien n'interagisse pas avec l'ATPase, ou bien ne modifie en rien l'environnement de ses résidus tryptophanes (les laissant témoigner de la fixation d'ATP), et que ce soit bien la présence de Mg^{2+} qui, au contraire, permette lentement mais sûrement une interaction différente du CPA avec l'ATPase (en tous cas pour les résidus tryptophanes), plus significative bien que réversible lentement.

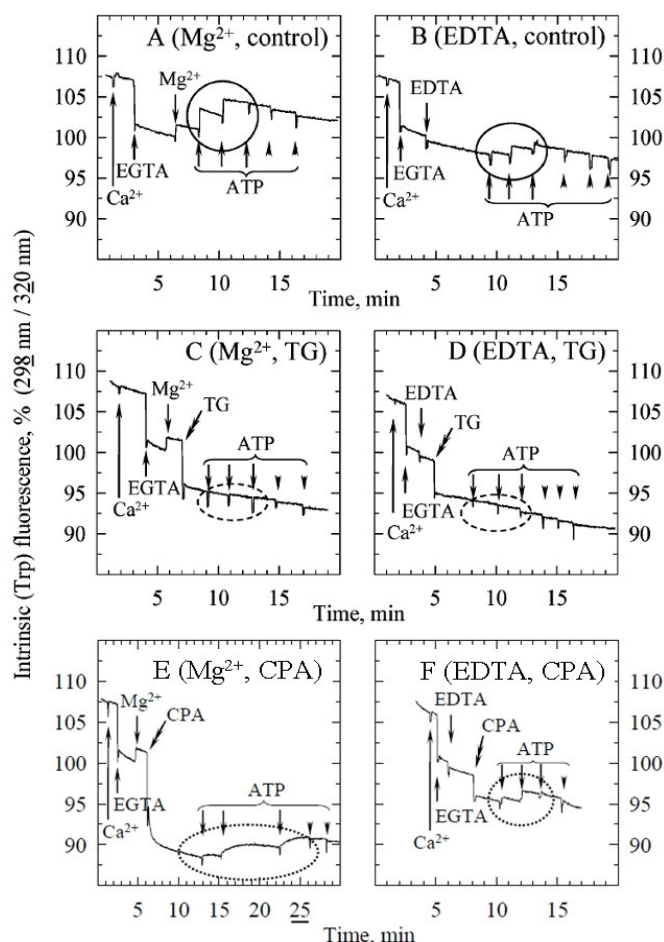


Figure III.07 : La TG et le CPA inhibent complètement la réponse des tryptophanes à l'addition ultérieure de nucléotide ; par contre, une fois encore, en présence de CPA, l'effet du Mg^{2+} semble être d'augmenter l'interaction du CPA avec la protéine. La cuvette du fluorimètre contient $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ de membranes de SR suspendues dans le tampon 150 mM Mops-Tris à $\text{pH } 7$ et 20°C . Les différentes additions sont effectuées comme suit : *panneau A* : $100 \text{ }\mu\text{M}$ de Ca^{2+} , 1 mM d'EGTA, 5 mM de Mg^{2+} puis des additions successives de $3 \text{ }\mu\text{M}$, $30 \text{ }\mu\text{M}$ puis plusieurs fois $300 \text{ }\mu\text{M}$ de Na_2ATP . L'excès de nucléotide permet d'estimer que l'effet de filtre interne est ici minimal (voir [Chap. II](#)). *Panneau B* : la même expérience qu'en A est réalisée en remplaçant le magnésium par une addition de 2 mM d'EDTA suffisante pour chélater le magnésium contaminant apporté par les tampons et la protéine. *Panneaux C à F* : expériences identiques à celles décrites en A et B, sauf que l'on ajoute un inhibiteur après l'addition de Mg^{2+} (C et E) ou d'EDTA (D et F) : ou bien $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ de TG (C et D), ou bien $0,3 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ de CPA (E et F). La longueur d'onde d'excitation est fixée à 298 nm et celle d'émission à 320 nm , afin d'optimiser la réponse des tryptophanes à l'addition de magnésium tout en limitant l'effet de filtre interne relatif aux additions d'ATP ([Guillain, Gingold et al. 1982](#)). Les traces ont été corrigées pour les faibles dilutions dues aux différentes additions. Cette figure est adaptée des figures 6 et S5 dans ([Montigny, Picard et al. 2007](#)).

L'une des hypothèses possibles, que nous avons proposée dans notre article, serait qu'un complexe CPA.Mg^{2+} puisse se fixer plus efficacement que le CPA seul. La publication récente d'une nouvelle structure obtenue en présence de CPA a apporté une magnifique confirmation de cette hypothèse. Prévenus de nos observations, les auteurs ont choisi d'utiliser du manganèse à la place du magnésium durant la cristallogénèse en présence de CPA de l'ATPase dépourvue de Ca^{2+} (« E2.AMPPCP ») : Le manganèse est un possible compétiteur du calcium et du magnésium pour la fixation à l'ATPase ([Chiesi and Inesi 1980](#)), mais en cristallographie il présente surtout l'avantage d'avoir un plus grand nombre d'électrons que le calcium et surtout que le magnésium, ce qui va donner des signaux plus intenses de diffraction des rayons X et, à certaines longueurs d'onde pour les rayons X incidents, un signal de « diffusion anormale » permettant de repérer le centre métallique diffuseur. La structure obtenue montre ainsi sans ambiguïté l'existence d'un site de fixation du manganèse (et donc très certainement de fixation du magnésium dans les conditions ordinaires) qui contribue à la fixation des groupes acides du CPA ([figure I.19B](#) rappelée ci-après et renommée [III.08](#). et ([Laursen, Bublitz et al. 2009](#))) : ce

résultat est directement cohérent avec les signaux de fluorescence que nous avons observés (figure III.06 & 07), ainsi qu'avec des résultats plus anciens (mais dont nous n'avions pas connaissance) montrant l'existence de complexes metal.CPA (Ca^{2+} et Mg^{2+} , (Steyn and Rabie 1976) ; Cu^{2+} , Ni^{2+} et Fe^{3+} , (Lebrun, Duvert et al. 1985)).

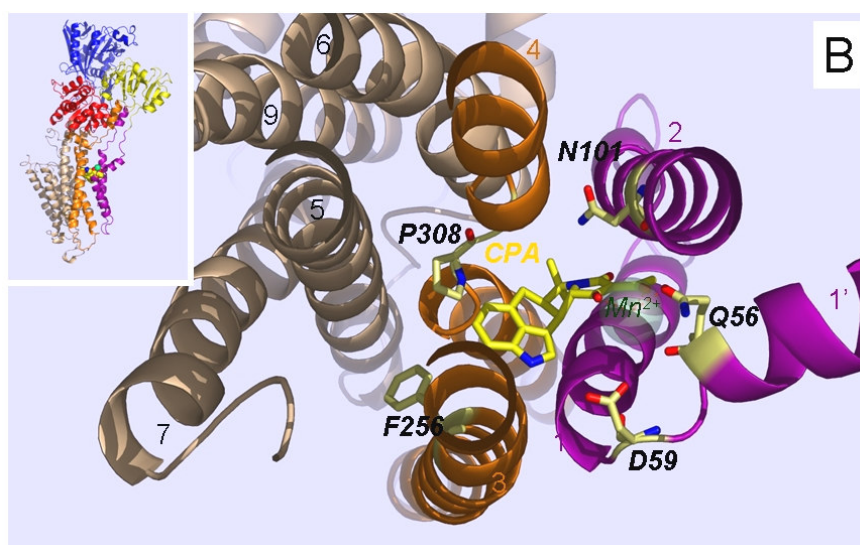


Figure III.08 : Un ion Manganèse dans le site de fixation de l'acide cyclopiazonique (CPA) de la structure « E2.CPA.AMPPCP.MgF₄ » (PDB #3FGO, (Laursen, Bublitz et al. 2009)). Le domaine membranaire ici représenté est observé depuis le cytosol, selon un axe perpendiculaire à la membrane (le domaine cytosolique a été masqué). Les hélices transmembranaires M1 à M9 sont visibles et annotées de 1 à 9, ainsi que la partie 1' de M1 orientée dans un plan parallèle à la membrane dans ces conformations (M1 et M2 en violet, M3 et M4 en orangé, M5 à M10 en blanc). Les chaînes latérales des acides aminés sont indiquées en gras et italique, et les atomes sont colorés comme suit, (en rouge pour les oxygènes, bleu pour les azotes et blanc pour les carbones). L'inhibiteur CPA est indiqué en orange et coloré selon le même code couleur avec cependant les carbones en jaune. Le CPA se place entre les hélices M1 à M4 et bloque la protéine en structurant un réseau de liaisons hydrogènes, *via* des molécules d'eau, avec les résidus asparagine N101, glutamine Q56 et aspartate D59. La surprise de cette structure a été de montrer la présence d'un ion manganèse (en vert, symbolisé par une sphère semi-transparente), présent au centre de ce réseau d'interaction.

Cette figure est une répétition de la figure I.19, ajoutée ici pour faciliter la lecture du texte.

Les ligands de l'ATPase qui fixent le Mg^{2+} complexé au CPA ont-ils une signification fonctionnelle, en absence de cet inhibiteur ?

Rappelons que depuis l'obtention en 2004 d'une structure en présence d'ADP et d' AlF_4 montrant que la formation du dérivé phosphorylé E1P entraîne l'obstruction du « passage » entre M1 et M2 qui permet normalement de « voir » les sites de transport depuis le cytosol, tout porte à croire que « l'entrée » du calcium vers ses sites de transport sur la protéine se ferait *via* ce passage (voir figure III.09, adaptée d'après (Sorensen, Møller et al. 2004)) : dans la forme « $\text{Ca}_2\text{.E1}$ », on peut apercevoir le calcium et les résidus du site II depuis la membrane (*image de gauche, au centre du domaine, en rouge et vert*), alors qu'on ne le peut plus dans la forme « $\text{Ca}_2\text{.E1.ADP.AIF}_4$ » (*image de droite*). Le passage de l'état « $\text{Ca}_2\text{.E1}$ » à « $\text{Ca}_2\text{.E1.ADP.AIF}_4$ » passe par une réorganisation des hélices M1 à M4 qui « remontent » et viennent positionner de nombreux résidus hydrophobes (*en jaune*) devant l'accès aux sites, pour les « occlure ». Or ceci se produit juste au niveau du site de fixation du manganèse observé dans la structure « E2.CPA » de Laursen *et al.* (la position de Q56 est indiquée sur l'*image de gauche*, la position de D59 est indiquée sur l'*image de droite*) (Laursen, Bublitz et al. 2009).

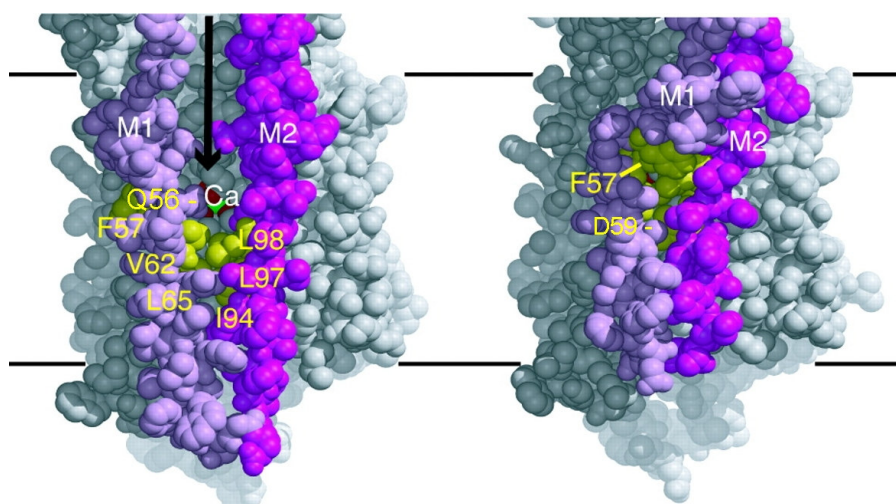


Figure III.09 : Voie d'accès supposée des ions calcium aux sites de transport, depuis le cytosol. Les domaines membranaires des ATPases cristallisées en « Ca₂.E1 » (à gauche, (Toyoshima, Nakasako et al. 2000)) et en « Ca₂.E1.ADP.AIF₄ », l'analogue structural de la forme « Ca₂.E1-P.ADP » (à droite, (Sorensen, Møller et al. 2004)), sont représentés avec les atomes en surface pleine. Les hélices M1 et M2 sont respectivement colorées en rose pâle et magenta, le reste du domaine membranaire étant en grisé. Les acides aminés du site de transport I, colorés en rouge, coordonnent le calcium, en vert. Les acides aminés hydrophobes, colorés en jaune, sont probablement impliqués dans « l'occlusion » du calcium dans cette forme de l'ATPase. La flèche noire indique la position de l'entrée de l'accès supposé aux sites de transport. Cette figure est adaptée de (Sorensen, Møller et al. 2004).

L'ensemble de ces résultats suggère que le site métallique qui contribue à la fixation du complexe CPA.Mg²⁺ ou encore CPA.Mn²⁺ pourrait bien, en absence de CPA, être un site « d'approche » des cations divalents vers les sites de transport. Ce site serait situé à l'interface cytosol-membrane, à près de 20 Å des résidus du site de transport II lui-même.

PS : En 2004, nous avons également montré que le magnésium était susceptible de se fixer dans cette région (Montigny, Jaxel et al. 2004) : la réalisation de coupures oxydatives en présence de Fe²⁺ (d'eau oxygénée et d'ascorbate ; « Réaction de Fenton ») avait donné lieu à des coupures dans l'hélice transmembranaire M3, au environ des résidus E255 et L260. Malheureusement, les sites de clivage n'avaient pu être déterminés précisément (ils n'étaient estimés qu'à partir des masses apparentes des fragments peptidiques sur gel SDS-PAGE), ce qui ne permettait donc pas de positionner précisément l'atome de fer et par conséquent le site potentiel de fixation d'un magnésium. Dans la structure « E2.CPA.Mn²⁺ », dont le domaine membranaire à un repliement identique à celui de la forme « E2.TG », le manganèse se situe à environ 7.5 Å des résidus anioniques les plus proches dans M3 (D254 et Q250). Si l'on suppose une fixation du Fe²⁺ au niveau d'un site équivalent à celui de Mn²⁺, cette distance de 7.5 Å est compatible avec le positionnement en sus d'une molécule d'eau oxygénée, nécessaire à la réaction de Fenton, pour donner une espèce réactive de l'oxygène qui irait « attaquer » l'hélice M3.

**MANUSCRIPT #1 : INHIBITORS BOUND TO Ca^{2+} -FREE
SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} -ATPASE LOCK ITS
TRANSMEMBRANE REGION BUT NOT NECESSARILY ITS
CYTOSOLIC REGION, REVEALING THE FLEXIBILITY OF
THE LOOPS CONNECTING TRANSMEMBRANE AND
CYTOSOLIC DOMAINS**

Montigny C, Picard M., Lenoir G., Gauron C.,
Toyoshima C. and Champeil P

Biochemistry 2007, 46 : 15162-15174.

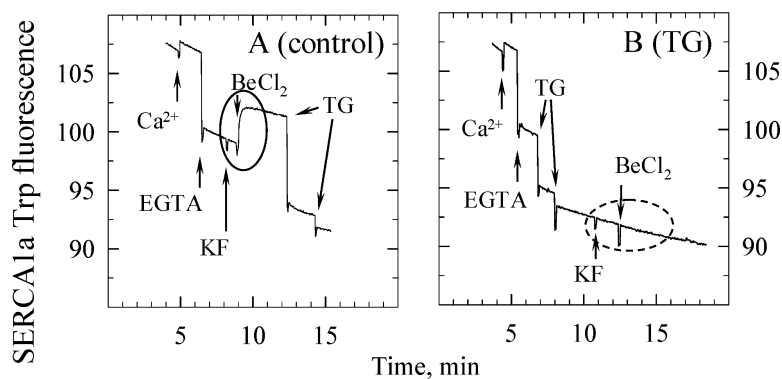
Article

Inhibitors Bound to Ca-Free Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase Lock Its Transmembrane Region but Not Necessarily Its Cytosolic Region, Revealing the Flexibility of the Loops Connecting Transmembrane and Cytosolic Domains

Cdric Montigny, Martin Picard, Guillaume Lenoir, Carole Gauron, Chikashi Toyoshima, and Philippe Champeil

Biochemistry, 2007, 46 (51), 15162-15174 • DOI: 10.1021/bi701855r

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on January 23, 2009



More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Links to the 1 articles that cite this article, as of the time of this article download
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

[View the Full Text HTML](#)



ACS Publications
High quality. High impact.

Inhibitors Bound to Ca^{2+} -Free Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} –ATPase Lock Its Transmembrane Region but Not Necessarily Its Cytosolic Region, Revealing the Flexibility of the Loops Connecting Transmembrane and Cytosolic Domains[†]

Cédric Montigny,^{‡,§} Martin Picard,^{‡,§,||} Guillaume Lenoir,^{‡,§,⊥} Carole Gauron,^{‡,§} Chikashi Toyoshima,[▽] and Philippe Champeil^{*,‡,§}

CNRS, URA 2096 (Protéines Membranaires Transductrices d'Énergie), F-91191 Gif-sur-Yvette, France, CEA, iBiTecS (Institut de Biologie et Technologies de Saclay), F-91191 Gif-sur-Yvette, France, and Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

Received September 11, 2007; Revised Manuscript Received October 16, 2007

ABSTRACT: Ca^{2+} -free crystals of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} –ATPase have, up until now, been obtained in the presence of inhibitors such as thapsigargin (TG), bound to the transmembrane region of this protein. Here, we examined the consequences of such binding for the protein. We found that, after TG binding, an active site ligand such as beryllium fluoride can still bind to the ATPase and change the conformation or dynamics of the cytosolic domains (as revealed by the protection afforded against proteolysis), but it becomes unable to induce any change in the transmembrane domain (as revealed by the intrinsic fluorescence of the membranous tryptophan residues). TG also obliterates the Trp fluorescence changes normally induced by binding of MgATP or metal-free ATP, as well as those induced by binding of Mg^{2+} alone. In the nucleotide binding domain, the environment of Lys⁵¹⁵ (as revealed by fluorescein isothiocyanate fluorescence after specific labeling of this residue) is significantly different in the ATPase complex with aluminum fluoride and in the ATPase complex with beryllium fluoride, and in the latter case it is modified by TG. All these facts document the flexibility of the loops connecting the transmembrane and cytosolic domains in the ATPase. In the absence of active site ligands, TG protects the ATPase from cleavage by proteinase K at Thr²⁴²–Glu²⁴³, suggesting TG-induced reduction in the mobility of these loops. 2,5-Di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene or cyclopiazonic acid, inhibitors which also bind in or near the transmembrane region, also produce similar overall effects on Ca^{2+} -free ATPase.

Sarcoplasmic reticulum (SR)¹ Ca^{2+} –ATPase (SERCA1a) is an ion pump belonging to the family of P-type ATPases, responsible in muscle cells for active transport of Ca^{2+} from the cytosol into the sarcoplasmic reticulum lumen (see, e.g., refs 1–6 for review): the resulting reduction of the cytosolic free Ca^{2+} concentration triggers muscle relaxation. This

active transport requires ATP hydrolysis as the energy source, and its catalytic cycle has been studied at length. At some step during ATP hydrolysis, the pump's affinity for Ca^{2+} changes from high to low, coupled with topological reorientation of the binding sites from one side of the membrane to the other (with intermediate “occluded” species). The catalytic cycle comprises transitions between various intermediates, some of which are phosphorylated (hence the name of the “P-type” family) at a critical aspartate residue in the catalytic site (e.g., the so-called $\text{Ca}_2\cdot\text{E1P}$ or E2P forms). In 2000, the detergent-solubilized purified ATPase was crystallized in the presence of Ca^{2+} , and in subsequent years other forms of the ATPase, thought to be fair analogues of various catalytic intermediates, were also obtained, allowing elucidation of the main structural features required for ATP-driven ion pumping (7–18).

However, the traditional question of the extent to which crystalline structures reflect the more dynamic structures of an enzyme during its catalytic cycle can of course be raised (see, e.g., refs 19 and 20). This is especially the case for the structures obtained in the absence of Ca^{2+} , as the crystals corresponding to these forms have been obtained, until now, by compensating the instability of detergent-solubilized ATPase in the absence of Ca^{2+} (see, e.g., refs 21–24) by the addition of inhibitors (such as those mentioned in refs

[†] We thank the Human Frontier Science Program Organization for support, Grant RGP 0060/2001-M.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 33-1-6908-3731. Fax: 33-1-6908-8139. E-mail: philippe.champeil@cea.fr.

[‡] CNRS.

[§] CEA.

^{||} Present address: Laboratoire de Cristallographie & RMN Biologiques, CNRS UMR 8015 and Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France.

[⊥] Present address: Department of Membrane Enzymology, Bijvoet Center and Institute of Biomembranes, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands.

[▽] University of Tokyo.

¹ Abbreviations: SR, sarcoplasmic reticulum; ATPase, adenosine triphosphatase; E2 and E1, nonphosphorylated forms of Ca^{2+} –ATPase; E2P and E1P, phosphorylated forms of Ca^{2+} –ATPase, respectively ADP-insensitive or ADP-sensitive; TG, thapsigargin; BHQ, 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene; CPA, cyclopiazonic acid; prK, proteinase K; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; EGTA, [ethylenedis(oxyethylenetri)]tetraacetic acid; Mops, 4-morpholinepropanesulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; Mes, 4-morpholineethanesulfonic acid; FITC, fluorescein 5-isothiocyanate.

25–27). Note that crystals of a given form of Ca^{2+} -free ATPase obtained in the presence of different inhibitors (thought to act on the protein similarly) reveal slightly different structures (15–17). In a previous work, we have shown that adding inhibitors such as thapsigargin (TG), 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene (BHQ), or cyclopiazonic acid (CPA) to Ca^{2+} -free ATPase complexed with BeF_x (a transition-state analogue of “E2P”) indeed prevents the ATPase Ca^{2+} binding pocket from opening toward the lumen, in contrast with what is considered to happen with the “normal” E2P form, and with the unfortunate consequence that, in the presence of such inhibitors, we may never be able to obtain crystals showing the ATPase structure with an *open* Ca^{2+} release pathway from the transport sites toward the lumen (28).

In the present work, we further document the effects of TG, BHQ, and CPA on Ca^{2+} -free ATPase. By monitoring the fluorescence changes occurring either in one of the cytosolic domains or within the transmembrane domain (thanks to a fluorescein label attached to Lys⁵¹⁵ in the nucleotide binding domain or to the ATPase intrinsic tryptophan residues, respectively) upon addition of specific ligands such as fluoride, vanadate, Mg^{2+} , or ATP, we now show that the presence of TG or related inhibitors *fixes* the structure of the ATPase *transmembrane domain* and prevents it from experiencing the changes which would normally have occurred in the absence of the inhibitor, *without necessarily* preventing binding events in the cytosolic domains from occurring. This is presumably a consequence of the likely *flexibility* of the loops connecting the A-domain and the transmembrane part of the ATPase and probably explains why the various structures previously described for crystalline Ca^{2+} -free ATPase forms have all been found to be very similar in their transmembrane domains, irrespective of the bound ligands and conformations in their cytosolic domains. By monitoring the proteolytic susceptibility of a loop intervening between the ATPase transmembrane and cytosolic domains, we also document the effect of the inhibitors on the protein average structure or dynamics.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. TG (the stock solution was 1 mg/mL in DMSO, i.e., about 1.5 mM) was from VWR International (no. 586005, Fontenay-sous-bois, France), BHQ (the stock solution was 22 mg/mL in DMSO, i.e., 100 mM) was from Aldrich (no. 11,297-6, Saint Quentin Fallavier, France), and CPA (the stock solution was 10 mg/mL in DMSO, i.e., about 30 mM) was from Sigma (no. C1530, Saint Quentin Fallavier, France). Proteinase K (the stock solutions were 6 or 1.5 mg/mL in 10 mM Tris–Cl, pH 7.4) was from Roche Diagnostics (no. 745723, Meylan, France).

Proteolysis by Proteinase K. For controlled proteolysis, SR membrane vesicles (prepared as in refs 28 and 29) were treated with proteinase K (prK) under conditions described in the corresponding figure captions. As previously (30, 31), proteolysis was stopped by adding 0.5–1 mM PMSF to the samples and transferring them on ice for at least 10 min. After proteolysis arrest, the samples were diluted 10-fold into a 4 M urea-containing denaturation buffer (otherwise as described in ref 32) and boiled for 60 s, and aliquots were loaded onto an SDS–PAGE Laemmli gel (33) prepared in

the presence of 1 mM Ca^{2+} (8–12% acrylamide, as needed). Depending on the experiment and on the desired level of response linearity, 4 or 2 μg of protein was loaded per lane; after Coomassie Blue staining, the intensity of the individual peptide bands was deduced from gel scanning. The electrophoresis miniprotein 2 supply, the GS700 densitometer, and Molecular Analyst and Quantity One software were provided by Bio-Rad SA (Marnes-la-Coquette, France); low molecular weight (LMW) markers were from GE Healthcare (Vélizy, France).

Fluorescence Measurements. Fluorescence measurements were carried out with a SPEX Fluorolog spectrofluorometer provided by Horiba/Jobin-Yvon (Longjumeau, France). The intrinsic fluorescence of the ATPase was recorded with excitation and emission wavelengths set at 290 nm (or 298 nm; see the figure captions) and 330 nm (or 320 nm), respectively (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively), with SR membranes at 0.1 mg/mL protein in a thermostated and continuously stirred cuvette (see, e.g., ref 19). Extrinsic fluorescence of FITC-labeled SR membranes (suspended at 0.02 mg/mL protein) was also recorded (ATPase labeling with FITC had been performed as described (34), except that FITC had been initially diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) instead of dimethylformamide); excitation and emission wavelengths were then set at 495 and 520 nm (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively).

Filtration Measurements. SR membranes were first suspended at 0.1 mg/mL protein, with or without inhibitors (TG at 1 $\mu\text{g/mL}$ (about 1.5 μM), CPA at 0.3 $\mu\text{g/mL}$ (about 1.35 μM), or BHQ at 30 μM), in a Ca^{2+} -free buffer in the presence or absence of Mg^{2+} at pH 7 and 20 °C (see the figure captions). Then, at time zero, 30 μM [γ -³²P]ATP together with 300 μM [³H]glucose was added from a concentrated solution (already containing the two isotopes). After various periods, aliquots (2.5 mL, i.e., about 0.25 mg of protein) were loaded onto two HA filters (Millipore, no. HAWP02500, Saint Quentin en Yvelines, France) on top of each other, under vacuum. The two filters, without rinsing, were counted individually in a scintillation counter, with [³H]-glucose in each filter serving as a marker of the background unbound ATP (trapped in this filter together with the wetting volume). In the upper filter, unbound ATP was subtracted from the total ATP, to give the amount of ATP bound specifically to the ATPase. The lower filter served to check that SR membranes were adsorbed onto the upper filter only (see, e.g., ref 28 or 34 for related filtration experiments).

RESULTS

Effects of TG or Other Inhibitors on “E2P-Related” Forms of Ca^{2+} -Free ATPase: Proteolysis and Intrinsic Fluorescence Experiments. In a remarkable series of papers, Danko and colleagues previously demonstrated that Ca^{2+} -free ATPase becomes fully resistant to proteolysis by proteinase K after formation of E2P-related species from either orthovanadate or fluoride complexes (or, to some extent, from phosphate itself) (35, 36). These authors also mentioned that protection by such phosphate analogues was still observed in the presence of TG. As a preliminary check, we repeated those experiments under our own favorite conditions (Supplemental Figure S3 in ref 28) for forming E2P-like species, i.e., at pH 7 in the presence of KCl and the additional

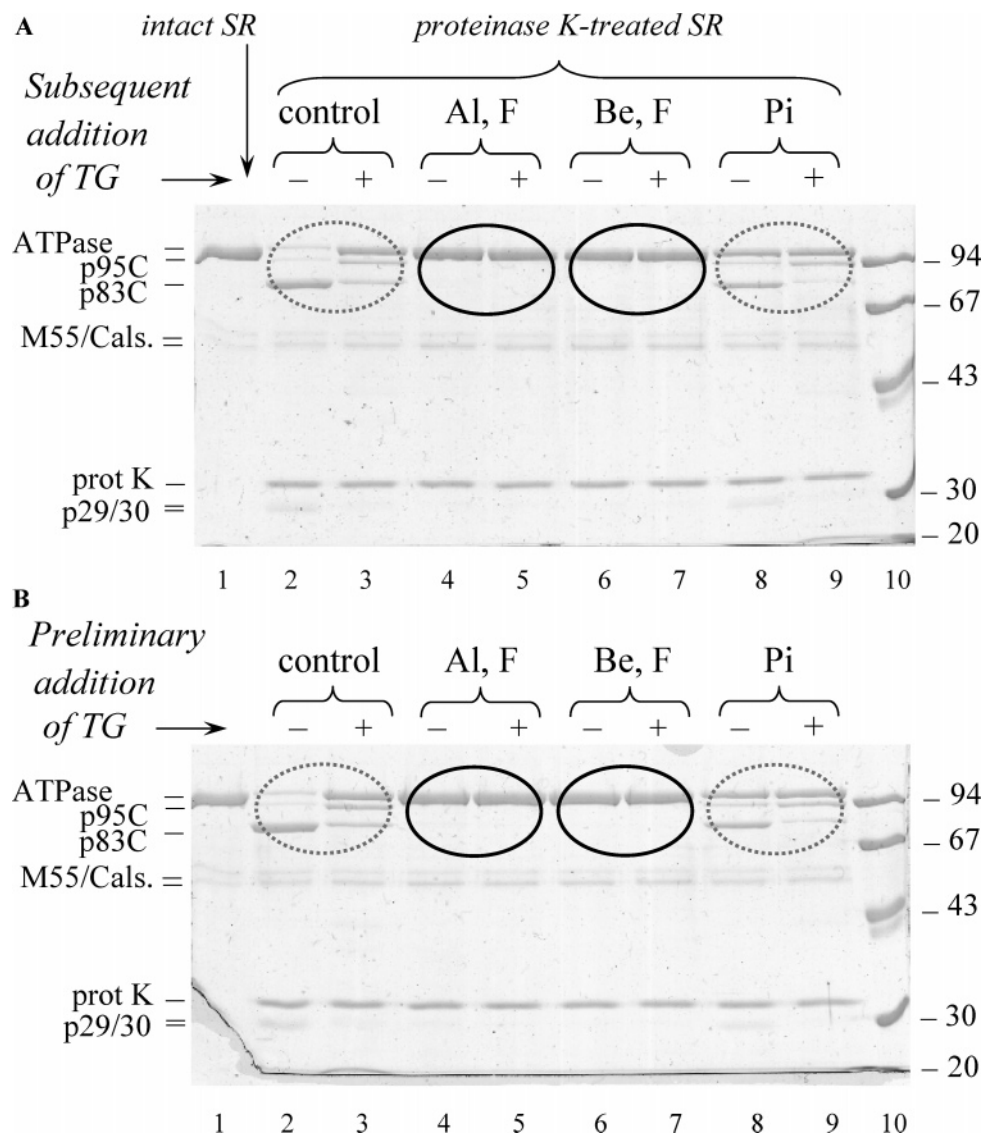


FIGURE 1: Fluoride-containing E2P-like forms (but not E2P itself) are fully protected from cleavage in the presence of TG *irrespective* of whether TG has been added after or before the fluoride salt, implying that the prior presence of TG does *not* prevent the ATPase from reacting with the fluoride compound. (A) SR membranes (1 mg of protein/mL) in 100 mM KCl, 20% DMSO, 150 mM Mops–Tris, 0.5 mM EGTA, and 5 mM Mg^{2+} at pH 7 and 20 °C were incubated in the absence (lanes 2 and 3) or presence of various additions: 0.05 mM $AlCl_3$ and 1 mM KF (lanes 4 and 5), 0.05 mM $BeCl_2$ and 1 mM KF (lanes 6 and 7), or 2 mM P_i (lanes 8 and 9). Incubation lasted 5–10 min. Similar incubations in the presence of KF and Mg^{2+} alone, KF in the absence of free Mg^{2+} , $BeCl_2$ without KF, or orthovanadate are shown in Figure S1 of the Supporting Information. Then, TG (0.01 mg/mL) was added to some of these samples (lanes 3, 5, 7, and 9) for 5–10 min of incubation again. Last, proteinase K was added to all samples, at 0.3 mg/mL, and proteolysis took place for 60 min. (B) Similar experiment, except that TG was added first to the Ca^{2+} -deprived SR membranes, followed after 5–10 min by fluoride (together with Al or Be) or P_i and only then, 5–10 min later, by proteinase K. In both cases, after proteolysis arrest and sample denaturation, 2 μ g of protein per lane was loaded for SDS–PAGE, here on a 9% acrylamide gel. Lanes 10 contain molecular mass markers (LMW Pharmacia kit). Lanes 1 contain intact SR (2 μ g of protein per lane, again) in the absence of proteinase K.

presence of 20% DMSO, known to stabilize formation of E2P from P_i (37).

The results illustrated in Figure 1A extend the previous results of Danko et al. to these experimental conditions and show that the ATPase indeed becomes fully resistant to proteinase K after reacting with aluminum or beryllium fluoride (a few other incubation conditions, e.g., with magnesium fluoride or vanadate, are illustrated in Figure S1 of the Supporting Information) and remains so if TG is added subsequently. TG binding under these conditions is proven by its inhibitory effect on Ca^{2+} binding to the luminal side of the ATPase (28) and also by its effects on fluorescence levels, as shown below. We also confirmed under the same conditions the more modest protective effect of P_i itself

(despite the fact that, thanks to the presence of DMSO, P_i addition here allows almost full phosphorylation), as well as the fact that this effect of P_i was disrupted by TG (35, 36). This more modest protective effect and its subsequent disruption by TG are obviously due to the dynamic nature of the E2 to E2P equilibrium, combined with the fact that TG reduces the extent of the reaction of E2 with P_i (25, 27, 38). Most importantly for our purpose, we then found that the blockade of ATPase proteolysis was independent of whether TG had been added after or *before* the fluoride salt (as shown by the identical results in panels A and B of Figure 1). This implies that the prior presence of TG does *not* prevent the cytoplasmic domains of ATPase from reacting with aluminum or beryllium fluoride in a subsequent step.

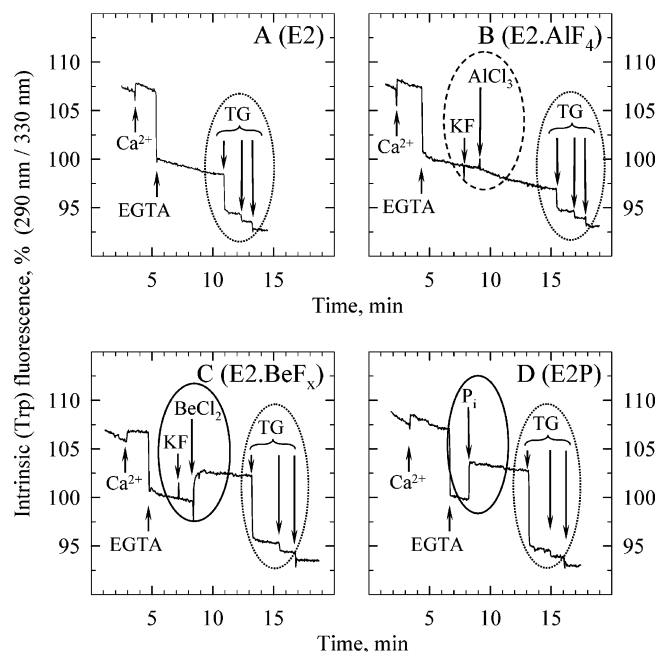


FIGURE 2: In contrast with what happens upon formation of E2·AlF₄ (or E2·MgF₄), formation of E2·BeF_x or E2P raises Trp fluorescence. Further addition of TG reduces it, much more for E2·BeF_x or E2P than for E2·AlF₄ or E2, so that the final levels are similar. The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/mL SR in 100 mM KCl, 20% DMSO, 5 mM Mg²⁺, and 50 mM Mops–Tris at pH 7 and 20 °C. Sequential additions were made, when indicated by arrows: Ca²⁺ (100 μM) and EGTA (2 mM) (in all panels), KF (1 mM) and AlCl₃ (B) or BeCl₂ (C) (both at 50 μM) or P_i (2 mM) (D), and last TG (1 μg/mL each addition, in all panels). The excitation wavelength was 290 nm, and the emission wavelength was 330 nm (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively). In the various panels, the first addition of TG saturates the ATPase (1 μg/mL TG corresponds to about 1.5 μM TG, whereas 0.1 mg/mL SR corresponds to 0.5–0.7 μM ATPase), while each further addition induces an additional small quenching of fluorescence, mainly due to an inner filter effect (see also refs 25 and 36). The traces have been corrected for the (very small) artifacts induced by dilution.

From the results in ref 28 we know that adding TG (or other inhibitors) to Ca²⁺-free ATPase after the formation of ATPase complexes with metal fluoride prevents the normal opening of the Ca²⁺ binding sites toward the luminal medium. To further characterize this influence of inhibitors on the ATPase transmembrane domain, we studied the consequences of TG addition on the ATPase intrinsic fluorescence, a fluorescence due to Trp residues mainly located (12 out of 13) in the transmembrane section of the ATPase. Related experiments performed in the absence of DMSO have previously been reported (36, 28), but thanks to the presence of DMSO we were here able to directly compare “E2P-like” species, formed from fluoride salts, with the “true” E2P species itself, formed from P_i. Formation of the transition-state analogue E2·AlF₄ (from KF and AlCl₃) only led to a slight relatively slow fluorescence decrease (Figure 2B), as previously found in the absence of DMSO (28). In contrast, the intrinsic fluorescence level of the ATPase rose, *both* when the E2P phosphoenzyme was formed from P_i (Figure 2D) and when the E2·BeF_x analogue was formed from KF and BeCl₂ (Figure 2C). This confirms the previous conclusion that, from the Trp fluorescence point of view, the E2·BeF_x species is a much closer relative to

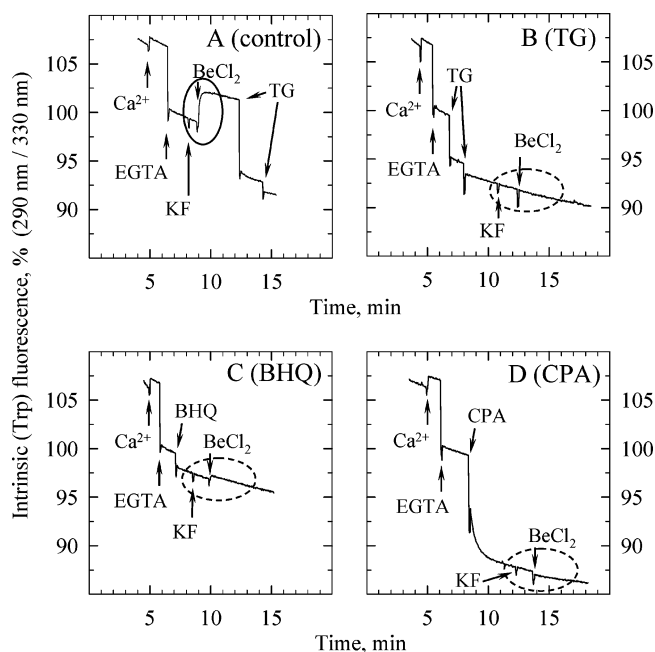


FIGURE 3: ATPase preincubation with TG, CPA, or BHQ (with poor affinity for the latter inhibitor) prevents the membranous Trp residues from experiencing fluorescence changes following formation of E2·BeF_x. The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/mL SR in 100 mM KCl, 20% DMSO, 5 mM Mg²⁺, and 50 mM Mops–Tris at pH 7 and 20 °C, as for the experiment illustrated in Figure 2. Sequential additions were made, when indicated by arrows: Ca²⁺ (100 μM) and EGTA (2 mM) (in all panels) and then KF (1 mM) and BeCl₂ (50 μM) directly (A), TG (1 μg/mL, i.e., about 1.5 μM, twice) followed by KF and BeCl₂ (B), BHQ (30 μM) followed by KF and BeCl₂ (C), or CPA (0.3 μg/mL, i.e., about 1 μM) followed by KF and BeCl₂ (D). As for the experiment illustrated in Figure 2, the excitation wavelength was 290 nm and the emission wavelength was 330 nm (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively). The traces have been corrected for the (very small) artifacts induced by dilution.

the true E2P state than the E2·AlF₄ transition-state analogue (28, 36).

Figure 2 then also shows the effect of TG addition to these various species: TG addition reduced the ATPase intrinsic fluorescence level much more for E2·BeF_x or E2P than for E2·AlF₄ or E2, so that the final levels were not very different. Because of our proteolysis results in Figure 1, we can interpret the rather similar final fluorescence levels in the absence or presence of P_i (Figure 2A,D) as simply reflecting the quasi-disappearance of E2P in the presence of TG; however, the again similar final fluorescence level in Figure 2C implies that TG addition to the ATPase complex with BeF_x has modified the transmembrane region of this complex, to make it closely resemble that of the fluoride-free complex (consistent with closure of the Ca²⁺ release channel), *despite the fact* that BeF_x is *not* displaced from the cytoplasmic domains by TG.

Conversely, and to make this even more clear-cut, Figure 3 shows the result of a complementary experiment where TG was added from the start and BeF_x was added at a later step only: after the prior addition of TG, subsequent addition of fluoride and beryllium no longer induced *any* change in Trp fluorescence (Figure 3B; compare with Figure 3A), although from Figure 1B we know that susceptibility to proteolysis by proteinase K is fully blocked and hence

reaction with the fluoride compound *has* occurred. In other words, upon reaction of BeF_x with the ATPase catalytic site, the transmembrane region of the ATPase complex with TG, at least as evidenced by the Trp residues, has *not* experienced any change, although one of the loops connecting the transmembrane and the cytosolic domains *has* experienced a drastic change. Similar results were obtained after reaction of ATPase with aluminum fluoride, with the same conclusion (data not shown). These results make it possible to understand that previous crystals of Ca^{2+} -free ATPase complexed with TG and fluoride salts revealed transmembrane domains pretty similar to those in the absence of fluoride, *despite* the fact that the cytosolic domains were different (8, 12, 13): TG fixes the ATPase transmembrane domain irrespective of what happens in the cytosolic domains following binding of the fluoride compound (AlF_4 or MgF_4 in previously published crystalline forms) and thereby may mask part of the information that would have been derived from inhibitor-free crystals.

Almost similar results were obtained using other well-characterized inhibitors of Ca^{2+} -ATPase, instead of TG, either BHQ or CPA (Figure 3C,D). In the case of BHQ, however, concentrations of BHQ much larger than stoichiometric (30 μM in Figure 3C) were required to prevent fluorescence changes upon addition of BeF_x almost completely (2 μM BHQ hardly changed anything, data not shown). This fits with the relatively poor affinity with which under similar conditions BHQ was found to prevent luminal opening of the Ca^{2+} binding sites (28). In contrast, and again consistent with the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements in (28), CPA was effective at 1 μM ; in this case, the fluorescence recording suggests that the binding of CPA (or the resulting blockade of transmembrane segment movements) is not instantaneous, but requires a few minutes of incubation (see also below). For both BHQ and CPA, addition of the inhibitor resulted in an apparent drop in Trp fluorescence, while as for TG, subsequent additions induced smaller drops (not shown). This is because all these inhibitors have a dual effect on ATPase intrinsic fluorescence: they perturb it by binding to the ATPase and simultaneously induce inner filter effects due to their own absorbance in the UV region (data not shown). BHQ also has some weak fluorescence itself, which counterbalances in part the inner filter effect and complicates more detailed analysis (data not shown).

Effects of TG or Other Inhibitors on a Reporter Group (Fluorescein) at Lys^{515} in the Nucleotide Binding Domain. From the above results, we concluded that in the presently available crystals where Ca^{2+} -free ATPase is complexed with AlF_4 or MgF_4 and TG, TG has probably driven the ATPase transmembrane domain into a fixed state irrespective of what had happened in the cytosolic domains following binding of the fluoride compound (see, e.g., refs 8, 12, and 13). One question, then, is to which extent, in these crystals, TG could have altered the organization of the cytosolic domains too, despite the fact (Figure 1) that ATPase reaction with the fluoride compound had remained possible. To address this issue, we explored the response to the addition of TG of an extrinsic label located in the cytosolic region, namely, FITC bound at Lys^{515} in the nucleotide binding domain. TG has already been reported to block the FITC fluorescence changes induced by Ca^{2+} addition or removal, but reports of the effect of TG per se on FITC fluorescence are scarce in the literature

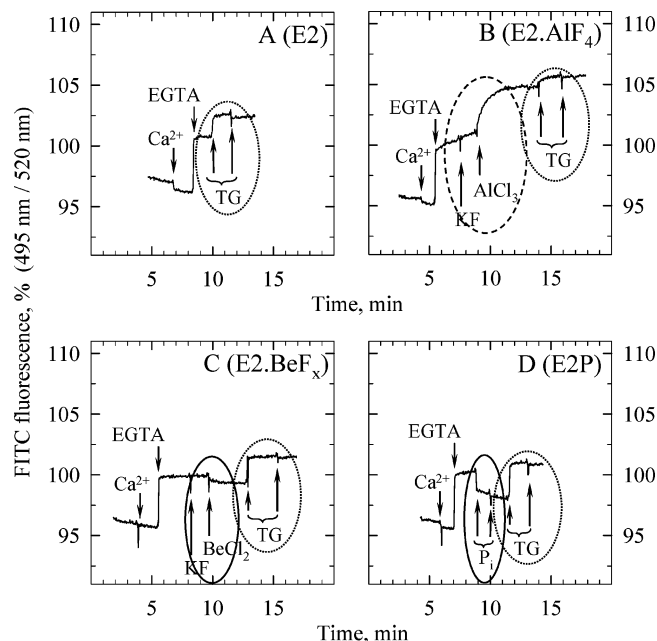


FIGURE 4: In $\text{E2}\cdot\text{BeF}_x$ (or E2P), the fluorescence of FITC bound to Lys^{515} differs from that in $\text{E2}\cdot\text{AlF}_4$ (or $\text{E2}\cdot\text{VO}_4$, not shown). FITC fluorescence hardly responds to TG addition to $\text{E2}\cdot\text{AlF}_4$ (or $\text{E2}\cdot\text{VO}_4$) but responds quite significantly to TG addition to $\text{E2}\cdot\text{BeF}_x$. The fluorometer cuvette contained 0.02 mg/mL FITC-SR in 100 mM KCl, 20% DMSO, 5 mM Mg^{2+} , and 150 mM Mops-Tris at pH 7 and 20 °C. Sequential additions were made, when indicated by arrows: Ca^{2+} (20 μM) and EGTA (0.2 mM) (in all panels), KF (1 mM) and AlCl_3 (B) or BeCl_2 (C) (both at 50 μM) or P_i (2 mM, followed by another identical addition of 2 mM) (D), and TG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each addition, in all panels). The excitation wavelength was 495 nm, and the emission wavelength was 520 nm (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively). In the various panels, the first addition of TG saturates the ATPase. The traces have been corrected for the (small) artifacts induced by dilution. Effects of TG addition to the $\text{E2}\cdot\text{VO}_4$ species are shown in Supporting Information Figure S2.

(see, e.g., refs 25 and 66).

As a preliminary result, under the exact same conditions as those documented above, i.e., in the presence of DMSO and KCl at pH 7, Figure 4 first shows the previously undocumented fact that the response of FITC fluorescence to ATPase reaction with BeF_x is a drop in FITC fluorescence (Figure 4C), similar in sign to its response to ATPase reaction with P_i (Figure 4D, a previously undocumented drop too), whereas ATPase reaction with AlF_4 triggers a response of opposite sign (Figure 4B, a rise in FITC fluorescence, rather similar to that classically observed (39) upon ATPase reaction with another putative transition state, orthovanadate; see Supporting Information Figure S2A). Thus, the $\text{E2}\cdot\text{BeF}_x$ species again appears to be more similar to the true E2P species than to the $\text{E2}\cdot\text{AlF}_4$ or $\text{E2}\cdot\text{VO}_4$ species. When TG was added to the FITC-labeled $\text{E2}\cdot\text{BeF}_x$ species, FITC fluorescence rose quite significantly (Figure 4C); in contrast, there was only a slight change upon addition of TG to $\text{E2}\cdot\text{AlF}_4$ (Figure 4B) (while TG addition to E2P (Figure 4D) increased FITC fluorescence back to the level found in the absence of P_i (Figure 4A), as expected from the dynamic nature of phosphorylation from P_i).

From these results, we may infer that the ATPase structure around Lys^{515} in the previously published $\text{TG}\cdot\text{E2}\cdot\text{AlF}_4$ crystals (13) probably did *not* suffer much from the presence of TG, but the ATPase structure in a putative $\text{TG}\cdot\text{E2}\cdot\text{BeF}_x$

crystal, if such a structure were to become available, might deviate more significantly, even in the cytosolic region, from its TG-free counterpart, again assuming the latter could also become available. It is however fair to recall that in previous experiments where TNP-AMP bound in the cytosolic domain, instead of FITC, was used as the reporter group, addition of TG to the $E2 \cdot BeF_x$ species left hydrophobicity around the TNP group essentially unaltered (36); thus, those results with TNP-AMP point to the possibility that the effect of TG on the cytosolic domains suggested by our FITC data might remain rather limited. Nevertheless, consistent with a general effect of TG at the nucleotide binding site (where the fluorescein is located), it may be recalled that TG is known to reduce the ATPase affinity for MgATP (14, 40–42; see also below).

Focusing on the $E2 \cdot VO_4$ and $E2 \cdot AlF_4$ species, whose formation is most clearly revealed by the fluorescein reporter group, formation of these species was not prevented by the preliminary addition of TG (Supporting Information Figure S2C,D), consistent with the proteolysis results. This was true also in the absence of DMSO (Supporting Information Figure S3), i.e., under conditions where the fluorescence rise associated with VO_4 binding has been extensively described (39). Note that TG-dependent and VO_4 -dependent FITC signals are significantly larger in the absence than in the presence of DMSO (as shown by comparing Figure S3A with Figure S2A and Figure S3C with Figure S2C), which makes the former conditions more favorable to study the effects of TG or VO_4 on FITC fluorescence. Other inhibitors influenced FITC fluorescence in a manner qualitatively similar to that of TG: they all increased the basic fluorescence level of FITC but did not prevent formation of the transition-state analogue (Supporting Information Figure S4). BHQ was again less effective than TG or CPA, as at a concentration of a few micromolar it blocked the effect of subsequent addition of Ca^{2+} only partially.

Effects of TG or Other Inhibitors on Other Forms of Ca^{2+} -Free ATPase, As Deduced from Intrinsic Fluorescence Responses to Mg^{2+} or ATP. We then explored the effect of TG, BHQ, and CPA on two other events: binding of Mg^{2+} and ATP to Ca^{2+} -free ATPase. These two events are known to give rise to distinct Trp fluorescence changes, which were observed here in the absence of DMSO and KCl. The Trp fluorescence changes accompanying Mg^{2+} addition at neutral or alkaline pH (43) were completely obliterated in the presence of TG (part A versus part B of Figure 5). This was also essentially true in the presence of BHQ at 10 μ M (Figure 5C), but again BHQ appeared to bind with relatively poor affinity, as the rate of its dissociation upon subsequent addition of excess Ca^{2+} was much faster than for TG (at only 3 μ M BHQ, Trp fluorescence remained sensitive to Mg^{2+} and the rate of the subsequent Ca^{2+} -induced rise was faster than at 10 μ M BHQ, while at 30 μ M BHQ, this rate was slowest, data not shown). In the presence of CPA, it turned out that addition of Mg^{2+} after CPA induced a further drop in Trp fluorescence (Figure 5D): this peculiar feature probably reveals that CPA itself binds tighter (or to a larger extent) to the ATPase at millimolar concentrations of Mg^{2+} than at the micromolar concentration found in nominally Mg^{2+} -free buffer and hence is more efficient in quenching Trp fluorescence (see the Discussion).

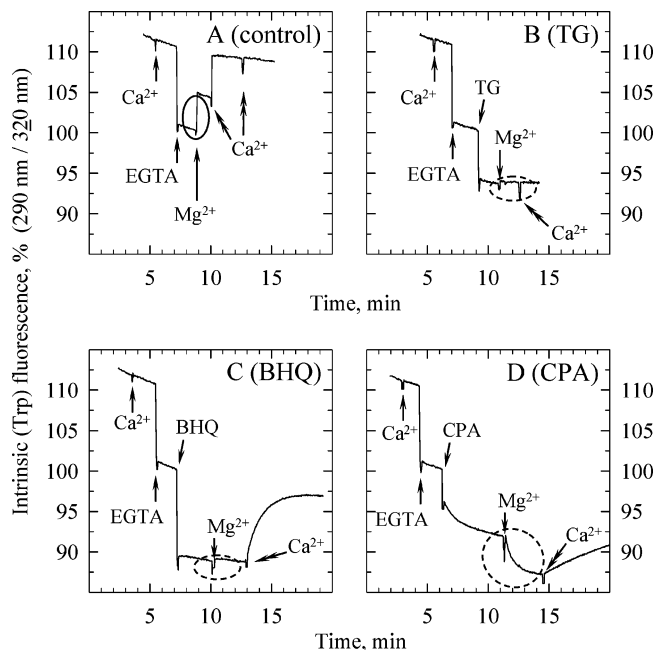


FIGURE 5: TG (as well as BHQ) completely obliterates the response of ATPase Trp residues to the addition of Mg^{2+} to Ca^{2+} -free ATPase. The response to Mg^{2+} in the presence of CPA is masked by enhanced CPA interaction with the ATPase following addition of Mg^{2+} . The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/mL SR in 150 mM Mops-Tris at pH 7 and 20 °C. Sequential additions were made as follows, when indicated by arrows: Ca^{2+} (100 μ M), EGTA (1 mM), inhibitor if any [in panel B TG (1 μ g/mL), in panel C BHQ (10 μ M), and in panel D CPA (0.3 μ g/mL)], then Mg^{2+} (20 mM), and last (double arrow) Ca^{2+} again (at 1 mM, added twice in panel A, which is the control). The excitation wavelength was 290 nm, and the emission wavelength was changed to 320 nm to optimize the Mg^{2+} -dependent signal (43); bandwidths were 2 and 10 nm, respectively. This experiment was performed at pH 7 in the absence of KCl, but similar results were also obtained at pH 7.5 (which further optimizes the Mg^{2+} -dependent signal; see ref 43) or at pH 7 but in the additional presence of 100 mM KCl (which slightly depresses it, unpublished results). Traces have been corrected for the (small) artifacts induced by dilution.

We then studied the effects of inhibitors on the Trp fluorescence changes that normally accompany ATP addition to Ca^{2+} -free ATPase (44, 45, 34, 19). In the presence of Mg^{2+} , where the affinity for ATP (MgATP, in fact) is high in the absence of TG, TG completely inhibited these fluorescence changes (Figure 6A,C), a fact which was previously noted (46) but only briefly commented upon as reflecting the known TG-induced drop in the affinity of the ATPase for MgATP (46, 41, 67). Remarkably, however, this was also the case in the total absence of free Mg^{2+} (Figure 6B,D), i.e., under conditions where the binding of ATP (with poorer affinity) has been suggested to be almost unaltered by TG (47). In relation with that suggestion, and because of the existence of seemingly contradictory results obtained under different ionic conditions (14), we performed [γ - ^{32}P]-ATP binding experiments under our ionic conditions (using a filtration assay), and we were able to confirm the suggestion in ref 47: at the relatively high concentration of [γ - ^{32}P]-ATP we used (30 μ M), i.e., with the ATPase nucleotide binding site essentially fully saturated in the presence of Mg^{2+} and only partially in the absence of Mg^{2+} , TG hardly affected the amount of ATP bound in the absence of Mg^{2+} (and the amount of ATP bound to the ATPase-TG complex was in fact higher in the absence of Mg^{2+} than in its presence;

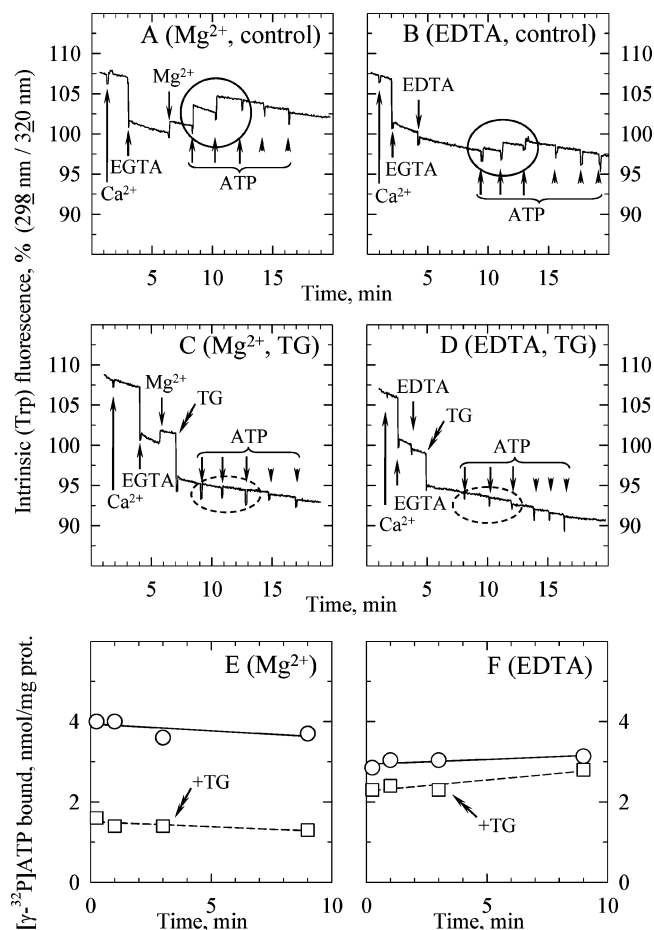


FIGURE 6: TG completely obliterates the response of ATPase Trp residues to the residual binding of either MgATP or ATP. (A–D) The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/mL SR in 150 mM Mops–Tris at pH 7 and 20 °C. Sequential additions were made as follows, when indicated by arrows: Ca²⁺ (100 μM), EGTA (1 mM), Mg²⁺ (5 mM; A, C) or EDTA (2 mM; B, D), and TG if any (1 $\mu\text{g/mL}$; C, D); then, increasing concentrations of ATP were added, 3 μM first, then 30 μM more, then 300 μM more, and last two or three additions of 300 μM again (arrowheads). The excitation wavelength was set at 298 nm to reduce the inner filter effect due to ATP absorbance, while the emission wavelength was kept at 320 nm; bandwidths were 2 and 10 nm, respectively. Traces have been corrected for the (very small) artifacts induced by dilution. (E, F) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ binding to the ATPase (in the presence of 30 μM ATP) under almost exactly the same conditions, as deduced from filtration experiments. At time zero, 30 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was added to Ca²⁺-free ATPase (0.1 mg/mL), suspended in 150 mM Mops–Tris (pH 7 and 20 °C), 0.5 mM EGTA, and either 5 mM Mg²⁺ (E) or 0.5 mM EDTA (F), and preincubated in the absence (circles) or presence (squares) of 1 $\mu\text{g/mL}$ TG. After various periods, 2.5 mL aliquots were filtered on Millipore HA filters and double-counted without rinsing. In panel E, the tendency for bound ATP to become slightly lower after long periods most probably reveals Mg²⁺-dependent ATP hydrolysis by contaminant enzymes.

see the squares in part F versus part E of Figure 6). Both in the presence and in the absence of Mg²⁺, the amount of bound ATP remained significant in the presence of TG. Thus, the total absence of ATP-induced fluorescence changes under any of these two conditions implies that TG completely prevented the Trp residues in the membrane from experiencing any distinct change in environment upon the residual binding of ATP to the ATPase cytosolic domain: ATP still binds to the ATPase (with modest affinity) despite the presence of TG, but (as previously observed after formation

of an E2·BeF_x complex) no longer induces any conformational change in the transmembrane domain, where most of the Trp residues are located.

Similar experiments were repeated using BHQ or CPA instead of TG. BHQ proved to act very similarly to TG, although again with poorer affinity. In the presence of Mg²⁺, 30 μM BHQ nearly completely prevented (Supporting Information Figure S5A) the normal response of ATPase Trp residues to MgATP addition previously illustrated in Figure 6A, although about half of the $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ remained bound in the presence of BHQ (Figure S5E); 10 μM BHQ was not sufficient in the presence of Mg²⁺ (data not shown). In the absence of Mg²⁺, 10 μM BHQ was sufficient to eliminate the fluorescence response to ATP addition (compare Figure S5B with its control in Figure 6B), although $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ binding was only minimally altered by BHQ (Figure S5F). CPA revealed specific features, to be considered in parallel with its previously noted specific behavior in the experiments illustrated in Figures 3D and 5D. In the absence of free Mg²⁺, addition of CPA no longer induced any observable time-dependent fluorescence response, and the rapid fluorescence drop observed now matched exactly the drop expected for an inner filter effect alone (Supporting Information Figure S5D); the binding of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ to ATPase was again minimally altered by CPA (Figure S5F), but in this case the accompanying fluorescence changes, too, were minimally altered (compare Figure S5D with its control in Figure 6B); thus, CPA seems to hardly interact with the ATPase in the absence of Mg²⁺. In the presence of Mg²⁺, the time-dependent fluorescence drop, which we believe to be a manifestation of CPA interaction with the ATPase, was completed on a time scale of minutes (Figure S5C). After this equilibration, addition of ATP (i.e., MgATP) no longer induced any fast rise in Trp fluorescence, as for TG or BHQ, despite the reduced but again nonzero amount of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bound after short periods (Figure S5E; see also ref 67). At later times, Trp fluorescence rose slowly (compare Figure S5C with its control in Figure 6A), possibly revealing slow displacement of CPA from its binding site(s) (as also found in Figure 5D) concomitant with a slow increase in the amount of bound $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Figure S5E).

Effects of TG or Other Inhibitors on Ca²⁺-Free ATPase in the Absence of Any Other Ligand, As Deduced from Mild Proteolysis Experiments with Proteinase K. Last, we studied the effects of inhibitors on Ca²⁺-free ATPase in the absence of any other ligand, by using the ATPase susceptibility to proteinase K as an indicator of possible changes in its conformation or dynamics. To be consistent with the experiments in Figures 5 and 6, we chose here to keep proteolysis media devoid of DMSO and KCl; compared with the previous proteolysis experiments illustrated in Figure 1, we had to use a lower proteinase K to SR membrane ratio in the new experiments, because both DMSO and KCl appear to slow ATPase proteolysis (Figure S6 in the Supporting Information). As an introduction to these experiments, let us first recall (30, 48) that, during mild treatment of SR vesicles with proteinase K in the presence of Ca²⁺, a number of well-characterized initial products are formed, including membranous peptides derived from either the C-terminal (p83C, p27/28C, and p19C) or the N-terminal (p28N and a small amount of p81N) part of the ATPase, as well as water-soluble p29/30 fragments derived from the

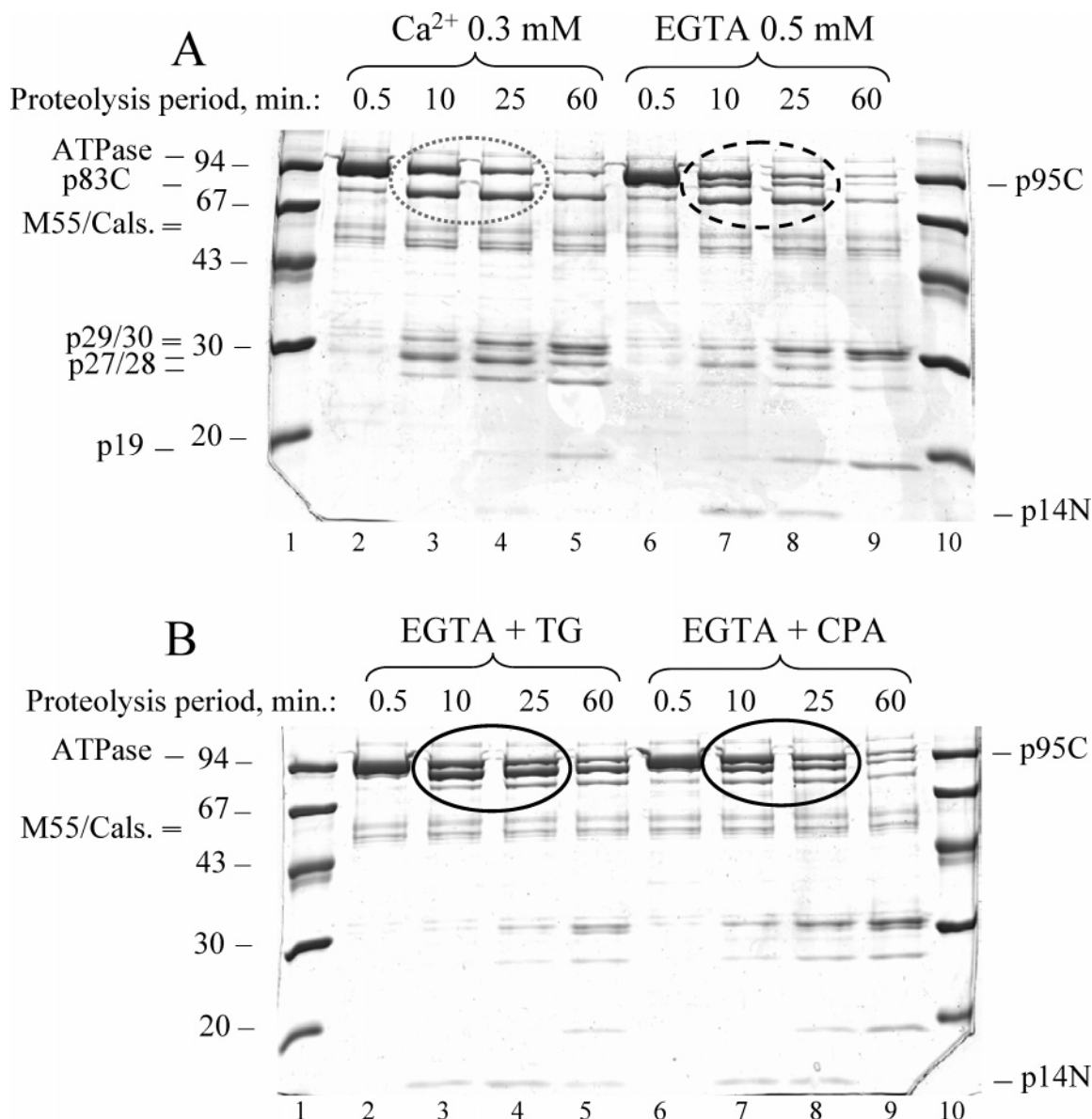


FIGURE 7: The presence of TG (or CPA) during proteinase K treatment of Ca^{2+} -free ATPase slows cleavage at T242–E243, resulting in the formation of large amounts of p95C. (A) SR membranes (2 mg of protein/mL) were treated with proteinase K (0.03 mg/mL) at 20 °C for various periods of time, in proteolysis buffer (100 mM Mops–NaOH and 5 mM Mg^{2+} at pH 6.5) containing either 0.3 mM Ca^{2+} (lanes 2–5) or 0.5 mM EGTA (lanes 6–9). After proteolysis arrest and sample denaturation, 4 μg of protein was loaded per lane, on a 12% acrylamide gel. Lanes 1 and 10 contain molecular mass markers (LMW kit, GE Healthcare). This is a repeat of the experiment illustrated in Figure 1A of ref 49, but performed exactly in parallel with the one illustrated in panel B. (B) SR membranes were similarly treated in the presence EGTA, except for the additional presence of either TG (lanes 2–5) or CPA (lanes 6–9), both at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (i.e., about 30 μM for TG and 60 μM for CPA; 2 mg/mL SR corresponds to about 10–14 μM ATPase, assuming 5–7 nmol of ATPase/mg of protein).

central and cytosolic nucleotide binding domain (see lanes 2–5 in gel A of Figure 7, corresponding to an experiment performed at pH 6.5). The C-terminal peptide p83C results from ATPase cleavage at T242–E243, and the T242–E243 bond is indeed peripheral (and therefore accessible to proteolysis) in the structure of the Ca^{2+} -bound form of Ca^{2+} –ATPase (7). In the absence of Ca^{2+} , as seen by lanes 6–9 in gel A, a new high molecular mass peptide is also formed (compare lanes 6–9 with lanes 2–5; see also Figure 1 in ref 49): this p95C peptide, a C-terminal one, is formed together with its N-terminal counterpart, p14N, after ATPase cleavage at L119–K120 (30).

Similar experiments were repeated in the absence of Ca^{2+} but now in the presence of TG. TG was previously described to only moderately slow overall proteolysis of the initial

ATPase (35). We confirmed this, but in addition we found that the presence of TG has a clear qualitative effect on the pattern of proteolysis: p83C becomes much weaker, while p95C is now predominant (lanes 2–5 in gel B versus lanes 6–9 in gel A of Figure 7). In Danko et al.'s previous paper (35), the same qualitative trend (although less pronounced under the conditions of that paper) is also visible (see Figure 2 in ref 35), and a similar TG-induced inversion of the p83 to p95 ratio has been reported in Western blots (50, 67). We also found that the presence of CPA, instead of TG, during proteolysis in the presence of EGTA, exerts effects on formation of p95C and p83C that are qualitatively similar to those exerted by TG, although slightly less pronounced (Figure 7B, lanes 6–9): the overall loss of intact ATPase is again slowed, and the formation of p95C is again favored at

the expense of p83C. The same result, including the fact that the effect was weaker, was found when BHQ was used (Figure S7 in the Supporting Information). The more prominent p95C band and the reduced p83C band, in the presence of TG or the other inhibitors, must be due to a slowing of the cut at T242–E243 rather than to stimulation of the cut at L119–K120, as disappearance of intact ATPase is *slower* in the presence of inhibitors than in their absence (i.e., in the absence of inhibitors, formation of the p95C peptide in the absence of Ca^{2+} is underestimated because cleavage at T242–E243 also occurs). Thus, we conclude that TG, BHQ, and CPA all reduce the rate of cleavage at T242–E243, with the effect of BHQ or CPA being slightly less pronounced.

A conceivable interpretation for this inhibitor-induced alteration in the proteolysis pattern might be that Ca^{2+} -free ATPase explores various conformations, only a few of which correspond to the true E2 conformation, with this true conformation, defined as being the conformation reactive to P_i , being the only one able to bind TG (25, 26, 40, 51). It has indeed already been suggested that Ca^{2+} -free ATPase is in dynamic equilibrium between a true “E2” state and a Ca^{2+} -free “E1” state (partly resembling the Ca^{2+} -saturated ATPase conformation) (39). However, the E2/E1 equilibrium is generally thought to depend on the pH (and temperature), being about 50/50 under neutral conditions at 20 °C, but being almost fully shifted toward the E2 form under more acidic conditions (39), partly because the E2 species corresponds to a form in which protons (to be countertransported for Ca^{2+}) are bound and occluded (52); it was recently suggested explicitly that, at pH 6, TG could stabilize the ATPase in the protonated “ $\text{H}_n\text{E2}$ ” state (14).

To test this interpretation, we repeated our experiments under different pH conditions. We predicted that if TG were merely stabilizing a pre-existing protonated E2 form, the effect of TG on susceptibility to proteolysis would be minimal at pH 6 (where the E2/E1 equilibrium is already shifted toward the E2 state in the absence of TG) but prominent at pH 7 (where half of the Ca^{2+} -free ATPase is in the Ca^{2+} -free E1 state in the absence of TG). However, the result of the experiment did not fit with this prediction: the effect of TG on ATPase susceptibility to proteolysis in the absence of Ca^{2+} was prominent *both* at pH 6 (Figure 8A) and at pH 7 (Figure 8B), and the p95C to p83C ratio in the absence of TG was even lower at pH 6 than at pH 7, so that the relative effect of TG was even stronger at pH 6 than at pH 7. Whether this result fits better or not with the alternative and previously proposed possibility (53–55) that, irrespective of pH, TG (as well as other inhibitors such as BHQ or CPA) drives the ATPase toward a state that somehow *differs* from that of inhibitor-free ATPase, will be discussed below.

DISCUSSION

At present, due to the known instability of detergent-solubilized Ca^{2+} -free forms of ATPase, the diffracting crystals we have for some of these forms of ATPase were all obtained in the presence of inhibitors (mostly TG, but also BHQ or CPA). These forms (with or without fluoride, for instance) do differ in their cytosolic regions, but for a given type of inhibitor (TG for instance) they have rather

similar organizations in their transmembrane domain. The likely reason for the latter fact is now made clear by our results: TG does not prevent a number of events from occurring in the ATPase cytosolic domain, e.g., reaction with fluoride compounds (Figure 1B) or binding of ATP with reduced affinity (Figure 6E,F), but it apparently prevents the transmembrane helices from responding to these cytosolic events (Figures 3 and 6A–D). Thus, the present work emphasizes that, to better understand the various conformations of sarcoplasmic reticulum ATPase during its catalytic cycle, especially its Ca^{2+} -free forms, we do need crystals prepared in the *absence* of inhibitor. Indeed, from the beginning, TG was considered as a “dead-end complex” (25), and as was explicitly stated a few years later after directed mutagenesis and chimeric exchange experiments, “perturbations produced by binding of either inhibitor within the stalk segment interfere with the long-range functional linkage between ATP utilization in the ATPase cytosolic region and Ca^{2+} binding in the membrane-bound region” (56). Here, we have demonstrated this directly with native sarcoplasmic reticulum ATPase. Although we are not able to exactly pinpoint the nature of the perturbations exerted by the inhibitors, we show that, beyond the transmembrane region, they extend to the loop(s) connecting this region and the cytosolic domains (Figures 7 and 8) and even higher above the membrane, up to fluorescein bound to Lys⁵¹⁵ in the nucleotide binding domain (Figure 4); the effects of TG on the headpiece of Ca^{2+} -free ATPase were in fact predicted (67). All this should be kept in mind when the structures of the forms obtained in the presence of TG or other inhibitors are considered. This *caveat* holds especially for the ATPase crystalline forms obtained with fluoride compounds ($\text{TG} \cdot \text{E2} \cdot \text{MgF}_4$, or $\text{TG} \cdot \text{E2} \cdot \text{AlF}_4$), which at present are the only analogues available for the true E2P form but still differ from it or from its closest relative, the TG-free $\text{E2} \cdot \text{BeF}_x$ form (Figures 2 and 4), both in the transmembrane domain (Figure 3 and ref 28) and probably in the nucleotide domain too (Figure 4C). However, it possibly holds also for the ATPase forms obtained in the presence of nucleotide and inhibitors, as TG apparently blocks long-distance reorganization by nucleotides of the ATPase transmembrane domain, even though nucleotide binding still takes place (Figure 6 and Supporting Information Figure S5).

Our results about the effect of Mg^{2+} binding to Ca^{2+} –ATPase—at least as concerns the particular type of Mg^{2+} binding which results in Trp fluorescence changes observable under neutral or alkaline conditions—may also be discussed. The exact reason for this effect of Mg^{2+} has been disputed from the start. One of the possibilities is that this Mg^{2+} ion could bind to one of the two Ca^{2+} sites, resulting in a shift of the ATPase conformation toward a Ca^{2+} -free but “E1-like” new conformation (43, 57). In this case, the blockade of the effect of Mg^{2+} by TG would indeed be easily understandable. However, Trp fluorescence experiments with the E309Q mutant (mutated at Ca^{2+} binding site “II”) showed that Mg^{2+} was able to bind to this mutant and to induce normal fluorescence changes, although Ca^{2+} was no longer able to induce such changes (58); thus, in that work, it was suggested that Mg^{2+} was *not* binding at any of the Ca^{2+} sites in the transmembrane region. If this is correct, the binding site for Mg^{2+} (at least for this Mg^{2+} ion) could then be between Asp⁷⁰³ and Asp⁷⁰⁷ in the catalytic site, as observed

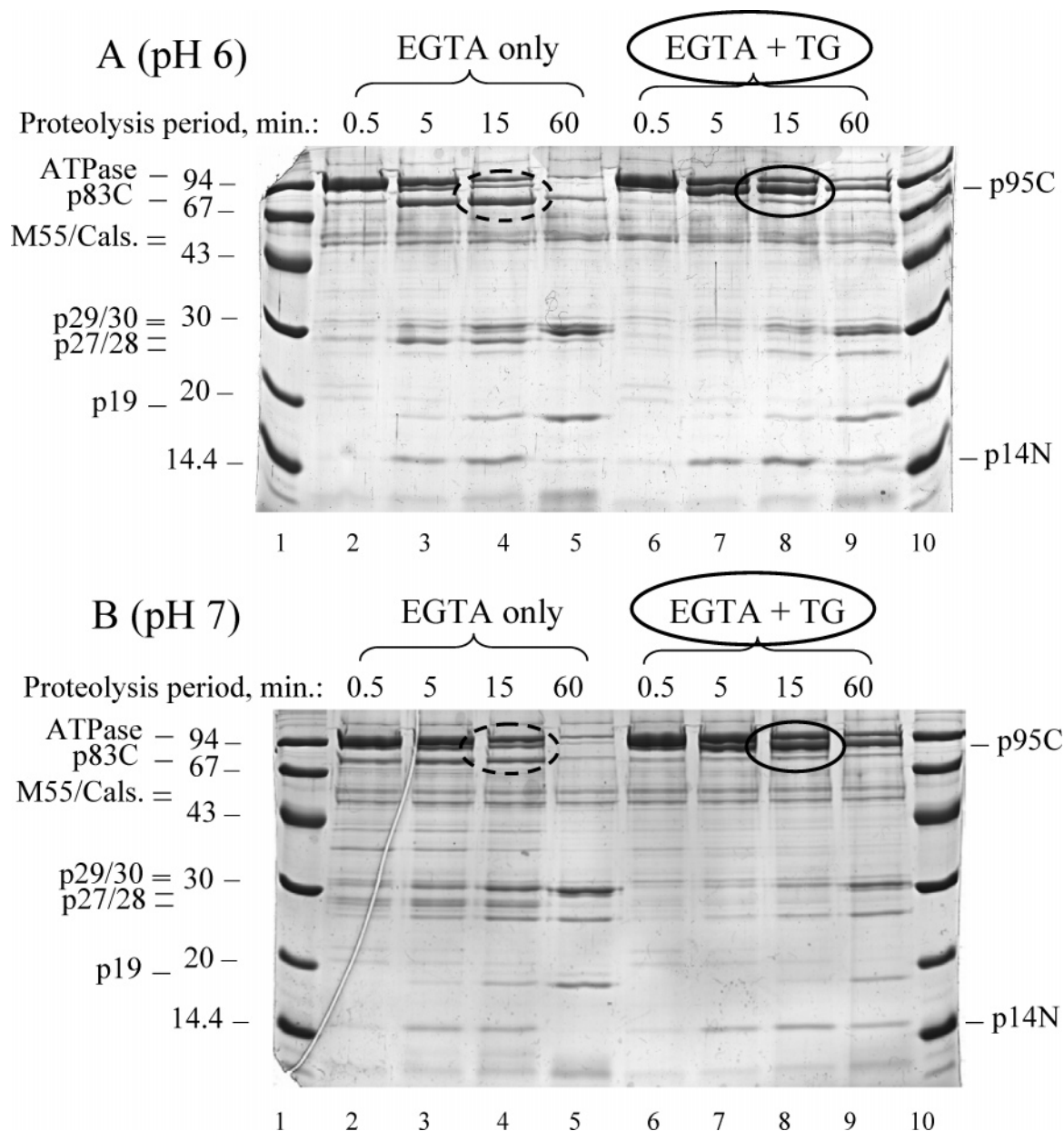


FIGURE 8: At both pH 6 and pH 7, the presence of TG in the absence of Ca^{2+} blocks ATPase cleavage by proteinase K at T242–E243 almost fully, resulting in overwhelming formation of the p95C peptide. SR membranes were treated as described in Figure 7 in the presence of 5 mM Mg^{2+} and 0.5 mM EGTA and the absence (lanes 2–5) and presence (lanes 6–9) of 0.02 mg/mL TG, but now in a medium consisting of either 50 mM Mes–Tris at pH 6 (A) or 50 mM Mops–Tris at pH 7 (B). After proteolysis arrest and sample denaturation, 4 μg of protein was loaded per lane, on a 12% acrylamide gel.

in a recently obtained E2(TG)AMPPCP crystal (PDB structure deposited as 2DQS, to be commented upon elsewhere), and the Trp response to Mg^{2+} would reveal Mg^{2+} -induced long-distance reorganization (in the absence of inhibitor) of the transmembrane region of the ATPase, and again this long-distance reorganization would turn out to be blocked by TG. However, at variance with the suggestion in ref 58, it is fair to recognize that site II of E309Q might have retained the ability to bind Mg^{2+} even though it has lost the ability to bind Ca^{2+} . Thus, a firm conclusion about the exact site to which Mg^{2+} has to bind to induce Trp fluorescence changes must probably be delayed until experiments with other mutants have been performed.

The results obtained with ATP and MgATP may also be shortly discussed here. Although, as well-known, TG affects the binding of MgATP very significantly, we confirmed that,

as recently described (47), TG affects the binding of ATP in the absence of Mg^{2+} to a very slight extent only; it was previously known, too, that TG hardly affects the binding of ATP analogues such as TNP–ATP (46) or TNP–8N₃–ATP (41). MgATP and ATP might in fact bind in slightly different conformations (59), and a complex of Ca^{2+} -free ATPase with TG might conceivably bind nucleotides (e.g., AMP–PCP) in a still somewhat different conformation.

Our results also add a few details to the characterization of the effect of BHQ and CPA. As concerns BHQ, our results confirm that this inhibitor binds with relatively poor affinity (in the range of a few micromolar in most of our experiments), but otherwise acts rather similarly to TG. In likely relation with this, the structure of the ATPase in BHQ·ATPase crystals was not found to be very different from that in the presence of TG (17). As concerns CPA, we deduce

from the Trp fluorescence results (Figures 3D, 5D, and 5S) that it reorganizes the transmembrane domain with kinetics which is not very fast (on the minute time scale in the presence of Mg^{2+}), compared with the much faster kinetics with which TG and BHQ act (54, 60). However, we also suspect that the mere binding of CPA to ATPase might depend on Mg^{2+} availability (part C versus part D of Supporting Information Figure S5). Similarly, partition of the well-known ionophore calcimycin (A23187) into sarcoplasmic reticulum membranes (see, e.g., ref 61) is favored by millimolar concentrations of Mg^{2+} (unpublished data).

As concerns the effects of inhibitors on the proteolytic susceptibility of ligand-free ATPase (at least using proteinase K as the protease), our similar results at different pH values (Figure 8) might at first sight be taken as rendering less likely the possibility that inhibitors could stabilize the true E2 conformation of the pump, the true E2 conformation being defined as the dynamic ensemble of conformations making the ATPase reactive to P_i , as opposed to the “ Ca^{2+} -free E1” conformation which, in Ca^{2+} -free ATPase, is in a pH-dependent equilibrium with E2 (39): they might seem to support the previous alternative suggestion (53–55) that these inhibitors drive the ATPase toward states which, at least in some respect, “differ” from the average E2 state prevailing at pH 6 in Ca^{2+} -free ATPase. In fact, in available crystals, the exact conformations of ATPase complexed with TG and CPA seem to be slightly different from each other (16, 17). However, old discussions in terms of “conformations” of enzymes during their catalytic cycle might be partly outdated by the more modern views about the intrinsic dynamics of protein structures, and our proteolysis data might be worth a comment in this respect. As an alternative to (or in addition to) the idea of TG shifting the “average” conformation of the protein into a slightly “different” one, we suggest that TG and the other inhibitors probably slow the cut at T242–E243 mainly because their “freezing” effect on the movements of the transmembrane segments of the ATPase propagates up to the links between the A-domain and the membrane domain: i.e., reduced susceptibility to proteolysis of the peripheral T242–E243 bond is probably not mainly due to steric hindrance in a new conformation, but to slowing of the protein dynamics in the region of these links, a slowing which turns out to be more or less similar for hydrophobic inhibitors bound at different sites near the transmembrane region. A similar slowing of the chain dynamics probably explains the protection of the cleavage sites around V734 and V747 in the M5 helix which is also observed upon TG binding (67). The ATPase might be inhibited as the result of such binding because protein “breathing” (i.e., transient increases in the protein transmembrane cross-sectional area) is probably involved in the various transitions in the catalytic cycle (24, 62). This could well be what has been dubbed by Logan-Smith et al. a “global conformational change” (64), except that we now might have to change our traditional loose way of talking about conformational changes into a more realistic one, taking into account the intrinsic flexibility and dynamic state of the protein.

The suggestion that the changes in proteolytic susceptibility of the T242–E243 bond observed in the present work after TG addition are due to changes in peptide chain dynamics, rather than to domain rotation and changes in bond

accessibility, makes even more remarkable the fact that the alternative explanation was correctly offered by Danko et al. (35) to explain the earlier and somewhat similar findings that the same T242–E243 bond was protected (but now fully) upon formation of E2P analogues (as confirmed in Figure 1): in that case, this alternative explanation did prove true, as rotation of the A-domain during the transition to E2P-related structures was subsequently deduced from crystal structures (10, 12).

To conclude, our main finding in this work is that, especially in the case of the formation of Ca^{2+} -free ATPase–fluoride complexes in the presence of beryllium, but also after the mere binding of ATP or MgATP, the membrane helices no longer respond to what is happening in the head domains after binding of TG or other inhibitors, as if the various regions of the protein were now “uncoupled”. This is obviously due to the fact that the loops connecting the ATPase transmembrane and cytosolic domains are flexible. The role of these flexible links to accommodate thermal fluctuations and simultaneously permit coupling of Ca^{2+} transport to ATP hydrolysis has been discussed recently (17). Such flexibility might also be the basis for the long-disputed possible “slipping” of the pump under special circumstances (see, e.g., refs 63–65).

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to David McIntosh for suggestions during this work and for his help in improving an initial version of the manuscript and to Hiroshi Suzuki for critical reading.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Figure S1 showing the protection of $E2 \cdot MgF_4$ and $E2 \cdot VO_4$ from proteolysis, in the absence or presence of TG; Figures S2–S4 showing FITC fluorescence changes upon addition of VO_4 (or AlF_4) and the effects of TG, BHQ, or CPA; Figure S5 showing Trp fluorescence responses to ATP (and $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ binding) in the presence of BHQ or CPA; Figure S6 showing the effect of DMSO and KCl on ATPase proteolysis; and Figure S7 showing that BHQ, too, favors p95 formation after proteolysis. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Makinose, M. (1972) Phosphoprotein formation during osmochemical energy conversion in the membrane of the sarcoplasmic reticulum, *FEBS Lett.* 25, 113–115.
- Hasselbach, W. (1978) The reversibility of the sarcoplasmic calcium pump, *Biochim. Biophys. Acta* 515, 23–53.
- de Meis, L., and Vianna, A. L. (1979) Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.* 48, 275–292.
- Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.* 73, 269–292.
- Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 282–295.
- Møller, J. V., Nissen, P., Sørensen, T. L., and le Maire, M. (2005) Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 387–393.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution, *Nature* 405, 633–634.
- Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium, *Nature* 418, 605–611.

9. Toyoshima, C., Nomura, H., and Sugita, Y. (2003) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, *FEBS Lett.* 555, 106–110.
10. Sørensen, T. L.-M., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump, *Science* 304, 1672–1675.
11. Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue, *Nature* 430, 529–535.
12. Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues, *Nature* 442, 361–368.
13. Olesen, C., Sørensen, T. L.-M., Nielsen, R. C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion, *Science* 306, 2251–2255.
14. Jensen, A.-M. L., Sørensen, T. L., Olesen, C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2006) Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump, *EMBO J.* 25, 2305–2314.
15. Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2005) Structural role of countertransport revealed in Ca^{2+} pump crystal structure in the absence of Ca^{2+} , *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14489–14496.
16. Moncoq, K., Trieber, C. A., and Young, H. S. (2007) The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump, *J. Biol. Chem.* 282, 9748–9757.
17. Takahashi, M., Kondou, Y., and Toyoshima, C. (2007) Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5800–5805.
18. Toyoshima, C. (2007) Ion pumping by calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Adv. Exp. Med. Biol.* 592, 295–303.
19. Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005) The average conformation at micromolar $[\text{Ca}^{2+}]$ of Ca^{2+} -ATPase with bound nucleotide differs from that adopted with the transition state analog ADP·AlFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar $[\text{Ca}^{2+}]$, *J. Biol. Chem.* 280, 18745–18754.
20. Picard, M., Jensen, A.-M., Sørensen, T. L., Champeil, P., Møller, J. V., and Nissen, P. (2007) Ca^{2+} versus Mg^{2+} coordination at the nucleotide-binding site of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, *J. Mol. Biol.* 368, 1–7.
21. Andersen, J. P., Møller, J. V., and Jørgensen, P. L. (1982) The functional unit of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Active site titration and fluorescence measurements, *J. Biol. Chem.* 257, 8300–8307.
22. McIntosh, D. B., and Ross, D. C. (1985) Role of phospholipid and protein-protein associations in activation and stabilization of soluble Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Biochemistry* 24, 1244–1251.
23. Lund, S., Orlowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Møller, J. V. (1989) Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 264, 4907–4915.
24. Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J.-L., and Champeil, P. (2006) Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study, *Biochemistry* 45, 1861–1869.
25. Sagara, Y., Wade, J. B., and Inesi, G. (1992) A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum ATPase with thapsigargin, *J. Biol. Chem.* 267, 1286–1292.
26. Wictome, M., Michelangeli, F., Lee, A. G., and East, J. M. (1992) The inhibitors thapsigargin and 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone favour the E2 form of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, *FEBS Lett.* 304, 109–113.
27. Seekoe, T., Peall, S., and McIntosh, D. B. (2001) Thapsigargin and dimethyl sulfoxide activate Medium Pi $\leftrightarrow$ HOH oxygen exchange catalyzed by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, *J. Biol. Chem.* 276, 46737–46744.
28. Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2006) Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride, *J. Biol. Chem.* 281, 3360–3369.
29. Champeil, P., Guillain, F., Vénien, C., and Gingold, M. P. (1985) Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-depleted sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation, *Biochemistry* 24, 69–81.
30. Juul, B., Turc, H., Durand, M. L., Gomez de Gracia, A., Denoroy, L., Møller, J. V., Champeil, P., and le Maire, M. (1995) Do transmembrane segments in proteolyzed sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase retain their functional Ca^{2+} binding properties after removal of cytoplasmic fragments by proteinase K?, *J. Biol. Chem.* 270, 20123–20134.
31. Møller, J. V., Lenoir, G., Marchand, C., Montigny, C., le Maire, M., Toyoshima, C., Juul, B. S., and Champeil, P. (2002) Calcium transport by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Role of the A-domain and its C-terminal link with the transmembrane region, *J. Biol. Chem.* 277, 38647–38659.
32. Soulié, S., Møller, J. V., Falson, P., and le Maire, M. (1996) Urea reduces the aggregation of membrane proteins on Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Anal. Biochem.* 236, 363–364.
33. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
34. Champeil, P., Riollot, S., Orlowski, S., Guillain, F., Seebregts, C. J., and McIntosh, D. B. (1988) ATP regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Metal-free ATP and 8-bromo-ATP bind with high affinity to the catalytic site of phosphorylated ATPase and accelerate dephosphorylation, *J. Biol. Chem.* 263, 12288–12294.
35. Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H., and Toyoshima, C. (2001) ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin, *FEBS Lett.* 489, 277–282.
36. Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2004) Distinct natures of Beryllium Fluoride-bound, Aluminum Fluoride-bound, and Magnesium Fluoride-bound stable analogues of an ADP-insensitive Phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: changes in catalytic and transport sites during phosphoenzyme hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 279, 14991–14998.
37. de Meis, L., Martins, O. B., and Alves, E. W. (1980) Role of water, Hydrogen ion, and temperature on the synthesis of ATP by the sarcoplasmic reticulum adenosinephosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation, *Biochemistry* 19, 4252–4261.
38. Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L., and Inesi, G. (1992) Characterization of the inhibition of intracellular Ca^{2+} transport ATPases by thapsigargin, *J. Biol. Chem.* 267, 12606–12613.
39. Pick, U., and Karlisch, S. J. (1982) Regulation of the conformation transition in the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum by pH, temperature, and calcium ions, *J. Biol. Chem.* 257, 6120–6126.
40. Kijima, Y., Ogunbunmi, E., and Fleischer, S. (1991) Drug action of thapsigargin on the Ca^{2+} pump protein of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 266, 22912–22918.
41. McIntosh, D. B., Woolley, D. G., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1996) Mutagenesis of Segment 487Phe-Ser-Arg-Asp-Arg-Lys492 of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase produces pumps defective in ATP binding, *J. Biol. Chem.* 271, 25778–25789.
42. McIntosh, D. B., Woolley, D. G., MacLennan, D. H., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1999) Interaction of nucleotides with Asp351 and the conserved phosphorylation loop of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, *J. Biol. Chem.* 274, 25227–25236.
43. Guillain, F., Gingold, M. P., and Champeil, P. (1982) Direct fluorescence measurements of Mg^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase, *J. Biol. Chem.* 257, 7366–7371.
44. Dupont, Y., Bennett, N., and Lacapère, J.-J. (1982) Fluorescence studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 402, 569–572.
45. Lacapère, J.-J., Bennett, N., Dupont, Y., and Guillain, F. (1990) pH and magnesium dependence of ATP binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence that the catalytic ATP-binding site consists of two domains, *J. Biol. Chem.* 265, 345–353.
46. DeJesus, F., Girardet, J. L., Dupont, Y. (1993) Characterisation of ATP binding inhibition to the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by thapsigargin, *FEBS Lett.* 332, 229–232.
47. Clausen, J. D., McIntosh, D. B., Anthonisen, A. N., Woolley, D. G., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (2007) ATP-binding modes and functionally important interdomain bonds of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase revealed by mutation of Glycine 438, Glutamate 439, and Arginine 678, *J. Biol. Chem.* (in press).

48. Champeil, P., Menguy, T., Soulié, S., Juul, B., Gomez, de Gracia, A., Rusconi, F., Falson, P., Denoroy, L., Henao, F., le Maire, M., and Møller, J. V. (1998) Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Nucleotide and metal binding sites, *J. Biol. Chem.* 273, 6619–6631.
49. Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le, Maréchal, P., Falson, P., le Maire, M., Møller, J. V., and Champeil, P. (2004) Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase after proteolytic cleavage at Leu119-Lys120, close to the A-domain, *J. Biol. Chem.* 279, 9156–9166.
50. Xu, C., Ma, H., Inesi, G., Al-Shawi, M. K., and Toyoshima, C. (2004) Specific structural requirements for the inhibitory effect of Thapsigargin on the Ca^{2+} ATPase SERCA, *J. Biol. Chem.* 279, 17973–17979.
51. Sagara, Y., and Inesi, G. (1991) Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations, *J. Biol. Chem.* 266, 13503–13506.
52. Forge, V., Mintz, E., and Guillain, F. (1993) Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. I. Mechanism of affinity and cooperativity modulation by H^{+} and Mg^{2+} , *J. Biol. Chem.* 268, 10953–10968.
53. Wictome, M., Khan, Y. M., Lee, A. G., and East, J. M. (1995) Binding of sesquiterpene lactone inhibitors to the Ca^{2+} -ATPase, *Biochem. J.* 310, 859–868.
54. Khan, Y. M., Wictome, M., East, J. M., and Lee, A. G. (1995) Interactions of dihydroxybenzenes with the Ca^{2+} -ATPase: separate binding sites for dihydroxybenzenes and sesquiterpene lactones, *Biochemistry* 34, 14385–14393.
55. Logan-Smith, M. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2002) Evidence for a global inhibitor-induced conformation change on the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum from paired inhibitor studies, *Biochemistry* 41, 2869–2875.
56. Ma, H., Zhong, L., Inesi, G., Fortea, I., Soler, F., and Fernandez-Belda, F. (1999) Overlapping effects of S3 stalk segment mutations on the affinity of Ca^{2+} -ATPase (SERCA) for thapsigargin and cyclopiazonic acid, *Biochemistry* 38, 15522–15527.
57. Champeil, P., Gingold, M. P., Guillain, F., and Inesi, G. (1983) Effect of magnesium on the calcium-dependent transient kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase, studied by stopped flow fluorescence and phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 258, 4453–4458.
58. Lenoir, G., Jaxel, C., Picard, M., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2006) Conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mutants: effect of mutations either at Ca^{2+} -binding Site II or at tryptophan 552 in the cytosolic domain, *Biochemistry* 45, 5261–5270.
59. McIntosh, D. B., Clausen, J. C., Woolley, D. G., MacLennan, D. H., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (2004) Roles of conserved P-domain residues and Mg^{2+} in ATP binding in the ground and Ca^{2+} -activated states of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, *J. Biol. Chem.* 279, 32515–32523.
60. Davidson, G., and Varhol, R. J. (1995) Kinetics of thapsigargin- Ca^{2+} -ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition, *J. Biol. Chem.* 270, 11731–11734.
61. Champeil, P., le Maire, M., Møller, J. V., Riollot, S., Guillain, F., and Green, N. M. (1986) Does intrinsic fluorescence reflect conformational changes in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum?, *FEBS Lett.* 206, 93–98.
62. Cantor, R. S. (1997) The lateral pressure profile in membrane: A physical mechanism of general anesthesia, *Biochemistry* 36, 2339–2344.
63. de Meis, L. (2001) Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Regulation by ADP, *J. Biol. Chem.* 276, 25078–25087.
64. Logan-Smith, M. J., Lockyer, P. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2001) Curcumin, a molecule that inhibits the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca^{2+} , *J. Biol. Chem.* 276, 46905–46911.
65. Sumbilla, C., Lewis, D., Hammerschmidt, T., and Inesi, G. (2002) The slippage of the Ca^{2+} pump and its control by anions and curcumin in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 277, 13900–13906.
66. Champeil, P., Henao, F., Lacapère, J.-J., and McIntosh, D. B. (2001) A remarkably stable phosphorylated form of Ca^{2+} -ATPase prepared from Ca^{2+} -loaded and fluorescein isothiocyanate-labeled sarcoplasmic reticulum vesicles, *J. Biol. Chem.* 276, 5795–5803.
67. Inesi, G., Lewis, D., Ma, H., Prasad, A., and Toyoshima, C. (2006) Concerted conformational effects of Ca^{2+} and ATP are required for activation of sequential reactions in the Ca^{2+} ATPase (SERCA) catalytic cycle, *Biochemistry* 45, 13769–13778.

BI701855R

Supporting Information for the manuscript:

**Inhibitors bound to Ca^{2+} -free sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
lock its transmembrane region but not necessarily its cytosolic region, revealing
the flexibility of the loops connecting transmembrane and cytosolic domains**

*by Cédric Montigny, Martin Picard, Guillaume Lenoir, Carole Gauron,
Chikashi Toyoshima, and Philippe Champeil*

Supplemental Figure S1

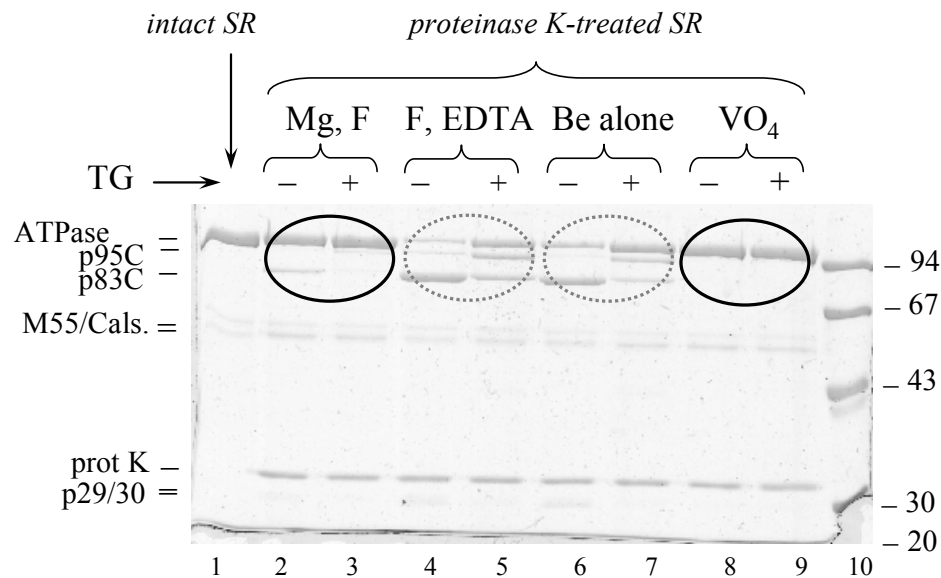


Figure S1. E2.MgF₄ and E2.VO₄ also are protected from cleavage both in the absence and presence of TG. Mg²⁺ is required for the effect of fluoride, and Be²⁺ alone is not sufficient.

This experiment was run exactly in parallel with the one illustrated in Fig. 1 of main text. SR membranes (1 mg protein/ml) in 100 mM KCl, 20% DMSO, 150 mM Mops-Tris, 0.5 mM EGTA and 5 mM Mg²⁺ (or zero Mg²⁺ in one case, see below) at pH 7 and 20°C were incubated in the presence of various additions: 1 mM KF alone in the continued presence of Mg²⁺ (lanes 2 & 3), 1 mM KF and 0.5 mM EDTA (lanes 4 & 5; in this case, the initial medium did not contain Mg²⁺, so that incubation took place in the absence of free Mg²⁺), 0.05 mM BeCl₂ alone (lanes 6 & 7), or 0.2 mM orthovanadate (lanes 8 & 9). Incubation lasted 5-10 minutes, except for incubation with Mg²⁺ and fluoride which lasted 85 minutes, a longer period required under these conditions to inhibit almost all of the SR ATPase activity (see Fig S3 in Supplemental Material of *ref.* 28). Then TG (0.01 mg/ml) was added to some of the samples, for 5-10 minutes again. Lastly, proteinase K was added at 0.3 mg/ml, and proteolysis took place for 60 minutes. After proteolysis arrest and sample denaturation, 2 µg protein per lane was loaded for SDS-PAGE, here on a 9% acrylamide gel. Lane 10 contains molecular mass markers (LMW Pharmacia kit). Lane 1 contains intact SR (2 µg protein per lane, again) in the absence of proteinase K.

Supplemental Figure S2

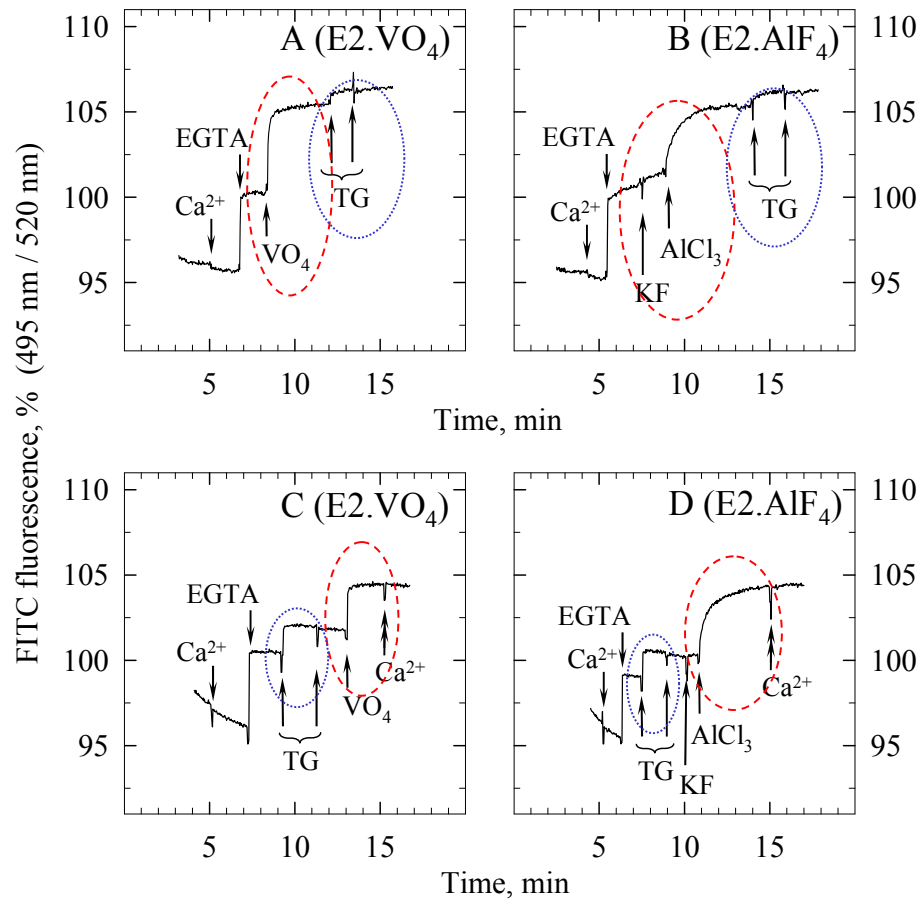


Figure S2. FITC, bound to Lys⁵¹⁵ in the cytosolic region, responds to formation of E2.VO₄ or E2.AlF₄ in similar manners. Subsequent addition of TG only slightly affects FITC fluorescence. Preliminary addition of TG does not prevent VO₄-dependent or AlF₄-dependent FITC changes.

A, This experiment was run in parallel with the one illustrated in Fig. 4 of main text. The fluorometer cuvette contained 0.02 mg/ml FITC-SR in 100 mM KCl, 20 % DMSO, 5 mM Mg²⁺ and 150 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C. Sequential additions were made, when indicated by arrows: Ca²⁺ (20 μM), EGTA (0.2 mM), 0.2 mM orthoVO₄, and TG (1 μg/ml each addition). The traces have been corrected for the (very small) artefacts induced by dilution. *B*, For comparison, *Panel B* of Fig. 4 has been reproduced here, recalling the effect of adding 1 mM KF and 0.05 mM of AlCl₃ instead of VO₄. *C*, *D*, Similar experiments, except that TG was now added *before* VO₄ (*C*) or AlF₄ (*D*). Here, the initial addition of Ca²⁺ was at 10 μM, and after EGTA addition TG was added at 0.2 μg/ml, twice. The final addition of 700 μM Ca²⁺ (double arrow) confirms that TG is indeed bound to the ATPase, since vanadate release is prevented. The traces have been corrected for the (very small) artefacts induced by dilution.

Supplemental Figure S3

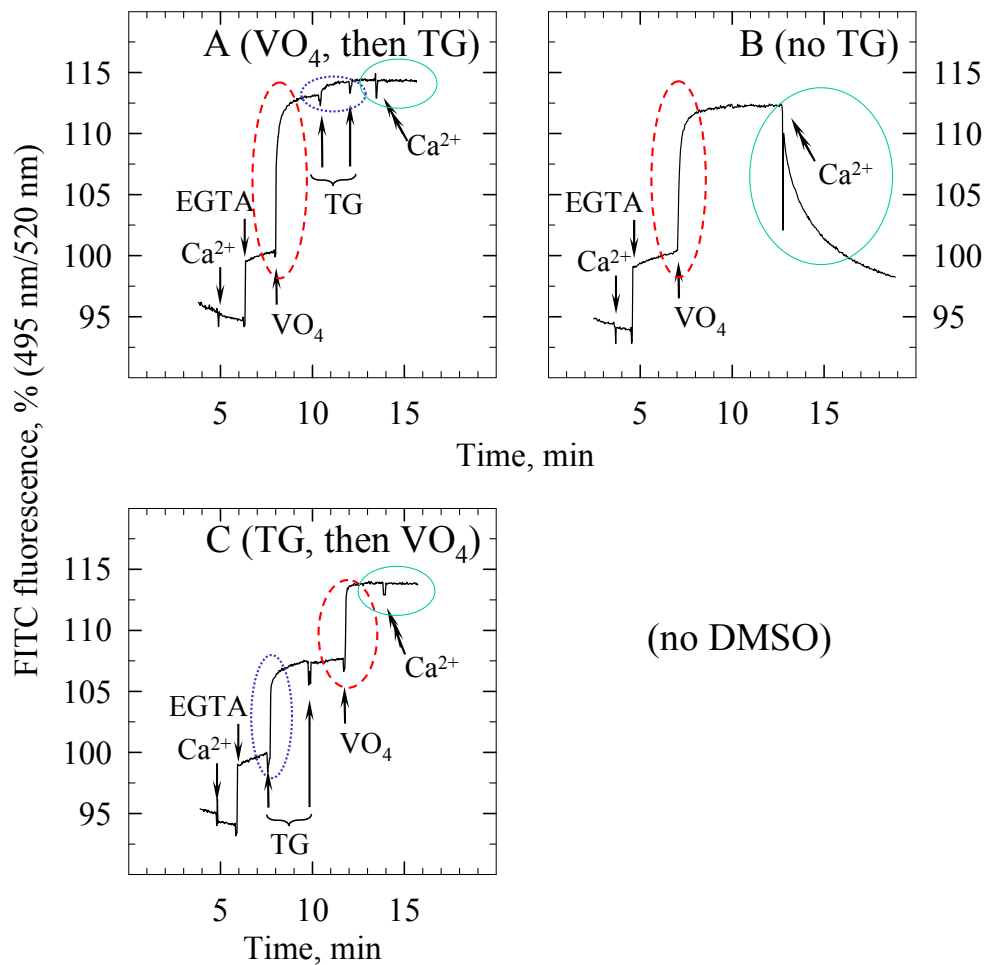


Figure S3. In the absence of DMSO, too, TG addition after VO₄ does not alter much the FITC fluorescence resulting from the previous addition of VO₄. Preliminary addition of TG raises FITC fluorescence but does not prevent VO₄-dependent changes to occur.

The fluorometer cuvette contained 0.02 mg/ml FITC-SR in 100 mM KCl, 5 mM Mg²⁺ and 150 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C, now in the absence of DMSO. *A*, sequential additions were made when indicated by arrows: Ca²⁺ (10 μM), EGTA (0.2 mM), orthoVO₄ (0.2 mM), TG (0.2 μg/ml each addition), and lastly Ca²⁺ (0.7 mM, double arrow), which did not induce any change because of the presence of TG. *Panel B*, same experiment in the absence of TG (for control). *Panel C*, same experiment as the one in *Panel A*, but with TG added *before* VO₄. The traces have been corrected for the (very small) artefacts induced by dilution.

Supplemental Figure S4

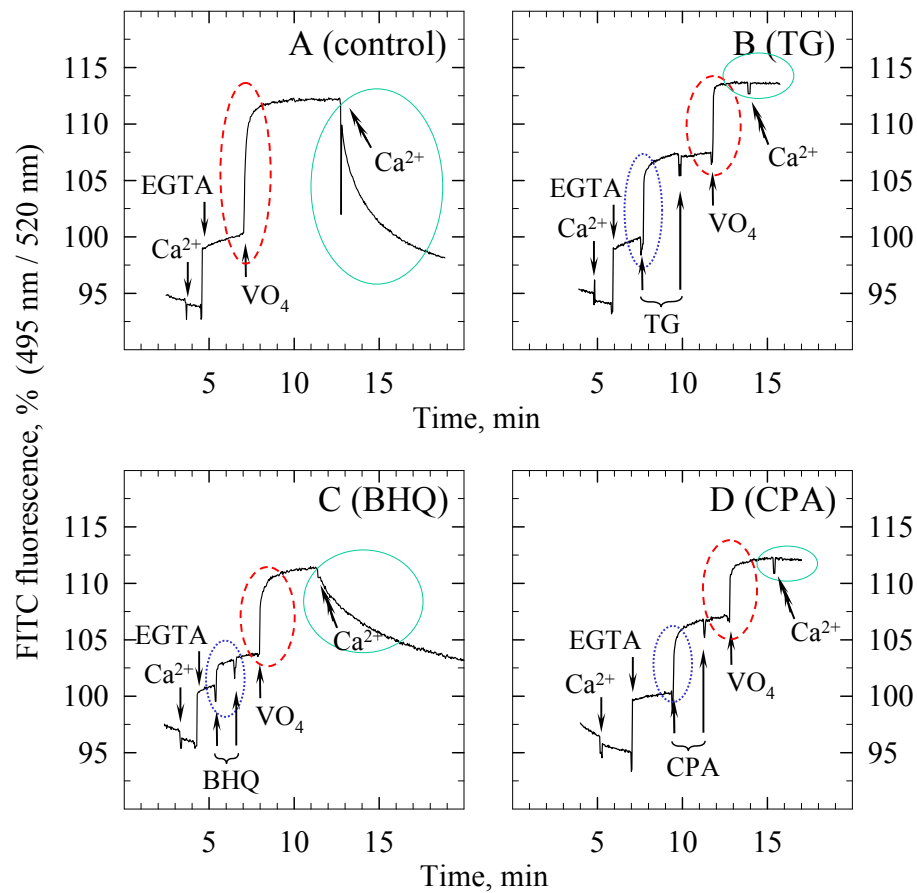


Figure S4. TG, CPA or BHQ all raise FITC fluorescence and *do not* prevent FITC from experiencing fluorescence changes addition of VO_4 .

The fluorometer cuvette contained 0.02 mg/ml FITC-SR in 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} and 150 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C (in the absence of DMSO). Sequential additions were made, when indicated by arrows: Ca^{2+} (10 μM), EGTA (0.2 mM), and then inhibitors -TG (Panel B, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each addition, i.e. 0.3 μM), BHQ (Panel C, about 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ again each addition, i.e. 1 μM), or CPA (Panel D, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ again each addition, i.e. 3 μM), followed by 0.2 mM ortho VO_4 , and lastly Ca^{2+} (0.7 mM) to check for the extent of blockade of the Ca^{2+} -induced signals (the concentration of BHQ used here did *not* block fully those events, due to its poor affinity for the ATPase). The traces have been corrected for the (very small) artefacts induced by dilution.

Supplemental Figure S5

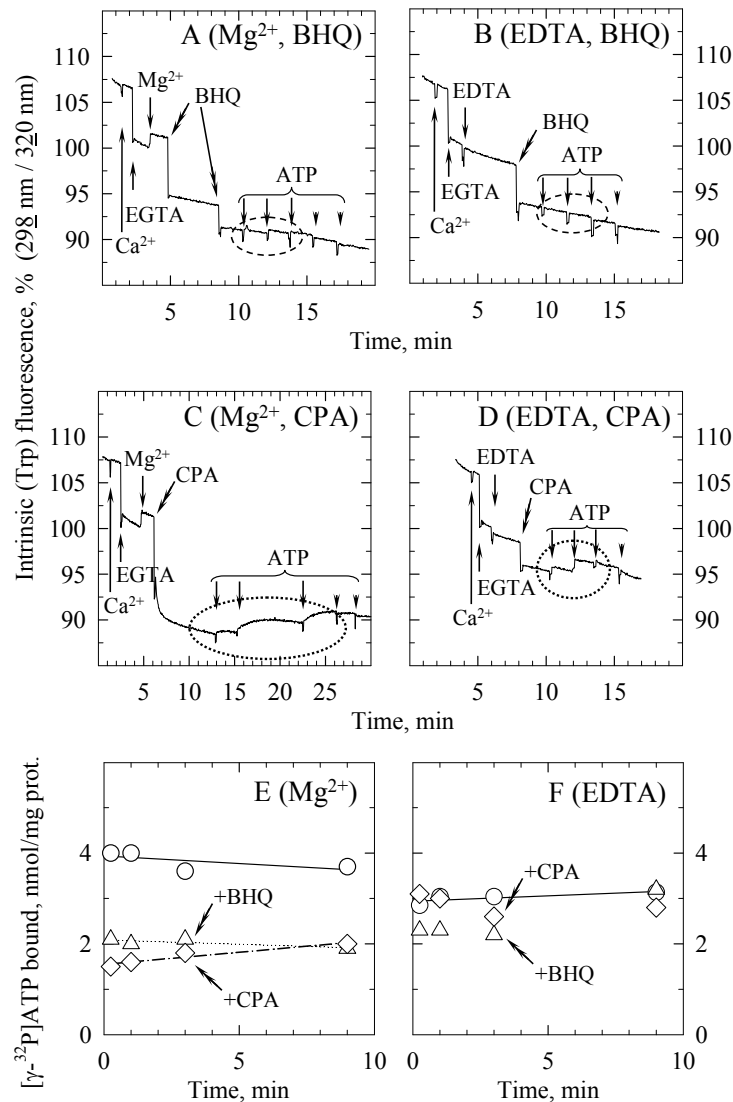


Figure S5. BHQ also inhibits the response of ATPase Trp residues to ATP addition, although again with poor affinity in the presence of Mg²⁺. CPA is much less efficient, especially in the absence of Mg²⁺ where CPA might not interact at all.

This experiment was run in parallel with the one in Fig. 6 of main text. *Panels A-D*, The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/ml SR in 150 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C. Sequential additions were made as follows, when indicated by arrows: Ca²⁺ (100 μM), EGTA (1 mM), Mg²⁺ (5 mM, *Panels A* and *C*) or EDTA (2 mM, *Panels B* and *D*) and either BHQ (10 μM followed by another 20 μM in *Panel A*; 10 μM only in *Panel B*) or CPA (0.3 μg/ml in *Panels C* and *D*); then, increasing concentrations of ATP were added, 3 μM first, then 30 more, then 300 more, and lastly 1 or 2 additions of 300 μM again (arrowheads). The excitation wavelength was set at 298 nm and the emission wavelength was 320 nm, to improve Mg²⁺-dependent signals and to reduce as much as possible the inner filter effect of ATP (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively). Traces have been corrected for the (very small) artefacts induced by dilution.

Panels E-F, [γ-³²P] ATP binding to the ATPase (in the presence of 30 μM ATP) under almost exactly the same conditions, as deduced from filtration experiments. At time zero, 30 μM [γ-³²P] ATP was added to Ca²⁺-free ATPase (0.1 mg/ml), suspended in 150 mM Mops-Tris (pH 7 and 20°C), 0.5 mM EGTA and either 5 mM Mg²⁺ (*Panel E*) or 0.5 mM EDTA (*Panel F*) and preincubated in the absence (circles) of inhibitor or in the presence of 30 μM BHQ (triangles) or 0.3 μg/ml CPA (diamonds). After various periods, 2.5 ml aliquots were filtered on Millipore HA filters and double-counted without rinsing.

Supplemental Figure S6

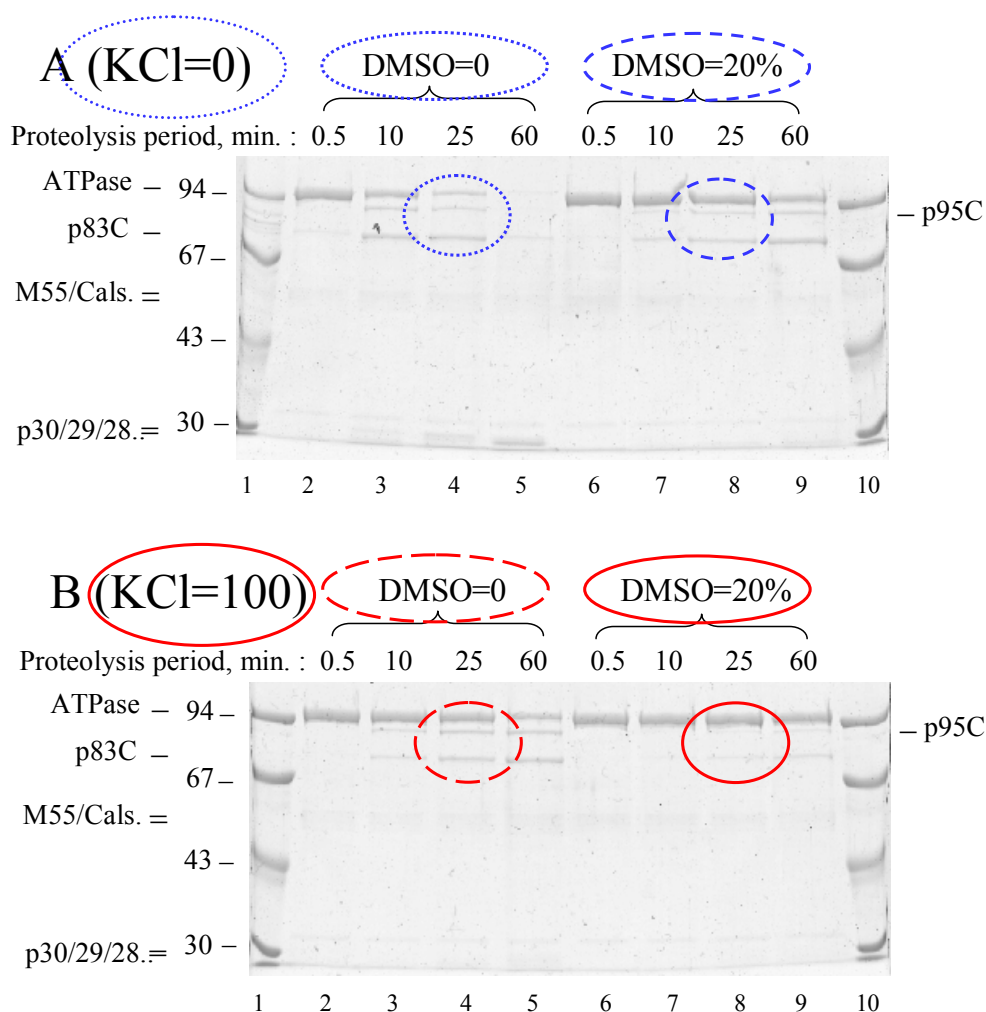


Figure S6. KCl and DMSO slow down ATPase cleavage by proteinase K in the absence of Ca^{2+} at pH 7.

A, SR membranes (1 mg protein/ml) were treated with proteinase K (0.03 mg/ml) at 20°C for various periods of time, in a proteolysis buffer containing either 150 mM Mops-Tris, 5 mM Mg^{2+} and 0.5 mM EGTA at pH 7 (lanes 2-5) or, in addition, 20% DMSO (lanes 6-9). After proteolysis arrest and sample denaturation, 2 μg protein was loaded per lane, on an 8 % acrylamide gel. Lanes 1 and 10 contain molecular mass markers (LMW Pharmacia kit).

B, Same experiment in the additional presence of 100 mM KCl.

Both KCl and DMSO slow down ATPase cleavage, although on the ATPase side, DMSO is known to stabilize the E2 form required for formation of E2P and KCl is known to have the opposite effect. In additional experiments, we found that LiCl and KCl had similar slowing down effects under the conditions of this experiment as well as in the absence of Mg^{2+} , and also in the presence of Ca^{2+} together with Mg^{2+} (data not shown).

Supplemental Figure S7

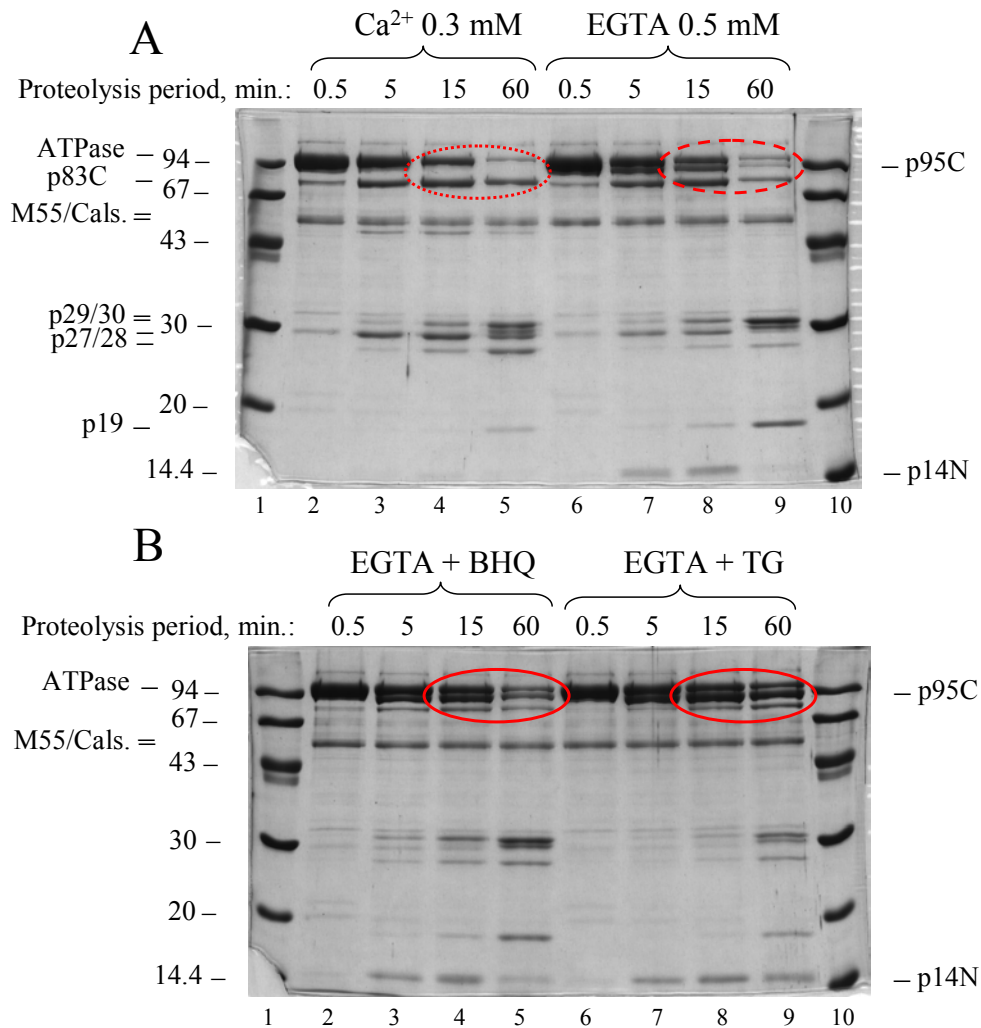


Figure S7. BHQ also favours p95 during ATPase cleavage in the absence of Ca^{2+} , by protecting the T242-E243 bond, although not exactly to the same extent as TG.

A, SR membranes (2 mg protein/ml) were treated with proteinase K (0.03 mg/ml) at 20°C for various periods of time, in proteolysis buffer (100 mM Mops-NaOH and 5 mM Mg^{2+} at pH 6.5) containing either 0.3 mM Ca^{2+} (lanes 2-5) or 0.5 mM EGTA (lanes 6-9). After proteolysis arrest and denaturation, 4 μg protein was loaded per lane, on a 12% acrylamide gel. Lanes 1 and 10 contain molecular mass markers (LMW kit, GE Healthcare). This is a repeat of the experiments illustrated in Fig 7 of the main text, performed in parallel with the one illustrated in *Panel B* below.

B, SR membranes were similarly treated in the presence of EGTA, except for the additional presence of either BHQ (lanes 2-5) or TG (lanes 6-9), both at 30 μM (for 2 mg/ml SR, this corresponds to $\approx$ 3 to 2 mol TG/mol ATPase, assuming 5 to 7.5 nmol ATPase/mg protein). Adding a 30-fold higher concentration of BHQ did not increase further protection of ATPase, while adding TG together with BHQ did (data not shown).

CHAPITRE IV : UTILISATION DU GLYCEROL ET DE LA BETAÏNE POUR STABILISER L'ATPASE- Ca^{2+} SOLUBILISEE, NOTAMMENT POUR DES ETUDES DE FLUORESCENCE INTRINSEQUE

La protéine SERCA1a contient treize résidus tryptophanes, douze dans sa partie membranaire, et un dans le domaine cytoplasmique N de fixation du nucléotide ([figure IV.01](#)). Comme je l'ai déjà présenté dans ce manuscrit, les propriétés de fluorescence de ces résidus tryptophane leur permettent souvent de jouer le rôle de rapporteurs intrinsèques pour les éventuels changements de conformation de la protéine. Ces trente dernières années, de nombreuses études ont montré que l'addition de certains ligands sur la protéine SERCA1a membranaire, préparée à partir du réticulum sarcoplasmique de lapin, donnait lieu à des changements modestes mais reproductibles de son intensité de fluorescence, aussi bien à l'équilibre qu'à l'état stationnaire ([Dupont 1976](#); [Lacapère, Gingold et al. 1981](#); [Guillain, Gingold et al. 1982](#); [Lacapère, Bennett et al. 1990](#)). Plus récemment, ces techniques ont été utilisées pour caractériser la SERCA1a recombinante, obtenue après expression dans un système hétérologue et purification.

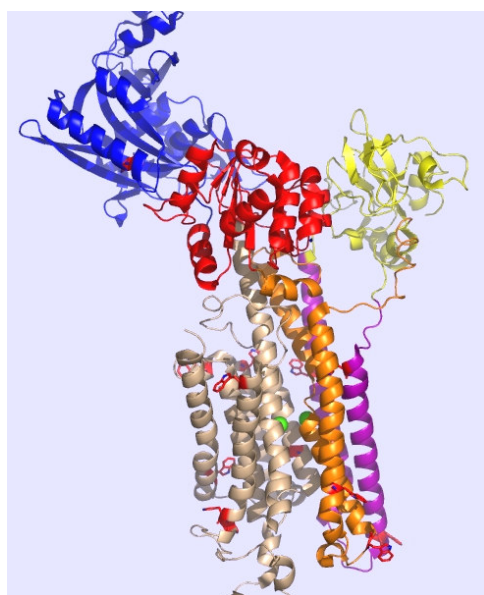


Figure IV.01 : Localisation des résidus tryptophanes dans la structure tridimensionnelle de l'ATPase Ca^{2+} obtenue en présence de calcium (PDB #1SU4, ([Toyoshima, Nakasako et al. 2000](#))). Les chaînes latérales des treize résidus tryptophanes sont colorées en rouge. Le domaine de fixation du nucléotide est coloré en bleu, le domaine de phosphorylation en rouge et le domaine dit « actuator » en jaune. Les hélices du domaine membranaire sont colorées comme suit, M1 & M2 en violet, M3 & M4 en orange et M5 à M10 en blanc. Les ions calcium sont symbolisés par les sphères vertes.

A l'exception des travaux de [Miras et al. \(Miras, Cuillel et al. 2001\)](#), les mesures de fluorescence intrinsèque de ces ATPases recombinantes purifiées ont toujours été réalisées après reconstitution en présence de lipides ([Lenoir, Picard et al. 2004](#); [Jidenko, Lenoir et al. 2006](#); [Lenoir, Jaxel et al. 2006](#); [Marchand, Winther et al. 2008](#)). L'intérêt majeur de cette reconstitution préliminaire de la protéine dans un environnement lipidique est de stabiliser la protéine, afin de pouvoir la manipuler aussi bien en présence qu'en absence de calcium : en absence de calcium, l'ATPase solubilisée est en effet très instable, et elle peut perdre son activité en quelques minutes ([Møller, Lind et al. 1980](#); [Andersen, Møller et al. 1982](#); [McIntosh and Ross 1985](#); [Vilsen and Andersen 1987](#); [Lund, Orlowski et al. 1989](#); [Champeil, Menguy et al. 2000](#)); [figure N.6](#) adaptée de ([Montigny, Arnou et al. 2008](#))). Les effets parasites importants des détergents sur les signaux de fluorescence induits par l'addition de ligands sont une autre des raisons qui ont souvent justifié cette reconstitution préalable : la présence de détergents, même à concentration résiduelle faible, entraîne souvent des modifications importantes voire la disparition de certains signaux de

fluorescence (Dupont and le Maire 1980; Andersen, le Maire et al. 1983; McIntosh and Davidson 1984; de Foresta, Henao et al. 1992).

Cependant, l'étape de reconstitution qui permet l'élimination du détergent est une étape longue et délicate, qui conduit hélas souvent à une perte de matériel et hélas souvent aussi à une perte d'activité de la protéine purifiée (agrégation, dénaturation, adsorption sur les parois...). Dans ces conditions, il était souhaitable de rendre possible dès la fin de la purification l'utilisation de tests de caractérisation fonctionnelle, notamment par fluorescence intrinsèque, sans devoir attendre une reconstitution en protéoliposomes longue et hasardeuse. Une partie du travail réalisé pendant cette thèse a donc consisté à montrer que le glycérol, déjà connu pour stabiliser l'ATPase solubilisée en absence de calcium, permettait également la caractérisation de l'ATPase, aussi bien par les mesures de fluorescence intrinsèque, à l'équilibre, que par les mesures d'activités ATPasiques, à l'état stationnaire. La glycyl-bétaïne (bétaine) s'est avérée avoir des propriétés similaires.

Le glycérol et la bétaine font partie d'une famille de molécules de natures très variées, sucres (saccharose, sorbitol ; (Back, Oakenfull et al. 1979; Taylor, York et al. 1995)), acides aminés (glycine, alanine, proline ; (Schobert and Tschesche 1978)), méthylamines (Yancey and Somero 1979), DMSO (diméthylsulfoxyde) (Kim, Yan et al. 2006), souvent utilisées pour stabiliser les protéines, y compris l'ATPase SERCA1a (Møller, Lind et al. 1980; Murphy, Pepitone et al. 1982; Vilsen and Andersen 1987), que ce soit pendant les étapes de congélation, de conservation ou encore de purification en présence de détergents, ces dernières nécessitant parfois des temps longs (de quelques heures à quelques jours (Dean and Tanford 1978; Møller, Lind et al. 1980; Murphy, Pepitone et al. 1982; Vilsen and Andersen 1987; Pikula, Mullner et al. 1988)). La plupart de ces molécules sont décrites comme étant des « cosmotropes », c'est-à-dire des composés qui semblent stabiliser les protéines en ordonnant l'eau autour d'elles, entraînant la formation d'un réseau d'interactions stables qui limite l'accès du solvant au cœur des protéines et par là même limiterait leur dénaturation. On les oppose aux « chaotropes » ou facteurs de désordre, parmi lesquels on trouve à titre d'exemple l'urée ou le chlorure de guanidine. Ces derniers vont perturber la couche d'hydratation de la protéine, entraînant d'une part, l'exposition de zones jusqu'alors protégées de la chaîne polypeptidique, d'autre part, la formation de nouvelles interactions avec le solvant, ces interactions conduisant généralement à une augmentation de la solubilité mais aussi souvent simultanément à l'inactivation voire la dénaturation de la protéine.

Dans ce chapitre, je vais donc exposer comment le glycérol (et la bétaine) nous ont permis d'une part de rendre possible, notamment en fluorescence intrinsèque, plusieurs tests fonctionnels sur les ATPases solubilisées (natives ou recombinantes, sauvages ou mutées), aussi bien en présence qu'en absence de calcium. Je montrerai d'autre part comment ces protocoles nous ont permis d'étudier plus en détail les effets spécifiques, sur certaines étapes du cycle, de l'interaction de l'ATPase avec deux des détergents communément utilisés pour son étude : le n-dodecyl- β -D-Maltopyranoside (DDM) et l'octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether (C₁₂E₈). Du fait de la difficulté de manipulation de l'enzyme solubilisée en absence de son ligand, due essentiellement à son manque de stabilité, peu de travaux avaient jusqu'à présent décrit ces effets (Kosk-Kosicka, Kurzmack et al. 1983; Mahaney, Thomas et al. 2004). Mais tout d'abord, j'ai évidemment vérifié que le glycérol ou la bétaine n'avaient d'effet drastique ni sur le comportement des détergents dans l'eau, ni sur leur capacité à solubiliser des membranes.

I. PRELIMINAIRES : INFLUENCE DU GLYCEROL ET DE LA BETAÏNE SUR LA MICELLISATION DES DETERGENTS ET LEUR CAPACITE A SOLUBILISER LES MEMBRANES

1. Introduction générale sur les détergents

Les détergents sont des molécules amphipatiques, c'est à dire qui contiennent à la fois des groupements chimiques polaires (hydrophiles) et des groupements apolaires (hydrophobes). Un grand nombre d'entre eux sont inspirés de la structure des phospholipides, avec une longue chaîne aliphatique terminée par une « tête » hydrophile pouvant être de nature très variée (par souci de simplification, je ne parlerai pas ici des sels biliaires, dont la structure est dérivée des stérols). Comme toutes les molécules amphiphiles, les détergents ont la propriété d'être solubles dans l'eau mais également de pouvoir s'insérer dans les phases hydrophobes. En outre, à partir d'une certaine concentration en milieu aqueux, et afin de limiter les interactions de leur domaine hydrophobe avec ce milieu aqueux, les détergents vont le plus souvent s'organiser en agrégats, les « micelles », dont la taille dépendra notamment de la longueur de la chaîne aliphatique et de l'encombrement de la tête polaire. Ces détergents vont pouvoir être utilisés pour solubiliser des molécules hydrophobes dans les milieux aqueux, c'est-à-dire rendre possible la manipulation en solution d'objets qui normalement auraient une forte tendance à l'agrégation dans ces milieux.

Un détergent va être caractérisé par plusieurs éléments, qui sont : i) la nature chimique de sa tête polaire, qui peut être non-ionique, anionique, cationique ou « zwitterionique », ii) la longueur de sa chaîne aliphatique, iii) la masse molaire des micelles formées, ou encore le « nombre d'agrégation » qui est le nombre moyen de monomères de détergent présents par micelle, et enfin, iv) la « concentration micellaire critique » (CMC). Cette dernière est définie comme la concentration limite à laquelle le détergent monomérique va commencer à s'organiser en micelles ([figure IV.02](#)).

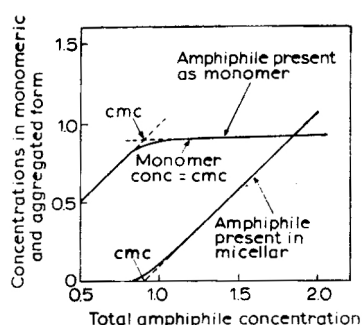


Figure IV.02 : Représentation schématique de la concentration du détergent présent sous forme monomérique et de la concentration du détergent présent sous forme micellaire, en fonction de la concentration totale du détergent. Les lignes pointillées indiquent comment on détermine généralement la CMC (voir ci-après §1.2.). Les concentrations indiquées ici sont arbitraires. Figure extraite de ([Helenius and Simons 1975](#)).

En réalité, la formation des micelles s'effectue dans une certaine gamme de concentrations autour de la CMC, pouvant être influencée par de nombreux paramètres physico-chimiques comme la polarité du solvant, la force ionique, la température, le pH... C'est surtout de cette concentration particulière qu'est la CMC que va dépendre la capacité d'un détergent donné à extraire et à solubiliser une molécule. La [figure IV.03](#) présente de façon schématique les phases explorées au cours de l'interaction avec des concentrations croissantes de détergents d'une membrane biologique, qui contient à la fois des lipides et des protéines intrinsèques (pour revue, ([Helenius and Simons 1975](#); [le Maire, Champeil et al. 2000](#))).

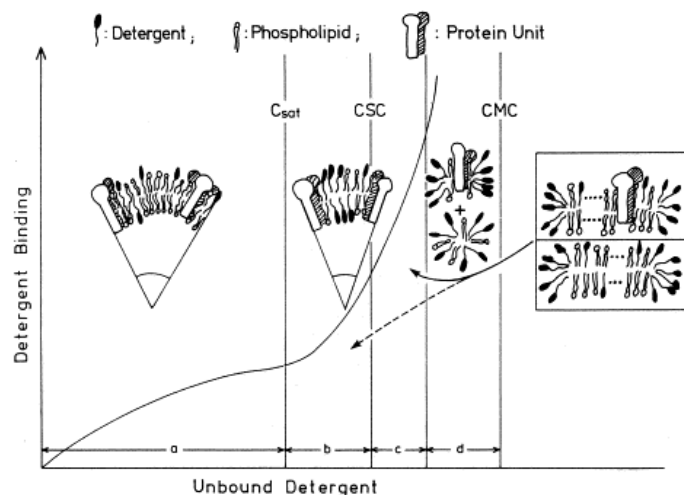


Figure IV.03 : Représentation schématique des différentes phases traversées au cours de la solubilisation d'une membrane biologique par les détergents. On procède à une addition progressive de détergent sur une préparation contenant des membranes en suspension dans un tampon aqueux. A des concentrations faibles de détergent, le détergent partitionne entre la phase aqueuse et la phase lipidique de la membrane sans modification particulière de la morphologie des membranes (phase a). Pour une certaine concentration de détergent libre dans le solvant, la membrane est « saturée » en molécules de détergent (« C_{sat} »). Toute molécule de détergent supplémentaire entraîne alors un changement de taille et de forme des membranes (réduction du rayon de courbure) ; phase b), débouchant sur une fragmentation de ces membranes occasionnée par l'insertion « coopérative » de détergent aux extrémités des fragments ainsi créés (fin de la phase b, fragments de membranes représentés en insert). Lorsque ces fragments deviennent suffisamment petits, c'est-à-dire qu'ils ne sédimentent plus aux vitesses de centrifugation permettant la récupération de membranes, commence alors la « solubilisation ». La limite de cette étape est particulièrement mal définie puisqu'elle dépend des conditions de centrifugation choisies pour juger de cette absence de sédimentation. La concentration en monomères dans le tampon à cette étape est nommée « concentration solubilisante critique » (CSC), elle est a priori proche de la C_{sat} (également mal définie car pas facilement accessible à l'expérience). C'est à ce stade que va débuter réellement la solubilisation, toute addition supplémentaire de monomères de détergent dans la membrane biologique entraînant une extraction progressive de ces constituants (phase c). Au-delà de cette concentration, la quantité de petits objets, essentiellement des monomères de détergent, va augmenter simultanément à la réduction en taille des objets solubilisés. Leur taille peut-être réduite jusqu'à obtention d'objets ne contenant que peu de lipides et de protéines, voire une seule protéine entourée de détergent et qui peut même être complètement délipidée. On se retrouve alors avec un mélange de monomères de détergents et de micelles mixtes détergents+lipides+protéines, détergents + lipides, et détergents+protéines (phase d). Cette figure est extraite de (Kragh-Hansen, le Maire et al. 1993). Pour des raisons thermodynamiques, on notera que la CSC est toujours plus petite que la CMC, la concentration en détergent pour la formation de micelles en *absence* de lipides ou de protéines.

Je vais décrire maintenant les méthodes permettant de déterminer deux des caractéristiques des détergents évoquées ci-dessus : leur concentration micellaire critique (CMC) et leur capacité à solubiliser les membranes (au-delà de la CSC).

2. Détermination de la Concentration Micellaire Critique, effet du glycérol

Il existe de nombreuses techniques de mesure de la concentration micellaire critique d'un détergent.

Une première famille de techniques utilise les propriétés de changement de tension de surface des liquides en présence de détergent. L'une de ces techniques est rudimentaire et peut être mise en œuvre aisément dans n'importe quel laboratoire : elle consiste à compter des gouttes à la sortie d'un capillaire. En effet, la tension superficielle d'un liquide contenant un détergent diminue quand la concentration du détergent monomérique augmente ; de ce fait, la taille des gouttes diminue. Pour un volume donné s'écoulant du capillaire, le nombre de gouttes augmente proportionnellement à la diminution de tension superficielle, et ce jusqu'à la CMC, concentration à laquelle la quantité de monomère en solution est maximale. La CMC est donc mesurée par la concentration à partir de laquelle le nombre de gouttes se stabilise.

Une méthode plus sophistiquée nécessite l'utilisation d'une balance équipée d'un système « d'anneau de du Nouy » (du Nouy 1919) ou encore d'un « plateau de Wilhelmy ». A l'aide de ces appareillages, on peut déterminer la force nécessaire pour extraire l'anneau ou le plateau

métallique d'une solution. Cette force diminue avec la réduction de la tension superficielle, et la CMC d'un détergent est atteinte quand la force nécessaire pour extraire l'anneau ou le plateau est minimale (et reste stable malgré l'augmentation de la concentration en détergent) (Benzonana 1969).

Une deuxième grande famille de méthodes repose sur les variations de propriétés spectroscopiques que subissent de nombreuses sondes colorées lorsqu'elles partitionnent dans des phases hydrophobes. L'une des molécules très utilisée est le pyrène (Kalyanasundaram and Thomas 1977). Cette molécule cyclique (figure IV.04) a un spectre d'émission de fluorescence qui change de forme quand elle s'insère dans une phase hydrophobe. On mesure alors le rapport des intensités de deux bandes d'émission, à 372 et à 383 nm. En dessous de la CMC, ce rapport reste stable car le pyrène n'interagit pas avec le détergent. Une fois la CMC atteinte, les premières micelles se forment et le pyrène s'y insère. Le rapport d'intensité I_{383}/I_{372} commence alors à croître progressivement, d'autant que le nombre des micelles augmente. La CMC est indiquée par ce point anguleux.

Cependant, le pyrène présente quelques inconvénients liés essentiellement à sa nature strictement apolaire, et au fait général qu'il convient de prendre garde à la concentration de sonde utilisée. En effet, ces molécules, qui contiennent souvent un ou plusieurs cycles aromatiques, sont souvent peu solubles et peuvent s'agréger. Ce phénomène entraîne un changement prématuré du spectre (d'absorption ou d'émission de fluorescence, selon la molécule utilisée) qui ne reflète en rien la formation d'une micelle de détergent mais plutôt la formation d'agrégats de la sonde (appelés excimères dans le cas du pyrène (Mataga, Okada et al. 1967)), voire l'apparition d'agrégats mixtes entre sonde et surfactant avant la CMC (Mukerjee and Mysels 1955; Mast and Haynes 1975). Afin d'éviter ce problème, il faut n'utiliser dans la mesure du possible que des concentrations de sondes faibles (mais suffisantes pour obtenir un signal mesurable et significatif). Dans le cas du pyrène, la concentration utile dans un solvant polaire ne doit pas excéder 2 à 3 μM pour éviter la formation d'excimères (Kalyanasundaram and Thomas 1977). La détermination de la CMC, idéalement, est réalisée à différentes concentrations de sonde et/ou éventuellement avec différentes sondes ou techniques.

Dans les deux paragraphes suivants, je vais décrire l'utilisation des deux sondes que nous utilisons le plus souvent au laboratoire : l'une simplement colorée, le méthyl orange, et dont on exploite les propriétés d'absorption ; l'autre également fluorescente, le 1-anilino-8-naphtalène sulfonate (ANS) (voir figure IV.04 pour les formules développées).

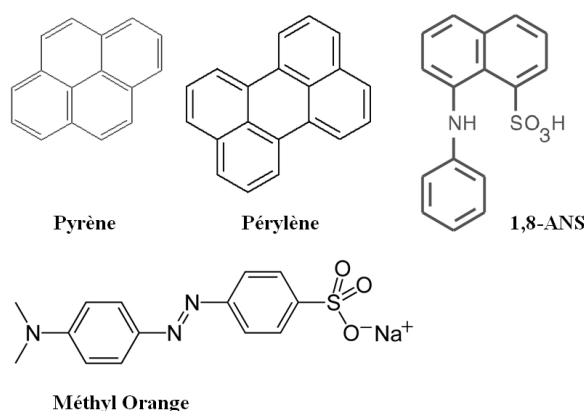


Figure IV.04 : Formule développées de quelques sondes couramment utilisées pour déterminer les concentrations micellaires critiques. Le pyrène, le pérylène et l'acide 1-anilino-8-naphtalène (ANS) sont des sondes dont le spectre d'émission de *fluorescence* change en présence d'une phase hydrophobe. Le méthyl orange est une molécule colorée dont le spectre d'*absorption* est modifié au contact des phases hydrophobes.

a. Spectrophotométrie : utilisation du méthyl orange

Le méthyl orange, aussi appelé hélianthine, est en premier lieu un indicateur de pH naguère très répandu, qui passe du rouge au jaune entre pH 3 et pH 4, tout comme d'autres molécules de structures voisines possédant aussi une fonction azo ($R-N=N-R'$, R et R' représentant des groupements alkyl ou aryl). Cependant, ce composé présente également la propriété de s'insérer dans les phases hydrophobes, et cette insertion se traduit par une modification de son spectre d'absorption. En 1969, Gilbert Benzonana a utilisé cette propriété du méthyl orange pour déterminer la CMC du déoxycholate (Benzonana 1969), le spectre du méthyl orange se modifiant progressivement à compter du moment où il peut partitionner dans les micelles formées.

La figure IV.05 présente les résultats que nous avons obtenus par cette méthode pour déterminer les CMC du DDM et du $C_{12}E_8$, dans un tampon contenant ou non du glycérol. On peut conclure des panneaux C et D que le glycérol n'affecte que modérément la CMC des détergents testés. Comme décrit plus haut, cette CMC est estimée d'après le point à partir duquel le spectre du colorant change brusquement. A partir des portions de droites tracées dans les panneaux C et D (voir légende de la figure IV.05), on obtient les valeurs de CMC suivantes, en absence de glycérol ou en présence de 20 % et 40 % de glycérol (w/w) : pour le DDM, 80, 100 et 170 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, pour le $C_{12}E_8$, 45, 50 et 75 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, respectivement. Ce résultat montre un effet limité du glycérol sur les CMC de ces deux détergents, avec une augmentation au plus d'un facteur 2 pour le DDM et 1,5 pour le $C_{12}E_8$. Pour ce dernier, ce résultat concorde avec celui décrit par en 1999 par Aramaki *et al.* à partir d'expériences de mesures de tension de surface (Aramaki, Olsson *et al.* 1999).

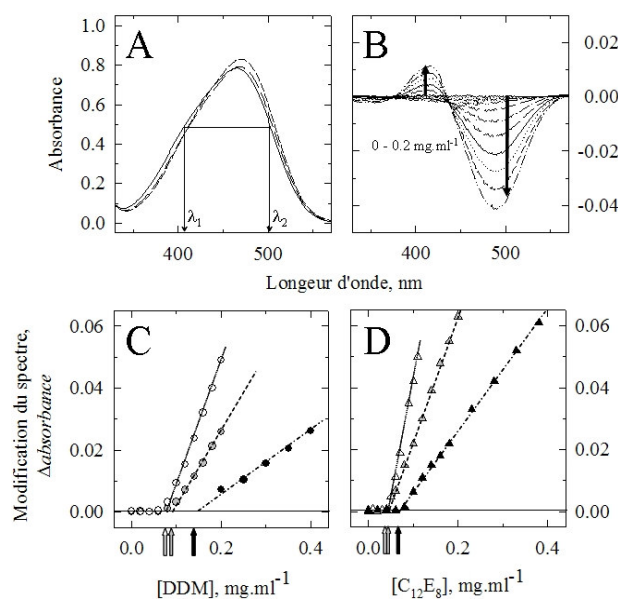


Figure IV.05 : Concentrations Micellaires Critiques du n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM, B & C) et de l'octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether ($C_{12}E_8$, D), en absence ou en présence de glycérol : détermination à partir des changements de spectres du méthyl orange lors de sa partition dans les micelles. A, spectres du méthyl orange (40 μM) dans le tampon Mops-Tris 40 mM pH 7, KCl 80 mM à 20°C (trait continu), et dans le même tampon additionné de glycérol, à 20% (tirets longs) ou 40% (tirets courts) (w/w). λ_1 et λ_2 sont les longueurs d'onde auxquelles on suivra les changements d'absorbance (panneau C & D). Ces longueurs d'onde λ_1 et λ_2 sont choisies de telle sorte que les absorptions en ces points soient égales (tel que montré ici dans le tampon sans glycérol), afin de minimiser les effets de dilution lors de l'addition ultérieure de détergent (Ohnishi 1978). B, spectres de différence du méthyl orange (40 μM) dans le tampon sans glycérol (tampon sur lequel le « blanc » est réalisé), après des additions successives de DDM, de 0 à 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (par pas de 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Les différences $\text{Abs}_{\lambda_1} - \text{Abs}_{\lambda_2}$ sont mesurées sur ces spectres pour être ensuite reportées en fonction de la quantité totale de détergent (panneau C, ronds blancs). C & D : De telles mesures sont réalisées en présence de glycérol 20% (symboles gris) ou 40% (symboles noirs) (w/w), pour le DDM (C) ou le $C_{12}E_8$ (D). Les longueurs d'onde λ_1 et λ_2 sont 410 et 501 nm pour le tampon sans glycérol, 420 et 502 nm pour le tampon contenant 20% de glycérol, et 423 et 503 nm pour le tampon contenant 40% de glycérol. Les CMC sont estimées d'après les points anguleux des différents tracés (flèches blanches, grises et noires pour les mesures en absence de glycérol ou en présence de 20% ou 40% glycérol).

On notera ici que le glycérol a lui-même un léger effet sur le spectre d'absorption du méthyl orange (panneau A). Cet effet est probablement dû au fait que le glycérol affecte la polarité du milieu, le rendant en quelque sorte « moins hydrophile ». Pour cette raison, les longueurs d'ondes choisies pour quantifier le changement de spectre ont été adaptées légèrement pour chaque série de mesures réalisées en fonction de la présence ou non de glycérol (voir légende la [figure IV.05](#)).

On peut dire un mot supplémentaire concernant les pentes des portions de droites tracées au-delà de la CMC (panneau C et D). La pente de ces droites diminue avec l'augmentation de la quantité de glycérol dans le milieu, et ce pour les deux détergents. Une explication raisonnable de ce fait serait que plus la quantité de glycérol dans le milieu est importante, moins il y a de méthyl orange incorporé dans les micelles formées. Il est en effet possible que le coefficient de partition du méthyl orange entre le solvant et les micelles change en présence de glycérol, puisque nous avons vu dans le panneau A que le glycérol avait un effet sur le spectre du méthyl orange. Le « degré d'hydrophobicité » du solvant ayant augmenté avec l'addition de glycérol, le méthyl orange pourrait avoir moins tendance à s'insérer dans les micelles.

b. Spectrofluorimétrie : utilisation du 1-anilino-8-naphtalène sulfonate (ANS)

L'utilisation des sondes fluorescentes de type anilino-naphtalène sulfonate (ANS) a été développée dans les années 50. Utilisées tout d'abord pour étudier par polarisation de fluorescence les propriétés de protéines en solution (l'albumine et l'ovalbumine, [\(Weber 1952\)](#)), ces sondes ont rapidement été utilisées pour caractériser des systèmes membranaires [\(Newton 1954\)](#). Aujourd'hui, les dérivés de ces sondes sont aussi bien utilisés *in vitro* pour caractériser des mélanges de lipides ou de surfactants, qu'*in vivo* pour mettre en évidence des structures cellulaires particulières (pour revue, [\(Slavik 1982\)](#)), et l'ANS s'est révélée au cours des 30 dernières années être un indicateur particulièrement adapté à la détermination de valeurs de CMC. Plus soluble que les sondes pyrène et pérylène ([figure IV.04](#)), l'ANS présente en outre l'avantage de pouvoir être utilisée avec des détergents à courtes chaînes aliphatiques (l'ANS se fixant en surface de la micelle alors que le pyrène irait s'insérer en son cœur), et y compris avec des détergents ayant de faibles nombres d'agrégation, le volume de phase hydrophobe nécessaire à son insertion étant relativement limité. Cependant, son utilisation se limite aux détergents non ioniques. En effet, la molécule porte un groupement chargé sulfonate qui réduit son champ d'utilisation : il a été montré qu'elle ne pouvait être utilisée ni avec les détergents anioniques, probablement à cause de phénomènes de répulsion de charges empêchant l'incorporation de la sonde dans les micelles, ni avec les détergents cationiques ou zwitterioniques, avec lesquels elle s'agrège [\(Mast and Haynes 1975\)](#). Contrairement au pyrène et au pérylène qui fluorescent efficacement en milieu aqueux, l'ANS présente une fluorescence très faible dans les solvants polaires, et cette caractéristique revêt un intérêt tout particulier : le niveau de base de fluorescence est particulièrement faible en tampon aqueux, alors que dans les milieux apolaires ou hydrophobes comme le cœur de la micelle, la molécule voit son rendement quantique fortement augmenter (jusqu'à plus de 100 fois), sans doute à cause de la plus grande durée de vie de l'état excité précédant l'émission de fluorescence. L'ANS est ainsi sensible à de très faibles variations de son environnement permettant la détection l'apparition précoce des micelles. Cette sonde peut être utilisée très diluée et donner tout de même un signal intense de fluorescence une fois mise en présence de micelles (concentration usuelle de quelques μM , voir [figure IV.06](#) et [\(Miguel, Eidelman et al. 1989\)](#)).

L'utilisation de l'ANS pour mesurer les CMC du DDM et du C_{12}E_8 , en présence ou en absence de glycérol (et/ou de DMSO), donne des résultats similaires à ceux obtenus avec le méthyl orange (résultats non montrés). La [figure IV.06](#) présente les résultats que nous avons obtenus avec l'ANS pour mesurer les CMC du DDM et du C_{12}E_8 , en absence ou en présence,

ici, de bétaine (je reviendrai plus loin sur la nature de cette molécule qui peut être utilisée pour stabiliser les protéines ; voir §IV). La cuvette contenant la sonde est éclairée à une longueur d'onde d'excitation de 370 nm. L'émission de fluorescence est détectée à 480 nm. Au-delà de ces conditions de mesures spectroscopiques, le principe de détermination de la CMC reste le même que celui décrit précédemment avec le méthyl orange. Le détergent est ajouté progressivement et précautionneusement dans la cuvette sous agitation. Une augmentation brusque de l'intensité de fluorescence illustre la formation des premières micelles, dans lesquelles la sonde s'incorpore instantanément. Dans les conditions classiques, *i.e.* en absence de bétaine, on retrouve les valeurs de CMC décrites dans la littérature et retrouvées avec le méthyl orange, soit 80 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ pour le DDM et 45 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ pour le C_{12}E_8 . Dans le cas de la bétaine, et contrairement au glycérol, l'addition d'une concentration de 1M de bétaine n'affecte presque pas la CMC (indiquées par les flèches blanches et noires au niveau de l'axe des abscisses).

On peut toutefois faire deux remarques. Tout d'abord, on constate que le niveau de fluorescence initial est systématiquement plus élevé en présence qu'en absence de bétaine (+10%). Il est possible que l'ANS interagisse avec la bétaine et que cette interaction conduise à une durée de vie à l'état excité de l'ANS plus long. Ensuite, comme pour le glycérol, on constate que les pentes des portions de droites après la CMC sont moins grandes en présence qu'en absence de bétaine. On peut dès lors s'orienter vers le même genre d'hypothèse *i.e.* une variation du coefficient de partition apparent de la sonde entre solvant et micelles. La quantité de sonde incorporée dans les micelles serait alors plus faible et s'illustrerait par une augmentation plus « lente » du signal en fonction de la concentration totale de détergent ajouté.

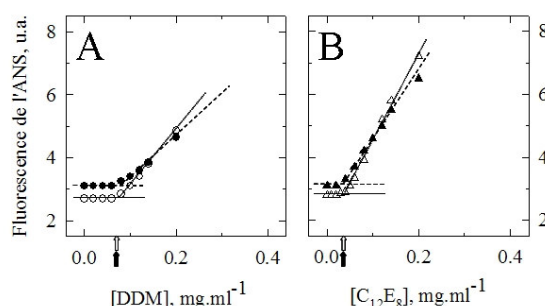


Figure IV.06 : Concentrations Micellaires Critiques du n-dodécyl-β-D-maltopyranoside (DDM, A) et de l'octaéthylène glycol mono-n-dodécyl éther (C_{12}E_8 , B), en présence ou en absence de bétaine : détermination à partir de l'incorporation de l'ANS dans les micelles. La cuvette contient le tampon Mops-Tris 40 mM pH 7, KCl 80 mM à 20°C (symboles vides, lignes pointillées) éventuellement additionné de 1M de bétaine (symboles pleins, tirets). Les longueurs d'onde en excitation et en émission sont réglées à 370 nm et 480 nm respectivement, avec des fentes de 5 nm et 20 nm. On ajoute 1 μM d'ANS au milieu de mesure, et sa fluorescence, alors faible, est cependant déjà bien mesurable (la fluorescence de l'ANS dans le tampon est au moins 20 fois l'intensité du signal de base pour le tampon en absence d'ANS), puis on enregistre l'intensité de fluorescence en continu, en ajoutant progressivement le détergent à partir de solutions stocks à 20 et 200 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$. Les niveaux de fluorescence atteints après chaque ajout sont reportés en fonction de la concentration totale en détergent. Les CMC sont lues sur les abscisses, au niveau des points anguleux (flèches blanches et noires pour les mesures en absence ou en présence de bétaine).

3. Solubilisation des membranes biologiques : approche générale et effet du glycérol sur la solubilisation des membranes de réticulum sarcoplasmique

Comme évoqué précédemment, la solubilisation des membranes biologiques n'est pas un phénomène physique précisément décrit. Sa définition repose surtout sur des critères opérationnels : par exemple, on définit comme matériel solubilisé un mélange dans lequel, à cause de la présence d'une concentration suffisante de détergent, on n'obtient plus de culot dans des conditions de centrifugation où les membranes d'origine, en absence de détergent, peuvent être récupérées. Un autre critère retenu, associé au premier mais non identique, est que les objets solubilisés diffusent beaucoup moins la lumière que les membranes d'origine. En effet, on

observe une clarification de la suspension de membrane lors de la solubilisation. On peut donc utiliser cette propriété spectroscopique pour suivre la solubilisation des membranes, soit par des mesures de leur turbidité à relativement forte concentration (diminution de la transmission de la lumière traversant l'échantillon, à 180°C, à des longueurs d'onde où il n'y a pas de chromophores susceptibles d'absorber la lumière incidente), soit, à concentration plus faible, par des mesures de leur capacité à diffuser la lumière, à 90° par exemple (voir le principe ci-après).

Dans notre cas particulier, nous avons étudié, par diffusion de la lumière à 90°, la capacité des détergents à solubiliser les membranes de réticulum sarcoplasmique préparées à partir du muscle squelettique du lapin (voir [Chap. II](#)).

a. Solubilisation des membranes, étudiée par diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière à 90° résulte de l'interaction d'un rayon lumineux incident avec des particules en suspension. On s'intéresse ici à la diffusion « élastique » de la lumière (sans perte d'énergie, *i.e.* sans changement de la longueur d'onde), aussi appelée diffusion Rayleigh.

Cette mesure de diffusion peut être utilisée pour suivre la clarification d'une suspension de membranes lipidiques sous l'action de concentrations croissantes de détergents ([Jorgensen and Skou 1971](#); [Champeil, Rigaud et al. 1982](#); [Ollivon, Eidelman et al. 1988](#); [de Foresta, le Maire et al. 1989](#); [Kragh-Hansen, le Maire et al. 1993](#); [de Foresta, Legros et al. 1996](#); [Kragh-Hansen, le Maire et al. 1998](#)). Par cette méthode on peut déterminer la Concentration de Solubilisation Critique ou CSC, qui est la concentration minimale de détergent libre en solution pour laquelle on observe la « solubilisation » de l'échantillon de membrane *i.e.* une diminution brusque de la quantité de lumière diffusée attestant de la fragmentation « significative » des membranes. Pour ce type d'expérience, on connaît la quantité totale de détergent que l'on a ajouté à la suspension de membrane. Si l'on connaît la quantité maximale de détergent pouvant être incorporée à ces mêmes membranes ainsi que la quantité de membranes dans l'échantillon, ou si l'on répète la mesure à des concentrations de membranes différentes, on peut déduire la CSC du détergent (voir ci-après). Cette mesure est simple à pratiquer mais son exploitation reste toutefois assez qualitative. En effet, en toute rigueur, la diffusion élastique de la lumière n'obéit pas uniquement à la taille des objets mais aussi à de nombreux paramètres tels que la différence d'indice de réfraction entre le milieu aqueux et la membrane. Pour cette raison, les courbes de diffusion, enregistrées en fonction de la quantité de détergent ajouté, ont souvent des formes composites. Toutefois, il est en général possible, par comparaison avec d'autres types de mesures, de repérer la partie de la courbe correspondant spécifiquement à la solubilisation des membranes ([figure IV.07](#)).

J'ai réalisé ces mesures de diffusion de la lumière à 90° dans un spectrofluorimètre de type *SPEX Fluorolog* (Horiba/Jobin Yvon), en réglant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission toutes deux à 500 nm (avec des fentes de 2 et 5 nm respectivement). La lumière diffusée est captée à 90° (comme la lumière émise lors d'une mesure de fluorescence). La cuvette contient le tampon de mesure et les membranes de réticulum sarcoplasmique, et son contenu est agité en continu à l'aide d'un barreau aimanté, dans un support thermostaté. Si l'on cherche à estimer le moins mal possible la concentration critique de solubilisation (CSC), on doit travailler avec une concentration de membranes la plus faible possible (quelques dizaines de $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) notamment pour des détergents à faible CMC comme le DDM et le C_{12}E_8 . En effet, avant même la solubilisation des membranes, l'insertion progressive des molécules de détergent dans la bicouche lipidique, jusqu'à saturation, peut mobiliser une fraction non négligeable du détergent total ajouté : plus la quantité de membranes est grande et plus la quantité totale de détergent nécessaire à la solubilisation sera élevée par rapport à la valeur de la CSC, et ce d'autant plus, proportionnellement, que la CMC du détergent manipulé sera faible.

L'ajout de détergent est réalisé à partir d'une solution stock concentrée (d'un facteur 100 à 1000, par exemple) pour limiter la dilution du milieu de mesure. Il convient donc de minimiser

les perturbations locales liées à l'addition de cette solution concentrée. Pour cela, on peut choisir d'utiliser un pousse-seringue programmable afin d'ajouter le détergent en continu dans la cuvette à l'aide d'une canule, en vérifiant que la vitesse d'addition est suffisamment lente pour ne pas influencer la solubilisation (Meyer, Ollivon et al. 1992); moins efficacement mais plus simplement, on peut aussi ajouter le détergent le plus lentement possible à l'aide d'une pipette automatique, à proximité du barreau aimanté afin de favoriser un mélange instantané (Paternostre, Roux et al. 1988; de Foresta, Legros et al. 1996). En ce cas, il est indispensable après chaque addition d'attendre que le système se stabilise, et de garder à l'esprit que peuvent se poser des problèmes de dénaturation et d'agrégation des protéines suite à leur exposition transitoire à de fortes concentrations de détergent (Kragh-Hansen, le Maire et al. 1998). C'est ce dernier protocole que nous avons retenu pour les résultats que je présente dans ce paragraphe (figure IV.07).

b. Effet du glycérol sur le pouvoir solubilisant des détergents vis à vis des membranes de réticulum

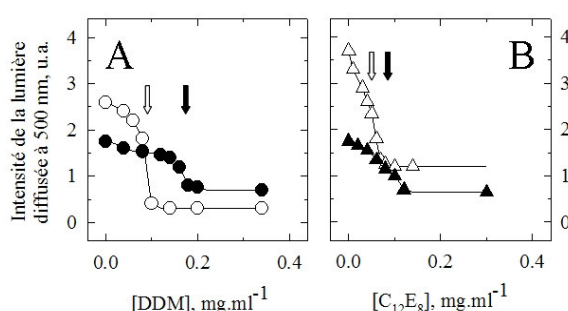


Figure IV.07 : Solubilisation des membranes de réticulum sarcoplasmique par le n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM, panneau A) ou l'octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether (C₁₂E₈, panneau B). Les membranes de SR sont mises en suspension à 20 µg.ml⁻¹ dans un tampon Mops-Tris 40 mM pH 7, KCl 80 mM à 20°C, contenant (symboles pleins) ou non (symboles vides) le glycérol à 40% w/w. Les détergents sont ajoutés lentement et avec précaution, à partir de solutions stock à 20 et 200 mg.ml⁻¹. La diffusion de la lumière à 90° est mesurée en continu à la longueur d'onde de 500 nm en excitation et émission avec des fentes de 2 et 5 nm respectivement. Les valeurs reportées n'ont pas été corrigées pour la dilution (< 1% au final). Les valeurs de CSC estimées sont indiquées par les flèches blanches (en absence de glycérol) et noires (en présence de glycérol).

Les mesures de CMC présentées plus haut (figure IV.06) avaient montré que le glycérol augmentait modérément mais significativement la CMC du DDM et du C₁₂E₈. De façon cohérente, j'ai observé qu'il était nécessaire, pour solubiliser les membranes, d'ajouter une quantité de détergent légèrement plus grande en présence de glycérol qu'en son absence (figure IV.07).

Comme évoqué brièvement ci-dessus, la mesure de la CSC à partir d'une seule expérience de solubilisation reste cependant qualitative. Pour obtenir une valeur plus exacte, il faudrait répéter la mesure à plusieurs concentrations de membranes et extrapoler la droite $CSC = f([membranes])$ pour une concentration de membrane nulle (Lichtenberg, Robson et al. 1983; Lichtenberg 1985). Toutefois, on peut vérifier que les ordres de grandeur trouvés sont raisonnables. En effet, à l'initiation de la solubilisation (comme d'ailleurs pendant toute la durée de l'expérience), on a :

$$[détergent]_{totale} = [détergent]_{libre} + [détergent]_{lié}$$

En présence de $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de SR et si on considère que les membranes peuvent accumuler $0,25 \text{ g}$ de détergent/g de membranes de SR avant d'atteindre la saturation (Andersen, le Maire et al. 1983) et commencer à être solubilisée, on a

$$[\text{détergent}]_{\text{lié}} = 5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$$

La concentration de détergent libre déclenchant la solubilisation des membranes n'est donc *a priori*, à $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de membranes, inférieure que de $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ à la concentration de détergent total en ce point de la courbe. Pour cela, la position des flèches indiquant ici le début de la solubilisation (figure IV.07) n'est guère différente de celle indiquant la CMC dans la figure IV.06. De nouveau, la présence de 40 % de glycérol dans le milieu augmente au plus d'un facteur 2 la quantité de détergent nécessaire pour solubiliser les membranes. La bétaine est, quant à elle, quasiment sans effet (données non présentées ici).

Deux remarques supplémentaires peuvent être faites, suite à ces mesures. D'une part, on constate sur la figure IV.07 que la diffusion de la lumière par les membranes, avant toute addition de détergent, est systématiquement plus faible en présence qu'en absence de glycérol. Cependant, on sait que la diffusion de la lumière par une particule est fonction de la différence d'indice de réfraction entre cette particule et le milieu, et que cette différence d'indice de réfraction est sans aucun doute plus importante entre les membranes et le tampon sans glycérol qu'entre les membranes et le tampon contenant le glycérol. Il est donc compréhensible que la quantité de lumière diffusée soit plus importante en absence de glycérol qu'en sa présence. D'autre part, on constate également que les profils des courbes de solubilisation par les deux détergents sont différents : avant même d'atteindre la CSC, l'addition de DDM affecte moins que l'addition de C_{12}E_8 la diffusion de la lumière. On pourrait imaginer que l'insertion de C_{12}E_8 dans les membranes affecte l'indice de réfraction de celles-ci, différemment de l'insertion du DDM; on se retrouverait alors dans un cas de figure équivalent à celui du glycérol, avec une diminution de la différence des indices de réfraction entre solvant et membranes. Une autre explication possible, qui pourrait s'associer à la précédente, serait que les vésicules de SR changent de morphologie différemment pour les deux détergents suite à l'insertion des molécules de détergent dans la bicouche lipidique : dans le cas du DDM, la phase d'insertion des molécules de détergent dans les membranes de SR, jusqu'à leur solubilisation, s'accompagne initialement d'une transition des vésicules closes (plus ou moins sphérique) vers de larges fragments « ouverts » de membranes (« membrane sheets », (Kragh-Hansen, le Maire et al. 1993)) avant d'aboutir à des micelles mixtes de petite taille. En revanche, pour le C_{12}E_8 , de tels changements de forme n'ont pas été décrits. Il semble aussi que les processus de solubilisation par ces deux détergents soient un peu différents : le C_{12}E_8 extrait préférentiellement les lipides avant de solubiliser les protéines alors que le DDM extrait lipides et protéines simultanément (Kragh-Hansen, le Maire et al. 1993; Kragh-Hansen, le Maire et al. 1998), ce qui pourrait conduire à la formation d'objets de natures distinctes, ayant des propriétés de diffusion de la lumière probablement différentes.

Quoiqu'il en soit, ces mesures préliminaires suggèrent que le glycérol et la bétaine ne bouleversent pas le comportement physico-chimique du DDM et du C_{12}E_8 en solution ou vis-à-vis des membranes de réticulum.

II. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE L'ATPASE- Ca^{2+} SOLUBILISEE EN PRESENCE DE GLYCEROL ET EN ABSENCE DE CALCIUM

1. Préliminaires : que sait-on de l'interaction des détergents avec l'ATPase ?

De nombreuses études ont été réalisées ces trente dernières années sur l'ATPase Ca^{2+} , soit dans les membranes natives de réticulum sarcoplasmique, soit après solubilisation par divers détergents. Cependant, dans ce dernier cas, la plupart de ces études ont été menées en présence de l'ion transporté par la protéine, le calcium, puisqu'il semblait indispensable à sa stabilisation : en effet, l'absence de calcium au niveau des sites de transport, conduit à une inactivation irréversible très rapide de l'ATPase solubilisée (Møller, Lind et al. 1980; Andersen, Møller et al. 1982; McIntosh and Ross 1985; Vilsen and Andersen 1987; Lund, Orlowski et al. 1989; Champeil, Menguy et al. 2000).

L'interaction de l'ATPase du réticulum sarcoplasmique avec des concentrations faibles et non solubilisantes de détergent, *i.e.* inférieures à la CMC et à la CSC, a été largement étudiée. Dans ces conditions « perturbantes » de la membrane, l'ATPase conserve une partie de son activité ATPasique et ne s'inactive pas de façon irréversible (Andersen, le Maire et al. 1983; McIntosh and Davidson 1984; de Foresta, le Maire et al. 1989). Un certain nombre d'études de l'effet sur la catalyse enzymatique de ces doses « perturbantes » de détergent ont donc pu être menées.

La majeure partie des données concernent des détergents non-ioniques, dont les deux plus couramment utilisés pour l'isolement de la protéine que sont le C_{12}E_8 et le DDM (voir les structures dans la figure IV.08).

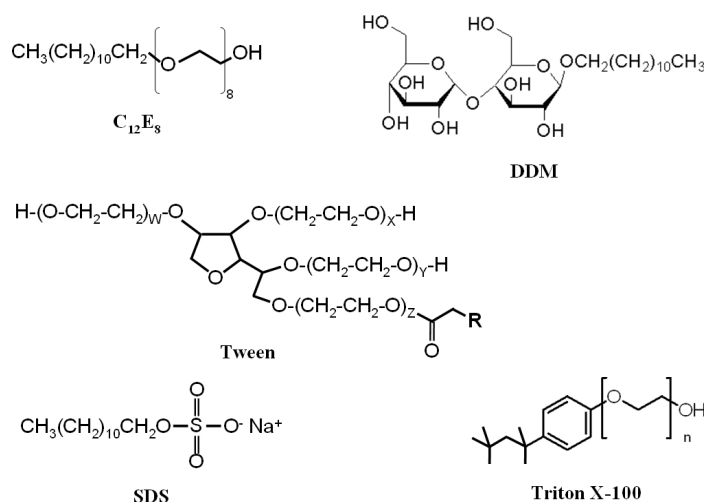


Figure IV.08 : Formules semi-développées de quelques détergents. Le C_{12}E_8 , le Tween et le Triton X-100 sont des détergents non-ioniques possédant des têtes polaires de type polyoxyéthylènes. Le C_{12}E_8 présente une chaîne aliphatique linéaire de 12 carbones de type laurate. La formule C_xE_y sert de base aux mélanges de détergents de type Lubrol ou Brij, avec des longueurs de chaînes aliphatiques (x) et des groupements polyoxyéthylènes (y) de longueurs variables. Le Triton X-100 présente une chaîne aliphatique ramifiée additionnée d'un cycle phényl ; il s'agit d'un mélange de molécules pour lesquelles la taille de la tête polaire n'est pas exactement définie ($n=9-10$). Les détergents de type Tween sont parmi ceux qui possèdent les têtes polaires polyoxyéthylènes les plus volumineuses ($w+x+y+z=20$) : le radical R représente la chaîne aliphatique ; à titre d'exemple, si $\text{R} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}^{2-}$ (laurate), on parle de Tween 20 ; si $\text{R} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}^{2-}$ (oleate), on parle de Tween 80. Le DDM est également un détergent non-ionique classé parmi les alkylglucosides. Il se compose d'une chaîne aliphatique linéaire de 12 carbones de type laurate et d'une tête polaire glucosidique D-maltose. Le SDS est un détergent ionique composé également d'une chaîne aliphatique linéaire de 12 carbones de type laurate, surmontée d'une tête polaire de taille très réduite : un groupement sulfate avec le sodium comme contre-ion.

Historiquement, les travaux se sont tout d'abord portés sur le $C_{12}E_8$. En 1983, Andersen *et al.* mesurent la quantité maximale de $C_{12}E_8$ pouvant être incorporée aux membranes de SR avant leur solubilisation. Ils estiment cette concentration « saturante » à 0,25 g de détergent / g de protéine dans les membranes (pour rappel, le SR contient 0,5 g de lipide / g de protéine d'où une quantité saturante de $C_{12}E_8$ équivalent à 0,5 g de détergent / g de lipide soit ~0,8 mole de $C_{12}E_8$ / mole de lipide et ~50 moles de $C_{12}E_8$ / mole d'ATPase (Andersen, le Maire *et al.* 1983)). Du point de vue du cycle catalytique de l'ATPase, le $C_{12}E_8$ à concentration faible, non solubilisante, augmente la vitesse des transitions entre l'état « E2 » et l'état « Ca_2E_1 » dans les deux sens (mais réduit de façon dramatique l'amplitude des signaux de fluorescence liés à cette transition) tout en ralentissant la vitesse d'hydrolyse de l'ATP. Ce ralentissement est observé aussi bien à pH 7,5 qu'à pH 6, en présence ou non de KCl et quelle que soit la concentration en Mg^{2+} . Le $C_{12}E_8$ semble sans effet sur les étapes de fixation du nucléotide, d'isomérisation et de relargage du Ca^{2+} côté luminal (Champeil, le Maire *et al.* 1986). Néanmoins, il ralentit la vitesse de déphosphorylation de la protéine (et réciproquement la vitesse de phosphorylation par le Pi). Le DDM également a pour effet majeur d'abaisser l'activité ATPasique à pH 7,5 et en présence de 100 mM KCl (de Foresta, le Maire *et al.* 1989). A pH 6 et en absence de KCl, en revanche, les doses perturbantes de DDM n'inhibent pas cette activité, contrairement à ce que l'on observe pour le $C_{12}E_8$. La coopérativité pour la fixation des deux ions Ca^{2+} (Forge, Mintz *et al.* 1993a) est également modifiée par le DDM perturbant (de Foresta, Henao *et al.* 1992), à cause sans doute de l'accélération de la transition de « E2 » vers « Ca_2E_1 ». Dans ces conditions, il est même d'ailleurs possible de différencier clairement la fixation des deux ions Ca^{2+} : une affinité submicromolaire pour le premier, semblable à l'affinité pour le calcium de l'enzyme membranaire, et une affinité bien plus mauvaise de quelques micromolaire voire dizaines de micromolaire, pour le second calcium (de Foresta, Henao *et al.* 1994). Les effets sur les principales transitions du cycle catalytique du DDM et du $C_{12}E_8$ à doses perturbantes sont résumés dans la figure IV.09. A saturation, la quantité de DDM inséré dans les membranes est de l'ordre de 0,8 mole de DDM / mole de lipides, tout comme pour le $C_{12}E_8$ (de Foresta, Henao *et al.* 1992).

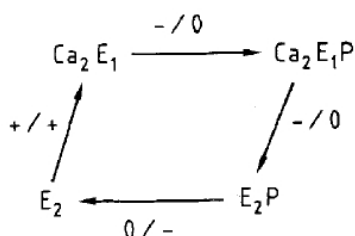


Figure IV.09 : Effet de doses perturbantes de détergent sur la catalyse enzymatique par SERCA1a. Un cycle simplifié reprenant les intermédiaires clefs de la catalyse est représenté ici. Les effets stimulateur (+) ou inhibiteur (-) du DDM et du $C_{12}E_8$ sur les vitesses des quatre principales étapes représentées ici sont indiqués respectivement à gauche et à droite de la barre. L'absence d'effet est représentée par un (0). Figure extraite de (de Foresta, Henao *et al.* 1992).

On trouve également dans la littérature quelques données concernant d'autres détergents comme le Tween 80, le Tween 20, le Lubrol WX et le Brij 99, qui contrairement au DDM et au $C_{12}E_8$, ne sont pas des détergents purs (figure IV.08) (les deux derniers détergents, par exemple, sont des mélanges de détergents de type polyoxyéthylène de structure comparable à celle du $C_{12}E_8$ mais dont les chaînes aliphatiques et les têtes sont de longueurs différentes). Ces mélanges inhibent également l'activité ATPasique lorsqu'ils sont ajoutés à doses perturbantes (de Foresta, le Maire *et al.* 1989). A ce jour, aucune autre étude n'a été publiée concernant l'effet de ces quatre détergents sur l'ATPase, probablement à cause du fait que leur incapacité à solubiliser correctement les membranes biologiques limite leur intérêt.

Le Triton X-100 est autre détergent non-ionique très répandu pour la solubilisation des membranes biologiques et la manipulation des protéines membranaires (pour revue (le Maire, Champeil *et al.* 2000)). Il a notamment été, cette dernière décennie, à l'origine de nombreuses discussions concernant l'existence de radeaux lipidiques (« rafts ») dans les membranes des cellules eucaryotes (pour revue, voir (London and Brown 2000)). Il s'agit également d'un

détergent hétérogène au niveau de sa tête polaire polyoxyéthylène. La partie hydrophobe de ce détergent est une chaîne aliphatique branchée non linéaire (voir la structure dans la [figure IV.08](#)). L'ATPase Ca^{2+} mise en présence de concentrations perturbantes de Triton X-100 présente également d'importantes altérations de son cycle catalytique, dont une baisse de l'activité ATPasique et aussi une diminution de l'affinité pour le calcium ([McIntosh and Davidson 1984](#)).

Enfin, on trouve une série de publications décrivant l'effet de doses perturbantes d'un détergent anionique, le SDS ([figure IV.08](#)), sur l'affinité de l'ATPase pour le calcium et l'hydrolyse d'ATP globale ([Fassold, Hasselbach et al. 1989](#); [Fassold, Hasselbach et al. 1990](#)). Cependant, du fait du fort pouvoir dénaturant de ce détergent, il est peut-être difficile de faire la part entre de réels effets sur la catalyse enzymatique et une inactivation irréversible de la protéine.

2. Stabilisation de l'ATPase- Ca^{2+} solubilisée en détergent, détectée en fluorescence intrinsèque

Il est bien connu depuis de nombreuses années que la fixation des ions calcium aux sites de transport de la protéine se traduit par une augmentation du signal de fluorescence intrinsèque (de quelques pourcent), fluorescence liée essentiellement à la présence de 13 résidus tryptophanes dont 12 au niveau du domaine membranaire ([Dupont 1976](#)). Le panneau A dans la [figure IV.10](#) reprend cette expérience classique : une première addition de 20 μM de Ca^{2+} permet de s'assurer que la quasi-totalité des enzymes seront ensuite saturés en Ca^{2+} , dans la forme « $\text{Ca}_2\text{E1}$ » qui est la forme dont le niveau de fluorescence intrinsèque est le plus élevé. Dans cette expérience, il n'y a cependant pas d'augmentation du signal de fluorescence lors de cette addition, ce qui confirme que le calcium contaminant, de l'ordre de quelques μM , présent dans l'eau utilisée pour la préparation du tampon, était déjà suffisant, à pH 7 et en absence de Mg^{2+} , pour saturer les sites de transport (ce qui reflète bien la forte affinité de l'enzyme pour le Ca^{2+} dans ces conditions). Ensuite, l'addition d'un large excès d'EGTA entraîne une diminution caractéristique du signal, de quelques pourcent. Ce phénomène est réversible puisque qu'une ré-addition progressive de calcium permet de retrouver un signal plus élevé. Cette série d'ajouts successifs (entourée en rouge) permet de titrer l'affinité de la protéine pour le calcium : il faut un peu plus de 0,3 μM de $\text{Ca}^{2+}_{\text{libre}}$ pour atteindre la moitié de l'amplitude du signal ($\text{Ca}_{1/2}$). Cette valeur correspond à l'affinité de la protéine pour le calcium déjà décrite dans la littérature ([Forge, Mintz et al. 1993a](#)).

On notera dans cette expérience la dérive progressive du signal de fluorescence, qui décroît continûment, plus ou moins indépendamment des additions pratiquées. Cette diminution progressive peut être attribuée à plusieurs phénomènes : elle peut refléter soit la photolyse des chromophores liée à l'éclairement intense et continu de l'échantillon (blanchiment), soit l'adsorption des vésicules de membranes sur les parois de la cuvette en quartz et sur le barreau de téflon (se traduisant au fil de la cinétique par une baisse significative de la concentration en protéine au milieu de la cuvette et donc de sa fluorescence), soit l'inactivation d'une partie des protéines. Ces trois phénomènes indépendants peuvent bien sûr avoir lieu simultanément.

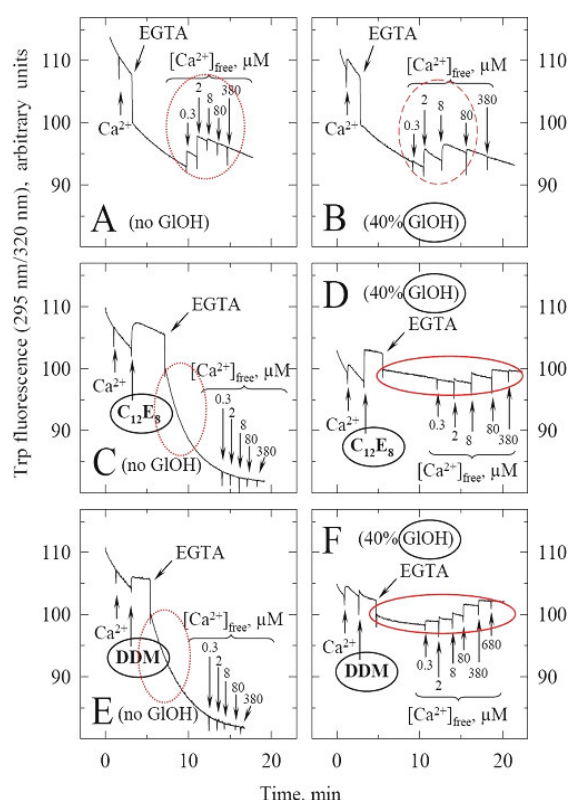


Figure IV.10 : Mesure des changements de fluorescence intrinsèque induits par l'addition de Ca^{2+} à l'ATPase Ca^{2+} , membranaire ou solubilisée par les détergents, en absence ou en présence de glycérol, à pH 7 et en absence de Mg^{2+} . Les membranes de SR sont mises en suspension à $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ dans un tampon Mops-Tris 50 mM pH 7, KCl 100 mM à 20°C , contenant (panneaux B, D & F) ou non (panneaux A, C & E) 40% (w/w) de glycérol. La première étape consiste à ajouter $20 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} afin de saturer les sites de transport (s'ils ne le sont pas déjà à cause des $3\text{-}5 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} contaminant déjà présents dans le tampon). Cette étape est suivie si nécessaire par l'addition du détergent à $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, soit le C_{12}E_8 (panneaux C & D), soit le DDM (panneaux E & F). L'addition de $0,75 \text{ mM}$ d'EGTA permet ensuite de chélater l'ensemble du calcium présent ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} \text{ final} \sim 0,013 \mu\text{M}$), et le niveau de fluorescence atteint est alors arbitrairement désigné comme 100%. Après quelques minutes, des quantités croissantes de Ca^{2+} sont ajoutées pour titrer l'affinité de la protéine (les concentrations approximatives en Ca^{2+} libre sont indiquées sur les figures ; pour les valeurs exactes, consulter les légendes des figures 1 et S1 de (Montigny, Arnou et al. 2008)). Les longueurs d'ondes en excitation et en émission sont réglées à 295 nm et 320 nm, avec des fentes de 5 nm et 10 nm respectivement. Les traces présentées ici ont été choisies parmi plusieurs expériences identiques. Les niveaux de fluorescence ont été corrigés du facteur de dilution correspondant aux différentes additions.

En présence de concentrations solubilisantes de détergent, le résultat est bien différent. En effet, il a été montré que l'enzyme solubilisée en absence de calcium s'inactivait très rapidement, de façon irréversible (Møller, Lind et al. 1980; Andersen, Møller et al. 1982; McIntosh and Ross 1985; Vilsen and Andersen 1987; Lund, Orłowski et al. 1989; Champeil, Menguy et al. 2000). Une fois la protéine extraite de la membrane et entourée des seules molécules de détergent (voire de quelques lipides), l'absence de Ca^{2+} pour structurer et maintenir les hélices transmembranaires proches les unes des autres rend probablement le domaine hydrophobe de la protéine très labile, les molécules de détergent étant très mobiles en comparaison avec les lipides d'une membrane biologique.

Les traces présentées dans les panneaux C et E de la figure IV.10 montrent comment cette inactivation irréversible induite par le détergent se traduit pour le signal de fluorescence des tryptophanes. L'enzyme saturée en calcium est dans un premier temps solubilisée par l'ajout de $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de C_{12}E_8 (panneau C) ou de DDM (panneau E); lorsqu'ensuite l'EGTA est ajouté, la perte de fluorescence initiale et immédiate liée à cet ajout est suivie d'une diminution assez rapide de l'intensité de fluorescence, bien plus rapide que la dérive décrite plus haut. Après

quelques minutes, cette dérive se stabilise, mais on constate que la protéine ne répond plus à l'addition de calcium dans le milieu, parce qu'elle est irréversiblement inactivée.

Je montre ici, dans les panneaux D & F, que l'addition de 40% de glycérol au tampon de mesure permet de protéger la protéine de la dénaturation, la rendant capable de continuer à répondre au calcium et rendant donc possible de nouveau la détermination de son affinité pour cet ion. On remarquera que le glycérol lui-même a peu d'effet sur l'amplitude des signaux induits par le Ca^{2+} et l'EGTA (figure IV.10 & 11 ; voir aussi figure 8 dans (Champeil, Guillain et al. 1985)). Et aussi que l'utilisation simultanée du glycérol et des détergents entraîne une réduction significative de la dérive : il est possible que dans ces conditions les protéines ne s'adsorbent plus que très peu sur les parois de la cuvette.

Notons incidemment que l'ajout de détergent s'accompagne lui-même d'un signal de fluorescence, mais l'interprétation de ce signal est incertaine : i) le détergent peut décrocher les protéines potentiellement adsorbées aux parois de la cuvette ; ii) la clarification de l'échantillon par le détergent peut révéler une partie de l'intensité de fluorescence jusque là masquée par la turbidité des membranes ; iii) enfin seulement, la plupart des tryptophanes se trouvent localisés à l'interface entre membrane et solvant, et un changement brusque de la polarité de leur environnement peut évidemment se traduire par un changement du niveau de fluorescence. Des tryptophanes jusqu'alors exposés au solvant et donc initialement peu fluorescents pourraient se retrouver exaltés par le détergent suite à la solubilisation. A cause de sa complexité probable, je n'exploiterai donc pas ce signal dû au détergent lui-même.

3. Détermination, à partir des signaux de fluorescence intrinsèque, de l'affinité pour le Ca^{2+} de l'ATPase solubilisée

a. à pH 7

L'amplitude des variations de fluorescence, une fois corrigée pour la dilution induite par l'addition de ligands, peut être reportée en fonction de la concentration en calcium libre dans le milieu afin de déterminer plus précisément les valeurs de $\text{Ca}_{1/2}$ (figure IV.11).

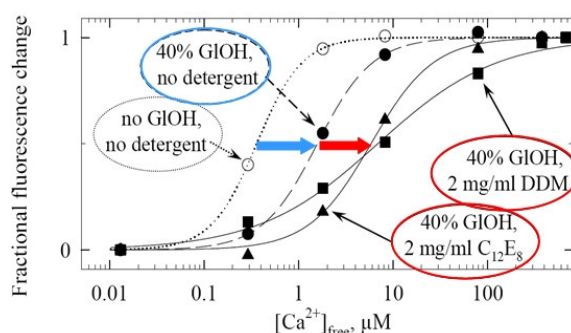


Figure IV.11 : Quantification des changements de fluorescence intrinsèque induits par l'addition de Ca^{2+} à l'ATPase Ca^{2+} , membranaire ou solubilisée par les détergents, en absence ou en présence de glycérol, à pH 7 et en absence de Mg^{2+} . Les amplitudes des variations relatives d'intensité de fluorescence liées aux additions successives de Ca^{2+} sont déduites de la figure IV.10, et reportées en fonction de la concentration en Ca^{2+} libre après normalisation par rapport à la somme des variations dans une condition donnée. Chaque courbe a été ajustée selon une équation de Hill. Les coefficients de Hill obtenus sont 1,8 (ronds blancs, tampon sans glycérol ni détergent), 1,5 (ronds noirs, tampon contenant 40% de glycérol (w/w)), 1,3 (triangle noirs, tampon contenant 40% de glycérol et 2 mg.ml⁻¹ de C_{12}E_8) et 0,7 (carrés noirs, tampon contenant 40% de glycérol et 2 mg.ml⁻¹ de DDM). Du fait du nombre limité de points par titration, ces valeurs ne sont certainement pas précisément déterminées mais elles donnent une idée de la coopérativité relative pour chaque condition. Avant normalisation, les variations maximales de fluorescence étaient respectivement de 6,2, 6,1, 4,6 et 3,2%.

L'affinité apparente à l'équilibre de l'ATPase pour le Ca^{2+} , le $\text{Ca}_{1/2}$, est voisine de $0.4 \mu\text{M}$ dans le tampon à pH 7 en absence de Mg^{2+} . L'ajout du glycérol augmente cette valeur à $2 \mu\text{M}$ (flèche bleue), et réduit donc légèrement l'affinité. Ce résultat est cohérent avec le fait qu'en présence de glycérol, le Ca^{2+} contaminant du milieu n'est plus suffisant pour saturer les sites, comme en atteste dans la [figure IV.10.B](#) l'augmentation de fluorescence obtenue après addition de $20 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . La solubilisation a pour effet de diminuer encore davantage l'affinité ($\text{Ca}_{1/2} = 7 \mu\text{M}$, flèche rouge). Cependant, on remarque que les deux détergents ne produisent pas exactement les mêmes effets : la solubilisation par le DDM semble s'accompagner d'une diminution de la coopérativité (voir également la figure S2 dans [\(Montigny, Arnou et al. 2008\)](#) pour des résultats similaires obtenus en présence de 5 mM de Mg^{2+}).

b. à pH 6

On sait que la présence de protons dans le milieu, à pH acide, s'oppose à la fixation de Ca^{2+} , et à pH acide, l'équilibre entre les formes dites « E1 » (de haute affinité pour le Ca^{2+}) et « E2 » (de basse affinité) est réputé être fortement tiré vers « E2 ». Nous avons donc exploré les propriétés de l'ATPase à pH 6 en espérant initialement mettre en évidence un effet sur la coopérativité, celle-ci étant fortement dépendante de l'équilibre entre les deux formes « E1 » et « E2 » et bien sûr de l'affinité relative des deux Ca^{2+} pour les sites de transport ([Forge, Mintz et al. 1993a](#); [Inesi, Lewis et al. 2008](#)). Je rappelle ici que le pH et la force ionique n'ont que très peu d'influence sur les CMC des détergents non-ioniques, et sont de même sans grand effet sur la solubilisation des membranes de SR par le DDM et le C_{12}E_8 .

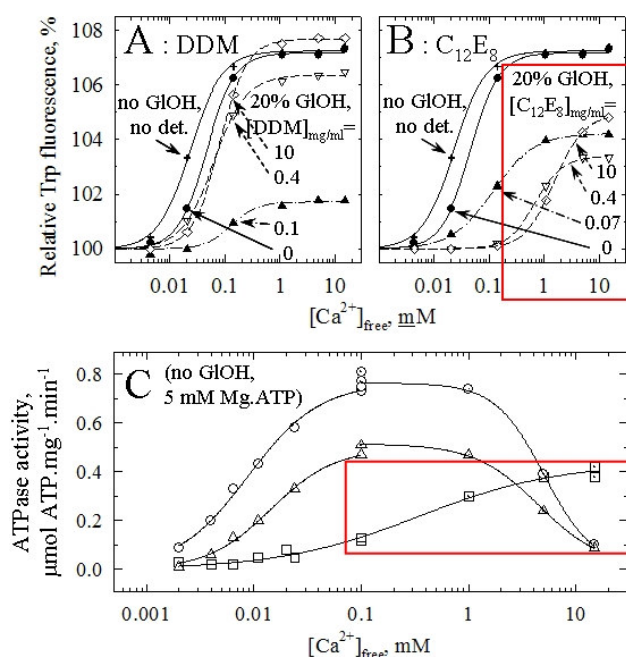


Figure IV.12 : Effet de la solubilisation par le DDM ou le C₁₂E₈ sur l'affinité apparente de l'ATPase pour le Ca²⁺, à pH6. Mesures de fluorescence à l'équilibre (A & B), et mesures d'activité ATPasique à l'état stationnaire (C). Mesures de fluorescence à l'équilibre (A & B) : les membranes de SR sont mises en suspension à 100 μg.ml⁻¹ dans un tampon Mes-Tris 150 mM pH 6, LiCl 100 mM et Mg²⁺ 20 mM à 20°C, contenant ou non 20% (w/w) de glycérol. On titre l'affinité de l'enzyme pour le Ca²⁺ de la même façon que précédemment (voir figure IV.10 & 11 ; voir aussi figure 2A-D dans (Montigny, Arnou et al. 2008)), en tenant évidemment compte de l'influence du pH sur l'affinité de l'EGTA pour le Ca²⁺ (à pH 6, K_{d,EGTA} ~ 40 μM). Ici, les niveaux relatifs de fluorescence (corrigés des dilutions et de la dérive) sont reportés en fonction de la concentration en Ca²⁺_{libre}. Ces titrations sont réalisées sur l'enzyme en absence de glycérol et de détergent (croix, panneau A et B), ou en présence de 20% de glycérol et dans ce dernier cas avec des concentrations croissantes de détergent (de 0 à 10 mg.ml⁻¹), indiquées sur la figure (les points obtenues à 2 mg.ml⁻¹ ne sont pas indiqués dans un souci de clarté ; ils donnent des résultats intermédiaires entre les points à 0.4 et à 10 mg.ml⁻¹), soit du DDM (panneau A), soit du C₁₂E₈ (panneau B). Chaque courbe a été ajustée selon une équation de Hill avec des coefficients compris entre 1,5 et 2. Du fait du nombre limité de points par titration, ces valeurs ne sont certainement pas précises mais donnent tout de même une idée de la coopérativité relative pour chaque condition. Activités ATPasiques à l'état stationnaire (C) : l'activité ATPasique de l'enzyme membranaire (ronds) ou solubilisée avec 2 mg.ml⁻¹ de DDM (triangles) ou de C₁₂E₈ (carrés) a été mesurée à l'aide d'un système d'enzymes couplées (voir Chap. II) dans le tampon Mes-Tris 150 mM pH 6, LiCl 100 mM, Mg²⁺ 20 mM, en absence de glycérol mais dorénavant en présence de 5 mM de Mg.ATP. La mesure est réalisée avec un enzyme à 10 μg.ml⁻¹. La concentration en Ca²⁺ est initialement fixée à 100 μM puis les concentrations plus faibles sont explorées par addition d'EGTA (symboles vides). Les concentrations plus élevées sont atteintes par addition de Ca²⁺ (symboles pointés).

A pH 6 (figure IV.12, A & B), les coopérativités apparentes sont toutes plus fortes qu'à pH 7 (Forge, Mintz et al. 1993a), sans surprise particulière en présence de détergent à dose solubilisante, même avec le DDM. Il n'en va pas de même avec les affinités apparentes trouvées pour le Ca²⁺. En absence de détergent, on retrouve la valeur de Ca_{1/2} attendue à pH 6, de 20 μM (Forge, Mintz et al. 1993a). En présence de 20% de glycérol, l'enzyme perd de l'affinité comme à pH 7, avec une valeur de Ca_{1/2} qui passe à 30 μM. Si on regarde l'effet de concentrations perturbantes de détergent, on voit une réduction significative de l'affinité pour le Ca²⁺, avec des valeurs de Ca_{1/2} de l'ordre de 150 à 200 μM pour les deux détergents, et d'autre part une réduction importante de l'amplitude des changements de fluorescence liés à la fixation de calcium, comme déjà rapporté dans la bibliographie pour le DDM (de Foresta, Henao et al. 1994), le Triton X100 (McIntosh and Davidson 1984) et le SDS (Fassold, Hasselbach et al. 1989). Par contre, si on regarde l'effet de concentrations solubilisantes de détergent, on voit un résultat à la fois inattendu et très surprenant. Alors que la solubilisation complète par le DDM (de 0,4 à 10 mg.ml⁻¹) n'a que peu d'effet sur l'affinité pour le Ca²⁺, avec des valeurs de Ca_{1/2} aux

alentours de 60-70 μM , la solubilisation par le C_{12}E_8 a un effet dramatique sur la fixation du ligand, avec des valeurs de $\text{Ca}_{1/2}$ de l'ordre du millimolaire. De plus, les cinétiques des changements de fluorescence (non montrées ici) révèlent un ralentissement en présence de C_{12}E_8 de la transition liée à l'addition de calcium, suggérant un ralentissement des étapes conduisant à la fixation du ligand ou lui faisant suite (voir figure 2A-D et 3A-B dans (Montigny, Arnou et al. 2008)). Ces deux effets pourraient être dus à un déplacement très significatif vers « E2 » de l'équilibre entre les formes « E1 » et « E2 », déplacement qui serait donc induit par la présence de concentrations solubilisantes de C_{12}E_8 .

4. Confirmation par des mesures d'activité ATPasique de l'effet spécifique du C_{12}E_8 sur l'affinité pour le Ca^{2+} de l'ATPase solubilisée

A ce stade, nous avons souhaité vérifier si cet effet était également visible sur le fonctionnement de l'enzyme, et en présence de KCl et pas seulement de LiCl. Initialement, nous avons remplacé le KCl de nos tampons traditionnels par du LiCl, connu pour favoriser la formation de l'intermédiaire phosphorylé « E2-P » (alors qu'elle est défavorisée par la présence de KCl, parce que le KCl accélère l'étape de déphosphorylation $\text{E2-P} \rightarrow \text{E2}$ (Shigekawa, Dougherty et al. 1978a; Shigekawa and Akowitz 1979; Chaloub and de Meis 1980)) ; de plus, le KCl est indispensable à l'activité de la pyruvate kinase utilisée pour la mesure de l'activité ATPasique avec les enzymes couplées (voir Chap. II).

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure IV.12C. Les mesures d'activité ATPasique ont été réalisées dans le milieu Mes-Tris 150 mM pH 6, KCl 100 mM et 20 mM Mg^{2+} à 20°C, et en absence de glycérol malgré ce qui a été dit précédemment sur le rôle protecteur du glycérol. Au cours de la catalyse, l'ATPase passe par un certain nombre de formes où les sites de transport ne contiennent pas de calcium, et on pourrait donc craindre que ces formes ne soient rapidement inactivées en présence de concentrations solubilisantes de détergent. Il est toutefois possible, pour ces mesures d'activité, de s'affranchir de la présence du glycérol, parce que la concentration élevée en nucléotide y protège déjà l'ATPase de l'inactivation (Møller, Lind et al. 1980; Martin, Tanford et al. 1984).

En membrane (figure IV.12C, ronds), on retrouve une phase classique d'activation de l'activité ATPasique par le Ca^{2+} avec une affinité apparente à l'état stationnaire de l'ordre de 8 μM , suivie d'une phase d'inactivation réversible (l'activité ATPasique est inhibée par des concentrations trop élevées en calcium, d'une part à cause de la compétition entre $\text{Mg}.\text{ATP}$ et $\text{Ca}.\text{ATP}$ au niveau du site catalytique (car le $\text{Ca}.\text{ATP}$ est un substrat moins bien hydrolysé que le $\text{Mg}.\text{ATP}$), et d'autre part, par l'éventuelle fixation de Ca^{2+} sur les sites de transport du côté luminal, avec une affinité faible (ceci est cependant probablement négligeable à pH 6). En présence de DDM (triangles), on retrouve un profil assez semblable, avec une vitesse maximale d'hydrolyse un peu plus faible (voir ci-après) et une affinité apparente pour le calcium seulement légèrement réduite avec $\text{Ca}_{1/2} \sim 20 \mu\text{M}$; ce déplacement de l'affinité apparente à l'état stationnaire est du même ordre de grandeur que celui observé à l'équilibre. En revanche, en présence de C_{12}E_8 (carrés), on constate de nouveau, comme à l'équilibre en présence de glycérol, un déplacement très important du $\text{Ca}_{1/2}$ vers des valeurs de l'ordre du millimolaire. Pourtant, la vitesse maximale d'hydrolyse n'est pas très différente de celle observée avec le DDM. Les résultats de fluorescence intrinsèque sont donc pleinement confirmés par les mesures d'activité ATPasique.

5. Détermination, à partir des signaux de fluorescence intrinsèque, de l'affinité pour le $\text{Mg}.\text{ATP}$ de l'ATPase solubilisée

Nous venons de voir que le DDM et le C_{12}E_8 à concentrations solubilisantes influençaient de façon différente la transition de la forme « E2 » vers « $\text{Ca}_2.\text{E1}$ », comme le montrent les effets de ces détergents sur la coopérativité (figure IV.11) et sur l'affinité (figure IV.12) de l'enzyme

pour le Ca^{2+} . A partir des signaux de fluorescence des tryptophanes, il est possible également de déterminer, en absence de Ca^{2+} , l'affinité de l'enzyme pour l'ATP. Nous avons choisi de réaliser cette mesure à pH 7, un pH plus acide étant moins favorable à la fixation de nucléotides (Lacapère, Bennett et al. 1990).

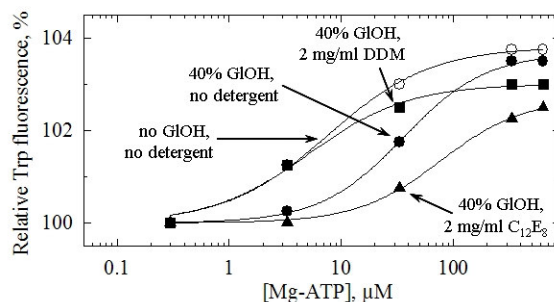


Figure IV.13 : Changements de fluorescence intrinsèque induits par l'addition de Mg.ATP à l'ATPase Ca^{2+} , membranaire ou solubilisée par les détergents, en absence ou en présence de glycérol, à pH 7 et en présence de 5 mM Mg^{2+} . Les membranes de SR sont mises en suspension à $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ dans un tampon Mops-Tris 50 mM pH 7, KCl 100 mM et 5 mM Mg^{2+} à 20°C (ronds blancs), éventuellement en présence de 40% de glycérol (w/w, ronds noirs) et éventuellement solubilisées par $2 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ de DDM (carrés noirs) ou de C_{12}E_8 (triangles noirs). Les variations d'intensité de fluorescence liées aux additions successives de Mg.ATP (pour les traces originales, voir figure 7 dans (Montigny, Arnou et al. 2008)) sont reportées en fonction de la concentration en Mg.ATP ajoutée. Les différentes courbes ont été ajustées selon une équation de Hill dont les coefficients s'avèrent être proches de 1 (à $\pm 0,15$ près).

L'affinité pour l'ATP en absence de glycérol, déterminée ici (figure IV.13) en présence de 5 mM de Mg^{2+} et à pH 7, est de l'ordre de quelques μM , ce qui correspond à ce que l'on peut trouver dans la littérature (Lacapère, Bennett et al. 1990). L'addition de glycérol au milieu diminue cette affinité ($\text{Mg}.\text{ATP}_{1/2} \sim 30 \mu\text{M}$). La solubilisation par le C_{12}E_8 accentue cette perte d'affinité ($\text{Mg}.\text{ATP}_{1/2} \sim 90 \mu\text{M}$). En revanche, la solubilisation par le DDM conduit à un effet inverse, avec un retour vers une affinité de quelques micromolaires, malgré la présence du glycérol. Comme la forme « E2 » est réputée (au moins dans le cas de la Na^+,K^+ -ATPase) avoir moins d'affinité pour l'ATP que la forme « E1 », ce résultat est bien compatible avec l'hypothèse formulée plus haut d'un déplacement de l'équilibre « E2-E1 » vers « E2 » en présence de C_{12}E_8 , mais non en présence de DDM.

III. APPLICATION A L'ETUDE, AVANT CRISTALLISATION, DES ENZYMES RECOMBINANTS SERCA1A SAUVAGE (WT) OU MUTES (D351A ET P312A), EXPRIMES DANS LA LEVURE *S. CEREVISIAE*

L'utilisation de la mutagenèse dirigée pour évaluer l'importance des différents résidus dans la catalyse enzymatique est un outil d'une grande puissance, qui a été largement utilisé pour l'ATPase-Ca²⁺. Toutefois, en absence de données structurales, l'interprétation des résultats obtenus avec les mutants est toujours sujette à discussion, car il est difficile de savoir si la mutation introduite n'a eu un impact que sur l'équilibre entre des conformations semblables à celles rencontrées pour l'enzyme sauvage, ou bien si cette mutation a impliqué également un changement local (voire global) de structure qui est bien davantage à l'origine du dysfonctionnement observé. Dès lors, l'obtention de la structure à résolution atomique de certains mutants doit nécessairement venir compléter les études fonctionnelles.

Sur la base du protocole d'expression hétérologue de l'ATPase-Ca²⁺ sauvage dans la levure *S. cerevisiae* qui a déjà permis la cristallogénèse de cette ATPase recombinante sauvage et la vérification que sa structure était identique à celle de l'ATPase préparée à partir du muscle de lapin (Jidenko, Nielsen et al. 2005; Jidenko, Lenoir et al. 2006; Cardi, Montigny et al. 2009), nous avons exprimé et purifié divers mutants : le mutant E309Q, où l'un des sites de fixation du calcium est modifié (voir §V.2 et (Montigny, Picard et al. 2007)), et deux autres mutants décrits comme bloquant l'ATPase dans certaines étapes particulières de son cycle catalytique : le mutant D351A où l'aspartate impliqué dans la catalyse enzymatique est remplacé par une alanine, empêchant ainsi la phosphorylation par l'ATP et donc bloquant l'ATPase dans un état « Ca₂.E1.ATP » ; le mutant P312A où une proline de l'hélice M4 du domaine membranaire est remplacée par une alanine, cette mutation ralentissant le cycle catalytique et notamment l'étape de transconformation de la forme « Ca₂.E1~P.ADP » vers la forme « E2P » (Marchand, Winther et al. 2008).

Ma contribution pratique dans ce projet a consisté dans un premier temps à assister Alexandre Marchand, qui effectuait son post-doc au laboratoire, dans les étapes d'expression et de purification des mutants. La transposition du protocole d'expression de l'enzyme sauvage aux enzymes mutés n'a pas présenté de difficultés particulières : le niveau d'expression de ces deux mutants a été du même ordre de grandeur que celui de l'ATPase sauvage, et nous avons pu procéder à la purification des ATPases recombinantes mutées sans mise au point supplémentaire. Ensuite, nous avons utilisé les techniques de spectrophotométrie de fluorescence pour confirmer ou décrire quelques aspects fonctionnels de ces mutants (fixation du calcium, affinité pour les nucléotides en présence ou en absence de calcium). Tirant profit de ce que nous avons observé avec les membranes de réticulum de lapin solubilisées en détergent, pour lesquelles l'ATPase se trouvait stabilisée par le glycérol (voir ci-dessus), nous avons pu travailler directement sur les enzymes récupérés en fin de purification sous forme solubilisée, sans passer par leur reconstitution en milieu lipidique : l'utilisation de 20 ou 40 % de glycérol au cours des mesures a permis de stabiliser les enzymes solubilisés, même en absence de calcium (voir §II.2 ainsi que (Montigny, Arnou et al. 2008)).

1. La mutation de l'aspartate catalytique en alanine s'accompagne d'une augmentation de l'affinité pour le nucléotide sans pour autant affecter l'affinité pour le calcium

On a déjà dit que l'aspartate D351 de l'ATPase Ca^{2+} était indispensable à la catalyse enzymatique (Allen and Green 1976) : sa phosphorylation par l'ATP conduit à la formation de l'intermédiaire énergisé « $\text{Ca}_2\text{.E1}\sim\text{P}$ », l'énergie de la liaison acylphosphate formée étant ensuite utilisée pour la réorientation des sites de transport vers le lumen (Maruyama and MacLennan 1988). Plus récemment, il a été démontré que la mutation de cet aspartate entraînait une augmentation de l'affinité de l'ATPase pour le nucléotide : l'absence de la chaîne latérale anionique du résidu dans la poche catalytique semble supprimer la répulsion électrostatique que doit affronter le phosphate γ de l'ATP dans l'enzyme sauvage (McIntosh, Woolley et al. 1999). L'une des manifestations de cette mutation est par exemple l'augmentation de l'affinité avec laquelle le nucléotide protège l'ATPase vis-à-vis d'une protéolyse. Dans l'enzyme sauvage, la fixation du nucléotide dépend évidemment aussi de nombreux autres résidus, dont la présence contrebalance certainement la répulsion électrostatique mentionnée ci-dessus ; il est probable que dans l'enzyme muté, l'absence de l'aspartate et de son carboxyle renforce aussi l'interaction du nucléotide avec ces autres résidus, augmentant ainsi le degré de compaction du domaine cytosolique et par là même sa résistance aux protéases (Ma, Inesi et al. 2003). Toutefois, rien ne permet d'exclure avec certitude que cette mutation puisse être seulement responsable d'un changement local de conformation, qui aurait les mêmes effets sur l'affinité pour le nucléotide et la sensibilité à la protéolyse.

A l'aide des mesures de fluorescence intrinsèque, nous avons d'abord montré que cette mutation n'affectait pas l'affinité de l'enzyme pour le calcium, quelque chose qui n'avait pas été vérifié jusqu'ici. Puis, comme attendu, nous avons retrouvé que l'affinité à l'équilibre du mutant pour l'ATP (en absence de Ca^{2+}) était en revanche bien meilleure que celle du sauvage, puisque la constante de dissociation apparente passe de 2 à 3 μM pour le sauvage à moins de 0,3 μM pour le mutant. En outre, il a été pour la première fois possible avec ce mutant de mesurer l'affinité à l'équilibre de l'ATPase pour l'ATP *en présence* de Ca^{2+} , condition dans laquelle l'ATPase sauvage hydrolyserait le nucléotide immédiatement : que ce soit en présence ou en absence de Ca^{2+} , ce mutant voit son affinité pour le Mg.ATP passer de quelques micromolaires à moins de 0,3 μM , suggérant que l'élimination de la chaîne latérale de l'aspartate permet effectivement une meilleure fixation du nucléotide.

Le mutant D351A a pu être cristallisé en présence de Ca^{2+} et d'AMPPCP, comme l'avait été l'enzyme recombinant sauvage (Jidenko, Nielsen et al. 2005), mais également en présence de calcium et d'ATP, ce mutant étant incapable d'hydrolyser le nucléotide. La cristallographie a révélé que la structure globale de ce mutant était comme espéré identique à celle de la protéine sauvage, à la mutation près de l'aspartate par une alanine. La partie nucléoside de l'ATP (adénine + désoxyribose) vient occuper sur le mutant la même position que l'AMPPCP. Cette structure, finalement sans grande surprise, a permis de confirmer l'hypothèse proposée près de 10 ans plus tôt selon laquelle l'absence de charge négative dans le mutant D351A serait à l'origine de sa plus grande affinité pour le nucléotide (McIntosh, Woolley et al. 1999).

Incidemment, les mesures ont permis de remarquer que sur le mutant, c'est-à-dire même en absence de l'aspartate 351, l'addition de magnésium à la protéine dépourvue de calcium se traduisait toujours par une augmentation du signal de fluorescence intrinsèque. Comme il a été dit précédemment (voir Chap. III, §II.1), la nature de ce signal « Mg^{2+} » a fait l'objet de nombreuses spéculations, et il pouvait par exemple être attribué à une fixation du magnésium soit au domaine cytosolique, dans la poche de fixation du nucléotide, soit au site de transport du calcium (Guillain, Gingold et al. 1982; Champeil, Gingold et al. 1983). Ici, la fixation dans la poche catalytique semble improbable en absence du groupement carboxylate de l'aspartate

D351, ce qui suggère une fixation du magnésium ailleurs sur la protéine. Comme il a aussi été montré que la mutation en glutamine du glutamate E309 (un résidu indispensable du site de transport II), n'empêchait pas non plus les tryptophanes de répondre à l'addition de magnésium (Lenoir, Jaxel et al. 2006), tout ceci suggère l'existence d'un site de fixation du magnésium encore ailleurs : par exemple le site de fixation du manganèse observé dans la récente structure « E2.CPA.Mn²⁺ » et précédemment discuté ((Laursen, Bublitz et al. 2009), voir Chap. III, §II.2), ce site pouvant correspondre à un éventuel site d'approche des ions calcium vers leurs sites de fixation avant transport.

2. La flexibilité de l'hélice transmembranaire M4 est peut-être un facteur limitant dans la transition « Ca₂.E1~P » → « E2-P »

Le résidu proline P312 est situé à proximité de l'interface membrane-cytosol, sur la partie non-structurée de l'hélice M4, juste en aval du résidu E309 impliqué dans la coordination du calcium au site de transport II. Sa mutation en alanine entraîne un ralentissement très important de la transition entre l'état « Ca₂.E1~P », dans lequel les ions calcium sont occlus, et l'état « E2-P » où les ions calcium sont normalement libérés du côté luminal (Vilsen, Andersen et al. 1989). Les signaux de fluorescence intrinsèque montrent que l'affinité de ce mutant pour le calcium est proche de celle de l'enzyme sauvage (Marchand, Winther et al. 2008).

Le mutant P312A a été cristallisé en présence de Ca²⁺, d'ADP et d'aluminium fluorure, *i.e.* dans un état proche de l'état de transition précédant la phosphorylation par l'ATP. Comme pour le mutant D351A, la superposition de la structure du mutant P312A avec celle de l'enzyme sauvage cristallisé dans la même conformation n'a pas mis en évidence d'importants changements structuraux.

En revanche la superposition des structures Ca₂.E1.ADP avec celle de l'analogue « E2.BeF₃ » de l'état « E2-P » ((Olesen, Picard et al. 2007; Toyoshima, Norimatsu et al. 2007)) a révélé, comme déjà dit, un basculement de la partie basse de l'hélice M4 lors de l'ouverture des sites de transport côté luminal, cette rupture de l'hélice ayant lieu précisément au niveau même du résidu P312 dans la partie non-structurée de M4.

La question soulevée était dès lors de savoir si la mutation P312A pouvait empêcher l'enzyme mutée d'atteindre l'état « E2-P » où les sites de transport sont ouverts côté luminal, un ralentissement de cette ouverture pouvant peut-être induire un ralentissement de la transition « Ca₂.E1~P → E2-P ». Pour répondre à cette question, Johannes Clausen a utilisé ici (Marchand, Winther et al. 2008) le fait que la phosphorylation par le Pi dépend de la présence d'un gradient de calcium (Beil, von Chak et al. 1977; Punzengruber, Prager et al. 1978), la fixation de calcium depuis le lumen favorisant la transition inverse « E2-P → Ca₂.E2-P → Ca₂.E1~P » : les vésicules de réticulum sont dans un premier temps « chargées » passivement avec du calcium (par incubation pendant 18h), puis le calcium resté à l'extérieur des vésicules est chélaté par l'EGTA, dans un milieu propice à la phosphorylation par le phosphate inorganique « E2 → E2-P ». La quantité d'enzyme phosphorylée a été déterminée, après arrêt acide, pour différentes concentrations de calcium luminal. C'était la première fois que ce type d'essai était réalisé sur une ATPase recombinante.

Le résultat de l'expérience a été que, tout comme l'enzyme sauvage, le mutant P312A se phosphorylait mieux en présence qu'en absence de Ca²⁺ luminal, ce qui impliquait que la mutation *n'empêchait pas* l'ouverture vers la lumière des sites de transport de la forme Ca₂.E2-P. Aucune des formes explorées au cours de la transition « Ca₂.E1~P → E2-P » n'est donc interdite dans le mutant : le cycle catalytique est certes très ralenti mais toutes les étapes semblent possibles, que ce soit dans le sens normal de la catalyse ou dans le sens inverse (Vilsen, Andersen et al. 1989; Marchand, Winther et al. 2008). Dans les conditions utilisées, la

phosphorylation par le Pi en présence d'un gradient de calcium s'est même révélée être pour le mutant maximale dès 2 à 3 mM de calcium luminal, alors qu'il faut plus de 20 mM pour le sauvage, suggérant que l'affinité des sites de transport du côté luminal est même meilleure pour le mutant.

L'hélice M4 du domaine membranaire est rompue en son milieu par la séquence ³⁰⁸PEGLP³¹² : le remplacement de la proline 312 par une alanine entraîne sans doute une réorientation du résidu E309Q se trouvant dans ce motif, rendant peut-être plus facile la fixation du calcium depuis le lumen. En tout cas, cette plus forte affinité rend l'enzyme mutée plus sensible à la rétroinhibition par le calcium luminal, ce qui pourrait éventuellement expliquer en partie le ralentissement de cette étape « Ca₂.E1~P → E2-P ».

Lors de ce travail, il a été choisi, par souci de simplification, de cristalliser l'enzyme en présence d'AlF₄ et d'ADP, donc dans une forme analogue de l'état « Ca₂.E1~P ». Avec l'obtention récente de la structure E2.BeF₃, qui a révélé pour la première fois la structure du domaine membranaire ouvert du côté luminal, il serait envisageable de cristalliser ce mutant P312A dans les mêmes conditions, si on suspecte un effet de cette mutation sur l'architecture des sites de transport ouverts.

3. De l'expression hétérologue des protéines membranaires à leur cristallisation ?

L'obtention de quantités suffisantes de mutants pour la cristallogénèse n'est pas un événement banal dans le domaine des protéines membranaires, particulièrement pour celles d'origine eucaryote. Même si les techniques de cristallogénèse et cristallographie ont fait d'énormes progrès ces dernières années, y compris dans le domaine des ATPases de type P (Sorensen, Olesen et al. 2006), la plupart des protéines membranaires d'organismes eucaryotes cristallisées à ce jour proviennent de source naturellement enrichies. Les deux premières structures à résolution atomique de protéines membranaires de mammifères, exprimées en systèmes hétérologue (l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a, (Jidenko, Nielsen et al. 2005), et le canal voltage-dépendant Kv1.2, (Long, Campbell et al. 2005)), n'ont été obtenues qu'en 2005. La combinaison de la cristallogénèse de mutants aux résultats déjà disponibles de mutagenèse dirigée permettra peut-être d'aller un peu plus loin dans l'interprétation de ces derniers résultats, permettant de préciser si les dysfonctionnement mis en évidence sont bien liés uniquement à la modification de l'acide aminé muté ou bien si ce changement a entraîné un plus vaste changement de conformation.

IV. UTILISATION D'UN AUTRE AGENT STABILISANT POTENTIEL : LA BÉTAÏNE

Comme rappelé plus haut, il existe de nombreuses molécules utilisées en biochimie pour stabiliser les protéines, solubles ou membranaires, lors de leur isolement. Dans le cas des protéines membranaires, ces agents stabilisants peuvent devenir nécessaires en présence de détergents, dans des conditions où l'inactivation irréversible de ces protéines est parfois très rapide (Dean and Tanford 1978; Møller, Lind et al. 1980; Murphy, Pepitone et al. 1982; Pikula, Mullner et al. 1988). Le glycérol est sans doute (avec le saccharose) la molécule la plus utilisée, mais il existe d'autres molécules qui sont des stabilisants potentiels. La N,N,N-triméthylglycine (ou glycyl bétaïne, ou plus simplement bétaïne) est l'une d'entre elles. Dans le règne végétal, cette molécule, que l'on retrouve notamment dans la betterave à sucre (*Beta vulgaris*, dont la bétaïne a hérité son nom), joue aussi bien le rôle d'osmorégulateur que de cryoprotectant (pour revue, voir (Chen and Murata 2008)). On la rencontre également dans le règne animal, chez certains mollusques et poissons cartilagineux, où elle semble contrebalancer l'effet de concentrations élevées d'urée dans le sang (voir ci-après et (Yancey and Somero 1979; Yancey, Clark et al. 1982)). En laboratoire, ces propriétés stabilisatrices ont été confirmées pour de nombreuses protéines. En premier lieu, la bétaïne a été décrite comme pouvant favoriser l'expression de certaines protéines chez les procaryotes : la surexpression de protéine entraîne très souvent des problèmes de repliement conduisant à la formation de corps d'inclusion, mais l'accumulation par la bactérie de bétaïne, présente à quelques millimolaires dans le milieu de culture et jusqu'à plusieurs centaines de millimolaires dans le cytosol, s'avère stabiliser les protéines néosynthétisées et améliorer leur repliement (Blackwell and Horgan 1991; Tate, Haase et al. 2003; Oganessian, Ankoudinova et al. 2007). D'autre part, la bétaïne à concentration molaire est parfois utile lors de l'isolement des protéines : en ce qui concerne des systèmes membranaires, sa présence est essentielle pour maintenir certains complexes actifs lors de leur isolement en présence de détergents (Murata, Mohanty et al. 1992; Boussac, Rappaport et al. 2004). L'une des manifestations de cette stabilisation est l'élévation de la température de dénaturation de la protéine (Santoro, Liu et al. 1992), qui peut s'expliquer par une augmentation de son degré de compaction, qui limite l'accès de l'eau au cœur de la molécule. Enfin, la bétaïne, comme d'autres agents stabilisants, fait partie des composés pouvant intervenir comme additifs lors de la cristallogenèse des protéines (Jeruzalmi and Steitz 1997; Oganessian, Ankoudinova et al. 2007), et on la retrouve (mais à concentration plus modérée), dans certains kits commerciaux (pour exemple : « Hampton Additive Screen II », Hampton Research).

En ce qui concerne plus précisément les ATPases de type P, c'est le rôle de protection de la bétaïne vis-à-vis de l'urée qui a été le plus étudié. Les poissons marins sont exposés en permanence à un milieu contenant une concentration élevée en sels. De ce fait, en absence de processus physiologique permettant de compenser cette différence de concentration, ces organismes auraient tendance à perdre par osmose une grande quantité d'eau, essentiellement au niveau des branchies. Certains mollusques et poissons cartilagineux, comme le requin ou la raie, ont développé un mécanisme particulier d'osmorégulation : au lieu d'évacuer l'urée dans les urines, ils l'accumulent dans le sang jusqu'à établir une différence de pression osmotique la plus faible possible avec le milieu externe. La concentration en urée peut alors y atteindre plusieurs centaines de millimolaires. Mais l'urée est un agent dénaturant puissant des protéines : la présence, dans le même temps, de concentrations élevées de bétaïne (typiquement 200 mM) semble lutter contre cet effet délétère de l'urée (Yancey and Somero 1979; Yancey, Clark et al. 1982). Un effet protecteur de la bétaïne vis à vis de l'urée a déjà été démontré sur les membranes de réticulum sarcoplasmique contenant l'ATPase- Ca^{2+} qui nous intéresse (de Meis and Inesi 1988; Chini, de Faria et al. 1992), et aussi sur l'ATPase- Ca^{2+} de la membrane plasmique des érythrocytes (Coelho-Sampaio, Ferreira et al. 1994). En ce qui concerne ses effets sur la catalyse enzymatique par l'ATPase, la bétaïne, comme d'autres méthylamines, semble agir en

augmentant l'affinité de l'ATPase pour le phosphate inorganique, comme le font le glycérol ou le DMSO (de Meis, Martins et al. 1980; de Meis and Inesi 1988).

Dans le prolongement des résultats que nous avons obtenus précédemment avec le glycérol, nous avons recherché les éventuelles propriétés stabilisatrices de la bétaine. L'intérêt était d'une part de trouver une alternative au glycérol pour les protocoles de purification où la viscosité du glycérol limite les débits durant les étapes de chromatographie et ralentit considérablement la concentration de la protéine par ultrafiltration. D'autre part, la bétaine pourrait tout comme le glycérol être utilisée dans les procédures de cristallo-genèse qui se déroulent sur plusieurs jours, et faire ainsi éventuellement apparaître, nous l'espérons, de nouvelles formes cristallisées de l'ATPase- Ca^{2+} .

1. Protection par la bétaine de l'ATPase solubilisée en absence de Ca^{2+}

Comme je l'ai décrit plus haut, l'ATPase- Ca^{2+} solubilisée en absence de calcium est particulièrement labile et s'inactive en quelques minutes (Lund, Orlowski et al. 1989). Nous avons voulu tester le pouvoir de stabilisation de la bétaine en absence de Ca^{2+} . Après un temps donné d'incubation de la protéine, solubilisée ou non, en absence de calcium et en présence ou non de bétaine, j'ai donc testé son activité ATPasique résiduelle (voir Chap.II ; (Møller, Lind et al. 1980; Andersen, Møller et al. 1982; McIntosh and Ross 1985; Vilsen and Andersen 1987; Swoboda and Hasselbach 1988; Lund, Orlowski et al. 1989; Champeil, Menguy et al. 2000)), et reporté celle-ci, sur une échelle semi-log (l'activité résiduelle décroît *a priori* selon une loi exponentielle), en fonction du temps. La pente de la droite obtenue nous informe sur la constante de vitesse d'inactivation irréversible de la protéine.

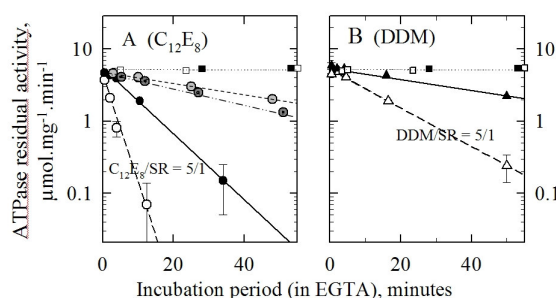


Figure IV.14 : Inactivation irréversible de l'ATPase Ca^{2+} solubilisée en absence de Ca^{2+} , et protection par la bétaine (et le glycérol). Les membranes de SR sont mises en suspension à $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ dans un tampon Tes-Tris 50 mM pH 7,5, KCl 100 mM et 1 mM Mg^{2+} à 20°C (tampon A), en absence de Ca^{2+} ($0,1 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ et 1 mM EGTA, $\text{Ca}^{2+}_{\text{libre}} \sim 5 \text{ nM}$), en présence ou non de $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de détergent (C_{12}E_8 ou DDM), additionné ou non de 20 % de glycérol (w/w) et/ou de 1M de bétaine. Après différents temps d'incubation, un aliquot est dilué 250 fois dans le milieu de mesure d'activité ATPasique (contenant $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de C_{12}E_8). Dans les deux panneaux, les carrés représentent les incubations en absence de détergent, dans un tampon sans additif (carrés blancs) ou contenant la bétaine (carrés noirs). *Panneau A* : ronds, incubation en présence de C_{12}E_8 , détergent uniquement (ronds blancs) ou en présence également de bétaine (ronds noirs), de glycérol (ronds grisés clairs) ou de bétaine et de glycérol simultanément (ronds pointés gris foncés). *Panneau B* : triangles, incubation en présence de DDM, détergent uniquement (triangles blancs) ou en présence également de bétaine (triangles noirs). Pour plus de clarté, les points obtenus pour l'enzyme solubilisée en DDM en présence de glycérol n'apparaissent pas sur la figure, l'inactivation observée dans cette condition étant semblable à celle de l'enzyme membranaire. Les points sont issus de plusieurs expériences indépendantes ; les valeurs d'activité sont corrigées de la valeur de l'activité Ca^{2+} -indépendante (mesurée après addition d'un excès d'EGTA). Durant la mesure finale de l'activité ATPasique, la concentration de bétaine dans la cuvette n'excède pas 4 mM ; j'ai vérifié que l'activité ATPasique reste stable jusqu'à 600 mM de bétaine.

La figure IV.14 présente l'inactivation au cours du temps de l'enzyme incubée en absence de calcium. En absence de détergent, comme attendu malgré l'absence de calcium, l'enzyme incubée est parfaitement stable au cours du temps, en présence ou non de bétaine. L'enzyme solubilisée en détergent, par contre, s'inactive (plus rapidement en C_{12}E_8 qu'en DDM dans nos conditions de pH, à pH 7,5, voir (Lund, Orlowski et al. 1989)). L'addition de 20 % de glycérol ralentit fortement cette inactivation de la protéine (Vilsen and Andersen 1987; Swoboda

and Hasselbach 1988; Montigny, Arnou et al. 2008). La protection par la bétaine dans ces conditions est plus limitée mais bien réelle: le $t_{1/2}$ d'inactivation augmente d'un facteur 3 à 4 en présence de 1 M bétaine (en présence de glycérol, ce même $t_{1/2}$ augmente d'un facteur 15 à 20). La protection par ces deux stabilisants n'est cependant pas une propriété additive : un mélange de 1 M bétaine avec 20% de glycérol ne protège en effet pas mieux l'ATPase, avec peut-être même une inactivation plus rapide qu'en présence uniquement de glycérol.

2. Protection par la bétaine de l'ATPase solubilisée en présence de Ca^{2+}

La purification des ATPases recombinantes est réalisée en présence de concentrations solubilisantes de détergents, mais toujours en présence de calcium (Jidenko, Lenoir et al. 2006). Nous avons donc voulu tester également un possible effet protecteur de la bétaine dans des conditions proches de celles de cette purification. L'enzyme a donc été incubée pendant un temps donné en présence de calcium, solubilisée ou non et éventuellement avec de la bétaine ou du glycérol. J'ai ensuite mesuré l'activité ATPasique résiduelle au cours du temps (figure IV.15).

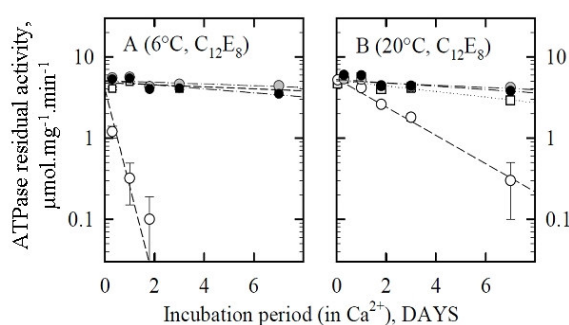


Figure IV.15 : Inactivation irréversible de l'ATPase Ca^{2+} solubilisée en présence de Ca^{2+} , et protection par la bétaine (et le glycérol). Les membranes de SR sont mises en suspension à $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ dans un tampon Tes-Tris 40 mM pH 7,5, KCl 80 mM, 0,8 mM Mg^{2+} à 20°C (tampon A dilué de 20% à cause de l'addition de glycérol dans certaines expériences) et 1 mM Ca^{2+} (carrés), en présence ou non de 5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de détergent (C_{12}E_8 , ronds, ou DDM, triangles), additionné ou non de 20 % de glycérol (w/w, symboles grisés) ou de 1M de bétaine (symboles noirs). Après différents temps d'incubation, un aliquot est dilué 250 fois dans le milieu de mesure d'activité ATPasique (contenant 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de C_{12}E_8). *Panneau A* : incubation en présence de C_{12}E_8 à pH 7,5 et 6°C. *Panneau B* : incubation en présence de C_{12}E_8 à pH 7,5 et 20°C.

La stabilisation par la bétaine est également bien réelle après solubilisation par le DDM (résultats non montrés). La vitesse d'inactivation est d'autant plus rapide que la quantité de détergent ajoutée est élevée, mais l'addition simultanée de lipides exogènes ralentit cette inactivation (résultats non montrés) (voir (Montigny, Arnou et al. 2009)).

Tout d'abord, cette expérience rappelle l'effet incroyablement stabilisateur du calcium : en présence de 1 mM de Ca^{2+} , l'échelle de temps se compte en jours, que ce soit à 6°C ou 20°C : il est probable que le Ca^{2+} , une fois fixé aux sites de transport membranaires, va « ponter » les différentes hélices transmembranaires et assurer leur cohésion, limitant ainsi l'agitation du domaine membranaire rendu plus mobile par l'absence de lipides et la présence de détergent (Toyoshima and Inesi 2004; Picard, Dahmane et al. 2006). L'enzyme solubilisée reste fragile mais la présence de calcium la stabilise de façon significative par rapport à la situation en absence de Ca^{2+} décrite sur la figure IV.14.

Par ailleurs, on confirme ici le fait surprenant que l'inactivation de la protéine solubilisée par le C_{12}E_8 est plus rapide à 6°C qu'à 20°C, comme cela avait déjà été rapporté pour le DDM (Champeil, Menguy et al. 2000). Mais surtout, plus complètement encore que ce qui avait été vu précédemment en absence de Ca^{2+} , l'addition de 1M de bétaine stabilise presque totalement la protéine, avec des vitesses d'inactivation du même ordre de grandeur que celles observées en membranes. Cette fois, la stabilisation par la bétaine est aussi efficace que la stabilisation par 20 % de glycérol.

3. Quelques mots concernant une éventuelle caractérisation fonctionnelle de l'effet de la bétaine

A ce stade, nous n'avons pour le moment pas poursuivi en détail la caractérisation fonctionnelle de l'ATPase en présence de bétaine. Nous avons simplement vérifié que la bétaine, jusqu'à 0,6 M, n'affectait quasiment pas la vitesse d'hydrolyse de l'ATP. Comme dans notre étude réalisée avec le glycérol, nous avons également testé s'il était possible en présence de bétaine d'utiliser les signaux de fluorescence intrinsèque de la protéine pour suivre la fixation des ligands. La présence de 1 M de bétaine est sans effet sur les spectres d'excitation et d'émission des tryptophanes (Coelho-Sampaio, Ferreira et al. 1994), et l'amplitude des changements de fluorescence liés à la fixation ou au départ des ions calcium des sites de transport reste également inchangée (résultats non montrés). Comme attendu, en présence de 1 M de bétaine et en absence de calcium, on observe un signal de fluorescence stable, correspondant bien à une stabilisation de l'enzyme solubilisée, au moins sur quelques minutes, comme nous l'avons observé précédemment en présence de 40 % glycérol sur la figure IV.10. Néanmoins, la bétaine ne permet pas plus que le glycérol de « récupérer » les signaux « perdus » sur l'enzyme solubilisée en C₁₂E₈, comme le signal lié à la fixation de phosphate inorganique, qui s'annule, ou le signal lié à la fixation du Mg²⁺, qui s'inverse (Montigny, Arnou et al. 2008). Ces résultats négatifs ont au moins pour mérite de confirmer que l'absence de ces signaux n'est certainement pas l'effet de la combinaison spécifique détergent-glycérol (ou détergent-bétaine), mais est plutôt probablement due à la solubilisation de la protéine.

V. CONCLUSIONS

1. A propos de l'effet des détergents

Jusqu'à présent, il était relativement ardu de tester les propriétés de fluorescence intrinsèques des ATPase-Ca²⁺ recombinantes. En effet, la manipulation de ces enzymes en présence de concentrations solubilisantes de détergent était rendue difficile du fait de l'inactivation irréversible se produisant en absence de calcium aux sites de transport (voir par exemple (Lund, Orłowski et al. 1989)), et aussi du fait que les signaux de fluorescence étaient particulièrement réduits dès lors que l'on ajoutait du détergent, tout comme dans le cas de l'enzyme native extraite du muscle de lapin (Dupont and le Maire 1980). La seule stratégie possible consistait à reconstituer ces protéines purifiées en présence de lipides exogènes, une étape supplémentaire parfois hasardeuse. Cette procédure a bien permis d'obtenir quelques informations fonctionnelles concernant certains mutants de l'ATPase, mais de manière très limitée, les changements de fluorescence demeurant bien faibles (voir ci-après, (Jidenko, Lenoir et al. 2006; Lenoir, Jaxel et al. 2006)).

Dans le travail présenté ici, j'ai montré que l'utilisation de 40% de glycérol (ou d'un mélange 20% glycérol + 15% DMSO, ou bien 20% glycérol + 1 mg.ml⁻¹ DOPC ou encore 1 M de bétaine), non seulement permet la stabilisation de l'ATPase solubilisée en absence de calcium comme attendu, mais aussi rend possible l'utilisation des propriétés de fluorescence intrinsèques de la protéine pour suivre la fixation de nombreux ligands, que ce soit à pH 7, avec la fixation de Ca²⁺, de Mg²⁺ ou encore de nucléotides (ATP ou ADP) et la formation de complexes fluorés mimant les états de transition de cette phosphorylation (Be.F₃), ou bien à pH 6, avec également les fixations de Ca²⁺ et de Mg²⁺ mais aussi la phosphorylation par le Pi (voir (Montigny, Arnou et al. 2008)).

Toutes les transitions ne sont cependant pas visibles avec un détergent donné. L'une des explications possibles de ce fait est que différents détergents (ou leurs têtes polaires), par exemple le C₁₂E₈ ou le DDM (et respectivement leurs têtes polyoxyéthylène ou maltose), ne

s'organisent pas de la même façon autour du domaine membranaire de l'ATPase. On sait déjà que les quantités de ces détergent pouvant se lier à l'ATPase sont différentes, avec 103 molécules de C₁₂E₈ par ATPase contre 152 pour le DDM (Møller and le Maire 1993), alors que pourtant ces molécules sont de tailles très voisines, avec respectivement des masses molaires de 539 g.mol⁻¹ et 510 g.mol⁻¹. Les chaînes aliphatiques de ces deux détergents étant parfaitement identiques, c'est donc la nature même de la tête polaire qui semble définir la quantité de molécules pouvant se fixer autour du domaine membranaire. La longue chaîne polyoxyéthylène du C₁₂E₈ est flexible et probablement plus dynamique, et elle peut probablement occuper beaucoup d'espace, alors que la tête maltose du DDM est plus courte, très compacte et donc probablement peu mobile (voir les structure dans la figure IV.08). De ce fait, la longue chaîne polyoxyéthylène du C₁₂E₈ peut certainement plus facilement venir à proximité de certains résidus tryptophanyl qui seraient inaccessibles au DDM. Il ne faut pas non plus négliger le déplacement éventuel, par un détergent et pas nécessairement par un autre, de lipides qui seraient essentiels à certaines transitions. Nous avons observé que la présence supplémentaire de lipides, en plus du détergent, était quelque fois indispensable pour observer certains changements de fluorescence (voir figures 5, S4 et S9, formation de l'intermédiaire phosphorylé E2-P à partir du Pi et formation du complexe fluoré E2.BeF₃ dans (Montigny, Arnou et al. 2008)), et il est bien possible, voire probable, que deux détergents n'aient pas la même capacité à délipider l'ATPase-Ca²⁺ au voisinage des chaînes latérales de certains tryptophanes.

Dans tous les cas, il faut garder à l'esprit que les signaux de fluorescence intrinsèque liés à la fixation de différents ligands sont des « boîtes noires » souvent encore peu comprises dans le détail. En effet, comme rappelé en début de ce chapitre, l'ATPase possède 13 tryptophanes, dont 12 dans sa partie membranaire et 1 dans son domaine de fixation du nucléotide. Nous pensons que la fluorescence du tryptophane W552 du domaine de fixation du nucléotide ne contribue pas aux principales variations de signal liées à la fixation des ligands (Lenoir, Jaxel et al. 2006). En revanche, nous ne disposons d'aucune information concernant la participation relative des différents tryptophanes membranaires à ces divers signaux. Il est probable que différents tryptophanes ou groupes de tryptophanes « répondent » différemment à la fixation de différents ligands (Champeil, Henao et al. 1997). En ce qui concerne l'enzyme solubilisée, une des raisons pour laquelle on ne détecte pas les mêmes transitions avec les deux détergents est peut-être simplement, comme dit précédemment, que ces détergents (ou plus exactement leurs têtes polaires) ne perturbent pas les tryptophanes de la même façon.

Bien que nous ayons décrit ici un protocole permettant l'utilisation des signaux de fluorescence intrinsèque de la protéine, nous n'avons pas eu autant de réussite avec l'enzyme marquée au FITC. Les signaux de fluorescence liés à la fixation et au départ des ions calcium des sites de transport sont presque inexistantes en présence de 40% de glycérol et ne sont pas récupérés après solubilisation (voir figures S7 et S8 dans (Montigny, Arnou et al. 2008)). C'est également le cas en présence de 1 M de bétaïne. Il serait concevable que le changement de polarité du solvant influe sur la durée de vie de l'état excité du fluorophore et donc sur la quantité de fluorescence émise (Lakowicz 1980; Valeur 2004). Cependant, les niveaux de fluorescence de l'enzyme en solution ne sont pas beaucoup affectés, et seule l'amplitude des variations change, ce qui rend peu convaincante cette explication pourtant plausible. En revanche, on sait que la transmission des changements de conformations du domaine membranaire vers le domaine cytosolique s'effectue essentiellement *via* les mouvements des boucles flexibles (essentiellement le domaine A aux hélices M1-3 ; (Møller, Lenoir et al. 2002; Lenoir, Picard et al. 2004; Daiho, Yamasaki et al. 2007; Holdensen and Andersen 2009)). De plus, il est probable que la présence de détergent augmente fortement la dynamique de la région membranaire (ce qui expliquerait entre autre les phénomènes d'inactivation irréversible dont nous avons parlé plus haut). On peut alors imaginer que la grande fluidité du domaine membranaire en présence de détergent cause un certain « bruit de fond » qui influe sur la

coordination des mouvements des trois sous-domaines cytosoliques les uns par rapport aux autres et expliquerait les grandes difficultés rencontrées pour obtenir des signaux de fluorescence de bonne qualité au niveau du FITC de l'enzyme solubilisée. Ceci témoignerait de l'importance du maintien d'une certaine rigidité dans le domaine membranaire pour permettre une coordination correcte entre domaine transmembranaire et sous-domaines cytosoliques. Une augmentation de la fluidité de la région membranaire entraînerait une réduction de l'efficacité de transmission *via* les boucles souples au domaine cytosolique et par là même réduirait l'efficacité du système pour fixer puis hydrolyser l'ATP et réaliser les changements de conformation nécessaires au transport, expliquant ainsi la baisse du $V_{\max}$ observée avec les deux détergents (voir figure N.8C et (Lund, Orlowski et al. 1989)). Ces aspects mécaniques sont également suggérés par les expériences de protéolyse ménagée au niveau de ces boucles (Møller, Lenoir et al. 2002).

Un autre signe de la dynamique accrue de la région membranaire de l'enzyme solubilisée pourrait être la sensibilité de cette enzyme vis-à-vis de la température. Le dogme veut que l'on manipule préférentiellement les protéines à froid lors des étapes de purification afin de les préserver de différentes causes de dénaturation (ralentissement de l'activité des éventuelles protéases, élévations de température au cours des étapes de broyage...). Pourtant, nous avons confirmé pour le DDM et observé pour la première fois pour le $C_{12}E_8$ que l'enzyme SERCA1a solubilisée, en présence de calcium, s'inactivait plus rapidement à 6°C qu'à 20°C (voir figure IV.15 pour le $C_{12}E_8$, et la figure 3 dans (Montigny, Arnou et al. 2009) ainsi que (Champeil, Menguy et al. 2000) pour le DDM). On pourrait imaginer que les lipides à longues chaînes présents (en moyenne en C_{18}) soient affectés par la température différemment des détergents à chaînes plus courtes, en C_{12} pour le DDM et le $C_{12}E_8$, (on sait que pour les lipides purs, l'abaissement de la température peut conduire à des transitions de phases qui limitent fortement la mobilité des acides gras), et donc que les molécules de détergents et de lipides ne soient alors plus distribuées de la même façon autour de l'ATPase, la rendant plus sensible à froid à une « attaque » par le solvant.

En fluorescence intrinsèque, après solubilisation, notamment par le $C_{12}E_8$, on observe une diminution de l'affinité pour le calcium (figure IV.10) : on peut de même imaginer que l'augmentation de la dynamique du domaine membranaire en présence de détergent rende plus difficile pour l'ATPase l'ajustement de ses sites de transport aux ions calcium. On a vu que la fixation du calcium à pH 7 semble être moins coopérative après solubilisation par le DDM qu'en absence de détergent, alors qu'à pH 6 une coopérativité plus forte est maintenue en présence ou en absence de détergent (figure IV.11 vs 12A). On sait que le pH est un facteur critique concernant la fixation des ions calciums aux sites de transport, la coopérativité apparente augmentant avec la concentration de protons, alors que l'affinité diminue à cause de la compétition au site de transport des ions calciums avec ces mêmes protons (Pick and Karlisch 1982; Forge, Mintz et al. 1993a; Forge, Mintz et al. 1993b). Ce résultat serait cohérent avec l'idée que le $C_{12}E_8$, beaucoup plus que le DDM, déplace l'équilibre conformationnel de l'ATPase en faveur de sa forme dite « E2 », et ralentisse les transitions entre E2 et $Ca_2.E1$; mais cette hypothèse nécessiterait pour être confirmée des expériences supplémentaires (cf. discussion dans (Montigny, Arnou et al. 2008)).

2. A propos de la fixation des ions calcium aux sites de transport

Le phénomène de fixation coopérative évoqué ci-dessus est probablement lié d'une part à l'existence d'un équilibre conformationnel entre les deux formes dites « E2 » et « E1 », avant même que le premier ion calcium ne se fixe sur « E1 », et aussi, d'autre part au fait que les deux sites ne sont vraisemblablement pas équivalents (Inesi, Kurzmack et al. 1980; Forge, Mintz et al. 1993a). Il semble qu'une fois le calcium fixé au site I (E771, D800, T799, E908 ; voir figure IV.16), le second calcium se fixe rapidement. La fixation du premier calcium pourrait stabiliser

la structure du deuxième site : en effet, étant donné que le résidu D800 participe aux deux sites de fixation (Zhang, Lewis et al. 2000), la fixation du premier calcium pourrait positionner le carbonyle de la chaîne latérale de l'aspartate D800 pour servir de base à la structuration du site II autour du second calcium (Møller, Nissen et al. 2005; Toyoshima 2008).

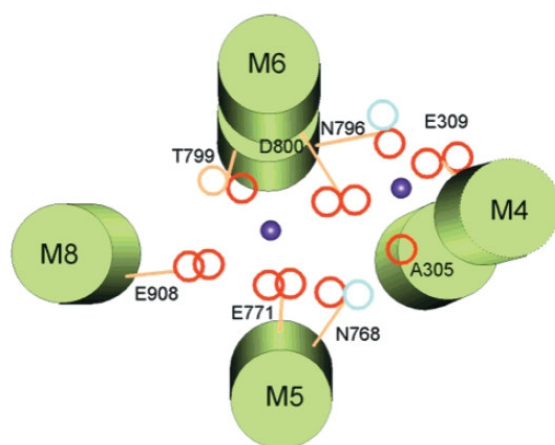


Figure IV.16 : Représentation schématique de l'organisation des résidus constituant les sites de transport du Ca^{2+} . Vue, depuis la face cytosolique et perpendiculairement au plan de la membrane, des quatre hélices transmembranaires M4, M5, M6 et M8. Le positionnement des hélices est réalisé d'après la structure à résolution atomique de l'ATPase obtenue en présence de Ca^{2+} (Toyoshima, Nakasako et al. 2000). On remarquera que les hélices M4 et M6 sont discontinues, avec une rupture au niveau des résidus liant les deux ions calcium. Les atomes d'oxygène des chaînes latérales apparaissent en rouge, les atomes d'azote en bleu. Les deux ions calcium fixés sont représentés par les sphères violettes. Figure adaptée d'après (Toyoshima and Inesi 2004).

A ce jour, les étapes de transconformation de l'état « E2 » vers l'état « E1 » et la fixation des deux ions calcium sont sans doute les étapes les moins bien comprises d'un point de vue structural (voir figure IV.17).

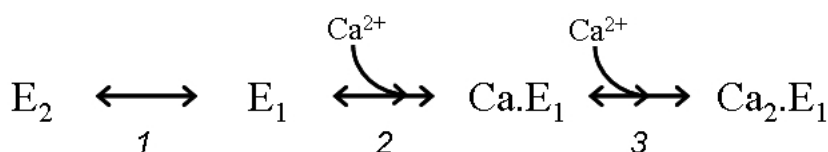


Figure IV.17 : Mécanisme catalytique le plus souvent proposé pour le passage de l'état « E2 » dépourvu de calcium à l'état « Ca_2E_1 » dont les sites de transport sont saturés. L'étape 1 représente un changement de conformation de la protéine, indispensable à la fixation, à l'étape 2, du premier ion calcium. Cette étape 1 serait celle directement sensible au pH et pourraient être également sensible à la présence de Mg^{2+} (Forge, Mintz et al. 1993a; Forge, Mintz et al. 1993b).

Nous disposons de trois structures à résolution atomique pouvant nous aider à détailler cette partie du cycle catalytique. La première structure est celle obtenue en 2000 par C. Toyoshima en présence de calcium (Toyoshima, Nakasako et al. 2000). L'ouverture très large du domaine cytosolique y a été sujette à polémique ; il est probable que cette structure n'existe que de manière très transitoire *in vivo*, la présence en permanence d'ATP à concentration millimolaire dans la cellule conduisant à une fixation immédiate du nucléotide, avant même la fixation des ions calcium aux sites de transport. En second, nous disposons de la structure « E2.TG » de l'ATPase obtenue en absence de calcium mais en présence de thapsigargine (TG) (Toyoshima and Nomura 2002). Cette forme est décrite comme mimant la forme « E2 » de l'ATPase dépourvue de ses ions calcium ; l'utilisation de la TG y a permis de stabiliser l'enzyme solubilisée, malgré l'absence de calcium dans le milieu, mais il a été montré par la suite que la présence de l'inhibiteur pouvait contraindre artificiellement le domaine membranaire, voire entraîner des mouvements des domaines cytosoliques (voir Chap. III et (Picard, Toyoshima et al. 2006; Montigny, Picard et al. 2007)). La troisième structure disponible a également été obtenue en présence de thapsigargine, mais en présence aussi d'un analogue non hydrolysable de l'ATP, l'AMPPCP. Cette structure « E2.TG.AMPPCP » illustre la probable fixation du nucléotide en absence de calcium, qui semble accélérer l'étape de transconformation de « E2 » vers « E1 » (Inesi, Lewis et al. 2006; Jensen, Sorensen et al. 2006), et elle ne présente aucune différence

majeure avec la structure « E2.TG ». Avec ces trois structures, il est difficile de comprendre comment les sites de transport se réorientent du côté luminal (ou d'un état occlus occupé par des protons) vers le côté cytosolique, avec la fixation séquentielle des deux ions calcium. Il serait donc particulièrement intéressant d'obtenir des structures mimant ces états intermédiaires. Les trois structures décrites ci-dessus ont en commun d'avoir été obtenues en présence de 10% de glycérol ainsi qu'en présence d'un mélange de dioléoyl-phosphatidylcholine (DOPC) et de C₁₂E₈. Les structures « Ca₂.E1 » et « E2.TG » ont été obtenues à pH 6,1 alors que la structure « E2.TG.AMPPCP » a été obtenue à pH 6,8. Pour ces trois structures, les 10 % de glycérol présents ne sont pas suffisants pour stabiliser l'ATPase en absence de calcium mais la présence conjointe de lipides et surtout de thapsigargine pour rigidifier la région membranaire a contribué sans aucun doute à la préservation de la protéine.

Les conditions de solubilisation décrites dans ce chapitre permettront peut-être de travailler en absence de calcium tout en maintenant l'enzyme solubilisée. Tout d'abord, un mot sur le détergent. Jusqu'à présent, toutes les structures publiées ont été réalisées en présence de C₁₂E₈. A pH 6, la coopérativité n'est pas modifiée par le C₁₂E₈. En revanche, à pH 6 également, le C₁₂E₈ réduit terriblement l'affinité de la protéine pour le calcium, en la portant au-delà du millimolaire. Ce premier résultat explique sans doute en partie pourquoi il a été nécessaire de porter la concentration en calcium à 10 mM lors de la cristallisation de la protéine en « Ca₂.E1 » malgré le fait que l'affinité en membrane ne soit que de quelques dizaines de micromolaire à pH 6 (Toyoshima, Nakasako et al. 2000). Le DDM, pourtant couramment utilisé pour l'isolement et la caractérisation fonctionnelle de l'enzyme, a rapidement été laissé de côté, parce qu'il n'a pas donné de résultat probant lors des essais préliminaires de cristallisation. Toutefois, nous avons montré qu'à pH 7, le DDM avait pour effet de modifier la coopérativité de l'enzyme sans réduire l'affinité pour le calcium autant que ne le fait le C₁₂E₈ (voir figure IV.11). Cet effet particulier du DDM sur la fixation des ions calcium pourrait en faire un candidat intéressant pour justement isoler des conformations particulières de l'ATPase, peut-être à des concentrations de calcium moins élevées que dans le cas du C₁₂E₈.

Une autre piste pourrait consister à utiliser d'autres lipides. En effet, les travaux du début des années 90 du groupe de A.G. Lee ont montré que l'utilisation de lipides à chaîne courte (C14 :1) permettait également de réduire la coopérativité de fixation des ions calcium. Dans ces conditions, il serait donc peut-être possible d'observer plus facilement un enzyme avec son seul site I occupé (Michelangeli, Orłowski et al. 1990). Ce traitement n'a pas d'effet délétère sur l'enzyme, puisque le remplacement ultérieur de ces lipides à chaîne courte par la DOPC (C18 :1) permet de récupérer la totalité de l'activité ATPasique (Michelangeli, Grimes et al. 1991).

Une autre solution éventuelle, peut-être complémentaire, serait de trouver un ligand pouvant remplacer le calcium sur l'un de ses sites de transport, et qui suffirait à stabiliser l'ATPase. Or on sait que le magnésium, qui ne peut pas être transporté par l'ATPase, est un compétiteur du calcium pour la fixation aux sites de transport (Champeil, Gingold et al. 1983; Forge, Mintz et al. 1993b), et qu'il permet la formation d'une espèce « Mg.E1 » qui pourrait être un bon homologue structural de l'état « Ca.E1 » tant convoité. Toutefois, cela impliquerait de réaliser la cristallogénèse à pH alcalin car le Mg²⁺ ne semble pas se fixer aux sites de transport à pH acide (Guillain, Gingold et al. 1982). On sait aussi que le magnésium peut suffire à ralentir fortement l'inactivation de l'enzyme solubilisée en absence de calcium ((Swoboda and Hasselbach 1988) et données non présentées). De ce fait, l'utilisation du magnésium, au moins à pH alcalin, pourrait permettre en parallèle de réduire la quantité de glycérol nécessaire à la stabilisation de l'enzyme en absence de calcium et d'obtenir des cristaux.

3. A propos, plus généralement, des enzymes recombinantes

Une dernière possibilité à considérer pour résoudre la question précédemment évoquée serait d'utiliser une protéine recombinante mutée au niveau du site II, comme notre mutant

E³⁰⁹Q. Le glutamate 309 est indispensable à la fixation du calcium au site II (Clarke, Loo et al. 1989; Clarke, Maruyama et al. 1989; Skerjanc, Toyofuku et al. 1993). A l'aide du protocole décrit dans ce chapitre, nous avons observé, pour les protéines sauvages (WT) et mutées (E³⁰⁹Q), des signaux de fluorescence intrinsèque correspondant d'une part à la fixation de calcium (voir figure IV.18) et d'autre part à la formation du complexe « E2.BeF₃ » (voir figure S9 dans (Montigny, Arnou et al. 2008)). Tout comme l'enzyme sauvage, le mutant E³⁰⁹Q solubilisé par le DDM est complètement stabilisé par le glycérol en absence de calcium (et *a fortiori* avec un unique ion calcium fixé au site I). Nous avons confirmé que la fixation de calcium au site I restant donne lieu à un changement de fluorescence de signe opposé à celui observé lors de la fixation des deux ions sur l'enzyme sauvage (figure IV.18 et (Champeil, Henao et al. 1997)), ce qui rejoint les observations faites précédemment (Michelangeli, Orłowski et al. 1990; Starling, East et al. 1993; Champeil, Henao et al. 1997). Ce mutant, s'il pouvait être cristallisé en présence de Ca²⁺, fournirait probablement des informations intéressantes.

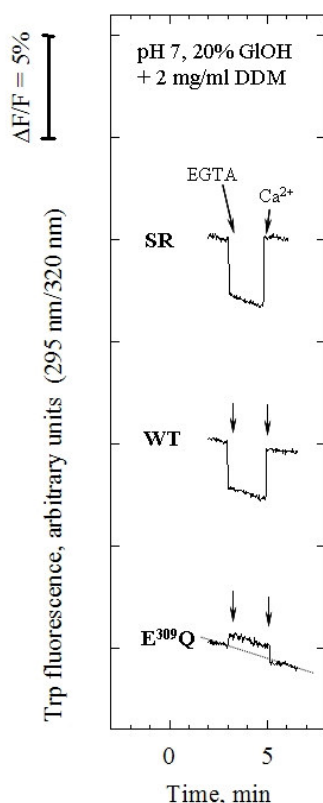


Figure IV.18 : Fixation du Ca²⁺ sur des enzymes natives (SR) ou recombinantes, sauvage (WT) ou mutée (E³⁰⁹Q). Les signaux de fluorescence intrinsèque correspondant à la chélation par l'EGTA puis à la fixation du calcium sur l'ATPase sont enregistrés pour les trois enzymes suivants : l'enzyme native membranaire, extraite du SR de lapin, ou bien les enzymes sauvage (WT) ou mutées (E³⁰⁹Q) obtenues après surexpression dans la levure *S. cerevisiae* puis purification (Jidenko, Lenoir et al. 2006). Ces enzymes SERCA1a sont suspendues à 10 µg.ml⁻¹ dans un tampon 100 mM NaCl, 50 mM Mops-Tris pH 7, 5 mM Mg²⁺, 20% glycérol (w/w) et 2 mg/ml DDM. La concentration en calcium libre est ajustée à 100 µM (en tenant compte du calcium apporté avec l'enzyme recombinante purifiée). Les deux additions successives, 2 mM d'EGTA d'abord puis de 3 mM de calcium total ensuite, sont indiquées par les flèches. Les intensités de fluorescence sont corrigées des faibles facteurs de dilution occasionnés par les différents ajouts. La ligne pointillée ajoutée à la trace du mutant E³⁰⁹Q est supposée aider à visualiser l'effet de la chélation et de la re-fixation du calcium.

Deux modifications majeures ont été ici apportées à la composition du tampon utilisé précédemment pour la figure IV.11 : le NaCl remplace le KCl, ces conditions ayant été démontrées comme amplifiant le signal correspondant à la fixation du calcium au site I (Champeil, Henao et al. 1997), et la présence de 5 mM de magnésium augmente la stabilité de l'enzyme solubilisée, et permet de ce fait de réduire le glycérol de 40 à 20 % et de gagner en amplitude dans les changements de fluorescence (Swoboda and Hasselbach 1988).

Plus généralement, nous avons atteint l'objectif qui consistait à stabiliser les enzymes solubilisées et purifiées en absence de calcium, afin de pouvoir utiliser plusieurs des tests fonctionnels existant pour l'étude de ces ATPases par fluorescence intrinsèque. Nous avons appliqué le protocole ainsi développé à l'étude d'enzymes recombinantes, produites par expression hétérologue dans la levure *S. cerevisiae*. Jusqu'à présent, la Ca²⁺-ATPase, surexprimée et purifiée (soit à l'aide d'une étiquette polyhistidine (Lenoir, Menguy et al. 2002), soit à l'aide d'un domaine de biotinylation *in vivo* (Jidenko, Lenoir et al. 2006)), était le plus souvent reconstituée en présence de lipides pour sa caractérisation fonctionnelle. J'ai montré dans ce chapitre (enzyme purifiée sauvage WT ou mutée E³⁰⁹Q, voir figure IV.18, et E³⁰⁹A, (Montigny, Arnou et al. 2008)) ainsi que dans d'autres travaux en collaboration (mutants D³⁵¹A et P³¹²A, voir §III.1. & 2. et (Marchand, Winther et al. 2008)), qu'il est dorénavant possible, en ajoutant suffisamment de glycérol au milieu de mesure (voire des lipides avec le détergent) d'utiliser, pour de telles ATPases recombinantes purifiées mais restées solubilisées en détergent, quelques unes des techniques de caractérisation spectroscopique développées jusqu'à présent sur

l'ATPase dans sa membrane native du réticulum sarcoplasmique de lapin. Le signal de fluorescence induit par les ajouts successifs d'EGTA et de Ca^{2+} à l'ATPase recombinante sauvage est désormais d'amplitude comparable à celle observée pour l'enzyme native (voir [figure IV.18](#), comparaison entre le SR et le WT).

A ce stade du travail, on peut ajouter qu'il est sans doute possible de mettre au point des protocoles semblables pour d'autres ATPases de type P, voire pour d'autres protéines membranaires présentant une instabilité en absence de leur ligand. Il existe peu de protéines membranaires naturellement abondantes comme la Ca^{2+} -ATPase extraite du muscle, et de ce fait, le recours à des systèmes de surexpression hétérologue pour ces protéines est désormais un défi majeur pour leur étude, avec souvent hélas, comme pour l'ATPase calcium, inactivation irréversible des protéines membranaires obtenues après expression hétérologue et purification (pour revue, voir [\(Garavito, Picot et al. 1996\)](#) et [\(Wiener 2004\)](#)). L'addition de certains agents stabilisants comme le glycérol ou la bétaine pourrait sans doute ralentir voire abolir les processus d'inactivation irréversible, sans empêcher la caractérisation fonctionnelle de ces protéines.

**MANUSCRIPT #2 : USE OF GLYCEROL-CONTAINING MEDIA
TO STUDY THE INTRINSIC FLUORESCENCE PROPERTIES
OF DETERGENT-SOLUBILIZED NATIVE OR EXPRESSED
SERCA1A.**

Montigny C, Arnou B, Marchal E and Champeil P

Biochemistry 2008, 47:12159-12174.

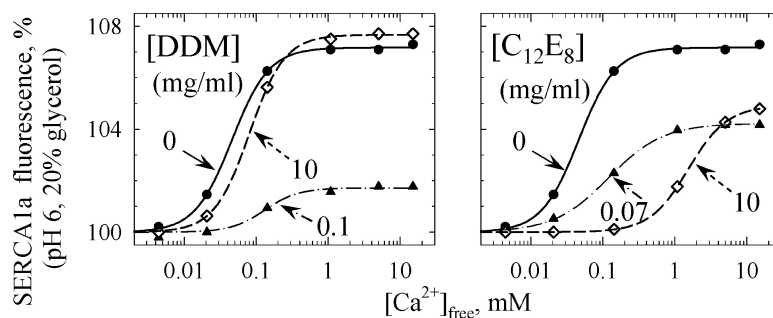
Article

Use of Glycerol-Containing Media To Study the Intrinsic Fluorescence Properties of Detergent-Solubilized Native or Expressed SERCA1a

Ce#dric Montigny, Bertrand Arnou, Estelle Marchal, and Philippe Champeil

Biochemistry, 2008, 47 (46), 12159-12174 • DOI: 10.1021/bi8006498 • Publication Date (Web): 24 October 2008

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on January 23, 2009



More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

[View the Full Text HTML](#)

Use of Glycerol-Containing Media To Study the Intrinsic Fluorescence Properties of Detergent-Solubilized Native or Expressed SERCA1a[†]

Cédric Montigny,^{‡,§} Bertrand Arnou,^{‡,§} Estelle Marchal,^{‡,§} and Philippe Champeil^{*,‡,§}

CNRS, URA 2096, Systèmes membranaires, photobiologie, stress et détoxication, F-91191 Gif-sur-Yvette, France, and
CEA, iBiTecS, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Received April 11, 2008; Revised Manuscript Received July 28, 2008

ABSTRACT: Rapid irreversible inactivation of Ca²⁺-free states of detergent-solubilized SERCA1a (sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 1a) has so far prevented the use of Trp fluorescence for functional characterization of this ATPase after its solubilization in various detergents. Here we show that using 20–40% glycerol for protection makes this fluorescence characterization possible. Most of the ligand-induced Trp fluorescence changes previously demonstrated to occur for SERCA1a embedded in native sarcoplasmic reticulum membranes were observed in the combined presence of glycerol and detergent, although the results greatly depended on the detergent used, namely, octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether (C₁₂E₈) or dodecyl maltoside (DDM). In particular, at pH 6, we found a C₁₂E₈-dependent unexpectedly huge reduction in SERCA1a affinity for Ca²⁺. We suggest that a major reason for the different effects of the two detergents is that high concentrations of C₁₂E₈, but not of DDM, slow down the E2 to E1 transition in solubilized and delipidated SERCA1a. Independently of the characterization of the specific effects of various detergents on SR vesicles, our results open the way to functional characterization by Trp fluorescence of heterologously expressed and purified mutants of SERCA1a in the presence of detergent, without their preliminary reconstitution into liposomes. As an example, we used the E309Q mutant to demonstrate our previous suspicion that Ca²⁺ binding to Site I of SERCA1a in fact slightly *reduces* Trp fluorescence, and consequently that the rise in this fluorescence generally observed when two Ca²⁺ ions bind to WT SERCA1a mainly reflects Ca²⁺ binding at Site II of SERCA1a.

Sarcoplasmic reticulum (SR)¹ Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) is an integral membrane protein of 994 amino acids. It is involved in the transport of Ca²⁺ from the cytosol to the SR lumen during the relaxation of fast twitch muscle, an energy-consuming active transport process which is coupled to ATP hydrolysis by this protein. The catalytic cycle for this process comprises Ca²⁺ binding to SERCA1a, followed by the transient formation of an ATP-derived, energy-rich intermediate, a covalent aspartyl-phosphorylated enzyme (thus, like other cation transporters, SERCA1a belongs to the family of P-type ATPases). After this formation, a spontaneous

conformational transition of the phosphorylated enzyme allows the transport sites to change their orientation from one side of the SR membrane to the other, lose their affinity for Ca²⁺, and therefore release the bound ions toward the SR lumen. Enzyme dephosphorylation then occurs and returns SERCA1a to its initial state. Detailed study of the ATPase catalytic cycle was originally made possible by the high level of expression of SERCA1a in rabbit skeletal muscle (about 70% of the total membrane protein in SR), and later by the heterologous expression of many mutants (e.g., refs (1–5), see more references in the Supporting Information). In 2000, detergent-solubilized SERCA1a was crystallized and the revelation of its structure at atomic resolution provided invaluable new insights (6). The trans-membrane region was found to be organized into 10 α -helical transmembrane spans (M1 to M10), two of which (M4 and M6) are interrupted at the level of the Ca²⁺ binding sites. This region (and the corresponding stalk above the membrane) is surmounted by a large cytosolic head, subdivided into three domains: a phosphorylation domain (P), a nucleotide-binding domain (N) and an “actuator” domain (A). This first successful crystallization, obtained in the presence of Ca²⁺, was followed within a few years by the successful crystallization of other forms of SERCA1a, thought to be reliable analogues of various intermediates in the catalytic cycle (see references in the Supporting Information). Crystals of wild-type and mutated Ca²⁺-ATPase, purified after heterologous expression in yeast, were also recently obtained

[†] We thank CNRS and CEA for financial support.

^{*} To whom correspondence should be addressed. Phone: 33-1-6908-3731. Fax: 33-1-6908-8139. E-mail: philippe.champeil@cea.fr. Mail: Ph. Champeil, iBiTec-S & URA 2096 CNRS, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

[‡] CNRS.

[§] CEA.

¹ Abbreviations: SERCA1a, sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, isoform 1a; SR, sarcoplasmic reticulum; ATPase, adenosine triphosphatase; EGTA[ethylenbis-(oxymethylenetrinitro)]tetraacetic acid; Mops, 4-morpholinepropane sulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; Mes, 4-morpholineethane sulfonic acid; FITC, fluorescein 5-isothiocyanate; C₁₂E₈, octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether; DDM, *n*-dodecyl β -D-maltopyranoside; E2 and E1, nonphosphorylated forms of Ca²⁺-ATPase; E2P and E1P, phosphorylated forms of Ca²⁺-ATPase, respectively ADP-insensitive and ADP-sensitive; TG, thapsigargin; AlF₄, aluminum fluoride; BeF₃, beryllium fluoride; VO₄, orthovanadate; DOPC, 1,2-dioleoylphosphatidylcholine; cmc, critical micellar concentration; csc, critical solubilization concentration; BAD, biotin-acceptor domain.

with satisfactory resolution (7, 8). All these results have allowed significant clarification of the structural basis of ATP-driven ion pumping by SERCA1a. It nevertheless remains desirable to broaden the range of techniques available for studying the functional features of the SERCA1a protein and some of its mutants, as well as the specific effects of various detergents on this protein, considered as a model.

One way of following the changes in the conformation of a protein at a particular step of its catalytic cycle is to take advantage of the spectroscopic properties of its tryptophan residues, which may act as intrinsic reporters. SERCA1a contains thirteen tryptophan residues, one in the nucleotide binding domain and twelve in the transmembrane region of the protein, and over many years it has been shown that the addition of various ligands to SERCA1a triggers specific changes in their fluorescence intensity (9–12). Such experiments, originally performed with native SR SERCA1a, have also been extended to heterologously expressed SERCA1a after its purification to an appropriate degree. However, with one exception (13) these Trp fluorescence measurements with expressed and purified SERCA1a were restricted to proteins previously reconstituted into proteoliposomes (14–16). One good reason for this preliminary reconstitution was that the incubation of native SERCA1a in detergent in the absence of Ca^{2+} was known to lead to relatively fast irreversible inactivation of its activity, much faster than when SERCA was kept embedded in lipids or in the presence of Ca^{2+} (17–22). Another reason for preliminary protein reconstitution was that, even before denaturation could take place, the presence of detergent was suspected to alter and often reduce the amplitude of the observable fluorescence changes (23–26). On the other hand, elimination of the detergent around the protein for its reconstitution into proteoliposomes is generally lengthy, and unfortunately often leads to loss of material and significant protein inactivation. It would therefore be desirable to skip the reconstitution step before Trp fluorescence measurements.

Here, we show that it is possible to solubilize native SR SERCA1a in the presence of excess detergent and still be able to monitor ligand-dependent changes in Trp fluorescence, provided the medium is supplemented with a high concentration of glycerol. In fact, glycerol has often been added to SERCA1a to stabilize it during long-term storage or purification in the presence of detergent (27–29). In the presence of glycerol and of two of the detergents commonly used to isolate and characterize Ca^{2+} -ATPase, most of the previously documented ligand-dependent fluorescence signals remained of acceptable size, at least for one or the other of these detergents. This enabled us to study here the specific effects of two detergents, DDM and C_{12}E_8 , on solubilized SERCA1a derived from native SR vesicles, effects which have only rarely been documented in detail beyond the overall alteration of SERCA1a activity and stability (among the few examples, see refs 30, 31). Similar experiments were also possible for heterologously expressed and purified mutants of SERCA1a, extending the range of functional tests applicable to SERCA1a mutants. As an example (other examples are given in ref 8, we studied here the E309Q mutant of SERCA1a, modified at one of its two Ca^{2+} sites.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

SR Membranes and Chemicals. SR membranes were prepared as previously described (32, 33). Octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether (C_{12}E_8) was purchased from Nikkol Chemical (Tokyo, Japan), and *n*-dodecyl β -D-maltopyranoside (DDM), from Anatrace (Maumee, OH). Streptavidin Sepharose high performance resin was provided by GE Healthcare (Orsay, France). Thapsigargin (TG stock solution was 1 mg/mL in DMSO, i.e., about 1.5 mM) was from VWR International (#586005, Fontenay-sous-Bois, France). 1,2-dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The concentrated stock solutions of detergent:DOPC mixtures (2:1, w/w), prepared at 40 mg/mL:20 mg/mL, were clear (the DDM/DOPC mixture was quite viscous). As glycerol of low quality may contain contaminants contributing undesired UV absorbance and fluorescence, we used the Merck *pro analysi* glycerol (#1.04092). Glycerol concentrations are expressed as w/w or v/v, depending on the particular protocol used for preparation of the buffer in the corresponding experiments. All other chemical products were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). [^{32}P]Pi was from Perkin-Elmer (NEX 054).

Trp Fluorescence Measurements. Fluorescence was measured with a SPEX Fluorolog spectrofluorometer (Horiba/Jobin-Yvon, Longjumeau, France). The intrinsic fluorescence of SR SERCA1a (34–36) was recorded with SR membranes at either 0.02 mg/mL or 0.1 mg/mL protein in a temperature-regulated and continuously stirred 2 mL cuvette, with excitation and emission wavelengths set at 295 and 320 nm respectively (bandwidths were 5 nm and either 10 or 5 nm, depending on the protein concentration). The increased viscosity provided by glycerol, when present, did not prevent efficient stirring of the corresponding cuvette. The medium used for each experiment is indicated in the corresponding figure legend. Depending on the experiment, this medium was supplemented with various concentrations of Ca^{2+} , EGTA, Mg^{2+} , nucleotides, or Pi. To compute $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ concentrations, the dissociation constant of the $\text{Ca}\cdot\text{EGTA}$ complex was taken to be 0.4 μM at pH 7 in the absence of Mg^{2+} (37), and was assumed to be the same in the presence of glycerol. The Maxchelator software was used (<http://maxchelator.stanford.edu/> and ref 38). In some of the experiments performed in the presence of Mg^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ was also varied by adding different concentrations of a Mg –EDTA mixture to 100 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$ (35, 39), and the results were similar. In the latter case, the apparent affinity for Ca^{2+} depends on the ratio of dissociation constants for $\text{Ca}\cdot\text{EDTA}$ and $\text{Mg}\cdot\text{EDTA}$, and this ratio cancels off any putative effect of glycerol on individual constants.

Steady-State ATPase Activity Measurements. These measurements were performed using a classical enzyme coupled assay, by measuring the rate of NADH oxidation in the presence of 0.1 mg/mL lactate dehydrogenase, 0.1 mg/mL pyruvate kinase, 1 mM phosphoenolpyruvate and 0.1–0.25 mM NADH (17).

Phosphorylation from [^{32}P]Pi. SR vesicles, suspended at 0.1 mg/mL in the absence or presence of detergent, were supplemented with [^{32}P]Pi (whose specific activity was set to about 0.025 mCi/ μmol). After 30 s at 20 °C, the reaction (in 0.3 mL) was quenched by rapidly adding excess acid

(2 mL of TCA 500 mM + H₃PO₄ 30 mM). The quenched sample was loaded onto two superimposed filters (Millipore HA) and thoroughly rinsed with the same acid solution before counting. Using this combination of strong acid and HA filters made it possible to precipitate and recover essentially all protein on the top filter (in the presence of detergent too, as in ref (54)), as testified by the absence of protein-associated counts on the second filter.

Expression, Purification and Assay of E309Q and E309A Mutants. The yeast expression plasmid pYDP60-SERCA1a-BAD(WT) was the one described by Jidenko et al. (16). To insert the E309 to Q mutation into the expression vector, a previously prepared vector, pYDP60-SERCA1a[E³⁰⁹Q]-6His (15), was digested by *Eco*RI and *Bss*HII to extract the DNA fragment containing the mutation. This fragment was used to replace the corresponding wild-type sequence in pYDP60-SERCA1a-BAD(WT). For the mutation of E309 to A, the initial vector containing the appropriately mutated sequence of SERCA1a was generously given by J. P. Andersen, and treated as described in ref (8). All constructions were checked by sequencing. The resulting plasmids for the two mutants were named pYDP60-SERCA1a[E³⁰⁹Q]-BAD and pYDP60-SERCA1a[E³⁰⁹A]-BAD. The plasmids were used to transform the *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain W303.1b/Gal4 (*a*, *leu2*, *his3*, *trp1::TRP1-GAL10-GAL4*, *ura3*, *ade2-1*, *can^r*, *cir⁺*) using the lithium acetate/single stranded carrier DNA/PEG method (40). Growth conditions, clone selection, recombinant protein expression and membrane preparation have all been previously described (41). Expression levels for the mutated proteins were similar to those observed for WT, i.e., about 0.1 mg of recombinant protein/g of yeast (about 4 mg/L of culture) was found in the "light membrane" fraction.

This fraction was solubilized by DDM for subsequent purification of recombinant Ca²⁺-ATPase by Streptavidin affinity chromatography (8). After purification, the recombinant proteins were concentrated 15- to 20-fold on Centriprep 30 filtration units (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Final samples contained about 0.2–0.6 mg/mL of protein, in a buffer consisting of 40 mM Mops-Tris at pH 7, 80 mM KCl, 40% (w/w) glycerol (the glycerol concentration was increased from 20 to 40% at the end of the concentration step, to ensure SERCA1a stability during storage at –80%) and 5–8 mg/mL DDM. This high final concentration of DDM results from our use of the Centriprep 30 units, which retain and therefore concentrate the DDM micelles together with the purified proteins. Note that, unlike Jidenko et al. (16), we did not further purify our samples by HPLC, as this proved unnecessary for the present fluorescence measurements.

RESULTS

Effect of Glycerol on the Critical Micellar Concentration and Critical Solubilization Concentration of DDM and C₁₂E₈. As a preliminary step, the effects of glycerol on the critical micellar concentration (cmc) and the critical solubilization concentration (csc) of the DDM and C₁₂E₈ detergents were tested. The cmc and csc of DDM and C₁₂E₈ only rose by less than a factor of 2 at 40% w/w glycerol, with intermediate values at 20% glycerol (data not shown; see corresponding methods and references in the Supporting Information).

Effect of Ca²⁺ on the Trp Fluorescence of Glycerol-Stabilized Detergent-Solubilized SERCA1a at pH 7. It is well-known that Ca²⁺ binding to the high affinity binding and transport sites in the transmembrane domain of SERCA1a affects the intrinsic (i.e., Trp) fluorescence of this protein by a few percent (9). This classical observation is illustrated in the experiment shown as panel A in Figure 1, using native SR membrane vesicles. In this experiment, an initial addition of Ca²⁺ on top of the contaminating Ca²⁺ in the medium left the observed Trp fluorescence of SERCA1a unaltered, because, under these conditions at pH 7, the SERCA1a sites were already saturated with the contaminating Ca²⁺ (3–5 μ M). In contrast, Ca²⁺ chelation by EGTA reduced this fluorescence by a few percent, and subsequent addition of Ca²⁺ in several steps allowed the fluorescence gradually to recover its initial high level. The concentration of free Ca²⁺ for half-recovery (Ca_{1/2}) was in the submicromolar range, as previously found at pH 7 in the absence of Mg²⁺ (e.g., ref (42)).

It is also well-known that similar fluorescence measurements are impossible, or at least extremely problematic, in the presence of solubilizing concentrations of detergents such as the DDM or C₁₂E₈ which will be used in this work, because solubilized SERCA1a is prone to fast irreversible inactivation (within minutes) if its Ca²⁺ binding sites remain unoccupied (17–22). Such inactivation results in a fairly rapid decrease of ATPase fluorescence, on top of the slow downward drift observed usually (and especially at low membrane concentrations), and further addition of Ca²⁺ after a few minutes is then unable to induce any change back to the initial fluorescence level of the Ca²⁺-saturated ATPase. For example, this is illustrated for C₁₂E₈ in panel C of Figure 1. Here, we found that the presence, together with detergent, of high concentrations of glycerol, known to protect solubilized SERCA1a from inactivation (27), kept the fluorescence of solubilized SERCA1a stable, even in the absence of Ca²⁺, and thus made it possible to observe significant rises in fluorescence intensity upon subsequent addition of Ca²⁺. This effect of glycerol, used at 40% w/w for the experiments illustrated in Figure 1, was observed for both DDM and C₁₂E₈ (see panel D of Figure 1 for C₁₂E₈; corresponding data for DDM are illustrated in panels E and F of Figure S1 in the Supporting Information). Protection against inactivation was also observed at only 20% glycerol, although for shorter periods (not shown). In the absence of detergent, glycerol alone left Ca²⁺-dependent changes essentially intact (32) (panel B in Figure 1), although the affinity for Ca²⁺ observed was slightly altered (see below for analysis).

As a collateral advantage of the simultaneous use of glycerol and detergent, note that the above-mentioned slow downward drift in fluorescence intensity which is generally superimposed on the ligand-induced changes independently of irreversible inactivation became even slower than in the absence of detergent (compare Figure 1D and Figure S1F in the Supporting Information with Figures 1A and 1B), perhaps because detergent was adsorbed onto the cuvette walls and the stirring bar, thereby preventing adsorption of the protein itself. Note also that the ATPase Trp fluorescence level itself changed slightly when detergent was added (e.g., Figure 1, C and D): this is commented upon in the Supporting Information, in relation with Figure S1 in the Supporting Information.

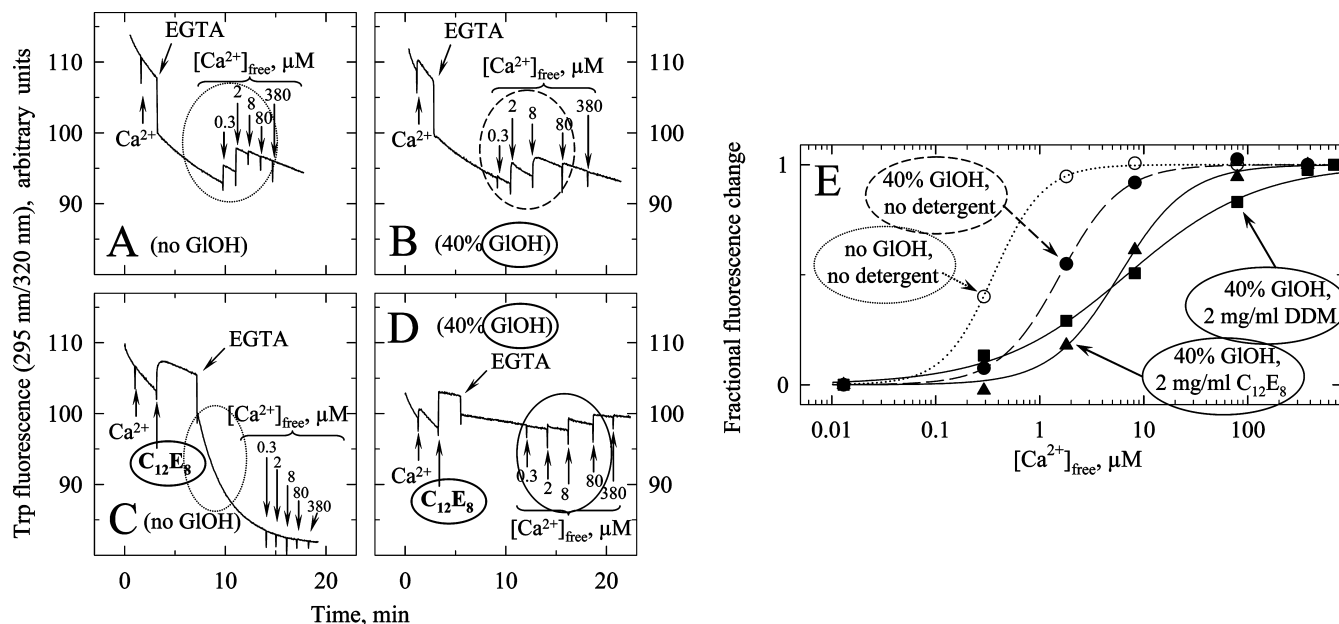


FIGURE 1: Binding of Ca^{2+} to membrane-embedded or detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase in the presence of glycerol (here at pH 7 in the absence of Mg^{2+}), as deduced from Trp fluorescence changes. (A–D) SERCA1a intrinsic fluorescence was measured with SR vesicles suspended at a final protein concentration of 0.02 mg/mL in a 2 mL quartz cuvette, in a buffer containing 100 mM KCl and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20 °C (panel A), supplemented with 40% (w/w) glycerol as required (panels B and D). The initial step consisted of adding 20 μM Ca^{2+} (4 μL of a 10 mM stock solution) on top of the contaminating Ca^{2+} (3–5 μM) already present in the buffer. This was followed, as required, by the addition of 2 mg/mL C_{12}E_8 (panels C and D) or 2 mg/mL DDM (not shown here, but see Figure S1 in the Supporting Information, panels E and F). Subsequent addition of 0.75 mM EGTA (5 μL of a 300 mM stock solution) then reduced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ to about 0.013 μM , and the fluorescence intensity at this step was arbitrarily taken as 100%. Several amounts of extra total Ca^{2+} were then added, in the order and at the concentrations stated below together with the resulting final concentrations of total and free $[\text{Ca}^{2+}]$: first, 0.3 mM (as 2 μL of a 300 mM stock solution), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.325$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 0.29$ μM ; 0.3 mM again (2 μL at 300 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.625$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 1.8$ μM ; 0.1 mM (2 μL at 100 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.725$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 8.2$ μM ; 0.1 mM again (2 μL at 100 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.825$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 79$ μM ; and last, 0.3 mM (2 μL at 300 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 1.125$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 376$ μM . To estimate $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ according to MaxChelator (a rough value is indicated on the figure itself), the dissociation constant of the Ca^{2+} ·chelator complex was assumed to be the same, irrespective of the presence or absence of glycerol (see text). The relative error in estimating these free Ca^{2+} concentrations is largest around 10 μM free Ca^{2+} . The traces shown illustrate a representative experiment of several which gave similar results. Fluorescence intensities were corrected for the small changes due to sample dilution on the addition of ligands. (E) Changes in ATPase fluorescence as a function of free Ca^{2+} were deduced from the traces in panels A, B and D, and from the trace in panel F of Figure S1 in the Supporting Information, after correction for the intensity drift, and plotted as fractional values after normalization to 1 of the maximal change in fluorescence in each series. These various curves were fitted to Hill equations with Hill coefficients of 1.8 (no glycerol, no detergent, open circles), 1.5 (40% glycerol, no detergent, closed circles), 1.3 (40% glycerol, 2 mg/mL C_{12}E_8 , closed triangles) and 0.7 (40% glycerol, 2 mg/mL DDM, closed squares), but exact values for these Hill coefficients are subject to strong uncertainties because of the small number of data points; the only clear fact is the reduced cooperativity in the last curve. Before normalization, the maximal Ca^{2+} -dependent relative changes in fluorescence were about 6.2%, 6.1%, 4.6% and 3.2% for the traces in panels A, B, D, and panel F of Figure S1 in the Supporting Information.

Traces like those illustrated in Figure 1 A, B, D (and in Figure S1F in the Supporting Information) made it possible to deduce, from the progressive recovery of fluorescence upon Ca^{2+} supplementation, the apparent affinity for Ca^{2+} of membrane-embedded or detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase (Figure 1E). Glycerol alone reduced this affinity moderately, as $\text{Ca}_{1/2}$ rose from 0.3–0.4 μM to 1.5–2 μM . This reduction in affinity, here deduced from the assumption that Ca^{2+} chelation by EGTA does not change much in the presence of glycerol, is consistent with the fact that in the presence of glycerol and absence of EGTA, the initial addition of 20 μM Ca^{2+} on top of the contaminating Ca^{2+} raised the Trp fluorescence level up to its maximal level, whereas in the absence of glycerol (as shown in Figure 1A), the same addition of 20 μM Ca^{2+} had absolutely no effect. The additional presence of detergent, either DDM or C_{12}E_8 , reduced this affinity further, as $\text{Ca}_{1/2}$ rose to still higher values, 7–9 μM , in the presence of 2 mg/mL of either detergent. However, the effects of DDM and C_{12}E_8 did not appear to be identical, as in addition to raising $\text{Ca}_{1/2}$, DDM

reduced the apparent cooperativity for Ca^{2+} binding quite significantly, whereas this was much less the case for C_{12}E_8 (closed triangles versus closed squares in Figure 1E). Similar results were obtained when experiments were repeated in the presence of 5 mM Mg^{2+} , as illustrated in Figure S2 in the Supporting Information: in the presence of Mg^{2+} , while the apparent affinity of solubilized ATPase for Ca^{2+} was poorer than in its absence (a well-known fact for membrane-embedded SERCA1a, presumably due to competition between Mg^{2+} and Ca^{2+} , see, for instance, refs 11, 42), the additional presence of detergent together with glycerol again shifted $\text{Ca}_{1/2}$ to still higher values, and DDM again specifically reduced the apparent cooperativity for Ca^{2+} binding. The poorer affinity and/or possibly poorer cooperativity of Ca^{2+} binding to detergent-solubilized SERCA1a compared with membrane-embedded ATPase have often been alluded to and discussed (or denied) in previous investigations with solubilized ATPase (e.g., refs 17, 18, 30, 43, 44), additional references are provided together with the legend to Figure

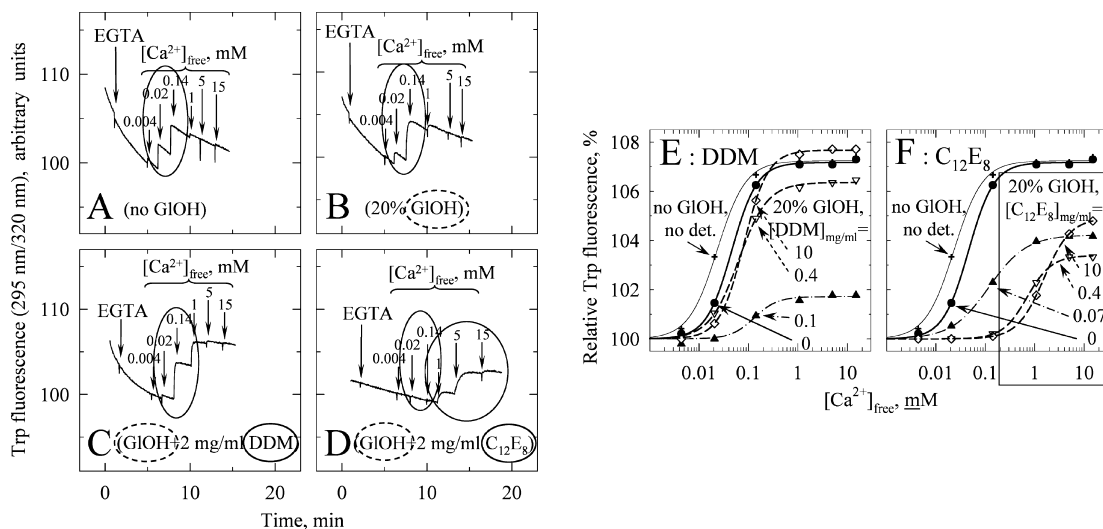


FIGURE 2: Ca^{2+} binding to membrane-embedded, DDM-solubilized or C_{12}E_8 -solubilized Ca^{2+} -ATPase at pH 6 and absence of KCl, as deduced from Trp fluorescence changes. (A–D) SERCA1a intrinsic fluorescence was measured with SR vesicles suspended at a final protein concentration of 0.1 mg/mL in a 2 mL quartz cuvette, in a buffer containing 150 mM Mes-Tris, 100 mM LiCl and 20 mM MgCl_2 , at pH 6 and 20 °C (panel A), in the absence of glycerol (panel A) or in the presence of 20% (v/v) glycerol (panels B–D); 2 mg/mL detergent was then added as required (DDM for panel C, C_{12}E_8 for panel D). Next (the illustrated traces start here) 2 mM EGTA was added, resulting in a free Ca^{2+} concentration of about 0.1 μM . The fluorescence intensity at this step was taken as 100%. Various amounts of Ca^{2+} , on top of the contaminating 3–5 μM total Ca^{2+} , were then added, resulting in different final concentrations of free $[\text{Ca}^{2+}]$. These amounts are listed below in the order of their addition, together with the resulting concentrations of free $[\text{Ca}^{2+}]$: 0.2 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.205$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 4$ μM ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ was estimated according to MaxChelator); 0.5 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.705$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 20$ μM ; 1 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 1.7$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 140$ μM ; 1.3 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 3$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 1$ mM; 4 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 5$ mM; and 10 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 15$ mM. Values were corrected for the small changes in intensity due to sample dilution on the addition of ligands. (E, F) After correction for the intensity drift, fluorescence intensities as a function of free Ca^{2+} for a given concentration of detergent (DDM in panel E, C_{12}E_8 in panel F) were deduced from the traces in panels A–D and from similar traces at other detergent concentrations, and plotted as %, relative to the fluorescence intensity at the lowest free Ca^{2+} concentration, under the following conditions: crosses and continuous thin line, no detergent and no glycerol; closed circles and continuous thick line, 20% glycerol and no detergent; closed right-side-up triangles and dash-dot lines, glycerol and nonsolubilizing concentrations of detergent (0.1 mg/mL DDM for panel E, 0.07 mg/mL C_{12}E_8 for panel F); dashed lines and open symbols, solubilizing concentrations of detergent, either 0.4 mg/mL (upside-down triangles), or 10 mg/mL (diamonds). As the results obtained with 2 mg/mL detergent (deduced from the traces in panels C and D) were close to those obtained with 10 mg/mL (diamonds in panels E and F), they were omitted, for clarity. These various curves were fitted to Hill equations with Hill coefficients between 1.5 and 2 for both intact and solubilized membranes.

S2 in the Supporting Information). This question will be addressed again in the Discussion.

The Dramatic Effect of Solubilizing Concentrations of C_{12}E_8 on SERCA1a Affinity for Ca^{2+} at pH 6. As pH *per se*, in the absence of Ca^{2+} , is thought to affect the conformational state of SERCA1a (55, 67), we extended to more acidic conditions our characterization by Trp fluorescence of the binding of Ca^{2+} to solubilized SERCA1a, and found that, under these conditions, C_{12}E_8 -solubilized SERCA1a displayed an unexpected behavior. At pH 6 in the presence of glycerol (here in the absence of potassium but presence of lithium), solubilization of SERCA1a (0.1 mg/mL SR) with excess C_{12}E_8 (from 0.4 up to 10 mg/mL C_{12}E_8) indeed raised the $\text{Ca}_{1/2}$ values for Ca^{2+} -induced changes in Trp fluorescence to extremely high, millimolar values (see Figure 2D versus Figure 2B), i.e., the apparent affinity of SERCA1a for Ca^{2+} dropped to extremely poor values. Nevertheless, this was *not* the case for DDM, which, at solubilizing concentrations, only led to a moderate increase in the $\text{Ca}_{1/2}$ (Figure 2C versus Figure 2B). The data for different concentrations of solubilizing detergent are given for DDM and C_{12}E_8 in Figures 2E and 2F respectively. In the same series of experiments, the apparent affinity of SERCA1a for Ca^{2+} in the presence of low, nonsolubilizing concentrations of detergent was also tested, and the results, also illustrated in Figures 2E and 2F, confirmed the moderate increase in $\text{Ca}_{1/2}$ previously observed

when SR membranes were “perturbed” by various detergents, either DDM (39), C_{12}E_8 (data not shown), Triton X-100 (44) or SDS (45). For large solubilizing concentrations of DDM, the $\text{Ca}_{1/2}$ was in fact smaller than for small nonsolubilizing concentrations (Figure 2E) (as previously deduced from ATPase activity measurements under standard ionic conditions, see Figure 5 in ref (39)). For C_{12}E_8 , the opposite was true, because in the presence of large solubilizing concentrations of C_{12}E_8 , the $\text{Ca}_{1/2}$ became much higher than in the presence of nonsolubilizing concentrations (Figure 2F). Note, incidentally, that the presence of 1 mg/mL DOPC together with 2 mg/mL C_{12}E_8 left the apparent Ca^{2+} affinity of SERCA1a at an intermediate value, corresponding to the affinity displayed by C_{12}E_8 -saturated or minimally solubilized SR membranes (data not shown).

The unexpectedly huge shift of $\text{Ca}_{1/2}$ to millimolar values in the presence of solubilizing concentrations of C_{12}E_8 at pH 6 was not restricted to assay conditions in the absence of KCl and presence of LiCl, but was also observed in the presence of KCl. This was shown not only by Trp fluorescence experiments similar to those reported above but now performed in the presence of KCl (Figure 3A,B), but also by simple ATPase activity measurements, at 10 μM $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ (Figure 3C), performed with a standard coupled enzyme assay (the presence of KCl in fact was a prerequisite for such ATPase activity measurements with this technique,

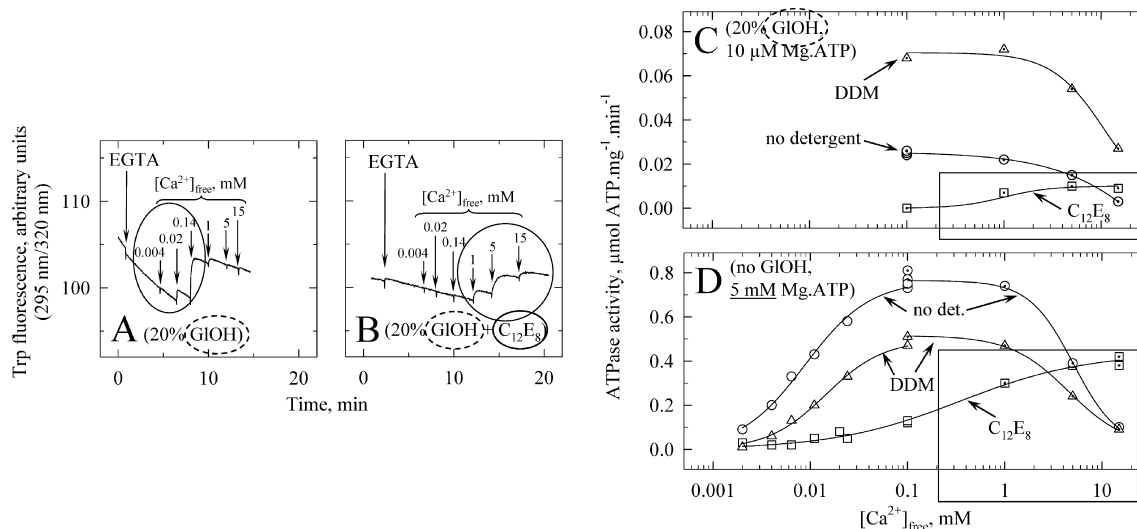


FIGURE 3: In the presence of KCl too, the affinity of SERCA1a for Ca^{2+} at pH 6 drops dramatically after solubilization with C_{12}E_8 . This affects Ca^{2+} -dependent ATPase activities, both in the presence of glycerol at low Mg-ATP and in its absence at high Mg-ATP. (A, B) Trp fluorescence was measured with 0.1 mg/mL SR vesicles in a buffer containing 20% glycerol, 150 mM Mes-Tris, 100 mM KCl and 20 mM MgCl_2 at pH 6 and 20 °C, in the presence of 2 mg/mL C_{12}E_8 (panel B) or in the absence of C_{12}E_8 (panel A). EGTA (2 mM) was added, resulting in a free Ca^{2+} concentration of about 0.1 μM (at this stage, the fluorescence intensity was taken as 100%); this was followed by additions of Ca^{2+} , on top of the contaminating 3–5 μM total Ca^{2+} , in the order and at the concentrations given below together with the resulting final concentrations of free $[\text{Ca}^{2+}]$: 0.2 mM resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.205$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 4$ μM ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ was estimated according to MaxChelator); 0.5 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 0.705$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 20$ μM ; 1 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 1.7$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 140$ μM ; 1.3 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = 3$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 1$ mM; 4 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 5$ mM; and last, 10 mM, resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 15$ mM. Fluorescence intensities were corrected for the small changes due to sample dilution on the addition of ligands. (C) ATPase activity was measured by a coupled enzyme assay, here in the presence of 10 μM Mg-ATP, under each of three conditions: the absence of detergent (circles), the presence of 2 mg/mL DDM (triangles), or the presence of 2 mg/mL C_{12}E_8 (squares). The medium, which also contained 0.1 mg/mL SR vesicles, 20% glycerol, 150 mM Mes-Tris, 100 mM KCl and 20 mM MgCl_2 at pH 6 and 20 °C as for the experiments shown in panel A, was first supplemented with 0.1 mM Ca^{2+} and subsequently with final Ca^{2+} concentrations of 1, 5 and 15 mM for the ATPase activity measurements. (D) This panel shows similar ATPase activity measurements, but in the presence of 5 mM Mg-ATP, without glycerol and with 0.01 mg/mL SR (see the different Y scale) in otherwise the same media, again in the absence of detergent (circles), in the presence of 2 mg/mL DDM (triangles), or in the presence of 2 mg/mL C_{12}E_8 (squares). Here too, the medium was initially supplemented with 0.1 mM Ca^{2+} . Then, either various concentrations of EGTA were added sequentially, to explore the effect of lower free Ca^{2+} concentrations (open symbols), or extra Ca^{2+} was added, to explore the effect of higher free Ca^{2+} concentrations (dotted symbols).

because of the potassium-dependence of the pyruvate kinase activity in this assay). Millimolar concentrations of Ca^{2+} stimulated ATPase activity in the presence of glycerol after solubilization by C_{12}E_8 at pH 6, contrasting with the more classical *inhibitory* effect of the same high concentrations of Ca^{2+} on the activity of membrane-embedded or DDM-solubilized SERCA1a (Figure 3C). To address the question of whether the C_{12}E_8 -induced large increase in the $\text{Ca}_{1/2}$ for ATPase activation only occurred in the presence of glycerol or, instead, was a more general feature, we performed additional ATPase measurements in the absence of glycerol. Using 5 mM Mg-ATP instead of only 10 μM , we were able to perform these additional experiments in the absence of glycerol reliably, because high Mg-ATP concentrations have been reported to efficiently reverse the instability of solubilized SERCA1a (17, 46). Under these conditions, *i.e.* in the absence of glycerol, a very large increase in the $\text{Ca}_{1/2}$ for ATPase activation at pH 6 was again apparent for SERCA1a solubilized with C_{12}E_8 , whereas with DDM, the increase was again much smaller (Figure 3D).

The different Effects of DDM and C_{12}E_8 at Solubilizing Concentrations on the Kinetics of Ca^{2+} -Induced Conformational Rearrangement. In addition to making it possible to monitor Ca^{2+} binding to solubilized SERCA1a at *equilibrium*, the presence of glycerol in the above-mentioned fluorescence experiments at pH 6, by slowing down the Ca^{2+} -induced conformational rearrangement of SERCA1a suf-

ficiently (32), made it possible, at least at pH 6, to resolve the *kinetics* of the Ca^{2+} -induced fluorescence rises, without resorting to more complicated stopped-flow experiments. Figure 2B–D shows that the rate of this Ca^{2+} -induced rearrangement was slightly accelerated by solubilizing concentrations of DDM, whereas solubilizing concentrations of C_{12}E_8 did not result in such acceleration, but in *significant slowing down* instead; as concerns C_{12}E_8 , the same conclusion can be derived from Figure 3A,B. This unexpected slowing down of the Ca^{2+} -induced rearrangement by high concentrations of C_{12}E_8 , but not DDM, contrasts with the fact that this rearrangement is accelerated in the presence of either C_{12}E_8 or DDM at low, nonsolubilizing concentrations (25, 26, 47), or in the simultaneous presence of C_{12}E_8 and lipid at a C_{12}E_8 to DOPC ratio of about 2 to 1 (data not shown; see also panels B and F versus panel A in the subsequent Figure 5).

A possible consequence of this slowing down of the Ca^{2+} -induced transition by high concentrations of C_{12}E_8 (as opposed to DDM) in the absence of extra lipid is that the E2/E1 equilibrium of SERCA1a might shift toward E2 in the presence of solubilizing and delipidating concentrations of C_{12}E_8 , rendering Ca^{2+} binding strongly unfavorable, especially at pH 6. This will be a key point when the effects of C_{12}E_8 versus those of DDM are discussed below.

Consequences of the Ca^{2+} Affinity Changes for Trp Fluorescence Detection of the Turnover of SERCA1a Solu-

bilized in Different Detergents at pH 6. Previous studies with membrane-embedded SERCA1a have suggested that the ability of Trp fluorescence to monitor SERCA1a enzymatic turnover depends on whether the E2P and E2 species, often considered to display lower fluorescence than the E1 and E1P species, accumulate to a significant or insignificant extent at steady-state during turnover (see, for instance, refs 48, 49). In previously published reports, different media have been shown to favor accumulation of E2P or E2 species at steady state (and therefore observation of clear turnover-dependent drops in fluorescence), and a pH 6 medium, devoid of potassium and supplemented by lithium if desired (50), fulfills these requirements (47, 49). With such a medium, in the presence of ionophore to make SR vesicles permeable to Ca^{2+} (note that as a side effect, the ionophore we used, calcimycin [A23187], quenched a large fraction of SERCA1a fluorescence (49), accounting for the low initial fluorescence level illustrated in Figure 4), and first in the absence of glycerol (panel A in Figure 4), a clear turnover-dependent drop in fluorescence was found to result from ATP addition to the permeabilized vesicles at both 100 μM and 1 mM Ca^{2+} , as illustrated by the beginning of the fluorescence trace in Figure 4A (the Ca^{2+} concentration was raised from 100 μM to 1 mM Ca^{2+} to allow full saturation of the Ca^{2+} binding sites of membrane-embedded SERCA1a, despite the acidic pH). Increasing concentrations of detergent were then added, and the result for DDM, here in the absence of glycerol, is also shown in Figure 4A. Small, nonsolubilizing (or minimally solubilizing) concentrations of DDM (0.1 mg/mL) reduced the size of the turnover-dependent fluorescence drop but not its rate, as previously reported (26). When higher concentrations of detergent were added, from 0.5 to 10 mg/mL, solubilization of the membranes occurred, as confirmed by the recovery of Trp fluorescence from its previous quenching by the nearby calcimycin ionophore (49). However, when ATP-dependent signals were then recorded, signs of turnover-dependent irreversible inactivation were detectable at the highest concentrations of DDM (Figure 4A, see dotted zone for 10 mg/mL), as expected on the basis of a previous report with C_{12}E_8 at pH 8.5 (48). Similar signs of inactivation were also observed with C_{12}E_8 at pH 6 in the absence of glycerol (not shown).

In the *presence* of 20% glycerol (here, v/v) (Figure 4B), the initial turnover rate for membrane-embedded SERCA1a was slower than in its absence, and raising the Ca^{2+} concentration from 100 μM to 1 mM again accelerated this rate slightly, because of the more complete saturation of the Ca^{2+} sites (see the beginning of the trace in Figure 4B). After solubilization, the presence of glycerol apparently eliminated turnover-dependent irreversible inactivation (Figure 4B). Highly reproducible ATP turnover-dependent fluorescence drops were therefore observable for all concentrations of DDM up to 10 mg/mL (higher concentrations were not tested). The glycerol-induced slowing down of the ATPase activity of membrane-embedded SERCA1a was reversed by both low and very high concentrations of DDM, although not exactly to the same extent. Similar experiments performed at pCa 4 only (instead of pCa 3) revealed the same qualitative features. Thus, assay conditions at pH 6 in the presence of glycerol are appropriate for revealing, by intrinsic fluorescence, the ATPase activity of DDM-solubilized ATPase.

When the same experiments (at pH 6 in the presence of

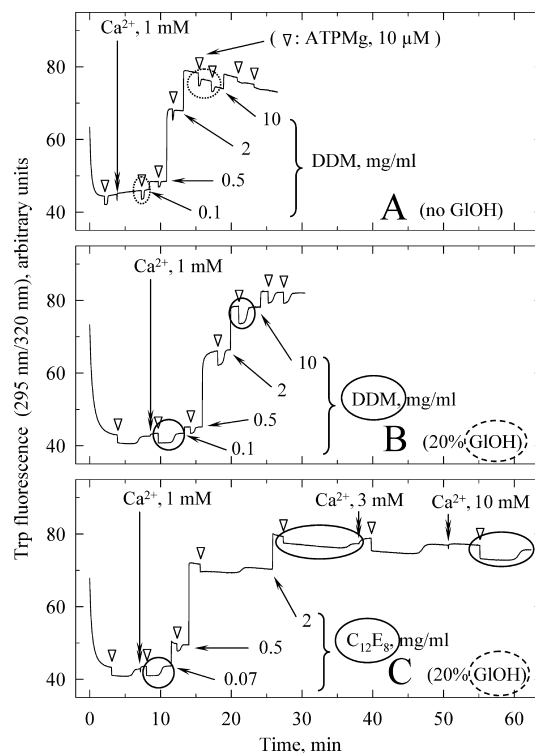


FIGURE 4: Turnover-dependent changes in Trp fluorescence at pH 6 in the absence of KCl, in the absence or presence of glycerol, in the presence of various concentrations of DDM or C_{12}E_8 , and in the presence of various concentrations of Ca^{2+} . Here, Trp fluorescence was measured with 0.1 mg/mL SR vesicles in a buffer containing 150 mM MesTris, 100 mM LiCl and 20 mM MgCl_2 at pH 6 and 20 °C, in the absence (panel A) or presence (panels B and C) of 20% glycerol (here, v/v); 100 μM Ca^{2+} was then added (the corresponding fluorescence level was taken as the 100% level), followed by 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ionophore A23187, i.e., calcimycin, which induced rapid (but not instantaneous) fluorescence quenching through resonance ("Förster") transfer. The illustrated trace starts here. The next step consisted of adding 10 μM $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ (upside-down triangle), followed by 0.9 mM Ca^{2+} to raise the Ca^{2+} concentration to 1 mM, and then $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ again (upside-down triangle again). Next, detergent (DDM for panels A and B and C_{12}E_8 for panel C) was sequentially added at the final total concentrations indicated (0.1, 0.5, 2 and 10 mg/mL for DDM; 0.07, 0.5, and 2 mg/mL for C_{12}E_8), with repeated additions of ATP between the detergent additions to test the turnover-dependent signals (upside-down triangles). At the end of the experiment illustrated in panel C, 2 mM and then an extra 7 mM Ca^{2+} were added, bringing the total Ca^{2+} to 3 mM (10 μM ATP was also added at each step, upside-down triangles). Values were corrected for the small changes in intensity resulting from dilution on the addition of ligands.

glycerol) were repeated in the presence of C_{12}E_8 , there was again no sign of any irreversible inactivation of the solubilized SERCA1a, and ATP turnover was again accelerated by the nonsolubilizing or only minimally solubilizing concentration of 0.07 mg of $\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{mL}$ (as with 0.1 mg/mL DDM). In this case, however, higher, fully solubilizing concentrations of C_{12}E_8 inhibited turnover dramatically: Figure 4C shows the results for 0.5 and 2 mg/mL C_{12}E_8 , and the same was true at 10 mg/mL (not shown). In accordance with the results in Figures 2 and 3, this dramatic inhibition of turnover proved to be due, at least in part, to the fact that SERCA1a had acquired a very poor affinity for Ca^{2+} under these new conditions, because when Ca^{2+} was increased to 3 mM and even further, up to 10 mM, the time required for ATP exhaustion was reduced (final portion of the trace in Figure 4C). Conversely, when the experiment

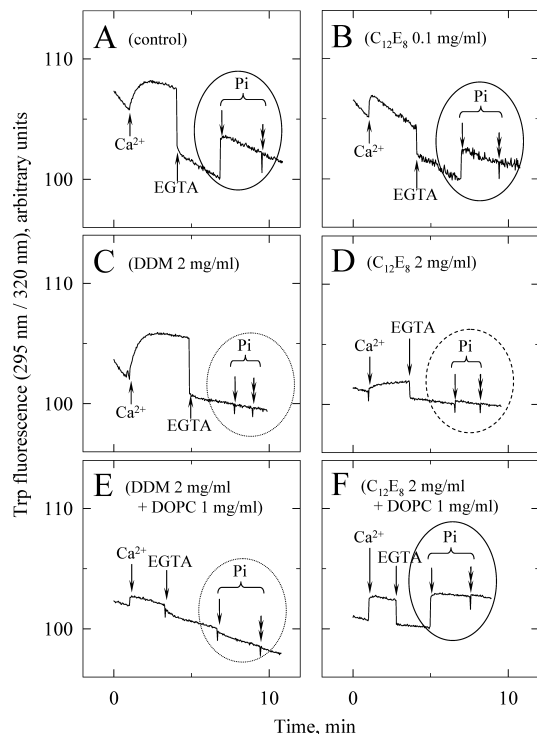


FIGURE 5: Pi-dependent changes in Trp fluorescence for membrane-embedded or detergent-solubilized Ca^{2+} -free SERCA1a. Effect of additional lipids. SR vesicles were suspended at 0.1 mg/mL protein (corresponding to about 0.05 mg/mL of SR lipid) in a buffer containing 150 mM Mes-Tris, 20 mM Mg^{2+} , 15% DMSO and 20% glycerol (w/w) at pH 6 and 20 °C, either in the absence of detergent (panel A) or together with one of the following five agents or combinations: 0.1 mg/mL of C_{12}E_8 (panel B), 2 mg/mL DDM (panel C), 2 mg/mL C_{12}E_8 (panel D), 2 mg/mL DDM + 1 mg/mL DOPC (panel E), or 2 mg/mL C_{12}E_8 + 1 mg/mL DOPC (panel F). Ca^{2+} (1 mM) was then added, followed by 10 mM EGTA, and last Pi, in two amounts of 2 mM each (single arrow, then double arrow). Values were corrected for the small changes in fluorescence intensity resulting from dilution on the addition of ligands.

was conducted in the presence of 100 μM Ca^{2+} only, turnover-dependent fluorescence signals were not detectable at all for the solubilized SERCA1a, even at 0.5 mg/mL C_{12}E_8 , and turnover-dependent signals only appeared after the Ca^{2+} concentration was raised to millimolar concentrations (data not shown). Note that this stimulation of ATPase activity by high Ca^{2+} concentrations occurs *despite* the inhibition expected, at these concentrations, to result from the substitution of $\text{Ca}\cdot\text{ATP}$ for the normal substrate, $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ (51).

Note that similar experiments were also performed in another medium known to favor accumulation of E2P or E2 species at steady state, namely, at alkaline pH in the presence of a high Mg^{2+} concentration (48). In this medium, unfortunately, the additional presence of 40% glycerol under the same conditions was not sufficient to reduce to zero the irreversible inactivation of SERCA1a known to occur (Figure 7E in ref (48)) in the absence of glycerol and presence of solubilizing concentrations of detergent (see Figure S3A in the Supporting Information, and corresponding comments). Back to the pH 6 situation, note also that Ca^{2+} release experiments performed under similar conditions (data not shown, but see a short description in the Supporting Information) were consistent with the Trp fluorescence results and the here-demonstrated very poor affinity of SERCA1a for Ca^{2+} in the presence of C_{12}E_8 at pH 6.

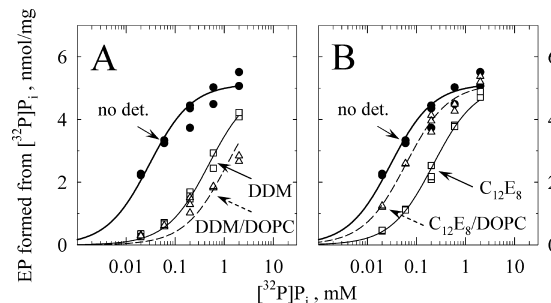


FIGURE 6: Formation of E2P from $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ in membrane-embedded or detergent-solubilized Ca^{2+} -free SERCA1a, as deduced from standard acid quenching experiments. SR vesicles were suspended at 0.1 mg/mL protein in a buffer containing 150 mM Mes-Tris, 20 mM Mg^{2+} , 2 mM EGTA, 15% DMSO and 20% glycerol (w/w) at pH 6 and 20 °C, either in the absence of detergent (closed circles, panels A and B), or together with one of the following five agents or combinations: 2 mg/mL DDM (squares, panel A), 2 mg/mL DDM + 1 mg/mL DOPC (triangles, panel A), 2 mg/mL C_{12}E_8 (squares, panel B), or 2 mg/mL C_{12}E_8 + 1 mg/mL DOPC (triangles, panel B). Various concentrations of $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ were then added, followed after 30 s by acid quenching and filtration. Observed EP levels were fitted to Michaelian curves with a common EP max (5.14 nmol/mg).

Effects of Pi or Fluoride Salts on Trp Fluorescence in Ca^{2+} -Free and Glycerol-Protected Detergent-Solubilized ATPase. We then attempted, in the combined presence of glycerol and detergent, to detect the formation of ADP-insensitive phosphoenzyme (E2P) from Ca^{2+} -free solubilized SERCA1a, as was shown to be possible for membrane-embedded SERCA1a (10, 32). Initial attempts using a pH 7, KCl-containing medium, supplemented with 20% DMSO to make the medium more favorable to E2P formation (52, 53), did not allow us to observe any Pi-dependent fluorescence changes in the presence of detergent (DDM or C_{12}E_8), either in the absence or in the presence of glycerol (data not shown). We then attempted to create different favorable conditions, by leaving potassium out of the medium and buffering it at pH 6, either in the absence of DMSO but presence of 40% glycerol, or in the presence of 15% DMSO and 20% glycerol (DMSO itself afforded partial protection against detergent-induced denaturation). In the latter situation, the rise in Trp fluorescence concomitant with E2P formation was easily detectable in the absence of detergent (see Figure 5A), but in the presence of detergent (either DDM or C_{12}E_8) there was again little evidence for any change in Pi-dependent fluorescence (Figure 5, C and D), although with C_{12}E_8 , very small but reproducible changes in Trp fluorescence could still be observed. This only very small signal was disappointing, because E2P formation has been reported to remain possible in the presence of some of the most common detergents, although less favorable than in the absence of detergent (see, for instance refs (30, 44, 54)).

As the conditions for these fluorescence experiments, namely, low protein and high detergent concentrations, presumably lead to SERCA1a delipidation, we then wondered whether the residual presence of phospholipid together with detergent would help to make Pi-induced changes detectable. We found that this was indeed the case, but remarkably, only in the presence of C_{12}E_8 (Figure 5F) and not of DDM (Figure 5E). From the point of view of the fluorescence responses to Pi addition, the incubation of SR vesicles with a 2:1 (w/w) mixture of C_{12}E_8 and DOPC,

obtained from an optically clear, concentrated 2:1 mixture (in which the lipid had therefore been almost fully solubilized) gave results not very different from those obtained after incubation of the same SR vesicles with a small, only minimally solubilizing amount of $C_{12}E_8$ alone, i.e., when 0.1 mg/mL $C_{12}E_8$ was added to 0.1 mg/mL SR protein and therefore about 0.05 mg/mL SR lipid (so that the overall detergent to lipid ratio was similar in both experiments): in both experiments, the Pi-induced rise in Trp fluorescence was quite satisfactory (Figure 5, F and B). Note that in both cases, the Ca^{2+} -dependent changes also displayed smaller amplitude and faster kinetics than in SR vesicles in the absence of any detergent (compare panels A, B and F in Figure 5). Results similar to those illustrated in Figure 5, A,F (in the presence of lipid) were in fact also obtained in the *absence of glycerol* (data not shown), presumably because the presence of lipid together with detergent was sufficient to protect solubilized SERCA1a from EGTA-induced irreversible denaturation (19–21).

To understand the above results, we measured under the exact same conditions, using standard acid quenching methods, the actual amount of phosphoenzyme (E2P) formed from phosphate, added as $[^{32}P]Pi$. We found (Figure 6) that the presence of detergent alone increased the concentration of $[^{32}P]Pi$ required for half activation of E2P formation, with a more deleterious effect for DDM than for $C_{12}E_8$. The additional presence of DOPC allowed the recovery of a more favorable situation in the presence of $C_{12}E_8$ (Figure 6B), but not in the presence of DDM (Figure 6A). This result is qualitatively consonant with the fluorescence results. Nevertheless, it appears that, at the concentrations of Pi (2 and 4 mM) used in the Trp fluorescence measurements illustrated in Figure 5, very significant amounts of E2P were formed in the presence of either detergent in the absence of lipid, whereas Pi-dependent changes in fluorescence were minimal. Thus, the combined results in Figures 5 and 6 indicate that the absence of a Pi-dependent Trp fluorescence signal does not necessarily imply the absence of E2P formation, but that only specific conditions (in this case, $C_{12}E_8$ + DOPC) allow Trp fluorescence to be sensitive to this formation. This will be further discussed later. Note that the increased concentration of $[^{32}P]Pi$ required for half activation of E2P formation in the presence of glycerol and detergent was *not* the result of time-dependent partial inactivation, because the (reduced) levels of E2P found in the presence of glycerol and detergent remained stable when the time of contact of SERCA1a with the detergent was varied, on a time scale of a few minutes (data not shown).

As a further check, we studied, under the same conditions, the ability of Trp residues in solubilized Ca^{2+} -free SERCA1a to reveal the putative formation from beryllium fluoride of $E2 \cdot BeF_3$, an E2P analogue, and found results similar to those for E2P detection: Trp fluorescence rose on the addition of beryllium and fluoride in the presence of $C_{12}E_8$ plus DOPC, as it does in membranes (33, 53), but did not rise in the presence of DDM plus DOPC (Figure S4 in the Supporting Information).

Effects of Mg-ATP, ATP or Mg^{2+} on Trp Fluorescence in Ca^{2+} -Free Detergent-Solubilized and Glycerol-Protected ATPase. The Trp fluorescence response of solubilized but glycerol-stabilized SERCA1a to nucleotides was also investigated. For this study, as acidic conditions are known to

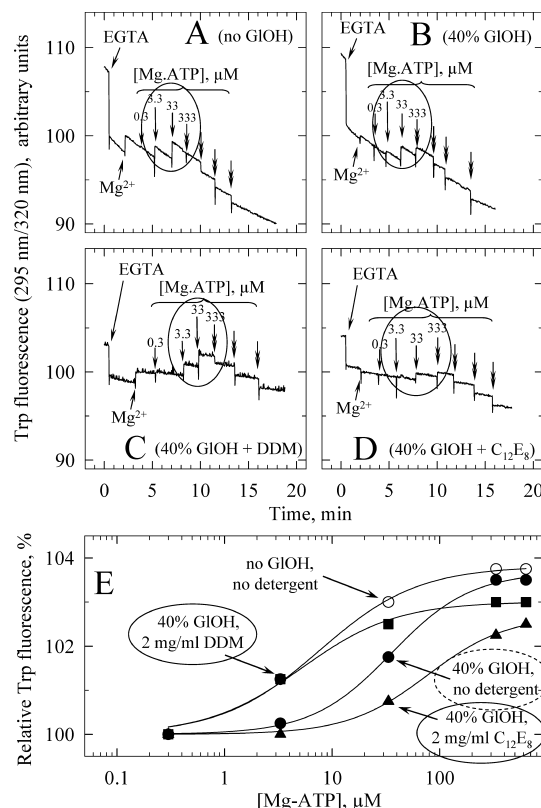


FIGURE 7: Binding of Mg-ATP to Ca^{2+} -free membrane-embedded or detergent-solubilized ATPase in the presence of glycerol, as deduced from Trp fluorescence changes. (A–D) The initial step consisted of adding 2 mM of EGTA to SR vesicles suspended at 0.02 mg/mL in a buffer containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris and 100 μ M Ca^{2+} at pH 7 and 20 °C (panel A), in the presence, as required, of 40% (w/w) glycerol (panels B–D) and 2 mg/mL detergent (DDM for panel C or $C_{12}E_8$ for panel D). This was followed by the addition of 5 mM Mg^{2+} and then of increasing concentrations of Mg-ATP (final total concentrations are indicated on the figure). Double arrows correspond to additions of 300 μ M. Several such additions were made to estimate the inner filter effects due to nucleotide absorbance (double arrows without numbers). Values were corrected for the small changes in intensity resulting from dilution on the addition of ligands, but *not* for the changes due to these inner-filter effects. Note that using 295 nm instead of a shorter excitation wavelength minimizes the inner-filter effect of the nucleotide, and using 320 nm instead of a longer emission wavelength maximizes the Mg^{2+} -induced signal, see ref 11. (E) After correction for the drift and inner-filter effects, relative fluorescence levels in the presence of the various concentrations of Mg-ATP were plotted for the four conditions above: without glycerol and without detergent (open circles), with glycerol but without detergent (closed circles), or with glycerol and either 2 mg/mL DDM (closed squares) or 2 mg/mL $C_{12}E_8$ (closed triangles). Data points were fitted to equations whose Hill coefficients all fell into the 1.05 ± 0.1 range.

have an unfavorable effect on the affinity of SERCA1a for Mg-ATP (12), we reverted to a standard pH 7 situation. Figure 7 shows an experiment in which, after an initial addition of EGTA and 5 mM Mg^{2+} (to be commented upon below), various concentrations of Mg-ATP (ranging from 0.3 to 300 μ M) were added to SR vesicles to trigger the anticipated increase in fluorescence caused by Mg-ATP binding to the ATPase. For the highest concentrations of added Mg-ATP, e.g., 300 μ M (several such additions were made; see double arrows in Figure 7A), a drop in fluorescence intensity was observed, instead of a rise, because of the inner-filter effect of the UV absorbance of nucleotide at

these high concentrations (36). For lower concentrations of $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$, the inner-filter effect was marginal, thus allowing unambiguous evaluation of the “true” effect of $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ addition on Trp fluorescence. We found that glycerol alone reduced the apparent affinity for $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ binding (Figure 7B versus Figure 7A), but that the presence of DDM on top of glycerol reversed this effect (Figure 7C versus Figure 7A and B). The apparent dissociation constants for $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ binding to DDM-solubilized SERCA1a in the presence of glycerol or to membrane-embedded SERCA1a in the absence of glycerol were fairly similar ($5\text{--}8\ \mu\text{M}$ at pH 7 and $5\ \text{mM}$ Mg^{2+} see Figure 7E). Contrarily to DDM, however, C_{12}E_8 did *not* reverse the apparent affinity for $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ binding, and left this affinity poor, or even poorer (Figure 7D and 7E). The same trend was observed in the absence of Mg^{2+} , i.e., the mere presence of glycerol again made ATP-induced Trp fluorescence changes less easily observable, in terms of both amplitude and affinity, and this loss of affinity for ATP binding was again reversed by DDM, but not by C_{12}E_8 (data not shown).

The effect of Mg^{2+} alone in these experiments is worth a word of comment. The effect of Mg^{2+} on the Trp fluorescence of Ca^{2+} -depleted ATPase is thought to result from Mg^{2+} binding either to the Ca^{2+} binding sites or to other sites on the ATPase (11, 15). In the absence of detergent, glycerol strongly reduced the Mg^{2+} -dependent rise in Ca^{2+} -free ATPase fluorescence (compare panels A and B in Figure 7), as previously reported (32), but DDM again counteracted this reduction by glycerol and made the Mg^{2+} -dependent rise clearly detectable again (panel C in Figure 7). Again, C_{12}E_8 behaved differently from DDM, as it did *not* reverse the loss in the Mg^{2+} -dependent rise, and in fact induced further loss (panel D in Figure 7; see also Figure S5 in the Supporting Information, where a higher concentration of Mg^{2+} was tested). The Mg^{2+} -dependent Trp fluorescence changes are therefore consonant with the effects of the same detergents on the apparent affinity for $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$.

Incidentally, we also tested whether, in the presence of glycerol, nucleotides remained effective in changing the Trp fluorescence of detergent-solubilized Ca^{2+} -saturated SERCA1a (the E1 form), as they are, to a moderate extent, for membrane-embedded SERCA1a. ADP (or AMPPCP, not shown) indeed slightly raised Trp fluorescence of both DDM- and C_{12}E_8 -solubilized SERCA1a (Figure S6 in the Supporting Information). Of course, in this case, glycerol was not indispensable to the success of the experiment, as Ca^{2+} alone maintained solubilized SERCA1a in a stable form (36). In the presence of glycerol and DDM, addition of ADP and then aluminum fluoride clearly triggered the formation of a species with still higher fluorescence (Figure S6C in the Supporting Information), presumably the $\text{Ca}_2 \cdot \text{E1} \cdot \text{ADP} \cdot \text{AlF}_x$ species (36), but in the presence of C_{12}E_8 on top of glycerol, a rise in Trp fluorescence was hardly discernible on the addition of AlF_x after ADP (Figure S6D in the Supporting Information). Note that glycerol alone apparently slowed down the formation of $\text{Ca}_2 \cdot \text{E1} \cdot \text{ADP} \cdot \text{AlF}_x$, as illustrated in panel B versus panel A in Figure S6 in the Supporting Information).

FITC Labeling Is Probably Not of Much Use for Studying the Effects of Binding to Solubilized ATPase of Ligands Like Ca^{2+} . At this point we labeled SR ATPase with FITC at Lys515 in the nucleotide-binding domain (55, 53), to

ascertain whether or not, in the presence of glycerol and DDM or C_{12}E_8 , FITC fluorescence in the labeled ATPase would retain some of the properties previously described in the absence of detergent. In solubilized and Ca^{2+} -depleted FITC-ATPase, FITC fluorescence did remain stable in the presence of 40% glycerol, in contrast with its previously reported instability in the absence of glycerol (18). However, although inactivation of the ATPase was apparently blocked, chelation or subsequent addition of Ca^{2+} only induced small changes in FITC fluorescence, and this was already the case in the mere presence of glycerol and absence of detergent. These somewhat disappointing results are shown as Figure S7 in the Supporting Information, panels A–F. Probably because of this adverse effect of glycerol, FITC-labeled ATPase was not much useful either to detect the possible formation of complexes of Ca^{2+} -free ATPase complexes with vanadate, in the presence of glycerol and detergent (Figure S8 in the Supporting Information, panels A–D).

Trp Fluorescence Experiments with Heterologously Expressed Mutants. In addition to the study of rabbit SR SERCA1a solubilized in different detergents, the study of SERCA1a mutants after their heterologous expression in yeast and subsequent purification in the presence of DDM (16) will also benefit from the present results. As an example, we show here experiments performed with the initial aim of confirming, in the presence of detergent, an observation we had previously made with WT and a Ca^{2+} site mutant of SERCA1a, E309Q, after both had been purified and reconstituted in lipids (15). Because the E309Q mutant lacks Site II for Ca^{2+} binding but remains able to bind Ca^{2+} at Site I, we had wondered whether this binding was sufficient to induce Trp fluorescence changes. In that earlier work, performed with SERCA1a proteins expressed with a histidine tag, purified and reconstituted, the expressed proteins had suffered to a significant extent from the reconstitution protocol (as shown by the fact that ATPase activities and Ca^{2+} -dependent Trp fluorescence changes were both lower for the WT enzyme than for native SR vesicles). Nevertheless, we had considered significant the fact that, with the E309Q mutant, Ca^{2+} -dependent fluorescence changes were reduced to virtually zero, whereas Mg^{2+} -dependent changes were still observable (15).

Similar experiments, performed here using SERCA1a tagged with a biotin acceptor domain (BAD), purified by streptavidin chromatography and kept solubilized in the presence of glycerol and detergent (8), made it clear that, for the E309Q mutant lacking Site II, Ca^{2+} -dependent changes were indeed reduced to virtually zero, as initially suspected, whereas Mg^{2+} -dependent changes were still observable, although with a reduced amplitude (bottom left trace in Figure 8). A similar conclusion was derived from experiments in which a second Site II mutant, E309A, was used, instead of the E309Q mutant (data not shown). Note that, in the present experiments, Ca^{2+} -dependent relative changes in fluorescence were of similar magnitude for yeast-expressed WT SERCA1a and for control solubilized rabbit SR SERCA1a (middle and top left traces in Figure 8).

Nevertheless, a closer look at the results of these new experiments, compared to those we reported previously (34), showed that Ca^{2+} -induced Trp fluorescence changes *not only* were reduced to virtually zero in the E309Q mutant but also were converted to a small signal of opposite sign (see the

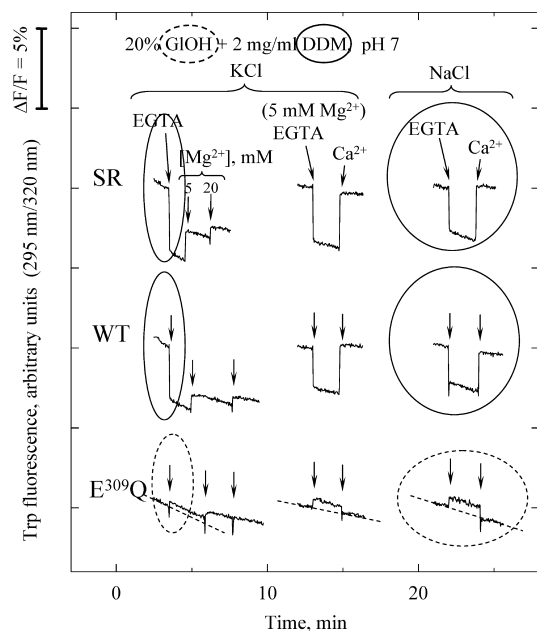


FIGURE 8: Binding of Ca^{2+} to the yeast-expressed SERCA1a mutant E309Q triggers small Trp fluorescence changes, of a sign opposite to that for the corresponding SR or WT SERCA1a changes. SERCA1a (either extracted from native SR, or yeast-expressed as WT or E309Q and purified, middle and bottom traces, respectively) was diluted 20-fold in a medium containing 100 mM KCl (or 100 mM NaCl for the last traces on the right) and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20 °C (panel A), and supplemented with 20% (w/w) glycerol, 2 mg/mL DDM, and extra Ca^{2+} , whose final total concentration was 100 μM , including the Ca^{2+} added together with the expressed enzyme. The final concentration of SERCA1a was about 10 $\mu\text{g/mL}$ in all cases. Left traces: 2 mM EGTA was added, followed by 5 mM Mg^{2+} and then another 15 mM (to reach 20 mM). Central and right traces (the latter in the presence of NaCl instead of KCl): the medium contained 5 mM Mg^{2+} from the start; 2 mM EGTA was added, followed by 3 mM Ca^{2+} . Values were corrected for the small changes in fluorescence intensity resulting from dilution on the addition of ligands. The traces for SR, WT and E309Q were shifted vertically in relation to each other, for clarity.

dashed line in the bottom left trace of Figure 8), while in the E309A mutant, the residual small signal kept the same sign (not shown, but see below). For E309Q, this signal of opposite sign, of borderline reliability compared with the noise level, was more clearly visible in the presence of Mg^{2+} , added from the start (central traces in Figure 8), and even more clearly when KCl was replaced by NaCl (right traces in Figure 8). Conversely, this small signal was less clear when 290 nm was used as the excitation wavelength, instead of 295 nm (data not shown). Remarkably, in a previous stopped-flow study of the EGTA-induced Trp fluorescence changes in native SR membranes, the presence of NaCl and an excitation wavelength in the long wavelength range (295 nm) had both been found optimal, during dissociation of the two Ca^{2+} ions from their sites, for revealing the transient occupation of an ATPase state with *lower fluorescence than the final equilibrium state* in the absence of Ca^{2+} . This “super-low” fluorescence had been proposed to be due to an E1-like state with only one residual Ca^{2+} ion bound, instead of the two initially bound ions (35). A similar proposal had also been previously derived from the observation that in the presence of perturbing concentrations of DDM, i.e., under conditions where cooperativity for the binding of the two Ca^{2+} ions was lost, binding of Ca^{2+} to

its binding site of highest affinity in fact *reduced* Trp fluorescence, although Ca^{2+} binding to both sites raised it (39). The results of the present experiments, in which only one Ca^{2+} ion can bind to the E309Q mutant, at “Site I”, are fully consistent with these previous proposals.

To make sure that the E309Q and E309A mutants had not been denatured during purification, we checked, using the glycerol- and DMSO-containing medium at pH 6 previously used for the experiments illustrated in Figures 5 and S4, that, in the presence of C_{12}E_8 and DOPC in a 2:1 ratio (w/w), the putative formation of the $\text{E}2\cdot\text{BeF}_3$ species induced rises in Trp fluorescence of fairly similar amplitudes for all SERCA1a proteins, namely, these expressed mutants, the expressed WT SERCA1a, and the rabbit SR SERCA1a. We found that this was indeed the case (right portion of the traces in Figure S9 in the Supporting Information). Note that, as a result of the prevailing C_{12}E_8 /lipid ratio, Ca^{2+} chelation by EGTA induced Trp fluorescence changes of relatively small amplitude even for native SR SERCA1a (Figure S9A in the Supporting Information) and expressed WT SERCA1a (Figure S9B in the Supporting Information). Nevertheless, for the expressed E309Q mutant, the above-reported change in the sign of the Ca^{2+} -dependent signal was even more apparent (Figure S9C in the Supporting Information) than under the conditions of the experiment in Figure 8. Again, this change of sign did not occur for E309A (Figure S9D in the Supporting Information).

DISCUSSION

When native SERCA1a is solubilized by detergent in the absence of glycerol, the amplitudes of certain ligand-induced changes in its Trp fluorescence may be reduced (see, for instance, ref 23), and the SERCA1a instability which results from solubilization and delipidation (e.g., in the presence of a large excess of detergent) makes fluorescence measurements even more difficult (see, for instance ref (18)). We found here that clear Ca^{2+} -dependent changes again became observable in the presence of glycerol together with solubilizing concentrations of detergent (Figure 13), and this was also true of other ligand-induced changes, although success in some cases depended on the particular detergent used and required the simultaneous addition of lipid (Figures 4–7). In the combined presence of glycerol and detergent, the steady drift in intensity, which under other conditions is not always easily distinguished from ligand-induced changes, became even slower than in the absence of detergent, perhaps because of reduced adsorption of the protein onto the cuvette walls. Thus, the main message conveyed by the present work is that adding glycerol to the medium for experiments with detergent-solubilized SERCA1a is effective not only for ensuring long-term stability of the overall ATPase activity of the solubilized SERCA1a as was long ago demonstrated (see, for instance, refs 17, 27) but also, more specifically, for making feasible with solubilized SERCA1a most of the Trp fluorescence experiments which in membrane-embedded SERCA1a have proved useful for detecting and quantifying ligand-induced conformational transitions. The protective effect of glycerol on solubilized and delipidated SERCA1a, which is especially visible in the absence of Ca^{2+} , might be partly due to the slowing down by glycerol of the dynamics of the SERCA1a polypeptide chain (56), partly to more

general and previously discussed effects of cosmotropes (57). Note that we checked that in the presence of glycerol up to 40% w/w, there was not much change in the cmc or in the solubilizing efficiency of DDM or C₁₂E₈.

An attractive consequence of this message is that it opens the way to easier Trp fluorescence studies with heterologously expressed SERCA1a mutants, as such studies will be possible without the previous need to reconstitute these mutants into liposomes as in previous studies (14–16), an additional step during which inactivation hazards may occur. To our knowledge, only one previous study took advantage of this possibility, but it was restricted to the characterization of expressed WT SERCA1a (13). Recently, in a different work, we studied the D351A and P312A mutants by such Trp fluorescence measurements in the simultaneous presence of glycerol and detergent, without reconstitution (8). Here, as another example, we used the E309Q mutant, which lacks Site II, one of the two sites for Ca²⁺ binding, to prove a suggestion originally derived from both kinetic experiments with native SR vesicles (35) and equilibrium experiments performed under conditions in which the cooperativity of Ca²⁺ binding had been lost (39). The suggestion was that Ca²⁺ binding to Site I in WT SERCA1a in fact slightly *reduced* Trp fluorescence, implying that Ca²⁺ binding to Site II only was mainly responsible for the generally observed *rise* in Trp fluorescence. The results obtained here with the E309Q mutant fully support this suggestion.

Note, however, that for another Site II mutant, the E309A mutant, EGTA-induced fluorescence changes at pH 7 were again reduced compared to WT, but nevertheless kept the “normal” sign. This observation might at first sight be connected with the fact that the E309Q mutant was previously reported to be *completely* unable to be phosphorylated from ATP, whereas an E309A mutant could be phosphorylated at high enough Ca²⁺ concentrations (4, 58, 59). However, it is fair to note that these E309Q and E309A mutants were derived from rabbit and frog SERCA1a, respectively. If the difference in their behavior is nevertheless due to the mutation itself, it would fit very well with our fluorescence data, and both sets of results would imply that some residual binding of Ca²⁺ to the mutated Site II in E309A is possible, but none at all to the corresponding site in E309Q, despite the fact that mutation of E to Q is generally thought to be more conservative than mutation to A. Alternatively, or as a complementary possibility, our results might be discussed in connection with previous findings suggesting, from both proteolytic and TG inhibition studies, that mutation of the E309 side chain could result in unusual properties for the mutant (60–62). These results could imply that, beyond its role in liganding Ca²⁺, the side chain at residue 309 might play a significant role in stabilizing or destabilizing interhelical interactions in the transmembrane region in the absence of Ca²⁺. In rat gastric H⁺,K⁺-ATPase, residues involved in the cation-binding site have already been suggested to participate in a conformationally sensitive interhelical network (63, 64), and related interhelical interactions can indeed be found in the SERCA1a published structures. In SERCA1a in the absence of Ca²⁺, the different abilities of E, Q and A side chains at position 309 to establish this type of interhelical connection might differ and account for the existence of differences between WT and the various mutants, beyond differences in their Ca²⁺ binding ability.

Even in WT SERCA1a, Trp fluorescence measurements could of course be considered as a mere black box from which little detailed molecular information will ever be derived. For instance, the results in Figures 5 and 6 imply that the absence of a Pi-dependent Trp fluorescence signal does not necessarily imply the absence of E2P formation, and show that only specific conditions allow Trp fluorescence to be sensitive to this formation (in this case, C₁₂E₈ + DOPC). A conceivable explanation for this fact could be that some of the Trp residues which normally change fluorescence as a result of the protein transition to a particular new conformation (e.g., E2P) are Trp residues which reside at the interface between the protein, the hydrophobic region of the membrane and the water phase: as a result, the presence of fairly well positioned phospholipid headgroups (and not only highly disordered detergent chains) in this region, close to these Trp residues, might be critical for discriminating between the fluorescence intensities of these Trp residues in the two conformations of the protein. Note, for instance, that, in the presence of Ca²⁺ and AMPPCP, a phospholipid headgroup was found very close to W¹⁰⁷ of the protein, a Trp residue which together with the transmembrane M2 probably moves significantly during the various conformational transitions of SERCA1a (68), and that another phospholipid headgroup was found nearby in one of the Ca²⁺-free forms of SERCA1a (e.g., 2AGV in the PDB) but *not* after fluoride binding and relocation of M2 (69). The ability of additional DOPC to compete with one particular type of detergent close to these residues, but not necessarily with the other, could account for its possible effects on the amplitude and sign of the Trp fluorescence signals during a particular transition.

Irrespective of detailed (and speculative) interpretation, an attractive prospect of our findings is that they open the way to the study of the different effects exerted on SERCA1a by different solubilizing detergents. In fact, only few of the previous reports about the overall ATPase activity of SERCA1a include detailed descriptions of how the various intermediate steps in the catalytic cycle are altered by one or the other detergent under solubilizing conditions (see, for instance, refs 17, 30, 31, 44, 54, 65). Detailed information about the specific effects of DDM and C₁₂E₈ was only obtained when each of these two detergents was added to SR membranes at a concentration below its cmc and was therefore inserted into the membranes without inducing solubilization (see, for instance refs 25, 26, 39, 47).

Under fully solubilizing conditions, our experiments make it possible to pinpoint specific effects on SERCA1a of the solubilizing concentrations of DDM and C₁₂E₈: (1) these concentrations tend to reduce the equilibrium affinity of the ATPase for Ca²⁺ (Figure 1), at least for the Ca²⁺ ion bound to Site II (Figure 8), in ways specific to each detergent, especially at pH 6 where C₁₂E₈ has a distinctly unfavorable effect on Ca²⁺ binding (Figures 2–4); (2) C₁₂E₈ is more favorable than DDM for SERCA1a phosphorylation from Pi, especially in the presence of added lipid (Figures 5 and 6); (3) conversely, DDM, but not C₁₂E₈, allows Mg•ATP and ATP (as well as Mg²⁺ alone, probably) to retain a high affinity for binding to SERCA1a in the presence of glycerol (Figure 7); (4) a striking finding which also emerges from the present work, despite its poor kinetic resolution, is that, at least at pH 6, solubilizing concentrations of DDM reverse

the inhibition by glycerol of the Ca^{2+} -induced transition, whereas the same concentrations of C_{12}E_8 *do not* reverse this inhibition and even induce further slowing down under delipidating conditions (Figure 2, A–D; Figure 3, A versus B; Figure 5, A–D). To explain these various results in detail is beyond the scope of the present report, and at this stage, a complete characterization by stopped-flow experiments of the *rates* of the various ligand-induced fluorescence changes in solubilized SERCA1a is still lacking. We can nevertheless already make a fair suggestion about the detergent-induced changes in the rate of what is known as the E2 to E1 transition.

This E2 to E1 transition is generally thought to *precede* Ca^{2+} binding to the E1 form. In SR membranes, we know that glycerol *per se* slows down this transition (Figure 9 in ref (32)), while both DDM and C_{12}E_8 accelerate it under nonsolubilizing but “perturbing” conditions (25, 26, 47); it is also already clear that, at pH 6, the E2 to E1 transition is the main rate-limiting step for the effect of Ca^{2+} addition, and becomes even more so in the additional presence of glycerol (32). We suggest that a slowing down of the E2 to E1 transition, exerted by solubilizing C_{12}E_8 concentrations (depending on the exact detergent to lipid ratio), is a key event accounting for most of the observations in the present work concerning the differences between the effects of DDM and C_{12}E_8 .

Our ATPase activity and turnover results at pH 6 in the presence of glycerol provide a first illustration of the probable validity of this suggestion. Under these conditions, the E2 to E1 transition presumably is the main rate-limiting step for overall ATP hydrolysis, and this is why nonsolubilizing concentrations of both DDM and C_{12}E_8 *stimulate* overall ATP hydrolysis (Figure 4B,C), in distinct contrast with what is observed under more usual conditions, i.e., at pH 7.5 in the absence of glycerol, conditions under which nonsolubilizing concentrations of both DDM and C_{12}E_8 *inhibit* overall activity (26, 47): nonsolubilizing concentrations of C_{12}E_8 and DDM are known to stimulate the rate of the E2 to E1 transition under a variety of conditions (Figure 10C in ref (47); Figure 3 in ref (26)), and therefore are expected to reverse the inhibitory effect of glycerol on this step and to stimulate overall ATPase activity in the present experiments. Conversely, the fact that, at pH 6 and with glycerol, overall ATPase activity reverts to very low values in the presence of solubilizing concentrations of C_{12}E_8 but not of DDM (Figures 4C and 4B) (and remains low in the presence of C_{12}E_8 even after saturation of the Ca^{2+} sites) is consistent with the idea that solubilizing C_{12}E_8 is no longer able to do what nonsolubilizing C_{12}E_8 was doing, because it no longer accelerates the E2 to E1 transition but probably slows it down. In contrast, at pH 7.5 in the absence of glycerol, C_{12}E_8 is known to keep ATPase activity relatively high (whereas DDM strongly inhibits it (21)), because under these new conditions, the E2 to E1 transition is no longer rate-limiting.

The slowing down by C_{12}E_8 (but not DDM), at high, delipidating concentrations, of the rate of the E2 to E1 transition at pH 6, is also likely to account for part if not all of the huge reduction in the affinity for Ca^{2+} of C_{12}E_8 -solubilized SERCA1a (Figures 2, 3). At pH 6, the E2 to E1 pre-equilibrium which precedes Ca^{2+} binding is indeed generally considered to already shift very much in favor of E2 (in fact $\text{E2}\cdot\text{H}_n$) in the absence of glycerol (75, 67), and

glycerol probably shifts this equilibrium even further (32): thus, any slowing down of the E2 to E1 transition rate, as occurs with solubilizing concentrations of C_{12}E_8 (but not of DDM), will directly contribute to a further shift in the equilibrium toward E2, and hence to the observed further shift of $\text{Ca}_{1/2}$ values, up to millimolar values (Figures 2, 3). The same is probably true in the absence of glycerol at pH 6, because conventional ATPase activity measurements revealed a similar shift of the $\text{Ca}_{1/2}$ value for ATP hydrolysis activation in the presence of C_{12}E_8 (Figure 3D). Incidentally, note that these conventional ATPase activity measurements, in the absence of glycerol but presence of a high $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ concentration, could be performed without suffering from the adverse effect of irreversible ATPase denaturation, presumably because the constant presence of a high $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ concentration protected the Ca^{2+} -free forms of solubilized SERCA1a from inactivation (17, 27) just as efficiently as glycerol did in “turnover” experiments at low ATP concentrations (although presumably via a different mechanism). As mentioned under Results, when lipids were added together with detergent, they also to some extent rendered glycerol superfluous, for similar reasons.

The same differential effect of C_{12}E_8 in favor of E2 might also account in part for the fact that formation of E2P (from Pi) or $\text{E2}\cdot\text{BeF}_3$ (from fluoride), two species formed from the E2 state of SERCA1a, is more favorable in the presence of C_{12}E_8 than in the presence of DDM, especially in the presence of additional lipids (Figures 5 and 6). A similar differential shift by C_{12}E_8 (but not DDM) of the E2 to E1 equilibrium in favor of E2, not only at pH 6 but also under other conditions, would also account in part for our observations concerning binding of nucleotides and Mg^{2+} (Figure 7): if one accepts the view that the E1 conformation has a higher affinity for ATP than the E2 conformation, a widely accepted notion in the Na^+, K^+ -ATPase field, and the view that Mg^{2+} -dependent changes are accompanied by a shift of the E2 to E1 equilibrium toward E1, as suggested in refs 11,66,67, a C_{12}E_8 -induced shift of this equilibrium in the opposite direction, in favor of E2, would indeed account for the poorer binding of $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$, ATP and Mg^{2+} (Figure 7 and data not shown) in the presence of C_{12}E_8 than in the presence of DDM. Note that, in the absence of detergent, the similar effect of glycerol alone, shifting the E2 to E1 equilibrium toward E2, is also the simplest explanation for the reduced affinity of SERCA1a for Ca^{2+} and $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$, and the increased apparent affinity for Pi, observed in the presence of glycerol. Conversely, a DDM-induced shift of the E2 to E1 equilibrium toward E1 might contribute to the poorer cooperativity of Ca^{2+} binding at pH 7 in the presence of DDM, compared with C_{12}E_8 (Figure 1E and Figure S2E in the Supporting Information), because of the previously discussed view that a major determinant of the cooperativity of Ca^{2+} binding is the balance of this E2/E1 equilibrium (any shift of this equilibrium toward E2 increases cooperativity, see ref 42): at pH 7, conditions under which the equilibrium is probably not very different from 1 under usual conditions (see, for instance ref (55)) and the cooperativity not the highest (42), DDM could further reduce the cooperativity for Ca^{2+} by favoring E1 instead of E2.

From a “historical” point of view, the unexpected very large reduction in the affinity for Ca^{2+} of SERCA1a solubilized in the presence of C_{12}E_8 at pH 6 probably enables

us, 25 years later, to understand why, in ref (30), pCa 4 was not sufficient to protect SERCA1a from irreversible activation after SR membrane solubilization with C₁₂E₈ at pH 6 (Figures 4, 8 and 9 in ref (30)). A large reduction in affinity for Ca²⁺ probably also accounts in part for the fact, long considered somewhat mysterious, that, to achieve appropriate protection of the solubilized Ca²⁺-bound state of SERCA1a in the first successful crystallization attempts (in the presence of C₁₂E₈ at pH 6.1), the addition of unusually high concentrations of Ca²⁺ (and lipid) was found to be required (6, 29). The relatively poor affinity of ATPase for Ca²⁺ under these original solubilization conditions probably contributed to this requirement, which should therefore no longer be considered mysterious.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Alexandre Marchand, Christine Jaxel, Marc le Maire, Jesper Møller and Jens Peter Andersen for their contribution to the initial project of this work or subsequent fruitful discussions, and to Béatrice de Foresta, Antony Lee and one of our reviewers for helpful advice on the first version of this manuscript. Concerning the construction of the BAD-containing vectors, we are grateful to Pierre Falson for his early involvement in the project, to Christine Jaxel for finalizing it for the WT and E309Q mutation, and to Alexandre Marchand for finalizing it for the E309A mutation. We also thank Mathilde Dreyfus for her help in editing an early version of the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Supplemental references; methods for measuring the effect of glycerol on the critical micellar concentration and the critical solubilizing concentration of DDM and C₁₂E₈; Figure S1 showing protection by glycerol in the case of DDM, too; Figure S2 showing Ca²⁺-dependent changes in the presence of Mg²⁺; Figure S3 showing turnover-dependent signals at pH 8 and 10 mM Mg²⁺, together with a comment on complementary Ca²⁺ release experiments; Figure S4 showing BeF₃-dependent signals; Figure S5 showing Mg²⁺-dependent changes in Trp fluorescence; Figure S6 showing the effects of ADP and AlF_x in the presence of Ca²⁺; Figure S7 showing Ca²⁺-dependent changes in FITC fluorescence in the presence of glycerol and detergent; Figure S8 showing vanadate-dependent changes in FITC fluorescence; and Figure S9 showing the formation of E2•BeF₃ for expressed SERCA1a and mutants. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Hasselbach, W., and Makinose, M. (1961) The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting. *Biochem. Z.* 333, 518–528.
- de Meis, L., and Vianna, A. L. (1979) Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 275–292.
- Maruyama, K., and MacLennan, D. H. (1988) Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca²⁺ transport activity of the Ca²⁺-ATPase expressed in COS-1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3314–3318.
- Andersen, J. P. (1995) Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by site-directed mutagenesis. *Biosci. Rep.* 15, 243–261.
- Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 269–292.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405, 633–634.
- Jidenko, M., Nielsen, R. C., Sørensen, T. L., Møller, J. V., le Maire, M., Nissen, P., and Jaxel, C. (2005) Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11687–11691.
- Marchand, A., Winther, A.-M. L., Holm, P. J., Olesen, C., Montigny, C., Arnou, B., Champeil, P., Clausen, J. D., Vilsen, B., Andersen, J. P., Nissen, P., Jaxel, C., Møller, J. V., and le Maire, M. (2008) Crystal Structure of D351A and P312A mutant forms of the mammalian sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase reveal key events in phosphorylation and Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* 283, 14867–14882.
- Dupont, Y. (1976) Fluorescence studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 544–550.
- Lacapère, J. J., Gingold, M., Champeil, P., and Guillain, F. (1981) Sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylation from inorganic phosphate in the absence of a calcium gradient. Steady state and kinetic fluorescence studies. *J. Biol. Chem.* 256, 2302–2306.
- Guillain, F., Gingold, M. P., and Champeil, P. (1982) Direct fluorescence measurements of Mg²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 257, 7366–7371.
- Lacapère, J. J., Bennett, N., Dupont, Y., and Guillain, F. (1990) pH and magnesium dependence of ATP binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence that the catalytic ATP-binding site consists of two domains. *J. Biol. Chem.* 265, 348–353.
- Miras, R., Cuillel, M., Catty, P., Guillain, F., and Mintz, E. (2001) Purification of heterologous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase SERCA1a allowing phosphoenzyme and Ca²⁺-affinity measurements. *Protein Expression Purif.* 22, 299–306.
- Lenoir, G., Picard, M., Møller, J. V., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2004) Involvement of the L6–7 loop in SERCA1a Ca²⁺-ATPase activation by Ca²⁺ (or Sr²⁺) and ATP. *J. Biol. Chem.* 279, 32125–32133.
- Lenoir, G., Jaxel, C., Picard, M., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2006) Conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mutants: effect of mutations either at Ca²⁺-binding site II or at tryptophan 552 in the cytosolic domain. *Biochemistry* 45, 5261–5270.
- Jidenko, M., Lenoir, G., Fuentes, J. M., le Maire, M., and Jaxel, C. (2006) Expression in yeast and purification of a membrane protein, SERCA1a, using a biotinylated acceptor domain. *Protein Expression Purif.* 48, 32–42.
- Møller, J. V., Lind, K. E., and Andersen, J. P. (1980) Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membranous (Ca²⁺ + Mg²⁺)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 255, 1912–1920.
- Andersen, J. P., Møller, J. V., and Jørgensen, P. L. (1982) The functional unit of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 257, 8300–8307.
- McIntosh, D. B., and Ross, D. C. (1985) Role of phospholipid and protein-protein associations in activation and stabilization of soluble Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 24, 1244–1251.
- Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1987) Effect of phospholipid, detergent and protein-protein interaction on stability and phosphoenzyme isomerization of soluble sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 170, 421–429.
- Lund, S., Orłowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Møller, J. V. (1989) Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264, 4907–4915.
- Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J. L., and le Maire, M. (2000) Interaction of amphipols with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275, 18623–18637.
- Dupont, Y., and le Maire, M. (1980) Fluorometric study of the solubilized Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 115, 247–252.
- Lüdi, H., Rauch, B., and Hasselbach, W. (1982) The influence of detergents on the Ca²⁺- and Mg²⁺-dependent adenosine triphosphatase of the sarcoplasmic reticulum. *Z. Naturforsch.* 37c, 299–307.
- Andersen, J. P., Le Maire, M., Kragh-Hansen, U., Champeil, P., and Møller, J. V. (1983) Perturbation of the structure and function

- of a membranous Ca^{2+} -ATPase by non-solubilizing concentrations of a non-ionic detergent. *Eur. J. Biochem.* 134, 205–214.
26. de Foresta et al., B., Henao, F., and Champeil, P. (1992) Kinetic characterization of the perturbation by dodecylmaltoide of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Eur. J. Biochem.* 209, 1023–1034.
27. Dean, W. L., and Tanford, C. (1978) Properties of a delipidated, detergent-activated Ca^{2+} -ATPase. *Biochemistry* 17, 1683–1690.
28. Murphy, A. J., Pepitone, M., and Highsmith, S. (1982) Detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase: hydrodynamic and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 257, 3551–3554.
29. Pikula, S., Mullner, N., Dux, L., and Martonosi, A. (1988) Stabilization and crystallization of Ca^{2+} -ATPase in detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263, 5277–5286.
30. Kosk-Kosicka, D., Kurzmack, M., and Inesi, G. (1983) Kinetic characterization of detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 22, 2559–2567.
31. Mahaney, J. E., Thomas, D. D., and Froehlich, J. P. (2004) The time-dependent distribution of phosphorylated intermediates in native sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from skeletal muscle is not compatible with a linear kinetic model. *Biochemistry* 43, 4400–4416.
32. Champeil, P., Guillaing, F., Vénien, C., and Gingold, M. P. (1985) Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-depleted sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation. *Biochemistry* 24, 69–81.
33. Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2006) Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride. *J. Biol. Chem.* 281, 3360–3369.
34. Orlowski, S., and Champeil, P. (1993) Strontium binding to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Spectroscopic differentiation of the substeps involved. *FEBS Lett.* 328, 296–300.
35. Champeil, P., Henao, F., and de Foresta, B. (1997) Dissociation of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and changes in fluorescence of optically selected Trp residues. Effects of KCl and NaCl and implications for substeps in Ca^{2+} dissociation. *Biochemistry* 36, 12383–12393.
36. Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005) The average conformation at micromolar Ca^{2+} of Ca^{2+} -ATPase with bound nucleotide differs from that adopted with the transition state analog ADP·AlFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 280, 18745–18754.
37. Martell, A. E., and Smith, R. M. (1974) *Critical Stability Constants*, Vols. 1 and 3, Plenum Press, NY.
38. Patton, C., Thompson, S., and Epel, D. (2004) Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* 35, 427–431.
39. de Foresta, B., Henao, F., and Champeil, P. (1994) Cancellation of the cooperativity of Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by the non-ionic detergent dodecylmaltoide. *Eur. J. Biochem.* 223, 359–369.
40. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355–360.
41. Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thinès, D., le Maire, M., and Falson, P. (2002) Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca^{2+} -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1560, 67–83.
42. Forge, V., Mintz, E., and Guillaing, F. (1993) Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. I. Mechanism of affinity and cooperativity modulation by H^{+} and Mg^{2+} . *J. Biol. Chem.* 268, 10953–10960.
43. Verjovski-Almeida, S., and Silva, J. L. (1981) Different degrees of cooperativity of the Ca^{2+} -induced changes in fluorescence intensity of solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 256, 2940–2944.
44. McIntosh, D. B. and, and Davidson, G. A. (1984) Effects of nonsolubilizing and solubilizing concentrations of Triton X-100 on Ca^{2+} binding and Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 23, 1959–1965.
45. Fassold, E., Hasselbach, W., and Küchler, B. (1989) Effect of non-solubilizing SDS concentrations on high affinity Ca^{2+} binding and steady-state phosphorylation by inorganic phosphate of the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Z. Naturforsch.* 44c, 139–152.
46. Martin, D. W., Tanford, C., and Reynolds, J. A. (1984) Monomeric solubilized sarcoplasmic reticulum Ca pump protein: demonstration of Ca binding and dissociation coupled to ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6623–6626.
47. Champeil, P., le Maire, M., Andersen, J. P., Guillaing, F., Gingold, M., Lund, S., and Møller, J. V. (1986) Kinetic characterization of the normal and detergent-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Chem.* 261, 16372–16384.
48. Andersen, J. P., Lassen, K., and Møller, J. V. (1985) Changes in Ca^{2+} affinity related to conformational transitions in the phosphorylated state of soluble monomeric Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 260, 371–380.
49. Champeil, P., le Maire, M., Møller, J. V., Riollot, S., Guillaing, F., and Green, N. M. (1986) Does intrinsic fluorescence reflect conformational changes in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum? *FEBS Lett.* 206, 93–98.
50. Daiho, T., Yamasaki, K., Wang, G., Danko, S., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2001) Deletions of any single residues in Glu40-Ser48 loop connecting a domain and the first transmembrane helix of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase result in almost complete inhibition of conformational transition and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 278, 39197–39204.
51. Orlowski, S., Lund, S., Møller, J. V., and Champeil, P. (1988) Phosphoenzymes formed from $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ and $\text{Ca}\cdot\text{ATP}$ during pre-steady state kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 263, 17576–17583.
52. de Meis, L., Martins, O. B., and Alves, E. W. (1980) Role of water, hydrogen ion, and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase in the absence of a calcium ion gradient. *Biochemistry* 19, 4252–4261.
53. Montigny, C., Picard, M., Lenoir, G., Gauron, C., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2007) Inhibitors bound to Ca^{2+} -free sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase lock its transmembrane region but not necessarily its cytosolic region, revealing the flexibility of the loops connecting transmembrane and cytosolic domains. *Biochemistry* 46, 15162–15174.
54. McIntosh, D. B., and Ross, D. C. (1988) Reaction cycle of solubilized monomeric Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum is the same as that of the membrane form. *J. Biol. Chem.* 263, 12220–12223.
55. Pick, U., and Karlsh, S. J. (1982) Regulation of the conformation transition in the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum by pH, temperature, and calcium ions. *J. Biol. Chem.* 257, 6120–6126.
56. Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J.-L., and Champeil, P. (2006) Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study. *Biochemistry* 45, 1861–1869.
57. Timasheff, S. N. (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 67–97.
58. Andersen, J. P., and Vilsen, B. (1992) Functional consequences of alterations to Glu309, Glu771, and Asp800 in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267, 19383–19387.
59. Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1992) Mutational analysis of the role of Glu309 in the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase of frog skeletal muscle. *FEBS Lett.* 306, 247–250.
60. Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., Deschamps, S., Møller, J. V., Champeil, P., le Maire, M., and Falson, P. (1998) The cytoplasmic loop located between transmembrane segments 6 and 7 controls activation by Ca^{2+} of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 20134–20143.
61. Inesi, G., Lewis, D., Toyoshima, C., Hirata, A., and de Meis, L. (2007) Conformational fluctuations of the Ca^{2+} -ATPase in the native membrane environment. Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin. *J. Biol. Chem.* 283, 1189–1196.
62. Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1998) Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of Na^{+} , K^{+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms. *Biochemistry* 37, 10961–10971.
63. Swarts, H. G., Hermesen, H. P., Koenderink, J. B., Schuurmans Stekhoven, F. M., and De Pont, J. J. (1998) Constitutive activation of gastric H^{+} , K^{+} -ATPase by a single mutation. *EMBO J.* 17, 3029–3035.
64. Swarts, H. G., Koenderink, J. B., Willems, P. H., Krieger, E., and De Pont, J. J. (2005) Asn792 participates in the hydrogen bond network around the K^{+} -binding pocket of gastric H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 280, 11488–11494.

65. Lund, S., and Møller, J. V. (1988) Biphasic kinetics of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and the detergent-solubilized monomer. *J. Biol. Chem.* 263, 1654–1664.
66. Champeil, P., Gingold, M. P., Guillaín, F., and Inesi, G. (1983) Effect of magnesium on the calcium-dependent transient kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase, studied by stopped flow fluorescence and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 258, 4453–4458.
67. Inesi, G., Lewis, D., Toyoshima, C., Hirata, A., and de Meis, L. (2008) Conformational fluctuations of the Ca^{2+} -ATPase in the native membrane environment. Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin. *J. Biol. Chem.* 283, 1189–1196.
68. Picard, M., Jensen, A. M., Sørensen, T. L., Champeil, P., Møller, J. V., and Nissen, P. (2007) Ca^{2+} versus Mg^{2+} coordination at the nucleotide-binding site of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Mol. Biol.* 368, 1–7.
69. Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2005) Structural role of countertransport revealed in Ca^{2+} pump crystal structure in the absence of Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14489–14496.

BI8006498

Supporting Information for the Manuscript:

**Use of glycerol-containing media to study the intrinsic fluorescence properties
of detergent-solubilized native or expressed SERCA1a .**

by Cédric Montigny, Bertrand Arnou, Estelle Marchal, and Philippe Champeil

*CNRS, URA 2096 (Systèmes membranaires, photobiologie, stress et détoxication),
F-91191 Gif-sur-Yvette, and
CEA, iBiTec-S (Institut de Biologie et Technologies de Saclay),
F-91191 Gif-sur-Yvette, France.*

Additional References concerning key reports or reviews about the function of SERCA1a and its structure in various states : see [supplemental references 1-17](#).

Supplemental references :

- suppl. ref. 1.* Ebashi, F., and Ebashi, S. (1962) Removal of calcium and relaxation in actomyosin systems. *Nature* 194, 378-379
- suppl. ref. 2.* Makinose, M. (1972) Phosphoprotein formation during osmo-chemical energy conversion in the membrane of the sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 25, 113-115.
- suppl. ref. 3.* Hasselbach, W. (1978) The reversibility of the sarcoplasmic calcium pump. *Biochim. Biophys. Acta* 515, 23-53.
- suppl. ref. 4.* Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 282-295.
- suppl. ref. 5.* Møller, J. V., Nissen, P., Sørensen, T. L., and le Maire, M. (2005) Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump. *Curr Opin Struct Biol.* 15, 387-393.
- suppl. ref. 6.* Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418, 605-611.
- suppl. ref. 7.* Toyoshima, C., Nomura, H., and Sugita, Y. (2003) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 555, 106-110.
- suppl. ref. 8.* Sørensen, T. L.-M., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304, 1672-1675.
- suppl. ref. 9.* Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430, 529-535.
- suppl. ref. 10.* Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* 442, 361-368.
- suppl. ref. 11.* Olesen, C., Sørensen, T. L.-M., Nielsen, R. C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science* 306, 2251-2255.
- suppl. ref. 12.* Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2005) Structural role of countertransport revealed in Ca^{2+} pump crystal structure in the absence of Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 14489-14496.
- suppl. ref. 13.* Jensen, A.-M. L., Sørensen, T. L., Olesen, C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2006) Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *EMBO J.* 25, 2305-2314.
- suppl. ref. 14.* Moncoq, K., Trieber, C. A., and Young, H. S. (2007) The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Chem.* 282, 9748-9757.
- suppl. ref. 15.* Takahashi, M., Kondou, Y., and Toyoshima, C. (2007) Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 5800-5805.
- suppl. ref. 16.* Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., and Ogawa, H. (2007) How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104, 19831-19836.
- suppl. ref. 17.* Olesen, C., Picard, M., Winther, A.M., Gyrup, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Møller, J.V., and Nissen, P. (2007) The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 450, 1036-1042.

Methods for measuring the effect of glycerol on the critical micellar concentration and the critical solubilizing concentration of DDM and C₁₂E₈.

The effect of glycerol on the critical micellar concentration (cmc) of the DDM and C₁₂E₈ detergents was tested using methyl orange, an amphiphilic dye capable of insertion into detergent micelles (see [suppl. ref. 18](#)), by evaluating the detergent concentration at which the absorbance properties of the dye start changing. We also evaluated the effect of glycerol on the critical solubilization concentration (csc) of these two detergents, by checking the efficiency of these detergents for reducing 90° light scattering by SR vesicles at 500 nm ([suppl. ref. 19](#)). As previously reported for the cmc of C₁₂E₈ ([suppl. ref. 20](#)), the cmc and csc of DDM and C₁₂E₈ only rose by less than a factor of 2 at 40% w/w glycerol, with intermediate values at 20% glycerol (data not shown).

- [suppl. ref. 18](#). de Foresta, B., Legros, N., Plusquellec, D., le Maire, M., and Champeil, P. (1996) Brominated detergents as tools to study protein-detergent interactions. *Eur. J. Biochem.* 241, 343-354.
- [suppl. ref. 19](#). de Foresta, B., le Maire, M., Orlowski, S., Champeil, P., Lund, S., Møller, J.V., Michelangeli, F., and Lee, A.G. (1989) Membrane solubilization by detergent: use of brominated phospholipids to evaluate the detergent-induced changes in Ca²⁺-ATPase/lipid interaction. *Biochemistry* 28, 2558-2567.
- [suppl. ref. 20](#). Aramaki, K., Olsson, U., Yamaguchi, Y., and Kunieda, H. (1999) Effect of water-soluble alcohols on surfactant aggregation in the C₁₂EO₈ system. *Langmuir* 15, 6226-6232.

Legends to the supporting Figures S1-S8 :

Supporting Figure S1: Measurements of Ca²⁺-dependent changes in the intrinsic fluorescence of detergent-solubilized ATPase (here at pH 7 in the absence of Mg²⁺) are rendered possible by the protective effect of glycerol against SERCA1a irreversible inactivation. Compared with Figure 1 of the main text, this Figure provides two additional panels (E & F), similar to Panels C & D but obtained in the presence of DDM instead of C₁₂E₈. SERCA1a intrinsic fluorescence was measured with SR vesicles suspended at a final protein concentration of 0.02 mg/ml in a 2-ml quartz cuvette, in a buffer containing 100 mM KCl and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C (Panel A), supplemented with 40% (w/w) glycerol as required (Panels B, D, F). The initial step consisted of adding 20 μM Ca²⁺ (4 μl of a 10 mM stock solution) on top of the contaminating Ca²⁺ (3-5 μM) already present in the buffer. This was followed, as required, by the addition of 2 mg/ml C₁₂E₈ (Panels C & D) or 2 mg/ml DDM (Panels E & F). Subsequent addition of 0.75 mM EGTA (5 μl of a 300 mM stock solution) then reduced [Ca²⁺]_{free} to about 0.013 μM, and the fluorescence intensity at this step was arbitrarily taken as 100%. Several amounts of extra total Ca²⁺ were then added, in the order and at the concentrations stated below together with the resulting final concentrations of total and free [Ca²⁺]: firstly, 0.3 mM (as 2 μl of a 300 mM stock solution), resulting in [Ca²⁺]_{total}=0.325 mM and [Ca²⁺]_{free}=0.29 μM; 0.3 mM again (2 μl at 300 mM), resulting in [Ca²⁺]_{total}=0.625 mM and [Ca²⁺]_{free}=1.8 μM; 0.1 mM (2 μl at 100 mM), resulting in [Ca²⁺]_{total}=0.725 mM and [Ca²⁺]_{free}=8.2 μM; 0.1 mM again (2 μl at 100 mM), resulting in [Ca²⁺]_{total}=0.825 mM and [Ca²⁺]_{free}=79 μM; and lastly, 0.3 mM (2 μl at 300 mM), resulting in [Ca²⁺]_{total}=1.125 mM and [Ca²⁺]_{free}=376 μM. For panel F, a supplementary addition of 0.3 mM (2 μl at 300 mM) was performed, resulting in [Ca²⁺]_{total}=1.425 mM and [Ca²⁺]_{free}=676 μM. To estimate [Ca²⁺]_{free} according to MaxChelator (a rough value is indicated on the figure itself), the dissociation constant of the Ca²⁺.chelator complex was assumed to be the same, irrespective of the presence or absence of glycerol (see text). The traces shown illustrate a representative experiment of several which gave similar results. Fluorescence intensities were corrected for the small changes due to sample dilution on the addition of ligands. Excitation and emission wavelengths were 295 nm and 320 nm respectively, with bandwidths of 5 and 10 nm respectively.

Comment: Note that the ATPase Trp fluorescence level itself changed slightly when detergent was added (Supporting Figure S1, C-F). Presumably, this change is mainly due to alterations in the environment and dynamics of the Trp residues, many of which reside at the interface between the protein and the lipid phase and may therefore not only sense local small changes in the protein conformation but also interact with detergent headgroups. The fluorescence change observed upon detergent addition may also be due to various other factors, including changes in the ability of contaminating Ca^{2+} to saturate ATPase sites, the presence of fluorescent contaminants in the detergent (this not very significant for the detergents we used here), solubilization-induced reduction of the inner filter effects due to turbidity, desorption from the cuvette walls of previously adsorbed SR vesicles, etc. As a final result, the overall emission spectrum of the ATPase Trp residues did not shift by more than 1-2 nm upon solubilization (data not shown), which is much less than the 20 nm shift from the overall spectrum of the Trp residues in membrane-embedded SERCA1a ($\lambda_{\text{max}} \approx 328$ nm) to the spectrum of pure Trp in buffer ($\lambda_{\text{max}} \approx 348$ nm).

Supporting Figure S2: Binding of Ca^{2+} to membrane-embedded or detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase in the presence of glycerol, as deduced from Trp fluorescence changes, here at pH 7 in the presence of 5 mM Mg^{2+} . Fluorescence was measured as described in the legend to Figure 1 of the main text, but in the presence of 5 mM Mg^{2+} , added after EGTA (the effect of Mg^{2+} itself on Trp fluorescence is described and discussed in the text, in relation to Figure 7 and the Supporting Figure S5). (A-D) SR vesicles were suspended at a final protein concentration of 0.02 mg/ml in a 2-ml quartz cuvette, in a buffer containing 100 mM KCl and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C, supplemented with 40% (w/w) glycerol as required (Panels B, C and D). 20 μM Ca^{2+} (4 μl of a 10 mM stock solution) was then added, on top of the contaminating Ca^{2+} (3-5 μM) already present in the buffer, followed, as required, by 2 mg/ml DDM (Panel C) or 2 mg/ml C_{12}E_8 (Panel D). The traces illustrated here start under these conditions. Subsequent addition of 0.75 mM EGTA (5 μl at 300 mM) then reduced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ to about 0.013 μM , and the fluorescence intensity at this stage was arbitrarily taken as 100%. 5 mM Mg^{2+} was added (5 μl of a 2M stock solution), which only raised $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ slightly (to 0.015 μM). Several amounts of total Ca^{2+} were then added, in the order and at the concentrations given below together with the resulting final concentrations of total and free $[\text{Ca}^{2+}]$: 0.3 mM (2 μl of a 300 mM stock solution), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}=0.325$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}=0.34$ μM ; 0.3 mM again (2 μl at 300 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}=0.625$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}=2.2$ μM ; 0.1 mM (2 μl at 100 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}=0.725$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}=9.2$ μM ; 0.1 mM again (2 μl at 100 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}=0.825$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}=79$ μM ; and lastly 0.3 mM again (2 μl at 300 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}=1.125$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}=376$ μM . For the experiments shown in panels C and D, another 0.75 mM Ca^{2+} was added (5 μl at 300 mM), resulting in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}=1.875$ mM and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}=1125$ μM . As in the experiments described in the legend to Supporting Figure 1, we assumed, when estimating $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ according to MaxChelator (a rough value is indicated on the figure itself), that the dissociation constant of the Ca^{2+} -chelator complex was the same, irrespective of the presence or absence of glycerol, although we did take the presence of Mg into account. Fluorescence intensities were corrected for the small changes due to sample dilution on the addition of ligands. Excitation and emission wavelengths were 295 nm and 320 nm, and bandwidths, 5 and 10 nm respectively. (E) Changes in fluorescence as a function of free Ca^{2+} were deduced from the traces in Panels A-D after correction for the intensity drift, and plotted as fractional values after normalization to 1 of the maximal change in fluorescence in each series. These various curves were fitted to Hill equations with Hill coefficients of 1.7 (no glycerol, no detergent, open circles), 1.6 (40% glycerol, no detergent, closed circles), 0.9 (40% glycerol, 2 mg/ml DDM, closed squares) and 1.7 (40% glycerol, 2 mg/ml C_{12}E_8 , closed triangles). Before normalization, the Ca^{2+} -dependent maximal changes in fluorescence were about 5%, 6%, 4% and 3.5% respectively for the traces in Panels A, B, C and D.

Note that similar experiments were repeated in the presence of 1 mM Mg^{2+} . In those experiments, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ was varied by adding different concentrations of an Mg-EDTA mixture to 100 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$ (35, 39), and similar results were obtained.

Additional references for previously observed changes in Ca^{2+} affinity after solubilization : see [suppl. ref. 21 and 22](#).

[suppl. ref. 21](#). Murphy, A.J., Pepitone, M., and Highsmith, S. (1982) Detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase. Hydrodynamic and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 257, 3551-3554.

[suppl. ref. 22](#). Lüdi, H., Rauch, B., and Hasselbach, W. (1982) The influence of detergents on the Ca^{2+} - and Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphatase activity of the sarcoplasmic reticulum. *Z. Naturforsch.* 37c, 299-307.

Supporting Figure S3. Turnover-dependent changes in Trp fluorescence at pH 8 with 10 mM Mg^{2+} under several conditions: in the absence or presence of glycerol, and in the presence of various concentrations of DDM or C_{12}E_8 . Here, Trp fluorescence was measured with 0.1 mg/ml SR vesicles in a buffer containing 100 mM KCl, 60 mM Tes-Tris and 10 mM MgCl_2 at pH 8 and 20°C, in the absence of glycerol (Panel A) or in its presence (46% w/w, *i.e.* about 40% v/v, for Panels B and C); 100 μM Ca^{2+} was then added (the corresponding fluorescence level was taken as the 100% level), followed by 2 $\mu\text{g/ml}$ of the A23187 ionophore calcimycin, which induced non-instantaneous fluorescence quenching. The illustrated trace starts here. Next, 10 μM Mg.ATP was added (upside down triangle), followed by C_{12}E_8 for the experiments illustrated in Panels A and B, and by DDM for those shown in Panel C. Detergents were added at the following final total concentrations: for C_{12}E_8 , 0.07, 0.5, 2 and, for the experiments shown in Panel A, 10 mg/ml; for DDM, 0.1, 0.5, and 2 mg/ml. ATP was added after the detergent (upside down triangles) to test for turnover-dependent signals. Fluorescence intensities were corrected for the small changes resulting from dilution on the addition of ligands.

Comment: It appears that using this high pH medium, the additional presence of 40% glycerol was not sufficient, even at moderate solubilizing concentrations of C_{12}E_8 , 0.5 and 2 mg/ml (Panel B), to reduce the SERCA1a inactivation known to occur during turnover of Sercal α in the solubilized state (48). The situation was slightly more favorable with DDM, as a transient turnover-dependent fluorescence drop with minimal inactivation was distinguishable, for instance, at 2 mg/ml DDM (Panel C), but turnover-dependent signals remained sluggish. This unfavorable situation probably results from two factors, reported in [ref. 21](#): (i) irreversible inactivation by C_{12}E_8 of the Ca^{2+} -free form of SERCA1a is faster under alkaline conditions than at neutral pH and also faster than inactivation by DDM under the same alkaline conditions, and (ii) irrespective of the particular detergent, inactivation by detergent of the E2P form of SERCA1a, transiently occupied during turnover, is faster than inactivation of its E2 state.

Additional Ca^{2+} release experiments (data not shown).

In complementary experiments, we also attempted to reveal turnover-dependent Ca^{2+} release from Ca^{2+} -equilibrated solubilized SERCA1a, and to compare it with the previously demonstrated turnover-dependent Ca^{2+} release from SERCA1a embedded in leaky membrane preparations (47, 48, and [suppl. refs. 23-25](#)). Using a diode-array spectrophotometer and the Ca^{2+} -sensitive dye Antipyrylazo III, we recorded the changes in absorbance occurring at various wavelengths upon addition of MgATP to Ca^{2+} -equilibrated SERCA1a (26). At pH 6, but not at pH 8 in the presence of Mg^{2+} , Antipyrylazo III proved satisfactorily sensitive to small changes in free Ca^{2+} (around 100 μM or even 300 μM , see below), not only in the absence but also in the presence of 20% glycerol. Starting from “classical” conditions, at pH 6 and in the absence of glycerol, we realized at the outset

that the anticipated turnover-dependent transient change in the dye absorbance was in fact superimposed onto transient changes in the *turbidity* of the sample (the latter changes were also detectable in the absence of the dye), and that these changes in turbidity vanished at high ionic strength. For this reason, most of the subsequent experiments in the absence of potassium were indeed performed in its absence, *but in the additional presence of 100 mM LiCl*, which eliminated the transient changes in turbidity. Under these conditions (at pH 6 and in the presence of glycerol), using ionophore A23187-permeabilized SR vesicles, and starting from 300 μM Ca^{2+} to compensate at least partially for the shifts in the ATPase affinity for Ca^{2+} revealed in [Figures 2E & 2F](#), we found that solubilizing concentrations of DDM reduced Ca^{2+} release but left it distinctly visible (data not shown). This is consistent with the moderate shift in the ATPase affinity for Ca^{2+} and the putative acceleration of the rate-limiting E2 to $\text{Ca}_2\text{E1}$ transition in the presence of DDM. On the other hand, solubilizing concentrations of C_{12}E_8 reduced this Ca^{2+} release to zero, which is consistent with the much larger shift in the ATPase affinity for Ca^{2+} in the presence of C_{12}E_8 than of DDM.

[suppl. ref. 23](#). Watanabe, T, Lewis, D., Nakamoto, R., Kurzmack, M., Fronticelli, C., and Inesi, G. (1981) Modulation of calcium binding in sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 20, 6617-6625.

[suppl. ref. 24](#). Wakabayashi, S., Ogurusu, T., and Shigekawa, M. (1986) Factors influencing calcium release from the ADP-sensitive phosphoenzyme intermediate of the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 261, 9762-9769.

[suppl. ref. 25](#). Champeil, P, and Guillain, F. (1986) Rapid filtration study of the phosphorylation-dependent dissociation of calcium from transport sites of purified sarcoplasmic reticulum ATPase and ATP modulation of the catalytic cycle. *Biochemistry* 25, 7623-7633.

Supporting Figure S4: $\text{E2}.\text{BeF}_3$ formation raises Trp fluorescence at pH 6 in the presence of $\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{DOPC}$ (2/1 w/w), but no rise is observed in the presence of DDM/DOPC (2/1 w/w). Ca^{2+} (0.3 mM) was added to SR vesicles suspended at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in a buffer containing 150 mM Mes-Tris, 20 mM Mg^{2+} , 15% DMSO and 20% glycerol (w/w) at pH 6 and 20°C (top trace) together with, as required, 2 mg/ml C_{12}E_8 + 1 mg/ml DOPC (middle trace) or 2 mg/ml DDM + 1 mg/ml DOPC (bottom trace). The preparation was then supplemented with 5 mM EGTA, 5 mM Mg^{2+} , 1 mM KF, and 50 μM BeCl_2 . Fluorescence intensities were corrected for the small changes resulting from dilution on the addition of ligands, and the fluorescence traces were shifted in relation to each other for clarity.

Comment: Under different ionic conditions known to allow $\text{E2}.\text{BeF}_3$ formation although not to favor E2P formation, namely at pH 7 in the presence of KCl and absence of DMSO, a small rise in fluorescence also occurred when beryllium and fluoride were added in the presence of C_{12}E_8 and DOPC, whereas a slight *drop* in fluorescence was observed in the presence of DDM and DOPC, and an even larger drop, in the absence of DOPC (data not shown). The use of aluminum fluoride instead of beryllium fluoride under the latter conditions only led to minimal sluggish drops in fluorescence (data not shown), similar to those seen in membranes (33, 53).

Supporting Figure S5: Effect of Mg^{2+} on the Trp fluorescence of Ca^{2+} -free membrane-embedded or detergent-solubilized ATPase at pH 7 in the absence or presence of glycerol. The initial step consisted of adding 2 mM EGTA (as 4 μl of a 1M stock solution) to SR vesicles suspended at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in a buffer containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris and 100 μM Ca^{2+} at pH 7 and 20°C (Panel A), in the presence of 40% (w/w) glycerol (Panels B-D) and of 2 mg/ml detergent as required (DDM for Panel C or C_{12}E_8 for Panel D). This was followed by two successive additions of Mg^{2+} (as 5 and then 15 μl of a 2M stock solution) so as to reach final Mg^{2+}

concentrations of 5 mM and then 20 mM. Before the addition of Mg^{2+} , the fluorescence intensity was taken as 100%. Values were corrected for the small changes in intensity resulting from sample dilution on the addition of ligands. Excitation and emission wavelengths were 295 nm and 320 nm, with bandwidths of 5 and 10 nm respectively (note that using 320 nm instead of a longer emission wavelength maximizes the Mg^{2+} -induced signal, see [11](#)).

Supporting Figure S6. Effects of ADP and AlF_x on Trp fluorescence in the presence of Ca^{2+} under four conditions: in the absence of glycerol and detergent (A), in the presence of glycerol alone (B) or in the presence of both glycerol and 2 mg/ml detergent, DDM (C) or C_{12}E_8 (D). Trp fluorescence was measured in 100 mM KCl and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C in the absence of glycerol (*Panel A*) or in the presence of 40% (w/w) glycerol (Panels B-D). SR was present at 20 µg/ml. 100 µM Ca^{2+} was added, followed, for the experiments shown in Panels C and D, by 2 mg/ml detergent, 2 mM EGTA (the illustrated traces start at this step), 5 mM Mg^{2+} and 3 mM Ca^{2+} (to reach pCa 3). ADP was then added, in two successive amounts of 50 µM each, followed by 1 mM KF and 50 µM AlCl_3 (*see ref. 36 and suppl. ref. 26*). Fluorescence intensities were corrected for the small changes resulting from sample dilution on the addition of ligands.

suppl. ref. 26. Troullier, A., Girardet, J.L., and Dupont, Y. (1992) Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 22821-22829

FITC labeling is probably not of much use for studying the effects of binding to solubilized ATPase of ligands like Ca^{2+} .

Extrinsic fluorescence of FITC-labeled SR membranes (again suspended at 0.02 mg/ml protein) was also measured. SERCA1a in SR vesicles was previously been labeled with FITC as described earlier (*suppl. ref. 27*), except that FITC was initially diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) instead of dimethylformamide ([53](#)). Excitation and emission wavelengths were set at 495 nm and 520 nm respectively (bandwidths were 2 and 10 nm respectively). Results are shown as Supporting Figures S7 and S8.

suppl. ref. 27. Champeil, P., Riollot, S., Orlowski, S., Guillaing, F., Seebregts, C.J., and McIntosh, D.B. (1988) ATP regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Metal-free ATP and 8-bromo-ATP bind with high affinity to the catalytic site of phosphorylated ATPase and accelerate dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 263, 12288-12294.

Supporting Figure S7: Glycerol protects Ca^{2+} -free FITC-ATPase from detergent-induced denaturation, but FITC fluorescence is no longer very sensitive to Ca^{2+} . FITC fluorescence in FITC-labeled SR was measured with 20 µg/ml FITC-SR protein suspended in a buffer containing 100 mM KCl and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C, supplemented with 40% (w/w) glycerol as required (Panels B, C and D). Excitation and emission wavelengths were 496 and 520 nm respectively, and bandwidths, 2 and 10 nm respectively. The initial step consisted of adding 100 µM Ca^{2+} on top of the contaminating Ca^{2+} (3-5 µM) already present in the buffer. This was followed, as required, by the addition of 2 mg/ml DDM (Panels C&E) or 2 mg/ml C_{12}E_8 (Panels D&F). The next additions were 2 mM EGTA and later, 3 mM Ca^{2+} , to test the FITC fluorescence response to Ca^{2+} . Values were corrected for the small changes in intensity resulting from dilution on the addition of ligands, but not for the changes resulting from medium acidification due to proton release by EGTA on the second addition of Ca^{2+} .

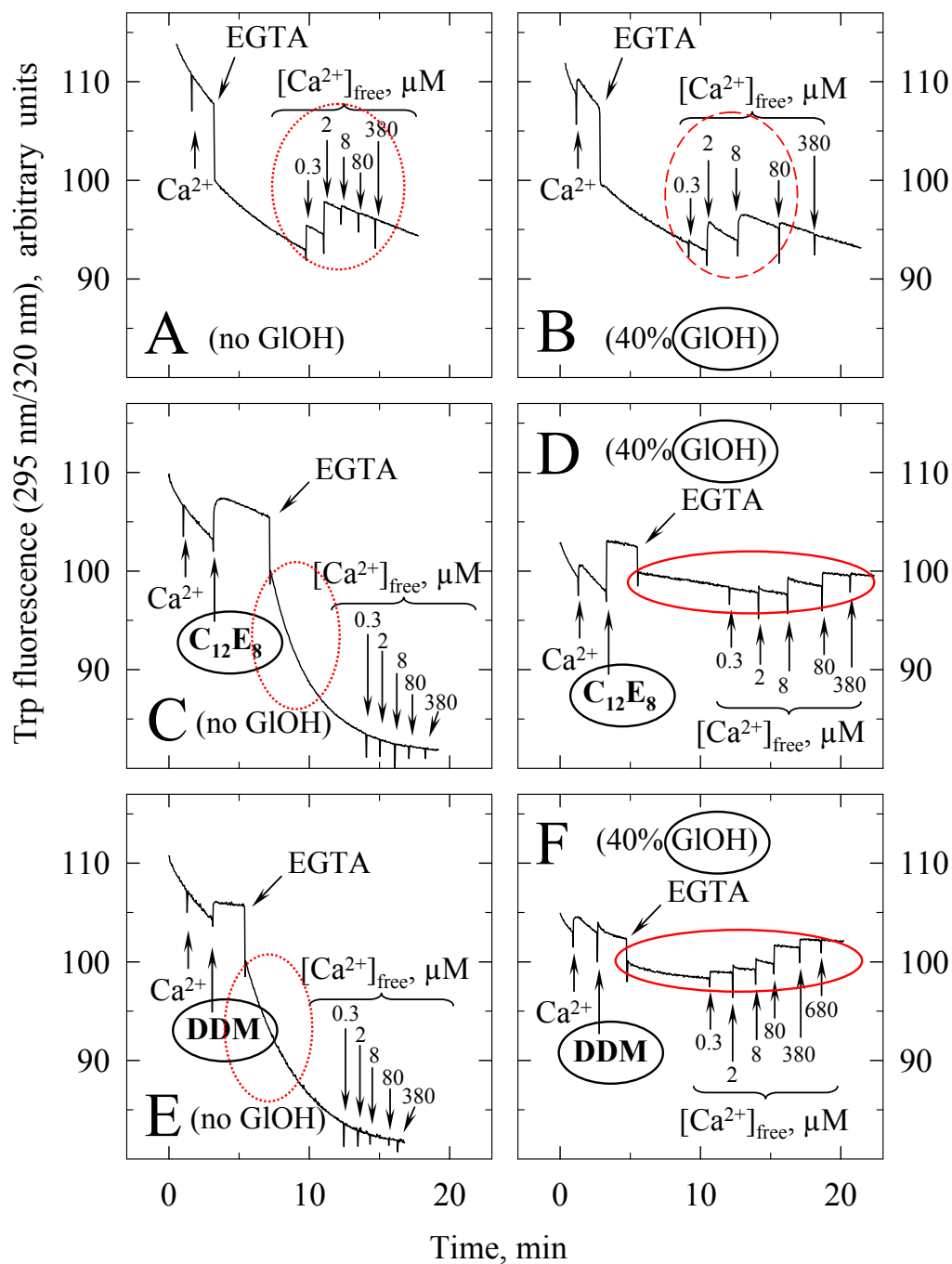
Comment: In solubilized and Ca^{2+} -deprived FITC-ATPase, FITC fluorescence did remain stable in the presence of 40% glycerol (Supporting Figure S7, Panels C,D versus Panels E, F). However, although inactivation of the ATPase was apparently blocked, chelation or subsequent addition of Ca^{2+} only induced small changes in FITC fluorescence, and this was already the case in the mere presence of glycerol and absence of detergent (Supporting Figure S7, B-D). The same was true in the presence of lipid (DOPC) together with C_{12}E_8 (not shown). In the absence of detergent, 40% glycerol alone in fact not only reduced but also reversed the *sign* of the now very small effect induced by Ca^{2+} chelation or its subsequent addition (Supporting Figure S7B), although there was no obvious glycerol-induced or detergent-induced spectral change in bound FITC fluorescence (not shown). When the Ca^{2+} -dependent changes in FITC fluorescence were studied with only 20% glycerol at pH 6 instead of pH 7, they were again reduced by detergent (2 mg/ml of DDM or C_{12}E_8 versus no detergent) to small residual signals of questionable usefulness (data not shown).

Supporting Figure S8. FITC-labeled ATPase response to orthovanadate in the absence of glycerol and detergent (A), in the presence of glycerol alone (B) and in the presence of both glycerol and 2 mg/ml detergent, DDM (C) or C_{12}E_8 (D). FITC fluorescence was measured with 20 $\mu\text{g/ml}$ FITC-labeled SR, suspended in 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C (Panel A) under each of the four following conditions: in the absence of glycerol [Panel A], in the presence of 40% glycerol alone [Panel B] or in the presence of 40% glycerol and 2 mg/ml detergent (DDM [panel C] or C_{12}E_8 [Panel D]). 200 μM Ca^{2+} was then added, followed by 2 mM EGTA, two supplements of 0.2 mM orthovanadate (VO_4) and 1 $\mu\text{g/ml}$ of thapsigargin (TG). Fluorescence intensities were corrected for the small changes resulting from dilution on the addition of ligands.

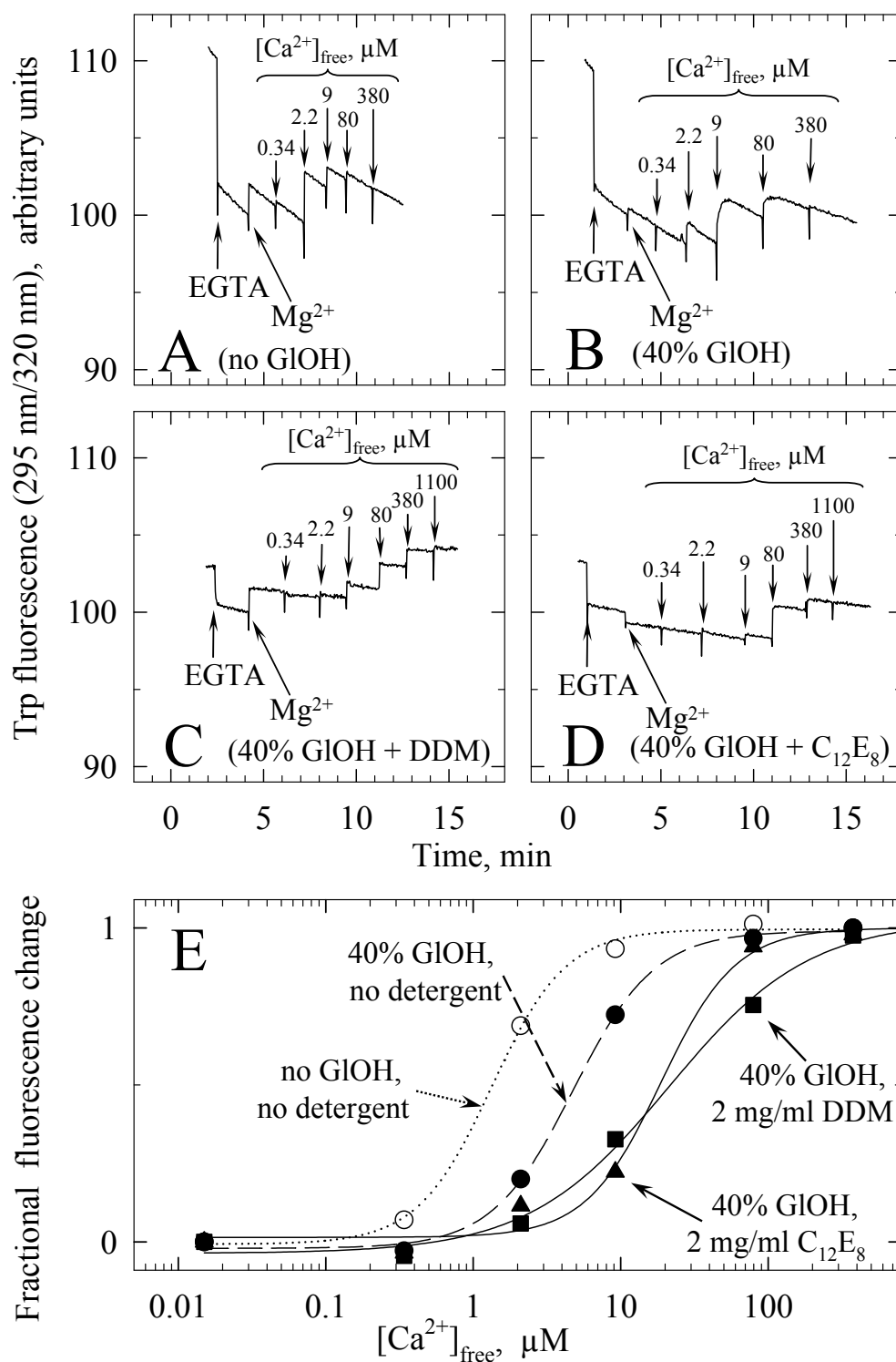
Comment: Observation of an orthovanadate-dependent rise in FITC fluorescence (55) was still possible in glycerol-containing media, but to a reduced extent. The situation was not much better in the presence of DDM, and in the presence of C_{12}E_8 , the significance of the recorded signals was unclear (Supporting Figure S8). Thus, FITC labeling does not seem very promising for studying SERCA1a solubilized in excess detergent and glycerol, probably because of the unexpected adverse effect of glycerol on FITC fluorescence changes.

Supporting Figure S9. Although Ca^{2+} binding to the yeast-expressed SERCA1a mutant E309Q triggers changes in Trp fluorescence in a direction opposite to that for SR or WT SERCA1a (or E309A), this mutant forms E2BeF_3 fairly normally. SERCA1a, either from native SR (panel A) or recombinant and purified in detergent (WT, mutated to E309Q, or mutated to E309A, see panels B, C and D respectively) was diluted 20-fold in a medium containing 150 mM Mes-Tris (pH 6 and 20°C), 20 mM Mg^{2+} , 15% DMSO, 20% glycerol (w/w), 2 mg/ml C_{12}E_8 + 1 mg/ml DOPC, and enough Ca^{2+} or DDM to result in final concentrations of 200 μM Ca^{2+} and 0.5 mg/ml DDM, including the Ca^{2+} and DDM derived from the medium in which the recombinant proteins were suspended. 2 mM EGTA was then added, followed by 1 mM KF and then 50 μM BeCl_2 . Fluorescence intensities were corrected for the small changes due to sample dilution on the addition of ligands.

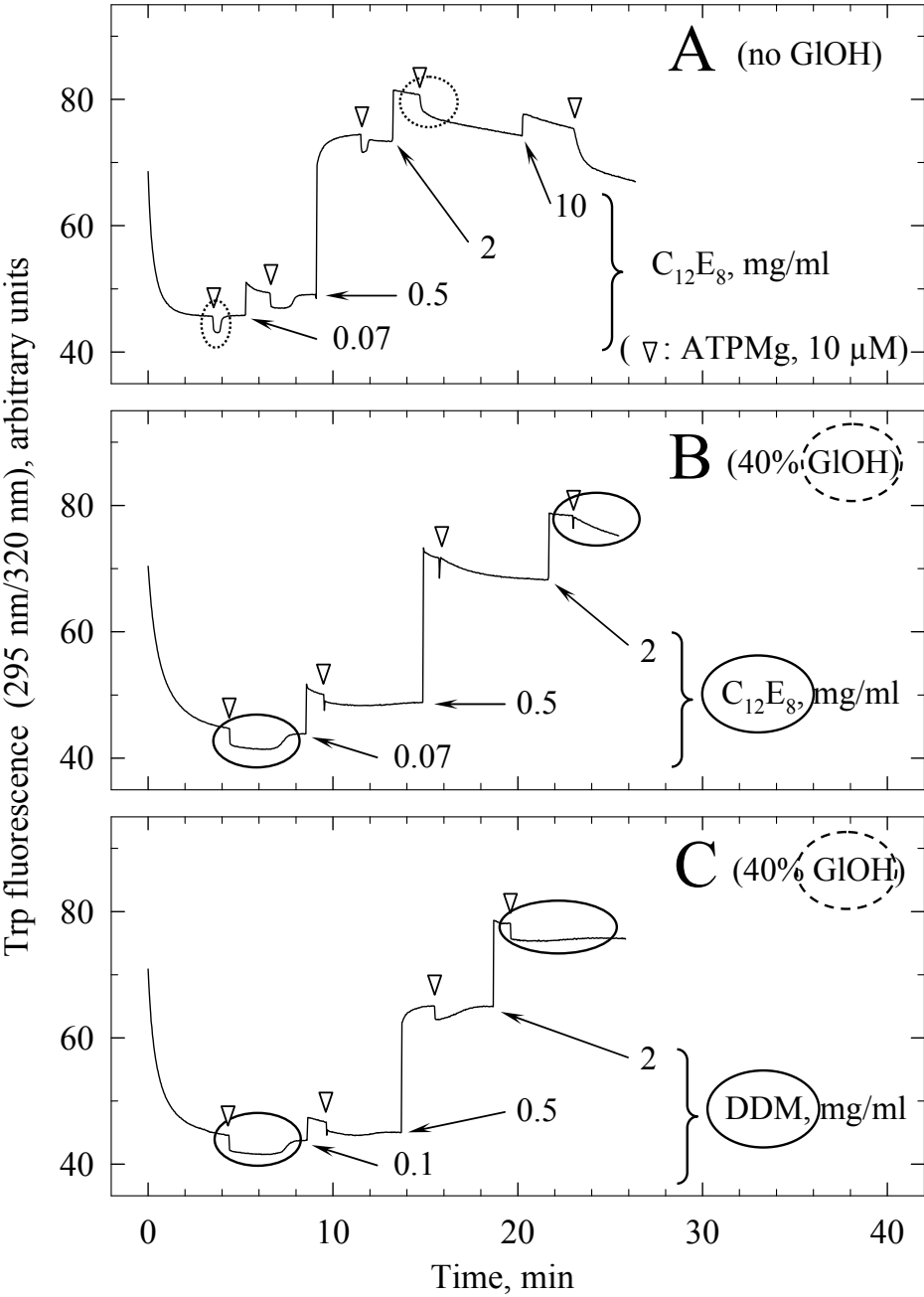
Supporting Fig S1. Glycerol protects Ca^{2+} -free SERCA1a from detergent-induced denaturation (here at pH 7, $[\text{Mg}^{2+}] = 0$), both with C_{12}E_8 and with DDM.



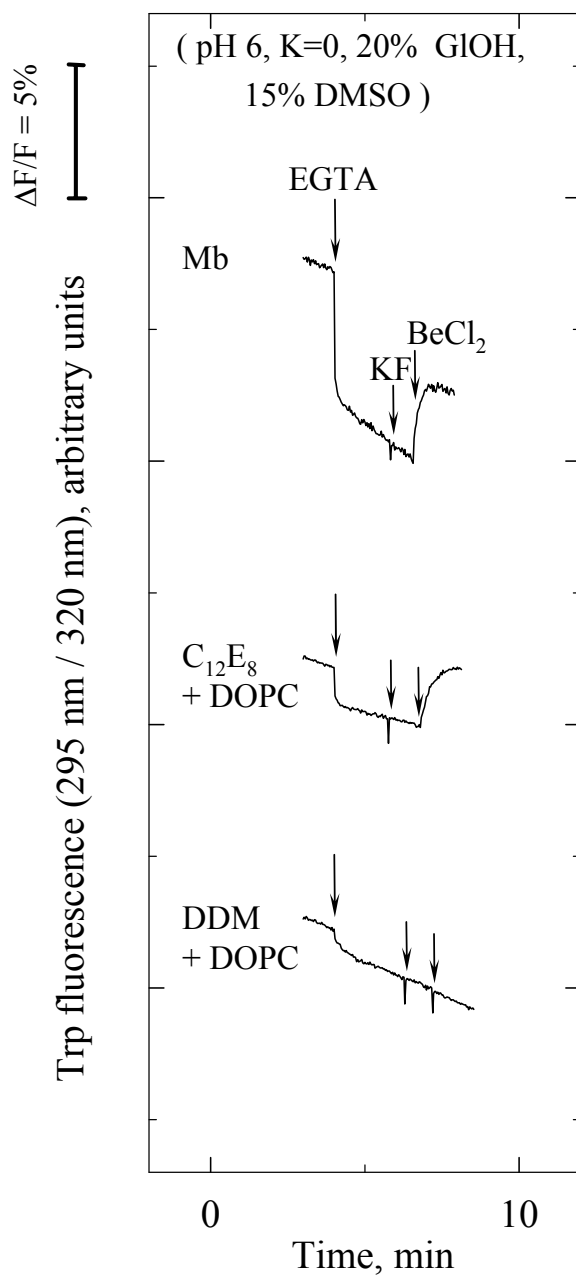
Supporting Fig S2. Binding of Ca^{2+} to membrane-bound or detergent-solubilized, glycerol-protected SERCA1a, as deduced from Trp fluorescence changes at pH 7 in the presence of 5 mM Mg^{2+} .



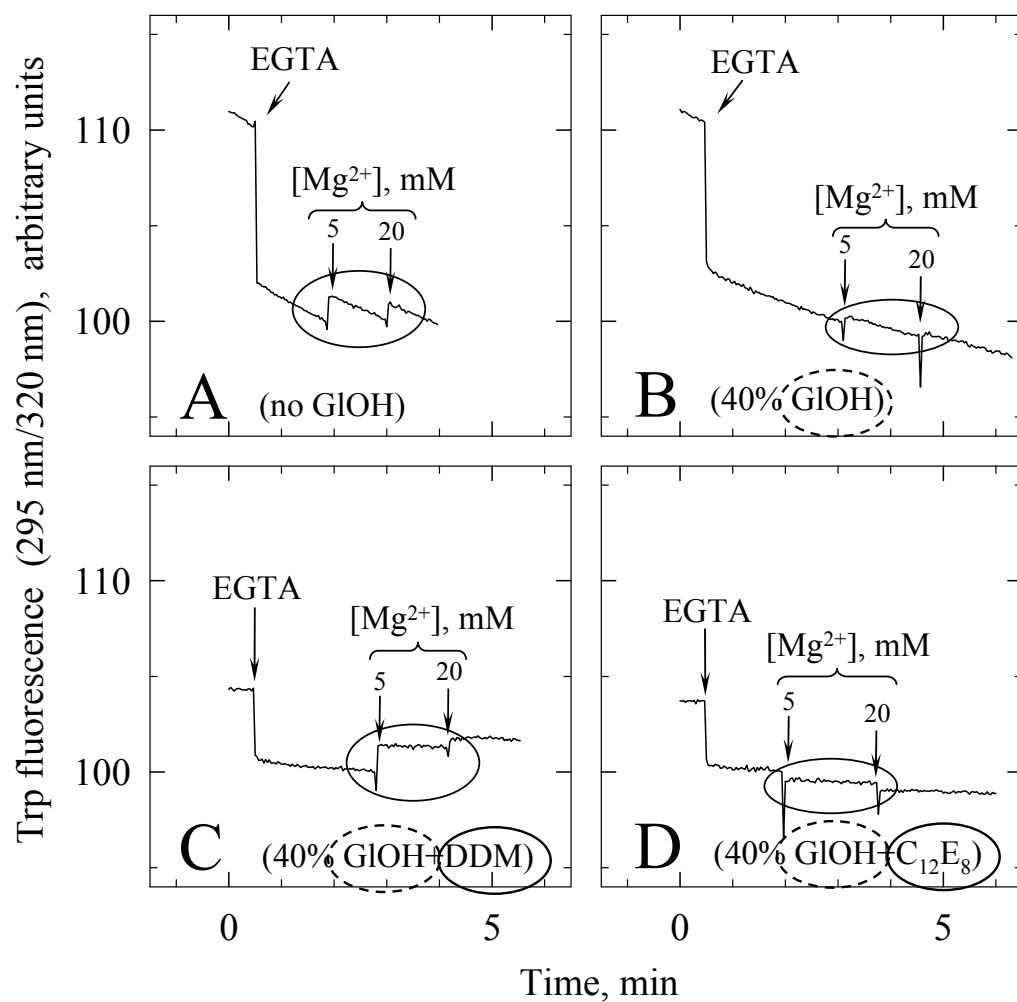
Supporting Fig S3. Turnover-dependent changes in Trp fluorescence at pH 8 and 10mM Mg²⁺ (100 mM K⁺, ± 40% glycerol).



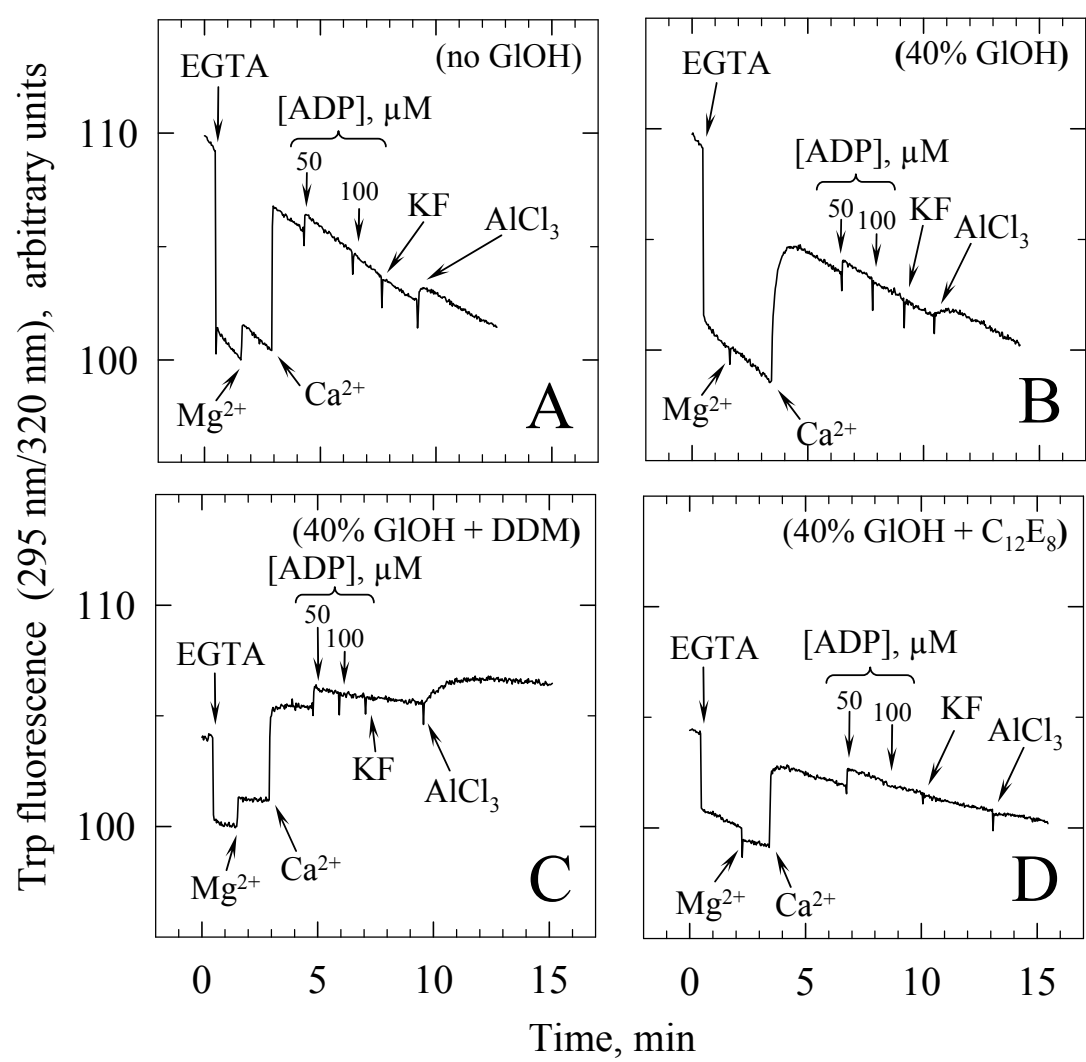
Supporting Fig S4. E2.B_eF₃ formation raises Trp fluorescence in the presence of C₁₂E₈/DOPC (2/1 w/w), but no rise is observed in the presence of DDM/DOPC (2/1 w/w).



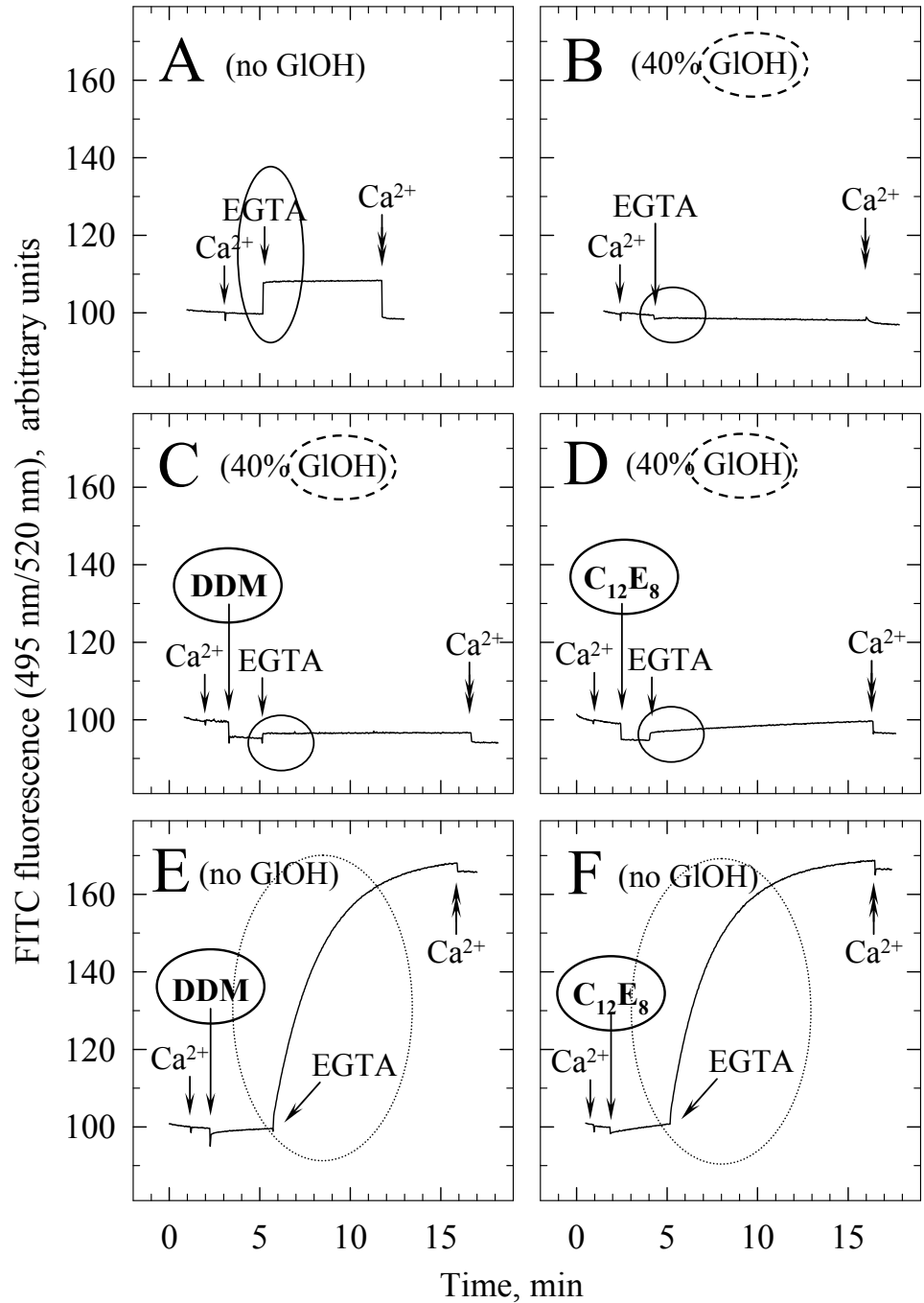
Supporting Fig S5. Effect of Mg^{2+} on the Trp fluorescence of Ca^{2+} -free membrane-embedded or detergent-solubilized ATPase at pH 7, in the absence or presence of glycerol .



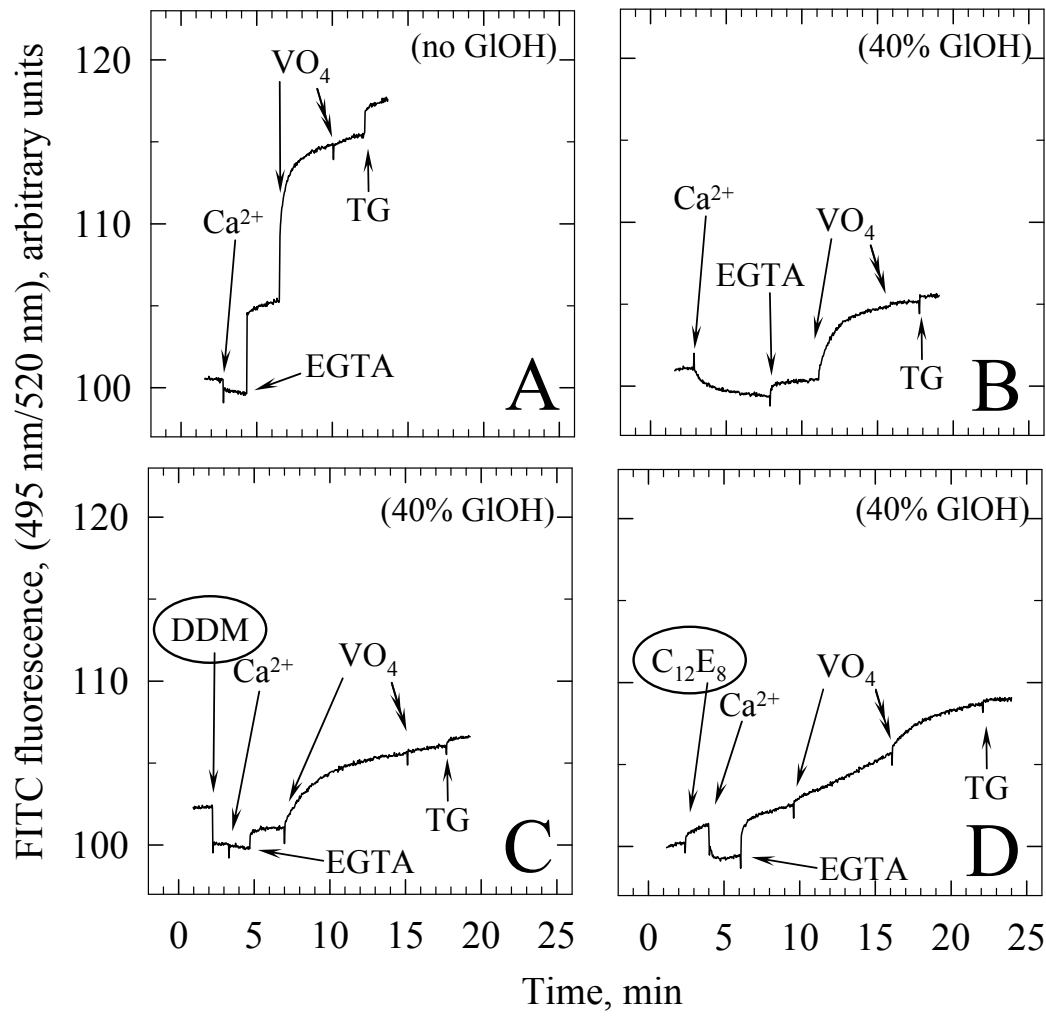
Supporting Fig S6. Effects of ADP and AlF_4 on the Trp fluorescence of Ca^{2+} -saturated membrane-embedded or detergent-solubilized SERCA1a in the presence of glycerol.



Supporting Fig S7. Glycerol protects Ca^{2+} -free FITC-ATPase from detergent-induced denaturation, but FITC fluorescence is no longer very sensitive to Ca^{2+} .

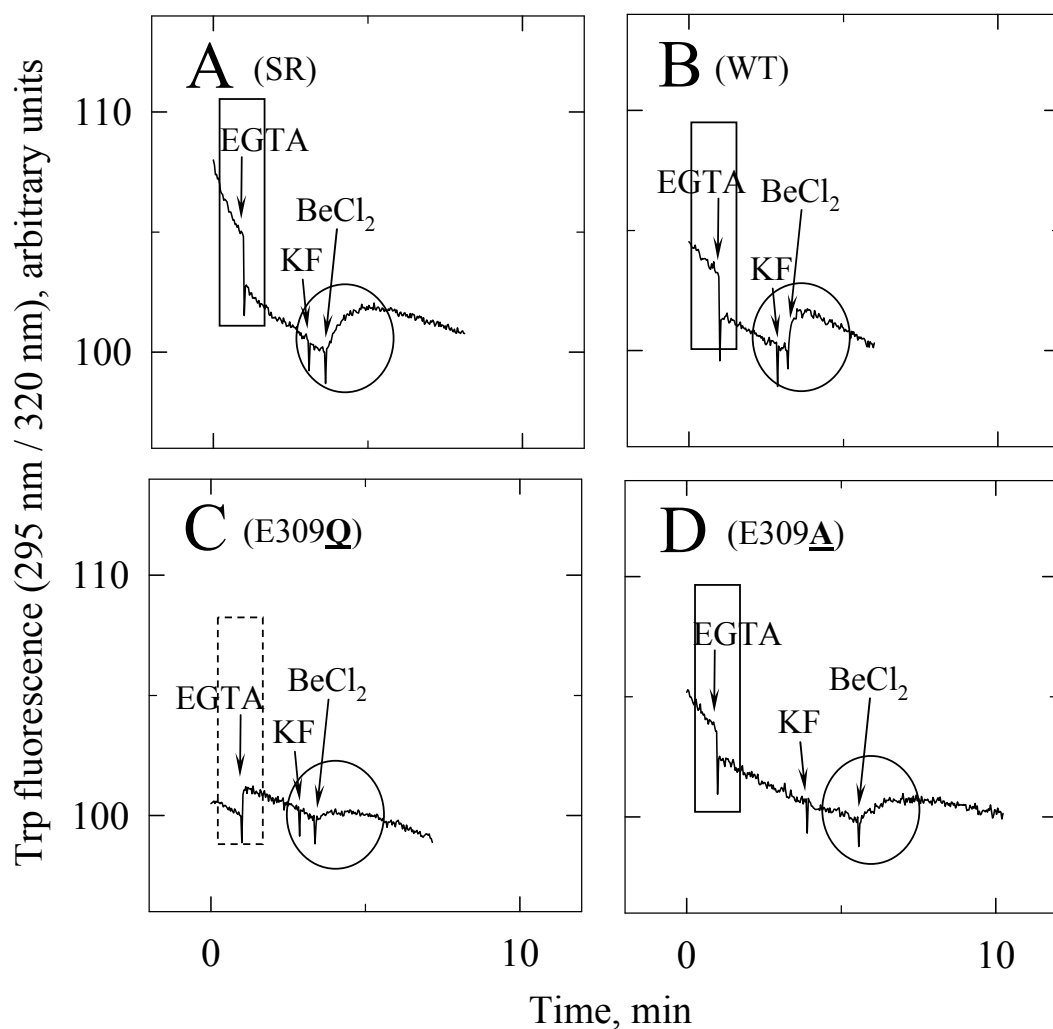


Supporting Fig S8. Poor FITC response to VO_4 , too,
in the presence of glycerol (and detergent)



Supporting Fig S9. Although Ca^{2+} binding to the yeast-expressed SERCA1a mutant E309Q triggers changes in Trp fluorescence in a direction opposite to that for SR or WT SERCA1a, both this mutant and the E309A mutant form E2BeF₃ fairly normally.

(pH 6, K=0, 20% G10H, 15% DMSO, 2 mg/ml C₁₂E₈ + 1 mg/ml DOPC)



**MANUSCRIPT #3 : CRYSTAL STRUCTURE OF D351A AND
P312A MUTANT FORMS OF THE MAMMALIAN
SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} -ATPASE REVEAL KEY
EVENTS IN PHOSPHORYLATION AND Ca^{2+} RELEASE.**

Marchand A, Winther A-ML, Holm PJ, Olesen C, Montigny C,
Arnou B, Champeil P, Clausen JD, Vilsen B, Andersen JP, Nissen P,
Jaxel C, Møller J.V and le Maire M

J. Biol. Chem. 2008, 283:14867.

Crystal Structure of D351A and P312A Mutant Forms of the Mammalian Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Reveals Key Events in Phosphorylation and Ca^{2+} Release^{*[5]}

Received for publication, December 13, 2007, and in revised form, March 19, 2008 Published, JBC Papers in Press, March 20, 2008, DOI 10.1074/jbc.M710165200

Alexandre Marchand[‡], Anne-Marie Lund Winther[§], Peter Joakim Holm[§], Claus Olesen[¶], Cedric Montigny[‡], Bertrand Arnou[‡], Philippe Champeil[‡], Johannes D. Clausen[¶], Bente Vilsen[¶], Jens Peter Andersen[¶], Poul Nissen^{§1}, Christine Jaxel^{‡2}, Jesper Vuust Møller^{¶3}, and Marc le Maire^{‡4}

From the [‡]Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et de Technologies de Saclay, SB²SM, URA CNRS 2096, Laboratoire de Recherche Associé, 17V University of Paris-Sud, Gif sur Yvette, F-91191, France, the [§]Centre for Membrane Pumps in Cells and Disease-PUMPKIN, Danish National Research Foundation, Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Gustav Wieds Vej 10C, Aarhus C DK-8000, Denmark, and the [¶]Centre for Membrane Pumps in Cells and Disease-PUMPKIN, Danish National Research Foundation, Institute of Physiology and Biophysics, University of Aarhus, Ole Worms Allé 1185 and 1160, Aarhus C DK-8000, Denmark

In recent years crystal structures of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a), stabilized in various conformations with nucleotide and phosphate analogs, have been obtained. However, structural analysis of mutant forms would also be valuable to address key mechanistic aspects. We have worked out a procedure for affinity purification of SERCA1a heterologously expressed in yeast cells, producing sufficient amounts for crystallization and biophysical studies. We present here the crystal structures of two mutant forms, D351A and P312A, to address the issue whether the profound functional changes seen for these mutants are caused by major structural changes. We find that the structure of P312A with ADP and AlF_4^- bound (3.5-Å resolution) and D351A with AMPPCP or ATP bound (3.4- and 3.7-Å resolution, respectively) deviate only slightly from the complexes formed with that of wild-type ATPase. ATP affinity of the D351A mutant was very high, whereas the affinity for cytosolic Ca^{2+} was similar to that of the wild type. We conclude from an analysis of data that the extraordinary affinity of the D351A mutant for ATP is caused by the electrostatic effects of charge removal and not by a conforma-

tional change. P312A exhibits a profound slowing of the Ca^{2+} -translocating $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition, which seems to be due to a stabilization of $\text{Ca}_2\text{E1P}$ rather than a destabilization of E2P. This can be accounted for by the strain that the Pro residue induces in the straight M4 helix of the wild type, which is removed upon the replacement of Pro³¹² with alanine in P312A.

The sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)⁵ plays a crucial role in muscle relaxation by re-accumulating Ca^{2+} into the sarcoplasmic reticulum lumen at the end of the contractile event (1, 2). The fast twitch muscle isoform (SERCA1a) can easily be prepared in large yield from rabbit skeletal muscle, which has facilitated many biochemical and biophysical studies, thus leading to a detailed description of its functional and structural properties (3–7). SERCA belongs to the family of P-type ATPases characterized by the formation during the catalytic cycle of an energy-rich covalent aspartyl-phosphorylated intermediate. The cycle of phosphorylation and dephosphorylation is coupled with $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange through conformational changes between the so-called “E1” and “E2” forms in phosphorylated and dephosphorylated states. Ca^{2+} binding from the cytoplasmic side in the E1 form is required for phosphorylation of the enzyme from ATP, whereas the dephosphorylation occurs subsequently to the luminal release of Ca^{2+} from E2P and leads to proton countertransport (Scheme 1). Key residues involved in the binding of Ca^{2+} and ATP (8–11) and in the phosphorylation reaction (12, 13) were initially identified by site-directed mutagenesis, and essential information about residues involved in conformational

^{*} This work was supported by grants from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) program Signalisation et transport membranaires and by the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-06-BLAN-0239-01 to M. I. M.), from a Hallas-Møller research grant from the Novo Nordisk Foundation (to P. N.), by a Ph.D. stipend from the Lundbeck Foundation (to A. M. L. W.), by a post-doctoral fellowship from the Carlsberg Foundation (to P. J. H.), from the Danish Medical Research Council Aarhus University Research Foundation, and The Vilhelm Pedersen Foundation (to J. V. M.), and from the Danish Medical Research Council, Aarhus University Research Foundation, and the Novo Nordisk Foundation (Fabrikant Vilhelm Pedersen og hustrus legat to J. V. M. and J. P. A.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. S1.

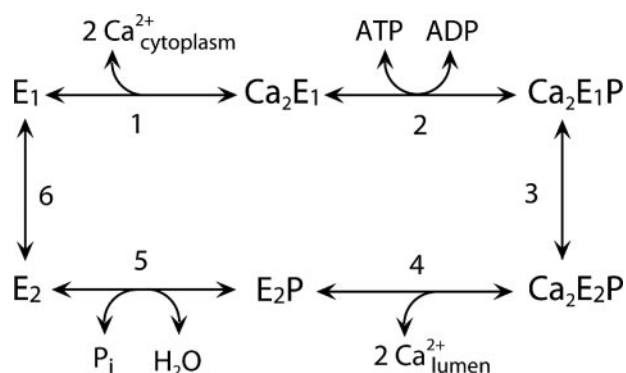
¹ To whom correspondence may be addressed: Tel.: 45-8942-5025; Fax: 45-8612-3178; pn@mb.au.dk.

² To whom correspondence may be addressed: Tel.: 33-1-69-08-33-79; Fax: 33-1-69-08-81-39; christine.jaxel@cea.fr.

³ To whom correspondence may be addressed: Tel.: 45-891-422-938; Fax: 45-861-295-99; jvm@biophys.au.dk.

⁴ To whom correspondence may be addressed: Tel.: 33-1-69-08-62-43; Fax: 33-1-69-08-81-39; marc.lemaire@cea.fr.

⁵ The abbreviations used are: SERCA, sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; SERCA1a, SERCA isoform 1a; SR, sarcoplasmic reticulum; SR SERCA1a, SR membranes from rabbit muscles containing SERCA1a; WT SERCA1a, yeast-expressed wild-type rabbit SERCA1a; SERCA1a_{mut}, SERCA1a cDNA with mutations corresponding to one different amino acid from the wild-type; AMPPCP, adenosine 5'-(β , γ -methylene)triphosphate; BAD, biotin acceptor domain; C₁₂E₈, octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether; DDM, *n*-dodecyl β -D-maltoside; DOPC, dioleoyl phosphatidylcholine; P, phosphate; PEG, polyethylene glycol; HPLC, high-liquid pressure chromatography; MOPS, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid.



Scheme 1. Ca^{2+} -ATPase reaction cycle. Simplified scheme illustrating the partial reaction of the Ca^{2+} -ATPase reaction cycle.

changes and energy transduction has also been gained from the detailed studies of SERCA mutants (see *e.g.* Refs. 8 and 13–17). A very significant step forward in the understanding of the structure-function relationships of SERCA was taken by the crystallization and three-dimensional structure clarification at atomic resolution of catalytic intermediates, stabilized in several cases by structural analogues of ATP and phosphoryl groups (see *e.g.* Refs. 18–25). The cytosolic part of the protein consists of a transduction (“actuator”) domain A, a phosphorylation domain P containing the phosphorylated aspartic acid residue Asp-351, and a nucleotide-binding domain N. The membrane-embedded region to which these cytosolic domains are linked is organized in 10 transmembrane spans, M1–M10, which accommodate the Ca^{2+} binding sites, nested in internal loops or kinks of M4 and M6 (23, 26). The formation of a compact Ca^{2+} -occluding $\text{Ca}_2\text{E1P}$ state ensures coupling between phosphoryl transfer and vectorial Ca^{2+} transport (21, 25). The phosphorylation/ Ca^{2+} occlusion step is followed by a major conformational rearrangement involving both the cytosolic and the transmembrane regions, resulting in the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition (*cf.* Scheme 1), in which the A domain rotates (24, 25) and the membrane domains separate, allowing release of Ca^{2+} toward the lumen (27).

Many structural details correlate well with the results of functional studies of mutants with changes to specific residues, thus providing a sound basis for the use of site-directed mutagenesis to obtain further insight into how the long range communications between the cytoplasmic and membranous parts of the protein are brought about. The analysis of the functional consequences of mutations has reached a level where it encompasses rapid kinetic quench-flow studies of the partial reaction steps (28) and most recently also biophysical measurements of conformational transitions by fluorescence changes, made feasible by large scale expression in yeast (15, 29). A number of mutations appear to accelerate or block partial reactions in the functional cycle and displace E1–E2 and/or E1P–E2P equilibria. However, in the absence of direct structural information the fundamental question arises whether the effect of a given mutation is caused by the displacement of the equilibrium between already existing conformations in the wild-type enzyme, or whether it is the result of induction of local or global structural changes not seen in the wild type. To deal with this

question there is a need for an analysis of the structures of the mutant proteins.

So far, the success in three-dimensional crystallization of Ca^{2+} -ATPase, as well as other eukaryotic membrane proteins like cytochrome oxidase (30), bovine rhodopsin (31), and aquaporins (32), has to a large extent been dependent on their purification in relatively large amounts from natural sources, enabling optimization of the conditions for obtaining well diffracting protein crystals (33). This fortunate situation does not exist for Ca^{2+} -ATPase mutants or for the majority of membrane proteins from mammalian sources, which, however, can be prepared by recombinant expression systems. The first reports on successful crystal structure determination of eukaryotic membrane proteins, purified from an overexpression host (yeast), came in 2005 (SERCA1a (34), the shaker K^+ channel protein (35)). With a new procedure for affinity purification of SERCA1a heterologously expressed in yeast cells (36), we were able to produce sufficient amounts, in the milligrams range, of SERCA1a for crystallization and biophysical studies (34). Extending this technique to Ca^{2+} -ATPase mutants would open the possibility of linking, in a more definitive way than before, the structural data obtained by x-ray diffraction with those arising from the functional analysis of Ca^{2+} -ATPase mutants, to address key functional aspects of the Ca^{2+} transport mechanism.

To explore these possibilities, we have focused on two mutants, D351A and P312A, which have been selected for crystallization due to their important functional characteristics as previously determined in the mammalian COS cell expression system (12, 16, 37). Both of these mutations prevent the ATPase from hydrolyzing ATP and transporting Ca^{2+} . In mutant D351A the negatively charged side chain of the conserved aspartate, constituting the phosphorylation site in the P-domain, has been removed, resulting in an inability of the mutant enzyme to undergo phosphorylation (12). It was demonstrated that ATP and MgATP bind with much higher apparent affinity to D351A as compared with the wild-type enzyme (37), leading to the hypothesis that in the wild type a significant electrostatic repulsion exists between the γ -phosphate of ATP and the negative charge of Asp³⁵¹, which was considered to be overcome by highly favorable interactions of ATP with other residues. This hypothesis would also explain the observation of an enhanced nucleotide protection against proteolysis in the D351A mutant (38). However, an alternative possibility could be that the high affinity state is the result of a particular structure of the mutant, induced by the mutation *per se*, and as such irrelevant to the function of the wild-type enzyme. The other mutant, P312A, is characterized by an extremely slow transition from the ADP-sensitive $\text{Ca}_2\text{E1P}$ phosphoenzyme intermediate to the ADP-insensitive E2P state, the step that releases the Ca^{2+} ions toward the lumen (16). Pro³¹² is located at the border of the unwound part of transmembrane segment M4, next to the ³⁰⁸PEGL motif containing the Ca^{2+} binding residue Glu³⁰⁹, and the question here is also whether the block of $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ reflects an abnormal structure of the mutant or different kinetic properties of the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition.

In this communication we have addressed these questions by determining the crystal structure of the above mutants with

bound nucleotide. The large scale expression in the yeast system of the D351A mutant has also been utilized to investigate by fluorescence measurements whether the change induced by the mutations has any consequences for the long range communication between the Ca^{2+} binding sites and the phosphorylation site. As will be shown this approach, in conjunction with data obtained by previously established methodology, has allowed us to obtain an improved understanding of the mechanistic roles of Asp³⁵¹ and Pro³¹² in ATPase function.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals—All chemical products were purchased from Sigma-Aldrich unless specified otherwise. Restriction and modification enzymes were from New England Biolabs (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). High activity bovine thrombin was from Calbiochem (VWR International, Fontenay sous Bois, France), the streptavidin-SepharoseTM High Performance was purchased from GE Healthcare Biosciences AB (Orsay, France). All products for yeast and bacteria cultures were purchased from Difco (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) was from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) was from Anatrace (Maumee, OH) and octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether (C_{12}E_8) was purchased from Nikkol Chemical (Tokyo, Japan).

Plasmid Constructions—SERCA1a mutants (SERCA1a_{mut}) in pMT2 vector (D351A) or p91023 (P312A) were the ones previously used for expression in COS cells (16, 37). The yeast expression plasmid pYeDP60-SERCA1a-BAD was as previously described (36). Each plasmid was digested by EcoRI (cut on the plasmid upstream the cDNA of SERCA1a) and BssHII (internal site at +2038 in SERCA1a). Fragments were purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The 2.1-kb EcoRI-BssHII fragment of SERCA1a_{mut} cDNA containing the mutation was subcloned in the opened EcoRI-BssHII pYeDP60-SERCA1a-BAD, replacing the corresponding WT SERCA1a cDNA. To keep the same environment between the EcoRI site and the ATG, which is important for expression in yeast, another step of subcloning was performed: pYeDP60-SERCA1a-BAD and new pYeDP60 plasmids containing SERCA1a_{mut}-BAD cDNA were digested by KpnI (internal site at +640 in SERCA1a and at +3304 in pYeDP60). After purification, the 2.76-kb KpnI fragment containing the mutation was ligated to KpnI-cleaved pYeDP60 (using an NEB Quick ligation kit, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) to obtain the pYeDP60-SERCA1a_{mut}-BAD containing the D351A or P312A mutation. The constructions were checked by sequencing. These plasmids were transformed and amplified in *Escherichia coli* JM109. Plasmids DNA were purified using a QIAprep 8 Turbo Miniprep kit (Qiagen).

Yeast Transformation—The *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain W303.1b/Gal4 (*a*, *leu2*, *his3*, *trp1::TRP1-GAL10-GAL4*, *ura3*, *ade2-1*, *can^r*, *cir⁺*) was the same as previously described (39). Transformation was performed according to the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/PEG method (40).

Yeast Culture, Mutant Expression, and Preparation of Membrane Fractions—Growth conditions and criteria for expression of the mutants were the same as previously published for

native SERCA1a expressed in yeast (36). Yeast cells were broken with glass beads. For membrane preparation by differential centrifugation (36, 39), the P3 pellet, corresponding to the light membrane fraction (where the level of SERCA1a activity is highest), was finally suspended in Hepes-sucrose buffer (20 mM Hepes-Tris (pH 7.5), 0.3 M sucrose, 0.1 mM CaCl_2) at a final volume corresponding to 0.5 ml/g of the initial yeast pellet). From 1 liter of culture, 40 g of yeast was obtained and from the P3 pellet, 250 mg of membrane proteins was obtained with a SERCA1a (wild type or mutants) content of ~1% as estimated by Western blot analysis using an anti-SERCA1a antibody (39). SR-SERCA1a from rabbit muscle, used as a standard for protein estimation, was prepared as previously described (41).

Purification of the Mutants by Streptavidin-Agarose Chromatography—The light membrane fraction ("P3" fraction), suspended in the Hepes-sucrose buffer, was first solubilized by DDM (6 mg/ml) at a protein concentration of 2 mg/ml in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7), 0.1 M NaCl, 20% glycerol, 1 mM CaCl_2 , 1 mM β -mercaptoethanol, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. After stirring for 2.5 h at room temperature, non-solubilized material was pelleted by centrifugation at $120,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. All subsequent steps (unless otherwise specified) were then performed in a cold room. The supernatant after the centrifugation step was mixed with streptavidin-SepharoseTM High Performance resin at a ratio of 40:1 (v/v), using typically 1 ml of resin per 0.4 mg of SERCA1a (corresponding to 40 ml of solubilized proteins with an average solubilization yield of 50%), and stirred gently overnight at 4 °C. The suspension was then loaded onto a number of 11×100 mm columns (BioSeptra) and washed, first with a "high salt" buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7), 1 M NaCl, 20% glycerol, 1 mM CaCl_2 , 0.05% DDM, buffer:resin, 12:1 (v/v)), and then with a "low salt" KCl buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7), 50 mM KCl, 20% glycerol, 2.5 mM CaCl_2 , 0.05% DDM, buffer:resin, 12:1 (v/v)). All the resin in the columns was resuspended in the "low salt" KCl buffer (buffer:resin, 1:1 (v/v)) and introduced into a larger column (40×200 mm, BioSeptra, MA) and thrombin was added (20 units of thrombin/ml of resin). The column was sealed and placed on a wheel, and the mixture was stirred gently at room temperature for 30 min, followed by a second addition of thrombin and stirring of the mixture for another 30 min. To inactivate thrombin, 2.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride was then added, and the proteolytically cleaved SERCA1a proteins eluted from the column by three successive additions of the KCl buffer (buffer:resin, 1:1 (v/v)). The eluted fractions containing the Ca^{2+} -ATPase (~2 mg of protein with a Ca^{2+} -ATPase content of ~40%, as evidenced by gel electrophoresis) were pooled, and the glycerol concentration increased to 40% before freezing the samples in nitrogen and storage at -80 °C.

HPLC Gel Filtration—For crystallization experiments, DDM was exchanged with C_{12}E_8 by size-exclusion chromatography, an additional step that also led to improvement of the purity of the Ca^{2+} -ATPase preparation. For this, the pool of SERCA1a mutant proteins (typically 30 ml) was first concentrated on Centricon Ultracel-YM 30 (Amicon, Millipore, Bedford, MA) until the volume was smaller than 500 μl . The concentrate was applied at 0.5 ml/min to a silica gel-filtration column (0.78 cm $\times$ 30 cm TosoHaas TSK-gel G3000SW_{XL} column, Sigma-

Aldrich), mounted on a Gold HPLC System (Beckman Coulter, Roissy CDG, France), and equilibrated with 100 mM MOPS (pH 6.8), 80 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 15% sucrose, and 0.5 mg/ml C_{12}E_8 . The eluted fractions containing the Ca^{2+} -ATPase peak were pooled (~ 1.5 ml) and concentrated on Centricon-30 to a final volume of ~ 50 μl , resulting in a final protein concentration of 8–10 mg/ml and a concentration of C_{12}E_8 estimated to be ~ 10 –12 mg/ml on the basis of previous C_{12}E_8 binding data (42).

Protein Crystallization—For crystallization, the concentrated, delipidated, and C_{12}E_8 -solubilized Ca^{2+} -ATPase was supplemented with phospholipids (DOPC), to reach a C_{12}E_8 :DOPC ratio of 3:1 (w/w). This was done by adding the sample to a centrifuge tube that had been deposited with a thin layer of N_2 -dried DOPC, vortexing the tube, and storing it overnight at 4 °C. The next day the sample often exhibited a slight haziness, arising from non-solubilized lipids, in which case it was clarified by addition of a slight amount of C_{12}E_8 stock solution, until having a clear solution. In addition the sample was subjected to centrifugation at $120,000 \times g$ for 20 min to remove aggregated (inactive) protein, arising during the preparation. Agents were then added to induce the formation of ATPase crystals in the presence of 10 mM Ca^{2+} together with either 1 mM ATP, AMP-PCP, or ADP together with 1 mM AlF_4^- (as a structural analogue of phosphate). An initial 96 conditions of PEG/salt screening (33) were performed using a liquid-handling Mosquito robot (TTP Labtech, Cambridge UK), which distributed 100- + 100-nl drops of protein and crystallization buffer for equilibration with 100 μl of well solution. After a few hours (up to 2 days) at 19 °C, crystals started to appear. The best crystals were obtained at 10% sucrose, 12% PEG 2000 monomethyl ether, 0.2 M NaOAc, and 3% *tert*-butanol or 6% 2-methyl-2,4-pentanediol for P312A; and 7% PEG 6000, 0.2 M $\text{Na}_2\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4$, and 6% 2-methyl-2,4-pentanediol for D351A. These conditions were subjected to further grid screen optimization with 1- + 1- μl hanging drops equilibrating against 450 μl of well solution at 19 °C. After 1 week suitable crystals were cryoprotected (2 μl of 40% PEG 4000 or 5 μl of 50% sucrose added to the drop) and picked up in nylon-fiber loops (Hampton Research, Riverside, CA) mounted on 18-mm metal pins. Crystals were flash-cooled and stored in liquid nitrogen. Data were collected at the Swiss Light Source (for P312A mutant) or at the Berliner Elektronen Speicher Synchrotron (for the D351A mutant) beamlines. The crystals diffracted anisotropically, to 3.4 Å for the D351A crystals and to 3.5 Å for the P312A crystals. Crystallographic data were processed and scaled by using the XDS package (43). An unbiased difference Fourier map using experimental $F_{\text{obs}}(\text{SERCA1a P312A mutant}) - F_{\text{obs}}(\text{SERCA1a D351A mutant})$ difference coefficients was calculated to reveal the structural differences between SERCA1a D351A and P312A mutants.

Ca^{2+} -ATPase Reconstitution into Proteoliposomes—After the streptavidin chromatography step and concentration of the affinity-purified SERCA1a on Centricon 30 to a Ca^{2+} -ATPase concentration of 0.1 mg/ml in a medium containing 0.5 mg of DDM/ml, 20% glycerol, 2.5 mM Ca^{2+} , 50 mM Tris (pH 7.0), and 50 mM KCl, the protein was mixed gently with DOPC (protein:DOPC, 1:3 (w/w)) for 30 min at 4 °C. Biobeads SM-2 absorbent

(Bio-Rad) were prepared as described in a previous study (44). Detergent was removed by adding Biobeads at a Biobeads:DDM ratio of (200:1, w/w) and incubating with gentle stirring at 4 °C for 3 h. Biobeads were then removed, and the reconstituted protein was stored at 4 °C.

ATP Affinity Measurement—ATP equilibrium binding to mutant D351A reconstituted into proteoliposomes was measured by Millipore filtration. 10 μg of D351A was incubated with various amounts of [γ - ^{32}P]ATP (0.5 nM to 5 μM) in 2 ml of buffer (50 mM MOPS, pH 7.2, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2) in the presence of either 100 μM CaCl_2 or 2 mM EGTA, for 1 min at 20 °C. Then the sample was filtered on two superposed Millipore GS 0.22- μm filters under mild vacuum. The radioactivity of the filters was measured by liquid scintillation counting. The ^{32}P radioactivity of the lower filter (corresponding to the wet volume) was subtracted from the ^{32}P radioactivity of the upper filter to obtain the amount of ATP bound to the reconstituted protein.

Fluorescence Measurements—Fluorescence measurements were performed with a Spex fluorolog instrument at 20 °C. Intrinsic fluorescence of SERCA1a or mutants was measured with excitation and emission wavelengths set at 290 and 330 nm, with bandwidths of 2 and 20 nm, respectively (Fig. 3), or 295 and 320 nm, with bandwidths of 5 and 10 nm, respectively (Figs. 4 and 5). Changes in tryptophan fluorescence were monitored at 20 °C after 20-fold dilution of concentrated WT SERCA1a or mutants (to final concentrations of 0.1 mM Ca^{2+} and 7.5 μg of protein/ml for WT SERCA1a or D351A, and 5 μg of protein/ml for P312A) into a medium containing 40 mM MOPS-Tris, pH 7.0, 80 mM KCl, 40% glycerol, 1 mg/ml DDM, and supplemented with Ca^{2+} , EGTA, or Mg-EDTA (according to previous studies (45, 46)) as indicated in the legends of Figs. 3–5. SR vesicles from rabbit muscle (at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) served as a control. In ATP binding measurements, 5 mM MgCl_2 and EGTA were also added to the buffer, and various additions were performed, as indicated in the legends of Figs. 4 and 5.

Phosphorylation Studies on P312A Expressed in COS Cells—The P312A mutant was also expressed in COS-1 cells (12), and measurements of phosphorylation from [γ - ^{32}P]ATP or $^{32}\text{P}_i$ (in the absence of a Ca^{2+} gradient), and of dephosphorylation, were carried out essentially as previously described (14, 16). The Ca^{2+} gradient-dependent phosphorylation from $^{32}\text{P}_i$ (47, 48) was studied following passive Ca^{2+} loading of the microsomal vesicles by incubation overnight with CaCl_2 added in concentrations ranging from 10 μM to 40 mM. The Ca^{2+} -loaded vesicles were diluted into a phosphorylation medium containing $^{32}\text{P}_i$ and EGTA to remove Ca^{2+} from the medium outside of the vesicles. Further experimental details are given in the figure legends.

For quantification of enzyme phosphorylation, the acid-precipitated protein was washed by centrifugation and subjected to SDS-PAGE in a 7% polyacrylamide gel at pH 6.0, and the radioactivity associated with the separated Ca^{2+} -ATPase band was determined by imaging using a Packard CycloneTM Storage Phosphor System. The experiments were generally conducted at least twice, and the data were analyzed by nonlinear regression using the SigmaPlot program (SPSS, Inc.).

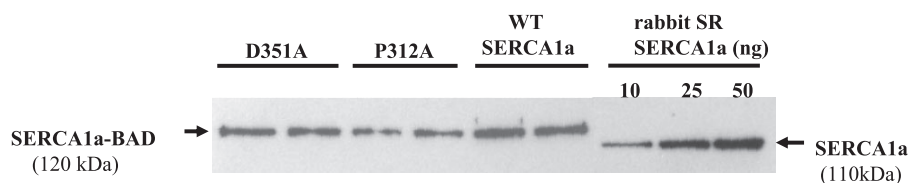


FIGURE 1. Level of expression of wild-type (WT), D351A, and P312A rabbit SERCA1a in yeast light membranes, as detected by Western blotting. Light membranes (2 μ g) of yeast expressing WT SERCA1a, or D351A and P312A mutants, were loaded in duplicate onto 10% SDS-polyacrylamide gel for electrophoresis and then transferred onto polyvinylidene difluoride-membrane. Western blots were then hybridized with an anti-SERCA1a polyclonal antibody as previously described (36). SR membranes (10, 25, and 50 ng of protein, respectively) were also loaded to allow, by comparison, quantification of the SERCA1a-BAD expressed in each light membrane fraction. The positions of SERCA1a with the BAD domain (SERCA1a-BAD) and SERCA1a control from rabbit SR are indicated by arrows.

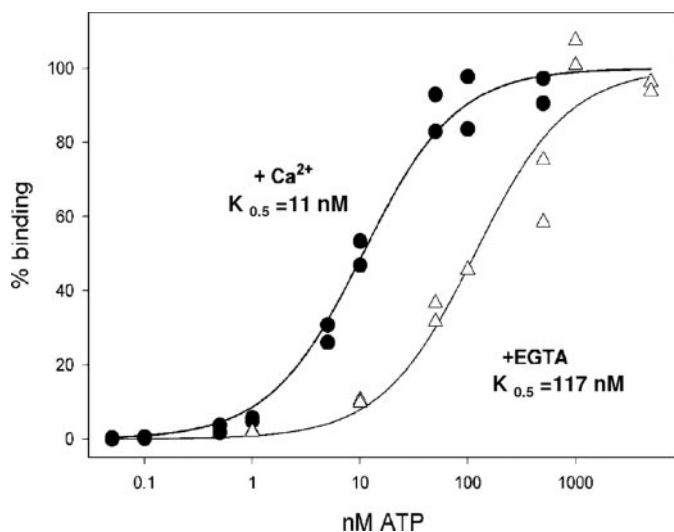


FIGURE 2. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ binding to D351A mutant, as determined by Millipore filtration. Binding of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (0.5 nM to 5 μ M) was measured by loading on GS Millipore filters 10 μ g of purified and reconstituted D351A in 50 mM MOPS, pH 7.2, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , in presence of either 100 μ M Ca^{2+} (circles) or 2 mM EGTA (triangles) and variable concentrations of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ as indicated. The duplicate data points at each concentration of ATP were from separate experiments performed on different days. The data points were fitted to the Hill equation with the Hill coefficient set to 1 and yielded a $K_{0.5}$ value of 11 nM in the presence of Ca^{2+} and a $K_{0.5}$ value of 117 nM in the presence of EGTA.

RESULTS

Protein Expression and Purification—The strategy used to obtain the D351A and P312A proteins suitable for crystallization and biophysical measurements was to express in yeast these mutated forms of rabbit SERCA1a, fused to a biotinylation acceptor domain (BAD) by a linker containing a thrombin cleavage site (36). This construct allowed purification of the mutant by avidin chromatography after *in vivo* biotinylation in yeast, using thrombin to release the mutant protein from the affinity column.

Mutant D351A was expressed in yeast at about the same level as WT SERCA1a-BAD, whereas P312A was expressed at a somewhat lower, but nevertheless comparable level (Fig. 1). From 4 liters of yeast culture, we were able to purify the two mutants in the milligrams range at a concentration of 8–10 mg/ml as required by the crystallization protocol.

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ Binding Measurements on D351A—As described in the introduction, previous studies of D351A using the mammalian expression system had demonstrated an extraordinarily

high affinity of this mutant for ATP (37). Using the yeast-expressed, purified, and reconstituted mutant D351A, it was feasible to measure directly $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ equilibrium binding over a wide range of ATP concentrations from ~ 0.1 nM to 1 μ M by filtration (Fig. 2). An extremely tight $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ binding to D351A was indeed obtained in the presence of Ca^{2+} , resulting in a $K_{0.5}$ value of 11 nM (at pH 7.2). In the absence of Ca^{2+} (*i.e.* after addition

of EGTA), the binding was weaker (with a $K_{0.5}$ of 117 nM), in accordance with the previous observation using an indirect method for the same mutant (37). But still this value represents a much higher affinity than observed for WT SERCA1a ($K_d = 3\text{--}5$ μ M at pH 7.0–7.2 (see *e.g.* Refs. 18 and 49)).

Fluorescence Measurements on Mutants—By tryptophan fluorescence measurements, it was also possible to estimate the affinity of the yeast-expressed SERCA1a mutants for Ca^{2+} and ATP. When excited in the UV regions the protein with its 13 tryptophan residues responds with a fluorescence signal, which is affected by changes in the conformation of the native protein induced by addition of ligands such as Ca^{2+} or EGTA, and Mg^{2+} or MgATP . Previous measurements of fluorescence with wild-type yeast-expressed SERCA1a were performed after reconstitution of the purified (detergent-solubilized) SERCA1a into proteoliposomes (29, 36). This method has been used in preference to detergent-solubilized SERCA1a, which, as is well known (*e.g.* Refs. 50 and 51), inactivates very rapidly in the presence of calcium chelators. Moreover, the detergent concentration is known to affect (and reduce) the amplitude of the fluorescence signals (*e.g.* Refs. 52 and 53). Yet, reconstitution generally leads to a certain loss of material, and possibly to partial inactivation of the SERCA1a (in our hands ATPase activity was somewhat decreased after reconstitution of the purified proteins, data not shown).

As an alternative to reconstitution, we found here that it was possible to perform the fluorescence experiments directly on detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase by the use of the same high concentration of glycerol (40% v/v) in which we stored our preparations in the deep-freezer after affinity chromatography. Under these conditions, SERCA1a was not only very efficiently protected from inactivation, but simultaneously the ligand-dependent fluorescence signals remained stable and of a decent size, both when DDM (Fig. 3) and C_{12}E_8 (data not shown) were used. These conditions with 40% glycerol, where SERCA1a remained stable, were therefore used to investigate the response of wild-type or mutant SERCA1a to ligand binding.

Ca^{2+} Binding Affinity Measurements—Fig. 3 shows the fluorescence changes observed when Ca^{2+} chelators were added at concentrations designed (as in Ref. 46) to result in a change of the free Ca^{2+} concentration from 100 μ M to 1 μ M and 0.04 μ M, before a final shot of Ca^{2+} re-established the free Ca^{2+} concentration at its initial value of 100 μ M. The similar relative amplitudes in all four cases excludes that a major proportion of the

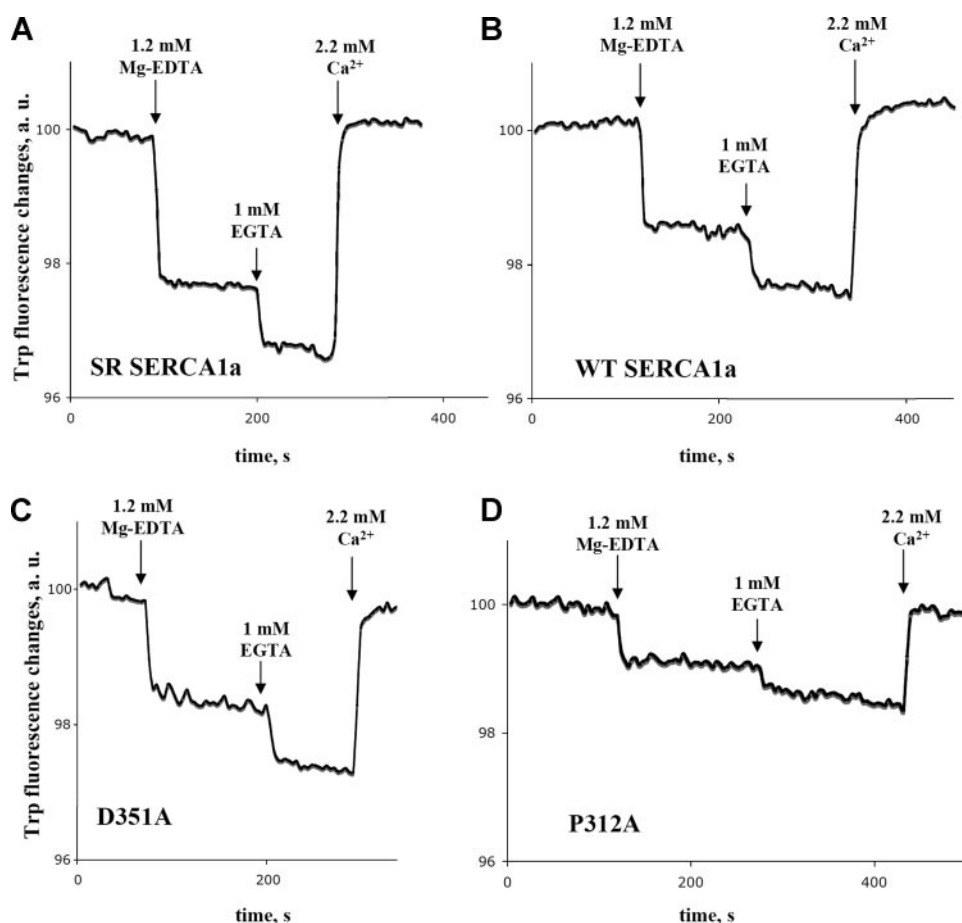


FIGURE 3. Comparison of the Ca^{2+} affinities of SR SERCA1a (A) or yeast-expressed WT-SERCA1a (B) and D351A (C) or P312A (D) mutants, as deduced from fluorescence measurements. The initial buffer for these Trp fluorescence measurements (excitation and emission wavelengths of 290 nm and 330 nm, respectively) consisted of 40 mM MOPS, pH 7, 80 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 40% glycerol, and 1 mg/ml DDM at 20 °C. The 20-fold dilution of SR and yeast-expressed proteins resulted in protein concentrations of 8 $\mu\text{g/ml}$ for SR SERCA1a, 7.5 $\mu\text{g/ml}$ for WT SERCA1a and D351A, and 5 $\mu\text{g/ml}$ for P312A. 100 μM Ca^{2+} was present after dilution for the yeast-expressed proteins, whereas it was added for SR SERCA1a. Subsequent additions of Mg-EDTA, EGTA, and Ca^{2+} , as indicated, then resulted in free Ca^{2+} concentration of 1 μM , 0.04 μM , and 100 μM (46). For this figure, the initial fluorescence intensity has been normalized to 100 in all cases, but actual levels were consistent with the estimated final concentration of protein. The small changes of intensity due to sample dilution upon addition of ligands have been corrected for. This is one of three different independent experiments, which all gave the same results.

yeast-expressed SERCAs could have adopted a non-native structure (except perhaps for P312A).

The fluorescence changes occurring upon decreasing the free concentration of Ca^{2+} from 100 μM to 1 μM free Ca^{2+} , relative to the maximal changes occurring upon reduction to still lower free concentrations of Ca^{2+} , were similar for all four SERCA1a proteins, indicating that the D351A mutation did not result in any significant difference in Ca^{2+} affinity, as compared with the wild-type yeast-expressed SERCA1a (and this was probably the case also, although less clear-cut, for the P312A mutation). The apparent K_d for Ca^{2+} deduced from these data and from similar experiments performed at other free Ca^{2+} concentrations (data not shown) is $\sim 1.5\text{--}2$ μM . This value is only slightly higher (due to DDM) than in the absence of detergent under otherwise identical conditions, which is in accordance with previous studies of SR Ca^{2+} -ATPase (e.g. Ref. 54). Note, however, that detergent seems to accelerate very much movements of Ca^{2+} between the bulk medium and SERCA1a

Ca^{2+} fixation site II (55), which might blur any effect of the mutations in native membranes.

Effects of Mg^{2+} and ATP Binding—Fluorescence changes are also observed upon binding of Mg^{2+} and MgATP to Ca^{2+} -free SR SERCA1a (56, 57). This effect is shown in Figs. 4 (A and B) for native SR SERCA1a and for yeast-expressed and purified WT SERCA1a, respectively. Here, a first addition of EGTA resulted in Ca^{2+} chelation and formation of a Ca^{2+} -free conformation with low fluorescence. The following addition of 5 mM Mg^{2+} caused an increase of the fluorescence signal. Finally, various concentrations of MgATP were added (0.3, 3, 30, and 300 μM), revealing the anticipated increase of fluorescence caused by ATP binding to the protein. At the highest concentrations of ATP, e.g. 300 μM , a drop in intensity was observed instead of a rise, because of the inner-filter effect caused by the UV absorbance by the nucleotide. The magnitude of the inner filter effect, which might mask a real increase in fluorescence due to ATP binding to the protein, is best evaluated by repeating the ATP additions in increments of 300 μM , beyond the levels required to saturate the ATP binding site on the protein, to allow true fluorescence changes to be deduced from these measurements at the lower concentrations of ATP (see Ref. 58).

For SR and WT SERCA1a, the addition of 0.3 μM MgATP in the absence of Ca^{2+} only gave rise to a slight increase in SERCA1a fluorescence, whereas 50% of the maximal fluorescence increase was observed at ~ 3 μM MgATP for both enzymes (see *traces A and B* in Fig. 4), a value in the expected range (e.g. Ref. 57). A similar value was found for the P312A mutant, although the fluorescence changes were lower and noisier, and it seems that P312A and WT SERCA1a have similar ATP affinities (data not shown). For mutant D351A (see Fig. 4C), the addition of Mg^{2+} raised Trp fluorescence in a manner similar to that found with wild-type enzyme. On the other hand, with this mutant 0.3 μM MgATP added in the absence of Ca^{2+} was sufficient to increase the fluorescence signal by $>50\%$ of the maximal change observed upon saturation with ATP (see Fig. 4C). At these low ATP concentrations, inner filter effects are not significant. Thus, the estimated $\text{ATP}_{0.5}$ value was ~ 0.2 μM for D351A. This confirmed the high ATP affinity of the D351A mutant illustrated in Fig. 2.

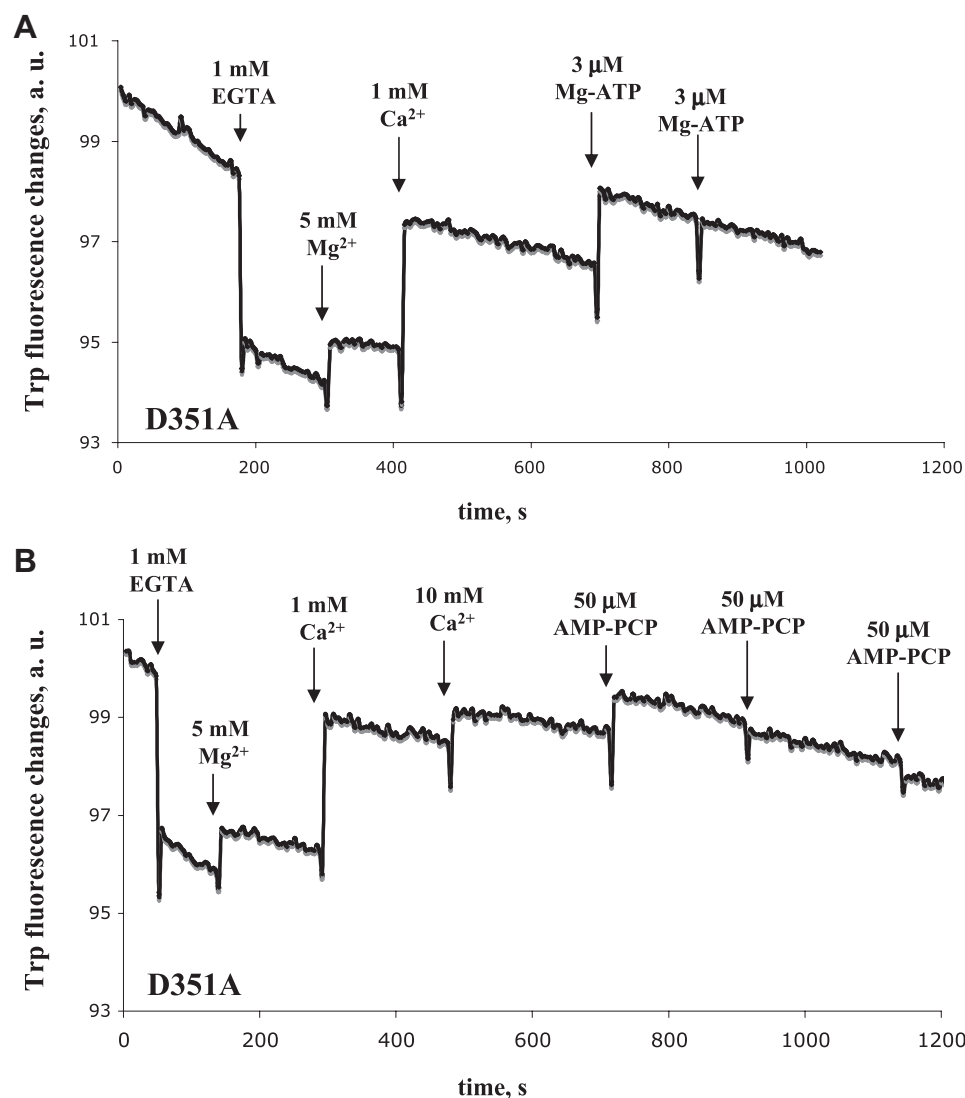


FIGURE 5. Comparison between ATP binding to D351A mutant at pCa4 (A) and AMPPCP binding to D351A at pCa2 (B). Fluorescence measurements were performed in 40 mM MOPS, pH 7, 80 mM KCl, 40% glycerol, 1 mg/ml DDM at 20 °C. A 20-fold dilution of yeast-expressed and purified D351A mutant resulted in 7.5 $\mu\text{g/ml}$ D351A and 100 μM Ca^{2+} in the buffer. As an internal control for the fluorescence changes, 1 mM EGTA was then added to decrease the fluorescence level to its minimal value, followed by addition of 5 mM Mg^{2+} , and 1 mM Ca^{2+} was finally added to recover the initial free Ca^{2+} concentrations of 100 μM . Then, MgATP was added (3 μM , twice) (A). Alternatively, to compare with the conditions for crystallization, 10 mM Ca^{2+} was first added and then 50 μM AMPPCP (three times) (B). The small changes in intensity due to dilution have been corrected for.

Crystals of D351A were obtained in the presence of 10 mM Ca^{2+} and 1 mM AMPPCP as for native SR SERCA1a (21) or expressed WT SERCA1a (34). In addition a successful crystallization of D351A was obtained with ATP replacing the non-hydrolyzable analogue, which was feasible with this mutant, because of the inability to hydrolyze ATP. For P312A, which is characterized as a mutant for which the ADP-sensitive phosphoenzyme ($\text{Ca}_2\text{E1P}$) piles up at steady state (16), the crystallization condition contained AlF_4^- and ADP together with 10 mM Ca^{2+} (21). The crystals displayed the same morphology as those of the native SERCA1a under comparable conditions. A full data set was collected at 3.4 Å for D351A in complex with AMP-PCP and at 3.7 Å for D351A in complex with ATP, and the crystals of P312A with ADP plus AlF_4^- gave a data set at 3.5 Å (summarized in Table 1). There is a high level of isomorphism

between WT SERCA1a and the two mutants, P312A and D351A, as can be seen from Figs. 6B and 7A, respectively. However, for a close comparison with that of the wild-type enzyme (34) we were confronted with the obstacle that the mutants crystallized in a different space group, $\text{P}2_1$ instead of $\text{C}2_1$. The $\text{P}2_1$ crystal form is nearly identical to the $\text{C}2$ form, but a slight change of the crystal packing has led to deterioration of the C-centering, yielding now two copies in the asymmetric unit. This prevented us from computing difference Fourier maps between the mutants and the wild-type enzyme. On the other hand, we were able to compute a difference map between the mutants, $F_{\text{obs}}(\text{P312A:ADP:AlF}_4^-) - F_{\text{obs}}(\text{D351A:AMPPCP})$, which confirmed both the absence of the aspartate side chain in the D351A mutant (Fig. 7B), the absence of the proline side chain in the P312A mutant (Fig. 6C), and slight differences in the binding of the nucleotides. However, apart from this no other significant differences between the two mutants were observed. Finally, the difference map of D351A with bound ATP and AMPPCP, $F_{\text{obs}}(\text{D351A:ATP}) - F_{\text{obs}}(\text{D351A:AMPPCP})$ showed that, while both nucleotides are bound in the same overall bent conformation, the position of the β -phosphate appears to be slightly different (Fig. 7C). Taken together the structural information obtained from the crystals of D351A and P312A allow the conclusion that the mutations *per se* only result

in subtle conformational changes, at least in the respective $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{ATP/AMPPCP}$ and $\text{Ca}_2\text{E1P}$ forms.

Phosphorylation Studies on P312A—The normal structure of P312A in the $\text{Ca}_2\text{E1P}$ form raises the question whether the block of the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition previously described (16) is due to an inability to form an E2P intermediate in the ground state. As illustrated in Fig. 8, we therefore re-examined the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition and the functional properties of E2P in the P312A mutant in more detail than previously, using the COS-1 cell-expressed enzyme. At 0 °C the rate constant of phosphoenzyme turnover following phosphorylation with [γ - ^{32}P]ATP was reduced 60- to 70-fold in P312A, relative to that of the wild type, and the phosphoenzyme remained ADP-sensitive (*i.e.* $\text{Ca}_2\text{E1P}$) throughout the experiment (Fig. 8A). At 25 °C the turnover of the phosphoenzyme formed from ATP

TABLE 1

Crystallographic data obtained for D351A and P312A crystals

The non-anomalous data collection statistics are reported for the mutants forms except for the D351A·ATP form where the anomalous data statistics are shown.

Data	D351A·AMPPCP	D351A·ATP	P312A·ADP·AlF ₄ ⁻
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Cell dimension (Å, °)	a = 152.9 b = 75.8 c = 162.6 β = 108.9	a = 152.7 b = 76.0 c = 163.1 β = 108.8	a = 150.6 b = 75.6 c = 161.8 β = 108.6
Beam line	SLS-XO6SA	SLS-XO6SA	SLS-XO6SA
Wavelength (Å)	1.1272	1.0723	1.0706
Resolution (Å) ^a	30–3.4 (3.5–3.4)	50–3.7 (3.8–3.7)	30–3.5 (3.6–3.5)
Completeness (%)	98.2 (83.0)	96.3 (87.2)	99.7 (99.8)
Unique reflections	48,648	37,013	44,047
Redundancy	3.7 (3.4)	3.0 (2.1)	4.2 (4.2)
R _{merge} (%) ^b	10.5 (66.7)	20.3 (57.4)	25.4 (88.3)
I/σI	11.89 (2.55)	6.7 (2.4)	7.0 (2.5)
Wilson B-factor ^c	87.5	66.3	82.1
Model Resolution (Å)	30–3.4 (3.46–3.4)	No model refined	30–3.5 (3.66–3.5)
R/R _{free} (%) ^d	26.5/29 (46.9/42.9)	No model refined	20.8/25.8 (31.5/33.8)
Ramachandran (%)	77.9/19.9/2.0/0.3	No model refined	78.5/19.3/1.9/0.3
r.m.s.d. bonds (Å)	0.009	No model refined	0.008
r.m.s.d. angles (°)	1.54	No model refined	0.98
Average B-value (Å ²) ^e	102	No model refined	97.38

^a Values in parentheses refer to the highest resolution shell, except when otherwise stated.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_h |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i \sum_h I_i(h)$, where $I_i(h)$ is the i th measurement.

^c Determined by TRUNCATE of the CCP4 program package.

^d R_{free} is the R -factor calculated for a randomly picked subset with ~1000 reflections excluded from the refinement.

^e Fractions of residues in the most favorable/allowed/generous/disallowed regions of the Ramachandran plot according to PROCHECK.

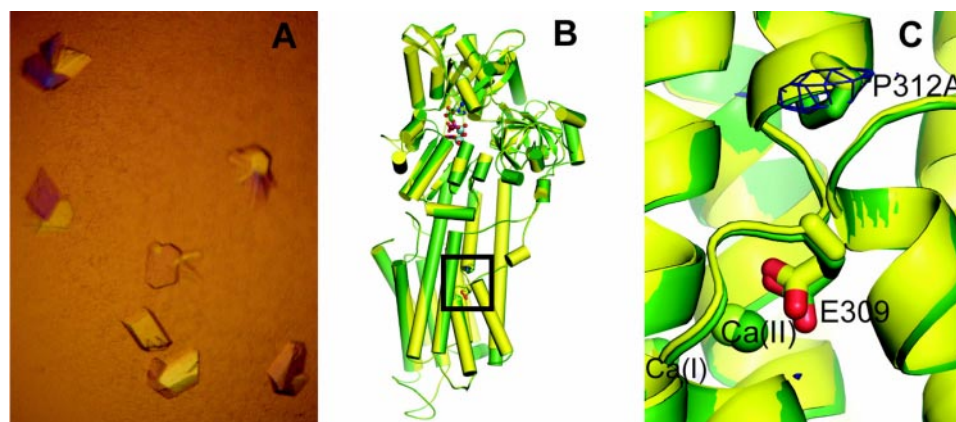


FIGURE 6. Crystals and crystal structures of yeast-expressed P312A mutants of SERCA1a in the presence of Ca²⁺, ADP, and AlF₄⁻. A, crystals obtained for P312A mutant in the presence of ADP and the phosphate analogue AlF₄⁻. B, overall view of the crystal structure of P312A·ADP·AlF₄⁻ mutant shown in yellow, aligned with the WT structure of Ca₂E1·ADP·AlF₄⁻ (pdb code: 1T5T), shown in green. C, enlarged view of the calcium binding site in the transmembrane region where the structure of WT Ca₂E1·ADP·AlF₄⁻ is aligned with the structure of the P312A mutant. In the WT structure, the residues Pro³¹², Glu³⁰⁹, and the bound Ca²⁺ ions are displayed; in the P312A mutant structure, Ala³¹², Asp³⁰⁹, and the Ca²⁺ ions are displayed. $F_{\text{obs}}(\text{P312A} \cdot \text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-) - F_{\text{obs}}(\text{D351A} \cdot \text{AMPPCP})$ difference Fourier map reveals a clear negative peak (displayed at -3.24σ , blue mesh), which confirms the absence of the proline side chain in P312A mutant.

was likewise markedly (~10-fold) reduced in P312A relative to wild type, although it is also noteworthy that the temperature dependence is steeper in the mutant than in the wild type. On the other hand, the dephosphorylation rate was wild type-like following backward phosphorylation of E2 with P_i, *i.e.* the rate of $E2P \rightarrow E2 + P_i$ is normal, in the P312A mutant (Fig. 8D), *cf.* Scheme 1. This, together with the close to normal (~2-fold reduced) apparent affinity for P_i in the backward phosphorylation with P_i (Fig. 8C), excludes any significant destabilization of the Ca²⁺-free E2P form of the mutant. Hence, in P312A as opposed to certain other SERCA mutants with mutation in the cytoplasmic domains (8), accumulation of Ca₂E1P is not caused by alteration of the properties of the Ca²⁺-free E2P form.

gradient promote dephosphorylation (neutral pH, presence of K⁺ without organic solvent) (48), the effect of the luminal Ca²⁺ being attributed to a shift toward the right of the equilibrium $E2P + 2\text{Ca}^{2+}_{\text{lumen}} \leftrightarrow \text{Ca}_2E2P \leftrightarrow \text{Ca}_2E1P$ (Scheme 1, steps 3–5). Phosphorylation with ³²P_i dependent on the high luminal Ca²⁺ concentration was likewise observed with the P312A mutant, indicating that the mutation did not interfere with the luminal exposure of the Ca²⁺ sites in E2P (Fig. 9A). The phosphoenzyme formed with the wild type as well as the mutant under these conditions disappeared rapidly upon addition of ADP, as expected because of the equilibrium $\text{Ca}_2E2P \leftrightarrow \text{Ca}_2E1P$, leading to the formation of ADP-sensitive Ca₂E1P, whereas the E2P formed in the absence of a high luminal Ca²⁺ concentration

To examine whether the E2P state of the P312A mutant also exposed the Ca²⁺ binding sites to the lumen in a normal way, we studied the well known (see *e.g.* Refs. 47 and 48) Ca²⁺ gradient-dependent formation of E2P from P_i (Fig. 9). This is an assay that up to now had never been performed with expressed ATPase. The microsomal vesicles containing expressed WT SERCA1a or mutant were loaded with Ca²⁺ at a high concentration of 20 mM and then diluted into a medium containing ³²P_i and EGTA (to chelate Ca²⁺ in the medium outside the vesicles and thereby allow phosphorylation from P_i). The high luminal Ca²⁺ concentration is known to allow the reaction of the wild type with P_i even under conditions that in the absence of a Ca²⁺

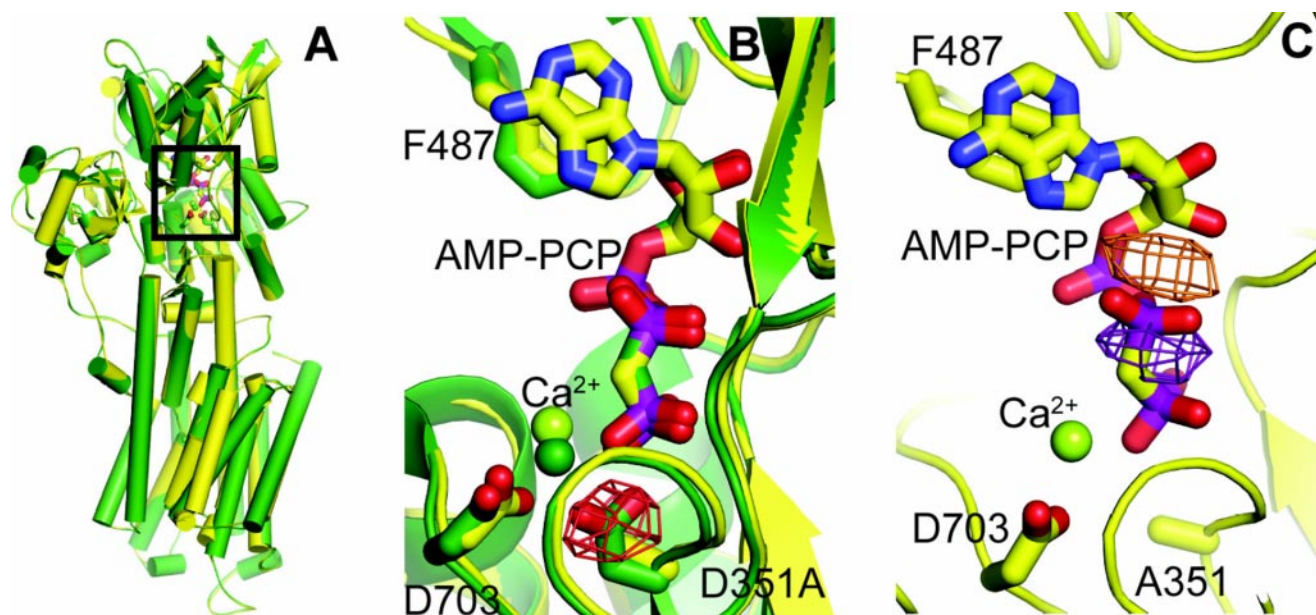


FIGURE 7. Crystal structures of yeast-expressed D351A mutants of SERCA1a in the presence of Ca^{2+} and AMPPCP (or ATP). A, overall view of the crystal structure of D351A-AMPPCP mutant shown in yellow, aligned with the WT structure of $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{AMPPCP}$ (PDB code: 1T55), shown in green. B, enlarged view of the phosphorylation site where the structure of WT $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{AMPPCP}$ is aligned with the structure of the D351A mutant. In the WT structure, the residues Asp³⁵¹, Phe⁴⁸⁷, Asp⁷⁰³, and the $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{AMPPCP}$ substrate analogue are displayed; in the mutant structure, Ala³⁵¹, Phe⁴⁸⁷, Asp⁷⁰³, and $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{AMPPCP}$ are displayed. $F_{\text{obs}}(\text{P312A}\cdot\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-) - F_{\text{obs}}(\text{D351A}\cdot\text{AMPPCP})$ difference Fourier map reveals a clear positive peak (displayed at 7σ , red mesh), which confirms the absence of the aspartate side chain in D351A mutant. (Differences between $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ and AMPPCP are also apparent in the difference map albeit at lower (3.0σ) contour level, not shown.) C, the computed structure of D351A with AMPPCP shown here was similar to that of D351A with ATP-bound except for a positive and a negative peak (displayed at 4σ and -4σ , purple and orange mesh, respectively) in the $F_{\text{obs}}(\text{D351A}\cdot\text{ATP}) - F_{\text{obs}}(\text{D351A}\cdot\text{AMPPCP})$ difference Fourier map, which we interpret as a slight shift of the position of β -phosphate in ATP, otherwise there were no clear differences between the D351A-AMPPCP and the D351A-ATP structures.

was exclusively ADP-insensitive (Fig. 9A) (47). By loading the vesicles with various Ca^{2+} concentrations, it was also feasible to determine an apparent affinity for luminal Ca^{2+} . Importantly, we found that the P312A mutant displayed a significant increase of the luminal Ca^{2+} affinity relative to the wild type (Fig. 9B), which may be accounted for by a displacement of the equilibrium $\text{E2P} \leftrightarrow \text{Ca}_2\text{E2P} \leftrightarrow \text{Ca}_2\text{E1P}$ in favor of one or both of the latter intermediates. What is excluded is that $\text{Ca}_2\text{E2P}$ can be considered to be destabilized with respect to $\text{Ca}_2\text{E1P}$, i.e. that formation of $\text{Ca}_2\text{E1P}$ from the $\text{Ca}_2\text{E2P}$ species is impossible in the mutant.

DISCUSSION

Recent methodological and technological progress has led to advances in the clarification of the structure of membrane proteins by x-ray crystallography (33), especially for a number of prokaryotic membrane transporters. Compared with this, structural determination at atomic resolution of eukaryotic membrane proteins is still lagging behind, but the preparation of diffracting crystals of SERCA1a with structural analogues of the physiological ligands, representing many different functional states, has led to significant progress in understanding the pump function of this P-type ATPase (59, 60), and this progress has been made possible by the ready availability of the protein in large amounts at an already sufficient purity level from an animal source (skeletal muscle). However, when dealing with Ca^{2+} -ATPase mutants we are in the same situation as with most eukaryotic membrane proteins that are only available in small amounts and require extensive purification for crystallization, including solubilization by detergents with no

loss of functional properties. The yeast-expression method developed in our laboratory for this purpose relies on the expression of a fusion protein consisting of SERCA1a and the BAD domain, which has allowed us to obtain fair amounts of purified and active protein amenable to both functional investigation and crystallization (34, 36). Our results provide for the first time an answer to a fundamental question in relation to Ca^{2+} -ATPase mutants: whether the functional changes resulting from mutations reflect major structural deviations from the wild type. At least for the two mutations under study here, D351A and P312A, despite the profound changes in the functional properties, we can now conclude that they are only associated with rather subtle structural changes, which makes it imperative to discuss the structural basis of the functional disturbance from this point of view.

The D351A Mutant—For this mutant we have confirmed a previous observation, namely that it exhibits an extraordinarily high affinity for ATP. We were able to deduce this both from classic $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ binding measurements, performed by filtration of D351A reconstituted into proteoliposomes (Fig. 2), and from Trp fluorescence measurements performed using purified protein still solubilized in DDM (Fig. 4). From a methodological point of view it is of interest that we found that under appropriate conditions (40% glycerol added to Ca^{2+} -ATPase solubilized by 1 mg/ml DDM) information could be obtained directly from the detergent-solubilized state, obviating the need to go through the complete reconstitution procedure used previously (15, 36). In addition to confirming the reliability of the previous measurement of an ATP affinity in the nanomolar

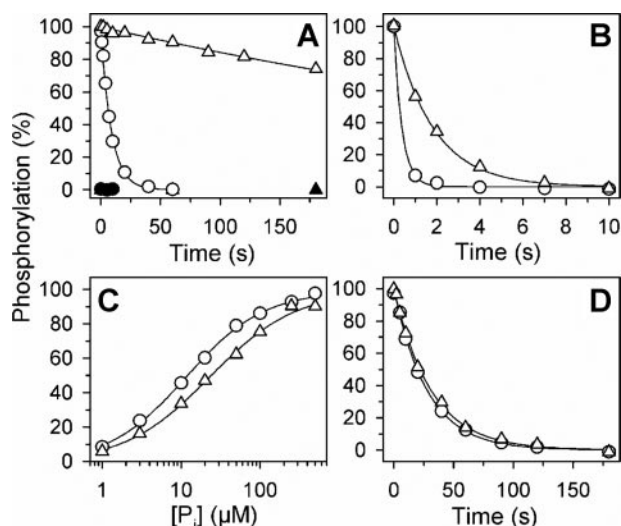


FIGURE 8. Functional analysis of the phosphoenzyme in COS cell-expressed wild type (circles) and P312A (triangles). *A*, rate of forward processing of $\text{Ca}_2\text{E1P}$ phosphoenzyme at 0°C (open symbols) and ADP sensitivity of the phosphoenzyme (closed symbols). The wild-type and P312A were phosphorylated for 15 s at 0°C in 40 mM MOPS/Tris (pH 7.0), 80 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0.955 mM CaCl_2 (giving a free Ca^{2+} concentration of $10\ \mu\text{M}$ during phosphorylation), $2\ \mu\text{M}$ calcium ionophore A23187, and $5\ \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. The phosphoenzyme was chased at 0°C by addition of 10 mM EGTA, and acid quenching was performed at the indicated time intervals (open symbols). The lines show the best fits of a monoexponential decay function to the data, giving the following rate constants: wild type, $k = 6.8 \pm 0.1\ \text{min}^{-1}$; P312A, $k = 0.10 \pm 0.01\ \text{min}^{-1}$. To test the ADP sensitivity of the phosphoenzyme (closed symbols) 1 mM ADP (pH 7.0) was added at the indicated times following the EGTA chase, and acid quenching was performed 4 s later. *B*, rate of forward processing of $\text{Ca}_2\text{E1P}$ phosphoenzyme at 25°C . The wild-type and P312A were phosphorylated for 5 s at 25°C in 40 mM MOPS/Tris (pH 7.0), 80 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , $2\ \mu\text{M}$ calcium ionophore A23187, and $5\ \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. The phosphoenzyme was then chased at 25°C by addition of 10 mM EGTA, and acid quenching was performed at the indicated time intervals. A monoexponential decay function was fitted to the data, giving the following rate constants: wild type, $k \geq 150\ \text{min}^{-1}$ (too fast to determine accurately by manual mixing, from Ref. 28; it is $\sim 300\ \text{min}^{-1}$); P312A, $k = 33 \pm 2\ \text{min}^{-1}$. *C*, P_i dependence of E2P formation in the backward direction of normal turnover. Wild type and P312A were phosphorylated for 10 min at 25°C in 100 mM MES/Tris (pH 6.0), 10 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 30% (v/v) DMSO, and varying concentrations of $^{32}\text{P}_i$, followed by acid quenching. The lines show the best fits of the Hill equation ($\text{EP} = \text{EP}_{\text{max}} \cdot [\text{P}_i]^n / (K_{0.5} + [\text{P}_i]^n)$) to the data, giving the following $K_{0.5}$ values and Hill coefficients (n_H): wild type, $K_{0.5} = 12 \pm 1\ \mu\text{M}$, $n_H = 0.9$; P312A, $K_{0.5} = 23 \pm 2\ \mu\text{M}$, $n_H = 0.8$. *D*, Rate of E2P hydrolysis. Phosphorylation from $^{32}\text{P}_i$ ($0.5\ \text{mM}$) was carried out for 10 min at 25°C in 100 mM MES/Tris (pH 6.0), 10 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, and 30% (v/v) DMSO. The phosphorylated sample was chilled on iced water, and dephosphorylation was studied at 0°C by a 19-fold dilution into ice-cold buffer containing 50 mM MOPS/Tris (pH 7.0), 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, and 5 mM H_3PO_4 , followed by acid quenching at serial times, as indicated. A monoexponential decay function was fitted to the data, giving the following rate constants: wild type, $k = 2.1 \pm 0.1\ \text{min}^{-1}$; P312A, $k = 1.9 \pm 0.1\ \text{min}^{-1}$.

range in D351A (37), we also show that the D351A mutation does not alter the affinity for Ca^{2+} (Fig. 3), thus demonstrating that the removal of this negative charge at the catalytic site does not influence the long range interaction with the Ca^{2+} binding sites and the equilibrium between the E1 and E2 forms. In this respect there seems to be a difference from the corresponding Na^+, K^+ -ATPase mutation, which appears to displace the E1–E2 conformational equilibrium in favor of E2 (61).

The inability of D351A to utilize ATP in the presence of Ca^{2+} allowed for the first time crystallization of the intermediate with Ca^{2+} and ATP simultaneously bound. Moreover, D351A measurements of ATP-induced Trp fluorescence responses were feasible even in the presence of Ca^{2+} , which activates

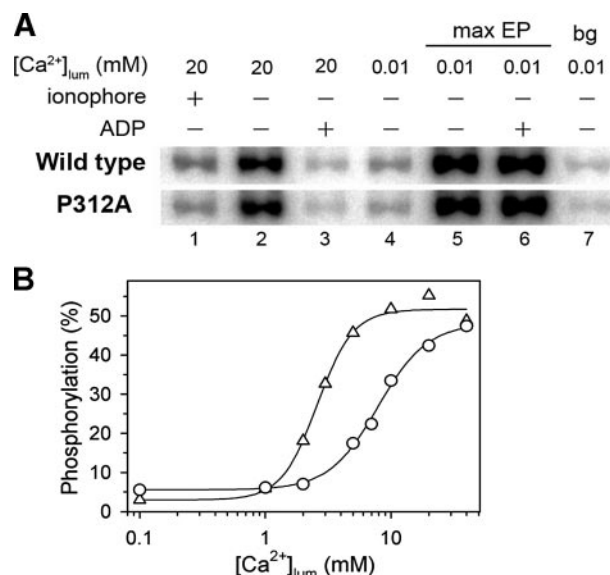


FIGURE 9. Function of the luminal Ca^{2+} sites in the E2P state of COS cell-expressed wild type and P312A. *A*, radioactive Ca^{2+} -ATPase bands on phosphorylation gel illustrating the stimulatory effect of luminal Ca^{2+} on the formation of E2P from $^{32}\text{P}_i$. The microsomal vesicles were loaded with Ca^{2+} in the lumen by incubation overnight ($\sim 18\ \text{h}$) on ice in 150 mM MOPS/Tris (pH 7.0), 125 mM sucrose, 75 mM KCl, and the indicated CaCl_2 concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{lum}}$). The phosphorylation was determined at 25°C by a 50-fold dilution of the Ca^{2+} -loaded vesicles into a phosphorylation medium containing 150 mM MOPS/Tris (pH 7.0), 125 mM sucrose, 77 mM KCl, 10 mM EGTA (removing Ca^{2+} on the outside of the vesicles as required for P_i phosphorylation), and $0.5\ \text{mM}$ $^{32}\text{P}_i$, followed by acid quenching 1 min later. The effects of 20 mM and $0.01\ \text{mM}$ luminal Ca^{2+} are shown in lanes 2 and 4. The background (bg) determined by replacing EGTA in the phosphorylation medium (i.e. on the outside of the vesicles) by $2.5\ \text{mM}$ CaCl_2 to prevent the phosphorylation with P_i is shown in lane 7. In a control experiment corresponding to lane 1 the Ca^{2+} -ionophore A23187 (final concentration $19\ \mu\text{M}$) was added shortly before initiation of the phosphorylation to allow Ca^{2+} to leak out of the vesicles. In lane 3, the ADP sensitivity of the phosphoenzyme formed in the presence of $20\ \text{mM}$ luminal Ca^{2+} is demonstrated by the addition of $1\ \text{mM}$ ADP 2 s prior to acid quenching. The max EP in lane 5 indicates for reference the maximal phosphorylation level determined under conditions of stoichiometric phosphorylation (100 mM MES/Tris (pH 6.0), 10 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 125 mM sucrose, 30% (v/v) DMSO, and $0.5\ \text{mM}$ $^{32}\text{P}_i$). In lane 6, the ADP insensitivity of the phosphoenzyme formed under these conditions is demonstrated by the addition of $1\ \text{mM}$ ADP 2 s prior to acid quenching. *B*, quantitative analysis of gels corresponding to various luminal Ca^{2+} concentrations for wild type (circles) and P312A (triangles). The phosphorylation of the Ca^{2+} -loaded microsomes was carried out as for lanes 2 and 4 of panel A. The ordinate shows the results in percentage of the maximal phosphorylation level (max EP in panel A) following subtraction of the background obtained as for lane 7 of panel A. The lines show the best fits of the equation ($\text{EP} = \text{EP}_{\text{min}} + (\text{EP}_{\infty} - \text{EP}_{\text{min}}) \cdot [\text{P}_i]^n / (K_{0.5} + [\text{P}_i]^n)$) to the data, with EP_{min} accounting for the basal phosphorylation level in the absence of a Ca^{2+} gradient and EP_{∞} representing the extrapolated phosphorylation level at infinite intravesicular Ca^{2+} . The $K_{0.5}$ values obtained were: wild type, $7.9 \pm 0.4\ \text{mM}$; P312A, $2.6 \pm 0.1\ \text{mM}$.

phosphorylation in the wild type. Hence, with this mutant it was possible to compare the fluorescence response induced by MgATP at a moderate ($100\ \mu\text{M}$) Ca^{2+} concentration with that observed upon addition of AMPPCP under crystallization conditions at $10\ \text{mM}$ Ca^{2+} (i.e. presumably as a $\text{Ca} \cdot \text{AMPPCP}$ complex, see Ref. 62) (Fig. 5). This provides an interesting confirmation of the physiological relevance of the x-ray data obtained with crystals formed in the presence of the very high Ca^{2+} concentration of $10\ \text{mM}$. Furthermore, we found that the effect of Mg^{2+} on the conformation of the SERCA1a pump remained observable with the D351A mutant (Fig. 4C). This long studied effect of Mg^{2+} (56, 63), was previously suggested *not* to depend on the once hypothesized binding of Mg^{2+} to the first Ca^{2+}

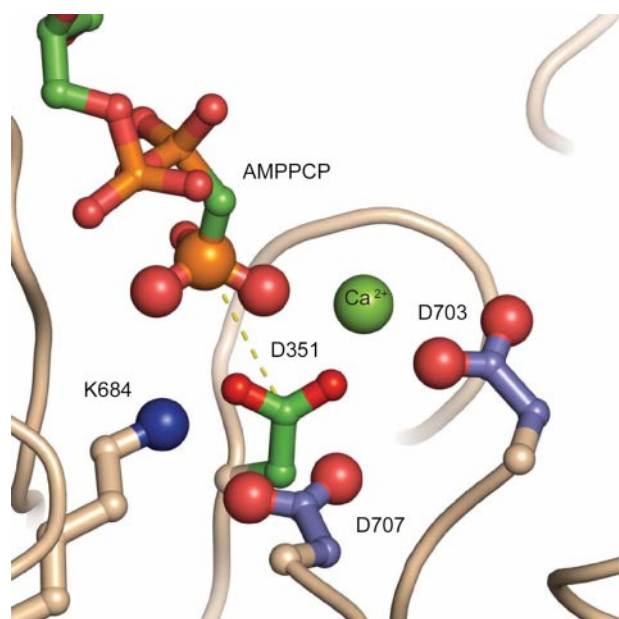


FIGURE 10. The electrostatic environment of the phosphorylation site as depicted by the structure of the $\text{Ca}_2\text{E1-AMPPCP}$ complex (PDB code: 1T5S). The figure shows in ball and stick representation the charged amino acid residues surrounding the central Asp³⁵¹, in addition to bound divalent cation (green sphere: represented by Ca^{2+} rather than Mg^{2+} in the crystal structure due to the high Ca^{2+} concentration (62)) and the γ -phosphate residue of bound AMPPCP. The distance between the O δ 1/O δ 2 carboxylate and the oxygen atoms of the γ -phosphate is ~ 4 Å. For further explanation, see the text.

binding site (29). The present data indicate that it does not depend, either, on the putative binding of Mg^{2+} to the Asp³⁵¹-negative charge.

With the D351A mutant, the crystals obtained diffracted to 3.4-Å resolution in the presence of AMPPCP and Ca^{2+} , and to 3.7-Å resolution in the presence of ATP and Ca^{2+} . The difference Fourier maps show that the triphosphate moiety of both nucleotides are bound in nearly the same bent conformation as in wild-type Ca^{2+} -ATPase (Fig. 7C). The elevated affinity of the D351A mutant for ATP (37) and the similar effect of the corresponding Na⁺,K⁺-ATPase (61) mutation have been interpreted in terms of a decrease in binding energy of the wild type, which is caused by the approach of the negatively charged γ -phosphate and the Asp³⁵¹ carboxylate group leading to formation of the aspartyl-phosphoanhydride. Fig. 10 illustrates the electrostatic environment of the phosphorylation site, as based on the $\text{Ca}_2\text{E1-AMPPCP}$ structure (21). The negatively charged residues of this site are Asp³⁵¹, Asp⁷⁰³, and Asp⁷⁰⁷, which are counterbalanced by Lys⁶⁸⁴, also essential to phosphorylation (13), and by a bound divalent cation (Ca^{2+} in the crystal structure (62), Mg^{2+} in the physiological situation) coordinated by Asp³⁵¹, Asp⁷⁰³, Thr³⁵³, and the γ -phosphate of the trinucleotide. Lys⁶⁸⁴ and the divalent cation, by interaction with Asp³⁵¹, will provide charge delocalization of the carboxylate group of Asp³⁵¹, permitting the approach of the γ -phosphate to form the transition state of the phosphorylated $\text{Ca}_2\text{E1P}$ intermediate with MgATP as the substrate. Furthermore, Lys⁶⁸⁴ and Mg^{2+} , by their interposition between the negatively charged groups, will exert a partial screening effect of the electrostatically negative field, arising from Asp⁷⁰³ and Asp⁷⁰⁷. Replacement of Asp³⁵¹ by alanine or asparagine (37) will tip the balance in favor

of positively charged groups at the phosphorylation site and thereby enhance the affinity for nucleotide binding. The similarity between the structures of the wild-type Ca^{2+} -ATPase and the D351A mutant, with no difference between the main chains around Asp³⁵¹ (Fig. 7), supports the hypothesis of a purely electrostatic effect with no major conformational changes in D351A.

On the basis of the distances among the relevant charged groups the magnitude of the effect can be roughly quantified from electrostatic theory. Such calculations call for an estimate of the change in electrostatic potential ($\Delta\psi$), caused by removal of the electrostatic charge from the carboxylate group of Asp³⁵¹. According to Coulomb's law, the presence of an electrostatic point charge causes a change in the surrounding electrostatic potential, $\Delta\psi \sim e/k/D \cdot r$, where e is the electronic unit charge (1.6×10^{-19} C), k is Coulomb's constant ($9 \cdot 10^9 \text{ N} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{C}^{-2}$), D is the dielectric constant at the binding site, r is the distance (in meters), C is coulombs, and N is newtons. As indicated in Fig. 10 the distance between the charges of the carboxylate group and the γ -phosphate can be estimated to be 4 Å, which by insertion of a suitable value for the dielectric constant inside the protein ($D = 20$) leads to a $\Delta\psi$ value of 0.18 V induced by removal of the charge from the Asp³⁵¹ carboxylate group. By application of the Nernst equation this corresponds to a 1250-fold increase in binding affinity at 20 °C, as calculated from the expression, $\ln K_{\text{eqt}} = \ln K_{\text{eq, int}} + zF \cdot \Delta\psi / R \cdot T$, where $K_{\text{eq, int}}$ represents the (intrinsic) equilibrium constant of the discharged state, z is ion charge, F is Faraday, R is gas constant, and T is absolute temperature. An increase in affinity of this order of magnitude will suffice to account for the marked increase in nucleotide binding affinity as indicated by a K_d value for the dissociation constant ATP of 0.01 μM for the Ca^{2+} -bound⁶ D351A mutant. Similarly the effect of the mutation on the nucleotide binding affinity in the Ca^{2+} -depleted ATPase can be estimated from the E2-TG-AMPPCP structure (PDB code 2C88), where TG is thapsigargin (18). Here the γ -phosphate is located at the periphery of the P-domain, with the result that the distance from Asp³⁵¹ is increased to 9 Å. Assuming this conformation will be retained after removal of one electronic charge at the phosphorylation site, the estimated increase in binding affinity will be 24-fold, we then compared it with an experimentally determined increase of ~ 45 -fold (from a K_d of 0.11 μM for the D351A mutant in the present work, to 5 μM in native Ca^{2+} -ATPase (18)). Thus, the data are consonant with binding of monovalently (rather than divalently) charged MgATP (which appears to be a reasonable proposition at pH 7.2 and $D = 20$), and the electrostatic interactions become more prominent when the Ca^{2+} -ATPase resulting from binding of Ca^{2+} is converted to the $\text{Ca}_2\text{E1}$ state. It should be emphasized that the above calculations are dependent on the near identity of the mutant and wild-type structure, such that any movements of other charged groups (including the coordinated Mg^{2+}) can be neglected. The good agreement between the calculation and the measurement of binding affinity underscores

⁶ Please notice that in Fig. 10 as well as in Fig. 7 the Ca^{2+} ion shown results actually from the replacement of the normally acting Mg^{2+} , whereas the two Ca^{2+} ions in Fig. 6 are the physiological, transported ions.

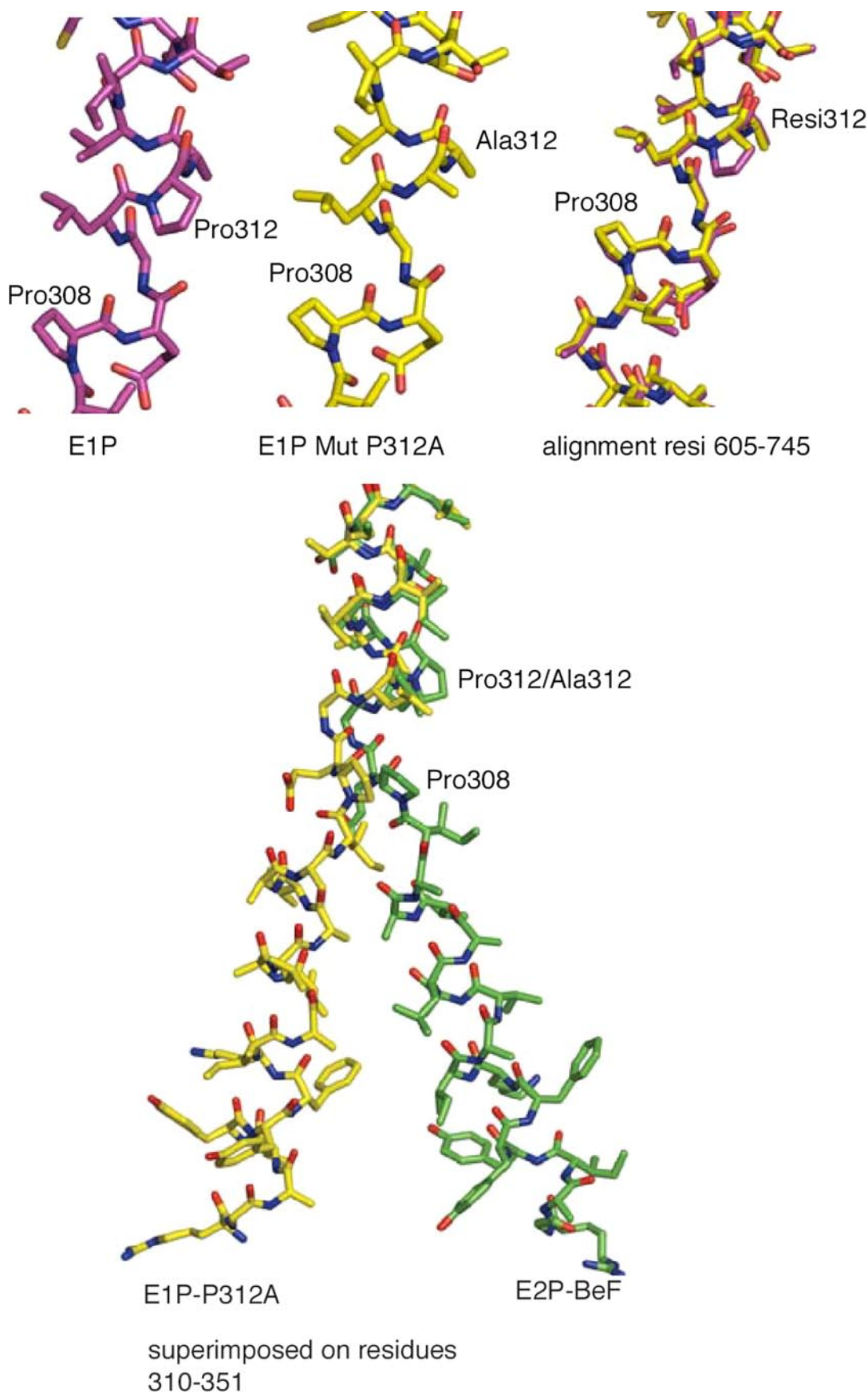


FIGURE 11. **The structural consequence of the P312A mutation.** Upper part: comparison of the M4 helix between the native E1P (1T5S) (magenta sticks) and the E1P mutant P312A in $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ form (yellow sticks) structure. On the right, the two structures are superimposed on residues 605–745. Lower part: comparison of P312A (E1P) and native SERCA1a in $\text{E2}\cdot\text{BeF}_3^-$ form (E2P). Yellow: P312A in $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ form (E1P). Green: native SERCA in $\text{E2}\cdot\text{BeF}_3^-$ form (E2P).

the conclusion drawn from the comparison of the crystal structures of mutant and wild type.

The P312A Mutant—The other mutant studied, P312A, was crystallized in a transition state of phosphorylation as $\text{Ca}_2\text{E1}\cdot\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ (which structurally resembles $\text{Ca}_2\text{E1P}$). The crystallization conditions were similar to those used for crystallization of the native enzyme in the same state (21), and the crystals diffracted to 3.5-Å resolution. Like the D351A mutant, the P312A structure shows no significant deviation from the wild-type structure, even in the $^{308}\text{PEGLP}$ segment where only the absence of the Pro^{312} side chain is noted (Figs. 6 and 11, upper part). In the wild type, this part of the M4 helix is unwound at Pro^{308} to accommodate one of the bound Ca^{2+} ions, and there is no reason to believe that there is any difference in this regard for the P312A mutant. In agreement with this view we observed that the Ca^{2+} affinity of the cytoplasmically facing high affinity sites is probably not altered very significantly by the P312A mutation (Fig. 3). The reason why the ability of the P312A mutant to hydrolyze ATP and translocate Ca^{2+} is severely curtailed was previously shown to be due to a slowing of the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition (16), and this conclusion is confirmed by the more extensive functional measurements in the present study (Fig. 8, A and B). It is of note that mutation in the same region of the closely related Na^+, K^+ -ATPase (where Leu rather than Pro is present in the homologous position to Pro^{312}) likewise causes a block of the $\text{Na}_3\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition (64). Fig. 11 (lower part) compares the conformation of M4 of the P312A mutant and of the wild type in the E2P ground state (resulting from the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition), based on the E2-BeF₃ crystal structures as reported recently by us (27) and by Toyoshima's group (65). Although the two new E2P structures differ in important respects, especially concerning the presence of a wide open luminal channel for release of Ca^{2+} in our structure (27), they do align well with respect to the kink that is formed by the unwound part of M4 (Fig. 11). The change of orientation of this unwound part of M4 in all E2 conformations, which in the E2P ground state contributes to the formation of the luminal exposure of the Ca^{2+} sites in E2P, is likely caused by a push, after phosphorylation, of the P-domain on the M4 helix. This leads to its downward displacement (~5 Å) in the membrane (25, 27). What then could explain the slowing of the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition in the mutant? Apart from a possible destabilization of transition states along this overall transition, for yet unknown reasons, several hypotheses were considered. Initially, before performing the phosphorylation experiments illustrated in Fig. 9, we had tentatively considered the possibility that the absence of Pro^{312} in the P312A mutant might prevent this helix from adopting the bent conformation that apparently is required (27) for opening the phosphoenzyme Ca^{2+} site toward the lumen. But such destabilization of the $\text{Ca}_2\text{E2P}$ form was subsequently excluded by our measurements of the Ca^{2+} -dependent phosphorylation in P312A, which showed that luminal Ca^{2+} had normal access to its sites on E2P (Fig. 9). Therefore Ala^{312} does not inhibit the formation of either $\text{Ca}_2\text{E2P}$ or the open form (ground state) of E2P. We have therefore considered another explanation for the slowing of the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition in the P312A mutant. We propose that the replacement of Pro^{312}

by alanine is relieving an inbuilt constrained region⁷ corresponding to the Ca^{2+} binding site I. This could explain the slowing of the $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition in the mutant. Stabilization of a close to normal $\text{Ca}_2\text{E1P}$ conformation by the P312A mutation is consistent with the similar crystal structures of the mutant and the wild type and would also be consistent with the right shift of the equilibrium $\text{E2P} + 2\text{Ca}^{2+}_{\text{lumen}} \leftrightarrow \text{Ca}_2\text{E2P} \leftrightarrow \text{Ca}_2\text{E1P}$ observed in the presence of a Ca^{2+} gradient (Fig. 9B). Additionally, our data reveal that the temperature dependence between 4 °C and 20 °C for the $\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ transition is steeper for the mutant than for WT, meaning that higher activation energy is needed for the transition between E1P and E2P for the mutant.

Finally, how can the "proline effect" be compared with other known structure of membrane proteins, transporters or channels? Interestingly, in the molybdate and sulfate ABC transporters, residues with significant conservation include a Pro-XXX-Pro sequence as in M4 of SERCA1a. These prolines are present in what has been pointed out as one of the gate regions in the molybdate transporter structure (66). In the voltage-dependent potassium channel Kv1.2 (35, 67), there is a Pro-X-Pro sequence in S6 inner helices, which allow these inner helices to curve so that they can form the correct interaction with the rest of the structure, an essential feature for the coupling of the voltage sensor movements to pore opening and closing. In several other membrane transporters the proline appear to be critical residues for transport (see e.g. Refs. 68 and 69). Conformational dynamics simulations indicate that proline can create a weak point in a helix that is thought to facilitate movements required for the function of some membrane proteins (see e.g. Ref. 70). On the other hand, Pro residues are sometimes found to be replaced by other residues in critical kink regions of membrane proteins, e.g. by Gly in the KcsA channel, and by Leu in Na, K -ATPase in the position homologous to Pro^{312} in Ca^{2+} -ATPase. For such data Yohannan *et al.* (71) have advanced evidence in favor of the view that other residues, as a result of evolutionary changes, can replace Pro in critical kink regions, when the optimized packing of the surrounding structure puts the non-Pro residue under strain to the same degree as by a Pro residue in a helical or other folded structure. The advantage of having a leucine present in the Na^+, K^+ -ATPase at the position corresponding to Pro^{312} of the Ca^{2+} -ATPase may be related to the difference between the affinities of the "high affinity" sites for Na^+ and Ca^{2+} in the respective proteins, which amounts to ~1000-fold. Hence, because the Na^+ -bound E1P form of the Na^+, K^+ -ATPase is less stable than the Ca^{2+} -bound E1P form

⁷ It is worth noting that the transmembrane segment M4 in both E1P (1T55) and E2P (3B9B) contains a canonical type I turn in the $^{308}\text{PEGLP}^{312}$ region separating the M4 segment into two α -helices, and type I turns are well fitted for places in a sequence where conformational readjustments must occur (J.-M. Neumann, CEA, Saclay, personnel observation). Indeed, the ϕ, ψ angles in 1T55 are $-100, +6$ for Gly^{310} (which is $i+2$ of Pro^{308} , the beginning of this turn) and $-59, -22$ for Glu^{309} (which is $i+1$), consistent with a canonical type I turn. Having two prolines as PXXXP constrains the choice of a hydrogen bond between i (Pro^{308}) and $i+3$ (Leu^{311}) through this turn type I. Introducing an alanine in 312 instead of a proline gives a second opportunity to Pro^{308} to make an $i+4$ hydrogen bond with the NH of Ala^{312} , which is impossible with a proline in 312. That this possibility can occur has been tested using simple modeling protocols (J.-M. Neumann and M. le Maire, CEA, Saclay, unpublished observation).

of the Ca^{2+} -ATPase, there may not be the same requirement for a proline in the Na^+, K^+ -ATPase as in the Ca^{2+} -ATPase, to allow the transition from E1P to E2P to occur at a reasonable rate.

Concluding Comments—The methodology worked out here for yeast expression and purification of Ca^{2+} -ATPase mutants in relatively large yield holds promise for correlating functional and structural properties of Ca^{2+} -ATPase investigated by biophysical techniques such as x-ray crystallography, intrinsic fluorescence, etc. As many Ca^{2+} -ATPase mutants with different functional deficiencies have previously been characterized enzymatically, mainly by phosphorylation and transport assays, the structural background for these changes should become clearer. The present results are in accordance with the simplifying concept that the mutations either affect the affinity for a ligand binding to a particular conformational state, due to local changes in the binding site (the electrostatics in the case of D351A), or displace the equilibrium between basic conformations that already exist in the wild-type enzyme (as seen for P312A). The third, highly relevant possibility, that aberrant properties of mutants are caused by the induction of new conformational states not existing in the wild type is not supported in the case of D351A and P312A, and only future crystallization studies on other Ca^{2+} -ATPase mutants will be able to reveal the extent to which this is also the case for other mutants of central importance. Of course, for such investigations to be fruitful there are important difficulties that have to be overcome for each mutant, such as the proper expression and stability of the purified mutated proteins in detergent. Beyond this scope, our methods for yeast expression and purification hopefully also will find a place in the study of the structure of other membrane proteins.

Acknowledgment—This paper is dedicated to Dr. J.-M. Neumann, who died unexpectedly on April 11, 2008. We are grateful to Dr. Neumann for pointing out to us the turn type I present in M4 of 1T5S and 3B9B and for interesting discussions.

REFERENCES

1. Ebashi, F., and Ebashi, S. (1962) *Nature* **194**, 378–379
2. Hasselbach, W., and Makinose, M. (1961) *Biochem. Z.* **333**, 518–528
3. de Meis, L., and Vianna, A. L. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 275–292
4. Inesi, G., Sumbilla, C., and Kirtley, M. E. (1990) *Physiol. Rev.* **70**, 749–760
5. Lee, A. G., and East, J. M. (2001) *Biochem. J.* **356**, 665–683
6. Møller, J. V., Juul, B., and le Maire, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 1–51
7. Stokes, D. L., and Green, N. M. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 445–468
8. Andersen, J. P. (1995) *Biosci. Rep.* **15**, 243–261
9. Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G., and MacLennan, D. H. (1989) *Nature* **339**, 476–478
10. MacLennan, D. H., Rice, W. J., and Green, N. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28815–28818
11. McIntosh, D. B., Woolley, D. G., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25778–25789
12. Maruyama, K., and MacLennan, D. H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3314–3318
13. Vilsen, B., Andersen, J. P., and MacLennan, D. H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16157–16164
14. Clausen, J. D., Vilsen, B., McIntosh, D. B., Einholm, A. P., and Andersen, J. P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2776–2781
15. Lenoir, G., Picard, M., Møller, J. V., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 32125–32133
16. Vilsen, B., Andersen, J. P., Clarke, D. M., and MacLennan, D. H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21024–21030
17. Zhang, Z., Sumbilla, C., Lewis, D., Summers, S., Klein, M. G., and Inesi, G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16283–16290
18. Jensen, A. M., Sørensen, T. L., Olesen, C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2006) *EMBO J.* **25**, 2305–2314
19. Moncoq, K., Trieber, C. A., and Young, H. S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 9748–9757
20. Olesen, C., Sørensen, T. L., Nielsen, R. C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **306**, 2251–2255
21. Sørensen, T. L., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **304**, 1672–1675
22. Takahashi, M., Kondou, Y., and Toyoshima, C. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5800–5805
23. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 647–655
24. Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) *Nature* **418**, 605–611
25. Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) *Nature* **432**, 361–368
26. Soulié, S., Neumann, J. M., Berthomieu, C., Møller, J. V., le Maire, M., and Forge, V. (1999) *Biochemistry* **38**, 5813–5821
27. Olesen, C., Picard, M., Winther, A. M., Gyrop, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2007) *Nature* **450**, 1036–1042
28. Sørensen, T. L., Dupont, Y., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5400–5408
29. Lenoir, G., Jaxel, C., Picard, M., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2006) *Biochemistry* **45**, 5261–5270
30. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136–1144
31. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) *Science* **289**, 739–745
32. Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., and Jap, B. K. (2001) *Nature* **414**, 872–878
33. Sørensen, T. L., Olesen, C., Jensen, A. M., Møller, J. V., and Nissen, P. (2006) *J. Biotechnol.* **124**, 704–716
34. Jidenko, M., Nielsen, R. C., Sørensen, T. L., Møller, J. V., le Maire, M., Nissen, P., and Jaxel, C. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11687–11691
35. Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005) *Science* **309**, 897–903
36. Jidenko, M., Lenoir, G., Fuentes, J. M., le Maire, M., and Jaxel, C. (2006) *Protein Expr. Purif.* **48**, 32–42
37. McIntosh, D. B., Woolley, D. G., MacLennan, D. H., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25227–25236
38. Ma, H., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 28938–28943
39. Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thines, D., le Maire, M., and Falson, P. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1560**, 67–83
40. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995) *Yeast* **11**, 355–360
41. Champeil, P., Guillain, F., Venien, C., and Gingold, M. P. (1985) *Biochemistry* **24**, 69–81
42. Møller, J. V., and le Maire, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18659–18672
43. Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800
44. Rigaud, J. L., Mosser, G., Lacapère, J. J., Olofsson, A., Levy, D., and Ranck, J. L. (1997) *J. Struct. Biol.* **118**, 226–235
45. Combettes, L., Claret, M., and Champeil, P. (1993) *Cell Calcium* **14**, 279–292
46. De Foresta, B., Henao, F., and Champeil, P. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 359–369
47. Beil, F. U., von Chak, D., and Hasselbach, W. (1977) *Eur. J. Biochem.* **81**, 151–164
48. Punzengruber, C., Prager, R., Kolassa, N., Winkler, F., and Suko, J. (1978) *Eur. J. Biochem.* **92**, 349–359
49. Lacapère, J. J., and Guillain, F. (1993) *Eur. J. Biochem.* **211**, 117–126

50. Andersen, J. P., Møller, J. V., and Jorgensen, P. L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8300–8307
51. Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J. L., and le Maire, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18623–18637
52. Andersen, J. P., le Maire, M., Kragh-Hansen, U., Champeil, P., and Møller, J. V. (1983) *Eur. J. Biochem.* **134**, 205–214
53. Dupont, Y., and le Maire, M. (1980) *FEBS Lett.* **115**, 247–252
54. Møller, J. V., Lind, K. E., and Andersen, J. P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1912–1920
55. Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J. L., and Champeil, P. (2006) *Biochemistry* **45**, 1861–1869
56. Guillain, F., Gingold, M. P., and Champeil, P. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7366–7371
57. Lacapère, J. J., Bennett, N., Dupont, Y., and Guillain, F. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 348–353
58. Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 18745–18754
59. Møller, J. V., Nissen, P., Sørensen, T. L., and le Maire, M. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 387–393
60. Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004) *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 269–292
61. Pedersen, P. A., Rasmussen, J. H., and Jorgensen, P. L. (1996) *Biochemistry* **35**, 16085–16093
62. Picard, M., Jensen, A. M., Sørensen, T. L., Champeil, P., Møller, J. V., and Nissen, P. (2007) *J. Mol. Biol.* **368**, 1–7
63. Champeil, P., Gingold, M. P., Guillain, F., and Inesi, G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 4453–4458
64. Vilsen, B. (1997) *Biochemistry* **36**, 13312–13324
65. Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., and Ogawa, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19831–19836
66. Hollenstein, K., Frei, D. C., and Locher, K. P. (2007) *Nature* **446**, 213–216
67. Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005) *Science* **309**, 903–908
68. Counillon, L., Noël, J., Reithmeier, R. A., and Pouyssegur, J. (1997) *Biochemistry* **36**, 2951–2959
69. Touret, N., Poujeol, P., and Counillon, L. (2001) *Biochemistry* **40**, 5095–5101
70. Bright, J. N., Shrivastava, I. H., Cordes, F. S., and Sansom, M. S. (2002) *Biopolymers* **64**, 303–313
71. Yohannan, S., Faham, S., Yang, D., Whitelegge, J. P., and Bowie, J. U. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 959–963

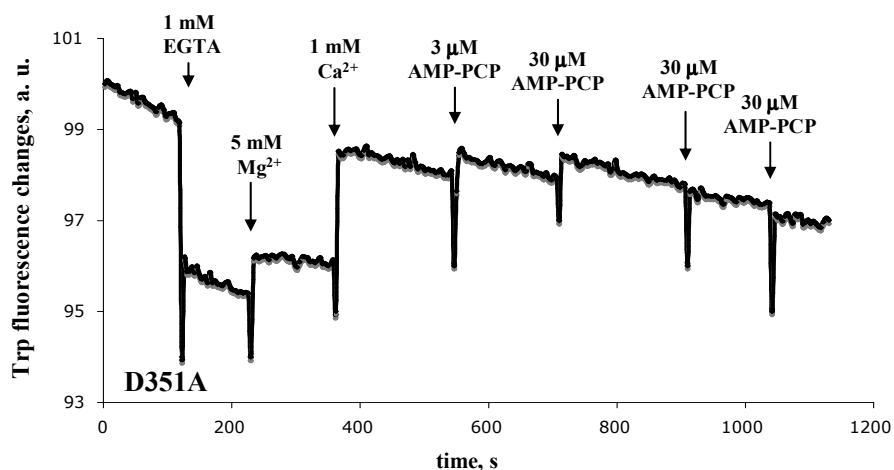
SUPPLEMENTAL MATERIAL

For the Ms by Alexandre Marchand, Anne-Marie Lund Winther, Peter Joakim Holm, Claus Olesen, Cedric Montigny, Bertrand Arnou, Philippe Champeil, Johannes D. Clausen, Bente Vilsen, Jens Peter Andersen, Poul Nissen, Christine Jaxel, Jesper Vuust Møller and Marc le Maire :

Crystal Structure of D351A and P312A mutant forms of the mammalian sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase reveals key events in phosphorylation and Ca^{2+} release

**Figure S1: Comparison between
AMP-PCP binding at pCa4 and ATP binding at pCa2
to D351A mutant as used for crystallization.**

A



B

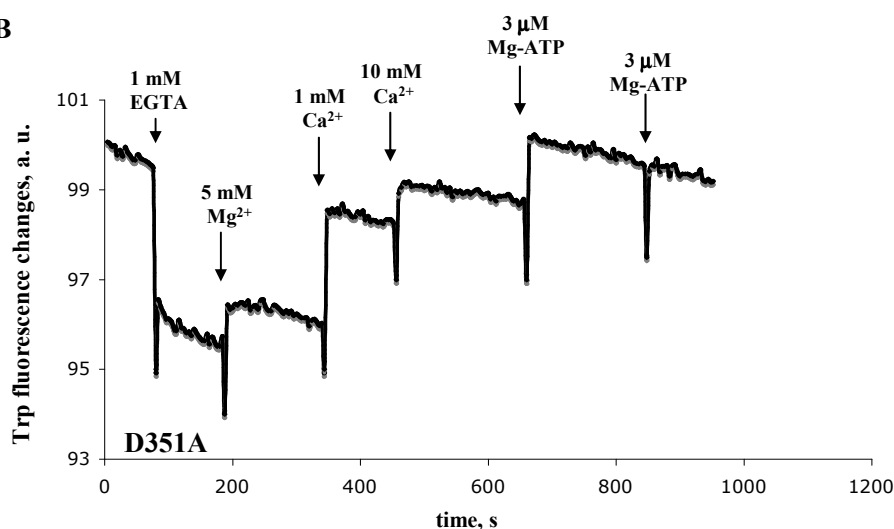


Figure S1: Comparison between AMP-PCP binding to D351A at pCa4 (A) and ATP binding to D351A mutant at pCa2 as used for crystallization (B). *Control experiment corresponding to Figure 5.* Fluorescence measurements were performed in 40 mM MOPS pH 7, 80 mM KCl, 40% glycerol, 1 mg/ml DDM at 20°C. A 20-fold dilution of yeast-expressed and purified D351A mutant resulted in 7.5 μg/ml D351A and 100 μM Ca²⁺ in the buffer. As an internal control for the fluorescence changes, 1 mM EGTA was then added to decrease the fluorescence level to its minimal value, followed by addition of 5 mM Mg²⁺, and 1 mM Ca²⁺ was finally added to recover the initial free Ca²⁺ concentrations of 100 μM. Then, 3 μM and 30 μM AMP-PCP (three times) were added (A). Alternatively, Ca²⁺ concentration was increased to 10 mM and followed by addition of Mg-ATP (3 μM, twice) (B). The small changes in intensity due to dilution have been corrected for.

**MANUSCRIPT #4 : GLYCYL BETAINE SLOWS DOWN
IRREVERSIBLE DENATURATION OF DETERGENT-
SOLUBILIZED SERCA1A.**

Montigny C, Arnou B, Champeil P

Submitted

Manuscript Number:

Title: Glycyl betaine slows down irreversible denaturation of detergent-solubilized SERCA1a

Article Type: Notes and Tips

Section/Category: Membranes and Receptors

Keywords: SERCA; membrane protein; detergent; solubilization; stability; betaine

Corresponding Author: Dr philippe champeil,

Corresponding Author's Institution: CNRS URA 2096 & CEA DSV

First Author: Cédric Montigny

Order of Authors: Cédric Montigny; Bertrand Arnou, PhD; philippe champeil

Abstract: Many membrane proteins become labile when they are solubilized by detergent. Here we show that the presence of high concentrations of glycyl betaine stabilizes one of these proteins, the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1a), solubilized with nonionic detergents like dodecylmaltoside (DDM) or octaethylene glycol monododecyl ether (C12E8). Betaine at high concentrations might therefore become useful as a stabilizing agent for detergent-solubilized SERCA1a (or perhaps other membrane proteins), for instance during purification procedures and functional characterization, or possibly during the long periods of time required for crystallogenesis.

To Peter McPhie, Executive Editor, Analytical Biochemistry

June 20th, 2009

Sir,

I am hereby submitting for publication as “Notes and Tips” in Analytical Biochemistry a short manuscript entitled: “*Glycyl betaine slows down irreversible denaturation of detergent-solubilized SERCA1a*”, by Cédric Montigny, Bertrand Arnou, and myself.

We have already submitted to Analytical Biochemistry a closely related manuscript (the previous ABIO-09-203) but that previous manuscript was not accepted, based on a number of comments by the reviewers. We wish to submit it again, after revision and now in a slightly shorter format, hopefully to be published as “Notes and Tips”. As discussed in more detail below, we think that many of the reviewers’ comments are probably appropriate for a detailed full article, but not for a contribution to the “Notes and Tips” section (at least according to the description of this section which is given in the Instructions to Authors).

Like other membrane proteins, the Ca^{2+} -transport ATPase known as “SERCA1a” becomes labile in the presence of solubilizing concentrations of detergent, and rapid irreversible inactivation of SERCA1a may then occur (especially for Ca^{2+} -free states). In this work we show that high concentrations of glycyl betaine, one of the many relatively inert solutes which over years have been found useful to stabilize soluble proteins, greatly stabilize SERCA1a after its solubilization with nonionic detergents like dodecylmaltoside (DDM) or octaethylene glycol monododecyl ether (C_{12}E_8) (these detergents are commonly used for its purification or crystallization). Betaine might therefore, at high concentrations, turn out to be very useful as a stabilizing agent for SERCA1a, or perhaps other membrane proteins.

Reviewer #1 of our previous submission stated that our “experiments are well performed and the results clearly presented”, and we thank him for this judgment. However, he regretted that we did not discuss in greater detail the various possible reasons why glycyl betaine stabilizes detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase (reasons which have been debated at length in the case of soluble proteins), and he suggested that we would have been in a better position if we had done more studies (for instance, we could have examined the effect of glycyl betaine on the various transitions between intermediate species in the ATPase catalytic cycle, and this might indeed have provided interesting information). We feel that this regret of a much wider scope for our manuscript cannot decently be taken as an objection against publication of our work as a “Notes and Tips” contribution, as this section of the Journal, if we understand the Instructions to Authors, is considered to be appropriate for welcoming simple but useful “kitchen tricks”.

Reviewer #1 also urged us to demonstrate crystallization in presence of glycyl betaine and to analyze the corresponding crystals, something we would certainly love to be able to do immediately. However, we again feel that it would not be really fair to use the present lack of a crystal as an objection to publication of our methodological results as “Notes and Tips”. It is now fashionable to think that every laboratory should be able to do both biochemistry and cristallogenesis (as well as many other things, from molecular biology to cell biology), but unfortunately this is not yet the case in our lab, and like in all labs we nevertheless need to have our work recognized. When our colleagues from Japan or from Denmark in the Serca1a field have succeeded in obtaining the desired crystals (we have sent them our results, of course), there is no doubt that they will be happy to quote the method previously published (we hope ☺!) in Analytical Biochemistry. Meanwhile, other groups interested in other membrane proteins will also perhaps be stimulated by our results (which the reviewer found reliable).

Reviewer #2 suggested that since the stabilizing effect of betaine has already been described for photosystem II, our study does not unveil a strictly novel method. This is partly true of course, but again we think that the mere extension of the number of membrane proteins which could benefit from a “kitchen trick” deserves publication. Membrane proteins remain difficult to handle, and their stabilization during purification, characterization and crystallization is a current and major bottleneck in the membrane proteins field. We think our results will be helpful in this respect.

More specifically, Reviewer #2 had a few comments:

* (1) He had questions about our methods, and we therefore tried to make the revised text clearer: yes, the activity of SERCA1a was assayed with detergent-solubilized SR membrane vesicles. In these vesicles, 70% of the protein consists of SERCA1a, and we have shown SDS-PAGE gels of our SR membranes, for instance, in Champeil et al. (1978) JBC 253, 1179-1186, or Montigny et al. (2007) Biochemistry 46, 15162-15174. nevertheless, this proportion has no incidence on the rationale of our results or on their analysis, and we feel that showing such gels again together with our present results would be of no real use.

* (2) He also regretted the absence of gel filtration experiments to “substantiate the effect of betaine on denaturation and provide insight into the underlying mechanism”. Although I agree that denatured Serca1a aggregates more easily than active Serca1a, and that this aggregation can be detected by gel filtration, aggregation would provide much more indirect evidence than the directly measured irreversible inactivation of Serca1a activity shown in our present version; thus, I again would see no real interest in including such data.

* (3) He also seemed to think that, since a few Serca1a crystals have already been obtained with glycerol as a protein stabilizer, obtaining Serca1a crystals with glycine betaine would be redundant. Scientists in our field have of course been made very happy with the information about Serca1a derived from these already available few crystals, but it is obvious to me (and to most, of us, I think) that new crystals will also be of interest, especially if they reveal new crystallization patterns, if they correspond to new forms of Serca1a or if they show selected features with higher resolution (e.g. lipids). Moreover, most of the Ca^{2+} -free forms of Serca1a which have been crystallized up to now have been obtained in the presence of Serca1a specific inhibitors, necessary for stabilization of the protein during crystallogenesis, and these inhibitors do bias the structure of the membrane-embedded domain. The use of new stabilizing agents could therefore be useful to avoid the use of such inhibitors.

* (4-7) Reviewer #2 made a few comments about Figure 1, but we have now deleted that Figure. He also suggested that our figures should not have a key for the symbols inside the figures, and we followed this advice (we only left titles to indicate what Panels A, B, C... were about). As suggested by this reviewer, Results and Discussion sections have now been written together as one section. As suggested, too, the unusual temperature dependence of detergent-solubilized SERCA denaturation is no longer discussed in any detail (but it is still mentioned, because it is of real significance). And we have tried to correct the residual typos...

In case decision about acceptability of our submission would require an additional round of review instead of being taken simply in the editorial office, we can again suggest, as previously, that among Editorial Board members, Dr T.A. Keiderling in Chicago, Illinois would probably handle our manuscript in an expert manner. As potential referees, we also suggest, as previously, A.G. Lee in Southampton (agl@soton.ac.uk), J.P. Andersen, J.V. Møller or P. Nissen in Aarhus (jpa@fi.au.dk, jvm@biophys.au.dk, or pn@mb.au.dk), C. Toyoshima in Tokyo (ct@iam.u-tokyo.ac.jp), G. Inesi, previously in Baltimore and now in California (ginesi@cpmcri.com), H. Suzuki in Asahikawa (hisuzuki@asahikawa-med.ac.jp), D. Stokes in New York (stokes@saturn.med.nyu.edu), L. de Meis in Rio de Janeiro (demeis@bioqmed.ufrj.br), or the recently retired D.B. McIntosh in Cape Town (northstationfarm@gmail.com), or again, as specialists of ion pumps outside the SERCA field, S.D. Karlish in Rehovot (steven.karlish@weizmann.ac.il), or M. Esmann in Aarhus (ME@BIOPHYS.AU.DK).

We thank you in advance for your attention, and look forward to hearing your decision. We hope that the new format of our revised manuscript will indeed allow you to consider it favourably.

On behalf of all authors,

Philippe Champeil, DR1 INSERM
CNRS/URA 2096 & CEA/DSV/iBiTec-S/SB²SM
Centre d'Etudes de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex (France)
Tel: 33 1 6908 3731 ; Fax: 33 1 6908 8139 ; E-mail: philippe.champeil@cea.fr

Graphics: Graphics were prepared with SigmaPlot, transferred into PowerPoint presentations, and converted to pdf format.

-----Message d'origine-----

De : ees.yabio.0.c523.9155c16f@eesmail.elsevier.com
[mailto:ees.yabio.0.c523.9155c16f@eesmail.elsevier.com] De la part de
Analytical Biochemistry
Envoyé : Monday, May 04, 2009 3:42 PM
À : CHAMPEIL Philippe 980494
Objet : ABIO-09-203: Decision

Ms. No.: ABIO-09-203

Title: Glycyl betaine slows down irreversible denaturation of detergent-solubilized SERCA1a
Analytical Biochemistry

Dear Dr champeil,

Your manuscript has been reviewed by individuals knowledgeable in this field. The reviewers felt that the material was not acceptable based largely on the reasoning that is noted in the reviewers' comments below.

I regret the negative outcome but appreciate having received the manuscript for consideration in Analytical Biochemistry.

Sincerely,

Peter McPhie
Executive Editor
Analytical Biochemistry

Reviewers' comments:

Reviewer #1: This article describes the finding that Glycyl betaine stabilizes detergent solubilized Ca-ATPase and suggests that this might be of importance for crystallization purposes. The experiments are well performed and the results clearly presented. The Discussion is however not very informative. I do not like sentences like the following in Discussion: "Betaine is only one of the many relatively inert solutes which over years have been found to stabilize various soluble proteins [12, 29-30], acting as "cosmotropic" agents for reasons which have been discussed at length. These reasons remain partly controversial, and probably in some cases are specific of the protein studied." It is not very helpful to the present readers to be referred to a lot of inconclusive literature. It would have been appropriate to discuss in this paper in depth possible reasons (even the "controversial" reasons) why Glycyl betaine stabilizes detergent solubilized Ca-ATPase. Perhaps the authors would be able to provide answers if they had done more studies. For example they could have examined the effects of Glycyl betaine on the conformational equilibria/reaction cycle of the Ca-ATPase. This might in any case provide interesting information. If they really want to promote Glycyl betaine as an agent helpful in crystallization, they could also have demonstrated crystallization in presence of Glycyl betaine. Crystallization of the Ca-ATPase is no longer an impossible task. Many high-resolution crystal structures of this enzyme in various conformations have been described during the last 9 years, and the authors collaborate intensely with crystallization laboratories that can do this, judging from their publication record. With respect to Glycyl betaine the goal must be to obtain a Ca-ATPase crystal with this compound present and thereby demonstrate its location in the structure.

Reviewer #2: The osmolyte glycine betaine is known to suppress or reverse protein aggregation, assist protein refolding, counteract the deleterious effects of urea and salts on protein stability, and enhance the thermotolerance of proteins. In this study, Montigny and colleagues

investigate the effects of glycine betaine on the activity of detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA, isoform 1a). The authors show that glycine betaine protects solubilized SERCA1a against loss of ATPase activity over time, slows down SERCA1a inactivation due to detergent solubilization, and enhances the stability of SERCA1a in the presence of Ca²⁺, which per se reduces irreversible inactivation of SERCA1a. Best protection of SERCA1a ATPase activity is achieved with 1M glycine betaine in the solubilization buffer.

The effects of glycine betaine on SERCA1a in its natural membrane environment have been investigated and published previously, as the authors of this paper state themselves (refs. 26, 27, 28). More importantly, the protective effect of glycine betaine (? 1M) on the activity of detergent-solubilized oxygen-evolving photosystem II from cyanobacteria has been shown previously (Boussac A et al, J Biol Chem 2004; 279: 22809-22819); this appears to be the first study demonstrating a stabilizing effect of glycine betaine on detergent-solubilized integral membrane proteins. The present study by Montigny and colleagues does therefore not unveil a novel method or a significant further development of an existing method.

Specific points:

1. Methods section, SERCA1a preparation; the authors should describe how detergent extraction of SERCA1a from SR membrane vesicles was done - at what concentration were the detergents (DDM and C12E8) used? was SERCA1a purified any further by chromatography (as described in an earlier paper by Montigny and colleagues; Biochemistry 2008; 47: 12159-12174)? or was the activity of SERCA1a assayed with detergent-solubilized SR membrane vesicles, as the figure legends suggest? what was the purity of the final SERCA1a or SR membrane vesicle preparation used for assaying ATPase activity? the authors should show an SDS-PAGE to that effect.

2. ATPase activity derived from the rate of NADH oxidation is used as the only readout of protein stability. In order to substantiate that glycine betaine slows down irreversible SERCA1a denaturation and provide insight into the underlying mechanism(s), the authors should show gel filtration analysis of detergent-solubilized SERCA1a under various conditions (in the presence or absence of glycine betaine, in the presence or absence of EGTA or Ca²⁺, and so on), or use an alternative approach.

3. The authors claim that glycine betaine might become useful as a stabilizing agent for purification and crystallization of SERCA. In fact, crystal structures of all major states in the reaction cycle of SERCA have already been determined (Sorensen et al, Science 2004; 304: 1672-1675. Toyoshima and Mizutani, Nature 2004; 430: 529-535. Olesen et al, Nature 2007; 450: 1036-1042. Jensen et al, EMBO J 2006; 25: 2305-2314). And in those studies, glycerol at ? 20% was included in the solubilization buffer, which according to the authors of this study proved superior over glycine betaine in protecting detergent-solubilized SERCA1a against denaturation. Thus, the proposed application for glycine betaine appears to be redundant, at least in the case of SERCA.

4. Figure 1; only scale bars for time (1 min) and absorbance change (?OD 0.1) are given, but y-axis and x-axis are not labeled with numerals. It would be helpful for the reader, if instead of the scale bars, the respective unit labels would be given on y-axis and x-axis.

5. Figure 2 and 3; for sake of clarity, each panel of those two figures should have a key for the symbols right next to it (and not inside the figure and along the data).

6. Results and Discussion sections should be written together as one section. The discussion of the temperature dependence of denaturation of C12E8-solubilized SERCA with reference to former work (last sentence of second paragraph on page 3) should be omitted because it is irrelevant for this study, and only distracts from the focus of this study.

7. There are typos and spelling errors throughout the manuscript; for example, line 11, page 2: "conteract" instead of "counteract".

Notes & Tips

**Glycyl betaine slows down irreversible denaturation
of detergent-solubilized SERCA1a.**

Cédric Montigny^{a,b}, Bertrand Arnou^{a,b}, and Philippe Champeil^{a,b*}

^a CNRS, URA 2096 (Systèmes membranaires, photobiologie, stress et détoxication),
F-91191 Gif-sur-Yvette, France

^b CEA, iBiTecS (Institut de Biologie et Technologies de Saclay),
F-91191 Gif-sur-Yvette, France

*Corresponding author. Fax: 33-1-6908-8139. E-mail: philippe.champeil@cea.fr.

Short Title: Betaine stabilizes detergent-solubilized SERCA1a.

Category assignment: Membranes and Receptors.

¹*Abbreviations used :* SERCA1a, sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, isoform 1a; SR, sarcoplasmic reticulum; ATPase, adenosine triphosphatase; EGTA, [ethylenebis-(oxyethylenenitrilo)]tetraacetic acid; Tes, N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethane sulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; C₁₂E₈, octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether; DDM, *n*-dodecyl β-D-maltopyranoside; DOPC, 1,2-dioleoylphosphatidylcholine; cmc, critical micellar concentration.

ABSTRACT

Many membrane proteins become labile when they are solubilized by detergent. Here we show that the presence of high concentrations of glycyl betaine stabilizes one of these proteins, the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1a), solubilized with nonionic detergents like dodecylmaltoside (DDM) or octaethylene glycol monododecyl ether (C₁₂E₈). Betaine at high concentrations might therefore become useful as a stabilizing agent for detergent-solubilized SERCA1a (or perhaps other membrane proteins), for instance during purification procedures and functional characterization, or possibly during the long periods of time required for crystallogenesis.

Keywords: SERCA, membrane protein, detergent, solubilization, stability, betaine.

Like many other membrane proteins, SERCA1a¹, the ATP-dependent Ca²⁺ pump of skeletal muscle cell endoplasmic reticulum [1-2], becomes fairly unstable after its solubilization by detergent, especially in the absence of its natural ligands, Ca²⁺ or ATP (*e.g.* [3] and references herein). Such irreversible inactivation of solubilized SERCA1a has already been shown to be slowed down by including glycerol in the solubilization buffer (*e.g.* [4-5] and references herein). However, glycerol is only one out of several fairly inert water-soluble molecules (*e.g.* polyols and sugars, or certain amino acids) which, at high concentrations, have been reported to protect the native structure of various water-soluble or membrane-bound proteins, possibly by favouring compact states for these proteins. Another one of these molecules, sometimes called “cosmotropic” osmolytes, is glycyl betaine (or betaine for simplicity), an effective enhancer of the tolerance of plants (including the sugar beet *Beta vulgaris* L.) against abiotic stress (*e.g.* [6]). In several cases betaine was indeed reported to counteract denaturation and result in easier expression, purification or even crystallization of specific proteins (*e.g.* [7-10]). Here we describe the previously unnoticed protecting effect exerted by betaine on detergent-solubilized SERCA1a. The use of this stabilizing agent for detergent-solubilized SERCA1a might be an alternative to the use of glycerol during purification procedures in which glycerol viscosity would severely slow down chromatography and ultrafiltration steps. We also hope that by making crystallogenesis possible under new conditions, its use could lead to new crystalline forms obtained in the absence of inhibitors [11, 22].

Sarcoplasmic reticulum (SR) membrane fragments were prepared as previously described [11]. The nonionic detergents C₁₂E₈ (octaethylene glycol monododecyl ether) and DDM (*n*-dodecyl β -D-maltopyranoside) were from Nikko Chemicals Ltd (Japan) and Anatrace Inc (U.S.A.), respectively. DOPC (dioleoyl phosphatidylcholine) was from Avanti Polar Lipids (U.S.A.). Glycyl betaine (thereafter called “betaine”, for simplicity) was from Fluka. The betaine stock solution was prepared by adding 12 g of solid betaine to 15 g of buffer A (100 mM KCl, 50 mM Tes-Tris and 1 mM Mg²⁺, at pH 7.5 and 20°C), resulting in a final volume of about 25 ml and therefore a final betaine concentration of about 4 M, together with concentrations of KCl, Tes and Mg²⁺ lower by about 40% than in the initial buffer A. The residual Ca²⁺-dependent ATPase activities of SERCA1a, either within SR membrane fragments or solubilized by detergent under the conditions indicated in the Figure legends, were determined at 20°C with a coupled enzyme assay, using a Hewlett-Packard HP 8453 diode-array spectrophotometer and an assay medium consisting of buffer A supplemented with 0.1 mM Ca²⁺, 0.05 mM EGTA, 5 mM MgATP, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 0.1 mg/ml lactate dehydrogenase, 1 mM phosphoenol pyruvate, an initial concentration of 0.2 to 0.3 mM NADH, and the additional presence of 1 mg/ml C₁₂E₈ (*e.g.* [3]).

We found that the well-known time-dependent irreversible inactivation generally observed upon incubation of detergent-solubilized SERCA1a for a few minutes in the absence of Ca²⁺ ([3, 5] and references herein) was slowed down by including betaine in the solubilizing incubation medium (Figure 1). This betaine-dependent stabilization of the Ca²⁺-free solubilized SERCA1a occurred for both

C₁₂E₈- and DDM-solubilized SERCA1a (Panels A and B, respectively, in *Figure 1*). It also occurred after solubilization at a reduced detergent/protein concentration (Panel C), *i.e.* when reduced delipidation already protects SERCA1a from irreversible denaturation to a significant extent ([3] and references herein). It was dependent on the betaine concentration: betaine concentrations up to 1 M enhanced stability while higher betaine concentrations were less effective (Panel D). Protection by 1 M betaine was only slightly less effective than that provided by 20% glycerol (data not shown). In parallel experiments, we checked that betaine up to at least 0.6 M had no significant perturbing effect on overall ATPase activity in the presence of C₁₂E₈ (data not shown).

We also tested the stabilizing effect of 1 M betaine in the presence of Ca²⁺, *i.e.* under conditions where time-dependent inactivation of the solubilized SERCA1a is much slower (under such conditions, Ca²⁺ binds to its high affinity transport sites on SERCA1a and “cross-links” some of the protein transmembrane segments, presumably slowing down the dynamics of this region of the protein, see [12] and references herein). In this case, SERCA1a was much more stable, but betaine was again helpful over long periods, in fact even more helpful, on a relative basis. Figure 2 illustrates this result: over a few days at either 20°C or 6°C, betaine was as potent as 20 % v/v glycerol (about 2.8 M) in stabilizing SERCA1a, solubilized with either C₁₂E₈ or DDM (*Panels A-C* in *Figure 2*), and this was true irrespective of the temperature during incubation (note that time-dependent irreversible inhibition of C₁₂E₈-solubilized SERCA1a in the presence of detergent alone is slower at 20°C than at 6°C, as previously mentioned (Figure 12B&C in [13]) for DDM). The protecting effect of betaine was similar to or even higher than the one afforded by including additional lipid together with detergent (here, dioleoyl phosphatidylcholine, DOPC, see *Panel D*).

In separate controls, we found by fluorescence measurements with Anilinonaphtalene sulfonate [14] and by light scattering measurements [15] that betaine did not significantly alter the critical micellar concentration of C₁₂E₈ and DDM or the ability of these detergents to solubilize SR membranes, excluding this as a possible cause of the observed protection of solubilized SERCA1a (data not shown). Independently, we found that the presence of 1 M betaine together with solubilized SERCA1a leaves it possible to use Trp fluorescence for characterizing ligand-dependent conformational changes of the solubilized SERCA1a (data not shown), as was recently found to be also the case in the presence of glycerol [5].

Although specific effects of betaine on the function of SERCA1a inserted in its natural membrane environment have already been described [16-18], the stabilizing effect exerted by betaine on detergent-solubilized SERCA1a has not yet been reported. The reason for this protection of SERCA1a is not fully elucidated. Photosystem II, another membrane protein, was previously found to be protected by betaine in its detergent-solubilized form [9], and this was apparently due to betaine preventing the dissociation of an associated protein chain [19]. In contrast, various soluble (and in some cases monomeric) proteins were suggested to be protected by inert osmolytes by a different mechanism, involving exclusion of these osmolytes from the water-protein interface [*e.g.* 20-21].

Irrespective of detailed reasons for this protection, protection of the solubilized SERCA1a by betaine, although not 100% in the absence of Ca^{2+} (*Figure 1*), was quite impressive in the presence of Ca^{2+} , even in the absence of lipid (*Figure 2*). Therefore, betaine at high concentrations could become useful as a stabilizing agent for detergent-solubilized SERCA1a (and probably other membrane proteins, too). Betaine, instead of glycerol or together with a reduced concentration of glycerol, could for instance prove useful for the purification of detergent-solubilized membrane proteins by procedures in which the intrinsic viscosity of glycerol would slow down operation (*e.g.* for column equilibration and elution media, or for ultrafiltration). Betaine, which is already proposed by commercial crystallization screens as one of the classical additives used at low concentrations, could also be used at higher concentrations to stabilize the detergent-solubilized protein during the lengthy incubation periods required for its crystallization, to hopefully lead to the discovery of new crystalline forms or perhaps to higher resolution crystals of SERCA1a.

Acknowledgements

We thank Alain Boussac for bringing the nice properties of betaine to our attention. We also thank CNRS and CEA for financial support.

References

- [1] J.V. Møller, P. Nissen, T.L. Sørensen, M. le Maire, Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (2005), 387-93.
- [2] C. Toyoshima, Structural aspects of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Arch. Biochem. Biophys.* 476 (2008), 3-11.
- [3] S. Lund, S. Orlowski, B. de Foresta, P. Champeil, M. le Maire, J.V. Møller, Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 264 (1989), 4907-4915.
- [4] W.L. Dean, C. Tanford, Properties of a delipidated, detergent-activated Ca^{2+} -ATPase, *Biochemistry* 17 (1978), 1683-1690.
- [5] C. Montigny, B. Arnou, E. Marchal, P. Champeil, Use of glycerol-containing media to study the intrinsic fluorescence properties of detergent-solubilized native or expressed SERCA1a, *Biochemistry* 47 (2008), 12159-12174.
- [6] T.H.H. Chen, N. Murata, Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants, *Trends Plant Sci.* 13 (2008), 499-505.
- [7] T. Coelho-Sampaio, S.T. Ferreira, E.J. Castro Júnior, A. Vieyra, Betaine counteracts urea-induced conformational changes and uncoupling of the human erythrocyte Ca^{2+} pump, *Eur. J. Biochem.* 221 (1994), 1103-1110.
- [8] D. Jeruzalmi, T.A. Steitz, Use of organic cosmotropic solutes to crystallize flexible proteins: application to T7 RNA Polymerase and its complex with the inhibitor T7 lysozyme, *J. Mol. Biol.* 274 (1997), 748-756.
- [9] A. Boussac, F. Rappaport, P. Carrier, J.-M. Verbavatz, R. Gobin, D. Kirilovsky, A.W. Rutherford, M. Sugiura, Biosynthetic $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchange in the photosystem II oxygen-evolving enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 22809-22819.
- [10] N. Oganessian, I. Ankoudinova, S.H. Kim, R. Kim, Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization, *Protein Expr. Purif.* 2 (2007), 280-285.
- [11] M. Picard, C. Toyoshima, P. Champeil, Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride, *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 3360-3369.
- [12] M. Picard, T. Dahmane, M. Garrigos, C. Gauron, F. Giusti, M. le Maire, J.-L. Popot, P. Champeil, Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study, *Biochemistry* 45 (2006), 1861-1869.
- [13] P. Champeil, T. Menguy, C. Tribet, J.-L. Popot, M. le Maire, Interaction of Amphipols with Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase, *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 18623-18637.

- [14] M. da Graça Miguel, O. Eidelman, M. Ollivon, A. Walter, Temperature dependence of the vesicle-micelle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside, *Biochemistry* 28 (1989), 8921-8928.
- [15] B. de Foresta, N. Legros, D. Plusquellec, M. le Maire, P. Champeil, Brominated detergents as tools to study protein-detergent interactions, *Eur. J. Biochem.* 241 (1996), 343-354.
- [16] L. de Meis, G. Inesi, Effects of organic solvents, methylamines, and urea on the affinity for Pi of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 157-161.
- [17] M.P. Sande-Lemos, L. de Meis, Rate of calcium release and ATP synthesis in sarcoplasmic reticulum vesicles, *Eur. J. Biochem.* 171 (1988), 273-278.
- [18] E.N. Chini, F.O. de Faria, C.M. Cardoso, L. de Meis, The enhancement of Ca^{2+} efflux from sarcoplasmic reticulum vesicles by urea, *Arch. Biochem. Bioph.* 299 (1992), 73-76.
- [19] N. Murata, P. S. Mohanty, H. Hayashi, G. C. Papageorgiou, Glycine betaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving complex, *FEBS Lett.* 296 (1992), 187-189.
- [20] T. Arakawa, S.N. Timasheff, The stabilization of proteins by osmolytes, *Biophys. J.* 47 (1985), 411-414.
- [21] S.N. Timasheff, The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes ?, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22 (1993), 67-97.
- [22] C. Montigny, M. Picard, G. Lenoir, C. Gauron, C. Toyoshima, P. Champeil, Inhibitors bound to Ca^{2+} -free sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase lock its transmembrane region but not necessarily its cytosolic region, revealing the flexibility of the loops connecting transmembrane and cytosolic domains, *Biochemistry* 46 (2007), 15162-15174.

Figure legends

Figure 1. Protection conferred by glycyl betaine against irreversible inactivation of detergent-

solubilized Ca^{2+} -free ATPase. SR membranes (1 mg/ml SR protein) were incubated in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM Tes-Tris, 1 mM Mg^{2+} at pH 7.5 and 20°C (buffer A) in the quasi-absence of free Ca^{2+} (0.1 mM total Ca^{2+} and 1 mM EGTA, $\text{Ca}^{2+}_{\text{free}} \sim 5$ nM), in the absence or presence of detergent and in the absence or presence of glycyl betaine. The detergent was either C_{12}E_8 or DDM, at a concentration (if present) of 5 mg/ml, except for Panel C for which 1.5 mg/ml was also used. The concentration of glycyl betaine (if present) was 1M, except for Panel D for which various concentrations were used, as indicated on the abscissa. After various incubations periods, aliquots were diluted 250-fold into a C_{12}E_8 -containing ATPase assay medium, and the residual ATPase activity of Serca1a was deduced from the Ca^{2+} -dependent fraction of the rate of NADH oxidation. *Panel A*, circles, incubation in the presence of 5 mg/ml C_{12}E_8 , in the absence (open symbols) or presence (closed symbols) of 1M betaine; controls were performed in the absence of detergent (squares). *Panel B*, triangles, incubation in the presence of 5 mg/ml DDM, in the absence (open symbols) or presence (closed symbols) of 1M betaine; squares correspond to the previously mentioned controls in the absence of detergent. *Panel C*, diamonds, incubation was performed in the presence of 1.5 mg/ml C_{12}E_8 , in the absence or presence of 1M betaine (open and closed symbols, respectively); separate incubations in the absence or presence of 5 mg/ml C_{12}E_8 and absence of betaine were also performed for control (open squares and circles, respectively). *Panel D*, closed symbols, incubation was performed in the presence of 5 mg/ml C_{12}E_8 and various concentrations of betaine; the residual ATPase activity was measured after either 5 minutes (circles) or 15 minutes (triangles). Controls incubated in the absence of detergent were also included (open symbols).

Figure 2. Protection conferred by glycyl betaine (compared with glycerol or lipids) against

irreversible inactivation of detergent-solubilized Ca^{2+} -saturated ATPase. SR membranes (1 mg/ml SR protein) were incubated in a medium containing 80 mM KCl, 40 mM Tes-Tris, 0.8 mM Mg^{2+} and 1 mM Ca^{2+} , in the absence (squares) or presence of 5 mg/ml detergent, either C_{12}E_8 (circles, *Panels A, B & D*) or DDM (triangles, *Panel C*), and in the absence (open symbols) or presence of either glycyl betaine at 1 M (closed symbols) or glycerol at 20 % v/v (grey symbols). Temperature was either 6°C (*Panels A, C, D*) or 20°C (*Panel B*), with pH set at 7.5 in both cases. *Panel D* reproduces some of the data points from *Panel A* and compares them with the results obtained (inverted triangles) in an experiment where the incubation medium contained dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) in addition to C_{12}E_8 (2 mg/ml and 5 mg/ml respectively), in the absence of betaine. After various periods, aliquots were diluted 250-fold into a C_{12}E_8 -containing ATPase assay medium for residual ATPase activity measurement, as for *Figure 1* experiments. *Panels A & D*, incubation with C_{12}E_8 at 6°C ; *Panel B*, incubation with C_{12}E_8 at 20°C; *Panel C*, incubation with DDM at 6°C ; for this Panel, $[\text{Ca}^{2+}]$ during incubation was only 0.8 mM.

Figure 1

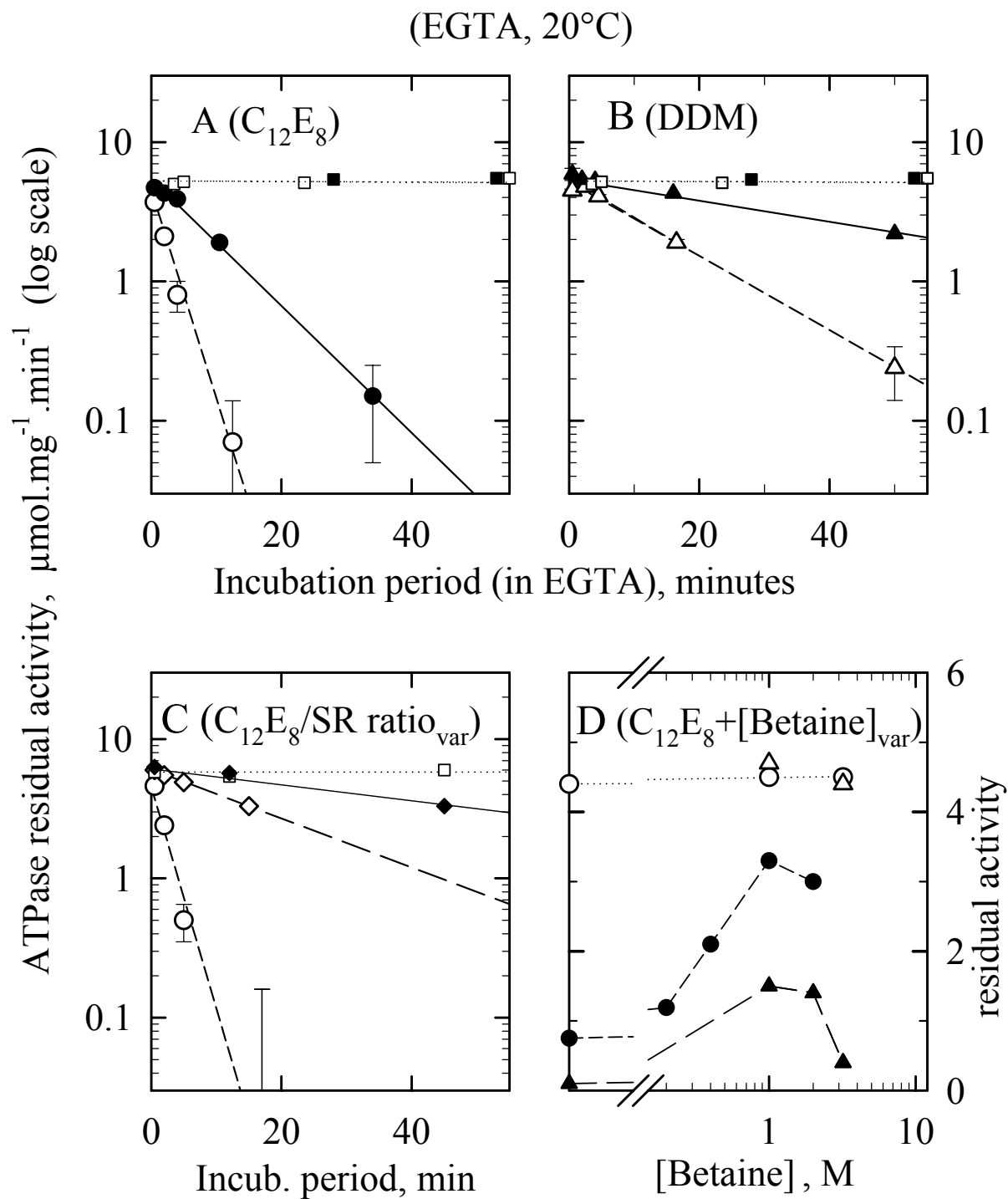
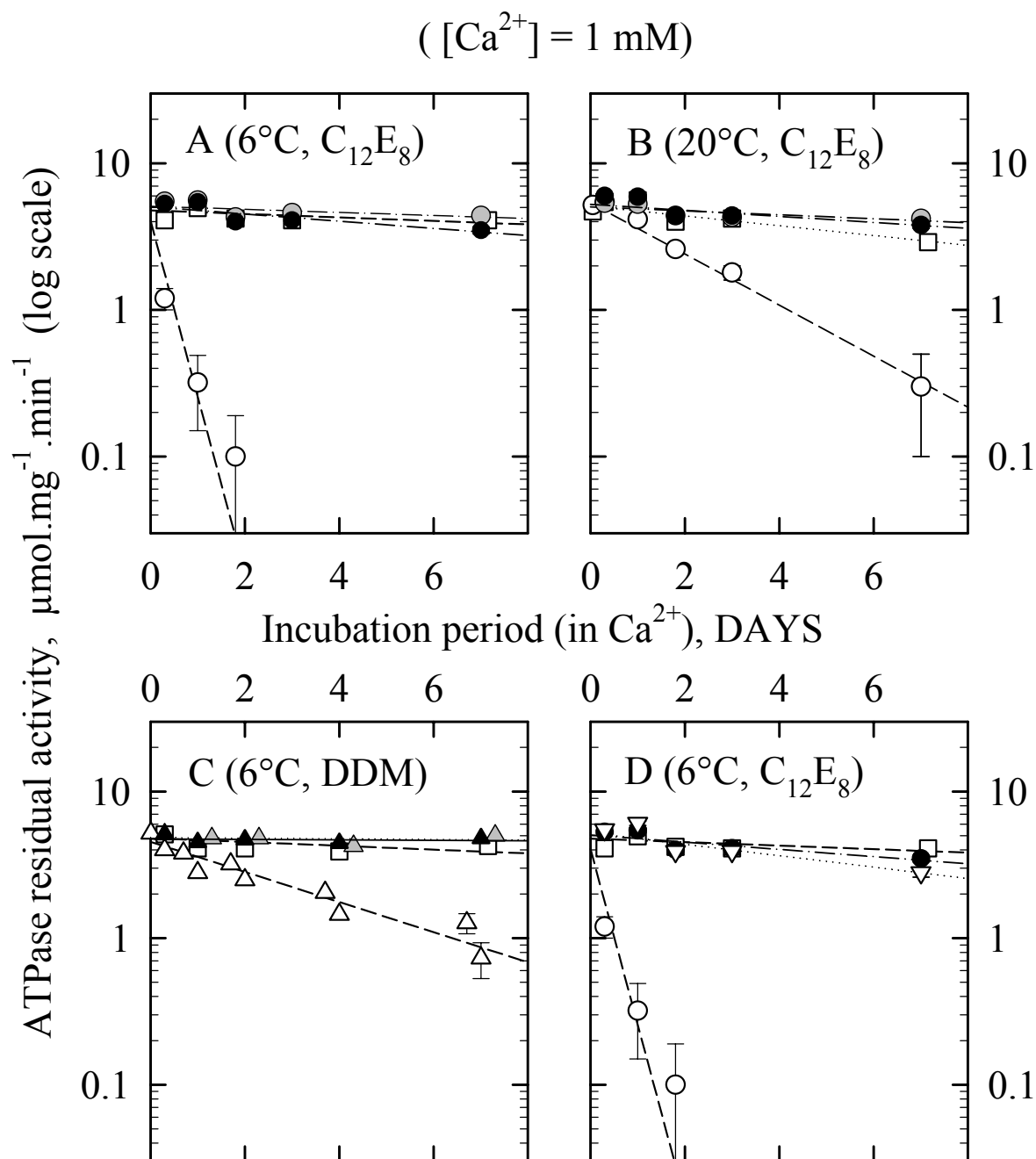


Figure 2



CHAPITRE V : ETUDE D'UNE FORME PARTICULIERE DE L'ATPASE- Ca^{2+} MARQUEE AU FITC : MISE EN EVIDENCE D'UN TRANSFERT INATTENDU DE PHOSPHATE DE L'ASPARTATE D351 VERS LA FLUORESCINE LIEE

Les chapitres précédents ont évoqué les efforts de stabilisation de l'ATPase solubilisée en vue de sa simple étude ou de sa cristallisation. L'ATPase- Ca^{2+} marquée au FITC avait également donné lieu à quelques espoirs (Stokes, Delavoie et al. 2005). En effet, une forme particulièrement stable de l'ATPase marquée, découverte près de 25 ans plus tôt (Pick 1981b), avait laissé espérer que l'on pourrait profiter de cette apparente stabilité pour cristalliser une nouvelle forme de l'enzyme. Je vais présenter ici un travail, réalisé en collaboration avec David McIntosh, qui a permis de caractériser plus précisément cette forme particulière et de révéler la raison inattendue de sa stabilité.

I. LA FLUORESCINE, LE FITC, ET LA FORME A BASSE FLUORESCENCE DE L'ATPASE MARQUEE AU FITC

La fluorescéine est une molécule fluorescente dont différents dérivés ont été largement utilisés pour le marquage fluorescent des protéines. L'un de ces dérivés est la fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC), qui permet un marquage au niveau notamment des chaînes latérales des lysines (figure V.01). C'est une molécule hydrosoluble qui, comme la fluorescéine, a un maximum d'absorption dans l'eau aux environs de 495 nm, une émission dans le vert aux alentours de 510-530 nm, un excellent rendement quantique, et aussi par ailleurs quelques inconvénients potentiels, dont une sensibilité importante à la lumière (photo-blanchiment) qui peut donner lieu à une perte d'émission au cours du temps, et une grande sensibilité au pH ($\text{pK}_a=6,4$), avec un signal de fluorescence plus intense aux pH alcalins (Molecular Probes – The Handbook, (Haugland 2005)).

Le FITC, avec sa fonction isothiocyanate très réactive, est utilisé dans de nombreux types d'applications, que ce soit le marquage de protéines ou de nucléotides ou le couplage à différentes sondes chimiques ou anticorps pour la détection par exemple en western-blots, ou encore comme donneur de photons dans les expériences de transfert d'énergie de type FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Dans les années 80, il a été montré que le FITC pouvait également être un inhibiteur de certaines ATPases de type P (Pick and Karlsh 1980; Jackson, Mendlein et al. 1983; Farley, Tran et al. 1984). Il est maintenant clair que cette inhibition est due à une fixation covalente du FITC à la chaîne latérale d'une lysine voisine du site nucléotidique et conservée dans les ATPases de type P (la lysine K515 de l'ATPase- Ca^{2+} , (Mitchinson, Wilderspin et al. 1982)), le FITC venant occuper le site de fixation du nucléotide.

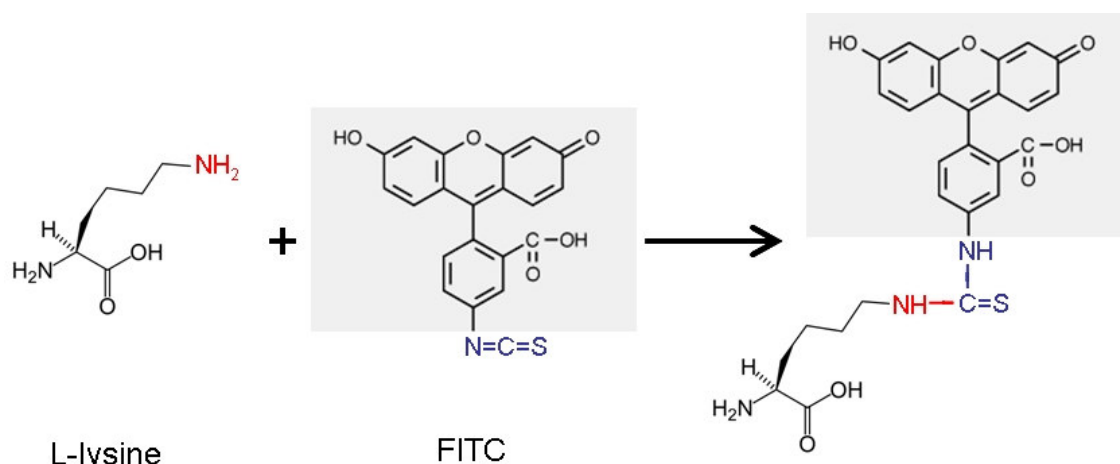


Figure V.01 : Formules développées pour la fixation covalente du FITC à la chaîne latérale d'une lysine. La lysine possède une fonction amine à l'extrémité de sa chaîne latérale (*en rouge*). Le FITC, grâce à sa fonction isothiocyanate (*en bleue*), va réagir spontanément avec cette amine pour former une liaison thiourée. Ce marquage covalent est irréversible dans nos conditions expérimentales.

Le FITC a beaucoup été utilisé comme sonde extrinsèque de la conformation de l'ATPase Ca^{2+} . En effet, le signal de fluorescence du FITC lié varie en fonction de la conformation adoptée par la protéine en présence des différents ligands ajoutés au milieu (Pick and Bassilian 1981a; Pick 1981b), et ces variations, bien que modestes (quelques pour cent), ont été fort utiles pour étudier les divers équilibres conformationnels de l'ATPase préalablement marquée au FITC. Dès les premières années, cependant, Uri Pick mit en évidence l'existence d'une forme de très faible fluorescence de l'ATPase- Ca^{2+} marquée au FITC (Pick 1981b) (que nous appellerons « Low fluorescence species » (Lfs) dans ce qui suit), apparaissant dans des conditions bien spécifiques. Le *panneau A* de la *figure V.02* montre une expérience dans laquelle nous avons reproduit ces conditions classiques de formation du Lfs.

Si l'on réalise une accumulation de calcium dans des vésicules de réticulum sarcoplasmique en utilisant l'acétylphosphate (AcP) comme source d'énergie (bien que l'ATPase- Ca^{2+} marquée au FITC soit devenue incapable d'hydrolyser l'ATP, elle reste capable d'hydrolyser l'acétylphosphate), et que l'on chélate ensuite avec de l'EGTA ou de l'EDTA le calcium se trouvant à l'extérieur des vésicules, on observe en effet une diminution très forte de l'intensité de fluorescence (*figure V.02, panneau A*), bien supérieure aux quelques pour cent de variation habituellement observés lors de l'ajout de divers ligands sur la protéine. L'apparition de cette forme Lfs nécessite absolument la présence d'une concentration millimolaire de calcium côté luminal, telle que celle obtenue après l'accumulation de Ca^{2+} dans les vésicules permise par l'AcP. Dans la forme à basse fluorescence obtenue alors après addition d'EGTA ou d'EDTA, les sites de transport du Ca^{2+} sont vides, mais ils ont conservé leur forte affinité apparente pour le calcium si on rajoute celui-ci depuis le cytosol. Des études plus récentes ont montré que cette forme particulière de l'ATPase, à basse fluorescence, avait également une *absorbance* plus basse pour sa fluorescéine liée (cf *figure V.03B* ci-dessous), qu'elle retenait le phosphate radioactif éventuellement présent sur l'AcP (ou sur le phosphate inorganique (Pi) à partir duquel on peut également former, en présence d'un gradient de Ca^{2+} , cette forme à basse fluorescence), et que cette phosphorylation était étonnamment stable dans le temps (Champeil, Henao et al. 2001).

Ces observations avaient laissé espérer qu'il serait possible, en utilisant (et cristallisant) cette forme à basse fluorescence de l'ATPase marquée, de découvrir une nouvelle conformation de l'ATPase, différente de celles obtenues jusque là. Pourtant, une étude structurale par protéolyse ménagée et par microscopie électronique après cristallogénèse à deux dimensions en présence de décavanadate et thapsigargine devait se révéler décevante, montrant que la forme « Lfs » ainsi cristallisée avait une conformation qui n'était guère différente de celle observée pour l'enzyme marquée non phosphorylée (Stokes, Delavoie et al. 2005).

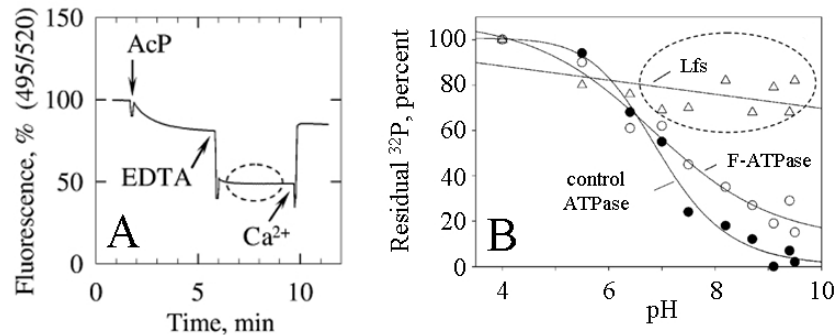


Figure V.02 : Conditions typiques de formation de l'espèce de basse fluorescence « Lfs », et stabilité de différentes formes phosphorylées de l'ATPase en fonction du pH. (A) *Formation du « Lfs »* : L'ATPase- Ca^{2+} marquée au FITC est suspendue dans un tampon 50 mM Tes-Tris, 0,3 M saccharose, 100 mM NaCl, 0,1 mM CaCl_2 et 5 mM MgCl_2 , à pH 7,5 et 20°C. La fluorescence de la fluorescéine liée est enregistrée avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 495 nm et 520 nm, respectivement. L'accumulation de calcium est démarrée par une addition de 10 mM d'acétylphosphate (AcP), qui donne lieu à une première diminution progressive de l'intensité de fluorescence. L'addition suivante de 7 mM d'EDTA, qui chélate le Ca^{2+} (et accessoirement le Mg^{2+} , mais une addition d'EGTA suffirait), entraîne une diminution brutale et de grande amplitude de la fluorescence, révélant la formation de la forme dite « Lfs » (niveau de fluorescence entouré en pointillé). Une dernière addition de 3 mM de calcium permet le retour au niveau de fluorescence précédant la chélation du Ca^{2+} . (B) *Stabilité des ATPases phosphorylées en fonction du pH* : Dans les mêmes conditions ioniques, une accumulation de calcium est cette fois réalisée en présence de ^{32}P -acétylphosphate (1 mM seulement ici, présent pendant deux minutes), d'une part pour l'ATPase- Ca^{2+} contrôle, non-marquée (ronds noirs, control ATPase), d'autre part pour une ATPase contrôle marquée au FITC (ronds blancs, F-ATPase, i.e. un deuxième contrôle, mais cette fois avec marquage), et enfin pour cette même ATPase marquée au FITC et à laquelle après deux minutes on a ajouté un chélateur du Ca^{2+} pour former le Lfs, comme dans le panneau A (triangles blancs, Lfs). Les protéines des 3 échantillons sont alors dénaturées par l'urée 8 M, et le pH de différents aliquots est alors ajusté aux valeurs indiquées en abscisse. Après 1 heure d'incubation à 37°C, les protéines sont précipitées à l'acide, récupérées par filtration et le ^{32}P resté lié à la protéine est mesuré à l'aide d'un compteur à scintillation. Les quantités de radioactivité résiduelle sont exprimées en pourcentage des valeurs obtenues à pH 4.

II. LE MYSTERE DE LA FORME A BASSE FLUORESCENCE (« LFS ») **ELUCIDE 25 ANS APRES SA MISE EN EVIDENCE**

On a mentionné plus haut qu'au-delà de sa très faible fluorescence, une autre caractéristique de la forme « Lfs » était l'impressionnante stabilité de sa phosphorylation, lorsque l'enzyme était conservée en absence de calcium (Champeil, Henao et al. 2001). Pour tenter d'obtenir des informations sur la nature chimique de cette phosphorylation, D. McIntosh a mesuré, après dénaturation de l'enzyme à l'urée, la dépendance en pH de cette stabilité. Le panneau B de la figure V.02.B montre le résultat de cette expérience. Lorsque l'ATPase non marquée (« control ATPase ») ou même l'ATPase marquée au FITC (« control » F-ATPase, qui n'a pas ici été traitée de manière à former du « Lfs ») sont phosphorylées par le ^{32}P -acétylphosphate puis dénaturées par l'urée 8M, la phosphorylation de ces enzymes est instable à pH alcalin, ce qui est en accord avec le fait que c'est une liaison acyl-phosphate qui est formée au cours du cycle catalytique (Hokin, Sastry et al. 1965), sur l'aspartate D351. En revanche, de façon très inattendue, la forme « Lfs » est particulièrement stable à tous les pH, ce qui suggère que le groupe phosphorylé de cet enzyme n'est pas un acylphosphate.

L'utilisation conjointe de techniques de protéolyse ménagée et de séparation des fragments par électrophorèse a alors permis de montrer qu'après formation de la forme Lfs (et seulement dans ce cas-là), le phosphate radioactif ne restait pas lié, comme on pouvait l'attendre initialement, au fragment de protéolyse contenant le résidu catalytique aspartate D351, mais que ce phosphate radioactif migrerait avec le deuxième fragment, celui qui porte le FITC (figures 2 et 3, (McIntosh, Montigny et al. 2008)).

En digérant l'enzyme « Lfs » par la trypsine de façon beaucoup plus extensive, nous avons alors également constaté que le niveau de fluorescence du FITC restait faible, malgré la production de petits peptides. Ceci rendait fort improbable que ce bas niveau de fluorescence soit lié à une conformation particulière de la chaîne polypeptidique autour du fluorophore, et suggérait plutôt une modification covalente de la fluorescéine par le phosphate. Nous avons ensuite montré que l'action d'une *phosphatase alcaline* sur ces fragments peptidiques issus de la forme « Lfs » permettait de récupérer toute l'intensité de fluorescence du FITC lié de l'enzyme contrôle « F-ATPase », alors que la phosphatase restait sans effet sur le Lfs non-digéré par la trypsine (figure V.03, panneau A), « Trypsinized Lfs » vs « Untreated Lfs ») ou sur l'ATPase marquée au FITC mais ayant gardé sa fluorescence normale, trypsinisée ou non. Notons que des évolutions semblables sont observées lorsque l'on s'intéresse au spectre d'absorption du FITC fixé, qui, comme on l'a déjà dit, est lui aussi modifié dans la forme Lfs (figure V.03, panneaux B-E).

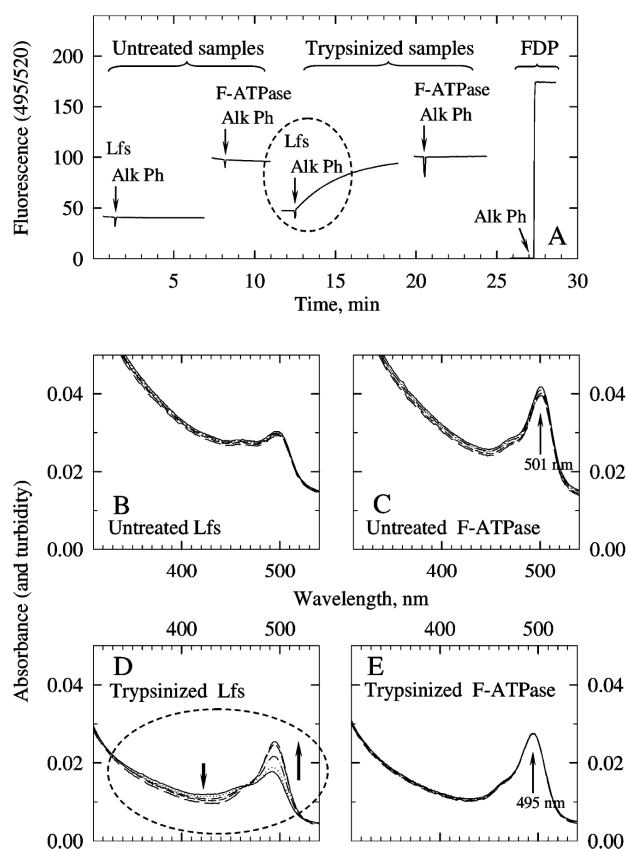


Figure V.03 : L'action d'une phosphatase alcaline sur l'espèce de basse fluorescence « Lfs » permet de retrouver le niveau de fluorescence ou d'absorption normal du FITC, si et seulement si la protéine est préalablement digérée de façon extensive par la trypsine. L'enzyme marquée au FITC est phosphorylée par l'AcP comme précédemment décrit (*F-ATPase*). Une fraction de cette enzyme est utilisée pour former l'espèce de basse fluorescence (*Lfs*). Des parties aliquotes de ces deux échantillons sont alors mises en présence de 12,5 % de trypsine (w/w, « *Trypsinized Lfs* » et « *Trypsinized F-ATPase* »), portées à pH 8 et incubées à 37°C pendant 4 heures. Deux échantillons témoins, i.e. sans trypsine, sont incubés dans les mêmes conditions (« *Untreated Lfs* » et « *Untreated F-ATPase* »). Après 4 heures d'incubation, on dilue les échantillons à 40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et on mesure les niveaux de fluorescence (panneau A) ou l'ensemble du spectre d'absorption (panneaux B-E) avant et après addition de 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de phosphatase alcaline (*Alk Ph*) : mesures de fluorescence en continu dans le panneau A, mesures d'absorption après 0, 0,5, 2, 5 et 10 minutes sur les panneaux B-E.

A droite du panneau A, contrôle positif : effet de l'alkaline phosphatase sur la fluorescéine diphosphate (FDP). La FDP est un dérivé commercial du FITC, phosphorylé au niveau des deux positions 3-O et 6-O du cycle xanthenone : cette espèce doublement phosphorylée a une fluorescence complètement éteinte, que réveille l'action de la phosphatase.

Nous avons conclu de tout cela que dans le Lfs, la phosphorylation se faisait non pas sur l'aspartate 351, sous la forme d'une liaison acylphosphate, instable à pH alcalin, mais directement sur la fluorescéine, sous la forme d'un ester de phosphate, sensible à la phosphorylase pourvu que la phosphorylase puisse avoir accès au groupe fluorescéine-phosphate (grâce à une trypsinolyse extensive), et stable à pH alcalin comme montré sur la [figure V.02](#).

On remarquera incidemment que le changement d'environnement du FITC entre FITC libre et FITC lié s'accompagne d'un décalage de son maximum *d'absorption* de 501 nm vers 495 nm, la longueur d'onde d'absorption de la fluorescéine libre. La fluorescéine, placée au sein du site de fixation du nucléotide est sans doute influencée par son environnement : il y a par exemple probablement interaction entre le cycle xanthenone de la fluorescéine et le cycle de la phénylalanine F487, F487 connue pour interagir avec la partie adénine du nucléotide, et donc probablement perturbation du nuage électronique du fluorophore.

Notons à ce stade qu'il existe depuis longtemps des sondes dérivées de la fluorescéine permettant de détecter et de suivre l'activité des phosphatases ([Rotman, Zderic et al. 1963](#)). Ces sondes (« FDP », par exemple, dans la [Figure V.03A](#)) portent deux phosphates au niveau des groupements 3-O et 6-O du cycle xanthenone et sont très peu fluorescentes sous cette forme. En revanche, l'action d'une phosphatase entraîne une augmentation importante de leur intensité de fluorescence ([Huang, Olson et al. 1992; Huang, Wang et al. 1999; Wang, Scheigetz et al. 1999](#)). Le comportement de notre forme « Lfs » rappelle le comportement de ces sondes et laisse penser que la fluorescéine fixée à l'ATPase a sans doute été phosphorylée d'une façon analogue, le phosphate ayant été transféré depuis l'aspartate catalytique vers l'une des positions 3-O et 6-O du FITC pour donner une fluorescéine monophosphate (FMP), connue pour avoir une absorption (et donc une fluorescence) intermédiaire en solution ([Huang, Wang et al. 1999](#)) (voir schéma en haut de la [figure V.04](#)).

Cette phosphorylation inattendue du FITC lié à la lysine515 implique que la réorganisation des domaines cytosoliques de l'ATPase à l'une des étapes du transport des ions calcium puisse conduire à une grande proximité entre le groupe phosphorylable du fluorophore lié et le résidu aspartate qui est normalement phosphorylé pendant le cycle catalytique, proximité dont les détails vont être discutés maintenant.

III. IMPLICATIONS DE CES RESULTATS POUR L'INTERPRETATION DU CYCLE CATALYTIQUE

La formation du Lfs est induite par la chélation du calcium après phosphorylation de l'aspartate D351 à partir d'AcP ou de Pi indifféremment, mais obligatoirement en présence de Ca^{2+} luminal. Cela suggère que la phosphorylation de la fluorescéine ne peut avoir lieu que si l'enzyme peut passer par une forme qui serait homologue à celle de l'intermédiaire « $\text{Ca}_2\text{.E2P}$ » (notée ici « $\text{Ca}_2\text{.E2P.F}$ », le F se référant à la fluorescéine), où l'ATPase phosphorylée n'a pas encore relargué ses ions calcium (voir [figure V.04 & 05](#)).

Lors de la réalisation de ce travail, nous avions à notre disposition la structure à résolution atomique de l'ATPase obtenue en présence des ions calcium occlus par AlF_4+ADP , considérée comme un analogue de l'état « $\text{Ca}_2\text{.E1~P}$ » ([Sorensen, Møller et al. 2004; Toyoshima and Mizutani 2004](#)). Sachant que la fluorescéine vient se loger dans le site de fixation du nucléotide, David McIntosh a cherché quelle serait la position la plus probable de la fluorescéine dans cette conformation (voir [figure V.04](#)) : en tenant compte de la liaison à la lysine K515 et en prenant soin d'aligner la fluorescéine sur la partie adénine de l'ADP, le positionnement du FITC devient assez évident, l'encombrement stérique limitant le nombre de possibilité. En présence d'AcP, le site catalytique est totalement occupé et la fluorescéine ne peut alors se positionner que comme dessiné sur le *panneau A* de la [figure V.04](#). En revanche, une fois l'AcP hydrolysé, le phosphate transféré à l'aspartate D351 et l'acétate éliminé, la fluorescéine peut exercer un

mouvement de pendule et venir effectivement aligner la fonction 3-O de son cycle xanthenone avec l'aspartate phosphorylé (*panneau B*). La distance entre les deux groupes est alors compatible avec un transfert du phosphate vers la fluorescéine. Toutefois, le passage d'une configuration à l'autre nécessite une réorganisation des domaines cytosoliques suffisamment importante pour permettre l'élimination de l'acétate et le mouvement de balance du FITC (comme cela est sans doute le cas dans le cycle catalytique « normal » de l'enzyme non-modifiée, phosphorylée par l'ATP, qui doit libérer l'ADP ; voir [Chap.I, §II.2](#)).

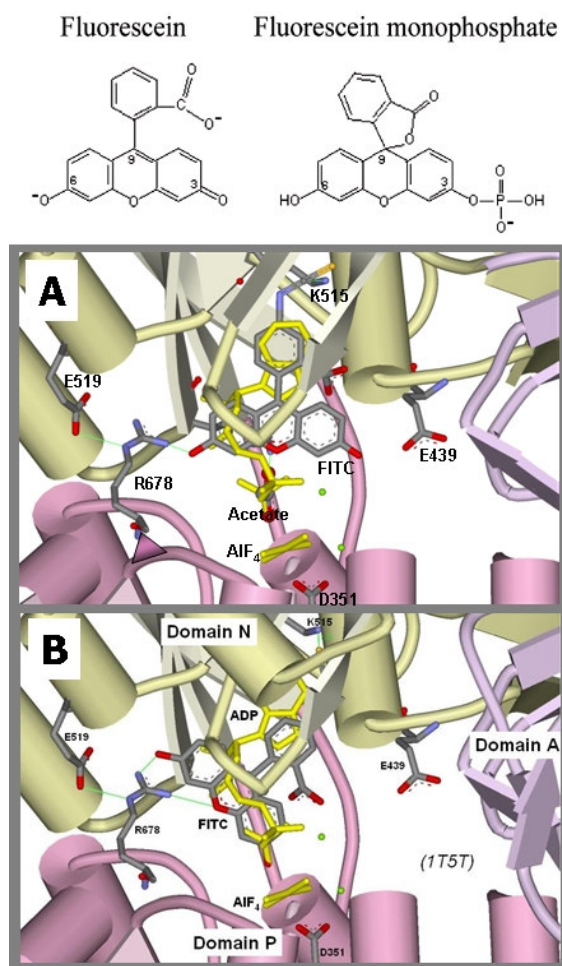


Figure V.04 : Modèle pour la phosphorylation de la fluorescéine après docking (manuel) du FITC dans le site catalytique de l'ATPase- Ca^{2+} dans une conformation dite « E1~P ». Insert : rappel des formules développées de la fluorescéine et de la fluorescéine monophosphate (qui porte le phosphate au niveau de la position 3 du cycle xanthenone). Panneaux A & B : le FITC a été introduit manuellement dans la structure de l'intermédiaire « $\text{Ca}_2.\text{E1}.\text{AIF}_4.\text{ADP}$ », PDB #1T5T, analogue de « $\text{Ca}_2.\text{E1}~\text{P}$ » (Sorensen, Møller et al. 2004), en prenant soin de maintenir la liaison à la lysine K515 via le groupement isothiocyanate. Le domaine N est coloré en blanc jaunâtre, le domaine P en rose et le domaine A en mauve. L'ADP et l'aluminium fluorure sont colorés en jaune. En présence d'AcP (panneau A : acetate, le phosphate étant mimé par l' AIF_4), l'aspartate D351 est phosphorylé normalement. Après le départ de l'acétyl (panneau B), la fluorescéine acquies un peu de liberté et peut positionner la fonction 3-O de son cycle xanthenone au voisinage de l'aspartate. La position de la fluorescéine est peut-être maintenue via quelques liaisons hydrogènes (en vert) imaginables avec les chaînes latérales des résidus R678 et E519. Le transfert du phosphate est alors possible. L'élimination de l'acétate nécessite pour ce transfert requiert probablement, entre les structures illustrées par les panneaux A et B, une réorganisation transitoire de l'interface des domaines cytosoliques.

A ce stade, nous avons tenté de proposer un cycle catalytique, pour l'enzyme marqué au FITC, rendant compte de la possible formation du Lfs (voir [figure V.05](#)) et de la nécessité pour cela que les sites luminaux pour le Ca^{2+} soient occupés. La construction de ce cycle part de l'hypothèse, justifiée par nos mesures de dérivé phosphorylé (Stokes, Delavoie et al. 2005), que l'une des étapes limitantes du cycle d'hydrolyse de l'AcP par l'ATPase marquée au FITC, comme pour l'ATPase non marquée, est l'étape de transconformation permettant le passage de la forme « $\text{Ca}_2.\text{E1}~\text{P.F}$ » à la forme « $\text{Ca}_2.\text{E2P.F}$ », durant laquelle les sites de transport sont supposés se réorienter côté luminal, le domaine A est supposé pivoter de façon très importante, et l'interface domaine P/domaine N est probablement modifiée également. On sait par ailleurs que dans les conditions où il n'y a pas formation d'un gradient important de concentration de calcium pendant le cycle catalytique (en présence d'ionophore, de détergent, ou encore oxalate), la forme Lfs ne peut pas se former (Champeil, Henao et al. 2001).

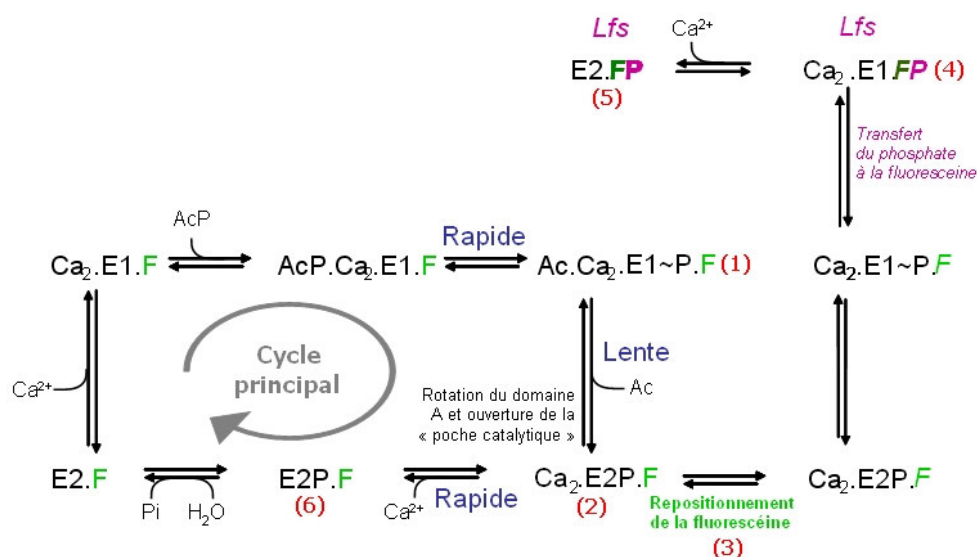


Figure V.05 : Cycle catalytique proposé pour rendre compte de la possible phosphorylation de la fluorescéine. Le code couleur suivant est employé : en bleu les vitesses relatives de quelques transitions, en vert clair la fluorescéine non-phosphorylée avec une forte intensité de fluorescence, en vert foncé la fluorescéine avec un faible niveau de fluorescence, en rose le phosphate fixé à la fluorescéine, F=fluorescéine repositionnée.

En présence de FITC (comme d'ailleurs en son absence), la fixation d'acétylphosphate est suivie par la phosphorylation de l'aspartate D351, i.e. la formation de l'intermédiaire « Ac.Ca₂.E1~P.F » (1), qui s'accumule de façon significative à l'état stationnaire, même en présence d'ionophore (Stokes, Delavoie et al. 2005) (la transition vers Ca₂.E2P.F (2) est significativement limitante par hypothèse). L'impossibilité pour le Lfs de se former en présence d'AcP et d'ionophore (comme en présence de Pi mais en absence de gradient de Ca²⁺) impose que la phosphorylation de la fluorescéine ne puisse se faire qu'*après passage* par une forme différente de Ca₂.E1~P.F, permettant le repositionnement de la fluorescéine. Ce repositionnement de la fluorescéine requiert sans doute une libération des interactions entre domaines cytosoliques ; la Figure V.05 suggère que cela se produit à la transition entre Ca₂.E1~P.F et Ca₂.E2P.F, et non pas seulement à la dissociation de l'acetyl de la forme Ac.Ca₂.E1~P.F. La fluorescéine dans la forme Ca₂.E2P.F reste encore à forte fluorescence. En présence de fortes concentrations de calcium côté luminal, les ions calcium relargués sont immédiatement remplacés par de nouveaux ions calcium, qui stabilisent cette forme Ca₂.E2P.F (2). Puisque l'acétate a été éliminé de cette forme et que les domaines cytosoliques ont bougé les uns par rapport aux autres, la fluorescéine a désormais tout loisir de se repositionner à l'intérieur de la poche qu'elle occupe (3), de telle sorte qu'*après* retour (pas instantané) à une conformation de type Ca₂.E1~P.F le transfert du phosphate soit désormais possible (4). L'addition éventuelle d'EGTA à cette étape chélate les ions calcium depuis le côté cytosolique et stabilise alors définitivement la forme Lfs, notée ici « E2-FP » (5). Mais en absence de calcium du côté luminal (par exemple en présence d'ionophore ou de détergent), la formation du Lfs est impossible parce que le relarguage des ions calcium est trop rapide et qu'il entraîne l'enzyme Ca₂.E2P.F presque immédiatement vers l'état « E2-P » (de (2) vers (6)), sans laisser à la fluorescéine le temps de revenir vers un état E1~P.F rendant possible sa phosphorylation (cette phosphorylation de la fluorescéine à partir du seul état E2P.F étant clairement impossible).

**MANUSCRIPT #5 : UNEXPECTED PHOSPHORYL TRANSFER
FROM ASP TO FLUORESCCEIN ATTACHED TO LYS515 IN
SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} -ATPASE.**

McIntosh D.B., Montigny C and Champeil P

Biochemistry 2008, 47 : 6386-6393.

Unexpected Phosphoryl Transfer from Asp³⁵¹ to Fluorescein Attached to Lys515 in Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase[†]

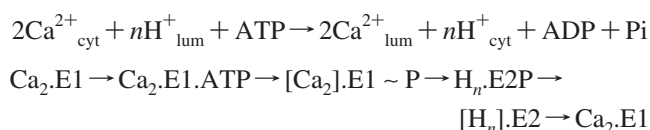
David B. McIntosh,^{*,‡} Cédric Montigny,[§] and Philippe Champeil[§]

Institute of Infectious Diseases and Molecular Medicine, Division of Chemical Pathology, and National Health Laboratory Services, University of Cape Town, South Africa, CNRS, URA 2096 (Protéines Membranaires Transductrices d'Énergie), F-91191 Gif-sur-Yvette, France, and CEA, iBiTec-S (Institut de Biologie et Technologies de Saclay), F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Received February 19, 2008; Revised Manuscript Received April 15, 2008

ABSTRACT: Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase is an ion pump whose catalytic cycle includes the transient formation of an acyl phosphate at Asp³⁵¹, and fluorescein isothiocyanate is a covalent inhibitor of ATP binding to this pump, known to specifically derivatize Lys⁵¹⁵ in the nucleotide-binding site. It was previously found that an unusually stable, phosphorylated form of fluorescein-ATPase, with low fluorescence, is obtained following Ca²⁺ loading with acetyl phosphate as energy source and then chelation with EGTA of Ca²⁺ on the cytosolic side. Here we show that the phospho-linkage in this low fluorescent species is stable at alkaline pH, unlike the acyl phosphate at Asp³⁵¹. Moreover, the low fluorescence and stable phosphoryl group track together in primary and secondary tryptic subfragments, separated by SDS–PAGE after denaturation. Finally, normal fluorescence and absorbance are recovered upon treatment with alkaline phosphatase after extensive trypsinolysis. We conclude that the low fluorescent species is the result of the phosphoryl group being transferred from Asp³⁵¹ to the fluorescein moiety during pump reversal, yielding fluorescein monophosphate tethered to Ca²⁺-ATPase.

Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (SR)¹ is an ATP-dependent Ca²⁺/H⁺ pump belonging to the family of P-type ATPases, so named because an acyl phosphate, formed through transient phosphorylation of an aspartyl group (Asp³⁵¹ in the case of SR Ca²⁺-ATPase), is an essential part of the catalytic cycle. The cycle (resulting in Ca²⁺/H⁺ counter-transport) comprises several intermediates, which are often separated into E1 and E2 forms and include intermediates with occluded ions (represented below with square brackets):



The transitions between some of these intermediates have often been studied using fluorescein as an extrinsic reporter group. Fluorescein isothiocyanate (FITC) specifically derivatizes SR Ca²⁺-ATPase at Lys⁵¹⁵ in the nucleotide-binding

site, and the fluorescence level of bound fluorescein is sensitive to its specific environment in various conformational states. Fluorescein-ATPase, although unable to use MgATP as a substrate, remains capable of Ca²⁺ pumping with smaller substrates like acetyl phosphate or *p*-nitrophenyl phosphate (1–3).

Many years ago it was reported that loading FITC-labeled SR vesicles with Ca²⁺ using acetyl phosphate as energy source and then adding EGTA (or adding EGTA and inorganic phosphate to FITC-labeled SR vesicles previously passively loaded with Ca²⁺) converts fluorescein-ATPase into an extremely low fluorescence species (here dubbed “Lfs”) (4). We subsequently found that this species also has low absorbance, that it is a phosphorylated species, but that the phospho-species formed has unusual properties: it is stable for several weeks in the absence of free Ca²⁺ (even after dissipation of the Ca²⁺ gradient required for its formation), and yet it is rapidly hydrolyzed upon readdition of Ca²⁺, through Ca²⁺ binding to high-affinity sites on the cytoplasmic side of the vesicles (i.e., the ATPase can apparently re-enter the catalytic cycle in the forward direction) (5). This phospho-species first seemed related to the [Ca₂]E1 ~ P catalytic intermediate, yet without the 2 occluded Ca²⁺ ions at the transport sites. However, this view was subsequently not confirmed by cross-linking experiments with glutaraldehyde within the cytosolic domain, nor by an 8 Å resolution structure of Lfs obtained by electron microscopy (which showed that, in the presence of decavanadate and thapsigargin (TG), Lfs was similar to the classical TG.E2.decavanadate structure); proteolytic digestion patterns with proteinase K and trypsin also failed to reveal any specific property of Lfs,

[†] The work was supported by National Research Foundation of South Africa, University of Cape Town, and National Health Laboratory Service of South Africa (D.B.M.) and by CNRS and CEA (C.M. and P.C.).

* Corresponding author: Division of Chemical Pathology, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, Observatory 7925, Cape Town, South Africa. E-mail: David.McIntosh@uct.ac.za. Fax: +27-21-4488150. Tel: +27-21-4066187.

[‡] University of Cape Town.

[§] CNRS and CEA.

¹ Abbreviations: FITC, fluorescein 5'-isothiocyanate; Lfs, low fluorescent species formed after Ca²⁺-loading of FITC-labeled sarcoplasmic reticulum vesicles with acetyl phosphate followed by addition of EGTA; SR, sarcoplasmic reticulum; TG, thapsigargin.

compared with control unphosphorylated fluorescein-ATPase (6). Questioning the previous idea that Lfs was a fluorescein-ATPase form phosphorylated at the catalytic Asp³⁵¹ but endowed with an unusual conformation, we then considered the possibility that Lfs could result, instead, from chemical modification of the fluorescein itself. Nevertheless, our initial experiments did not succeed in confirming this possibility (6).

Here we examine additional properties of Lfs (pH stability, fluorescence level and ³²P content of tryptic peptides, as well as sensitivity of the fluorescence intensity to alkaline phosphatase), and show that they are fully consistent with transfer of the phosphoryl group from Asp³⁵¹ to the fluorescein moiety, by reversal of the catalytic cycle. Such transfer results in formation of a tethered phosphofluorescein which, conversely, can be used as substrate for a single enzyme turnover in the forward direction after readdition of Ca^{2+} . Phosphorylation of fluorescein on the 3-O or 6-O of the xanthenone ring is indeed known to be possible and to produce a low absorbance and resultant low fluorescence compound, relatives of which are commonly used as fluorogenic substrates for assaying protein phosphatases (7–9).

EXPERIMENTAL METHODS

[³²P]Acetyl phosphate was synthesized by the method of Bodley and Jencks (10). SR was isolated from rabbit skeletal muscle by the method of Champeil et al. (11). SR derivatization with FITC (Sigma # F-7250, prepared as a 10 mM solution in dimethyl formamide or dimethyl sulfoxide) was performed at room temperature for 20 min at pH 8.0 (as in ref (12)), in 50 mM EPPS/TMAH, 0.3 M sucrose, 0.1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , with 4 mg of SR protein/mL and a quasi-stoichiometric amount of FITC (25 μM FITC). The pH was then adjusted to pH 7.5 with maleic acid and the preparation placed on ice.

Lfs formation from [³²P]acetyl phosphate was performed at room temperature by loading FITC-labeled SR vesicles (0.4 mg of protein/mL) with Ca^{2+} for 2 min in the presence of 50 mM MOPS/TMAH, pH 7.5, 0.3 M sucrose, 100 mM NaCl, 0.1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , and 1 mM [³²P]acetyl phosphate (a relatively low concentration for Lfs formation, nevertheless chosen to reduce the total amount of radioactivity handled), and then adding EGTA (5 mM); in some cases, Lfs stability was enhanced by adding EDTA (25 mM) as well.

The pH-dependence of the stability of the phospho-species was investigated by first preparing ³²P-labeled Ca^{2+} -ATPase in the Lfs medium (adding [³²P]acetyl phosphate, EGTA and EDTA as described above), then denaturing the protein by vortexing aliquots (0.25 mL, i.e. 0.1 mg of protein) with solid urea (150 mg per aliquot, resulting in 7–8 M urea) to which small amounts of concentrated acetic acid, maleic acid, or Tris had been added to adjust pH (to 4, 5–7 or 8–9.5, respectively). After 1 h incubation at 37 °C, samples were quenched with 5 mL of ice-cold 4% (w/v) trichloroacetic acid and 20 mM phosphoric acid, filtered on Whatman GF/F filters, washed thoroughly with the acid mix, and the radioactivity remaining on the filters was measured.

Limited trypsinolysis of ³²P-labeled Lfs was carried out by adding trypsin at room temperature in the same medium (0.4 mg of SR protein/mL, trypsin to SR protein ratio = 2%

or 4% w/w). The reaction was stopped by vortexing aliquots (75 μL) with solid urea (48 mg) plus solubilization solution (8 μL of 12% sodium dodecyl sulfate, 9 M β -mercaptoethanol, and a trace amount of Bromophenol Blue). The samples were analyzed by SDS–PAGE, according to the method of Laemmli (13) (3 h at pH 8.6, performed in a cold room at 4 °C, and yet gel plates warm to touch at the end of electrophoresis, perhaps 30–40 °C) with either 7.5% acrylamide or a gradient of 7–18%. CaCl_2 (1 mM) was added to the running and stacking gels, to favor separation of A and B fragments (14).

For Lfs formation from nonradioactive acetyl phosphate before the alkaline phosphatase experiments, the conditions were similar but 10 mM acetyl phosphate was used, instead of only 1 mM, because of the poor apparent affinity of this substrate (5); the medium also contained 50 mM TES-Tris (at pH 7.5), 0.3 M sucrose, 0.1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, and again 0.4 mg of FITC-labeled SR protein/mL. After 5 min loading, 2 mM EGTA was added, followed by 4 $\mu\text{g/mL}$ TG (an inhibitor of Ca^{2+} binding to Ca^{2+} -ATPase) to stabilize Lfs. Control fluorescein-ATPase was prepared similarly, but with a different order of addition of the various ligands: EGTA, then TG, and only then acetyl phosphate. Extensive trypsin digestion of either Lfs or the control fluorescein-ATPase was then carried out, by adding trypsin and Tris-base from concentrated solutions and raising the temperature: thus, trypsinolysis occurred at 37 °C and pH 8, with 12.5% trypsin (w/w) (about 0.4 mg/mL FITC-labeled SR protein/mL and 0.05 mg/mL trypsin). Other aliquots were incubated simultaneously but without trypsin (“untreated samples”). After 3–4 h of incubation, samples were diluted 10-fold into 100 mM NaCl, 0.3 M sucrose, 5 mM Mg^{2+} , 100 mM Tris-Cl, pH 8 at 37 °C, the fluorescence level and absorbance spectrum measured, and their changes upon addition of alkaline phosphatase (final concentration 1 $\mu\text{g/mL}$, 7.5 units/mL) recorded.

RESULTS

Some of the characteristics of Lfs have been detailed previously, its main features being an unusually low fluorescence and a different absorption spectrum with lower absorbance at 495 nm and higher absorbance at 430 nm (typical experiments are recalled in Figure 1A and B), as well as an unusually high stability when kept at a very low concentration of free Ca^{2+} (5). In Figure 1C, we now report an additional characteristic, i.e. the pH stability of the phospho-species at 37 °C following denaturation of the protein in 7–8 M urea. The control experiment with unmodified ATPase phosphorylated at Asp³⁵¹ (closed circles) reveals the expected lability at alkaline pH of the acyl phosphate bond (15). In contrast, in Lfs (triangles), the phospho-species is stable at alkaline pH, suggesting a phosphate ester. This type of bond, known to be formed, for instance, upon kinase-dependent phosphorylation of serine, threonine, or tyrosine, in our case would also be consistent with phosphorylation on the 3-O or 6-O group of the xanthenone ring of the fluorescein attached to Lys⁵¹⁵. Note that a second control experiment was performed with FITC-labeled SR vesicles incubated with [³²P]acetyl phosphate but to which EGTA had not been added (open circles in Figure 1). In this case the pH-dependence of stability was

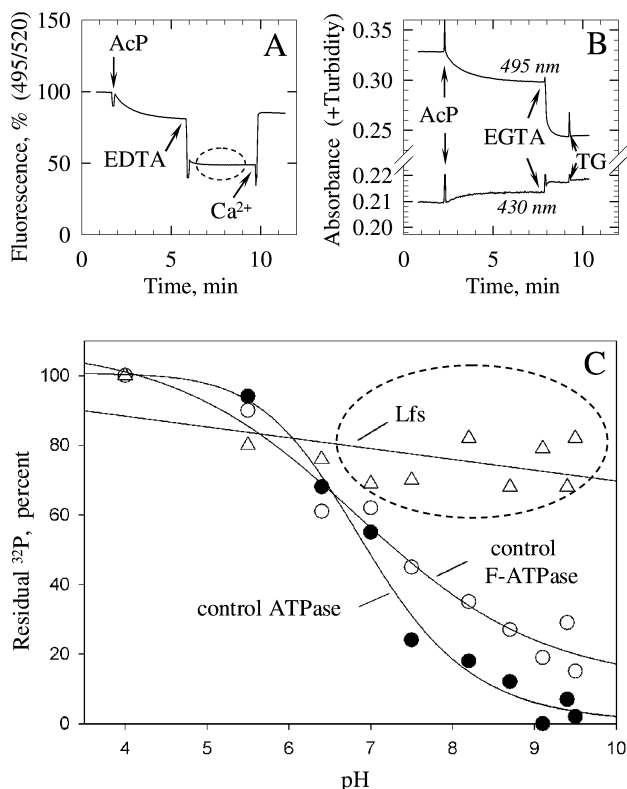


FIGURE 1: Formation of the “low fluorescence species” (Lfs), and pH stability of denatured phospho-species. (A) Typical fluorescence recording (495 nm/520 nm) of the formation of Lfs upon addition of 10 mM acetyl phosphate and then 7 mM EDTA (in the presence of 5 mM Mg^{2+}) to FITC-labeled SR vesicles at 0.02 mg/mL protein in Lfs medium; the subsequent addition of 3 mM Ca^{2+} allows fluorescence to recover, as previously observed (5). (B) This formation can also be monitored by absorbance measurements; here, FITC-labeled SR vesicles were at 0.4 mg/mL protein, and addition of acetyl phosphate was followed by addition of EGTA (2 mM) and then TG (4 μ g/mL). Traces recorded at 495 nm and at 430 nm are shown, and they evidence a change in the spectrum of the bound chromophore, as previously observed (5). (C) pH-dependence of the denatured phospho-species. Control, underivatized SR vesicles (“control ATPase”) and control, FITC-labeled SR vesicles (“control F-ATPase”) were Ca^{2+} loaded in Lfs medium with 1 mM [^{32}P]acetyl phosphate for 2 min at room temperature. In a third sample, the low fluorescent species (“Lfs”) was formed by adding EGTA to control FITC-labeled SR vesicles after this 2 min loading period. In all cases, proteins were then denatured, by vortexing aliquots with solid urea to which small aliquots of acid or Tris had been added, to bring the urea concentration to 7–8 M and the solution pH to that shown on the abscissa. The samples were incubated at 37 °C for 1 h, acid quenched, the protein collected on filters, and the radioactivity on the filters measured. The radioactivity is expressed as a percentage of the value at pH 4.0.

more similar to that for control ATPase, although it included a small pH-independent component. The latter would be consistent with the partial decrease in fluorescence and absorbance observed during Ca^{2+} loading with acetyl phosphate (i.e., formation of a small proportion of phosphofluorescein), even before EGTA addition (4, 5) (as recalled in Figure 1A).

Ca^{2+} -ATPase has a particularly sensitive tryptic cleavage site at Arg⁵⁰⁵ (T1 cleavage site), which separates the protein in two fragments of approximately equal size, one containing Asp³⁵¹ (A fragment, comprising residues 1–505) and the other Lys⁵¹⁵, with the attached fluorescein if present (B fragment, comprising residues 506–994) (16). Figure 2 shows the results of T1 cleavage of Lfs compared to a control

fluorescein-ATPase. All samples were applied in duplicates on the same gel, 8 lanes apart, so that after fluorescence imaging (see central part of Figure 2) the gel could be cut down the center and the left part submitted to Coomassie Blue staining while the right duplicate section was kept for radioactivity imaging. Separation of the A and B fragments was achieved in these experiments (thanks to the presence of excess Ca^{2+} during separation, ref 14), and, as expected, fluorescein attached to Lys⁵¹⁵ migrated together with the B fragment (see the left part of the figure). Two significant and unexpected facts were observed. First (middle right frame, but this is of course also visible in the other half of the gel, in the middle left frame), and irrespective of cleavage, the fluorescein-ATPase in Lfs (as well as in its B fragment) had distinctly lower fluorescence compared with the control fluorescein-ATPase, i.e. low fluorescence remained associated with the Lfs sample despite its treatment with urea and SDS before SDS-PAGE, and the low fluorescence persisted in the B fragment following T1 cleavage, showing that native association with the A fragment (with Asp³⁵¹) has nothing to do with this low fluorescence. Such low fluorescence for the denatured Lfs protein and its major fragment tends to rule out the possibility that it could be due to an unusual conformation of the membranous ATPase chain, phosphorylated at Asp³⁵¹ or any other amino acid residue, and suggests that the fluorescein label itself may well have been modified chemically in Lfs. Second, after radioactive imaging of the right part of the gel (extreme right frame) the phosphoryl group in Lfs was found to associate with the B fragment, not with the A fragment which bears Asp³⁵¹ (horizontal lines inserted to help visual alignments). Note that in the last lane of the right part of the gel (Lfs, 10 min trypsin; fluorescence and radioactivity), slight abnormalities in the running of the gel, as clearly seen by the position and upward tilt of the residual small band corresponding to full length Ca^{2+} -ATPase, artifactually raise the position of the B band; the opposite is true of the last lane of the left part of the gel.

The result of more sustained digestion with trypsin is shown in Figure 3. Among the many subfragments formed (Coomassie Blue-stained, top gel), the ^{32}P -labeled phosphoryl group in Lfs was found to specifically associate (see bottom gel, imaged for radioactivity) with those subfragments (circled bands) which also are fluorescent (center gel, imaged for fluorescence), and even in these smaller fragments the fluorescence was lower than in the corresponding ones in control fluorescein-ATPase (“C1”, on the left). This again supports the possibility that fluorescein itself has been modified in Lfs. In these experiments A and B fragments migrated at similar rates, because formation of Lfs had been achieved by adding both EGTA and a high concentration of EDTA for maximal stability, and excess $CaCl_2$ had not been added to the denatured samples.

The second control sample in Figure 3 (“C2”, on the right, i.e. FITC-labeled SR vesicles loaded with Ca^{2+} using [^{32}P]acetyl phosphate, but to which EGTA was not added subsequently) is also noteworthy, as prior to electrophoresis it must have been phosphorylated mostly at Asp³⁵¹: in agreement with Figure 1 (and due to the instability of the acyl phosphate under the alkaline Laemmli conditions), the “C2” lane indeed reveals only a very small amount of residual radioactivity. Again, part of this small amount of

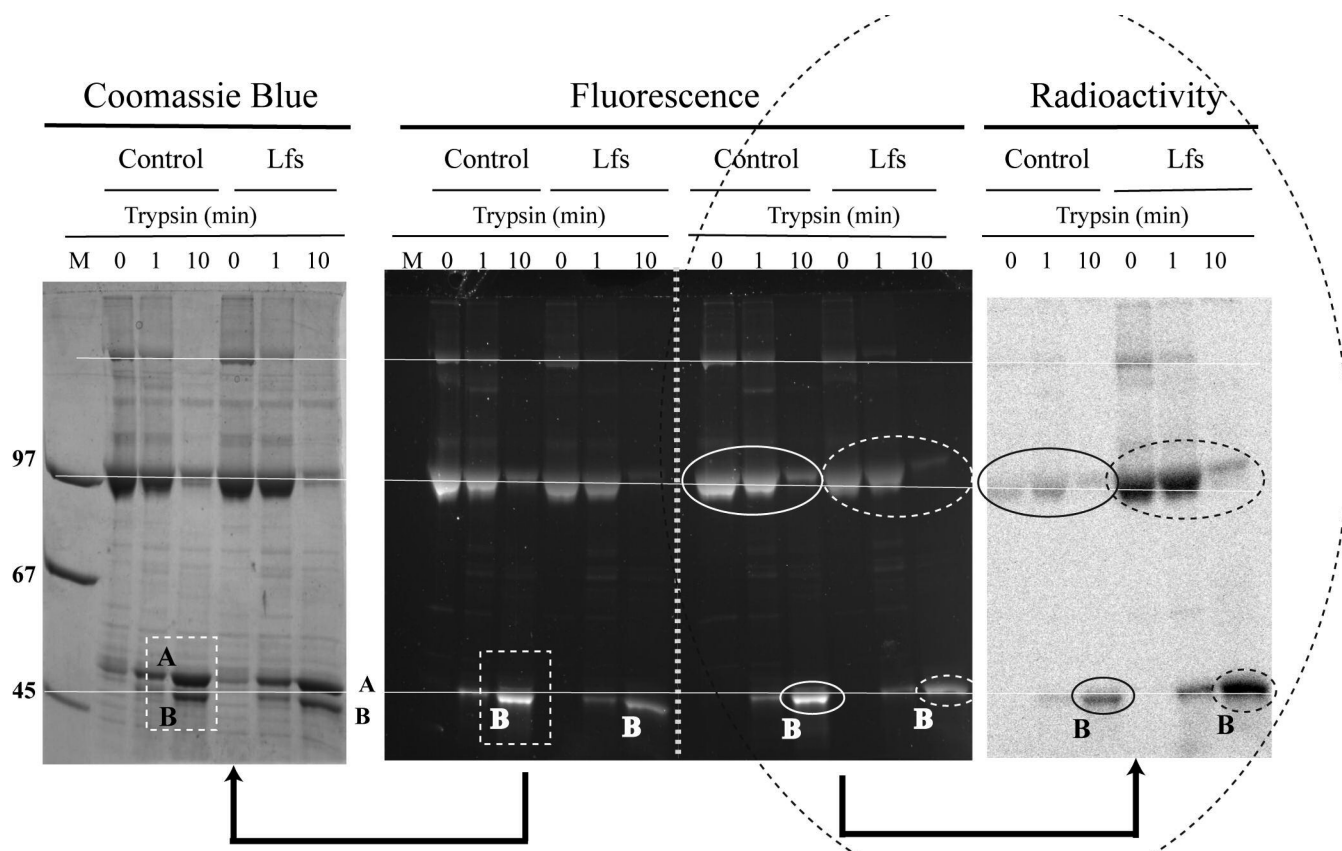


FIGURE 2: Association of phosphoryl group and low fluorescence with primary tryptic fragments. Two samples, both prepared from FITC-labeled SR vesicles, were digested with trypsin for various periods (0.4 mg/mL SR protein and 0.008 mg/mL trypsin, i.e. 2% w/w): either the classically formed Lfs (FITC-labeled SR vesicles loaded with Ca^{2+} for 2 min with $[^{32}\text{P}]$ acetyl phosphate, then incubated with excess EGTA for 1 min) or a control sample prepared in the same final medium (here, FITC-labeled SR vesicles incubated with 1 mM $[^{32}\text{P}]$ acetyl phosphate in the presence of excess EGTA from the start). At the times indicated, aliquots were vortexed with solubilization solution + urea, excess Ca^{2+} was added (to ensure subsequent separation of A and B fragments), and the samples were subjected to SDS-PAGE. Each sample loaded into a lane in the first half of the gel was duplicated in the second half of the gel. For the zero time point, trypsin was omitted. The gel was visualized for fluorescence, then sliced down the middle, and one-half (the left one) stained with Coomassie Blue (bottom left arrow), and the other (the right one) dried and subjected to radio-imaging (bottom right arrow). The lane marked M shows molecular weight markers. The main band at close to the 97 kDa marker is the uncleaved Ca^{2+} -ATPase, and primary tryptic fragments are labeled A (residues 1–505) and B (residues 506–994). Dotted lines indicate the approximate position of the vertical cut, and horizontal band alignments. An alignment of an unknown protein of high molecular weight (possibly oligomers of denatured ATPase), which was fluorescent and radiolabeled sufficiently, was also performed in order to be more certain of the trypsin fragment alignments.

residual radioactivity could be due to a small proportion of phosphate ester on fluorescein, as the latter is expected to be in equilibrium with the phosphorylated Asp³⁵¹ during Ca^{2+} loading.

As mentioned, phosphorylation of fluorescein on the 3-O or 6-O of the xanthenone ring is known to result in a low absorbance and low fluorescence compound (8), and related phosphorylated fluorescein molecules are commonly used as fluorogenic substrates for assaying protein phosphatases, which release fluorescein from the fluorescein phosphate (7–9). We asked whether normal fluorescence could be recovered from Lfs by adding such a phosphatase (in our case alkaline phosphatase): in our first attempts, the answer was no, even at 37 °C and pH 8 (Figure 4A, left traces), including (data not shown) after heat denaturation or after denaturation with 1% SDS followed by 10-fold dilution. However, extensive trypsinolysis of Lfs prior to alkaline phosphatase treatment did allow Lfs to slowly recover normal fluorescence upon subsequent incubation with alkaline phosphatase (center trace in Figure 4A), whereas alkaline phosphatase was without effect on similarly trypsinized control fluorescein-ATPase. This is critical evidence that the fluorophore itself in Lfs has been chemically modified, to form fluorescein mono-

phosphate and become sensitive to alkaline phosphatase (provided alkaline phosphatase has access to it, thanks to trypsinolysis). Note, in this respect, that adding alkaline phosphatase to trypsinized Lfs allowed the fluorescence to rise much more slowly than when the same concentration of alkaline phosphatase was added to fluorescein diphosphate (Figure 4A, extreme right trace), which is consistent with fluorescein monophosphate bound to tryptic peptides having hindered access to the active site of alkaline phosphatase, compared with free fluorescein monophosphate.

We previously noted that the low fluorescence species Lfs had low absorbance too, around 500 nm (5). Experiments identical to the fluorescence experiments described above, but in which absorbance properties were monitored after addition of alkaline phosphatase, also revealed, for trypsinized Lfs, alkaline-phosphatase dependent recovery of absorbance in this region (Figure 4, B–E). Moreover, upon addition of alkaline phosphatase, the time-dependent rise in Lfs absorbance around 500 nm was accompanied by a clear absorbance drop over the 330–460 nm range: judging from the absorbance spectrum of fluorescein monophosphate, this is exactly the range of wavelengths where absorbance of (free) fluorescein monophosphate exceeds that of fluorescein (8).

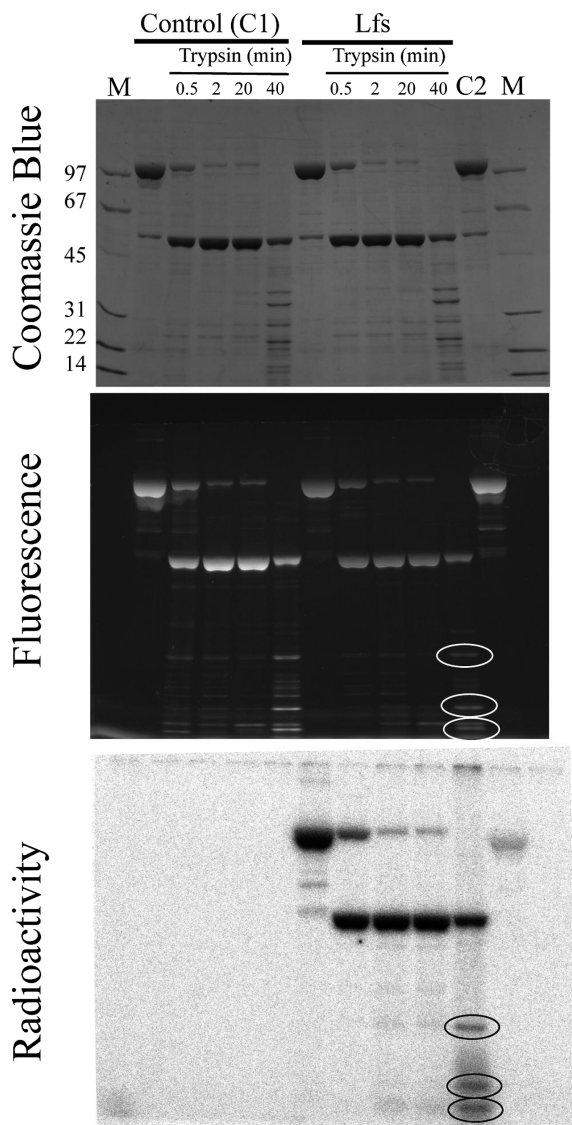


FIGURE 3: Association of phosphoryl group and low fluorescence with secondary tryptic subfragments. Initial samples, similar although not identical to those described for Figure 2, consisted of Lfs (FITC-labeled SR vesicles loaded with Ca^{2+} for 2 min with [^{32}P]acetyl phosphate, then supplemented with EGTA to form Lfs, and then with EDTA to stabilize Lfs further) and a control sample, “C1” (FITC-labeled SR vesicles supplemented with EGTA and EDTA first, and only then [^{32}P]acetyl phosphate). They were here subjected to more sustained tryptic digestion, using 4% (mg of trypsin/mg of SR protein) trypsin and longer digestion periods (for the time labeled 40 min, the digestion was in fact done for 20 min, SDS was then added to 1% (w/v), and the digestion continued for a further 20 min in the presence of SDS; trypsin retains significant activity in the presence of 1% SDS). The digestion was stopped by vortexing aliquots with solubilization solution + urea, and then the samples were subjected to SDS–PAGE with an acrylamide gradient of 7–18%. “C2” is another control where the FITC-labeled vesicles were incubated with [^{32}P]acetyl phosphate for 2 min, the reaction stopped with SDS + β -mercaptoethanol, and then EGTA and EDTA added. The top gel is Coomassie Blue-stained, the middle one shows fluorescence, and the bottom one radioactivity. Small bands in trypsin-treated Lfs which are both radiolabeled and of low fluorescence are circled. The gel used for Coomassie Blue staining was different from that used for fluorescence and radioactivity visualization, although the same samples were used and electrophoresis was performed in parallel. Lanes marked M show molecular weight markers.

Incidentally, note that for both Lfs and control fluorescein-ATPase, the prior trypsinolysis was accompanied by a

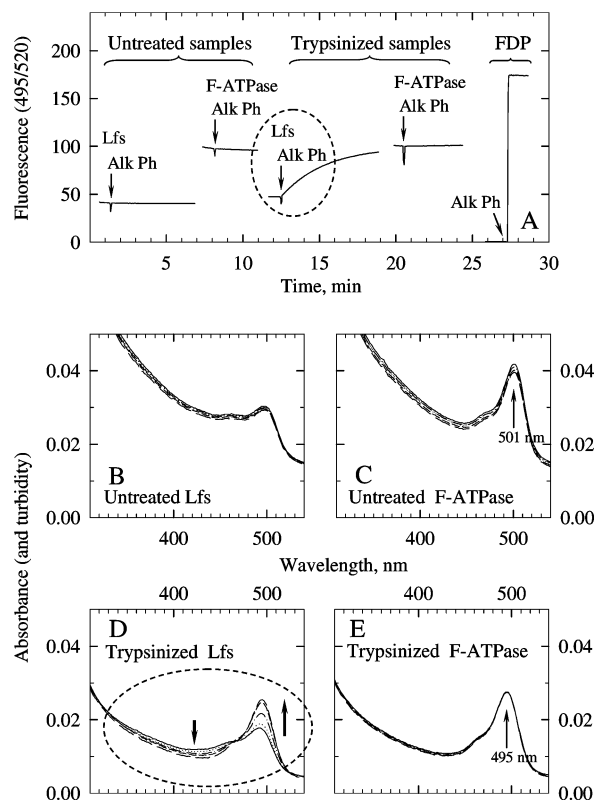


FIGURE 4: The low fluorescence and low absorbance of Lfs revert to normal fluorescence and normal absorbance upon addition of alkaline phosphatase to trypsinized samples. After Lfs formation from nonradioactive AcP (10 mM acetyl phosphate was used, to maximize the amount of Lfs) and preparation of a control fluorescein-ATPase (incubated with the same ligands added in a different order, see Experimental Methods), samples were supplemented with trypsin (12.5% w/w) when desired and slightly alkalized, and brought to 37 °C for incubation (the final pH was 8). After 3 or 4 h incubation, samples were diluted 10-fold (to 0.04 mg/mL FITC-SR protein) for recording their fluorescence or absorbance characteristics at various times after addition of alkaline phosphatase (final concentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (A) Fluorescence continuous measurements (495 nm/520 nm). In this series of measurements, the effect of alkaline phosphatase addition to fluorescein diphosphate (at about 0.25 μM , roughly equivalent to the concentration of fluorescein in derivatized SR vesicles) was also included. (B–E) Absorbance spectra for the various samples (as indicated) at various times after addition of alkaline phosphatase (0, 0.5, 2, 5 or 10 min). In parallel absorbance experiments with fluorescein diphosphate, the much faster kinetics previously illustrated for fluorescence recovery in panel A was also observed (not shown).

marked reduction in sample turbidity, as expected. In the case of control fluorescein-ATPase, it was also accompanied by a slight shift of the λ_{max} for bound fluorescence (from 501 to 495 nm), probably due to partial disruption of the protected environment around the bound fluorescein (e.g., Figure 9B in ref 17.).

DISCUSSION

The results presented here provide compelling evidence that in the ATPase form (Lfs) generated by acetyl phosphate-supported Ca^{2+} loading of FITC-derivatized vesicles followed by addition of EGTA, the remarkably stable phospho-species formed is not an ATPase with an acyl phosphate bond at Asp^{351} (as in the phosphoenzyme normally found during the catalytic cycle), but instead, a species with a phosphate ester

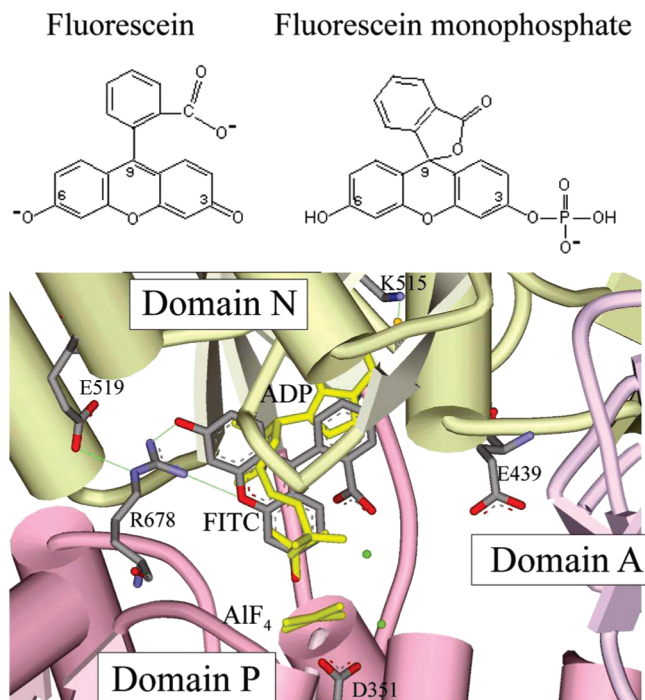


FIGURE 5: Model for phosphorylation of fluorescein: docking of FITC in the active site of Ca^{2+} -ATPase in an E1P-like structure. Top: Chemical formulas for fluorescein (left), here shown as the dianionic fluorescent form, and fluorescein monophosphate (right), here shown as isomer "A" (8, 9). Bottom: The structure of FITC, built up manually with software in Accelrys DS ViewerPro, was manually introduced into the structure of Ca^{2+} -ATPase ($\text{Ca}_2\text{E1.ADP.AIF}_4$; PDB accession code 1T5T), in the cavity of the ATPase accommodating ADP. The distance of the nitrogen atom of Lys⁵¹⁵ to the sulfur atom of the isothiocyanate group is 1.2 Å. The fitted FITC (atom specific coloring) and the ADP experimentally determined (yellow) are shown simultaneously; the adenine ring of ADP and the benzoyl ring of FITC are superimposed and coplanar. AIF₄, close to Asp³⁵¹, is also shown in yellow. The green spheres indicate Mg^{2+} ions. Favorable contacts (green lines) are made with Arg⁶⁷⁸ that normally hydrogen bonds with 3-O ribose of ADP.

on the fluorescein moiety attached to Lys⁵¹⁵. The chemical structure of one of the possible isomers of fluorescein monophosphate (8, 9) is shown on top of Figure 5.

This phosphorylation of fluorescein itself, not Asp³⁵¹, accounts nicely for the stability of the phosphoryl group, for the low fluorescence and the low absorbance (at 500 nm) of Lfs (including after denaturation of the protein), for the coincidence of the ³²P radioactivity with fluorescence in the primary tryptic fragment containing Lys⁵¹⁵ (and not Asp³⁵¹) as well as in smaller secondary subfragments, and for the ability of alkaline phosphatase to slowly but definitely allow small tryptic fragments of Lfs to recover normal fluorescence and absorbance properties for the fluorescein moiety. It also accounts for most of the puzzling electron microscopy, cross-linking and proteolysis observations reported in ref 6. One feature still requiring an explanation is that in the 8 Å resolution structure of Lfs in the additional presence of decavanadate and TG also reported in ref 6, Lfs, rather oddly, accommodated decavanadate at the interface of the three head domains, whereas the unphosphorylated fluorescein ATPase did not: presumably, phosphorylation of the fluorescein moiety forces the fluorescein rings to relocate elsewhere within the binding pocket (see below), away from the decavanadate binding site. A crystal structure of E2.TG.

AMPPCP (PDB code 2C88, ref 18, or 2DQS) shows that the α - and β -phosphates of nucleotide, together with a Mg^{2+} ion, focus toward Glu⁴³⁹ in domain N, and interact with the protein matrix in a manner significantly different from that in the $[\text{Ca}_2]\text{E1.AIF}_4\text{.ADP}$ species (PDB code 1T5T, ref 19); if, in the combined presence of EGTA, decavanadate, TG and Mg^{2+} , the phosphorylation of fluorescein in Lfs causes a similar interaction of its phosphoryl group with Glu⁴³⁹, this could well explain a shift in position of the xanthenone structure, compared to control fluorescein-ATPase. Based on handmade modeling, such a pendulum-like movement of the rings is indeed compatible with maintaining the link to Lys⁵¹⁵; for the 3O, it would require a move of ~ 4 Å from the position in the model in Figure 5 (see below).

Thus, unexpectedly, it appears that after acetyl phosphate-supported Ca^{2+} -loading of vesicles containing FITC-derivatized Ca^{2+} -ATPase and pump cycle reversion on the addition of EGTA, the phosphoryl group can be transferred to the fluorescein moiety. This transfer implies proximity of Asp³⁵¹ (in domain P) and the fluorescein moiety (in domain N) in the initial Asp-phosphorylated state (presumably the $[\text{Ca}_2]\text{E1}\sim\text{P}$ phosphoenzyme), and also implies that after such transfer Ca^{2+} ions originally bound to this phosphorylated state are no longer occluded and can dissociate from the ATPase (see also below) and thereby trigger disruption of the N/P domain proximity, making the phospho-transfer irreversible at low free $[\text{Ca}^{2+}]$ and resulting in a Ca^{2+} -free state with an ordinary conformation (E2) but a phosphorylated fluorescein instead of the normal fluorescein. Conversely, the extreme sensitivity of Lfs to Ca^{2+} (low fluorescence, low absorption and stable phosphorylation are lost immediately upon readdition of Ca^{2+} to nondenatured Lfs, see ref 5) can now be readily explained by the fact that, upon Ca^{2+} rebinding to the ATPase high affinity transport sites (oriented to the cytoplasmic side), the covalently attached fluorescein monophosphate will come close to Asp³⁵¹ again and will be used as a substrate in the forward direction of catalysis, for a single turnover. Indeed, the kinetics of Ca^{2+} transport during this process is consistent with the phosphoryl group re-entering the cycle after the binding of Ca^{2+} to normal outwardly exposed sites (5). As the rate of this binding was found similar to the rate of Ca^{2+} binding to normal fluorescein-ATPase or unlabeled ATPase (5), this, incidentally, implies that the tethered fluorescein monophosphate does not accelerate the "E2 to E1" transition, unlike the genuine substrate ATP.

We have suggested previously that FITC may be modeled into the catalytic site of Ca^{2+} -ATPase crystallized with ADP + AIF₄, such that the isothiocyanate moiety is proximal to the amino group of Lys⁵¹⁵ and the 3-O xanthenone oxygen superimposes with the attacking/departing oxygen of the β -phosphate of ADP (6). Such a model is presented in Figure 5, showing the 3-O oxygen appropriately positioned for acceptance of the phosphoryl group (mimicked by an AIF₄ group in 1T5T) from Asp³⁵¹. This supports the possibility that the formation of a tethered fluorescein monophosphate is "simply" the result of the cycle going in the reverse, with fluorescein replacing ADP and the E1-fluorescein monophosphate species being an analogue of the E1.ATP noncovalent species formed before phosphorylation; and the tethered fluorescein monophosphate could well readopt a similar position during re-entry into the cycle in the presence

of Ca^{2+} . Note, however, that the bound fluorescein can probably not adopt the same position during loading of the vesicles with acetyl phosphate, because of likely steric clashes of the edge of the xanthenone ring with the acetyl group: thus the covalently attached (nonphospho) fluorescein, at some stage, possibly during the $[\text{Ca}_2]\text{.E1}\sim\text{P}$ to E2P transition to account for the strict dependence of Lfs on a Ca^{2+} gradient, must be free enough to adopt alternative positions in the nucleotide-binding site, or alternatively the apposition of domains N and P is variable. The latter would be consistent with the rather weak interactions between them seen in some of the atomic structures, especially in the open $\text{Ca}_2\text{.E1}$ structure, coupled with flexing of the linking hinge. The ability of bound fluorescein to adopt different positions was in fact previously suggested on the basis of the ability of ATP (if not MgATP) to affect FITC fluorescence significantly, by binding to a low affinity site (12).

Our finding that the fluorescein in derivatized $[\text{Ca}_2]\text{.E1} \sim \text{P}$ behaves very much like ADP in unlabeled Ca^{2+} -ATPase might have a bearing on the proposal that departure of ADP from the catalytic site is the critical trigger for domains N and P separation, domain A rotation and E2-P state formation (20, 21). Obviously, the tethered fluorescein does not depart the catalytic site, and yet the $[\text{Ca}_2]\text{.E1} \sim \text{P}$ transition to E2P does not seem to be much inhibited when the covalently attached fluorescein monophosphate is used as substrate on the addition of Ca^{2+} or when acetyl phosphate is used as substrate with the fluorescein-ATPase. Domains N and P are mainly held together by Glu⁵¹⁹-Arg⁶⁷⁸ and Arg⁵⁶⁰-Asp⁶²⁷ links, where both arginines are also interacting with the ADP (ribose hydroxyls and β -phosphate oxygens, respectively). There is an additional hydrogen bond between the attacking/departing oxygen atom of the β -phosphate and Thr³⁵³ of domain P. When fluorescein replaces ADP, the interdomain interactions could remain (the Glu⁵¹⁹-Arg⁶⁷⁸ interaction is shown in Figure 5; the other interactions are omitted in order not to complicate the view). As shown in Figure 5, Arg⁶⁷⁸ could also interact very favorably with the xanthenone ring. The side chain of Arg⁵⁶⁰ could salt-link favorably with the carboxyl of the smaller phenyl ring of the fluorescein and the 3O-Thr³⁵³ interaction could also survive, as positioning this attacking/departing oxygen must be critical for catalysis. Thus, it is not clear that replacing the ADP with fluorescein necessarily weakens head domain interactions, and one then may query whether release of ADP really is the critical trigger for the $[\text{Ca}_2]\text{.E1}\sim\text{P}$ to E2P transition. Perhaps, dissociation of ADP may be rather seen as a means of driving the reaction forward by preventing the backward reaction to ATP, rather than a trigger to E2P. The only requirement for the transition from $[\text{Ca}_2]\text{.E1}\sim\text{P}$ to E2P probably is that the phosphate chain in ADP reorients (while the base moiety could remain bound to Phe⁴⁸⁷) and leaves the vicinity of the now phosphorylated Asp³⁵¹.

Finally, beyond accounting for the mystery of the low fluorescent intermediate reported by U. Pick so many years ago, the phosphorylation of fluorescein by reversal of the pump, and its dependence on luminal Ca^{2+} , might turn out to be useful in the development of an assay for measuring Ca^{2+} binding to luminal sites of mutant ATPase, or for detecting mutants with stabilized phosphorylated states. Such

an assay would shed light on the pathway for Ca^{2+} release from the transport sites located midway in the membrane to the lumen.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to D. Stokes, M. Green, J. J. Lacapère, F. Henao, S. Karlsh and Q. Wang for discussion and helpful suggestions, and to P. Le Maréchal and P. Decottignies (UMR 8619, CNRS and University Paris-Sud) for their help with mass spectrometry attempts not shown here.

REFERENCES

- Pick, U., and Karlsh, S. J. D. (1980) Indications for an oligomeric structure and for conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase labeled selectively with fluorescein. *Biochim. Biophys. Acta* 626, 255–261.
- Pick, U. (1981) Interaction of fluorescein isothiocyanate with nucleotide-binding sites of the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* 121, 187–195.
- Mitchinson, C., Wilderspin, A. F., Trinnerman, B. J., and Green, N. M. (1982) Identification of a labeled peptide after stoichiometric reaction of fluorescein isothiocyanate with the Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 146, 87–92.
- Pick, U. (1981) Dynamic interconversions of phosphorylated and nonphosphorylated intermediates of the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum followed in a fluorescein-labeled enzyme. *FEBS Lett.* 123, 131–136.
- Champeil, P., Henao, F., Lacapère, J.-J., and McIntosh, D. B. (2001) A remarkably stable phosphorylated form of Ca^{2+} -ATPase prepared from Ca^{2+} -loaded and fluorescein isothiocyanate-labeled sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* 276, 5795–5803.
- Stokes, D. L., Delavoie, F., Rice, W. J., Champeil, P., McIntosh, D. B., and Lacapère, J.-J. (2005) Structural studies of a stabilized phosphoenzyme intermediate of Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 280, 18063–18072.
- Huang, Z., Olson, N. A., You, W., and Haugland, R. (1992) A sensitive competitive ELISA for 2,4-dinitrophenol using 3,6-fluorescein diphosphate as fluorogenic substrate. *J. Immunol. Methods* 149, 261–266.
- Huang, Z., Wang, Q., Ly, H., Ghorvindarajan, A., Scheiget, J., Zaamboni, R., Desmarais, S., and Ramachandran, C. (1999) 3,6-fluorescein diphosphate: A sensitive fluorogenic and chromophoric substrate for protein tyrosine phosphatases. *J. Biomol. Screening* 4, 327–334.
- Wang, Q., Scheiget, J., Gilbert, M., Snider, J., and Ramachandran, C. (1999) Fluorescein monophosphates as fluorogenic substrates of protein tyrosine phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* 1431, 14–23.
- Bodley, A. L., and Jencks, W. P. (1987) Acetyl phosphate as a substrate for the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 262, 13997–14004.
- Champeil, P., Guillain, F., Vénien, C., and Gingold, M. P. (1985) Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-depleted sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent perturbation. *Biochemistry* 24, 69–81.
- Champeil, P., Riollot, S., Orłowski, S., Guillain, F., Seebregts, C. J., and McIntosh, D. B. (1988) ATP regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 263, 12288–12294.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- le Maire, M., Lund, S., Viel, A., Champeil, P., and Møller, J. V. (1990) Ca^{2+} -induced conformational changes and location of Ca^{2+} -transport sites in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase as detected by the use of proteolytic enzyme (V8). *J. Biol. Chem.* 265, 1111–1123.
- Hokin, L. E., Sastry, P. S., Galsworthy, P. R., and Yoda, A. (1965) Evidence that a phosphorylated intermediate in a brain transport adenosine triphosphatase is an acyl phosphate. *Biochemistry* 54, 177–184.
- Stewart, P. S., MacLennan, D. H., and Shamoo, A. E. (1976) Isolation and characterization of tryptic fragments of the adenosone

- triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 251, 712–719.
17. Champeil, P., Menguy, T., Soulié, S., Juul, B., de Gracia, A. G., Rusconi, F., Falson, P., Denoroy, L., Henao, F., le Maire, M., and Møller, J. V. (1998) Characterization of a protease resistant domain of the cytosolic portion of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Nucleotide- and metal-binding sites. *J. Biol. Chem.* 273, 6619–6631.
 18. Jensen, A.-M. L., Sørensen, T. L.-M., Olesen, C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2006) Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *EMBO J.* 25, 2305–2314.
 19. Sørensen, T. L., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304, 1672–1675.
 20. Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430, 529–535.
 21. Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* 432, 361–368.

BI800290Q

CHAPITRE VI : CARACTERISATION DE L'ASSOCIATION D'UN DIVALENT AVEC SES CHELATEURS POTENTIELS : EXEMPLES DU MAGNESIUM (Mg^{2+}) ET DU CADMIUM (Cd^{2+}).

Dans les conditions physiologiques, les ions se complexent avec toute une variété de ligands. Comme je l'ai présenté plus tôt, l'ATPase SERCA1a interagit avec plusieurs divalents, notamment le calcium et le magnésium. Cependant, pour que ces interactions soient possibles, il ne faut pas que ces cations soient chélatés par d'autres molécules, entrant en compétition avec l'ATPase. Comme les cations divalents sont susceptibles d'être chélatés par toutes les espèces anioniques présentes en solution, une pratique évidente dans notre domaine consiste à éviter d'utiliser des tampons connus pour chélater les divalents, et d'utiliser plutôt des tampons réputés peu susceptibles de telles interactions : les tampons dits de « Good » (Mops, Mes, Tes, ... ; (Good, Winget et al. 1966)) sont donc fréquemment utilisés dans notre domaine. Ce fut donc une réelle et désagréable surprise, au début de ce travail, de découvrir dans une revue une référence indiquant que le magnésium était très efficacement fixé par la molécule tampon Mops (Azab, Orabi et al. 2001; Magyar and Godwin 2003) pourtant couramment utilisé dans le domaine des ATPases de type P. Si tel était le cas, de très nombreux résultats, quasiment considérés comme des dogmes, étaient remis en cause. Le laboratoire ayant une certaine expérience des outils permettant de suivre les interactions du calcium avec divers chélateurs potentiels, j'ai adapté ces outils pour étudier les interactions éventuelles (ou l'absence d'interaction, espérons-nous) du magnésium avec plusieurs tampons, dont bien sûr le Mops (Montigny and Champeil 2007). A cette occasion, mettant notre savoir-faire au service d'une collaboration, nous avons également précisé les complexes formés par association entre le cadmium (Cd^{2+}) et le glutathion réduit (l'anion GSH⁻), afin de mieux comprendre lesquels de ces complexes étaient le plus susceptibles de se former au cours de la détoxification cellulaire du Cd^{2+} (Leverrier, Montigny et al. 2007).

I. INTERACTION DES DIVALENTS AVEC LES TAMPONS : LE CAS DU MAGNESIUM

1. Le problème soulevé par les résultats de Azab et al. (2001)

A la lecture des tables donnant les constantes d'association entre cations divalents et tampons classiques (Magyar and Godwin 2003), quelle ne fut pas notre surprise de constater que le Mops (4-morpholinepropanesulfonic acid) y était réputé capable de complexer le Mg^{2+} avec une affinité sub-millimolaire ($K_M \sim 300 \mu M$) ! La référence citée pour cette valeur était un papier publié dans un journal de chimie en 2001 (Azab, Orabi et al. 2001), dans lequel étaient présentées de nombreuses expériences de titrage par pH-métrie, mais où hélas, l'expérience particulière démontrant cette affinité inattendue (pour nous) du Mops pour le Mg^{2+} n'était cependant pas montrée. Cette affinité prétendument relativement forte était extrêmement troublante à nos yeux. En effet, comme je l'ai décrit en introduction, l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase- Ca^{2+} est un processus dépendant du Mg^{2+} (voir Chap. I), et les concentrations en Mg^{2+} total utilisées sont généralement de l'ordre de quelques millimolaires, alors que le Mops est couramment utilisé (pour travailler autour de pH 7) à des concentrations de plusieurs dizaines de mM. Dans de telles conditions, et si cette valeur de $K_M \sim 300 \mu M$ était exacte, il ne devrait y avoir quasiment plus de Mg^{2+} libre disponible pour permettre la catalyse enzymatique. Le papier de 2001 remettait donc en cause une grosse partie du travail réalisé depuis très longtemps pour comprendre le fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} (et d'ailleurs aussi de beaucoup d'autres

ATPases, elles aussi Mg^{2+} -dépendantes). Nous avons donc d'abord voulu mesurer le Mg^{2+} laissé libre malgré la présence du Mops.

2. Titrage de l'interaction d'un divalent avec ses chélateurs potentiels : principes, et résultats pour l'interaction du Mg^{2+} avec divers tampons

La détermination de la concentration libre d'un cation divalent se heurte au problème de la possible fixation de ce cation sur des ligands potentiels sous-estimés : les milieux expérimentaux utilisés sont souvent complexes et contiennent de nombreuses espèces moléculaires dont les affinités pour ces divalents peuvent ne pas être négligeables. Afin de suivre les concentrations en solution du Mg^{2+} libre (ou de tout autre divalent, comme on le verra plus loin) en présence de tels chélateurs potentiels, nous avons choisi deux types de méthodes différentes : les méthodes du premier type sont spectrophotométriques et s'appuient sur l'utilisation de sondes colorées dont le spectre change avec la fixation au métal. Les méthodes du second type utilisent la pH-métrie pour suivre les protons libérés lors de la chélation du cation par son ligand. Je vais dans un premier temps présenter ces méthodes, qui seront utilisées aussi bien ici pour suivre l'interaction du magnésium avec les tampons que, plus loin, pour suivre l'interaction du cadmium avec le GSH.

a. Association entre un métal et ses ligands, mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un colorant : exemple de l'interaction du Mg^{2+} avec les tampons, mesurée à l'aide de l'antipyrilazo III

○ Utilisation de sondes colorées ou fluorescentes : quelques généralités

Il est possible de suivre par spectrophotométrie la quantité de métal resté libre après sa chélation par un ligand potentiel. Pour cela, on utilise une molécule « rapporteuse » ou « indicatrice », dont les propriétés spectroscopiques vont changer quand elle va elle-même lier une (petite) partie du cation à doser.

Avant de décrire les propriétés particulières des sondes appropriées à notre problématique, il convient de rappeler quelques critères généraux dont la prise en compte est importante lors du choix de la sonde à utiliser. Tout d'abord, l'affinité de l'indicateur pour l'ion doit être relativement faible pour que la sonde ne soit pas saturée, et on choisira de travailler avec une faible concentration de sonde pour que la quantité d'ions complexés à la sonde reste toujours négligeable par rapport à la quantité totale d'ions disponibles et que la présence de la sonde ne perturbe donc pas la concentration d'ion libre à mesurer. Ensuite, il convient de vérifier que les propriétés spectrales de la sonde ne sont affectées que par l'ion à doser, et non pas, par exemple, par une interaction malencontreuse avec les protéines présentes ou avec d'autres composés du milieu (c'est notamment un problème quand ces sondes forment avec les divalents des complexes ternaires et pas seulement binaires ; c'est le cas par exemple de l'arsenazo et parfois de l'antipyrilazo III (cf ci-après). Enfin, si on souhaite suivre des cinétiques, les vitesses d'association et de dissociation de la sonde avec l'ion étudié doivent bien sûr être rapides.

Je vais maintenant présenter l'antipyrilazo III, qui est la sonde que nous avons utilisée pour suivre les concentrations en magnésium libre en présence de divers tampons. Plus tard, nous verrons également l'utilisation d'un autre indicateur coloré, la murexide, ainsi que d'une sonde fluorescente, le FluoZin-1, que nous avons utilisé pour suivre l'interaction du cadmium avec le glutathion.

○ utilisation de l'antipyrilazo III pour suivre la fixation éventuelle du magnésium par des chélateurs potentiels

L'antipyrilazo III (ApIII, voir formule chimique dans la [figure VI.01](#)) est un indicateur très répandu pour l'estimation des concentrations en cations divalents dans les milieux

biologiques. Comme la murexide, cette sonde fut initialement utilisée pour suivre les variations de concentrations en calcium libre dans les préparations de muscle (Scarpa, Brinley et al. 1978). Mais contrairement à la murexide (voir ci-après §II.2) qui ne fixe le magnésium qu'avec une affinité très faible, l'ApIII le fixe avec une affinité significative. Les deux complexes, Mg-ApIII et Ca.ApIII n'ont pas les mêmes spectres d'absorption (Scarpa 1979) : dans la région spectrale allant de 660 nm au proche infrarouge, la fixation de magnésium est sans effet alors que l'on trouve une bande d'absorption pour le calcium (Scarpa 1979; Ogawa, Harafuji et al. 1980). Nous avons utilisé l'ApIII pour suivre les concentrations de magnésium libre et mettre en évidence une possible compétition entre l'ApIII et divers tampons pour la fixation de ce métal.

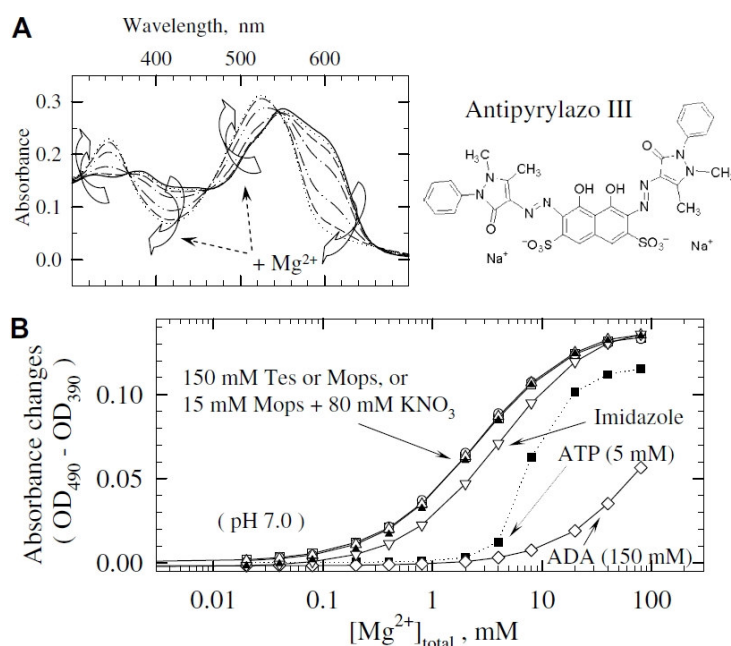


Figure VI.01 : Utilisation de l'antipyrylazo III comme sonde pour mesurer la concentration en Mg^{2+} libre, en absence ou en présence d'anion compétiteur. A. Détection du Mg^{2+} à l'aide de l'ApIII : à droite, formule chimique de l'antipyrylazo III ; à gauche, ligne continue, spectre d'absorption de 10 μM d'antipyrylazo III dans le tampon Tes-NaOH 150 mM, pH 7, 20°C (le blanc a été réalisé préalablement sur le tampon en absence d'antipyrylazo III). Lignes discontinues, spectres résultant d'additions séquentielles de Mg^{2+} , pour atteindre des concentrations de 0,04, 0,2, 0,8, 4, 20 et 80 mM. Les flèches blanches larges indiquent le sens de déplacement du spectre. B. Mise en évidence de la fixation (ou de l'absence de fixation) du Mg^{2+} par les tampons : on porte les changements d'absorbance de l'ApIII (après avoir choisi deux longueurs d'onde permettant de maximiser la réponse tout en s'affranchissant des dilutions (Ohnishi 1978), voir la figure VI.06) en fonction de la concentration totale en magnésium ajouté. Le milieu est tamponné à pH 7, 20°C, à l'aide différents tampons (tous à 150 mM) : Tes-Tris (carrés blancs), Mops-Tris (triangles blancs), imidazole (triangles blancs inversés) ou ADA (losanges). Deux expériences contrôles sont réalisées : une dans un tampon Mops-Tris à seulement 15 mM et contenant aussi 80 mM de KNO_3 (triangles noirs), et l'autre dans le tampon 150 mM Tes-Tris contenant 5 mM d'ATP.

La figure VI.01.B ((Montigny and Champeil 2007)) montre comment on peut observer les phénomènes de compétition entre sonde et tampon pour la fixation du métal. Les tampons Tes et Tris sont réputés ne pas chélater le magnésium (Magyar and Godwin 2003). Le tampon Tes-Tris va donc nous servir comme témoin négatif. On détermine dans ce tampon une affinité apparente de l'ApIII pour le magnésium de l'ordre de 2 mM. En guise de compétiteurs pour la fixation du Mg^{2+} , nous avons utilisé deux tampons décrits comme chélatant le magnésium (imidazole et ADA (N-[2-acetamido] iminodiacetic acid)), ainsi que l'ATP qui est un chélateur « naturel » : les titrations réalisées dans ces trois cas donnent lieu à des décalages vers la droite de l'affinité apparente de l'ApIII pour le magnésium, décalages qui sont directement fonction de l'affinité du compétiteur pour le magnésium (voir également la figure VI.04 pour une mesure de l'affinité de l'ATP pour le Mg^{2+} , réalisée par pH-métrie). En revanche, en présence de Mops, même à 150 mM, il n'y a pas de décalage de l'affinité : ceci suggère qu'il n'y a pas de compétition entre le Mops et l'ApIII pour la fixation du magnésium (figure VI.01.B), et donc

qu'il n'y a *pas* (heureusement pour notre domaine) d'interaction significative du Mops avec le Mg^{2+} , à pH neutre du moins.

b. Association entre un métal et ses ligands, étudiée par pH-métrie : l'interaction du Mg^{2+} avec les tampons

Afin de confirmer le résultat précédent, en opposition avec le contenu du papier de 2001, nous avons également procédé à une mesure par pH-métrie de cette éventuelle interaction du Mg^{2+} avec le Mops.

○ Principe

Les tampons simples ($A^- + H^+ \rightleftharpoons AH$) sont caractérisés par une constante d'acidité K_a (définie ci-après comme une constante de *dissociation*):

$$K_a = [A^-] \times [H^+] / [AH] \quad (eq. 1),$$

ou encore par leur $pK_a (= -\log K_a)$. On peut déterminer la valeur du pK_a en titrant le tampon par une base forte. La [figure VI.02](#) montre un tel titrage théorique, simulé (pour des raisons de comparaison avec nos résultats expérimentaux, voir ci-après) en la présence supplémentaire de 3 mM d'un acide fort, et avec trois concentrations différentes (1, 2 ou 3 mM) d'un tampon HA dont le pK_a est fixé à 8, arbitrairement.

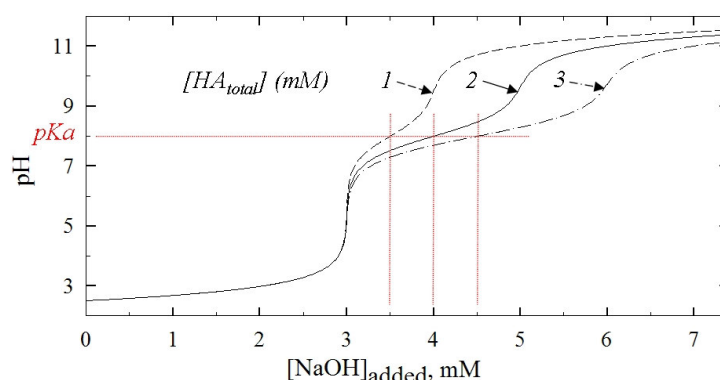
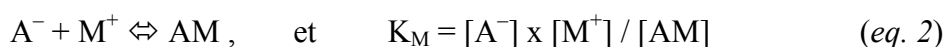


Figure VI.02 : Simulation de la détermination à l'aide d'un pH-mètre du pK_a d'un tampon. La figure présentée ici est une simulation réalisée avec le logiciel JChess ([van der Lee, De Windt et al. 2002](#)). Le tampon HA, de pK_a supposé égal à 8, est dilué à 1, 2 ou 3 mM (les courbes de titrage sont représentées respectivement à l'aide de tirets, d'une ligne continue ou d'une succession tirets-points) dans un milieu contenant exclusivement de l'eau et 3 mM d'acide nitrique (HNO_3). On titre le mélange en ajoutant des concentrations croissantes de soude (NaOH, mM). Il faut d'abord assez de soude (d'ions hydroxydes) pour neutraliser les 3 mM de protons apportés par l'acide nitrique. On déprotone ensuite le tampon. Le pK_a est la valeur de pH pour laquelle la moitié de l'acide est déprotoné : ce point de demi-équivalence (point d'inflexion) se situe pour toutes les courbes à pH 8. Au pK_a , la quantité de protons libérés correspond donc à la moitié de la concentration totale d'acide, et pour des valeurs de $[HA_{total}]$ de 1, 2 et 3 mM, les quantités totales de soude nécessaires pour atteindre le pK_a , compte tenu des 3 mM supplémentaires d'acide nitrique, seront donc de 3,5, 4 et 4,5 mM (*lignes pointillées rouges*).

En présence d'un cation supplémentaire en solution, par exemple un ion métallique (M^+), de nouvelles associations peuvent survenir. Le cas le plus simple est celui de l'association du métal avec le seul tampon déprotoné (avec une constante K_M , exprimée ici de nouveau en constante de dissociation) :



En solution, on aura alors *compétition* entre les protons H^+ et les cations métalliques M^+ pour la fixation au tampon déprotoné. On se retrouve dans une situation comparable à celle observée

pour une inhibition compétitive dans le cas d'un enzyme en présence d'un inhibiteur. On peut définir alors pour le tampon une constante d'acidité *apparente* (K_a') dont la valeur est égale à :

$$K_a' = K_a \times (1 + [M] / K_M) \quad (\text{eq. 3})$$

avec K_a la constante d'acidité vraie du tampon (eq. 1), $[M]$ la concentration *libre* d'ions métalliques, et K_M la constante de dissociation du métal avec le tampon déprotoné (eq. 2). La constante de dissociation apparente sera systématiquement plus élevée que la constante vraie en absence de compétiteur : c'est ce qu'illustre la simulation de la [figure VI.03](#),

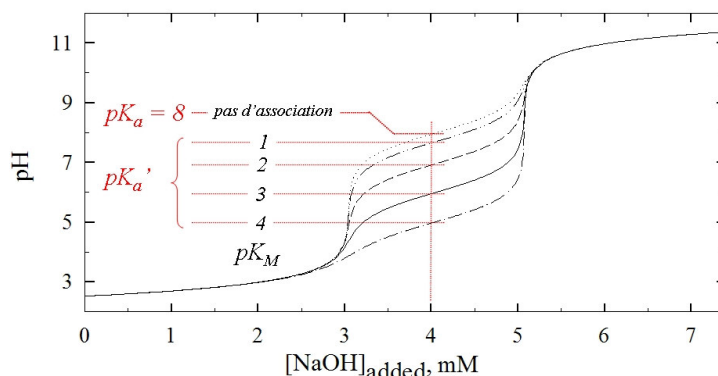


Figure VI.03 : Détermination *théorique* par pH-métrie, dans un cas de compétition simple, de la constante de dissociation K_M (ou $pK_M = -\log K_M$) d'un ion métallique avec un tampon. Comme dans la [figure M.5](#), la figure présentée ici est une simulation réalisée avec le logiciel JChess ([van der Lee, De Windt et al. 2002](#)). On titre 2 mM de tampon HA (pK_a vrai supposé 8) dans une solution à 3 mM d'acide nitrique (HNO_3), en présence de 100 mM d'un ion métallique M hypothétique, susceptible de se lier au tampon déprotoné avec des affinités croissantes : pas d'association (*courbe pointillée*), ou bien $pK_M (= -\log K_M)$ égal à 1 (*double points-tirets*), 2 (*tirets*), 3 (*ligne continue*) ou 4 (*points-tirets*). On titre le mélange en ajoutant des concentrations croissantes de soude (NaOH, mM). En absence d'association, on retrouve le pK_a attendu, 8. Plus M s'associe fortement au tampon déprotoné, plus la compétition avec les protons est importante, et plus le pK_a' est acide. Dans tous les cas, le volume de soude pour atteindre l'équivalence (i.e. quand on commence à avoir un excès de base) est évidemment le même, puisque toutes les molécules d'acide sont déprotonées à ce moment-là.

Afin de valider la méthode, et avant de s'intéresser au cas *a priori* plus épineux du Mg^{2+} et des tampons (et plus loin du cadmium et du glutathion), nous avons réalisé l'expérience sur un cas d'école, l'association du Mg^{2+} avec l'ATP ([figure VI.04](#)). Par cette méthode, nous avons estimé une valeur expérimentale de $K_{Mg,ATP}^{Mg} \sim 1,4 \cdot 10^{-4}$ M (à 20°C et en absence de sels) du même ordre de grandeur que la valeur de référence ($-\log K = 4,06 \pm 0,2$ à 25°C en présence de 100 mM de KCl ([Martell and Smith 1974](#))).

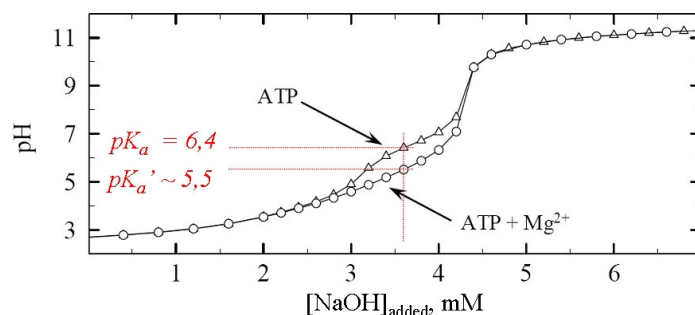


Figure VI.04 : Détermination expérimentale par pH-métrie de la constante de dissociation K_M d'un ion métallique avec un tampon : cas de la fixation du magnésium (Mg^{2+}) à l'ATP. Selon le même principe que dans la figure VI.03, mais cette fois de façon expérimentale, on titre à la soude une solution contenant de l'ATP, ici 1 mM. Cette situation est légèrement plus compliquée que la situation théorique au-dessus, parce que l'ATP possède deux autres groupes protonables (plus acides) et que la solution mère a été préalablement à peu près neutralisée, mais cela ne va pas empêcher de déterminer le troisième pK_a , autour de la neutralité. Pour l'ATP en absence de magnésium, on détermine un pK_a de 6,4 raisonnablement concordant avec la valeur indiquée dans les tables ($pK_a = 6,51$ dans (Martell and Smith 1974)). On réalise le même titrage mais en présence de 1 mM de $MgCl_2$. On constate un abaissement de la courbe de titrage dans la zone du pK_a , d'environ $\Delta pK_a (= pK_a - pK_a') = 0,9$; d'après l'équation décrite ci-dessus (eq. 3), on a donc $[M] / K_M = 7$ environ, d'où $K_M = 1,4 \cdot 10^{-4}$ M environ (puisque le Mg^{2+} libre dans ces conditions est sans doute de l'ordre de 0.5 mM), ce qui est raisonnablement concordant avec les données de la bibliographie (d'après Martell & Smith, $-\log K_M = 4,06 \pm 0,2$), malgré la grossièreté de ce traitement.

Au premier abord, cette méthode par pH-métrie a le mérite d'être simple à interpréter. Cependant, dans les cas où le métal ne se fixe pas seulement sur le tampon déprotoné, et particulièrement si celui-ci présente plusieurs groupes protonables, l'interprétation des données est moins directe et devient terriblement dépendante des hypothèses faites sur les complexes présents (voir ci-après, figure VI.12). Enfin, du point de vue de la sensibilité, les concentrations en solutés (tampon et métal) doivent aussi être suffisamment élevées pour que la libération des protons se traduise par une variation de pH suffisamment grande pour être significative.

○ Interaction entre le tampon Mops et différents divalents

Pour confirmer par une autre méthode le résultat obtenu à l'aide l'antipyrilazo III, nous avons donc également procédé à un titrage par pH-métrie d'un éventuel effet du Mg^{2+} sur le pouvoir tampon du Mops, en suivant scrupuleusement le protocole du papier de 2001 (Azab, Orabi et al. 2001) (figure VI.05).

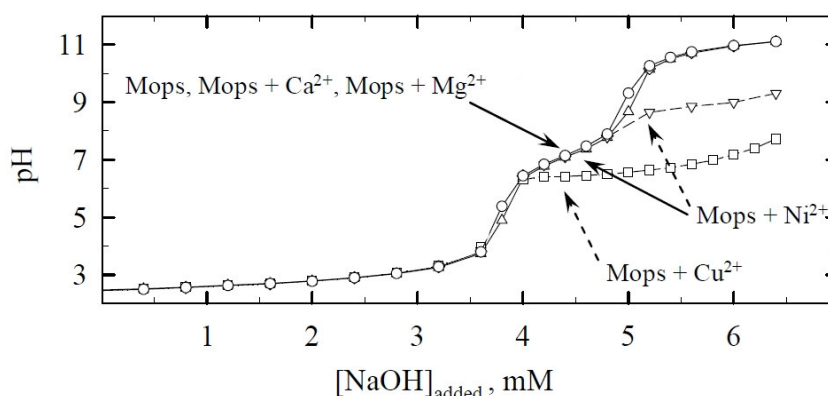


Figure VI.05 : Titrages par pH-métrie destinés à mettre en évidence l'éventuelle fixation de cations divalents sur le Mops. Les conditions expérimentales utilisées ici sont celles décrites dans (Azab, Orabi et al. 2001). 1 mM de Mops est suspendu dans un milieu contenant 100 mM de KNO_3 et 4 mM de HNO_3 (volume final = 25 mL), en absence (triangles) ou en présence de 1 mM d'un cation divalent : du calcium (losanges, *masqués par les autre symboles*), du magnésium (ronds), du nickel (triangles inversés) ou du cuivre (carrés). On ajoute des aliquots successifs de soude concentrée (solution stock à 100 mM) et on suit l'évolution du pH à l'aide d'une électrode de verre couplée à un pH-mètre (Radiometer PHM 240).

Comme le montre l'expérience présentée ici, le titrage par pH-métrie du tampon Mops en absence (triangles) ou en présence de 1 mM de magnésium (ronds) donne deux courbes de titrage parfaitement superposées, signifiant qu'il n'y a *pas* d'interaction significative entre le Mops et le magnésium. D'après l'équation donnée précédemment (voir §1.2.b), si l'affinité supposée de l'ordre de 300 μM s'était révélée vraie, nous aurions dû observer dans ces conditions un décalage du pKa du Mops (7,2) vers une valeur pKa' de l'ordre de 6,7-6,8, décalage qui aurait été parfaitement repérable à l'échelle de précision à laquelle nous travaillons.

De même, le titrage réalisé en présence de calcium confirme qu'il n'y a pas d'interaction entre le Mops et ce cation. Par contre, l'utilisation du nickel et du cuivre révèle un comportement un peu particulier de ces cations, dès la zone de virage pour le cuivre, et se poursuivant dans la zone des pH alcalins pour les deux cations. En mesurant la turbidité de ces échantillons au cours du titrage à l'aide d'un spectrophotomètre, nous avons constaté qu'il y avait apparition d'un précipité à pH alcalin (probablement dû à la présence simultanée de ces cations, du tampon et de l'excès d'ions hydroxydes). Ce domaine de pH n'est que rarement exploré dans nos expériences, et de tels précipités ne peuvent donc pas perturber nos autres mesures, mais cette zone de pH alcalins a toutefois été couverte dans les expériences de pH-métrie montrées ici.

II. DETERMINATION DE LA NATURE DES COMPLEXES « Cd²⁺-GSH » **POUVANT ETRE MIS EN JEU DANS LES PROCESSUS DE** **DETOXICATION CELLULAIRE**

De nombreuses hypothèses existent concernant la nature du ou des complexe(s) formé(s) par le cadmium (Cd²⁺) et le glutathion (GSH). Quand on examine de plus près les données concernant d'une part l'affinité du glutathion pour le cadmium et d'autres part les possibles structures du ou des complexe(s), on constate dans la littérature une grande diversité de résultats. Les conditions expérimentales explorées sont cependant multiples, en termes de pH, de force ionique et de concentration des deux partenaires. Dans ces conditions, et étant donné la nature même du glutathion avec ses quatre niveaux possibles de protonation (figure I.11), il n'est guère étonnant d'obtenir une grande variété de complexes possibles. C'est d'ailleurs le cas avec d'autres métaux comme le zinc, le nickel ou le cuivre (Krezel and Bal 2004; Miras, Morin et al. 2008), pour lesquels on retrouve des complexes similaires.

Du fait de notre expérience au laboratoire dans la manipulation des ligands potentiels de cations divalents, et en collaboration avec Manuel Garrigos, intéressé à la détoxification du Cd²⁺ par la protéine MRP1 évoquée dans l'introduction de cette thèse, nous avons adapté les protocoles de mesure utilisés dans le cas du Mg²⁺ pour essayer de préciser les valeurs des constantes de formation de complexes entre le Cd²⁺ et le GSH, ainsi que la nature de ces complexes, dans les conditions expérimentales utilisées le plus couramment par notre collègue.

Afin de suivre la formation des complexes entre le cadmium et le glutathion, j'ai utilisé trois approches différentes : i) la spectrophotométrie dans l'UV, en utilisant les propriétés spectroscopiques particulières de la liaison entre le soufre du glutathion et le métal (une méthode nouvelle par rapport à notre précédente étude de la chélation du Mg²⁺ par les tampons) ; ii) une seconde approche, déjà évoquée, consistant à suivre la concentration libre en cadmium à l'aide de sondes dont l'absorption ou la fluorescence change avec la liaison au métal ; iii) et aussi la pH-métrie, de nouveau, pour suivre les protons libérés par le GSH lors de chélation du cadmium. Je présenterai quelques uns de mes résultats pour illustrer l'utilisation de ces trois techniques.

1. Utilisation des propriétés spectroscopiques de la liaison entre un groupement sulfhydryl et un métal

Les liaisons chimiques peuvent générer des bandes d'absorption spécifiques. Par exemple, les transferts de charges ayant lieu entre l'atome de soufre d'un groupement sulfhydryle et un métal donnent lieu à des bandes d'absorption caractéristiques (Cheng, Yan et al. 2005; Rousselot-Pailley, Seneque et al. 2006), et ces transferts de charge ont par exemple été récemment utilisés pour suivre les interactions entre le cuivre Cu⁺ et le glutathion (Miras, Morin et al. 2008). Nous avons utilisé ces propriétés d'absorption UV pour suivre la formation de complexes entre le cadmium et le glutathion (Leverrier, Montigny et al. 2007). Néanmoins, il existe de nombreuses autres bandes d'absorption, particulièrement intenses, dans le domaine des UV courts, en deçà de 300 nm (Rouessac and Rouessac 2000), y compris pour les composants « ordinaires » d'un milieu de mesure, et notamment ses tampons ou même les ions chlorures, qui absorbent les courtes longueurs d'onde. Une première précaution sera donc de choisir un solvant dont l'absorption est limitée dans ce domaine : c'est le cas par exemple du phosphate.

Dans le cytoplasme des cellules, les concentrations en cadmium et en glutathion peuvent atteindre plusieurs millimolaires. Pour pouvoir étudier la chélation du Cd²⁺ par de telles concentrations de GSH, nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser dans notre spectrophotomètre des cuvettes ayant un trajet optique de 1 mm, parce que la forte absorbance d'un GSH millimolaire rend impossible l'acquisition de tout son spectre d'absorption, courtes longueurs d'onde comprises, dans les classiques cuvettes de 1 cm.

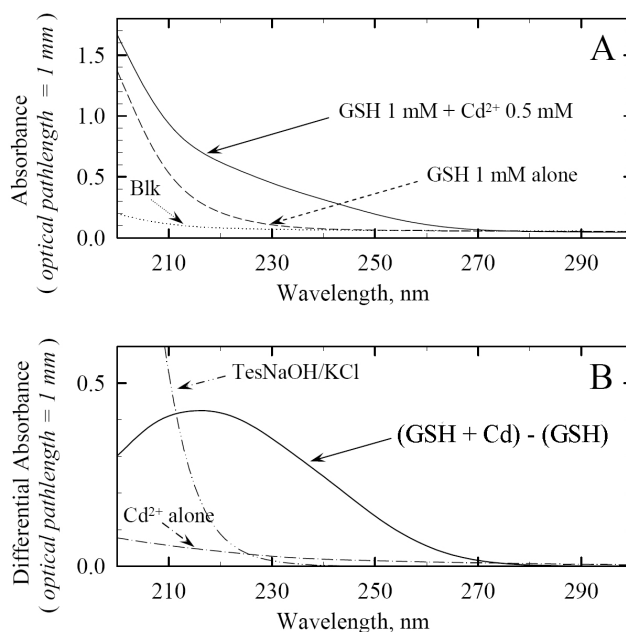


Figure VI.06 : Spectre UV du glutathion en présence ou non de cadmium. Les spectres sont mesurés dans des cuvettes en quartz ayant un trajet optique de 1 mm (pour limiter volontairement l'absorption), dans un tampon phosphate 5 mM pH 7,1 à 20°C (tampon A). Les solutions stocks de glutathion et de cadmium sont par ailleurs préparées à 40 mM dans le tampon B (Tes-NaOH 20 mM pH 7,1 à 20°C, KCl 100 mM). A : le blanc initial est réalisé sur l'air (cuvette vide) ; *ligne pointillée*, cette cuvette est alors remplie avec du tampon phosphate auquel a été ajouté 1/40^{ème} de tampon B, pour mimer la contribution de ce tampon lors des mesures suivantes, et le spectre est enregistré (« Blk ») ; *ligne discontinue (tirets)*, GSH 1 mM ; *ligne continue*, GSH 1 mM additionné de 0,5 mM de Cd²⁺. B : *ligne continue*, spectre de différence « GSH en présence de cadmium (GSH + Cd) » moins « GSH seul (GSH) » ; *ligne discontinue, points-tirets*, spectre du cadmium seul (« Cd²⁺ alone »).

A titre purement indicatif de la forte absorption possible d'un tampon à courtes longueurs d'onde, la *ligne discontinue, double points-tirets*, montre le spectre du tampon B (« TesNaOH/KCl ») non dilué, dans la même cuvette, pourtant de 1 mm seulement de trajet optique.

La [figure VI.06](#) montre le type d'expérience pouvant être menée pour observer la formation de complexes entre un ion métallique et le GSH : le GSH seul absorbe de façon significative, mais l'addition de Cd²⁺ modifie clairement cette absorption ([figure VI.06.A](#)). En présence de glutathion, l'absorption différentielle importante liée à l'addition du Cd²⁺ révèle la formation d'un complexe de transfert de charge formé *via* la fonction sulfhydryle du GSH (spectre de différence « (GSH + Cd) – (GSH) », [figure VI.06.B](#)). En absence de glutathion, le cadmium n'absorbe que très peu (comparer « Cd²⁺ alone » ([figure VI.06.B](#)) et « Blk » ([figure VI.06.A](#))) ; cette petite absorption apparente pourrait peut-être même être attribuée à une légère précipitation du phosphate et du cadmium, qui doit induire une légère turbidité.

Pour la suite, pour faciliter les additions de Cd²⁺, nous avons cependant travaillé dans des cuvettes de 1 cm de chemin optique, qui permettent d'assurer une agitation en continu. Comme l'absorbance du GSH (et des tampons) y est beaucoup plus importante du fait du plus long trajet optique, nous nous sommes contentés du pied de bande des spectres d'absorption, vers 250-270 nm. Nous avons alors enregistré l'absorbance dans nos cuvettes en présence de concentrations variables de Cd²⁺ et de GSH ([figure VI.07](#)). Regardons d'abord les courbes en traits pleins, correspondant à des expériences où nous avons enregistré l'absorbance en présence de concentrations croissantes de Cd²⁺, pour des concentrations différentes mais fixes de GSH.

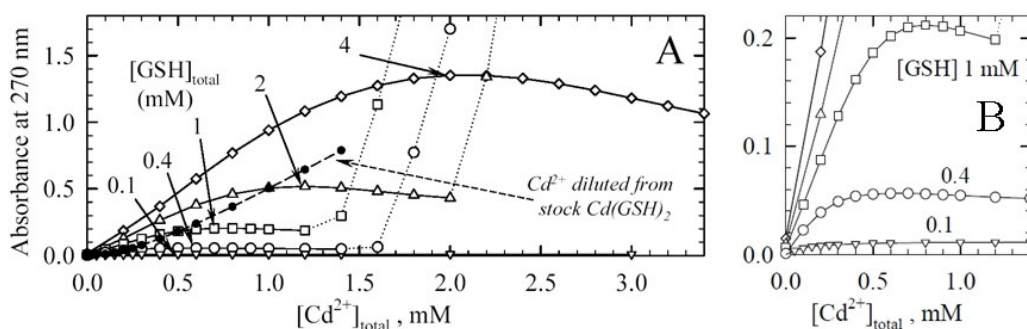
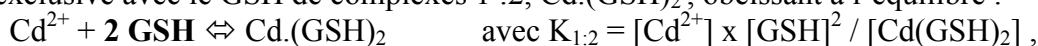
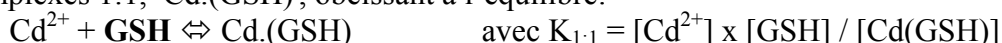


Figure VI.07 : Formation des complexes cadmium-glutathion observé par spectrophotométrie dans l'UV.
 A. absorption à 270 nm d'un mélange cadmium-glutathion : On ajoute des quantités croissantes de cadmium à une solution contenant des concentrations fixes de GSH, 0,1 mM (triangles inversés), 0,4 mM (ronds), 1 mM (carrés), 2 mM (triangles) et 4 mM (losanges) dans le tampon 50 mM Tes-NaOH, 50 mM KCL à pH 7,4 et 20°C. Une expérience supplémentaire a été réalisée en ajoutant dans le tampon sans GSH, une quantité donnée d'un mélange 10 mM Cd²⁺ et 20 mM GSH. B. agrandissement du panneau A.

La littérature consacrée à la détoxication du Cd²⁺ mentionne le plus souvent la formation quasi-exclusive avec le GSH de complexes 1 :2, Cd.(GSH)₂, obéissant à l'équilibre :



Mais on ne peut bien sûr pas exclure la formation simultanée, avec une certaine affinité, de complexes 1:1, Cd.(GSH), obéissant à l'équilibre:



Quel que soit le poids relatif de ces deux types de complexes, la première information qui émerge de la figure [figure VI.07](#) est que le(s) complexe(s) Cd.(GSH)_n ne se forme(nt) qu'avec une affinité *assez faible* : si cette affinité était vraiment forte (par rapport aux concentrations millimolaires utilisées ici), les pentes initiales de toutes les courbes de titration devraient être identiques tant que l'on a une concentration en Cd²⁺ très inférieure à celle en GSH (ou à la moitié de la concentration de GSH), et la rupture de pente en ce point serait brutale. Or, ces titrations montrent qu'il n'en est rien, suggérant que l'affinité du GSH pour le cadmium n'est pas très élevée ([figure VI.07.A](#)).

La deuxième information qui émerge de la [figure VI.07](#) est que la formation annoncée comme quasi-exclusive de complexes Cd.(GSH)₂ n'est pas toujours au rendez-vous : cela semble être le cas à forte concentration en GSH, puisque l'absorbance observée est alors maximale pour environ 2 GSH par Cd²⁺ (4 mM GSH, 2 mM Cd²⁺), mais c'est loin d'être le cas à faible concentration en GSH ([figure VI.07.B](#)). A faible concentration en GSH, les complexes 1:1 sont donc probablement majoritaires. La relativement faible affinité avec laquelle se forme le complexe 1:2 est également évidente si l'on mesure l'absorbance de solutions obtenues par dilutions d'une solution mère concentrée dans laquelle ce complexe 1:2 a été préalablement formé (on le suppose du moins) : l'absorbance y est moins élevée qu'à concentrations de Cd²⁺ identiques mais à concentrations de GSH plus élevées (courbe en tirets dans la [figure VI.07.A](#)).

Cette approche par spectroscopie présente quelques difficultés. Tout d'abord, selon que le cadmium se lie à un ou deux GSH simultanément, *i.e.* à un ou deux atomes de soufre, le maximum d'absorption du complexe de transfert de charge est réputé se déplacer vers les plus grandes longueurs d'onde, avec un coefficient d'absorption molaire plus faible pour le complexe 1:1 que pour le complexe 1:2 (ces propriétés spectrales différentes des complexes 1:1 et 1:2 peuvent éventuellement permettre de les différencier) ([Rousselot-Pailley, Seneque et al. 2006](#)). Dans notre cas, les spectres observés sont la résultante d'une combinaison linéaire entre les spectres des différentes espèces en solution, qui au final ne sont pas cependant faciles à décomposer.

Une autre limite de cette approche par spectroscopie est de ne faire apparaître que les complexes mettant en jeu une liaison du cadmium au GSH *via* la fonction sulfhydryle, la probable chélation du cadmium *via* les groupements carboxyl du GSH restant invisible : cette technique ne suffit pas pour suivre l'ensemble des complexes existants.

Nous avons donc choisi, en complément, et comme précédemment pour mesurer la complexation du magnésium aux tampons, d'utiliser pour mesurer la complexation du Cd^{2+} au GSH des sondes métalochromiques sensibles au Cd^{2+} libre, ainsi que la pH-métrie. L'ensemble des résultats obtenus a servi finalement de base pour une série de simulations informatiques visant à déterminer les valeurs des constantes d'association des nombreux complexes probablement mis en jeu.

2. Utilisation de sondes colorées ou fluorescentes pour titrer la quantité de cadmium libre en présence de glutathion

Il est possible de suivre les interactions Cd^{2+} / GSH en titrant la quantité de Cd^{2+} libre en solution à l'aide de sondes colorées (nous avons utilisé la murexide) ou fluorescentes (nous avons utilisé le FluoZin-1).

○ Une sonde colorimétrique, la murexide, pour l'étude de la chélation du Cd^{2+} par le GSH

Il existe de nombreux indicateurs métalochromiques, *i.e.* des sondes chimiques qui vont changer de spectre suite à la fixation d'un ion métallique. Parmi les sondes classiquement utilisées pour la détection du calcium libre en solution, on a déjà mentionné l'antipyrilazo III, et on trouve aussi la murexide¹³. La murexide est connue pour fixer de nombreux cations mono-, di- ou trivalents, avec des affinités très variables, de plusieurs centaines de millimolaires pour les ions potassium, sodium ou magnésium, millimolaire pour le calcium, voire sub-millimolaire pour certains lanthanides (Ohnishi 1978).

Nous avons montré que la murexide est également sensible au cadmium, et peut donc servir de rapporteur pour la détection de cet ion (figure VI.08). Nous avons observé une compétition entre la murexide et le glutathion pour la fixation du cadmium, et l'on peut donc par ce biais déterminer une affinité apparente du GSH pour ce cation. En absence de KCl, on peut estimer $K_{\text{diss}}^{\text{Cd}^{2+}}_{\text{Cd.GSH}} \sim 20\text{-}40 \mu\text{M}$. En présence de 50 mM de KCl, l'affinité apparente du cadmium pour le GSH diminue, avec $K'_{\text{diss}}^{\text{Cd}^{2+}}_{\text{Cd.GSH}} \sim 40\text{-}80 \mu\text{M}$, suggérant une compétition probable, soit des ions chlorures avec le GSH pour la fixation du cadmium, soit entre le K^+ et le Cd^{2+} pour la fixation sur la sonde, soit les deux.

¹³ Le purpurate d'ammonium, ou murexide, tient son nom de la pourpre, une teinture d'un rouge violacé, et du petit gastéropode dont elle était extraite, le murex. Dans l'Antiquité, les phéniciens, et tout particulièrement les habitants de la région de Tyr (l'actuelle presqu'île de Soûr au Liban) étaient réputés pour leurs talents de teinturiers. Le murex était recueilli sur les plages pour être broyé, la pourpre étant produite par des glandes de ce petit mollusque (Gras, 1995). Cette pourpre, synonyme de pouvoir, était la couleur dont se paraient les empereurs et autres dignitaires de la Rome antique, et dont se sont longtemps vêtus les cardinaux. En analyse chimique, elle est utilisée depuis plus de 50 ans comme indicateur métalochromique (Scarpa, 1979).

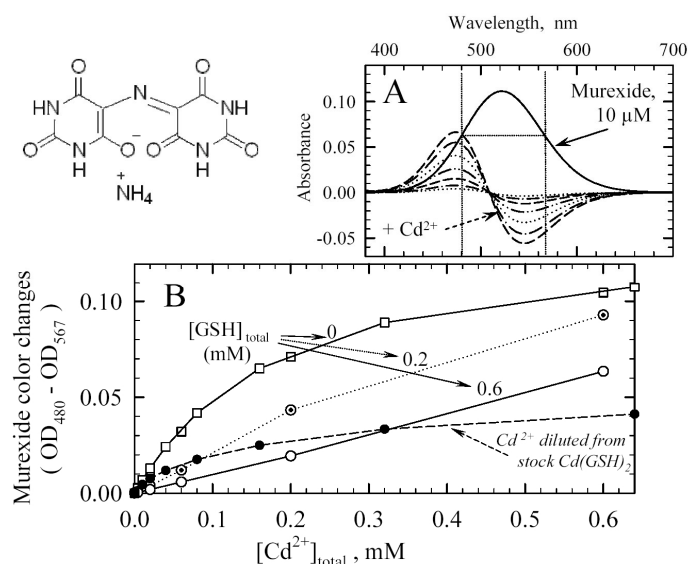


Figure VI.08 : Détection par la murexide du cadmium libre, et estimation de la chélation du cadmium par le glutathion. Insert, en haut à gauche : formule chimique de la murexide. *A. Changements d'absorption de la murexide en présence de cadmium :* ligne continue, spectre d'absorption de 10 μM de murexide dans un tampon 50 mM Tris-Mes et KCl 50 mM, pH 7 à 37°C. On observe un maximum d'absorption à 523 nm. On réalise alors un nouveau blanc sur cette cuvette contenant la murexide, et on enregistre ensuite les spectres différentiels observés après des additions successives de cadmium. Pour analyser les résultats, et afin d'avoir un signal différentiel important tout en s'affranchissant des effets de dilution, on choisit deux longueurs d'ondes pour lesquelles les signaux différentiels sont de signes opposés mais pour lesquelles le niveau d'absorption initial de la murexide (en absence de Cd²⁺) est le même (ici, 480 et 567 nm, (Ohnishi 1978)). *B. Changements d'absorption de la murexide en fonction de la concentration totale en cadmium :* on suit les changements d'absorption de la murexide en absence (carrés) ou en présence de différentes concentrations en GSH, 0,2 mM (ronds pointés) ou 0,6 mM (ronds blancs), dans le même tampon que pour le panneau A. En absence de GSH, on peut déterminer l'affinité apparente de la murexide pour le cadmium en reportant ces différences d'absorption en fonction de la concentration de cadmium ajouté : on trouve ici $K_{Cd,Mx} \sim 300 \mu M$. En présence de GSH, on observe un décalage de l'affinité vers la droite, suggérant une compétition du GSH avec la murexide pour la fixation du cadmium : à une concentration de GSH donnée, par exemple $[GSH] = 0,2 \text{ mM}$, quand on ajoute 0,2 mM de cadmium total, on observe le même changement d'absorption qu'à 0,08 mM de cadmium en absence de GSH, ce qui suggère que l'on a environ 0,08 mM de cadmium libre (et 0,120 mM de cadmium impliqué dans des complexes avec le GSH) : ce résultat montre une affinité relativement faible du GSH pour le cadmium, la majeure partie du ligand restant sous forme libre.

Une expérience supplémentaire a été réalisée en ajoutant dans le tampon sans GSH des quantités variables d'une solution concentrée 10 mM Cd²⁺ et 20 mM GSH précédemment préparée, comme pour la figure VI.07. Les résultats montrent que le(s) complexe(s) cadmium-GSH formé(s) dans la solution concentrée le sont de façon dynamique, puisqu'ils se dissocient lors de la dilution.

○ Utilisation de la murexide pour suivre la chélation du cadmium par d'autres molécules

Afin de définir les meilleures conditions expérimentales pour l'étude des interactions entre Cd²⁺ et GSH, nous avons parcouru les tables où sont listées les associations connues entre tampons et cations divalents (Magyar and Godwin 2003). En effet, les tampons utilisés couramment en biologie (Good, Winget et al. 1966; Magyar and Godwin 2003), qui sont essentiellement des acides et des bases faibles, vont peut-être fixer des cations et ainsi réduire la concentration de cation libre. C'est également le cas des ions chlorures apportés avec les sels (NaCl, KCl). Les cations ainsi piégés ne seraient pas disponibles pour se lier sur les molécules dont on veut titrer l'affinité. Nos mesures ont confirmé l'existence de telles associations (voir figure VI.09).

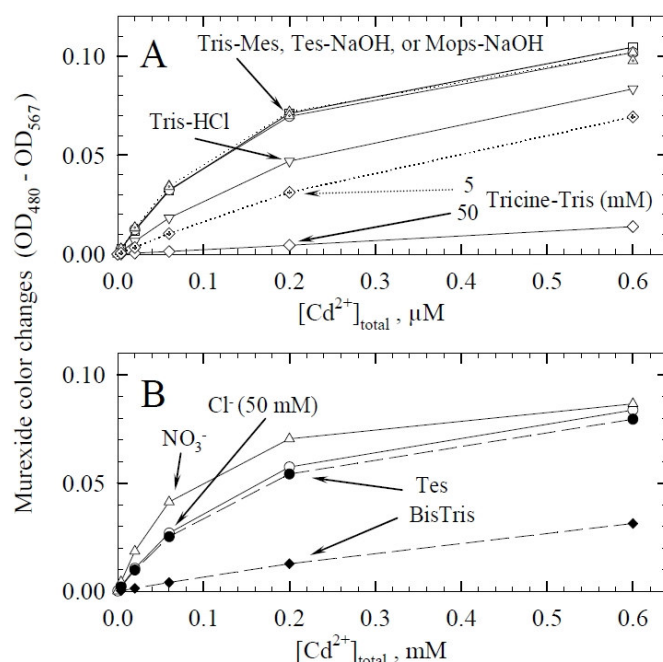


Figure VI.09 : Utilisation de la murexide pour suivre la chélation du Cd^{2+} par divers tampons et les ions chlorures. La murexide est utilisée à 10 μM . Le cadmium est titré comme décrit précédemment (voir [figure VI.08](#)). A : Le milieu de mesure contient 50 mM de KCl, ainsi 50 mM des tampons suivants, Tris-Mes (carrés), ou Tes-NaOH (ronds), ou Mops-NaOH (triangles), ou Tricine-Tris (losanges), ou encore Tris-HCl (triangles inversés) ; dans tous les cas, le pH est ajusté à 7 à 37°C. Cette figure montre que les tampons Tris-Mes, Tes-NaOH et Mops-NaOH donnent des résultats similaires et démontrant leur absence d'interaction avec le métal, alors que la présence de Tricine-Tris occasionne un déplacement important de l'affinité vers la droite qui correspond à une compétition entre la Tricine et la murexide pour la fixation du cadmium ([Holmes, Smith et al. 1995](#)). Dans le cas du tampon Tricine-Tris qui chélate le Cd^{2+} très fort, un cas intermédiaire a été testé, en utilisant seulement 5 mM de tampon et en complétant avec 45 mM de Tris-Mes (losanges pointés). B : *lignes continues*, on reproduit les mêmes expériences qu'en A, en présence de 50 mM de tampon Tes-NaOH pH 7 à 37°C, ou bien en présence de 50 mM KCl (ronds), ou bien en présence de 50 mM KNO_3 (triangles). On constate que la présence de 50 mM de chlorure déplace l'affinité apparente de la sonde pour le cadmium vers la droite, indiquant une certaine complexation du cadmium par ces ions chlorures ; *lignes pointillées*, les titrages sont réalisés en présence de 1 M KNO_3 , en présence de 50 mM Tes-NaOH (ronds noirs) ou de 50 mM tampon BisTris-Mes (losanges noirs), à pH 7 et 25°C. On observe une compétition importante entre le BisTris et la murexide pour la fixation du cadmium, les valeurs d'affinités apparentes mesurées étant concordantes avec la valeur de $\log K_{\text{Cd,BisTris}}^{\text{Cd}} = 2,47$ publiée ([Magyar and Godwin 2003](#)). Dans cette dernière série d'expériences, la solution de murexide avait été préparée le jour précédent et avait donc déjà été exposée à la lumière, ce qui explique probablement la perte de 10 % de son absorbance par rapport à la veille.

- Une sonde fluorescente, le FluoZin-1 sensible au cadmium, pour l'étude de la complexation du Cd^{2+} par le GSH. L'utilisation du FluoZin-1 révèle aussi l'adsorption du Cd^{2+} (et sans doute d'autres divalents) sur les parois de la cuvette

Les indicateurs fluorescents sensibles aux ions métalliques permettent souvent des dosages plus sensibles que les indicateurs métallochromiques seulement colorés. Pour cette raison, la mise au point d'indicateurs fluorescents sensibles aux ions métalliques a été particulièrement utile (notamment pour les dosages à l'intérieur des cellules). Il existe une immense variété d'indicateurs fluorescents permettant la détection de la plupart des ions impliqués dans des processus biologiques, par exemple le potassium ou le sodium ([Minta and Tsien 1989](#)), le calcium ([Tsien 1980](#); [Grynkiewicz, Poenie et al. 1985](#)), le magnésium ([Raju, Murphy et al. 1989](#)), le zinc ([Godwin and Berg 1996](#); [Walkup and Imperiali 1997](#); [Gee, Zhou et al. 2002](#)), ainsi bien sûr que les protons ([Rink, Tsien et al. 1982](#); [Bassnett, Reinisch et al. 1990](#)) (pour des références complémentaires, consulter également « *Molecular Probes : The Handbook* », *Invitrogen*).

En ce qui concerne spécifiquement le Cd^{2+} , son impact sur l'environnement et les organismes a notamment conduit au développement récent de sondes fluorescentes sensibles à ce cation. La plupart des molécules actuellement disponibles et sensibles au cadmium fixent cependant également de nombreux métaux lourds (Hg^{2+} , Pb^{2+} ,...), voire d'autres divalents comme le Zn^{2+} (Godwin and Berg 1996; Walkup and Imperiali 1997). A ce jour, il n'existe que trois sondes vraiment sélectives pour le cadmium vis-à-vis du zinc (Gunnlauugsson, Lee et al. 2003; Gunnlauugsson, Lee et al. 2004; Peng, Du et al. 2007); ces sondes ne sont cependant pas encore commercialisées, et d'ailleurs les expériences que nous souhaitons réaliser ne nécessitaient pas l'utilisation de sondes aussi sélectives. Parmi les autres sondes, répondant donc à la fois au cadmium et à d'autres cations divalents, on trouve la sonde FluoZin-1. Initialement développée pour la détection du zinc (Gee, Zhou et al. 2002), cette sonde présente un comportement très similaire vis-à-vis du cadmium. Il s'agit d'une molécule dérivée de la fluorescéine dont le niveau d'émission de fluorescence, quasi-nul en absence de ces ions, augmente d'un facteur 200 à 300 en présence de cadmium. Elle est très peu sensible aux variations de pH. Cette sonde possède une affinité pour le cadmium de l'ordre de 40 μM , adaptée à la gamme de concentrations dans laquelle nous souhaitons travailler (voir figure VI.10).

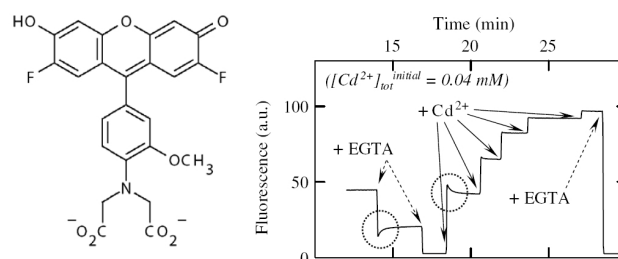


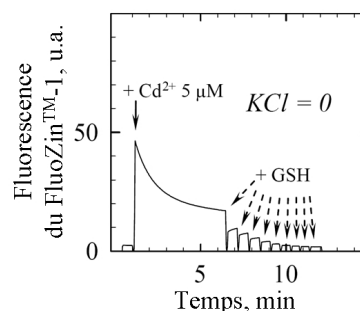
Figure VI.10 : Détection du cadmium libre par le FluoZin-1. A gauche : Formule chimique du FluoZin-1. A droite : on enregistre la fluorescence du FluoZin-1 avec $\lambda_{\text{excitation}} = 495 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 515 \text{ nm}$ (le spectre est voisin de celui de la fluorescéine). La cuvette contient initialement 50 mM Tes-NaOH à pH 7 (20°C), 50 mM KCl, 0,04 mM Cd^{2+} et 1 μM de sonde FluoZin-1. On fait ici deux ajouts successifs de 0,02 mM d'EGTA, chélateur fort du Cd^{2+} (comme du Ca^{2+}). Après la deuxième addition, le cadmium libre est quasiment nul et le FluoZin-1 ne fluoresce pratiquement plus (~2% de la fluorescence totale). On procède ensuite à la réaddition de Cd^{2+} (concentrations ajoutées finales successives : 0,04, 0,08, 0,16, 0,32, et enfin 0,64 mM). L'addition d'un large excès d'EGTA permet finalement de revenir au niveau de fluorescence minimum. On peut déterminer approximativement l'affinité du FluoZin-1 pour le cadmium en reportant ces niveaux de fluorescence (corrigés du niveau de fluorescence en absence de cadmium) en fonction de la concentration de cadmium ajouté (pour exemple, voir figure 3 dans (Leverrier, Montigny et al. 2007)).

Des signaux transitoires (encadrés en pointillé) sont observés dans cette expérience simple. Ils révèlent l'adsorption possible du Cd^{2+} sur les parois de quartz (voir texte).

Incidemment, et indépendamment de toute chélation du Cd^{2+} par le GSH, cette sonde nous a également permis de mettre en évidence une *adsorption* significative de cadmium sur les parois des cuvettes (phénomène qui reste invisible lors des mesures dans l'UV ou les titrages par pH-métrie). Dans une mesure *in vitro*, le récipient lui-même peut en effet être responsable d'une complexation partielle des divalents. Par exemple, en spectrophotométrie ou en spectrométrie de fluorescence, les cuves en quartz utilisées (ce serait également vrai pour des cuves en verre) sont composées de silicates. Les silicates sont chargés négativement, et les cations en solution sont donc susceptibles de pouvoir s'y associer : la concentration de cation libre en solution sera alors inférieure à la concentration attendue, et l'affinité apparente de la fixation du cation sur un autre ligand (tel le GSH) sera nécessairement plus faible que l'affinité vraie. Ce phénomène pourra être particulièrement significatif pour de faibles concentrations totales de cations, parce que la fraction fixée aux parois ne sera peut-être plus du tout négligeable par rapport à la concentration totale d'ions dans le milieu, et il pourra être encore plus significatif en absence de compétiteurs cationiques (par exemple Na^+ ou de K^+) de la fixation du Cd^{2+} sur les silicates. De fait, on constate sur les figure VI.10 et bien plus encore sur la figure VI.11 la présence de signaux transitoires lors de la chélation ou l'addition de cadmium. L'explication, par exemple, d'un

« overshoot » lors d'une addition de Cd^{2+} , est probablement que le cadmium ajouté dans la cuvette, initialement capté par le FluoZin-1, va progressivement se re-dissocier du FluoZin-1 pour aller « tapisser » les parois de la cuvette.

Figure VI.11 : Fixation du Cd^{2+} aux parois des cuvettes de spectrométrie, artefact pour l'évaluation de la complexation du Cd^{2+} par le GSH. La cuvette (en quartz) contient 1 μM de FluoZin-1 dans le tampon Mops-NaOH 50 mM pH 7,4, à 20°C, ici en absence de KCl (au contraire de la figure précédente). Après quelques minutes, on ajoute 5 μM de Cd^{2+} . L'« overshoot » observé révèle que le Cd^{2+} ajouté s'adsorbe lentement sur les parois. Après stabilisation du signal de fluorescence, on peut ajouter des doses croissantes de GSH pour titrer la chélation du cadmium par ce GSH, mais l'affinité apparente ainsi déduite est parasitée par la fixation sur les parois.



L'adsorption du cadmium aux silicates a déjà été décrite auparavant à pH alcalin, montrant la participation possible des ions hydroxydes dans ces associations (King, Rodrigue.Jm et al. 1974). Ce phénomène d'adsorption a lieu aussi sans aucun doute dès que les titrages sont réalisés dans des récipients en verre. Mais la quantité totale de cadmium susceptible de se fixer aux parois, limitée par la surface du récipient, passera d'autant plus inaperçue que la concentration totale en cadmium sera plus élevée.

Malgré ce phénomène, on peut tenter d'estimer l'affinité du cadmium pour le GSH en réalisant des additions successives de GSH. Comme précédemment avec la murexide, on trouve une valeur de l'affinité apparente du cadmium pour le GSH de l'ordre de 20 à 40 μM en absence de chlorure dans le milieu (données non montrées ici).

3. Titrage par pH-métrie de la formation des complexes « Cd-GSH »

Nous avons finalement également utilisé cette méthode classique pour évaluer les interactions du cadmium avec le GSH (figure VI.12, panneau A).

Mais le Cd^{2+} interagit différemment avec les formes plus ou moins protonées du GSH, et de telles données mettent en jeu de très nombreux équilibres : leur interprétation requiert donc des simulations, toutes dépendantes du modèle d'interaction choisi. A l'aide du logiciel « Jchess » de simulation des équilibres chimiques (van der Lee, De Windt et al. 2002), nous avons tenté de simuler nos résultats expérimentaux (par « essai-et-erreur »), et donc finalement proposé un jeu de constantes d'association permettant de reproduire raisonnablement l'ensemble de nos résultats expérimentaux, obtenus non seulement par pH-métrie, mais également par spectrophotométrie dans l'UV, à l'aide de la murexide et aussi par fluorescence du FluoZin-1) (figure VI.12, panneau A). Ce jeu de constantes s'est révélé bien plus adapté que ceux proposés dans la bibliographie (figure VI.07, panneaux D-F).

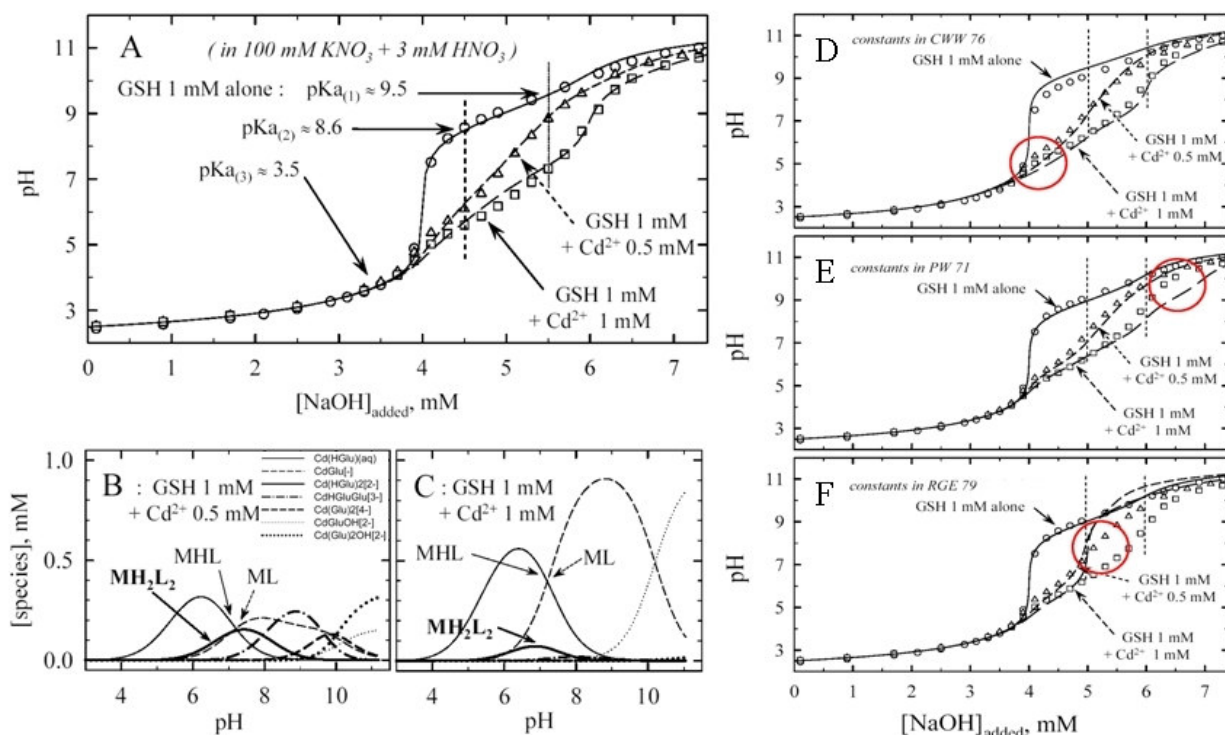


Figure VI.12 : Titrage par pH-métrie de la déprotonation du GSH en présence ou non de cadmium. A : Le GSH est suspendu à 1 mM dans 100 mM de KNO_3 et 3 mM de HNO_3 à 20°C, en absence (ronds) ou présence de 0,5 mM (triangles) ou 1 mM (carrés) de cadmium, et on ajoute de la soude. Le pH de la solution est mesuré après chaque ajout de NaOH. Dans ce panneau, les lignes continues correspondent au résultat de la simulation avec le logiciel JChess de ces expériences, en adoptant le jeu de constantes d'association qui rend compte au mieux (par tâtonnement) de ces titrages mais également des expériences de spectrophotométrie UV. B & C : Diagramme des espèces présentes en solution en fonction du pH, déterminé à partir du même jeu de constantes. D, E & F : Essais alternatifs d'ajustement des valeurs expérimentales obtenues en A, avec d'autres jeux de constantes disponibles dans la bibliographie : #CW76 (Corrie, Walker et al. 1976), #PW71 (Perrin and Watt 1971) et #RGE79 (Rabenstein, Guevremont et al. 1979). Les cercles rouges repèrent les zones de la courbe simulée présentant une importante divergence avec les valeurs expérimentales.

Pour obtenir ce jeu de constantes, nous avons considéré un à un les différents niveaux de protonation possibles du GSH, et ajouté dans la base de données du logiciel les complexes correspondants, en optimisant leurs constantes de dissociation. Nous avons volontairement laissé de côté les complexes mettant en jeu plus d'un métal ou plus de deux GSH (par exemple M_2L , $\text{M}_2\text{H}_3\text{L}_3$, MH_3L_3 , parfois mentionnés (Perrin and Watt 1971; Rabenstein, Guevremont et al. 1979)), qui ne se forment sans doute que pour des concentrations totales plus élevées que celles que nous avons utilisées. En revanche, nous avons volontairement inclus les complexes avec les hydroxyles, possibles à pH alcalin, qui se sont avérés utiles pour rendre compte de la fin de nos titrages, et qui sont souvent laissés de côté dans la bibliographie (voir aussi [Supplemental figure 2](#) dans (Montigny and Champeil 2007)). Pour la simulation des expériences de spectrophotométrie, nous avons tenu compte de l'association du cadmium avec les ions chlorure.

Le diagramme d'espèces que nous obtenons à partir de ce jeu de constantes ([figure VI.12, panneaux B et C](#)) montre qu'à pH physiologique, et même à concentration millimolaire de GSH lorsqu'il y a moitié moins de cadmium que de GSH (panneau B), le complexe 1:2 n'est pas forcément une forme dominante en solution.

A noter qu'indépendamment de ces simulations, nos expériences de spectroscopie montrent que le complexe cadmium-glutathion est en équilibre dynamique : la dilution ou l'ajout d'un compétiteur conduit à la redistribution instantanée des espèces en solution (voir [figure 5A](#) dans (Leverrier, Montigny et al. 2007) et les expériences de dilution d'une solution concentrée dans les [figures VI.07 & 08](#)).

4. Discussion et conclusions

a. Chélation du cadmium par le glutathion *in vitro*

Comme rappelé au début de ce chapitre, la nature des complexes formés entre le GSH et le cadmium *in vivo* est très controversée. Cependant, à lire les tables de constantes disponibles dans la bibliographie, on constate que les conditions de détermination de ces constantes ont été très diverses en termes de concentrations, de forces ioniques, de températures et de pH. Ces constantes, même si elles sont correctes dans un contexte expérimental particulier, peuvent ne pas refléter les multiples interactions pouvant être mises en jeu dans un autre contexte. La nature même du GSH avec ses quatre groupements protonables (voir [figure I.11](#)) suggère que les conditions expérimentales vont être critiques dans sa capacité à fixer les cations divalents, l'affinité du GSH pour ces cations étant évidemment variable selon son degré de protonation. En outre, nous avons vu que la détermination de ces constantes individuelles était très « modèle-dépendante », c'est-à-dire que la constante d'association déterminée pour un complexe donné dépendait des hypothèses que l'on faisait sur la formation de complexes voisins.

Dans le cadre de ce travail, nous avons montré que dans un milieu dit physiologique (tamponné aux environs de pH 7, avec 50 mM de KCl et des concentrations en cadmium et GSH allant de quelques micromolaires à plusieurs millimolaires), le complexe 1:2 Cd.(GS)₂ est loin d'être majoritaire, contrairement à l'idée fréquemment exprimée. Nous avons constaté que l'affinité du GSH pour le cadmium était sans doute relativement faible, avec une prédominance d'un complexe 1:1 pour des concentrations en GSH submillimolaires ([figure 5](#) dans ([Leverrier, Montigny et al. 2007](#))). L'utilisation de la murexide et du FluoZin-1 pour suivre la quantité de cadmium libre en fonction de la concentration en GSH nous a permis de confirmer dans nos conditions expérimentales une constante d'affinité apparente du GSH pour le cadmium de l'ordre de 40 à 80 μ M ([figures 2 et 3](#) dans ([Leverrier, Montigny et al. 2007](#))).

b. Chélation du cadmium par le glutathion *in vivo* ?

A ce stade, il convient de rappeler que dans la levure, le cytosol contient tout de même en permanence plusieurs millimolaires de GSH ([Meister 1988](#)). Un éventuel cadmium présent dans le milieu extracellulaire va entrer progressivement dans la levure *via* le transporteur du zinc Zrt1p ([Gomes, Fragoso et al. 2002](#)), et se trouver immédiatement en présence de concentrations millimolaires en glutathion réduit, des conditions « *in vivo* » malgré tout favorables à la formation de complexes M.L₂ ([Nagy, Montigny et al. 2006](#)), Notons d'ailleurs que ces complexes n'auront pas besoin de systèmes enzymatiques ([Adamis, Gomes et al. 2004](#); [Adamis, Mannarino et al. 2009](#)) pour se former. Si par ailleurs l'affinité des protéines de détoxication (par exemple Ycf1p dans la levure) pour ces complexes est micromolaire voire submicromolaire ([Li, Lu et al. 1997](#)), les complexes formés, même à faible concentration, seront très efficacement pris en charge par le transporteur pour être stockés dans la vacuole. De plus, et y compris dans d'autres types cellulaires, on sait qu'il existe d'autres transporteurs de type MRP, à la membrane de la vacuole et à la membrane plasmique, pouvant potentiellement transporter des composés conjugués au glutathion et sans doute le Cd²⁺ ainsi conjugué ([Kolaczowski, Kolaczowska et al. 1998](#)).

c. Chélation du cadmium par d'autres ligands potentiels

A l'occasion des expériences concernant la chélation éventuelle des divalents par les tampons (voir §I.2.), nous avons confirmé la chélation déjà connue du cadmium par des tampons comme la Tricine ou le Bis-Tris ([Magyar and Godwin 2003](#)), rappelant combien il est important de bien choisir le tampon utilisé ; les ions chlorure sont aussi, du fait de leur concentration élevée, des compétiteurs non-négligeables (voir [Supplemental figure S1](#) dans ([Leverrier, Montigny et al. 2007](#)) ; voir également [figure VI.09](#)).

d. Conclusion

Ce travail a montré que les complexes cadmium-glutathion étaient en équilibre dynamique et que l'affinité du glutathion pour le cadmium était relativement faible. *In vitro*, la manipulation de ces complexes est délicate, la moindre dilution ayant un effet direct sur la nature des espèces en présence dans la solution, à moins de travailler comme le font certains chimistes, et particulièrement ceux qui utilisent la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) pour caractériser ces complexes, en présence de plusieurs centaines de millimolaires de glutathion (Rabenstein, Guevremont et al. 1979; Rabenstein 1989). *In vivo*, ce manque d'affinité est probablement compensé par la très importante concentration cytosolique en glutathion.

III. CONCLUSION GENERALE

Dans un milieu biologique, l'association de deux molécules est un processus défini par des équilibres simples mais pouvant être influencés, comme nous l'avons vu, par de nombreux paramètres.

J'ai proposé au travers de ce chapitre plusieurs méthodes permettant de vérifier ou de déterminer de façon simple, avec souvent peu de matériel, la valeur de ces constantes dans les conditions de l'expérience conduite au laboratoire. Cette vérification est particulièrement justifiée quand la formation du complexe est un des paramètres majeurs du phénomène étudié. Notre expérience avec l'interaction supposée de la molécule tampon Mops avec le Mg^{2+} ((Azab, Orabi et al. 2001), citée dans une revue générale (Magyar and Godwin 2003)), montre de plus qu'il est parfois nécessaire de vérifier le contenu des tables de constantes avant de les utiliser de façon trop hâtive (Montigny and Champeil 2007).

Dans les cas les plus complexes, ces tables récapitulent un certain nombre de valeurs pour les diverses constantes d'équilibre impliquées dans ces associations. Toutefois, le travail présenté dans ce chapitre montre que même les constantes déterminées avec soin doivent être utilisées avec précaution, en prenant garde dans un premier temps à comprendre exactement quel est l'équilibre mis en jeu (nature des espèces) et dans quelles conditions sa constante a été déterminée ($T^{\circ}C$, pH, force ionique, concentrations des solutés...) (et aussi bien sûr de quel type de constante il s'agit exactement : absolue, apparente, cumulée...). La revue de ces constantes d'association est un travail fastidieux, à cause du volume de données à compiler et du fait que les conditions de mesures ne sont pas forcément standardisées d'une expérience à une autre. La prise en compte de toutes les compétitions susceptibles d'être mises en jeu dans une expérience donnée est aussi évidemment compliquée, et les constantes d'association absolues rapportées dans les bases de données de chimie ne sont pas forcément applicables dans les conditions particulières utilisées par un expérimentateur donné. Il convient donc, si la chose est critique, de vérifier par soi-même ces valeurs de constantes dans les conditions expérimentales souhaitées : heureusement, cette vérification peut souvent passer par l'utilisation croisée de techniques simples à mettre en œuvre.

**MANUSCRIPT #6 : USE OF METALLOCHROMIC DYES AND
POTENTIOMETRIC pH-METER TITRATION TO DETECT
BINDING OF DIVALENT CATIONS TO "GOOD'S" BUFFERS:
4-MORPHOLINEPROPANESULFONIC ACID (MOPS)
*DOES NOT BIND Mg^{2+} .***

Montigny C and Champeil P

Analytical Biochemistry 2007, 366 : 96-98.

Notes & Tips

Use of metallochromic dyes and potentiometric pH-meter titration to detect binding of divalent cations to “Good’s” buffers: 4-morpholinepropanesulfonic acid (Mops) does *not* bind Mg^{2+}

 Cédric Montigny, Philippe Champeil ^{*}

CNRS, URA 2096 (Protéines Membranaires Transductrices d'Énergie) and CEA, DSV, DBJC, SBFM (Laboratoire de Transport et Détoxication membranaire), CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Received 21 December 2006

Available online 24 February 2007

It has long been known that pH buffers used for biochemistry experiments may also bind divalent cations and that caution is therefore needed when selecting a buffer for a particular experiment [e.g., [1–6]]. For our own experiments with a Ca^{2+} -transporting, Mg^{2+} -requiring, and ATP-dependent enzyme (SERCA1a, a membranous Ca^{2+} pump), we initially had selected Mops¹, as many of our colleagues were also doing, as one of a few reportedly innocuous buffers. Yet, in a very nice review published in *Analytical Biochemistry* in 2003 [7] emphasizing the pitfalls associated with the binding of divalent cations to unfortunately noninnocent buffers, we discovered that Mops had been reported not only to bind “soft” or “borderline” divalent cations such as Cd^{2+} , Ni^{2+} , or Cu^{2+} but also to bind Mg^{2+} , a prototype of “hard” metal ions (Table 1 in that review). The reference quoted by the review was a work by Dr. Azab et al. [8] published in 2001 in a chemistry journal. Needless to say, we were greatly alarmed to read that Mops was binding Mg^{2+} *quite strongly*, with $\log \beta_1 = 3.51$, i.e., with submillimolar affinity (Table 1 in the review, and Dr. Azab's Table 7), and that ternary Mops- Mg^{2+} -ATP complexes could even form! Such a submillimolar affinity for the mere binary complex would be a disaster for all those (like us) who routinely perform experiments with, say, 20 or 50 mM Mops and yet without

further thought interpret the effects that they observe at millimolar total concentrations of Mg^{2+} (say, in the absence of ATP) as revealing millimolar dissociation constants for binding of this ion to its protein targets: if the affinity of Mops for Mg^{2+} really is submillimolar then most of the total Mg^{2+} under such circumstances must be bound to Mops and true dissociation constants for binding of free Mg^{2+} to its protein targets must be much lower than previously estimated! We then performed a few measurements under various conditions using a classical metallochromic indicator (antipyrilazo III) to detect free Mg^{2+} . We also repeated potentiometric pH-meter experiments like those reported by Dr. Azab. The outcome was that we were not able to reveal any strong Mg^{2+} binding to Mops (or to a few other common “Good's” buffers [1]).

The *inset* in Fig. 1 shows the chemical structure of antipyrilazo III, a metallochromic dye previously used mainly because of its sensitivity to Ca^{2+} [9–14]. Fig. 1A shows how Mg^{2+} ions affect its absorption spectrum in an aqueous medium buffered with 150 mM Tes-NaOH at pH 7; note that the fairly good isobestic points in the spectra of Fig. 1A suggest a simple Mg^{2+} -dependent equilibrium between two and only two forms of antipyrilazo III, free or complexed with Mg^{2+} . Fig. 1B shows a plot of the absorbance changes of antipyrilazo III as a function of added Mg^{2+} in experiments where either Tes-NaOH (open circles) or Tes-Tris (open squares) were used as buffers: similar results were obtained, so that individual symbols cannot be distinguished in Fig. 1B. Such experiments were then repeated using 150 mM Mops as the buffer (right-side-up open triangles) instead of Tes. If Mg^{2+} were to form complexes with Mops, this would reduce the apparent ability of Mg^{2+} to interact with antipyrilazo III, and

^{*} Corresponding author. Fax: +33 1 6908 8139.

 E-mail address: philippe.champeil@cea.fr (P. Champeil).

¹ Abbreviations used: ADA, N-[2-acetamido] iminodiacetic acid; Mops, 4-morpholinepropanesulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tes, N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid; Mes, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; GSH, glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine).

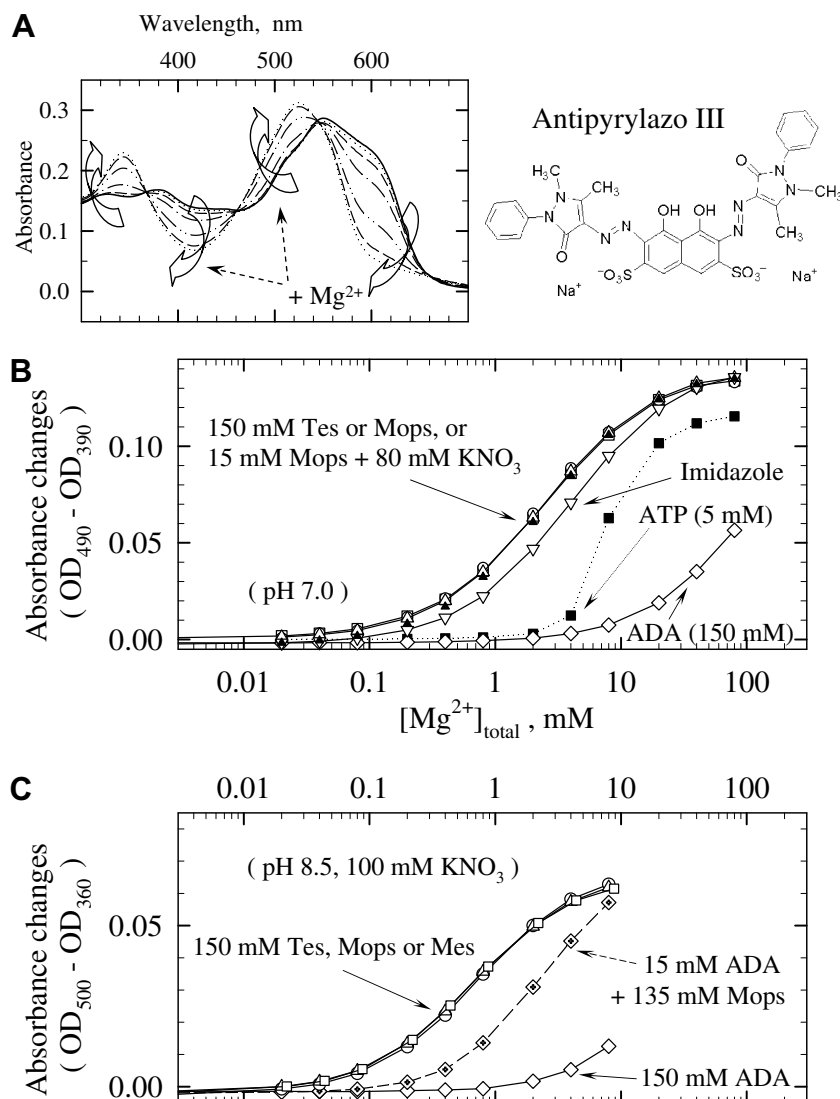


Fig. 1. Antipyrilazo III as a probe of the binding (or absence of binding) of Mg²⁺ to various buffers. (Inset), Antipyrilazo III chemical structure. (A) Antipyrilazo III was diluted to 10 μ M in 150 mM Tes-NaOH at pH 7, and its absorption spectrum was measured (continuous line). Increasing concentrations of Mg²⁺ were then sequentially added: 0.04, 0.2, 0.8, 4, 20, and 80 mM final total concentrations, respectively (dotted or dashed lines in A). Absorption spectra were recorded using a Hewlett–Packard diode-array spectrophotometer (HP 8453A), in which cuvettes (with 1-cm optical pathlength) were continuously stirred and maintained at 20 °C. The stock solutions of MgCl₂ (from Sigma–Aldrich) and antipyrilazo III (from Fluka) were 2 M and 2 mM, respectively (in water). Other chemicals were from Sigma–Aldrich. (B) Antipyrilazo III absorbance changes as a function of [Mg²⁺]_{total} in the experiment illustrated in A were evaluated by measuring the difference between ODs at 490 nm and 390 nm (a wavelength pair chosen to afford fair sensitivity to Mg²⁺ and yet minimize dilution-induced artifacts) (open circles). This titration was repeated under identical conditions except that the aqueous medium, buffered at pH 7 and 20 °C in all cases, now contained Tes-Tris (open squares), Mops-Tris (right-side-up open triangles), imidazole (upside-down triangles), or ADA (open diamonds), all at 150 mM, or 15 mM Mops-Tris and 80 mM KNO₃ (closed triangles) (omitting KNO₃ resulted in slightly stronger apparent affinity, as expected from the effect of ionic strength on antipyrilazo III interaction with Mg²⁺; not shown). A control experiment was also performed with 150 mM Tes-Tris plus 5 mM ATP (closed squares, dotted line). (C) Similar experiment except that the medium contained 100 mM KNO₃ in all cases and was now buffered at pH 8.5, with either 150 mM Tes-Tris (open circles), Mops-Tris (open triangles), Mes-Tris (open squares), or ADA-NaOH (open diamonds), or with 15 mM ADA-NaOH and 135 mM Tris-HCl (dotted diamonds, dotted line). Wavelengths were chosen differently because pH alters the Mg²⁺-induced differential spectrum.

therefore the corresponding curve in Fig. 1B would shift to the right, as the total Mg²⁺ added is plotted on the x scale of this figure. We, however, found no difference between Mops-Tris and Tes-Tris or Tes-NaOH (right-side-up open triangles versus open squares or circles), suggesting that Mops does *not* bind Mg²⁺ significantly under these conditions, compared with Tes.

In contrast, including 5 mM ATP together with the Tes-Tris buffer resulted in the typical behavior anticipated from the known fairly strong [15] binding of Mg²⁺ to ATP (closed squares in Fig. 1B). Replacing Tes by ADA, a buffer already known to bind Mg²⁺ moderately although significantly (reported log K = 2.5, [1,2,4,7]), also resulted in a pronounced shift to the right for an ADA concentration

of 150 mM (open diamonds in Fig. 1B), as expected, whereas Imidazole induced a smaller shift (upside-down open triangles). As also expected, the shift observed in the presence of ADA became much smaller if the concentration of ADA was reduced to 15 mM only, together with 135 mM either Tes or Mops (not shown here). Similar experiments with various buffers were repeated at pH 8.5 in the presence of 100 mM KNO₃, and the same qualitative behavior was again observed (Fig. 1C). The possibility that Tes or Mops could *both* bind Mg²⁺ to a significant, although similar, extent was excluded by the fact that when Mops was diluted 10-fold, nevertheless keeping the ionic strength constant by addition of KNO₃, we found the same antipyrilazo III titration curve (closed triangles in Fig. 1B) as at the 10-fold larger concentration of Mops (open right-side up triangles in Fig. 1B). Our conclusion is that these two buffers, Tes and Mops, do *not* bind Mg²⁺ to any significant extent at pH 7 or 8.5. Additional comments on these experiments are provided as [Supplementary Material](#).

We also performed a classical type of experiment [e.g., 4,5,16] to reveal binding of divalent cations to buffers (if any): we measured the changes in pH occurring when increasing amounts of NaOH are added to an initially acid (4 mM HNO₃) solution of buffer (at 1 mM), in the absence or presence of the divalent cation suspected to bind to this buffer. This is the type of experiment claimed by Azab et al. [8] to support the existence of significant binding of Mg²⁺ to Mops. Our own experiments are described in [Supplementary Material](#) (as Fig. 2), and they again contradict the idea that Mg²⁺ could interact with Mops to any significant extent.

Beyond controversy about exact numbers for binding constants and from a different, methodological point of view, our work illustrates that as an alternative to (or in combination with) simple pH-meter experiments for the estimation of *absolute* constants it is relatively straightforward for biochemists to estimate apparent, *conditional* constants under the specific conditions of a given series of experiments: to put our results in a positive perspective indeed, we show that metallochromic dyes are useful tools to measure thermodynamic conditional constants fairly easily under the exact conditions of the experiment in the lab, without relying only on extrapolation from the absolute constants reported in the literature.

Acknowledgments

We express our gratitude to Dr. H. Sigel in Basel and J.V. Møller in Aarhus for their interest and to M. Garrigos for stimulating discussions throughout this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ab.2007.02.025](https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.025).

References

- [1] N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, R.M. Singh, Hydrogen ion buffers for biological research, *Biochemistry* 5 (1966) 467–477.
- [2] G. Schwarzenbach, G. Anderegg, W. Schneider, H. Senn, Komplexe XXVI. Über die koordinationsstendenz von N-substituierten Iminodiessigsäuren, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 1147–1170.
- [3] K.-S. Bai, A.E. Martell, The interaction of (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris) with copper and nickel ions, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 31 (1969) 1697–1707.
- [4] R. Nakon, Free metal ion depletion by “Good’s” buffers. I. N-(2-acetamido)iminodiacetic acid 1:1 complexes with calcium(ii), magnesium(ii), zinc(ii), manganese(ii), cobalt(ii), nickel(ii), and copper(ii), *Anal. Biochem.* 95 (1979) 527–532.
- [5] K.H. Scheller, T.H. Abel, P.E. Polanyi, P.K. Wenk, B.E. Fischer, H. Sigel, Metal ion/buffer interactions. Stability of binary and ternary complexes containing 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (BisTris) and adenosine 5′-triphosphate (ATP), *Eur. J. Biochem.* 107 (1980) 455–466.
- [6] R. Nakon, C.R. Krishnamoorthy, Free-metal depletion by “Good’s” buffers, *Science* 221 (1983) 749–750.
- [7] J.S. Magyar, H.A. Godwin, Spectropotentiometric analysis of metal binding to structural zinc-binding sites: accounting quantitatively for pH and metal ion buffering effects, *Anal. Biochem.* 320 (2003) 39–54.
- [8] H.A. Azab, A.S. Orabi, E.T.A. El-Salam, Role of Biologically Important zwitterionic buffer secondary ligands on the stability of the mixed-ligand complexes of divalent metal ions and adenosine 5′-mono, 5′-di, and 5′-triphosphate, *J. Chem. Eng. Data* 46 (2001) 346–354.
- [9] T. Ohnishi, Characterization of the murexide method: dual-wave-length spectrophotometry of cations under physiological conditions, *Anal. Biochem.* 85 (1978) 165–179.
- [10] A. Scarpa, F.J. Brinley Jr., G. Dubyak, Antipyrilazo III, a “middle range” Ca²⁺ metallochromic indicator, *Biochemistry* 17 (1978) 1378–1386.
- [11] Y. Ogawa, H. Harafuji, N. Kurebayashi, Comparison of the characteristics of four metallochromic dyes as potential calcium indicators for biological experiments, *J. Biochem.* 87 (1980) 1293–1303.
- [12] M.V. Thomas Metallochromic indicators, in: *Techniques in Calcium Research*, Acad. Press, London, 1982, pp. 90–138.
- [13] P.L. Dorogi, K. Moss, E. Neumann, H.W. Chang, Spectrophotometric determination of reaction stoichiometry and equilibrium constants of metallochromic indicators. III. Antipyrilazo III complexing with Ca²⁺ and acetylcholine receptor protein, *Biophys. Chem.* 14 (1981) 91–100.
- [14] S. Hollingworth, R.W. Aldrich, S.M. Baylor, In vitro calibration of the equilibrium reactions of the metallochromic indicator dye antipyrilazo III with calcium, *Biophys. J.* 51 (1987) 383–393.
- [15] R.M. Smith, A.E. Martell, *Critical Stability Constants*, vol. 6, Plenum Press, NY, 1989.
- [16] G.H. Nancollas, M.B. Tomson, Guide lines for the determination of stability constants, *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 2675–2692.

Supplementary material for the Ms:

**Use of metallochromic dyes and potentiometric pH-meter titration to detect binding of divalent cations to “Good’s” buffers :
Mops does not bind Mg^{2+} under usual conditions.**

by

Cédric Montigny and Philippe Champeil

Additional comments on *Figure 1* and the use of Antipyrylazo III as a probe of the binding (or absence of binding) of Mg^{2+} to various buffers.

The experiments with ADA can be given satisfactory quantitative interpretation. Considering for instance those performed at pH 8.5 in the presence of 100 mM KNO_3 , the absorbance change induced by, say, 8 mM $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{total}}$ in the presence of 150 mM ADA is approximately equivalent to the one induced by 0.2 mM $[\text{Mg}^{2+}]$ in the *absence* of ADA, i.e. $[\text{Mg}]_{\text{free}}$ can be assumed to be about 0.2 mM in the presence of 150 mM ADA. Thus, $[\text{Mg}.\text{ADA}]$ is close to $8 - 0.2 = 7.8$ mM under these circumstances, $[\text{ADA}]_{\text{free}}$ is close to $150 - 7.8 = 142.2$ mM, and the (conditional) dissociation constant ($[\text{Mg}]_{\text{free}} \times [\text{ADA}]_{\text{free}} / [\text{Mg}.\text{ADA}]$) can be estimated to be about $(0.2 \times 142.2 / 7.8)$ mM, i.e. about 3.6 mM. The apparent (conditional) affinity of ADA for Mg^{2+} therefore appears to be of the order of magnitude expected from the reported absolute log K value of 2.5 for binding of Mg^{2+} to the deprotonated form of ADA (1-2, 4, 7) (and from the known pKa of ADA, close to 6.7).

It was also mentioned in the main text that including 5 mM ATP together with the Tes-Tris buffer during the titration of Antipyrylazo III with Mg^{2+} results in the typical behaviour anticipated for the known fairly strong binding of Mg^{2+} to ATP: a strongly diminished free Mg^{2+} for total Mg^{2+} concentrations lower than 5 mM (closed squares and dotted line in *Figure 1B*). From those data, an apparent dissociation constant can also be estimated, of about 0.06 mM, again reasonably consistent with the reported logK value of 4.2 for Mg^{2+} binding to deprotonated ATP (and its known pKa) (15).

This experiment with ATP nevertheless reveals a possible limitation of the easy use of antipyrylazo III under certain conditions, namely the fact that this dye may form ternary complexes (as already known in the case of Ca^{2+} -antipyrylazo III complexes, e.g. $\text{Ca}(\text{Ap})_2$, see refs 13, 14): in the presence of ATP, both the altered maximum in *Figure 1B* curve with closed squares and the differential spectrum recorded (not shown) reveal slight deviation from a simple situation, suggesting formation of ternary ATP-Mg-Ap complexes, and rendering the use of antipyrylazo III less simple. Note that in our hands, in addition to or as an alternative to antipyrylazo III, another metallochromic dye with simpler behaviour, murexide, was found to be very useful for characterizing complexes of various ligands with metal ions, among which Ca^{2+} of course, but also lanthanides or Cd^{2+} (17-20), or even Co^{2+} or Mn^{2+} (unpublished).

Additional references:

17. Champeil, P., Riollot, S., Orlowski, S., Guillaïn, F., Seebregts, C. J., and McIntosh, D. B. (1988) ATP regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Metal-free ATP and 8-bromo-ATP bind with high affinity to the catalytic site of phosphorylated ATPase and accelerate dephosphorylation, *J. Biol. Chem.* 263, 12288-12294.
18. Champeil, P., Menguy, T., Soulie, S., Juul, B., de Gracia, A. G., Rusconi, F., Falson, P., Denoroy, L., Henao, F., le Maire, M., and Møller, J. V. (1998) Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Nucleotide- and metal-binding sites, *J. Biol. Chem.* 273, 6619-6631.
19. Henao, F., Orlowski, S., Merah, Z., and Champeil, P. (1992) The metal sites on sarcoplasmic reticulum membranes that bind lanthanide ions with the highest affinity are not the ATPase Ca^{2+} transport sites, *J. Biol. Chem.* 267, 10302-10312.
20. Leverrier, P., Montigny, C., Garrigos, M., and Champeil, P. Cadmium complexes with glutathione revisited (*submitted*).

Classical pH-meter titration to reveal binding of divalent cations to buffers (if any).

To start with, we used ATP as a model ligand and checked that in such pH-meter experiments we were able to reveal the well known formation of an ATP complex with Mg^{2+} . Indeed, this was indicated by the fact that in the presence of Mg^{2+} , the region where ATP acts as a buffer was significantly shifted towards lower pH (*Panel A in Figure 2*).

Interpretation of such a shift in terms of the actual binding constant is usually performed with the help of a dedicated software, not always user-friendly. But simple-minded qualitative interpretation of the data can be deduced from classical analysis of simple competition between protons (H) and a competing metal ion (M) for binding to a buffer. In such a model, the apparent dissociation constant for protonation in the presence of the competing metal, K_H' , can be expressed as follows:

$K_H' = K_H (1 + M/K_M)$, K_H being the constant in the absence of the competing metal, all constants being expressed as dissociation constants (both for protons (H) and metal ions (M)), and M being the concentration of *free* metal). An identical formalism is indeed used, conversely, to analyze at a given pH the apparent affinity for metal of a protonatable chelator (21), and even more widely to analyze competition between a ligand and a competitor for binding to a Michaelian enzyme. Thus, in the case of ATP illustrated in *Figure 2A*, the mere shift of the $\text{pK}_a (= -\log K_H)$ region by about 1 pH units in the presence of 1 mM Mg^{2+} implies that the dissociation constant K_M of the $\text{Mg}:\text{ATP}$ complex is one order of magnitude smaller than the concentration of $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}}$ (about 0.5 mM at $\text{pH}=\text{pK}_H'$), i.e. it is about $5 \cdot 10^{-5}$ M, as indeed indicated in stability constant tables (e.g. 15). Analogous results were obtained with 1 mM ADA in the absence or presence of Ca^{2+} (data not shown), instead of 1 mM ATP in the absence or presence of Mg^{2+} , and they were again consistent with the known affinity of ADA for Ca^{2+} (1-2, 4, 7).

Similar experiments (again taken as controls), illustrated in *Figure 2B* but now performed with another ligand, the “BisTris” buffer, in the absence or presence of copper (Cu^{2+} , a metal ion with which BisTris is known to interact strongly), showed an even larger shift of the apparent pK_a of BisTris in the presence of Cu^{2+} versus in its absence, in agreement again with the reported very strong binding of Cu^{2+} to BisTris ($\log K = 5.27$, see ref. 5); in addition, in this case, there was an abnormality in the final portion of the titration (dashed-dotted line), presumably due to *precipitation* of a copper complex (see below).

Experiments were then finally performed with *Mops buffer* (*Figure 2C*), in the absence or presence of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} or Cu^{2+} , under conditions exactly identical to those mentioned in ref. 8. The presence or absence of Mg^{2+} or Ca^{2+} had *no effect* on the observed titration. Neither had the presence of 1 mM Ni^{2+} , except when NaOH was added in excess over $\text{HNO}_3 + \text{Mops}$, in the final portion of the titration, where it induced some strange effect again (upside down triangles and dashed line). As to Cu^{2+} , its addition did not result in any clean shift in pK_a , but it did result in pronounced abnormal behaviour *within* the buffering region itself (squares and dashed line). In fact, by simply monitoring the *turbidity* of our samples under identical conditions (data not shown), we found that precipitation started to occur *immediately after* the buffering region in the case of Ni^{2+} , and at its *very beginning* in the case of Cu^{2+} (hence the justification for the dashed lines).

We therefore find no evidence for any strong complex of Mops with either Mg^{2+} , Ca^{2+} , or even Ni^{2+} , and in contrast with the claim in ref. 8, we suggest that Mops is an innocuous buffer with respect to the binding of Mg^{2+} under pH conditions usual for biochemistry experiments with this buffer. It is difficult for us to discuss more deeply this discrepancy with the conclusion in that reference, because raw pH-meter titration curves with Mops are *not* shown in that paper.

Additional reference:

21. Portzehl, H., Caldwell, P. C., and Rüegg, J. C. (1964) The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions, *Biochim. Biophys. Acta* 581-591.

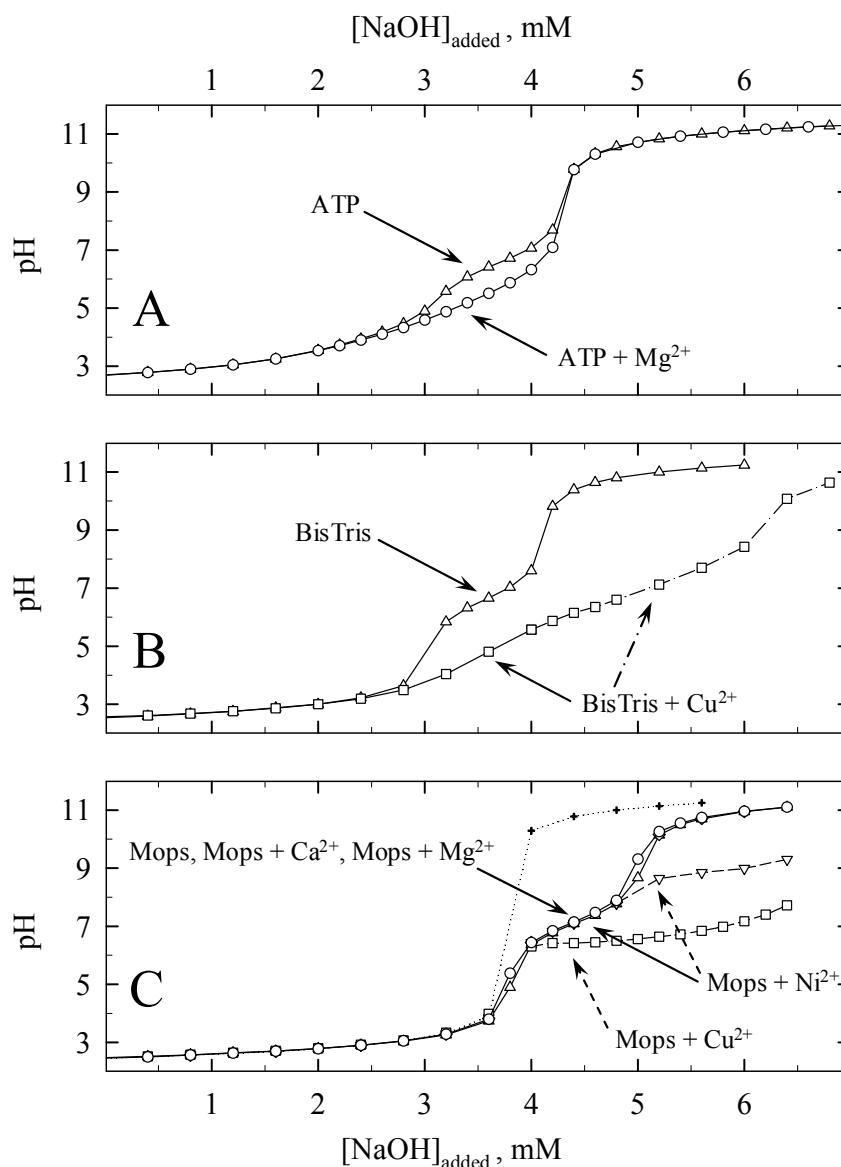


Figure 2. Classical pH-meter titration to reveal binding of divalent cations to buffers (if any).

Various buffers were suspended at 1 mM in 100 mM KNO_3 and 4 mM HNO_3 at 20°C (total volume was 25 ml), in the absence or presence of 1 mM divalent cation (as indicated below). Small volumes (up to 1.8 ml total) of concentrated NaOH (100 mM) were then added sequentially, and pH was measured after each addition, using a glass electrode and a Radiometer PHM 240 pH-meter. *Panel A*, 1 mM ATPNa_2 in the absence (triangles) or presence (circles) of 1 mM Mg^{2+} ; ATP was added from a stock 220 mM solution which had been previously buffered at pH 6.4 with NaOH. *Panel B*, 1 mM BisTris in the absence (triangles) or presence (squares) of 1 mM Cu^{2+} ; BisTris was added from a stock 500 mM solution which had been previously buffered at pH 7 with HCl. *Panel C*, 1 mM Mops (added as the acid form) in the absence (right side up triangles) or presence of 1 mM Ca^{2+} (diamonds, hidden below the other symbols), Mg^{2+} (circles), Ni^{2+} (upside down triangles, partially hidden) or Cu^{2+} (squares). The dotted curve with crosses is a control titration performed in the absence of any buffer or divalent cation.

**MANUSCRIPT #7: METAL BINDING TO LIGANDS:
*CADMIUM COMPLEXES WITH GLUTATHIONE REVISITED.***

Leverrier P, Montigny C, Garrigos M, Champeil P

Analytical Biochemistry 2007, 371 : 215-228.

Metal binding to ligands: Cadmium complexes with glutathione revisited

Pauline Leverrier¹, Cédric Montigny¹, Manuel Garrigos, Philippe Champeil^{*}

CNRS, URA 2096 (*Protéines Membranaires Transductrices d'Énergie*), and CEA, iBiTec-S, SB²SM, Laboratoire des protéines membranaires, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Received 8 June 2007
Available online 26 July 2007

Abstract

We studied the interaction of γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione, GSH) with cadmium ions (Cd^{2+}) by first performing classical potentiometric pH titration measurements and then turning to additional spectroscopic methods. To estimate the residual concentrations of free cadmium, we studied the competition of glutathione with a Cd^{2+} -sensitive dye, either an absorbing dye (murexide) or a fluorescent one (FluoZin-1), and consistent results were obtained with the two dyes. In KCl-containing Tes, Mops, or Tris buffer at pH 7.0 to 7.1 and 37 °C (and at a total Cd^{2+} concentration of 0.01 mM), results suggest that free cadmium concentration is halved when the concentration of glutathione is approximately 0.05 mM; this mainly reflects the combined apparent dissociation constant for the $\text{Cd}(\text{glutathione})$ 1:1 complex under these conditions. To identify the other complexes formed, we used far-UV spectroscopy of the ligand-to-metal charge transfer absorption bands. The $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex predominated over the 1:1 complex only at high millimolar concentrations of total glutathione and not at low submillimolar concentrations of total glutathione. The apparent conditional constants derived from these spectroscopy results made it possible to discriminate between sets of absolute constants that would otherwise have simulated the pH titration data similarly well in this complicated system. Related experiments showed that although the Cl^- ions in our media competed (modestly) with glutathione for binding to Cd^{2+} , the buffers we had chosen did not bind Cd^{2+} significantly under our conditions. Our experiments also revealed that Cd^{2+} may be adsorbed onto quartz or glass vessel walls, reducing the accuracy of theoretical predictions of the concentrations of species in solution. Lastly, the experiments confirmed the rapid kinetics of formation and dissociation of the UV-absorbing $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complexes. The methods described here may be useful for biochemists needing to determine conditional binding constants for charge transfer metal–ligand complexes under their own conditions.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cd^{2+} ; GSH; Potentiometric titration; Metal-sensitive dyes; Ligand-to-metal charge transfer complexes

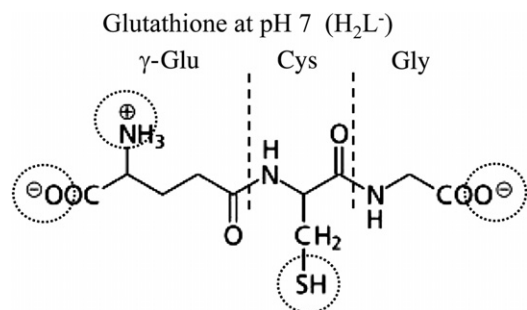
Cadmium ions (Cd^{2+}), like many other heavy transition metals, are toxic to living cells and bind to specific targets at micromolar concentrations. Among the numerous potential ligands in the cell, Cd^{2+} ions also bind to the tripeptide γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione) (Scheme 1), which is present in millimolar concentrations in the cytosol and, therefore, reduces the concentration of

cytosolic free Cd^{2+} , hence its potential toxicity [1,2]. In the yeast cytosol, it has been suggested that the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex formed, rather than the 1:1 complex, was specifically transported into the vacuolar compartment by Ycf1p, a transport protein previously known to be involved in yeast resistance to Cd^{2+} [3]. In addition, cadmium and glutathione could also be cotransported out of the cell by another yeast ABC transporter, Yor1p, again with a $\text{Cd}/\text{glutathione}$ ratio of 1:2 [4]. Such $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ complexes, therefore, are of particular biological relevance. Our interest in their possible cotransport by a third

^{*} Corresponding author. Fax: +33 1 6908 8139.

E-mail address: philippe.champeil@cea.fr (P. Champeil).

¹ These two authors contributed equally to this project.



Scheme 1. Predominant form of glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) at neutral pH. At pH 7.0, most glutathione molecules bear two negative charges on the (deprotonated) carboxyl groups (COO^-) plus one positive charge resulting from the presence of two protons: one on the sulfhydryl group (SH) and one on the ammonium group (NH_3^+). This is the H_2L^- species with one net negative charge. Cd^{2+} binding occurs mainly via deprotonation of the sulfhydryl group (with additional debatable levels of deprotonation), with the possible formation of either $\text{Cd}(\text{glutathione})$ or $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ complexes (see Table 1).

related transporter, the human multidrug resistance-associated protein (hMRP1),² led us to reexamine in some detail the formation of the various Cd^{2+} complexes with glutathione, the $\text{Cd}(\text{glutathione})_n$ complexes (with no predetermined notion of their degree of protonation).

The binding of Cd^{2+} to glutathione is complicated because four chemical groups in glutathione may undergo protonation or deprotonation and because metal–ligand complexes with various stoichiometries may form. The ammonium group and the sulfhydryl group are deprotonated only in rather alkaline conditions, whereas the two carboxyl groups are protonated only in very acidic conditions; the corresponding $\log K$ values reported by Martell and Smith [5] are approximately 9.5, 8.6, 3.5, and 2.1 at 25 °C and an ionic strength of 0.15 M. Thus, in neutral conditions, glutathione has two deprotonated carboxyl groups (RCOO^-), whereas the sulfhydryl (RSH) and ammonium (RNH_3^+) groups both are protonated. At pH 7.0, therefore, glutathione bears one net negative charge and can be described as H_2L^- or GSH^- .³ Assuming a pK_a close to 9.0 for the sulfhydryl group [6,7], the HL^{2-} or GS^{2-} form with a deprotonated sulfhydryl group accounts for, at pH 7.0, only approximately 1% of the amount of the major form shown in Scheme 1 (H_2L^- or GSH^-).

² Abbreviations used: hMRP1, human multidrug resistance-associated protein; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; Mes, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; Mops, 4-morpholinepropanesulfonic acid; Tes, *N*-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid; GSSG, oxidized glutathione; Ap, antipyrilazo III; EGTA, [ethylenedis(oxyethylene-nitrilo)]tetraacetic acid.

³ GSH is the abbreviation for glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine). Nevertheless, this abbreviation is not used frequently in the text (except in figures) because it might be considered to imply that the sulfhydryl group remains protonated in all cases. Instead, we use either GSH^- for the sulfhydryl-protonated main species of glutathione at pH 7.0 in the absence of ligands (Scheme 1) or GS^{2-} for the sulfhydryl-deprotonated species, as appropriate.

The various forms of glutathione with different degrees of protonation probably bind Cd^{2+} with different affinities. Furthermore, Cd^{2+} complexes with two glutathione ligands rather than one exist, and complexes with two metal ions per glutathione ligand, or three glutathione ligands per metal ion, have even been described in some reports [6–14]. Chemical texts on this topic tend to be confusing: for instance, Supplemental Tables 1 and 2 in Supporting Information present the different constants and complexes described in some such previous studies. Moreover, thermodynamic constants have in some cases been obtained under conditions far from common in biochemistry experiments (e.g. at 3 M ionic strength in [10]) and cannot therefore be directly extrapolated to the usual range of conditions for biochemical experiments. Finally, although dedicated software has made it possible to predict the detailed composition of a particular medium from thermodynamic constants, these programs are not necessarily user-friendly, and it is difficult for the experimentalist to predict what will happen in particular solutions, in the possible presence of other competitors for Cd^{2+} binding.

Discrepancies between previous studies may result from the complexes formed being identified purely by fitting ad hoc models to pH titration data, with the resulting absolute constants potentially depending on the model used. Therefore, we carried out both classical pH titration experiments and additional experiments, aiming to resolve some of the ambiguities by directly determining “apparent” or “conditional” binding constants under conditions commonly used in biochemistry experiments. These additional experiments included studies with absorbing or fluorescent “reporter” dyes, making it possible to determine, by means of competition experiments, the residual concentration of free Cd^{2+} in solution after the formation of complexes with glutathione. We also used UV spectroscopy to evaluate directly the formation of $\text{Cd}(\text{glutathione})_n$ complexes resulting in strong ligand-to-metal charge transfer absorption bands.

The results of our additional experiments restricted the range of constants likely to be correct for describing the formation of some of these complexes. The methods described here may be useful to other scientists wishing to determine conditional dissociation constants under their own specific conditions. Finally, our results might have some significance for consideration of published reports of Cd^{2+} transport in the presence of glutathione.

Materials and methods

Potentiometric titration experiments were performed with a Radiometer PHM240 pH meter using a combined glass electrode. Commercial pH 4.0, pH 7.0, and pH 10.0 standard buffers were used for calibration. The NaOH used for titration was freshly diluted from a commercially available Titrastol solution.

Absorption spectra were recorded with a Hewlett–Packard diode array spectrophotometer (HP 8453A), and fluorescence spectra were recorded with a SPEX fluorometer

(Fluorolog). Absorbance measurements were made with continuous stirring in quartz cuvettes with a 1-cm optical pathlength (with the exception of those shown later in Fig. 4A, where the optical pathlength was only 1 mm).

Buffer A consisted of 50 mM KCl and 50 mM Tris–NaOH, and buffer B consisted of 50 mM KCl and 50 mM Tris–Mes. In both cases, the pH was set at 7.4 at 22 °C. Based on published tables [15,16] and our own measurements of the temperature dependence of the pK_a of these buffers, we estimate that the pH became 7.0 to 7.1 when the cuvette was brought to 37 °C. (For the experiment illustrated later in Fig. 4A, 5 mM phosphate was used, buffered to pH 7.4 at room temperature, and then again brought to 37 °C.)

Glutathione and $CdCl_2$ were purchased from Sigma–Aldrich and used without further purification. Stock solutions of glutathione (40 mM) and $CdCl_2$ (20 mM) were prepared daily in buffer A (at neutral pH, glutathione oxidation occurs only very slowly, in weeks). Dilution artifacts resulting from the addition of these chemicals were generally small (<3% in Figs. 2 and 3); in Fig. 5, where they are more significant, such dilution artifacts were corrected for. Murexide was obtained from Sigma–Aldrich, and FluoZin-1 (potassium salt) was obtained from Molecular Probes (Invitrogen). A 2-mM stock solution of murexide and a 1-mM stock solution of FluoZin-1 were prepared, both in water. Other chemicals were obtained from Sigma–Aldrich.

The various equilibria were simulated with JCHESS software available at the website <http://chess.enscm.fr>. The various constants listed in Table 1 were used without correction for nonideality. The IUPAC database can be ordered from the website www.acadsoft.co.uk/index.html.

Results

Classical pH titration of glutathione in the presence and absence of Cd^{2+}

We first carried out a classical type of experiment [17,18], titrating the pH changes following the addition of increasing amounts of NaOH to a solution containing 3 mM HNO_3 and 1 mM glutathione, in the presence or absence of Cd^{2+} at a total concentration of either 0.5 or 1 mM (Fig. 1). In this experiment, glutathione was added as the neutral (H_3L) species. In the absence of Cd^{2+} , the addition of NaOH up to final concentrations between 3 and 4 mM confirmed the very acidic pK_a (<4.0) anticipated for the first deprotonation site of H_3L (i.e., the third protonation site of L^{3-} , one of the two carboxyl groups). As expected, further addition of NaOH up to concentrations between 4 and 6 mM (i.e., in excess by >1 mM with respect to 3 mM HNO_3) revealed the alkaline pK_a values of the other two deprotonation sites of H_3L to be close to 8.5 and 9.5, respectively, corresponding to the deprotonation of H_2L^- (the major species present at pH 7.0) and HL^{2-}

Table 1

Thermodynamic constants for formation of various complexes of Cd^{2+} and glutathione

Complex formed ^a	Abbreviated name ($M_mH_nL_l$)	Cumulative constant ($\log \beta_{mhl}$) ^b
$H_3Glu(aq)$	H_3L	21.6
$H_2Glu[-]$	H_2L	18.1
$HGlu[2-]$	HL	9.5
$Cd(HGlu)(aq)$	MHL	15.7
$CdGlu[-]$	ML	8.5
$CdGlu(OH)[2-]$	$MH_{-1}L$	−1.7
$Cd(HGlu)_2[2-]$	MH_2L_2	30.0
$CdGlu(HGlu)[3-]$	MHL_2	22.1
$Cd(Glu)_2[4-]$	ML_2	12.4
$Cd(Glu)_2OH[5-]$	$MH_{-1}L_2$	2.4
$CdOH[+]$	MH_{-1}	−10.07
$Cd(OH)_2(aq)$	MH_{-2}	−20.34
$CdCl[+]$	ML	1.3
$CdCl_2(aq)$	ML_2	2.0

^a The various complexes of Cd^{2+} and glutathione with protons are listed in order from the most protonated to the least protonated. This table gives the values used to fit the pH titration data in Fig. 1A and the additional spectrometry data in Supplemental Fig. S6. The constants for Cd^{2+} binding to OH^- , required for fitting the pH titrations in Fig. 1A, were taken from the standard JCHESS database. In line with the effect of 50 mM chloride on our spectrometry measurements in Supplemental Fig. S1B (open circles vs. open triangles), the last two lines also show the constants used to take into account the formation of cadmium chloride complexes (see, e.g., Ref. [5]) in our spectrometry experiments (performed in the presence of 50 mM KCl).

^b The cumulative (or “gross”) constant for formation of the $M_mH_nL_l$ complex, as used in the JCHESS database and expressed in terms of activity rather than concentration, is defined as $\beta_{mhl} = [M_mH_nL_l]/([M]^m [H]^n [L]^l)$.

(see, e.g., Ref. [5]). In the presence of Cd^{2+} , buffering capacity was nearly lost in this alkaline region, and the buffering region shifted toward lower pH (open arrow) [17], confirming the formation of complexes between glutathione and Cd^{2+} . The exact pattern observed depended on whether the Cd^{2+} -to-glutathione ratio was set at 0.5 or 1 (Fig. 1).

Compared with the results for 1 mM glutathione alone, the shift to the right by approximately 2 mM of the apparent equivalence point in the presence of 1 mM glutathione and 1 mM Cd^{2+} (from 4 mM to ~6 mM NaOH) suggests that Cd^{2+} deprotonates the H_2L^- species more than once. Thus, the metal Cd^{2+} ion (M) does not merely (as suggested in Ref. [6]) bind to the sulfhydryl-deprotonated (HL^{2-}) species, generating the $CdHGlu(aq)$ species (MHL); rather, it also binds to the fully deprotonated (L^{3-}) species, resulting in the formation of at least some $CdGlu[-]$ (ML). If this were not the case, a shift of only 1 mM in equivalence point would have been observed. Nevertheless, if we assume at first, for the sake of simplicity, that glutathione acts as a simple buffer, with the sulfhydryl-deprotonated HL^{2-} species able either to gain a proton to become H_2L^- or to form a 1:1 neutral complex with the metallic Cd^{2+} ion, these titration curves may be

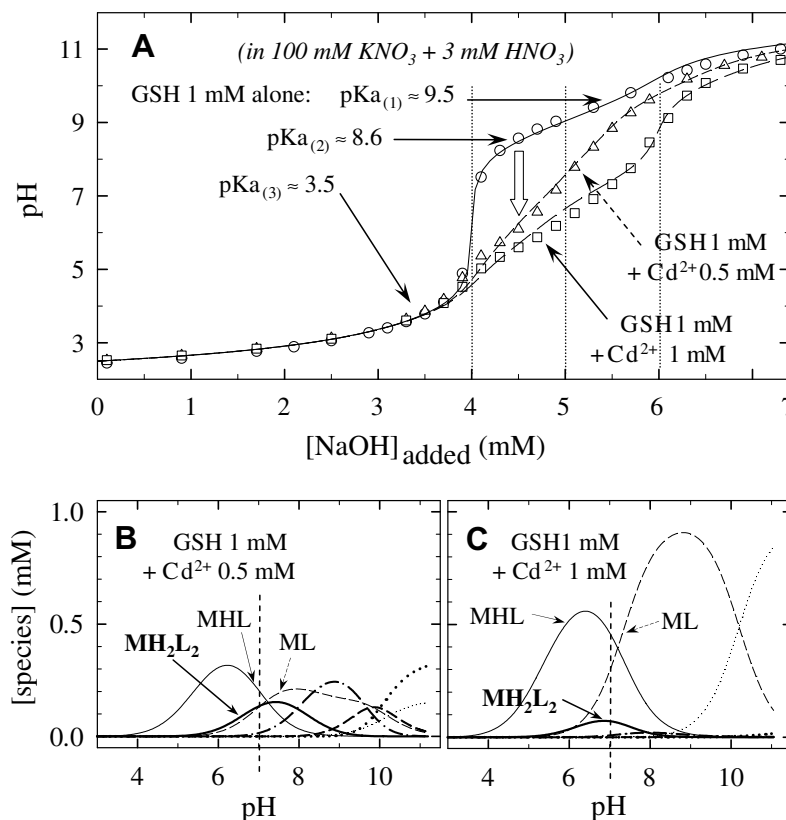


Fig. 1. pH titration of glutathione in the presence or absence of Cd^{2+} (and pH-dependent speciation of Cd^{2+} in the presence of glutathione, taking into account the results of the additional spectrometry experiments described below). (A) Glutathione was suspended at 1 mM in 100 mM KNO_3 and 3 mM HNO_3 at 20 °C (total volume 25 ml) in the absence (circles) or presence of 0.5 mM Cd^{2+} (triangles) or 1 mM Cd^{2+} (squares). Small volumes (up to 1.8 ml total) of concentrated (100 mM) NaOH were added sequentially, and pH was measured during this titration after calibration with known buffers and preliminary titration in the absence of glutathione. In this panel, the various lines correspond to fits to the experimental data, computed with JCHESS software and the various constants listed in Table 1, selected for compatibility with the spectrometry results. The open arrow pointing downward emphasizes the change in apparent pK_a resulting from competition between protons and Cd^{2+} for binding to the sulfhydryl group. The various vertical dotted lines correspond to titration endpoints after deprotonating one, two, or three groups in H3L. (B and C) Computed speciation of Cd^{2+} as a function of pH in the above experiments (1 mM glutathione in both cases, 0.5 mM Cd^{2+} for panel B and 1 mM Cd^{2+} for panel C) using the same set of constants. Thick lines illustrate the various 1:2 complexes: MH_2L_2 (thick continuous line), MHL_2 (thick dashed-dotted line), ML_2 (thick dashed line), and ML_2OH (thick dotted line). Thin lines illustrate the various 1:1 complexes: MHL (thin continuous line), ML (thin dashed line), and MLOH (thin dotted line). The vertical dashed lines correspond to the situation at pH 7.0.

interpreted roughly without the need for complex software. If we consider the region in which glutathione is active as a buffer with a pK_H of approximately 8.5, its shift by roughly 3.0 pH units in the presence of 1 mM $[\text{Cd}^{2+}]_\text{total}$ implies that the dissociation constant K_M of the individual $\text{Cd}^{2+}(\text{GS}^{2-})$ complex is three orders of magnitude smaller than the competitor $[\text{Cd}^{2+}]_\text{free}$ (presumably ~ 0.5 mM at $\text{pH} = \text{pK}'_\text{H}$). This would place this constant in the submicromolar range, as reported in a previous study [11]. In terms of total glutathione concentration, the corresponding apparent dissociation constant for the 1:1 Cd(glutathione) complex would be of a few tens of micromoles, as reported in a previous study [13] (see also [supplementary material](#)).

However, more quantitative analysis of the data with 0.5 and 1 mM Cd^{2+} is difficult and requires dedicated software to simulate the multiple equilibria involved. We used JCHESS software (see Materials and methods), and our findings are dealt with later in the Discussion. However, it should already be stressed here that we could not identify

one particular set of constants as being significantly better than certain alternatives for simulating our pH titration data. One possible reason for this is the use of too few metal and ligand concentrations in our experiments. However, it is at least as likely that there are too many equilibria involved in this problem for constants derived from such pH titration experiments alone to be reliable unambiguously (at least for experiments carried out in an ordinary biochemistry laboratory). Published studies have shown that, in addition to the various 1:1 complexes and depending on pH, a number of 1:2 complexes— $\text{Cd}(\text{HGlu})_2[2-]$ (MH_2L_2), $\text{Cd}(\text{HGlu})\text{Glu}[3-]$ (MHL_2), and $\text{Cd}(\text{Glu})_2[4-]$ (ML_2)—are likely to form (see, e.g., Ref. [10]). We found that, starting from a fairly reasonable fit with a given set of constants for all of these equilibria, increasing 1:2 complex formation constants by a factor of up to 2 and decreasing 1:1 complex formation constants accordingly gave nearly equally satisfactory fits to our pH titration data. The additional contribution of hydroxylated spe-

cies—CdGluOH[2−] (MH_{-1}L) and $\text{Cd}(\text{Glu})_2\text{OH}[5-]$ (MH_{-1}L_2)—also seems to be critical to account for the final part of the titration curves for pH values greater than 9.0; however, not all of these complexes are mentioned in all reports (see, e.g., Refs. [6,9,10]). The simulation in this region of the titration curve also depends heavily on the constants assumed for the formation of the $\text{CdOH}[+]$ or

$\text{Cd}(\text{OH})_2(\text{aq})$ species. Lastly, the Cd/glutathione system may also include complexes such as M_2L , $\text{M}_2\text{H}_3\text{L}_3$, and MH_3L_3 , as suggested in previous studies (see, e.g., Refs. [6,9]).

Therefore, we decided not to pursue efforts to simulate our pH titration results. (The final outcome of our fitting efforts, summarized in Table 1, and the resulting computed

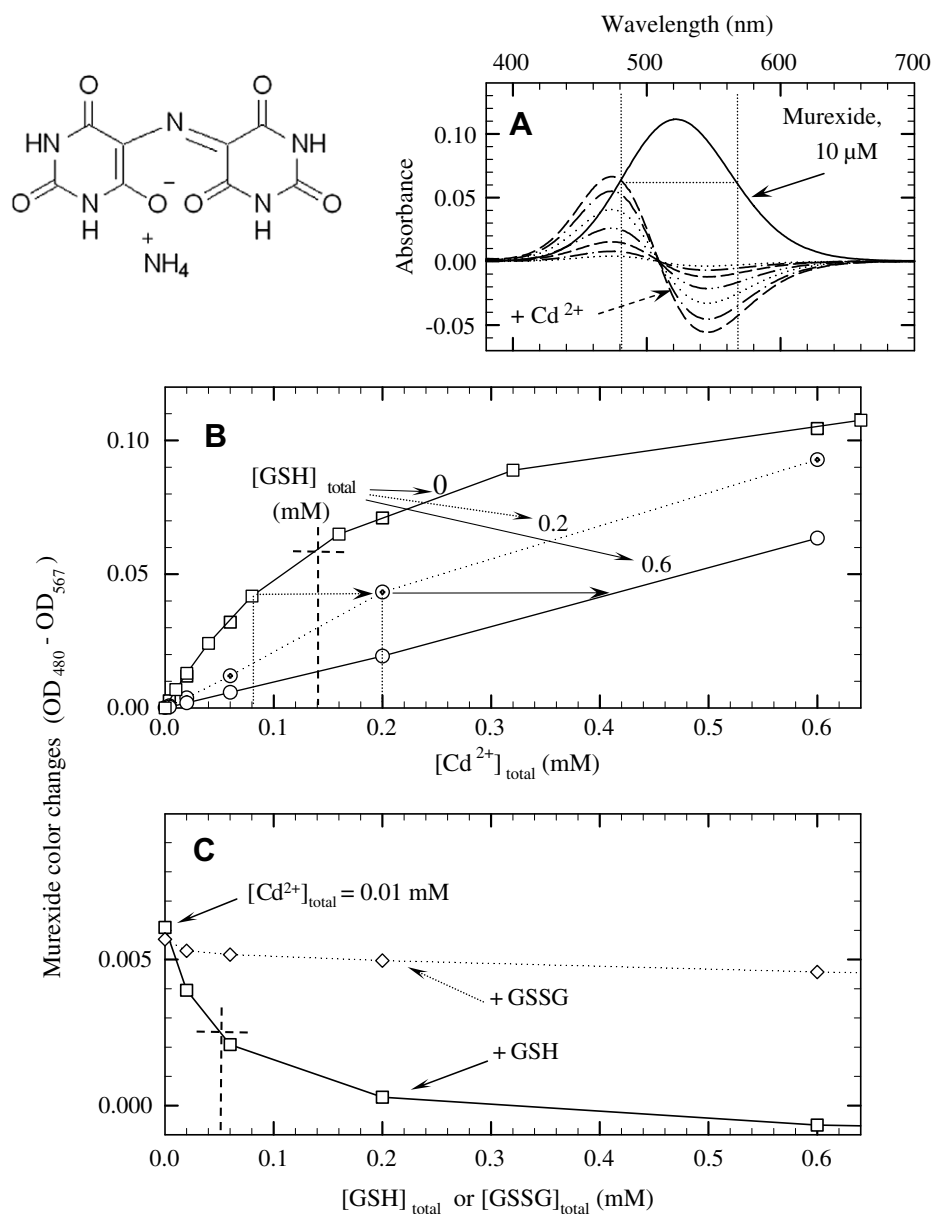


Fig. 2. Murexide as an indicator of residual free Cd^{2+} concentration after binding to glutathione. The inset at the top left shows the murexide chemical formula. (A) Spectrophotometric characterization. The solid line shows the absorption spectrum of 10 μM murexide in buffer B, which consists of 50 mM KCl and 50 mM Tris-Mes at 37 °C and pH 7.0 to 7.1. The murexide-containing cuvette was used as a blank for subsequent recordings, to which increasing amounts of cadmium were sequentially added (0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, and 0.64 mM total cadmium, respectively [various interrupted lines]). (B) Squares: murexide absorbance changes as a function of the added $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ were evaluated by measuring the difference between absorbance at 480 and 567 nm, a wavelength pair sensitive to cadmium but minimizing dilution-induced artifacts (see vertical dotted lines in panel A). Data from two separate experiments are plotted together and fall on the same line. The dashed cross indicates the apparent K_d for Cd^{2+} binding to murexide. Dotted and open circles: The experiment was repeated with 0.2 and 0.6 mM $[\text{glutathione}]_{\text{total}}$ in the cuvette, respectively. Arrows emphasize the higher $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ required, in the presence of glutathione, to obtain a similar murexide response. (C) A different experiment in which a low concentration of $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ (10 μM) was first added to the murexide-containing cuvette, with glutathione subsequently sequentially added (squares and continuous line). The dashed cross indicates the apparent K_d for Cd^{2+} binding to glutathione (assuming the formation of a 1:1 complex). Alternatively, GSSG was added instead of glutathione (diamonds and dotted line).

speciation, illustrated in Figs. 1B and C, are considered in the Discussion.) Instead, we used complementary spectroscopic measurements to overcome the ambiguity associated with these initial pH titration data.

Free cadmium concentration in solution in the presence of glutathione (or plain buffers) as assessed with the metallochromic reporter dye murexide

To begin, we aimed at determining the residual concentration of unbound Cd^{2+} in the presence of glutathione using indicators (or reporters) of free Cd^{2+} in experiments involving competition between glutathione and the indicator. In a first series of experiments, we used murexide as a probe for free cadmium. This well-known metallochromic dye has been used extensively for monitoring free Ca^{2+} concentration [19–21]. Murexide changes color when it binds Ca^{2+} (a weak binding with millimolar affinity). We found that it changed color in a similar manner on binding cadmium (Fig. 2A), with an apparent K_d for cadmium of approximately 0.14 mM in buffer B at 37 °C (Fig. 2B). Most significant for our purpose, a larger concentration of total Cd^{2+} was required in the presence of glutathione than in its absence to produce a given change in murexide absorbance.

For instance, in the presence of 0.2 mM $[\text{glutathione}]_{\text{total}}$ (dotted circles in Fig. 2B), 0.2 mM $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ was required to produce an absorbance change equivalent to that produced by 0.08 mM $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ in the absence of glutathione (open squares in Fig. 2B). Because the absorbance of murexide was similar in both cases, we can assume that $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$ was also similar at close to 0.08 mM. Thus, in the presence of 0.2 mM $[\text{glutathione}]_{\text{total}}$, and assuming the formation of predominantly Cd(glutathione) 1:1 complexes under these conditions of low $[\text{glutathione}]_{\text{total}}$, $[\text{Cd}(\text{glutathione})]$ can be estimated at 0.12 mM and $[\text{glutathione}]_{\text{free}}$ can be estimated at 0.08 mM (regardless of mean protonation level). Therefore, the apparent (conditional) dissociation constant for formation of the 1:1 complex, $([\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}} \times [\text{glutathione}]_{\text{free}} / [\text{Cd}(\text{glutathione})])$, can be estimated at slightly more than 0.05 mM. A similar value, approximately 0.05 mM, was deduced from experiments in which increasing concentrations of glutathione were added to a small fixed concentration of $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ (squares in Fig. 2C). The oxidized form of glutathione (GSSG) decreased free cadmium concentration very inefficiently (diamonds in Fig. 2C), confirming that cadmium binding to glutathione under our conditions involves mostly the sulfhydryl group rather than the carboxyl groups.

In these experiments, the small fixed concentration of $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ was 0.01 mM, which is smaller than the K_d for the Cd(murexide) complex, ensuring that the murexide signal was linearly related to Cd^{2+} concentration. This simple analysis of competition between the Cd^{2+} sensor (murexide) and glutathione should involve no major bias because we carefully kept the concentrations of indicator or Cd^{2+} below the dissociation constant of the Cd(indicator) com-

plex (~ 0.14 mM for Cd(murexide) [Fig. 2B]). For instance, using 10 μM murexide and a total concentration of Cd^{2+} of 0.01 mM (as in Fig. 2C), no more than 10% of total Cd^{2+} should bind to murexide.

We investigated whether the above apparent dissociation constant could have been influenced by competition with other components of the medium by titrating murexide with cadmium in the absence of glutathione, now in various buffers. As described in more detail in the supplementary material (Supplemental Fig. S1), we found that in the absence of glutathione and the presence of 50 mM Cl^- , nearly half of the total cadmium was bound to Cl^- (cf. open triangles and open circles in panel B of Supplemental Fig. S1), consistent with previous results (see, e.g., Ref. [13]). In contrast, the Tris, Mes, Mops, and Tes buffers did not bind Cd^{2+} under our conditions, whereas Tricine and Bistris buffers did.

Competition between a particular ligand and a metal-sensitive indicator for the binding of this metal remains simple to analyze only if metal–indicator–ligand ternary complexes do not form. This indeed seems to be the case for murexide, which is thought to give rise mostly to 1:1 complexes with metals [19–21] and which appears to do so in the presence of glutathione as well, as shown by the nice isobestic points obtained under most conditions (not shown). (At very high concentrations of glutathione, nevertheless, there was some spectroscopic evidence for weak interactions between murexide and glutathione.) In contrast, when we attempted to use the divalent cation-sensitive dye antipyrilazo III (Ap) [22], known to form ternary complexes with Ca^{2+} ($\text{Ca}(\text{Ap})_2$) [23,24], glutathione interacted with the Cd(Ap) complexes, as indicated by the appearance of a new spectroscopic signature (data not shown). For this reason, we preferred murexide over other metal-sensitive dyes for the current study despite the demonstrated utility of these other dyes in other contexts [25]. Nevertheless, we also cross-checked the results obtained with murexide with those obtained by another Cd^{2+} -sensitive probe, FluoZin-1, used at a concentration even lower than that for murexide so as to minimize artifacts. This is described next.

Free cadmium concentration in solution in the presence of glutathione as determined in complementary experiments with the cadmium-sensitive fluorophore FluoZin-1

FluoZin-1 (Molecular Probes) (see Fig. 3 inset) is a fluorescein derivative that can be used as an indicator for Zn^{2+} or Cd^{2+} because its fluorescence intensity increases with the concentration of either of these two metal ions in a fairly selective manner with moderate affinity; the absorption spectrum also shifts by a few nanometers (data not shown). A typical trace illustrating the fluorescence behavior of FluoZin-1 on Cd^{2+} chelation or on Cd^{2+} addition is shown in Fig. 3A. In such experiments, the titration of FluoZin-1 with cadmium indicated an apparent affinity of approximately 0.04 mM in buffers that did not complex cadmium

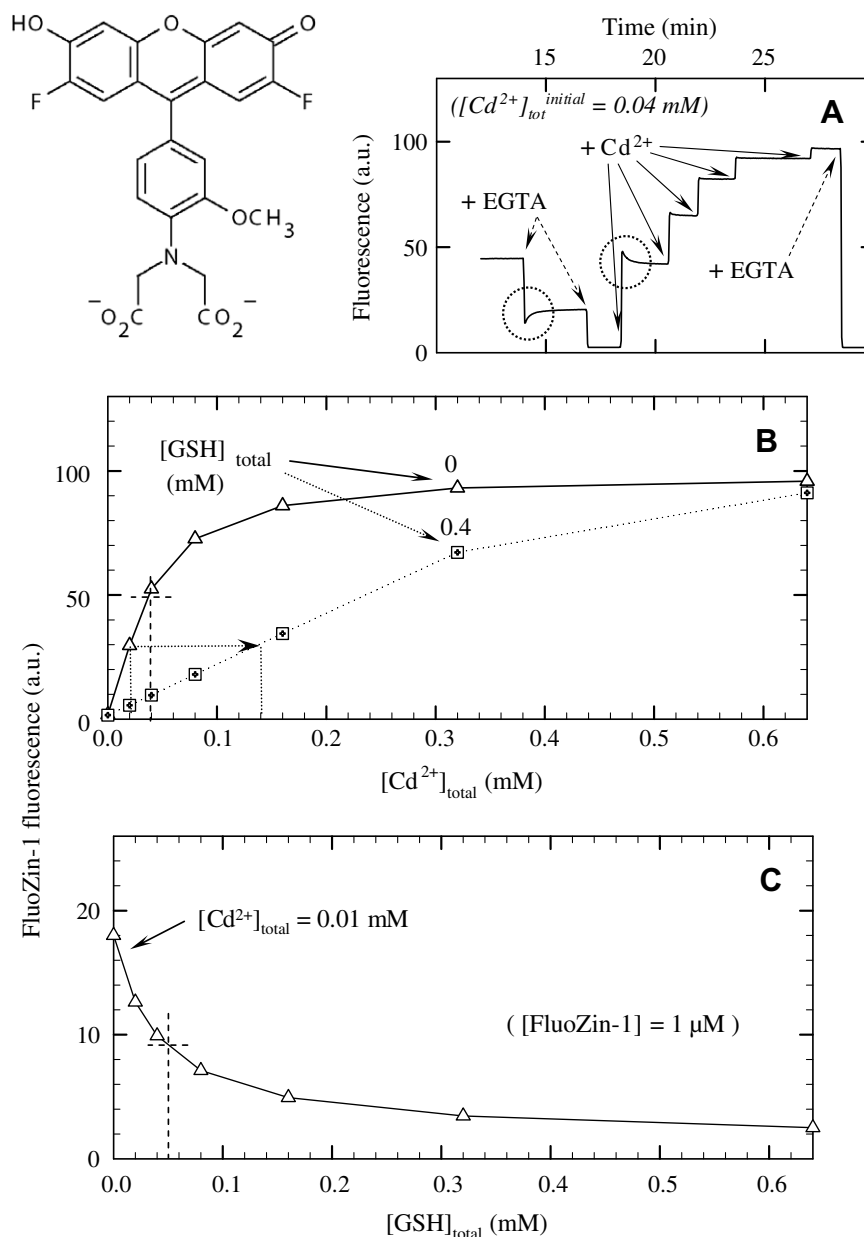


Fig. 3. FluoZin-1 as another indicator of the residual free Cd^{2+} concentration after binding to glutathione. The inset at the top left shows the FluoZin-1 chemical formula. (A) Typical recording of the fluorescence of FluoZin-1 (final concentration 1 μM) with excitation at 495 nm and emission at 515 nm (bandwidths of 2 and 10 nm, respectively). The medium (buffer A) initially contained 0.04 mM cadmium ions, and 0.02 mM EGTA. EGTA was then added, followed by a second shot of 0.02 mM EGTA. Additional cadmium was then added sequentially: first 0.04 mM (to reverse the effect of the 0.04 mM EGTA present, giving concentrations of 0.04 mM EGTA and 0.08 mM total Cd^{2+} [i.e., 0.04 mM excess cadmium] in the cuvette) and then another 0.04, 0.08, 0.16, and finally 0.32 mM. (B) Titration by added cadmium of the fluorescence of 1 μM FluoZin-1 in the presence of 50 mM KCl and 50 mM Mops–NaOH at 37 °C and pH 7.0 to 7.1 in the absence (triangles) or presence (dotted squares) of glutathione at a total concentration of 0.4 mM. (C) After 10 μM total Cd^{2+} was first added to 1 μM FluoZin-1, increasing concentrations of glutathione were then added in the same Mops–NaOH/KCl medium described above. a.u., arbitrary units.

(open triangles and dashed cross in Fig. 3B). Similar experiments, performed in different buffers, confirmed that Tris, Mes, Mops, or Tes, at a concentration of 50 mM, displayed no detectable Cd^{2+} binding at near-neutral pH (even in the presence of bicarbonate at a concentration of a few millimolar), although such binding was observed with Tricine, for instance (data not shown). This relatively poor apparent affinity of approximately 0.04 mM ensures that 1 μM

FluoZin-1 has no significant effect on free Cd^{2+} concentration. The presence of glutathione shifted this apparent affinity to the right such that, in the presence of 0.4 mM $[\text{glutathione}]_{\text{total}}$, a total cadmium concentration of 0.14 mM had a similar effect on fluorescence as did 0.02 mM cadmium in the absence of glutathione; that is, $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{free}}$ presumably was close to 0.02 mM in both cases. The apparent conditional dissociation constant for forma-

tion of the Cd(glutathione) 1:1 complex (again assuming that it was dominant here) under these conditions, therefore, is slightly lower than 0.05 mM. Values of the same order of magnitude were obtained in experiments where increasing concentrations of glutathione were added to FluoZin-1 equilibrated with a small concentration of cadmium (small enough to again ensure a linear FluoZin-1 response), that is, approximately 0.05 mM (Fig. 3C).

The results obtained with FluoZin-1 are consistent with those obtained with murexide. Therefore, both indicators reflect the equilibria prevailing in their absence. Both reveal the disappearance of free cadmium from the medium, probably concomitant with the formation of a Cd(glutathione) 1:1 complex. Because our typical conditions included 50 mM of the competing Cl^- ions, and the amount of Cd^{2+} bound to Cl^- under these conditions was nearly equivalent to the free Cd^{2+} concentration (see Supplemental Fig. S1), our observed dissociation constant of approximately 0.05 mM probably corresponds to a true conditional dissociation constant in the 0.02- to 0.03-mM range for Cd(glutathione) formation in the absence of Cl^- (at pH 7.0–7.1, ~ 0.1 M ionic strength, and 37 °C).

FluoZin-1 revealed an inconvenient property of cadmium that never would have been detected in classical pH titration experiments: the significant adsorption of Cd^{2+} onto the quartz walls of the cuvette (and probably also onto the walls of cuvettes made of other materials, including glass). An indication that such adsorption is occurring is provided by the small transient undershoots or overshoots observed in Fig. 3A following the chelation or addition of small concentrations of cadmium. We reasoned that previously adsorbed cadmium might indeed dissociate slowly from the walls on equilibration with the new lower cadmium concentration prevailing after the addition of the chelator, resulting in a corresponding slow increase in the Cd^{2+} concentration of the medium. The reverse process would occur following the addition of cadmium. This would not be easy to detect at high cadmium concentrations (at which FluoZin-1 fluorescence becomes saturated) or in the presence of cadmium-complexing ligands (which may buffer these changes in Cd^{2+}), but this should be more apparent at low cadmium concentrations. In fact, even more significant transient overshoots were observed in the presence of lower concentrations of total cadmium, especially in the absence of KCl (see Supplemental Fig. S2). This adsorption is not particularly surprising given that quartz and glass are made of silicates and, therefore, are likely to bind cations. However, it clearly decreases the accuracy with which thermodynamic constants can be estimated reliably, particularly if this adsorption remains undetected; conversely, undetected adsorption may account for some of the discrepancies in published results. Appropriate cleaning or coating procedures could be used to minimize this adsorption. Nevertheless, because such adsorption probably occurs in most biochemistry laboratories, its existence in itself reduces the precise relevance, for real biochemistry experiments, of absolute

thermodynamic constants taken from chemical databanks (even assuming that they are correct).

Cd(glutathione)_n complexes as revealed by metal-to-ligand charge transfer (far-UV absorption)

We then carried out UV spectroscopy experiments in the absence of an indicator with the aim of directly detecting the Cd^{2+} complexes formed in the presence of glutathione because charge transfer complexes of sulfhydryl compounds with Cd^{2+} are known to absorb light in the far-UV spectral region [26–28]. To minimize possible artifacts due to the strong absorption of most buffers in this spectral region, we first explored the properties of the Cd(glutathione)_n complexes by diluting our samples in 5 mM phosphate and recording their spectra in a cuvette with a 1-mm optical pathlength. The addition of 0.5 mM cadmium to 1 mM glutathione resulted in significantly higher absorbance in the far-UV region than was observed with 1 mM glutathione alone (see Supplemental Fig. S3A for these absorbance spectra). The differential spectrum is shown in Fig. 4 A, a broad band peaking in the 220-nm region, typical of charge transfer bands for S–Cd bonds.

We then switched to 1-cm optical pathlength cuvettes, facilitating the sequential addition of cadmium with stirring and data collection (as well as more reliable temperature control in the spectrophotometer used). We also switched to an ionic medium buffered without phosphate (to eliminate the formation of cadmium–phosphate complexes) and containing KCl (as found in cytosol-like media in many biochemical experiments). Over the limited range of wavelengths observable under these conditions (because of the too high levels of background absorbance in the far-UV region due to buffer and KCl [see Supplemental Fig. S3B]), the sequential addition of cadmium (up to 1.5 mM) to glutathione (0.4 mM) led to a saturable increase in absorbance as expected (Fig. 4B). Following the addition of even larger concentrations of cadmium (e.g., 2 mM in Fig. 4B), precipitation occurred, presumably because of the formation of large $\text{Cd}_m(\text{glutathione})_n$ polynuclear species. This event was clearly discernible on the spectra as a distinct contribution of light scattering to the apparent absorbance at long wavelengths (turbidity). Plots of absorbance at a particular wavelength as a function of time (Fig. 4D) showed that the UV-absorbing Cd(glutathione) species formed rapidly, with the cadmium-dependent absorbance changes occurring within the mixing period (<1 s). In this experiment, these absorbance changes were nearly superimposable at all wavelengths after appropriate normalization (but see more detailed discussion below of other cases at higher concentrations of glutathione).

The increase in absorbance at one particular wavelength was plotted as a function of total cadmium added (Fig. 4C, 250 nm in this case). When this experiment was repeated in the presence of 0.3 mM [ethylenebis-(oxyethylenetriolo)]tetraacetic acid (EGTA), a classical chelator of divalent metals [29,30], EGTA proved to be a much stronger Cd^{2+}

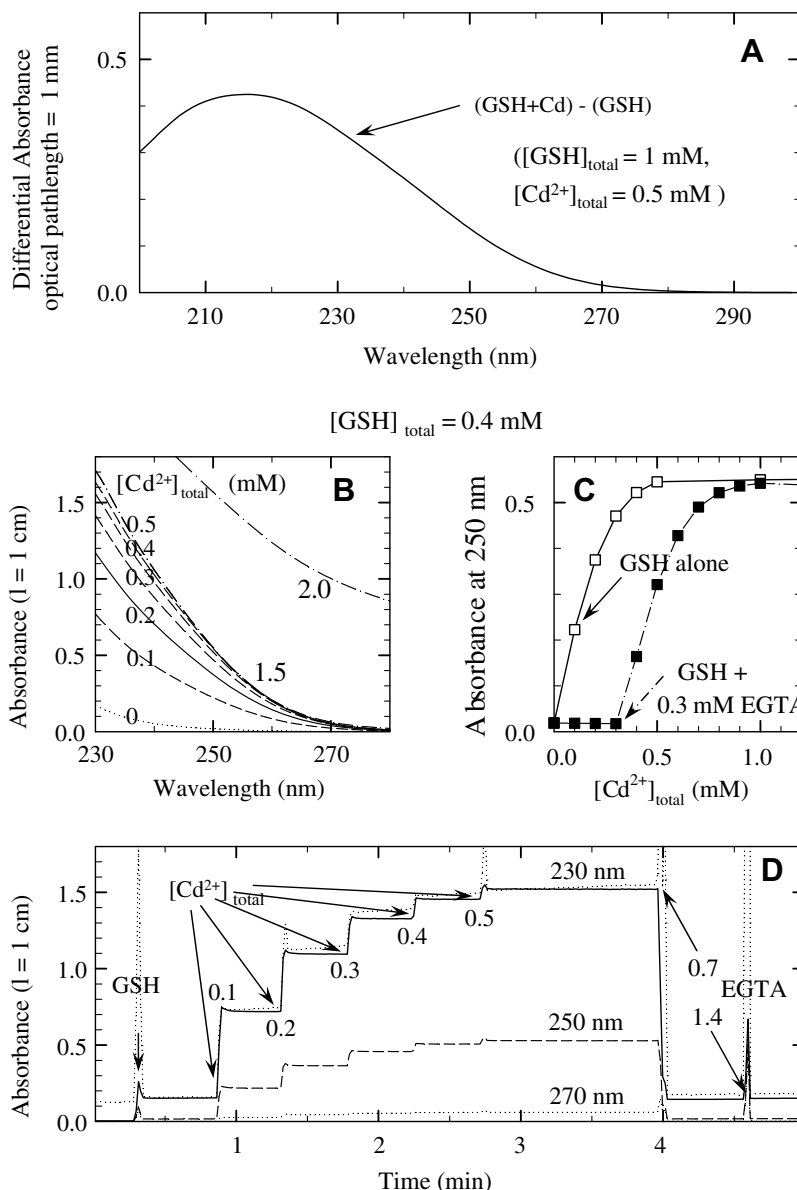


Fig. 4. Cadmium-dependent changes in far-UV absorption in the presence of 0.4 mM glutathione. (A) Spectra were recorded with a quartz cuvette with a 1-mm optical pathlength using 5 mM phosphate as the buffer: first with buffer supplemented with 1 mM glutathione and then with buffer supplemented with 1 mM glutathione and 0.5 mM cadmium. The solid line shows the difference computed from those two spectra, $[(\text{GSH} + \text{Cd}) - (\text{GSH alone})]$ (see Supplemental Fig. S3 for those spectra). (B–D) Here, as well as in Fig. 5, spectra were recorded with an ordinary quartz cuvette with a 1-cm optical pathlength under continuous stirring, and the zero absorption line was obtained with a cuvette and buffer in the beam path. The buffer here consisted of 50 mM Tris–Mes and 50 mM KCl at pH 7.0 to 7.1 and 37 °C, with recording limited to wavelengths exceeding 230 nm. (B) Glutathione was first added at a final total concentration of 0.4 mM, followed by cadmium, which was added to the stirred cuvette at various sequential total concentrations (as indicated). (C) Absorbance at 250 nm (taken from the results illustrated in panel B) was plotted as a function of added total cadmium (open symbols) together with the results of a similar experiment in which 0.3 mM EGTA was also present in the cuvette from the start of the experiment (closed symbols). (D) The kinetics of the cadmium-induced changes at three different wavelengths (230 nm [continuous line], 250 nm [dashed line], and 270 nm [dotted line]) is shown. The absorbance at 270 nm has also been replotted on an expanded scale (as a dotted line) after appropriate normalization to allow comparison with the data collected at 230 nm. In the experiment illustrated in panel D, 0.7 mM EGTA was added after 4 min (followed by another 0.7 mM), demonstrating the reversibility of absorbing complex formation.

trap than glutathione because Cd^{2+} -induced changes in absorbance were detected only when the concentration of Cd^{2+} added exceeded the concentration of EGTA. When EGTA was added after the formation of the light-absorbing complexes of glutathione with Cd^{2+} , absorption changes were also fully and rapidly reversed (Fig. 4D), revealing the rapid dissociation of the preformed Cd(gluta-

thione)_n complexes. If GSSG was used instead of glutathione, the GSSG absorption spectrum was found to be insensitive to the addition of Cd^{2+} and the spectrum of the Cd^{2+} plus GSSG mixture was insensitive to the addition of EGTA (data not shown). The same was true for *S*-methyl-glutathione (data not shown), again confirming that charge transfer complexes of Cd^{2+} with the sulfhydryl

moiety of glutathione play the main role in the observed absorption changes. We also carried out experiments similar to those presented in Fig. 4B in the presence of buffers thought to bind Cd^{2+} and, therefore, to compete with glutathione, with the expected competition being observed (data not shown).

Remarkably, in Fig. 4C (open symbols), cadmium-dependent changes did not cease abruptly after the addition of 0.2 mM total cadmium (corresponding to half of the glutathione concentration used) as would have been the case if the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex (the complex identified as important for resistance to cadmium toxicity in yeast [3]) had been formed with high affinity. Therefore, we investigated this issue in more detail, repeating similar experiments at different total concentrations of glutathione and cadmium (Fig. 5).

We carried out experiments similar to those described above but varying the total concentration of glutathione to which Cd^{2+} was sequentially added. At high glutathione concentrations, absorbance increased up to very high levels following the addition of Cd^{2+} . To observe saturation

behavior, we were forced to use a wavelength at which light was absorbed less strongly than in the far-UV region, and we chose 270 nm. For the highest concentration of glutathione tested (4 mM), maximal absorbance occurred at a $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ concentration close to 2 mM (vertical dotted line in Fig. 5A), that is, in a 1:2 ratio with the total glutathione concentration as expected for quasi-stoichiometric formation of the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex. This ratio was again not very different from 1:2 for a glutathione concentration of 2 mM, but it deviated from 1:2 quite significantly for the lowest concentrations of glutathione (down to 0.1 mM glutathione). This can be shown clearly by replotting Fig. 5A data with a different y scale (not shown here, but see Supplemental Fig. S4A) or by plotting absorbance at a shorter wavelength (see Fig. 5B, where 250 nm was chosen instead of 270 nm). These data suggest that the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex is formed quasi-stoichiometrically only at high total concentrations of glutathione (in the millimolar range); that is, it is formed with a relatively poor apparent affinity (although it has a higher extinction coefficient than the 1:1 complex).

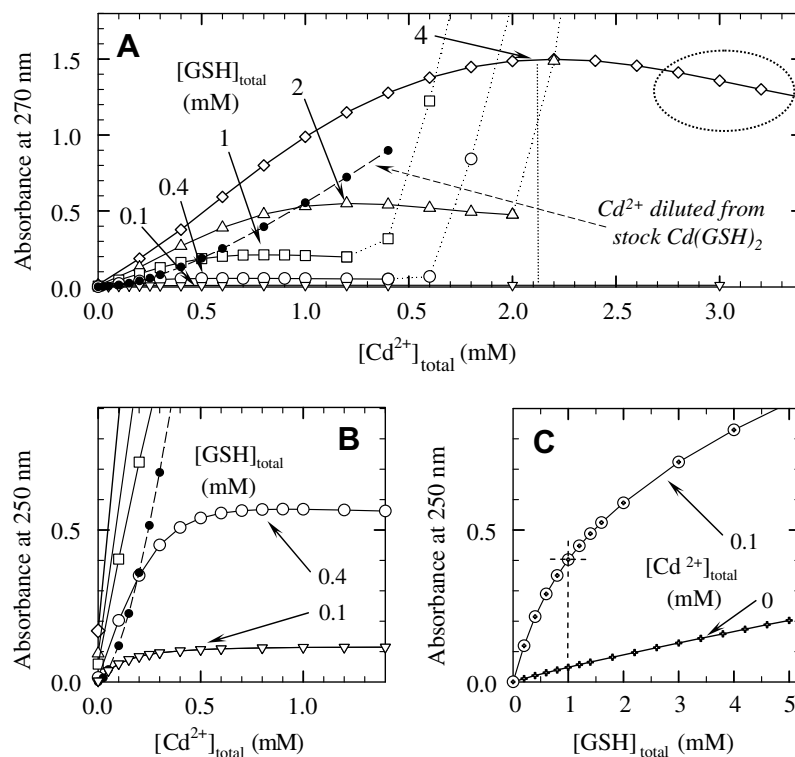


Fig. 5. Formation of $\text{Cd}^{2+}(\text{glutathione})_n$ complexes as detected by the UV absorbance of various combinations of total glutathione and total cadmium. (A and B) Open symbols in these two panels illustrate the results of experiments similar to those in Fig. 4B but performed at various (and fixed) concentrations of total glutathione: 4 mM (diamonds), 2 mM (triangles), 1 mM (squares), 0.4 mM (open circles), and 0.1 mM (inverted triangles). Buffer A was used, again at 37 °C, and absorbance at 270 nm is plotted in panel A, whereas absorbance at 250 nm, extracted from the same data set, is plotted in panel B for more sensitive detection of the changes occurring at low concentrations of glutathione (same symbols as for panel A). The small changes due to dilution on the addition of Cd^{2+} were corrected. In both panels, closed circles illustrate a second type of experiment, for which we first prepared a solution containing 10 mM cadmium and 20 mM glutathione in buffer A before this stock 1:2 mixture was then diluted to various extents in buffer A, resulting in the indicated final $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ concentrations, together with variable concentrations of glutathione (equal to twice the corresponding concentration of cadmium). (C) This panel illustrates a third type of experiment, in which a low and fixed concentration of $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ (0.1 mM) was first added to the cuvette before glutathione was then sequentially added (dotted circles). Absorbance at 250 nm is plotted. Control data in the absence of cadmium are also shown (crosses).

This poor apparent affinity and high extinction coefficient are also consistent with the observed difference in initial slopes for the different concentrations of glutathione in Figs. 5A and B. If the main complex influencing UV absorption had been a 1:2 complex formed with very high affinity, small additions of Cd^{2+} to excess glutathione would have resulted in stoichiometric complex formation in all cases and, therefore, in plots with identical initial slopes and sharp breaks before the plateau region at positions depending on total glutathione concentration.

We also carried out the complementary experiment (Fig. 5C) in which increasing concentrations of glutathione were added sequentially to a small and fixed concentration of total cadmium (0.1 mM). Half-maximum Cd^{2+} -dependent absorbance was observed for a total glutathione concentration close to 1 mM (dashed cross in Fig. 5C), that is, for a concentration of glutathione more than one order of magnitude larger than the apparent dissociation constant for $\text{Cd}(\text{glutathione})_1$ 1:1 complexes (see above). This result confirms the poor apparent constant for formation of the complex mainly responsible for UV absorbance (presumably the 1:2 complex).

At high total glutathione concentrations, in which 1:2 complexes form as soon as Cd^{2+} is added, the slight decrease in cadmium-dependent absorbance after the peak close to the 1:2 stoichiometric ratio of Cd^{2+} to glutathione is also consistent with the fact that 1:1 and 1:2 complexes do not have the same extinction coefficients (and do not have exactly the same spectrum, with the spectrum of the 1:2 complex being shifted toward longer wavelengths). At low or intermediate concentrations of glutathione, $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complexes with high extinction coefficients form with low affinity together with $\text{Cd}(\text{glutathione})_1$ 1:1 complexes with much lower extinction coefficients but with stronger affinities. This complex situation accounts for the characteristic features of the curves in Figs. 5A–C (see further comments in relation to Supplemental Figs. S4A–C).

We also performed independent experiments for which we first prepared a stock solution containing 10 mM Cd^{2+} and 20 mM glutathione in buffer A. This stock 1:2 mixture was then diluted to various extents in buffer A, resulting for each point (closed symbols in Figs. 5A and B) in a final concentration of $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ as indicated on the x axis of Figs. 5A and B but with a concentration of $[\text{glutathione}]_{\text{total}}$ now being twice that of $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$. $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complexes must have formed in this stock mixture due to the high concentrations of cadmium ions and glutathione present. However, the absorbance values measured for a given final total cadmium concentration (after dilution) were lower than those measured in the presence of a fixed high concentration of glutathione (e.g., 4 mM). This again implies that the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ complex is in rapid dynamic equilibrium, displaying rapid spontaneous dissociation on dilution.

Discussion

Possible binding of Cd^{2+} to buffers, apparent (conditional) dissociation constants for the $\text{Cd}(\text{glutathione})_n$ 1:1 and 1:2 complexes, and UV absorption properties of these complexes

Our data (e.g., Supplemental Fig. S1) first confirm the suspected formation of complexes between cadmium and various buffers, such as Tricine [31], and confirm previous numbers for complexation of cadmium by Bistris [17]. Although they also suggest that Tris buffer itself is not too much of a problem at pH 7.0 provided that it is not buffered with HCl, this latter fact does not conflict with the reported binding of Tris base to Cd^{2+} under alkaline conditions [32]; rather, it simply reflects the predominance at pH 7.0 of the protonated form of Tris (due to the relatively alkaline pK_a of Tris). Lastly, Good's buffers, such as Tes, Mops, and Mes [15], the Cd^{2+} -binding properties of which have not been reported before, also seem to pose little problem. This point is of practical importance for biochemical experiments with Cd^{2+} .

As concerns the binding of Cd^{2+} to glutathione, we deduce from our experiments with murexide or FluoZin-1 that the concentration of free cadmium is halved when the concentration of glutathione is approximately 0.05 mM (Figs. 2C and 3C) in KCl-containing Tes, Mops, or Tris buffer at pH 7.0 to 7.1 and 37 °C (with an initially low concentration of total cadmium, e.g., 0.01 mM). Because the presence of 50 mM Cl^- per se also appears to grossly halve the concentration of free Cd^{2+} (Supplemental Fig. S1), the “true” conditional dissociation constant for what we believe to be the $\text{Cd}(\text{glutathione})_1$ 1:1 complex, therefore, appears to be in the 0.02- to 0.03-mM range at pH 7.0 to 7.1 and 37 °C. More precise estimation remains difficult due to the poorly controlled possible adsorption of cadmium onto the vessel walls (Fig. 3A and Supplemental Fig. S2). Nevertheless, this result is consistent with calculations based on previously published absolute constants (e.g., those in Refs. [9,11]) and with the conditional constant of 10^{-5} M reported in one previous study [13] under slightly more alkaline pH conditions (pH 7.3). It is more difficult to compare our results with those of a previous study [10] (selected by the NIST database) because this would imply correction for the very high ionic strength used in that previous study (3 M).

In the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex that is now discussed, a single Cd^{2+} ion is thought to be bound to the deprotonated sulhydryl groups of two different glutathione molecules. Our UV spectroscopic study suggests that the concentration of free glutathione required for half-maximal formation of this 1:2 complex is close to 1 mM (see Fig. 5C), that is, more than 10 times higher than the concentration required for half-maximal formation of the 1:1 complex (~ 0.05 mM in our KCl-containing medium [see Figs. 2C and 3C]). Thus, at glutathione concentrations in the range of 0.1 to 1 mM, we conclude that both types of complex are likely to exist, making different contributions

to the absorbance signal observed in the UV region of the spectrum.

It has been suggested that in such complexes, the extinction coefficient (with respect to Cd^{2+}) of the ligand-to-metal charge transfer band of lowest energy (i.e., that found at the highest wavelength) increases with the number of sulfhydryl ligands of the metal (see, e.g., Ref. [26]). Thus, when increasing concentrations of cadmium are added to a fixed concentration of glutathione, absorbance at a high wavelength increases to a greater extent if 1:2 complexes are formed than if 1:1 complexes are formed. If concentrations and binding constants under specific conditions allow the sequential formation of 1:2 and 1:1 complexes, the intensity of this charge transfer absorption band would be expected to peak following the sequential addition of Cd^{2+} . Such a peak for the long-wavelength shoulder of the absorption band was indeed found at the anticipated stoichiometric ratio in a recent study of Cd^{2+} binding to model peptides [28]. The same rationale fully accounts for our own observation of an absorbance peak (instead of a true plateau) when the cadmium concentration is increased in the presence of a fixed high concentration of glutathione (Fig. 5A).

The spectrometry methods used here make it possible to determine apparent conditional constants under any particular experimental condition taking into account, for example, the possible presence of competing components in the medium (e.g., buffers, Cl^- ions [see Supplemental Fig. S1]). Those methods using free Cd^{2+} indicators provide relevant estimates for the formation of the $\text{Cd}(\text{glutathione})$ 1:1 complex, whereas UV spectroscopy provides a rough estimate of the apparent conditional constant for formation of the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex. This is of interest because formation of this latter complex at a particular pH is not easily predicted “by eye” from absolute thermodynamic tables.

Absolute constants for formation of various $(\text{metal})_m(\text{proton})_h(\text{ligand})_l$ complexes

The determination by far-UV spectrometry of the formation of the $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complex is of even greater interest because it reduces the unavoidable ambiguity of the results of classical pH titration experiments for such a complicated system. As already mentioned, as the final outcome of our efforts to fit our own pH titration data, we found by trial and error, and assuming that 1:1 and 1:2 species form with various levels of protonation, that the absolute constants in Table 1 (shown as $\log_{10}$ values) fitted our pH titration results (Fig. 1A) fairly well. The same set of constants also fitted all of the characteristic features of our spectrometry data more than adequately (see Supplemental Fig. S5). But it must be emphasized here that the spectrometry results were required to reduce the ambiguity of the pH titration results; simultaneously modifying the apparent affinity for Cd^{2+} of the 1:1 complexes by a factor of 2 in one direction and the apparent affinity for

Cd^{2+} of the 1:2 complexes by a factor of 2 in the other direction had little effect on the fit for pH titration data but had a clearly detrimental effect on the fit to spectrometry results (see Supplemental Fig. S5). Thus, the collection of spectroscopic data in addition to classical pH titration experiments was requested for us to discriminate between otherwise acceptable fits of the numerous equilibria involved in such experiments.

The resulting simulated speciation of Cd^{2+} at various pH values in the presence of 1 mM total glutathione (Figs. 1B and C) confirms that 1:1 and 1:2 complexes coexist at pH 7.0 (vertical dashed lines in Figs. 1B and C). At pH 7.0, 1:2 complexes become dominant only at very high millimolar concentrations of total glutathione, whereas 1:1 complexes are dominant at very low submillimolar concentrations of total glutathione (simulations not shown). At low total glutathione concentrations, the constants proposed in a previous study [10] would result in concentrations of 1:2 complexes at pH 7.0 three times higher than predicted by the constants in Table 1 (and established given our UV measurements in Fig. 5C). Besides the higher ionic strength in that previous study [10], one reason for the discrepancy may be that spectrometry experiments can be performed both at high and low total glutathione concentrations, corresponding to nearly pure extreme situations in which either the 1:2 or 1:1 species dominate. In contrast, despite the desirability of performing pH titration experiments with a large enough number of different metal and ligand concentrations, such experiments are difficult to perform at very low glutathione concentrations unless extreme care is taken to avoid pH errors due to atmospheric CO_2 .

Our interpretation of the data also implies the existence between pH 6.0 and 7.0 of Cd^{2+} complexes with a fully deprotonated glutathione (L^{3-}), whereas previous studies [6,7] suggested that, at pH values below 7.0, essentially no such “ML” species formed. However, this assumption was based on the results of NMR experiments performed with very high concentrations of glutathione (300 mM in some cases). Conversely, the protonated “MHL” form of the complex was omitted in another recent report [14]. Neither of these omissions seems to be consistent with our experimental data. Nevertheless, it is fair to recognize that we devoted little attention to the putative additional formation of more rarely described species such as M_2L , $\text{M}_2\text{H}_3\text{L}_3$, and MH_3L_3 [6,9].

Physiological relevance, kinetics for formation of the various $(\text{metal})_m(\text{proton})_h(\text{ligand})_l$ complexes, and conclusion

The low affinity with which $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complexes are formed (submillimolar) probably accounts for the fact that demonstration of the uptake of ^{109}Cd -labeled complexes into membrane vesicles has remained limited to only one study to date [3]. $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complexes form to only small extents at the low total concentrations generally used in biochemical uptake experiments. How-

ever, this poor affinity is not a real problem in cells where the total concentration of glutathione is thought to be on the order of several millimolar. Cd(glutathione)₂ 1:2 complexes will form there, and these complexes will be eliminated by the cell detoxification systems [3].

Our results also show that 1:1 and 1:2 complexes form and dissociate rapidly compared with the time scale of hand mixing. This finding is consistent with two types of previous reports suggesting millisecond time scales for rates of exchange: NMR experiments, in which (thanks to rapid exchange) the ¹³C resonance lines of individual carbon atoms of glutathione remained narrow despite the significant Cd²⁺-dependent chemical shifts [6,7,33], and temperature jump relaxation experiments performed with glutathione complexes with another divalent cation, zinc (Zn²⁺) [34]. Thereby, our data suggest that the extensive incubation period used previously to prepare radiolabeled ¹⁰⁹Cd(glutathione)₂ complexes (24 h at 45 °C in Ref. [3]) may have been unnecessary.

In conclusion, under our experimental conditions at pH 7.0 to 7.1 and 37 °C, Cd²⁺ formed 1:1 complexes with glutathione with moderate apparent strength (conditional dissociation constant of a few tens of micromoles), whereas 1:2 Cd(glutathione)₂ complexes become dominant only at higher millimolar concentrations of total glutathione because those 1:2 complexes were formed with poorer apparent affinity. Probable formation constants for the various complexes are shown in Table 1. However, of even greater importance than these absolute numbers, our work shows that apparent conditional constants can be estimated without difficulty under the specific conditions of a given series of experiments even by nonchemists (and that such estimation may in fact be required to discriminate between models). Thus, we hope that this work will prove to be useful to the many biochemists interested in toxic metals (not only Cd²⁺) forming light-absorbing charge transfer complexes with biological ligands.

Acknowledgments

We thank many colleagues for their help with literature reviews concerning metal–ligand complexation and the simulation of multiple equilibria as well as for fruitful discussions and the critical reading of early versions of this manuscript. We particularly thank H. Sigel (Basel); D.L. Rabenstein (Riverside); P. Campbell (Quebec); K. Powell (New Zealand); R.M. Smith (Texas); C. Fauquant and P. Delangle (Grenoble); P. Falson (Lyon); J. van der Lee, M. Parmentier, and C. Martin (Paris); C. Forestier (Cadaraiche); E. Ansoborlo (CEA–Valrho); and J. Labarre, O. Delalande, P. Vitorge, V. Lourenço, G. Le Rouzo, M. Carriere, and B. Gouget (Saclay). We also thank Julie Sappa for her help in editing the final version of the manuscript, and we thank the “Toxicologie Nucléaire Environnementale” program for supporting P.L. financially.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ab.2007.07.015](https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.015).

References

- [1] M.N. Hughes, R.K. Poole, Metal speciation and microbial growth: the hard (and soft) facts, *J. Gen. Microbiol.* 137 (1991) 725–734.
- [2] M.R. Twiss, O. Errécalde, C. Fortin, P.G.C. Campbell, C. Jumarie, F. Denizau, E. Berkelaar, B. Hale, K. van Rees, Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity, *Chem. Spec. Bioavail.* 13 (2001) 9–24.
- [3] Z.-S. Li, Y.-P. Lu, R.-G. Zhen, M. Szczypka, D. Thiele, P.A. Rea, A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 42–47.
- [4] Z. Nagy, C. Montigny, P. Leverrier, S. Yeh, A. Goffeau, M. Garrigos, P. Falson, Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification, *Biochimie* 88 (2006) 1665–1671.
- [5] A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical Stability Constants*, vol. 5, Plenum, New York, 1982.
- [6] D.L. Rabenstein, R. Guévremont, C.A. Evans, Glutathione and its metal complexes, in: H. Sigel (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 9, Marcel Dekker, New York, 1979, pp. 103–142.
- [7] D.L. Rabenstein, Metal complexes of glutathione and their biological significance, in: D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic (Eds.), *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*, part A, John Wiley, New York, 1989, pp. 147–186.
- [8] N.C. Li, R.A. Manning, Some metal complexes of sulphur-containing amino acids, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 5225–5228.
- [9] D.D. Perrin, A.E. Watt, Complex formation of zinc and cadmium with glutathione, *Biochim. Biophys. Acta* 230 (1971) 96–104.
- [10] A.M. Corrie, M.D. Walker, D.R. Williams, Thermodynamic considerations in co-ordination: XXII. Sequestering ligands for improving the treatment of plumbism and cadmiumism, *J. Chem. Soc. Dalton* (1976) 1012–1015.
- [11] W. Kadima, D.L. Rabenstein, Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes: XXVI. Mixed ligand complexes of cadmium, nitrilotriacetic acid, glutathione, and related ligands, *J. Inorg. Biochem.* 38 (1990) 277–288.
- [12] M.M. Shoukry, E.M. Khairy, M.M.A. Mohamed, Binary and ternary complexes of Cd(II) involving N-(2-acetamido)iminodiacetic acid and amino acids, *Annali di Chimica* 86 (1996) 167–180.
- [13] C. Jumarie, C. Fortin, M. Houde, P.G.C. Campbell, F. Denizau, Cadmium uptake by Caco-2 cells: Effects of Cd complexation by chloride, glutathione, and phytochelatin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170 (2001) 29–38.
- [14] N. Burford, M.D. Eelman, K. Groom, Identification of complexes containing glutathione with As(III), Sb(III), Cd(II), Hg(II), Tl(I), Pb(II), or Bi(III) by electrospray ionization mass spectrometry, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1992–1997.
- [15] N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, R.M. Singh, Hydrogen ion buffers for biological research, *Biochemistry* 5 (1966) 467–477.
- [16] V.S. Stoll, J.S. Blanchard, *Buffers: principles and practice*, *Methods Enzymol.* 182 (1990) 24–38.
- [17] K.H. Scheller, T.H. Abel, P.E. Polanyi, P.K. Wenk, B.E. Fischer, H. Sigel, Metal ion/buffer interactions: Stability of binary and ternary complexes containing 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Bistris) and adenosine 5'-triphosphate (ATP), *Eur. J. Biochem.* 107 (1980) 455–466.
- [18] G.H. Nancollas, M.B. Tomson, Guidelines for the determination of stability constants, *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 2675–2692.

- [19] T. Ohnishi, Characterization of the murexide method: dual-wave-length spectrophotometry of cations under physiological conditions, *Anal. Biochem.* 85 (1978) 165–179.
- [20] Y. Ogawa, H. Harafuji, N. Kurebayashi, Comparison of the characteristics of four metallochromic dyes as potential calcium indicators for biological experiments, *J. Biochem.* 87 (1980) 1293–1303.
- [21] M.V. Thomas, Metallochromic indicators, in: *Techniques in Calcium Research*, Academic Press, London, 1982, pp. 90–138.
- [22] A. Scarpa, F.J. Brinley Jr., G. Dubyak, Antipyrilazo III, a “middle range” Ca^{2+} metallochromic indicator, *Biochemistry* 17 (1978) 1378–1386.
- [23] P.L. Dorogi, K. Moss, E. Neumann, H.W. Chang, Spectrophotometric determination of reaction stoichiometry and equilibrium constants of metallochromic indicators: III. Antipyrilazo III complexing with Ca^{2+} and acetylcholine receptor protein, *Biophys. Chem.* 14 (1981) 91–100.
- [24] S. Hollingworth, R.W. Aldrich, S.M. Baylor, In vitro calibration of the equilibrium reactions of the metallochromic indicator dye antipyrilazo III with calcium, *Biophys. J.* 51 (1987) 383–393.
- [25] C. Montigny, P. Champeil, Use of metallochromic dyes and potentiometric pH titration to detect binding of divalent cations to “Good’s” buffers: mops does not bind Mg^{2+} , *Anal. Biochem.* 366 (2007) 96–98.
- [26] C.J. Henahan, D.L. Pountney, O. Zerbe, M. Vasak, Identification of cysteine ligands in metalloproteins using optical and NMR spectroscopy: Cadmium-substituted rubredoxin as a model $[\text{Cd}(\text{CysS})_4]^{2-}$ center, *Protein Sci.* 2 (1993) 1756–1764.
- [27] Y. Cheng, Y. Yan, J. Liu, Spectroscopic characterization of metal bound phytochelatin analogue (Glu-Cys)4-Gly, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1952–1962.
- [28] P. Rousselot-Pailley, O. Sèneque, C. Lebrun, S. Crouzy, D. Boturyn, P. Dumy, M. Ferrand, P. Delangle, Model peptides based on the binding loop of the copper metallochaperone Atx1: selectivity of the consensus sequence MxCxxC for metal ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II), *Inorg. Chem.* 45 (2006) 5510–5520.
- [29] A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical Stability Constants*, vol. 1, Plenum, New York, 1974, pp. 269–274.
- [30] R. Tsien, T. Pozzan, Measurement of cytosolic free Ca^{2+} with quin2, *Methods Enzymol.* 172 (1989) 230–262.
- [31] J.D. Holmes, P.R. Smith, R. Evans-Gowing, D.J. Richardson, D.A. Russell, J.R. Sodeau, Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmium sulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*, *Arch. Microbiol.* 163 (1995) 143–147.
- [32] B.E. Fischer, U.K. Häring, R. Tribolet, H. Sigel, Metal ion/buffer interactions: stability of binary and ternary complexes containing 2-amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris) and adenosine 5'-triphosphate (ATP), *Eur. J. Biochem.* 94 (1979) 523–530.
- [33] B.J. Fuhr, D.L. Rabenstein, Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes: IX. The binding of cadmium, zinc, lead, and mercury by glutathione, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 6944–6950.
- [34] L.A. Dominey, K. Kustin, Kinetics and mechanism of Zn(II) complexation with reduced glutathione, *J. Inorg. Biochem.* 18 (1983) 153–160.

Supplemental Material for the Ms:

Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revisited

by Pauline Leverrier, Cédric Montigny, Manuel Garrigos and Philippe Champeil

Analysis of some of the available literature about the formation of glutathione complexes

At first glance, there seems to be little agreement in the published literature concerning the details of Cd^{2+} binding to glutathione. For instance, *Supplemental Table 1* shows numbers for constants in some of these publications, as listed on the IUPAC database at the beginning of 2006: this table seems to suggest that the reported association constant “K1” (given here as the *logarithm* of this constant) may differ by as much as 10^4 from one reference to another, with two references seemingly indicating a value close to 10^6 , and another two indicating a value close to 10^{10} .

Supplemental Table 1
Binding of Cd^{2+} to glutathione, as quoted in the IUPAC database in 2006

Cd++	nmr NaNO3	25°C 0.40M U M K(Cd(NTA)+L)=5.28	K1=6.16	1990KR_a (<i>ref. 11</i>)
Cd++	gl KNO3	25°C 0.20M C B(CdHL)=13.43	K1=6.18	1990KU_a (<i>ref. 35</i>)
Cd++	gl NaClO4	25°C 3.00M C B2=15.35 B(CdHL)=17.02 B(CdHL2)=25.08 B(CdH2L2)=33.03 B(CdH-1L)=0.29 B(CdH-1L2)=3.17	K1=10.18	1976CW_a (<i>ref. 10</i>)
Cd++	gl KNO3	25°C 0.15M U	K1=10.50	1955LM_a (<i>ref. 8</i>)

However, on closer examination, the situation appears to be less extreme. Firstly, the second reference indicated in this table (1990KU_a, see ref.[35] in Additional References at the end of Supplemental material) in fact concerns Cd^{2+} binding to the oxidized form of glutathione, GSSG, rather than to glutathione itself (and following an exchange of e-mails, this reference should by now have been

removed from the IUPAC database). Secondly, the constant extracted from the first reference (1990KR, [11]) does not seem to have been introduced in a manner consistent with that for the other references. This constant has simply been copied from the original paper, without taking into account the fact that, in the original paper, the constants indicated referred to Cd^{2+} binding to GS^{2-} (*i.e.* HL^{2-}), rather than to the fully deprotonated ligand (*i.e.* L^{3-}) as in the rest of the table (and generally in the IUPAC database). When this is taken into account, the quantitative discrepancy between the values quoted in this first reference [11] and those quoted in the third and fourth references (1976CWA and 1955LMA, [10] and [8] in this Ms) becomes much smaller [6,7].

However, the discrepancy remains significant, because the authors of 1976CWA ([10] in this Ms, *i.e.* the reference selected in [5], the NIST database) believe that Cd^{2+} can bind strongly to the fully deprotonated L^{3-} , whereas the authors of 1990KR ([11]) cite previous evidence that Cd^{2+} binds to protonated ligand only (HL^{2-} , or GS^{2-}) (at least close to neutrality, see [6,7]). However, this alternative view is not supported by the results presented in [14] concerning complexes of zinc with glutathione.

It is also worth pointing out that the various constants were obtained under different temperature or ionic strength conditions. For example, the data in [10] (1976CWA) were obtained in the presence of 3 M KNO_3 , and therefore cannot easily be used for experiments under conditions typical of ordinary biochemical experiments.

Beyond the 1976CWA constants referred to in the IUPAC data base, *Supplemental Table 2* also lists some of the other constants already published, together with the various complexes sometimes considered to exist.

Supplemental Table 2
Previously reported thermodynamic constants for the formation of various complexes

Complex formed ^a	Abbrev. name ($\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l$)	Cumulative constant ($\log \beta_{\text{mhl}}$) ^b , from 1976CWA ^c	Cumulative constant ($\log \beta_{\text{mhl}}$) ^b , from 1971PW ^c	Cumulative constant ($\log \beta_{\text{mhl}}$) ^b , from 1979RGE ^c
$\text{H}_3\text{Glu}(\text{aq})$	H_3L	22.86	21.50	21.61
$\text{H}_2\text{Glu}[-]$	H_2L	19.04	17.96	18.21
$\text{HGlu}[2-]$	HL	9.88	9.42	9.49
$\text{Cd}(\text{HGlu})(\text{aq})$	MHL	17.02	15.19	15.65 (6.16+9.49)
$\text{CdGlu}[-]$	ML	10.18	8.59	-
$\text{CdGlu}(\text{OH})[2-]$	MHL_1L	0.29	-0.53 (8.59-9.12)	-
$\text{Cd}(\text{HGlu})_2[2-]$	MH_2L_2	33.03	30.45	31.06 (12.06+2*9.5)
$\text{CdGlu}(\text{HGlu})[3-]$	MHL_2	25.08	22.81	21.7 (31.06-9.36)
$\text{Cd}(\text{Glu})_2[4-]$	ML_2	15.35	13.39	-
$\text{Cd}(\text{Glu})_2\text{OH}[5-]$	MH_1L_2	3.17	-	-
Other complexes			M_2L (13.29)	$\text{M}_2\text{H}_3\text{L}_3$, MH_3L_3

^a The various complexes are listed from the most protonated to the least protonated. Note that *refs. 8 and 5* also suggest that M_2L and $\text{M}_2\text{H}_3\text{L}_3$, and MH_3L_3 complexes, respectively, are formed.

^b The *cumulative* constant for formation of the $\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l$ complex (here given as $\log \beta_{\text{mhl}}$) is defined as:

$$\beta_{\text{mhl}} = [\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l] / ([\text{M}]^m [\text{H}]^h [\text{L}]^l)$$

^c The three columns on the right show the constants found in (or calculated from) [10], [9] and [6], respectively. We made no attempt to correct for differences in activity or ionic strength.

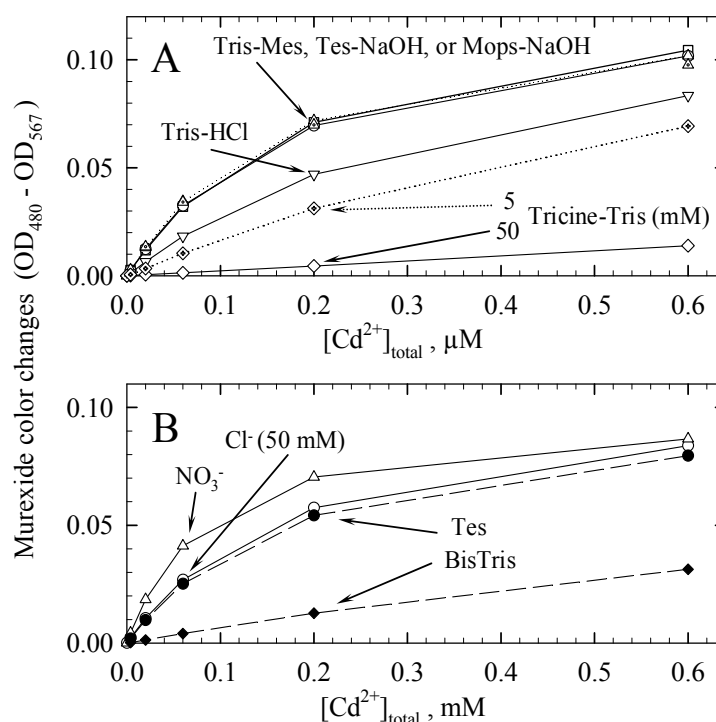
Rationale for a tentative simple interpretation of classical pH titration curves

For an initial rough interpretation (i.e. without the use of complicated software) of titration curves similar to those shown in Fig. 1, glutathione may be assumed, for the sake of simplicity, to act as a simple buffer with the sulfhydryl-deprotonated HL^{2-} (or GS^{2-}) species either being protonated to form H_2L^- (or GSH^- , the dominant species at pH 7) or forming a 1:1 neutral complex with the metallic Cd^{2+} ion. In this situation, a classical analysis of the simplest model of competition between protons (H) and the single metallic ion (“M”) would predict that: $K'_\text{H} = K_\text{H} (1 + [\text{M}]/K_\text{M})$, all constants being expressed as dissociation constants and M being the concentration of *free* metal. An identical formalism is used for analysis at a given pH of the apparent affinity for metal of a protonatable chelator [36], and is even more widely used for analyses of competition between a ligand and a competitor for binding to a Michaelian enzyme. Thus, considering the region in which glutathione is active as a buffer with $\text{pK}_\text{H} \approx 8.5$, its shift by about 3 pH units in the presence of 1 mM $[\text{Cd}^{2+}]_\text{total}$ would imply that the thermodynamic dissociation constant K_M of the individual $\text{Cd}^{2+}.\text{(GS}^{2-})$ complex is three orders of magnitude smaller than the competitor $[\text{Cd}^{2+}]_\text{free}$ (according to this hypothesis, about 0.5 mM at $\text{pH} = \text{pK}'_\text{H}$). This would place it in the submicromolar range, as previously reported (e.g. [11]). Given that, for a pKa of the sulfhydryl group close to 9, the sulfhydryl-deprotonated HL^{2-} (or GS^{2-}) species is present in amounts corresponding to 1% the amount of the main species H_2L^- (or GSH^-) species at pH 7, this would correspond to an *apparent* dissociation constant for the 1:1 Cd(glutathione) complex (in terms of concentration of *total* glutathione) of a few tens of μM , as reported in a previous study [13].

Possible role of medium components in competition with glutathione for the binding of Cd^{2+}

As cadmium, like other “borderline” or “soft” metal ions, may also bind to components of ionic solutions other than glutathione, including chloride ions or some of the usual buffers (e.g. [1, 13, 15, 17, 29, 37-38]; reviewed in [39]), we measured the apparent affinity of murexide for Cd^{2+} in media in which different buffers had been used to fix pH at the same desired value. In such experiments, any formation of cadmium complexes with the buffer should reduce the apparent ability of cadmium to interact with the indicator (and with glutathione, if present): curves like those in Fig. 2B of the main text should shift to the right, as they are plotted as a function of the *total* cadmium added. A similar rationale has been used to deduce Ca^{2+} binding to Bis-Tris from its competition with murexide, and the results obtained [40] were consistent with those obtained with other methods [17]. As a control, we tested the competition between *ATP* and murexide for the binding of Cd^{2+} , and obtained an apparent dissociation constant for the $\text{Cd}^{2+}.\text{ATP}$ complex of about 0.02 mM (data not shown), consistent with reference values [41]. We therefore used the same approach to assess Cd^{2+} binding, if any, to constituents of our ionic media other than glutathione (see *Supplemental Fig. S1* below).

Murexide (at 10 μM) as a probe of Cd^{2+} binding to buffers or Cl^-



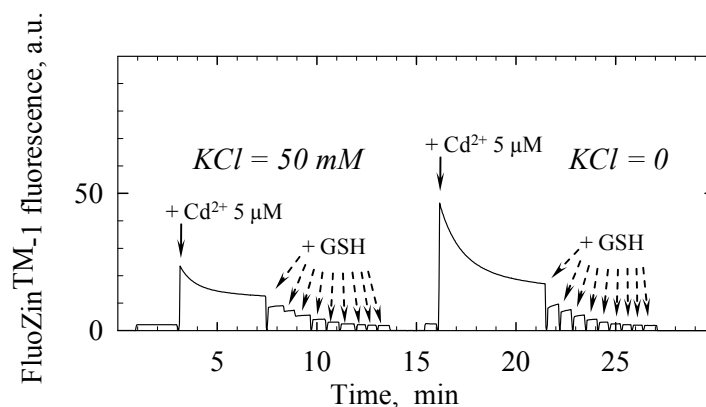
Supplemental Figure S1. Murexide (at 10 μM) as a probe of cadmium binding to buffers or Cl^- .

Titration with cadmium was carried out as in Fig. 2B (squares), but with a different aqueous medium. *Panel A*, this medium contained 50 mM KCl in the presence of either Tris-Mes, as for Fig. 2B (squares), or Tes-NaOH (circles), or Mops-NaOH (right side up triangles), or tricine-Tris (open diamonds), or Tris-HCl (upside down triangles); in all cases, the buffer concentration was 50 mM, and pH was about 7-7.1 at 37°C. In the case of Tricine-Tris, an intermediate case was also studied: 5 mM Tricine-Tris supplemented with 45 mM Tris-Mes (dotted diamonds, dotted line). *Panel B*, in this experiment, the murexide stock solution was one day older and had therefore experienced slight bleaching (hence a 10 % loss of absorbance). *Continuous lines*, same experiment as above in the presence of 50 mM Tes-NaOH, with either 50 mM KCl as before (open circles), or 50 mM KNO₃ (open triangles). *Dashed lines*, similar experiment, with either 50 mM BisTris-Mes (closed diamonds) or 50 mM Tes-NaOH (closed circles), but with medium containing 1 M KNO₃ rather than 50 mM KCl and kept at 25°C and pH 7 (to reproduce the conditions of experiments in [17]).

Comments: Supplemental Fig. S1A shows that 50 mM Tris-Mes, Tes-NaOH and Mops-NaOH gave results similar to those obtained for murexide with added $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$, whereas Tricine-Tris resulted in a very significant shift to the right due to competition between murexide and Tricine for binding to Cd^{2+} (diamonds in Fig. S1A), as expected from the observations reported in [31]. Strong competition between murexide and Bis-Tris was also observed (closed diamonds versus closed circles in Supplemental Fig. S1B), allowing to calculate an apparent dissociation constant of 5-7 mM for the Cd(Bis-Tris) complex, consistent also with the previously reported absolute value of $10^{2.47}$ for $K_{\text{Cd}(\text{Bis-Tris})}^{\text{Cd}}$ [17].

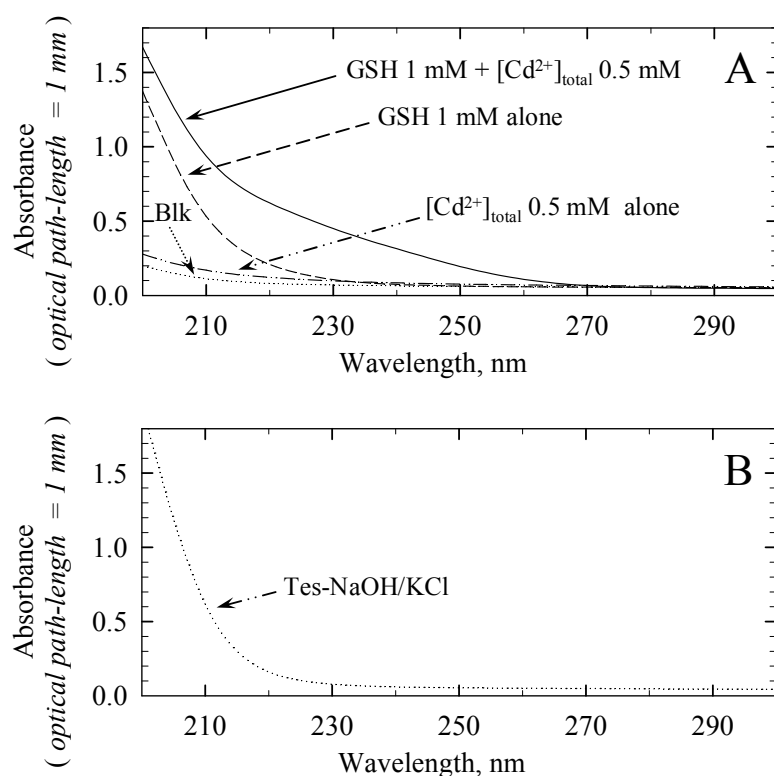
As our standard buffers A & B also contained 50 mM KCl, we tested whether the Cl^- anion itself bound Cd^{2+} , as suggested in [13]: we found that it did, as replacing KCl by KNO₃, which eliminated competition between Cl^- and murexide for Cd^{2+} binding, increased the apparent affinity of murexide for Cd^{2+} by a factor of almost 2 (compare open triangles and open circles in Fig. S1B). Thus, in the presence of 50 mM Cl^- , almost half the available cadmium is bound to Cl^- . This is why the use of Tris-HCl rather than Tris-Mes also resulted in moderate competition for the binding of cadmium to murexide (upside down triangles versus squares in Fig. S1A).

Cd^{2+} adsorption onto the cuvette walls, as revealed by FluoZinTM-1, another probe for the binding of Cd^{2+} to buffers or glutathione



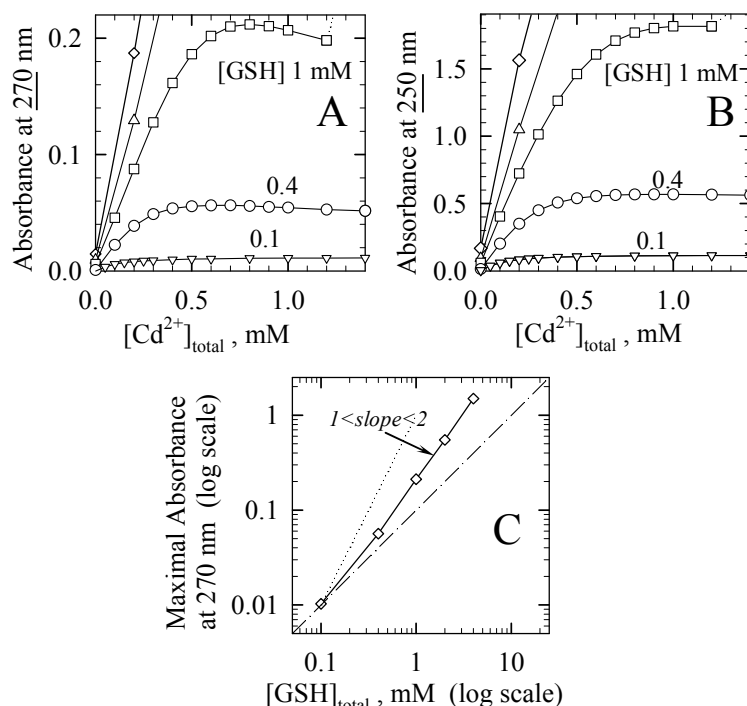
Supplemental Figure S2. Cd^{2+} adsorption onto the cuvette walls, as revealed by FluoZinTM-1, may be highly significant. In these experiments, 0.005 mM of Cd^{2+} only was added to 1 μM FluoZinTM-1 in 50 mM Mops-NaOH buffer (here at 20°C and pH 7.4), in the presence (left) or absence (right) of 50 mM KCl. The observed transient overshoot in final fluorescence in the cuvette was greater than that observed at 0.04 mM Cd^{2+} in Figure 3A of the main text, especially in the absence of KCl (in its presence, Cl^- partly complexes Cd^{2+} and K^+ probably adsorbs onto the silicate walls of the quartz cuvette: both phenomena minimize Cd^{2+} adsorption). Once this adsorption had reached equilibrium (or was close to equilibrium), glutathione was added sequentially, as for the experiments in Figure 3C of the main text (and as expected, GSH was a more efficient competitor of FluoZinTM-1 in the absence of the Cl^- than in its presence). Following the addition of glutathione, the changes in FluoZinTM-1 fluorescence (reflecting free Cd^{2+} concentration) were rapid, suggesting that Cd(glutathione) complexes formed rapidly (as also shown in Fig. 4D of main text).

Cd^{2+} -dependent changes in UV absorption in the presence of GSH, and interference of Tes/KCl absorption in the far-UV region



Supplemental Figure S3. Far-UV spectra of glutathione with and without cadmium, and strong absorbance of KCl/Tes in the far-UV region. Spectra were recorded with a quartz cuvette with a 1 mm optical path-length, using 5 mM phosphate as the buffer. In *Panel A*, the zero absorption line was obtained with no sample at all in the beam path (just air). *Dashed line*, buffer supplemented with 1 mM glutathione. *Continuous line*, buffer supplemented with 1 mM glutathione and 0.5 mM cadmium. *Dotted line*, buffer only (with cuvette); for rigorous comparison, this buffer (labeled as “Blk”) here consisted of 5 mM phosphate *together with* a 1:40 dilution of buffer A, in which cadmium and glutathione were dissolved for the additions cited above. Dashed-dotted-dotted line, buffer supplemented with 0.5 mM cadmium alone (this spectrum is probably contaminated by the increase in turbidity resulting from low levels of cadmium precipitation, with phosphate). In *Panel B*, the cuvette (here again with a 1 mm optical path-length) contains “buffer A” (i.e. 100 mM KCl with an “ordinary” buffer, 20 mM Tes-NaOH). The strong absorbance in the UV region explains why a 5 mM phosphate buffer had to be chosen for the experiments in *Panel A*, and why recorded spectra were limited to wavelengths exceeding 230 nm when a cuvette with a 1 cm optical path length was used for the experiments illustrated in Fig. 4B of main text.

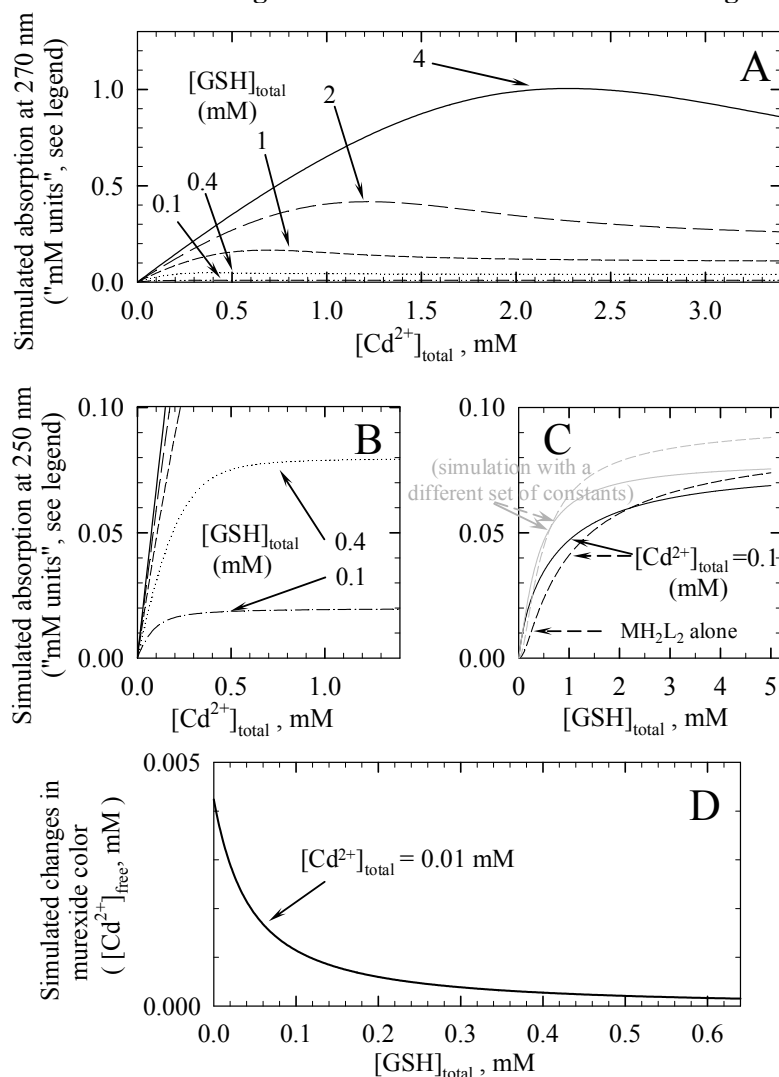
Additional evidence for the simultaneous presence of $\text{Cd}(\text{GSH})_n$ 1:1 and 1:2 complexes at low or intermediate GSH concentrations, and their unequal contribution to UV absorption on the low-energy side



Supplemental Figure S4. Additional evidence for the simultaneous presence of $\text{Cd}(\text{GSH})_n$ 1:1 and 1:2 complexes at low and intermediate GSH concentrations, and their unequal contribution to UV absorption on the low-energy side. Panels A-C are derived from the experiment illustrated in Fig. 5A&B of the main text. *Panel A*, the data illustrated in Fig. 5A (absorbance at 270 nm) are here re-plotted on an expanded scale, to make the maximum in these curves more visible, when present (same symbols as for Fig. 5A). *Panel B*, similar plot for absorbance at 250 nm: the data illustrated in Fig. 5B are re-plotted here on a Y scale allowing easier comparison with the results in *Panel A*. *Panel C*, the maximal absorbance for each of the curves with open symbols in Fig. 5A is plotted against the $[\text{glutathione}]_{\text{total}}$ for these curves (0.1, 0.4, 1, 2 and 4 mM, respectively). This is a log-log plot, and the dashed-dotted line indicates the slope that would correspond to linear dependence, with the dotted line indicating the slope that would correspond to quadratic dependence.

Additional comments on Figure 5 of the main text. The maximal absorbance reached at high cadmium concentrations in Fig. 5A and 5B was not proportional to $[\text{glutathione}]$, or to $[\text{glutathione}]^2$. Instead, it was proportional to $[\text{glutathione}]^n$, with n lying between 1 and 2 (*Supplemental Fig. S4C*). This suggests that both $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complexes and $\text{Cd}(\text{glutathione})$ 1:1 complexes may form, but with different apparent affinities, and that the two complexes do not contribute equally to the observed far-UV absorbance: at high glutathione concentrations, $\text{Cd}(\text{glutathione})_2$ 1:2 complexes predominate (low apparent affinity in terms of glutathione concentration and high extinction coefficient), whereas at low glutathione concentrations $\text{Cd}(\text{glutathione})$, 1:1 complexes predominate (higher apparent affinity but lower extinction coefficient at 270 nm). These findings also provide a rational explanation for the fact that the midpoint observed when glutathione was added to 0.1 mM total cadmium in Fig. 5C (close to 1 mM and essentially reflecting the apparent dissociation constant for formation of the 1:2 complex) was significantly higher than the midpoint observed when Cd^{2+} was added to 0.1 mM total glutathione in Fig. 5B (about 0.1 mM or slightly less, upside down triangles in Fig. 5B: this second midpoint is strongly dependent on formation of the 1:1 complex). The difference in extinction coefficients for the two types of complex also contributes to the heavy dependence of the initial slopes in Fig. 5A on total glutathione concentration.

JCHESS simulation using the constants in Table 1, in the presence of 50 mM KCl at pH 7, of various titrations of glutathione with Cd^{2+} or of Cd^{2+} with glutathione



Supplemental Figure S5. JCHESS simulation using the constants in Table 1, in the presence of 50 mM KCl at pH 7, of various titrations of glutathione with Cd^{2+} or of Cd^{2+} with glutathione.

Panels A-C, simulated UV absorbance properties of various combinations of total GSH and total Cd^{2+} (compare with the data in Fig. 5, A-C) in a pH 7 buffer also containing 50 mM KCl. Units for the simulated absorbance on the Y scale are concentration units (mM) for the Cd^{2+} complexes, independent of exact extinction coefficients. The simulated absorbance was considered to be a linear combination of the concentrations of (i) the sum of all 1:2 complexes and (ii) the sum of all 1:1 complexes. Coefficients for this linear combination were considered not to depend on complex protonation, and were selected on the basis of their ability to account for the clearer maximum for absorbance at 270 nm than for absorbance at 250 nm (*Supplemental Figure S4A versus S4B*, and [28]). These coefficients were 0.9 and 0.1 for simulating absorbance at 270 nm and 0.8 and 0.2 for simulating absorbance at 250 nm, *i.e.* the extinction coefficients of the 1:2 and 1:1 complexes were assumed to be in a 9/1 ratio at 270 nm but in an 8/1 ratio at 250 nm: at 250 nm the relative contribution of the 1:1 complex was more significant, as expected [28]. **Panel C** illustrates simulation of the situation in which glutathione is added to 0.1 mM $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{total}}$ (as in the UV spectroscopy experiments in Fig. 5C). The black dashed line shows the simulated concentration of the MH_2L_2 complex alone (with its expected sigmoidicity), whereas, for detailed comparison with Fig. 5C of the main text, the black continuous line shows the simulated combination of 1:2 and 1:1 complexes representing absorbance at 250 nm (sigmoidicity is not observed here, because of the dominant contribution of 1:1 complexes at low GSH concentrations). The gray lines in **Panel C** show the results of similar simulations performed with a constant double the normal value for formation of the MH_2L_2 1:2 complex but half the normal value for formation of the MHL 1:1 complex. These different constants

have little effect on the fit to the pH titration data in Fig. 1 of the main text, but they clearly result in an inadequate simulation of the UV absorption data in Fig. 5C of the main text, because the apparent affinity for GSH becomes too high. **Panel D**, simulated free Cd^{2+} concentration (revealed with murexide or FluoZinTM-1, compare with data in Fig. 2C or Fig. 3C), during the titration of 10 μM Cd^{2+} with increasing concentrations of glutathione under the same conditions.

For these simulations with JCHESS, the constants shown in Table 1 were used (except for the gray lines in *Panel C*), including those for Cd^{2+} complexation with Cl^- . No correction for either ionic strength or temperature was introduced, although spectroscopic measurements were performed at 37°C, whereas the constants used here to fit them are those used to fit our pH-meter data, collected at room temperature). For this reason, the simulation is shown here as a separate figure, not as a fit of the actual spectrometry data points in Fig. 5 or Figs. 2&3. In *Panel D*, the units on the Y scale for differential absorbance values are Cd^{2+} concentration units (mM), independent of the detailed spectral properties of the Cd^{2+} (murexide) complex. The free Cd^{2+} concentration in the absence of GSH is about 0.005 mM only, instead of 0.01 mM, because Cl^- binds about half of the 0.01 mM Cd^{2+} present.

ADDITIONAL REFERENCES

- [35]. H. Kozłowski, J. Urbanska, Cadmium ion interaction with sulphur containing amino acid and peptide ligands, *Polyhedron* 9 (1990) 831-837.
- [36]. H. Portzehl, P.C. Caldwell, J.C. Rüegg, The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions, *Biochim. Biophys. Acta* 79 (1964) 581-591.
- [37]. K.-S. Bai, A.E. Martell, The interaction of (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris) with copper and nickel ions, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 31 (1969) 1697-1707.
- [38]. R. Nakon, C.R. Krishnamoorthy, Free-metal depletion by “Good’s” buffers, *Science* 221 (1983) 749-750.
- [39]. J.S. Magyar, H.A. Godwin, Spectropotentiometric analysis of metal binding to structural zinc-binding sites: accounting quantitatively for pH and metal ion buffering effects, *Anal. Biochem.* 320 (2003) 39-54.
- [40]. P. Champeil, T. Menguy, S. Soulie, B. Juul, A.G. de Gracia, F. Rusconi, P. Falson, L. Denoroy, F. Henao, M. le Maire, J.V. Møller, Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Nucleotide- and metal-binding sites, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 6619-6631.
- [41]. R.M. Smith, A.E. Martell, in *Critical Stability Constants*, vol. 6, Plenum Press, N.Y., 1989.

CONCLUSION, ET QUELQUES PERSPECTIVES OU REMARQUES

I. BILAN GENERAL ET PERSPECTIVES

Comme cela a été détaillé au fil de ce manuscrit, ces trois années de doctorat ont été d'abord pour moi l'occasion d'aborder divers aspects liés aux relations entre structure et fonction de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a.

La première partie de ce travail a été consacrée à la caractérisation d'un aspect particulier des interactions entre l'ATPase-Ca²⁺ et ses inhibiteurs membranaires. Cette partie du travail s'est déroulée dans la continuité de la thèse de Martin Picard, qui avait suggéré que la fixation de la thapsigargine au domaine membranaire de l'ATPase-Ca²⁺ modifiait suffisamment la structure de la forme « E2.BeF₃ » pour empêcher la fixation des ions calcium sur leurs sites de transport à partir de la face luminale de la membrane du réticulum sarcoplasmique (Picard, Toyoshima et al. 2006). J'ai montré que la thapsigargine, tout comme le BHQ et le CPA, figeait la structure du domaine membranaire, ne bloquant pas seulement l'accès aux sites de transport depuis le lumen mais empêchant également la transmission des changements de conformations du domaine cytosolique vers le domaine membranaire : comme suggéré dans les précédents travaux, la forme « E2.BeF₃ » qui mime l'état phosphorylé « E2-P » ne peut plus fixer le calcium depuis le côté luminal lorsqu'elle est complexée à la thapsigargine, le BHQ ou le CPA. Cette forme E2.BeF₃ n'est d'ailleurs pas la seule forme affectée par la présence d'un inhibiteur au domaine membranaire : la fixation de nucléotides ou d'autres ligands aux domaines cytosoliques ne donne plus lieu, lorsque l'un de ces inhibiteurs est fixé au domaine membranaire, aux changements de conformation du domaine membranaire qui devraient normalement se produire.

Notre travail a souligné la grande flexibilité des boucles qui relient les domaines au domaine membranaire, flexibilité qui en présence d'inhibiteurs membranaires permet tout de même aux domaines cytosoliques d'explorer des organisations relatives diverses. Ses résultats soulevaient aussi un certain nombre de questions concernant la pertinence des structures tridimensionnelles de l'ATPase-Ca²⁺ obtenue par cristallogénèse en présence de ces inhibiteurs : peu de temps après, l'obtention enfin d'une structure « E2.BeF₃ » en absence de thapsigargine (et de son pendant en présence de thapsigargine, « E2.Tg.BeF₃ ») montraient l'étendue des changements de structures induits par la thapsigargine sur cette forme E2.BeF₃. On peut dès lors se demander si certaines des autres structures obtenues en présence de TG, BHQ ou CPA, et simultanément en présence de ligands au domaine cytosolique, ne présentent pas également des biais. En effet, mes résultats, notamment de spectroscopie de fluorescence et de protéolyse ménagée, montrent que le domaine membranaire ne répond pas normalement à la fixation de ligands au domaine cytosolique en présence d'inhibiteurs. Il serait donc souhaitable, comme nous l'avons suggéré pour la forme « E2.BeF₃ », que les prochaines structures cristallines d'états mimant les diverses formes « E2 » du cycle soient obtenues si possible en absence d'inhibiteurs. Ceci implique de trouver de nouvelles conditions de stabilisation de l'ATPase-Ca²⁺ en présence de détergents et en absence de calcium.

La solubilisation des protéines membranaires est en effet une étape critique de leur isolement et de leur éventuelle cristallisation, et l'ATPase-Ca²⁺ n'échappe pas à cette règle puisqu'en absence de calcium l'ATPase solubilisée est instable (Lund, Orlowski et al. 1989). Cette instabilité empêchait jusqu'à présent la manipulation prolongée de l'enzyme solubilisée en absence de calcium. Du coup, les études fonctionnelles concernant l'ATPase étaient principalement réalisées en membranes (ou en présence de quantités seulement perturbantes de détergent), et les études des ATPases recombinantes, sauvage ou mutées, exprimées dans la levure *S. cerevisiae* et purifiées en présence de détergent, n'étaient possible qu'après échange de

ce détergent avec des lipides. J'ai montré que l'utilisation de 40 % de glycérol (ou de 20 % glycérol et 20 % DMSO) dans les milieux de mesure permettaient non seulement de stabiliser ces enzymes solubilisées en absence de calcium mais aussi de réaliser de nombreuses études fonctionnelles, que ce soit à l'équilibre avec les mesures de spectroscopie de fluorescence ou à l'état stationnaire avec les mesures d'activité ATPasique en présence de concentrations relativement faibles d'ATP (non montrées ici). Ce travail a été l'occasion d'observer les effets spécifiques de doses solubilisantes de DDM et de $C_{12}E_8$ sur certaines étapes du cycle catalytique. Ces détergents pourtant identiques au niveau de leur chaînes aliphatiques, et dont certaines propriétés physico-chimiques sont assez proches (CMC, nombre d'aggrégation...), ont montré des effets très différents sur certaines propriétés de l'ATPase. Le plus marquant de ces effets est sans doute la perte d'affinité pour le calcium de l'enzyme solubilisée par le $C_{12}E_8$ à pH 6, alors que la solubilisation par le DDM semble sans grande conséquence de ce point de vue-là.

Ces résultats montrent tout d'abord que deux détergents pourtant très similaires chimiquement peuvent influencer le fonctionnement d'un enzyme de façon très différente. Pour l'étude des protéines membranaires en général, ce point est probablement significatif; il suggère que dans la mesure du possible il ne faut pas négliger l'essai de divers détergents sur une protéine donnée, afin de définir les protocoles les plus adaptés à son isolement, à sa stabilisation et à sa caractérisation fonctionnelle et structurale. C'est d'ailleurs un autre point soulevé par nos résultats : la cristallogénèse de l'ATPase- Ca^{2+} a jusqu'à aujourd'hui toujours été réalisée en présence d'un mélange de lipides et de $C_{12}E_8$. Si ces détergents (ou les lipides eux-mêmes) ont une influence sur le cycle catalytique, ils ont peut-être aussi un effet sur la structure même de la protéine. La solubilisation pourrait par exemple avoir pour effet d'éliminer certaines interactions importantes avec des lipides particuliers (Lee 2004), voire encore avec des protéines accessoires comme la sarcolipine, une petite protéine transmembranaire intervenant apparemment notamment dans la régulation de SERCA1a dans le muscle squelettique (Morita, Hussain et al. 2008; Traaseth, Ha et al. 2008). L'obtention de structures tridimensionnelles de l'ATPase après cristallisation dans un milieu le plus proche possible de la membrane native serait bien évidemment un résultat particulièrement intéressant. Cependant, ces conditions nouvelles de cristallisation éventuelles, explorées de façon extensive de 1982 (Dux and Martonosi 1983a) à 2000, n'ont pas encore donné lieu à des cristaux diffractant à des résolutions suffisamment élevées (voir Introduction). Au moins pouvons-nous tester, comme nous l'avons fait dans ce travail de thèse, l'effet fonctionnel des conditions de cristallogénèse qui marchent. Là encore, ce point pourrait être utile pour l'ensemble des protéines membranaires, pour aller vers les structures tridimensionnelles les plus représentatives possible des états explorés au cours de leurs cycles catalytiques.

Au-delà de ces aspects fonctionnels, centrés autour de l'ATPase- Ca^{2+} , ce doctorat a été pour moi une opportunité aussi pour collaborer avec diverses personnes sur des sujets qui pourraient sembler au premier abord éloignés du projet initial.

L'étude de la forme de basse fluorescence de l'ATPase- Ca^{2+} marquée au FITC (Lfs) a ainsi été l'occasion de travailler avec David McIntosh autour d'une interrogation restée dans la bibliographie depuis plus de 25 ans. Notre travail a mis en lumière cette capacité étonnante qu'a l'ATPase phosphorylée de transférer son phosphate à la fluorescéine fixée dans son domaine nucléotidique, et nous avons tenté de comprendre ce qui pouvait rendre possible ce transfert au cours de la catalyse. Un a-côté malheureux de notre découverte a été que les espoirs initiaux de profiter pour la cristallogénèse de cette forme apparemment extrêmement stable de l'ATPase- Ca^{2+} ont désormais perdu de leur intérêt.

J'ai eu également l'occasion de m'interroger sur la chélation possible des cations divalents par divers anions, que ce soit par des molécules tampons (l'interaction supposée du

Mops et du Mg^{2+}) ou par le glutathion (chélation du cadmium, en collaboration avec Manuel Garrigos). Ces deux séries d'expériences ont été tout d'abord une opportunité pour moi d'avoir une vue d'ensemble sur plusieurs techniques permettant de suivre ces chélation en solution, notamment en utilisant des sondes chimiques dont les propriétés d'absorption ou de fluorescence changent en présence de divalents. Dans un deuxième temps, ce travail a été pour moi une réelle prise de conscience du risque permanent qui peut exister dans l'utilisation de ces tables chimiques titanesques où sont compilées des centaines de milliers de constantes, pas toujours exprimées de façon claire, déduites d'expériences extrêmement variées, et dont les conditions de réalisation ne sont pas forcément toujours bien décrites. Dès lors, il convient d'avoir une sage prudence dans l'utilisation de ces tables, en comparant les différentes sources et en procédant à quelques vérifications simples dans les conditions expérimentales souhaitées.

II. UN MOT SUPPLEMENTAIRE SUR LA FLUORESCENCE INTRINSEQUE DES TRYPTOPHANES

L'utilisation des signaux de fluorescence intrinsèque pour suivre la fixation de divers ligands sur l'ATPase- Ca^{2+} est une technique qui, malgré son utilisation assez répandue depuis la fin des années 70, reste d'interprétation souvent assez globale. En effet, comme je l'ai exposé, le signal de fluorescence que nous observons est en fait la combinaison des signaux des douze résidus tryptophanes situés dans le domaine membranaire (plus un dans le domaine cytosolique). Les diverses structures tridimensionnelles ont permis de préciser la position de chacun de ces tryptophanes, dont, je le rappelle, l'émission de fluorescence dépend de l'environnement proche : certains de ces tryptophanes sont au contact du solvant, certains autres sont au contact de la phase membranaire (lipides ou détergents) et d'autres sont tournés vers l'intérieur du domaine membranaire. Les changements de conformation qui ont lieu suite à la fixation de différents ligands vont entraîner des déplacements dans l'espace de certains de ces tryptophanes, qui vont ainsi voir leur environnement changer. En observant les différentes structures disponibles et en reconstituant « le film » du cycle catalytique, on constate par exemple que les tryptophanes W50 et W107, situés respectivement aux extrémités des hélices transmembranaires M1 et M2, du côté cytosolique, bougent énormément dans l'espace, alors que ceux des hélices M7 à M10 semblent avoir une position relativement fixe par rapport à la membrane.

Il est alors tentant d'imaginer que les variations de niveaux de fluorescence observés soient principalement le reflet de ces quelques tryptophanes en mouvement, même si les changements de conformation ne sont évidemment pas les seuls facteurs qui peuvent influencer le niveau de fluorescence : la présence même du ligand à proximité des tryptophanes peut aussi évidemment être à l'origine de changements de fluorescence. Les inhibiteurs membranaires, par exemple, TG, BHQ ou CPA, ont des sites de fixation voisins de certains tryptophanes (W272 dans l'hélice M3, est ainsi à proximité du site de fixation de la thapsigargine). De la même façon, les sites de transport du calcium sont voisins du résidu W794 situé dans l'hélice M5. La fixation de ligands induit sans doute des changements locaux de polarité pouvant influencer l'émission de fluorescence des tryptophanes concernés.

La mutagenèse dirigée est probablement un outil qui aurait sans doute ici sa place. Ce type d'approche a déjà été grandement utilisé pour étudier les interactions de protéines membranaires avec les lipides de la membrane (Powl, East et al. 2003; Marius, Alvis et al. 2005). Dans ces deux cas, cependant, les protéines considérées ne possédaient pas de résidu tryptophane dans leur séquence ou n'en avaient qu'un nombre limité, et il était donc aisé d'ajouter un tryptophane unique à la position choisie ou de modifier la position de celui ou ceux pré-existant. Pour l'ATPase- Ca^{2+} et ses treize tryptophanes, une première série d'expériences a montré que le tryptophane W552, situé dans le domaine de fixation du nucléotide, ne contribuait sans doute guère aux changements de fluorescence de la protéine (Lenoir, Jaxel et al. 2006). On

rêverait de pouvoir muter de la même façon les tryptophanes du domaine membranaire. Néanmoins, si l'on souhaite démontrer de façon convaincante que seuls quelques uns d'entre eux contribuent aux changements observés, il faut pouvoir éliminer tous les autres, sans pour autant affecter la stabilité et l'activité de la protéine. Or, aussi bien pour l'ATPase- Ca^{2+} que pour de nombreuses autres protéines membranaires, il apparaît que les tryptophanes se distribuent préférentiellement aux interfaces (Yau, Wimley et al. 1998; Killian and von Heijne 2000). Dès lors, on peut se demander si une protéine dépourvue de la plupart de ses tryptophanes aurait son domaine transmembranaire aussi bien positionné dans la bicouche lipidique que l'ATPase native, et donc serait aussi bien repliée dans la membrane...

L'utilisation du glycérol pour stabiliser les ATPases recombinantes solubilisées pour des expériences de spectroscopie de fluorescence devrait permettre de transposer ces mesures de fluorescence à d'autres ATPases de type P, qui dans leur membranes natives ne sont pas forcément aussi abondantes que l'ATPase Ca^{2+} . Il sera alors intéressant de voir comment se traduisent les fixations de ligands en terme de variation des niveaux de fluorescence et peut-être ainsi mieux comprendre le lien entre ces variations et les changements de conformation de ces protéines.

On peut cependant déjà regarder ce qu'il advient de ces signaux de fluorescence intrinsèque dans une ATPase de type P voisine, l'ATPase- Na^+, K^+ . Cette autre ATPase possède de nombreux tryptophanes dans sa séquence, eux aussi situés principalement dans son domaine membranaire. Cette ATPase a un repliement extrêmement proche de celui de l'ATPase- Ca^{2+} : on pourrait donc imaginer que les fixations de ligands, notamment des ions sodium aux sites de transport (ions sodium homologues, sur les schémas de fonctionnement, aux ions calcium pour l'ATPase- Ca^{2+}), donnent lieu à des variations semblables des niveaux de fluorescence intrinsèque de ces ATPases. Or, la fixation de Na^+ sur l'ATPase- Na^+, K^+ donne bien des variations de fluorescence d'amplitudes similaires à celles observées pour l'ATPase- Ca^{2+} , mais elles sont de signes opposés ! Pourtant, rien dans la position des tryptophanes de ces deux protéines ne laisse présager cette différence. D'ailleurs, de façon également inexpliquée, les signaux de fluorescence extrinsèque des deux protéines, après marquage au FITC, sont également de signes opposés, alors pourtant de nouveau que les motifs caractéristiques et les repliements d'ensemble des domaines sont particulièrement bien conservés, et que les réorganisations de domaines doivent être passablement similaires.

Ces remarques conduisent à la conclusion que ces signaux de fluorescence, intrinsèque ou même extrinsèque, s'ils présentent l'avantage d'être relativement agréables à observer, sont à manipuler avec précaution si l'on ne veut pas se risquer à sur-interpréter les variations de fluorescence observées en termes de « changements de conformation ».

BIBLIOGRAPHIE

- Abramson, J., I. Smirnova, et al. (2003). "Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*." *Science* 301(5633): 610-5.
- Adamis, P. D., D. S. Gomes, et al. (2004). "The role of glutathione transferases in cadmium stress." *Toxicol Lett* 154(1-2): 81-8.
- Adamis, P. D., S. C. Mannarino, et al. (2009). "Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium-glutathione complex." *FEBS Lett*.
- Al-Feel, W., J. C. DeMar, et al. (2003). "A *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain defective in acetyl-CoA carboxylase arrests at the G2/M phase of the cell cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(6): 3095-3100.
- Ali, H., S. B. Christensen, et al. (1985). "The ability of thapsigargin and thapsigarginic to activate cells involved in the inflammatory response." *Br J Pharmacol* 85(3): 705-12.
- Allen, G. and N. M. Green (1976). "A 31-residue tryptic peptide from the active site of the $[Ca^{++}]$ -transporting adenosine triphosphatase of rabbit sarcoplasmic reticulum." *FEBS Lett* 63(1): 188-92.
- Aller, S. G., J. Yu, et al. (2009). "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding." *Science* 323(5922): 1718-22.
- Andersen, J., J. Møller, et al. (1982). "The functional unit of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Active site titration and fluorescence measurements." *J. Biol. Chem.* 257(14): 8300-8307.
- Andersen, J. P., M. le Maire, et al. (1983). "Perturbation of the Structure and Function of a Membranous Ca^{2+} -ATPase by Non-solubilizing Concentrations of a Non-ionic Detergent." *European Journal of Biochemistry* 134(2): 205-214.
- Andersen, J. P. and B. Vilsen (1995). "Structure-function relationship of cation translocation by Ca^{2+} - and Na^{+} - K^{+} -ATPases studied by site directed mutagenesis." *FEBS Lett* 359: 101-106.
- Andersson, J., K. Hauser, et al. (2008). "Protonation and hydrogen bonding of Ca^{2+} site residues in the E2P phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase studied by a combination of infrared spectroscopy and electrostatic calculations." *Biophys J* 94(2): 600-11.
- Aramaki, K., U. Olsson, et al. (1999). "Effect of Water-Soluble Alcohols on Surfactant Aggregation in the C12EO8 System." *Langmuir* 15(19): 6226-6232.
- Axelsen, K. B. and M. G. Palmgren (1998). "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily." *J Mol Evol* 46(1): 84-101.
- Azab, H. A., A. S. Orabi, et al. (2001). "Role of biologically important zwitterionic buffer secondary ligands on the stability of the mixed-ligand complexes of divalent metal ions and adenosine 5'-mono-, 5'-di-, and 5'-triphosphate." *Journal of Chemical and Engineering Data* 46(2): 346-354.
- Back, J. F., D. Oakenfull, et al. (1979). "Increased Thermal-Stability of Proteins in the Presence of Sugars and Polyols." *Biochemistry* 18(23): 5191-5196.
- Ballatori, N., S. M. Krance, et al. (2009). "Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology." *Mol Aspects Med* 30(1-2): 13-28.
- Barlogie, B., W. Hasselbach, et al. (1971). "Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate." *FEBS Lett* 12(5): 267-268.
- Bass, R. B., P. Strop, et al. (2002). "Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel." *Science* 298(5598): 1582-7.
- Bassnett, S., L. Reinisch, et al. (1990). "Intracellular pH measurement using single excitation-dual emission fluorescence ratios." *Am J Physiol* 258(1 Pt 1): C171-8.
- Bastide, F., G. Meissner, et al. (1973). "Similarity of the active site of phosphorylation of the adenosine triphosphatase from transport of sodium and potassium ions in kidney to that for transport of calcium ions in the sarcoplasmic reticulum of muscle." *J Biol Chem* 248(24): 8385-91.
- Beil, F. U., D. von Chak, et al. (1977). "Phosphorylation from inorganic phosphate and ATP synthesis of sarcoplasmic membranes." *Eur J Biochem* 81(1): 151-64.
- Benito, B., B. Garciadeblas, et al. (2002). "Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi." *Microbiology* 148(4): 933-941.
- Benzonana, G. (1969). "Study of bile salts micelles: properties of mixed oleate-deoxycholate solutions at pH 9.0." *Biochim Biophys Acta* 176(4): 836-48.
- Berridge, M. J. (1993). "Cell signalling. A tale of two messengers." *Nature* 365(6445): 388-9.
- Berridge, M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." *Nature* 361(6410): 315-25.
- Berridge, M. J. (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." *J Physiol* 499 (Pt 2): 291-306.
- Berridge, M. J. (2002). "The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle." *Cell Calcium* 32(5-6): 235-49.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Berrier, C., K. H. Park, et al. (2004). "Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent." *Biochemistry* 43(39): 12585-91.

- Bers, D., C. Patton, et al. (1994). A Practical Guide to the Preparation of Ca Buffers. A Practical Guide to the Study of Ca²⁺ in Living Cells. San Diego, Academic Press. 40: 3-29.
- Bick, R. J., K. A. Youker, et al. (1991). "Unsaturated Aminophospholipids Are Preferentially Retained by the Fast Skeletal-Muscle Ca²⁺-ATPase During Detergent Solubilization - Evidence for a Specific Association between Aminophospholipids and the Calcium-Pump Protein." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 286(2): 346-352.
- Bigelow, D. J. and G. Inesi (1992). "Contributions of chemical derivatization and spectroscopic studies to the characterization of the Ca²⁺-transport ATPase of sarcoplasmic reticulum." *Biochim Biophys Acta* 1113(3-4): 323-38.
- Bishop, J. E. and M. K. Al-Shawi (1988). "Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase by Mg²⁺ at High pH." *J. Biol. Chem.* 263(4): 1886-1892.
- Blackwell, J. R. and R. Horgan (1991). "A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form." *FEBS Lett* 295(1-3): 10-2.
- Bobe, R., R. Bredoux, et al. (2005). "How many Ca²⁺-ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets." *Platelets* 16(3-4): 133-50.
- Bogdanov, M. and W. Dowhan (1995). "Phosphatidylethanolamine is required for in vivo function of the membrane-associated lactose permease of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 270(2): 732-9.
- Bogdanov, M. and W. Dowhan (1998). "Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease." *Embo J* 17(18): 5255-64.
- Bogdanov, M., J. Sun, et al. (1996). "A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein." *J Biol Chem* 271(20): 11615-8.
- Bogdanov, M., M. Umeda, et al. (1999). "Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein. Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone." *J Biol Chem* 274(18): 12339-45.
- Boualem, B. (2009). Seksou ouderyis pour accueillir le printemps : le rituel encore vivace à Sidi Aïch. El Watan, le quotidien indépendant.
- Boullard, B. (2001). Dictionnaire des plantes médicinales du monde: Réalités & Croyances, Estem.
- Boussac, A., F. Rappaport, et al. (2004). "Biosynthetic Ca²⁺/Sr²⁺ exchange in the photosystem II oxygen-evolving enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*." *J Biol Chem* 279(22): 22809-19.
- Boyer, P. D., H. A. Lardy, et al. (1942). "The role of potassium in muscle phosphorylations." *J. Biol. Chem.* 146: 673-682.
- Brodin, P., R. Falchetto, et al. (1992). "Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump." *Eur J Biochem* 204(2): 939-46.
- Brody, I. A. (1969). "Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor." *N Engl J Med* 281(4): 187-92.
- Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." *Cell* 68(3): 533-44.
- Cable, M. B., J. J. Feher, et al. (1985). "Mechanism of allosteric regulation of the Ca,Mg-ATPase of sarcoplasmic reticulum: studies with 5'-adenylyl methylenediphosphate." *Biochemistry* 24(20): 5612-9.
- Caffrey, M. and G. W. Feigenson (1981). "Fluorescence quenching in model membranes. 3. Relationship between calcium adenosinetriphosphatase enzyme activity and the affinity of the protein for phosphatidylcholines with different acyl chain characteristics." *Biochemistry* 20(7): 1949-61.
- Carafoli, E. (2004). "Calcium-mediated cellular signals: a story of failures." *Trends Biochem Sci* 29(7): 371-9.
- Cardi, D., C. Montigny, et al. (2009). "Heterologous expression and affinity purification of eukaryotic membrane proteins in view of functional and structural studies: the example of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." *Methods Mol. Biol.* *accepted*.
- Chabre, M. (1990). "Aluminofluoride and berylliofluoride complexes: a new phosphate analogs in enzymology." *Trends Biochem Sci* 15(1): 6-10.
- Chaloub, R. M. and L. de Meis (1980). "Effect of K⁺ on phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum ATPase by either Pi or ATP." *J Biol Chem* 255(13): 6168-72.
- Champeil, P., M. Gingold, et al. (1983). "Effect of magnesium on the calcium-dependent transient kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase, studied by stopped flow fluorescence and phosphorylation." *J. Biol. Chem.* 258(7): 4453-4458.
- Champeil, P., F. Guillain, et al. (1985). "Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-deprived sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation." *Biochemistry.* 24(1): 69-81.
- Champeil, P., F. Henao, et al. (1997). "Dissociation of Ca²⁺ from Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase and Changes in Fluorescence of Optically Selected Trp Residues. Effects of KCl and NaCl and Implications for Substeps in Ca²⁺ Dissociation." *Biochemistry* 36(40): 12383-12393.
- Champeil, P., F. Henao, et al. (2001). "A Remarkably Stable Phosphorylated Form of Ca²⁺-ATPase Prepared from Ca²⁺-loaded and Fluorescein Isothiocyanate-labeled Sarcoplasmic Reticulum Vesicles." *J. Biol. Chem.* 276(8): 5795-5803.
- Champeil, P., M. le Maire, et al. (1986). "Kinetic characterization of the normal and detergent-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump." *J. Biol. Chem.* 261: 16372.
- Champeil, P., T. Menguy, et al. (2000). "Interaction of Amphipols with Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase." *J. Biol. Chem.* 275(25): 18623-18637.

- Champeil, P., J. L. Rigaud, et al. (1982). "Fluorescence Energy-Transfer between Atpase Monomers in Sarcoplasmic-Reticulum Reconstituted Vesicles, in the Presence of Low Concentrations of a Non-Ionic Detergent." *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 37(5-6): 513-516.
- Champeil, P., S. Riollot, et al. (1988). "ATP regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Metal-free ATP and 8-bromo-ATP bind with high affinity to the catalytic site of phosphorylated ATPase and accelerate dephosphorylation." *J. Biol. Chem.* 263(25): 12288-12294.
- Chang, G., R. H. Spencer, et al. (1998). "Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel." *Science* 282(5397): 2220-6.
- Chang, G. (2003). "Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation." *J Mol Biol* 330(2): 419-30.
- Chang, G. (2007). "Retraction of "Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation" [*J. Mol. Biol.* (2003) 330 419-430]." *J Mol Biol* 369(2): 596.
- Chang, G. and C. B. Roth (2001). "Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters." *Science* 293(5536): 1793-800.
- Chang, G., C. B. Roth, et al. (2006). "Retraction 10.1126/science.314.5807.1875b." *Science* 314(5807): 1875b.
- Chen, T. H. and N. Murata (2008). "Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants." *Trends Plant Sci* 13(9): 499-505.
- Cheng, Y. S., Y. B. Yan, et al. (2005). "Spectroscopic characterization of metal bound phytochelatin analogue (Glu-Cys)(4)-Gly." *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(10): 1952-1962.
- Chiesi, M. and G. Inesi (1980). "Adenosine 5'-triphosphate dependent fluxes of manganese and and hydrogen ions in sarcoplasmic reticulum vesicles." *Biochemistry* 19(13): 2912-8.
- Chini, E. N., F. O. de Faria, et al. (1992). "The enhancement of Ca^{2+} efflux from sarcoplasmic reticulum vesicles by urea." *Arch Biochem Biophys* 299(1): 73-6.
- Christensen, S. B., U. Rasmussen, et al. (1980). "Thapsigargin, constitution of a sesquiterpene lactone histamine liberator from *thapsia garganica*." *Tetrahedron Letters* 21(39): 3829-3830.
- Christensen, S. B., I. K. Larsen, et al. (1982). "Thapsigargin and Thapsigarginic, 2 Histamine Liberating Sesquiterpene Lactones from *Thapsia-Garganica* - X-Ray-Analysis of the 7,11-Epoxy of Thapsigargin." *Journal of Organic Chemistry* 47(4): 649-652.
- Clarke, D. M., T. W. Loo, et al. (1989). "Location of high affinity Ca^{2+} -binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase." *Nature* 339(6224): 476-8.
- Clarke, D. M., K. Maruyama, et al. (1989). "Functional consequences of glutamate, aspartate, glutamine, and asparagine mutations in the stalk sector of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 264(19): 11246-51.
- Coelho-Sampaio, T., S. T. Ferreira, et al. (1994). "Betaine counteracts urea-induced conformational changes and uncoupling of the human erythrocyte Ca^{2+} pump." *Eur J Biochem* 221(3): 1103-10.
- Coll, R. J. and A. J. Murphy (1992). "Fluoride-inhibited calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. Magnesium and fluoride stoichiometry." *J Biol Chem* 267(30): 21584-7.
- Consler, T. G., B. L. Persson, et al. (1993). "Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15): 6934-8.
- Corrie, A. M., M. D. Walker, et al. (1976). "Thermodynamic Considerations in Coordination .22. Sequestering Ligands for Improving Treatment of Plumbism and Cadmiumism." *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*(11): 1012-1015.
- Corry, B. and B. Martinac (2008). "Bacterial mechanosensitive channels: experiment and theory." *Biochim Biophys Acta* 1778(9): 1859-70.
- Cowan, S. W., T. Schirmer, et al. (1992). "Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins." *Nature* 358(6389): 727-33.
- Cronan, J., Jr (1990). "Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins." *J. Biol. Chem.* 265(18): 10327-10333.
- Cui, Z. F., D. Hirata, et al. (1996). "The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions." *Journal of Biological Chemistry* 271(25): 14712-14716.
- Daiho, T., T. Kubota, et al. (1993). "Stoichiometry of tight binding of magnesium and fluoride to phosphorylation and high-affinity binding of ATP, vanadate, and calcium in the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase." *Biochemistry* 32(38): 10021-6.
- Daiho, T., K. Yamasaki, et al. (2007). "Critical role of Glu40-Ser48 loop linking actuator domain and first transmembrane helix of Ca^{2+} -ATPase in Ca^{2+} deocclusion and release from ADP-insensitive phosphoenzyme." *J Biol Chem* 282(47): 34429-47.
- Danko, S., T. Daiho, et al. (2001). "ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin." *FEBS Letters* 489(2-3): 277-282.
- Danko, S., K. Yamasaki, et al. (2004). "Distinct Natures of Beryllium Fluoride-bound, Aluminum Fluoride-bound, and Magnesium Fluoride-bound Stable Analogues of an ADP-insensitive Phosphoenzyme Intermediate of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase: CHANGES IN CATALYTIC AND TRANSPORT SITES DURING PHOSPHOENZYME HYDROLYSIS." *J. Biol. Chem.* 279(15): 14991-14998.
- Davidson, G. A. and R. J. Varhol (1995). "Kinetics of Thapsigargin- Ca^{2+} -ATPase (Sarcoplasmic Reticulum) Interaction Reveals a Two-step Binding Mechanism and Picomolar Inhibition." *J. Biol. Chem.* 270(20): 11731-11734.
- de Foresta, B., F. Henao, et al. (1992). "Kinetic characterization of the perturbation by dodecylmaltoside of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase." *European Journal of Biochemistry* 209(3): 1023-1034.

- de Foresta, B., F. Henao, et al. (1994). "Cancellation of the cooperativity of Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by the non-ionic detergent dodecylmaltoside." *European Journal of Biochemistry* 223(2): 359-369.
- de Foresta, B., M. le Maire, et al. (1989). "Membrane solubilization by detergent: Use of brominated phospholipids to evaluate detergent-induced changes in Ca^{2+} -ATPase/lipid interaction." *Biochemistry* 28: 2558-67.
- de Foresta, B., N. Legros, et al. (1996). "Brominated Detergents as Tools to Study Protein-Detergent Interactions." *European Journal of Biochemistry* 241(2): 343-354.
- de Meis, L. and W. Hasselbach (1971). "Acetyl phosphate as substrate for Ca^{2+} uptake in skeletal muscle microsomes. Inhibition by alkali ions." *J Biol Chem* 246(15): 4759-63.
- de Meis, L. and G. Inesi (1988). "Effects of organic solvents, methylamines, and urea on the affinity for P_i of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 263(1): 157-61.
- de Meis, L., O. Martins, et al. (1980). "Role of water, Hydrogen ion, and Temperature on the synthesis of ATP by the Sarcoplasmic Reticulum Adenosinephosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation." *Biochemistry* 19: 4252-4261.
- de Meis, L. and A. L. Vianna (1979). "Energy Interconversion by the Ca^{2+} -Dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum." *Annual Review of Biochemistry* 48(1): 275-292.
- de Rey-Pailhade, J. (1888). *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*: 173-180.
- Dean, W. L. and C. Tanford (1978). "Properties of a delipidated, detergent-activated Ca^{2+} -ATPase." *Biochemistry* 17: 1683.
- Degani, C. and P. D. Boyer (1973). "A borohydride reduction method for characterization of the acyl phosphate linkage in proteins and its application to sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase." *J Biol Chem* 248(23): 8222-6.
- Dépêche_de_Kabylie (2004). *El Main, petite Kabylie*. **2009**.
- Di Leva, F., T. Domi, et al. (2008). "The plasma membrane Ca^{2+} ATPase of animal cells: structure, function and regulation." *Arch Biochem Biophys* 476(1): 65-74.
- Dowhan, W. and M. Bogdanov (2009). "Lipid-dependent membrane protein topogenesis." *Annu Rev Biochem* 78: 515-40.
- du Nouy, P. L. (1919). "A NEW APPARATUS FOR MEASURING SURFACE TENSION." *J. Gen. Physiol.* 1(5): 521-524.
- Dudkina, N. V., S. Sunderhaus, et al. (2008). "The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes." *J Bioenerg Biomembr* 40(5): 419-24.
- Dupont, Y. (1976). "Fluorescence studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71(2): 544-550.
- Dupont, Y. and M. le Maire (1980). "Fluorometric study of the solubilized Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum." *FEBS Lett.* 115: 247.
- Dux, L. and A. Martonosi (1983a). "Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca^{2+} -ATPase vesicles treated with vanadate." *J Biol Chem* 258(4): 2599-603.
- Dux, L., S. Pikula, et al. (1987). "Crystallization of Ca^{2+} -ATPase in detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum." *J. Biol. Chem.* 262(14): 6439-6442.
- East, J. M. and A. G. Lee (1982). "Lipid selectivity of the calcium and magnesium ion dependent adenosinetriphosphatase, studied with fluorescence quenching by a brominated phospholipid." *Biochemistry* 21: 4144-4151.
- Ebashi, S. and F. Lipmann (1962). "Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle." *J Cell Biol* 14: 389-400.
- Esmann, M. and D. Marsh (2006). "Lipid-protein interactions with the Na,K-ATPase ." *Chemical Physics Letters* 441: 94-104.
- Fairclough, R. J., L. Dode, et al. (2003). "Effect of Hailey-Hailey Disease mutations on the function of a new variant of human secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase (hSPCA1)." *J Biol Chem* 278(27): 24721-30.
- Farley, R. A., C. M. Tran, et al. (1984). "The amino acid sequence of a fluorescein-labeled peptide from the active site of (Na,K) -ATPase." *J Biol Chem* 259(15): 9532-5.
- Fassold, E., W. Hasselbach, et al. (1989). "Effect of non-solubilizing SDS concentrations on high affinity Ca^{2+} binding and steady-state phosphorylation by inorganic phosphate of the sarcoplasmic reticulum ATPase." *Z. Naturforsch.* 44c: 139.
- Fassold, E., W. Hasselbach, et al. (1990). "Participation of a non-covalent phosphointermediate in ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -cotransport ATPase." *Eur J Biochem* 192(3): 627-31.
- Fischer, G., U. Kosinska-Eriksson, et al. (2009). "Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism." *PLoS Biol* 7(6): e1000130.
- Forge, V., E. Mintz, et al. (1993a). " Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. I. Mechanism of affinity and cooperativity modulation by H^{+} and Mg^{2+} ." *J. Biol. Chem.* 268(15): 10953-10960.
- Forge, V., E. Mintz, et al. (1993b). " Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. II. Equilibrium and kinetic evidence for a two-route mechanism." *J. Biol. Chem.* 268(15): 10961-10968.
- Fortea, M. I., F. Soler, et al. (2001). "Unravelling the interaction of thapsigargin with the conformational states of Ca^{2+} -ATPase from skeletal sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 276(40): 37266-72.
- Fung, B. K., J. B. Hurley, et al. (1981). "Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(1): 152-6.
- Garavito, R. M., D. Picot, et al. (1996). "Strategies for crystallizing membrane proteins." *J Bioenerg Biomembr* 28(1): 13-27.

- Gee, K. R., Z. L. Zhou, et al. (2002). "Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes." *Cell Calcium* 31(5): 245-51.
- Geering, K. (2001). "The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases." *J Bioenerg Biomembr* 33(5): 425-38.
- Geering, K. (2005). "Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase." *J Bioenerg Biomembr* 37(6): 387-92.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, et al. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." *Yeast* 11: 355.
- Godwin, H. A. and J. M. Berg (1996). "A Fluorescent Zinc Probe Based on Metal-Induced Peptide Folding." *Journal of the American Chemical Society* 118(27): 6514-6515.
- Goeger, D. E., R. T. Riley, et al. (1988). "Cyclopiazonic Acid Inhibition of the Ca²⁺-Transport ATPase in Rat Skeletal-Muscle Sarcoplasmic-Reticulum Vesicles." *Biochemical Pharmacology* 37(5): 978-981.
- Gomes, D. S., L. C. Fragoso, et al. (2002). "Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1573(1): 21-5.
- Good, N. E., G. D. Winget, et al. (1966). "Hydrogen Ion Buffers for Biological Research." *Biochemistry* 5(2): 467-&.
- Gottesman, M. M. and S. V. Ambudkar (2001). "Overview: ABC transporters and human disease." *J Bioenerg Biomembr* 33(6): 453-8.
- Goussias, C., A. Boussac, et al. (2002). "Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357(1426): 1369-81; discussion 1419-20.
- Gras, M., P. Rouillard, et al. (1995). *L'univers phénicien*, Hachette Littérature.
- Gryniewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* 260(6): 3440-50.
- Guillain, F., M. Gingold, et al. (1982). "Direct fluorescence measurements of Mg²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum ATPase." *J. Biol. Chem.* 257(13): 7366-7371.
- Guimaraes-Motta, H., M. P. Sande-Lemos, et al. (1984). "Energy interconversion in sarcoplasmic reticulum vesicles in the presence of Ca²⁺ and Sr²⁺ gradients." *J Biol Chem* 259(14): 8699-705.
- Gunnlaugsson, T., T. C. Lee, et al. (2003). "Cd(II) sensing in water using novel aromatic iminodiacetate based fluorescent chemosensors." *Org Lett* 5(22): 4065-8.
- Gunnlaugsson, T., T. C. Lee, et al. (2004). "Highly selective fluorescent chemosensors for cadmium in water." *Tetrahedron* 60: 11239-11249.
- Guskov, A., J. Kern, et al. (2009). "Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride." *Nat Struct Mol Biol* 16(3): 334-42.
- Hahn, S., E. T. Hoar, et al. (1985). "Each of three "TATA elements" specifies a subset of the transcription initiation sites at the CYC-1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(24): 8562-6.
- Hao, L., J. L. Rigaud, et al. (1994). "Ca²⁺/H⁺ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids." *J Biol Chem* 269(19): 14268-75.
- Hasselbach, W. and M. Makinose (1961). "The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting." *Biochem. Z.* 333: 518.
- Hasselbach, W. and M. Makinose (1963). "On the Mechanism of Calcium Transport across the Membrane of the Sarcoplasmic Reticulum." *Biochem Z* 339: 94-111.
- Haugland, R. P., Ed. (2005). *The Handbook : A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, Invitrogen Corp.
- Hauser, K. and A. Barth (2007). "Side-chain protonation and mobility in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: implications for proton countertransport and Ca²⁺ release." *Biophys J* 93(9): 3259-70.
- Helenius, A. and K. Simons (1975). "Solubilization of membranes by detergents." *Biochim Biophys Acta* 415(1): 29-79.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.
- Higgins, C. F. and K. J. Linton (2004). "The ATP switch model for ABC transporters." *Nat Struct Mol Biol* 11(10): 918-26.
- Hippocrates (- 400 av. J.C.). *Oeuvres complètes d'Hippocrate: traduction nouvelle avec le texte grec en regard, collationné sur les manuscrits et toutes les éditions*, Adamant Media Corporation.
- Hokin, L. E., P. S. Sastry, et al. (1965). "Evidence that a phosphorylated intermediate in a brain transport adenosine triphosphatase is an acyl phosphate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 54(1): 177-84.
- Holdensen, A. N. and J. P. Andersen (2009). "The length of the A-M3 linker is a crucial determinant of the rate of the Ca²⁺ transport cycle of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." *J Biol Chem.*
- Holguin, J. A. (1986). "Cooperative effects of Ca²⁺ and Sr²⁺ on sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase." *Arch Biochem Biophys* 251(1): 9-16.
- Holmes, J. D., P. R. Smith, et al. (1995). "Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmium sulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*." *Arch Microbiol* 163(2): 143-7.
- Holzapfe, C. (1968). "Isolation and Structure of Cyclopiazonic Acid a Toxic Metabolite of *Penicillium Cyclopium* Westling." *Tetrahedron* 24(5): 2101-&.
- Holzapfe, C. (1971). "Biosynthesis of Cyclopiazonic Acid." *Phytochemistry* 10(2): 351-&.
- Horsefield, R., K. Norden, et al. (2008). "High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(36): 13327-32.

- Huang, Z., Q. P. Wang, et al. (1999). "3,4-fluorescein diphosphate: A sensitive fluorogenic and chromogenic substrate for protein tyrosine phosphatases." *Journal of Biomolecular Screening* 4(6): 327-334.
- Huang, Z. J., N. A. Olson, et al. (1992). "A Sensitive Competitive Elisa for 2,4-Dinitrophenol Using 3,6-Fluorescein Diphosphate as a Fluorogenic Substrate." *Journal of Immunological Methods* 149(2): 261-266.
- Hughes, M. N. and R. K. Poole (1991). "Metal Speciation and Microbial-Growth - the Hard (and Soft) Facts." *Journal of General Microbiology* 137: 725-734.
- Ikemoto, N. (1974). "The calcium binding sites involved in the regulation of the purified adenosine triphosphatase of the sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 249(2): 649-51.
- Ikemoto, N. (1975). "Transport and inhibitory Ca^{2+} binding sites on the ATPase enzyme isolated from the sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 250(18): 7219-24.
- Imamura, Y., K. Saito, et al. (1984). "Conformational change of Ca^{2+} , Mg^{2+} -adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum upon binding of Ca^{2+} and adenyl-5'-yl-imidodiphosphate as detected by trypsin sensitivity analysis." *J Biochem* 95(5): 1305-13.
- Inesi, G., M. Kurzmack, et al. (1980). "Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles." *J Biol Chem* 255(7): 3025-31.
- Inesi, G., D. Lewis, et al. (2006). "Concerted Conformational Effects of Ca^{2+} and ATP Are Required for Activation of Sequential Reactions in the Ca^{2+} ATPase (SERCA) Catalytic Cycle." *Biochemistry* 45(46): 13769-13778.
- Inesi, G., D. Lewis, et al. (2008). "Conformational fluctuations of the Ca^{2+} -ATPase in the native membrane environment. Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin." *J Biol Chem* 283(2): 1189-96.
- Israelachvili, J. N. and D. J. Mitchell (1975). "A model for the packing of lipids in bilayer membranes." *Biochim Biophys Acta* 389(1): 13-19.
- Israelachvili, J. N., D. J. Mitchell, et al. (1977). "Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles." *Biochim Biophys Acta* 470(2): 185-201.
- Jablonski, A. (1935). "Über des Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren." *Zeitschrift Fur Physik* 94(1-2): 38.
- Jackson, R. J., J. Mendlein, et al. (1983). "Interaction of fluorescein isothiocyanate with the $(\text{H}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase." *Biochim Biophys Acta* 731(1): 9-15.
- Jarup, L. (2003). "Hazards of heavy metal contamination." *Br Med Bull* 68: 167-82.
- Jensen, A.-M., T. L.-M. Sorensen, et al. (2006). "Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump." *EMBO J.* 25: 2305-14.
- Jeruzalmi, D. and T. A. Steitz (1997). "Use of organic cosmotropic solutes to crystallize flexible proteins: application to T7 RNA polymerase and its complex with the inhibitor T7 lysozyme." *J Mol Biol* 274(5): 748-56.
- Jiang, J., B. V. Daniels, et al. (2006). "Crystal structure of AqpZ tetramer reveals two distinct Arg-189 conformations associated with water permeation through the narrowest constriction of the water-conducting channel." *J Biol Chem* 281(1): 454-60.
- Jidenko, M., G. Lenoir, et al. (2006). "Expression in yeast and purification of a membrane protein, SERCA1a, using a biotinylated acceptor domain." *Protein Expr Purif* 48(1): 32-42.
- Jidenko, M., R. C. Nielsen, et al. (2005). "Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33): 11687-11691.
- Jordan, P., P. Fromme, et al. (2001). "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution." *Nature* 411(6840): 909-17.
- Jorgensen, P. L. and J. C. Skou (1971). "Purification and characterization of $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase. I. The influence of detergents on the activity of $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney." *Biochim Biophys Acta* 233(2): 366-80.
- Juul, B., H. Turc, et al. (1995). "Do Transmembrane Segments in Proteolyzed Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Retain Their Functional Ca^{2+} Binding Properties after Removal of Cytoplasmic Fragments by Proteinase K?" *J. Biol. Chem.* 270(34): 20123-20134.
- Kachmar, J. F. and P. D. Boyer (1953). "Kinetic analysis of enzyme reactions. II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase." *J Biol Chem* 200(2): 669-82.
- Kalyanasundaram, K. and J. K. Thomas (1977). "Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems." *Journal of the American Chemical Society* 99(7): 2039-2044.
- Karjalainen, E. L., K. Hauser, et al. (2007). "Proton paths in the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase." *Biochim Biophys Acta* 1767(11): 1310-8.
- Kelly, D. P., J. K. Shergill, et al. (1997). "Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria." *Antonie Van Leeuwenhoek* 71(1-2): 95-107.
- Khan, Y., M. Wictome, et al. (1995). "Interactions of dihydroxybenzenes with the Ca^{2+} -ATPase: separate binding sites for dihydroxybenzenes and sesquiterpene lactones." *Biochemistry* 34(44): 14385-93.
- Kijima, Y., E. Ogunbunmi, et al. (1991). "Drug action of thapsigargin on the Ca^{2+} pump protein of sarcoplasmic reticulum." *J. Biol. Chem.* 266(34): 22912-22918.
- Killian, J. A. and G. von Heijne (2000). "How proteins adapt to a membrane-water interface." *Trends Biochem Sci* 25(9): 429-34.
- Kim, S. H., Y. B. Yan, et al. (2006). "Role of osmolytes as chemical chaperones during the refolding of aminoacylase." *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 84(1): 30-38.
- Kimura, J., T. Ono, et al. (2009). " Na^{+} - Ca^{2+} exchanger expression and its modulation." *Biol Pharm Bull* 32(3): 325-31.
- King, W. G., Rodrigue, Jm, et al. (1974). "Losses of Trace Concentrations of Cadmium from Aqueous-Solution During Storage in Glass Containers." *Analytical Chemistry* 46(6): 771-773.

- Kiss, R. S., M. R. Elliott, et al. (2006). "Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes." *Curr Biol* 16(22): 2252-8.
- Kolaczowski, M., A. Kolaczowska, et al. (1998). "In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network." *Microb Drug Resist* 4(3): 143-58.
- Kosk-Kosicka, D., M. Kurzmack, et al. (1983). "Kinetic characterization of detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase." *Biochemistry* 22: 2559.
- Kragh-Hansen, U., M. le Maire, et al. (1998). "The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes." *Biophys J* 75(6): 2932-46.
- Kragh-Hansen, U., M. le Maire, et al. (1993). "Transitional steps in the solubilization of protein-containing membranes and liposomes by nonionic detergent." *Biochemistry* 32(6): 1648-56.
- Krezel, A. and W. Bal (2004). "Studies of zinc(II) and nickel(II) complexes of GSH, GSSG and their analogs shed more light on their biological relevance." *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2(3-4): 293-305.
- Kubota, T., T. Daiho, et al. (1993). "Quasi-irreversible inactivation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by simultaneous tight binding of magnesium and fluoride to the catalytic site." *Biochim Biophys Acta* 1163(2): 131-43.
- Kurisu, G., H. Zhang, et al. (2003). "Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity." *Science* 302(5647): 1009-14.
- Lacapère, J., M. Gingold, et al. (1981). "Sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylation from inorganic phosphate in the absence of a calcium gradient. Steady state and kinetic fluorescence studies." *J. Biol. Chem.* 256(5): 2302-2306.
- Lacapère, J. J., N. Bennett, et al. (1990). "pH and magnesium dependence of ATP binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence that the catalytic ATP-binding site consists of two domains." *J. Biol. Chem.* 265: 348.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-5.
- Lakowicz, J. R. (1980). "Fluorescence spectroscopic investigations of the dynamic properties of proteins, membranes and nucleic acids." *J Biochem Biophys Methods* 2(1): 91-119.
- Laursen, M., M. Bubltz, et al. (2009). "Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase." *J Biol Chem*.
- le Maire, M., P. Champeil, et al. (2000). "Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents." *Biochim Biophys Acta* 1508(1-2): 86-111.
- le Maire, M., J. V. Moller, et al. (1976). "Retention of enzyme activity by detergent-solubilized sarcoplasmic Ca2+ -ATPase." *Biochemistry* 15(11): 2336-42.
- Lebrun, M. H., P. Duvert, et al. (1985). "Complexation of the fungal metabolite tenuazonic acid with copper (II), iron (III), nickel (II), and magnesium (II) ions." *J Inorg Biochem* 24(3): 167-81.
- Lee, A. G. (2002). "Ca²⁺-ATPase structure in the E1 and E2 conformations: mechanism, helix-helix and helix-lipids interactions." *Biochim Biophys Acta* 1565: 246-266.
- Lee, A. G. (2003). "Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective." *Biochim Biophys Acta* 1612(1): 1-40.
- Lee, A. G. (2004). "How lipids affect the activities of integral membrane proteins." *Biochim Biophys Acta* 1666(1-2): 62-87.
- Leier, I., G. Jedlitschky, et al. (1996). "ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump." *Biochem J* 314 (Pt 2): 433-7.
- Leier, I., G. Jedlitschky, et al. (1994). "The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates." *J Biol Chem* 269(45): 27807-10.
- Lenoir, G. (2004). Etude des changements de conformation de l'ATPase-Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique (SERCA1) associés à la fixation et au transport de Ca²⁺. *Biochimie et Biophysique*. Paris, UNIVERSITE PARIS XI - FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD.
- Lenoir, G., C. Jaxel, et al. (2006). "Conformational Changes in Sarcoplasmic Reticulum Ca2+-ATPase Mutants: Effect of Mutations either at Ca2+-Binding Site II or at Tryptophan 552 in the Cytosolic Domain." *Biochemistry* 45: 5261-5270.
- Lenoir, G., T. Menguy, et al. (2002). "Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca(2+)-ATPase." *Biochim Biophys Acta* 1560(1-2): 67-83.
- Lenoir, G., M. Picard, et al. (2004). "Functional Properties of Sarcoplasmic Reticulum Ca2+-ATPase after Proteolytic Cleavage at Leu119-Lys120, Close to the A-domain." *J. Biol. Chem.* 279(10): 9156-9166.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley, et al. (2005). "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." *Toxicol Appl Pharmacol* 204(3): 216-37.
- Leverrier, P., C. Montigny, et al. (2007). "Metal binding to ligands: Cadmium complexes with glutathione revisited." *Analytical Biochemistry* 371: 215-228.
- Levina, N., S. Totemeyer, et al. (1999). "Protection of Escherichia coli cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity." *Embo J* 18(7): 1730-7.
- Levy, D., M. Seigneuret, et al. (1990). "Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability." *J Biol Chem* 265(32): 19524-34.
- Li, Z.-S., Y.-P. Lu, et al. (1997). "A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in Saccharomyces cerevisiae: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium." *PNAS* 94(1): 42-47.

- Li, Z. S., M. Szczypka, et al. (1996). "The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump." *Journal of Biological Chemistry* 271(11): 6509-6517.
- Lichtenberg, D. (1985). "Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants." *Biochim Biophys Acta* 821(3): 470-8.
- Lichtenberg, D., R. J. Robson, et al. (1983). "Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects." *Biochim Biophys Acta* 737(2): 285-304.
- Locher, K. P. (2009). "Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters." *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364(1514): 239-245.
- Locher, K. P., A. T. Lee, et al. (2002). "The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism." *Science* 296(5570): 1091-8.
- London, E. and D. A. Brown (2000). "Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)." *Biochim Biophys Acta* 1508(1-2): 182-95.
- Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel." *Science* 309(5736): 897-903.
- Lund, S., S. Orłowski, et al. (1989). "Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum." *J. Biol. Chem.* 264(9): 4907-4915.
- Lytton, J., M. Westlin, et al. (1991). "Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic-Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps." *Journal of Biological Chemistry* 266(26): 17067-17071.
- Ma, H., G. Inesi, et al. (2003). "Substrate-induced conformational fit and headpiece closure in the Ca²⁺-ATPase (SERCA)." *J Biol Chem* 278(31): 28938-43.
- Ma, H., L. Zhong, et al. (1999). "Overlapping Effects of S3 Stalk Segment Mutations on the Affinity of Ca²⁺-ATPase (SERCA) for Thapsigargin and Cyclopiazonic Acid." *Biochemistry* 38: 15522-15527.
- MacLennan, D. H., C. J. Brandl, et al. (1985). "Amino-Acid-Sequence of a Ca-2(+) + Mg-2+-Dependent Atpase from Rabbit Muscle Sarcoplasmic-Reticulum, Deduced from Its Complementary-DNA Sequence." *Nature* 316(6030): 696-700.
- MacLennan, D. H., C. J. Brandl, et al. (1985). "Cloning of DNA for Calcium Atpases of Sarcoplasmic-Reticulum." *Journal of General Physiology* 86(6): A8-A8.
- Madeira, V. M. (1978). "Proton gradient formation during transport of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum." *Arch Biochem Biophys* 185(2): 316-25.
- Magyar, J. S. and H. A. Godwin (2003). "Spectropotentiometric analysis of metal binding to structural zinc-binding sites: accounting quantitatively for pH and metal ion buffering effects." *Anal Biochem* 320(1): 39-54.
- Mahaney, J. E., D. D. Thomas, et al. (2004). "The time-dependent distribution of phosphorylated intermediates in native sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase from skeletal muscle is not compatible with a linear kinetic model." *Biochemistry* 43: 4400.
- Makinose, M. (1972). "Phosphoprotein formation during osmo-chemical energy conversion in the membrane of the sarcoplasmic reticulum." *FEBS Letters* 25(1): 113-115.
- Makinose, M. (1973). "Possible functional states of the enzyme of the sarcoplasmic calcium pump." *FEBS Lett* 37(2): 140-3.
- Marchand, A., A.-M. L. Winther, et al. (2008). "Crystal Structure of D351A and P312A mutant forms of the mammalian sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase reveal key events in phosphorylation and Ca²⁺ release." *J. Biol. Chem.* 283: 14867.
- Marius, P., S. J. Alvis, et al. (2005). "The interfacial lipid binding site on the potassium channel KcsA is specific for anionic phospholipids." *Biophys J* 89(6): 4081-9.
- Martell, A. E. and R. M. Smith (1974). *Critical Stability Constants : Amino Acids*. New York, Plenum Press.
- Martell, A. E. and R. M. Smith (1975). *Critical Stability Constants : Amines*. New York, Plenum Press.
- Martell, A. E. and R. M. Smith (1982). *Critical Stability Constants : First Supplement*. New York, Plenum Press.
- Martin, D. W., C. Tanford, et al. (1984). "Monomeric solubilized sarcoplasmic reticulum Ca pump protein: demonstration of Ca binding and dissociation coupled to ATP hydrolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(21): 6623-6.
- Maruyama, K. and D. H. MacLennan (1988). "Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca²⁺ transport activity of the Ca²⁺-ATPase expressed in COS-1 cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3314.
- Mason, M. J., C. Garcia-Rodriguez, et al. (1991). "Coupling between intracellular Ca²⁺ stores and the Ca²⁺ permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes." *J Biol Chem* 266(31): 20856-62.
- Mast, R. C. and L. V. Haynes (1975). "The use of the fluorescent probes perylene and magnesium 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate to determine the critical micelle concentration of surfactants in aqueous solution." *Journal of Colloid and Interface Science* 53(1): 35-41.
- Mataga, N., T. Okada, et al. (1967). "Electronic processes in hetero-excimers and the mechanism of fluorescence quenching." *Chemical Physics Letters* 1(4): 119-121.
- McIntosh, D. B. and G. A. Davidson (1984). "Effects of nonsolubilizing and solubilizing concentrations of Triton X-100 on Ca²⁺ binding and Ca²⁺-ATPase activity of sarcoplasmic reticulum." *Biochemistry* 23: 1959z.
- McIntosh, D. B., C. Montigny, et al. (2008). "Unexpected Phosphoryl Transfer from Asp351 to Fluorescein Attached to Lys515 in Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase." *Biochemistry* 47(24): 6386-6393.
- McIntosh, D. B. and D. C. Ross (1985). "Role of phospholipid and protein-protein associations in activation and stabilization of soluble Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *Biochemistry* 24: 1244-51.

- McIntosh, D. B., D. G. Woolley, et al. (1999). "Interaction of Nucleotides with Asp351 and the Conserved Phosphorylation Loop of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase." *J. Biol. Chem.* 274(36): 25227-25236.
- Meinild, A.-K., D. A. Klaerke, et al. (1998). "Bidirectional Water Fluxes and Specificity for Small Hydrophilic Molecules in Aquaporins 0-5." *J. Biol. Chem.* 273(49): 32446-32451.
- Meissner, G. (1975). "Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles." *Biochim Biophys Acta* 389(1): 51-68.
- Meister, A. (1988). "Glutathione Metabolism and Its Selective Modification." *Journal of Biological Chemistry* 263(33): 17205-17208.
- Meister, A. (1988). "On the Discovery of Glutathione." *Trends in Biochemical Sciences* 13(5): 185-188.
- Mermier, P. and W. Hasselbach (1976). "Comparison between strontium and calcium uptake by the fragmented sarcoplasmic reticulum." *Eur J Biochem* 69(1): 79-86.
- Meyer, O., M. Ollivon, et al. (1992). "Solubilization steps of dark-adapted purple membrane by Triton X-100. A spectroscopic study." *FEBS Lett* 305(3): 249-53.
- Michelangeli, F., E. A. Grimes, et al. (1991). "Effects of phospholipids on the function of (Ca^{2+}) - Mg^{2+} -ATPase." *Biochemistry* 30(2): 342-51.
- Michelangeli, F., S. Orłowski, et al. (1990). "Effects of phospholipids on binding of calcium to (Ca^{2+}) - Mg^{2+} -ATPase." *Biochemistry* 29(36): 8307-12.
- Mildvan, A. S. and M. Cohn (1966). "Kinetic and Magnetic Resonance Studies of the Pyruvate Kinase Reaction. II. COMPLEXES OF ENZYME, METAL, AND SUBSTRATES." *J. Biol. Chem.* 241(5): 1178-1193.
- Miguel, M. D., O. Eidelman, et al. (1989). "Temperature-Dependence of the Vesicle Micelle Transition of Egg Phosphatidylcholine and Octyl Glucoside." *Biochemistry* 28(22): 8921-8928.
- Minta, A. and R. Y. Tsien (1989). "Fluorescent indicators for cytosolic sodium." *J Biol Chem* 264(32): 19449-57.
- Mintz, E. and F. Guillain (1997). " Ca^{2+} transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase." *Biochim Biophys Acta* 1318(1-2): 52-70.
- Miras, R., M. Cuillel, et al. (2001). "Purification of Heterologous Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Serca1a Allowing Phosphoenzyme and Ca^{2+} -Affinity Measurements." *Protein Expression and Purification* 22(2): 299-306.
- Miras, R., I. Morin, et al. (2008). "Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13(2): 195-205.
- Mitchinson, C., A. F. Wilderspin, et al. (1982). "Identification of a labelled peptide after stoichiometric reaction of fluorescein isothiocyanate with the Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum." *FEBS Lett* 146(1): 87-92.
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, et al. (2003). "Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore." *Nature* 423(6943): 949-55.
- Møller, J. and M. le Maire (1993). "Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins." *J. Biol. Chem.* 268(25): 18659-18672.
- Møller, J. V., B. Juul, et al. (1996). "Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases." *Biochim Biophys Acta* 1286(1): 1-51.
- Møller, J. V., G. Lenoir, et al. (2002). "Calcium Transport by Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. Role of the A-domain and its C-terminal link with the transmembrane region." *J. Biol. Chem.* 277(41): 38647-38659.
- Møller, J. V., K. E. Lind, et al. (1980). "Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -activated ATPase from sarcoplasmic reticulum." *J. Biol. Chem.* 255: 1912.
- Møller, J. V., P. Nissen, et al. (2005). "Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump." *Current Opinion in Structural Biology* 15(4): 387-393.
- Moncoq, K., C. A. Trieber, et al. (2007). "The Molecular Basis for Cyclopiazonic Acid Inhibition of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump." *J. Biol. Chem.* 282(13): 9748-9757.
- Montigny, C., B. Arnou, et al. (2009). "Glycyl betaine slows down irreversible denaturation of detergent-solubilized SERCA1a." submitted to *Analytical Biochemistry*.
- Montigny, C., B. Arnou, et al. (2008). "Use of Glycerol-Containing Media To Study the Intrinsic Fluorescence Properties of Detergent-Solubilized Native or Expressed SERCA1a." *Biochemistry* 47(46): 12159-12174.
- Montigny, C. and P. Champeil (2007). "Use of metallochromic dyes and potentiometric pH-meter titration to detect binding of divalent cations to "Good's" buffers: 4-morpholinepropanesulfonic acid (Mops) does not bind Mg^{2+} ." *Analytical Biochemistry* 366(1): 96-98.
- Montigny, C., C. Jaxel, et al. (2004). " Fe^{2+} -catalyzed oxidative cleavages of Ca^{2+} -ATPase reveal novel features of its pumping mechanism." *J Biol Chem* 279(42): 43971-81.
- Montigny, C., M. Picard, et al. (2007). "Inhibitors Bound to Ca^{2+} -Free Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Lock Its Transmembrane Region but Not Necessarily Its Cytosolic Region, Revealing the Flexibility of the Loops Connecting Transmembrane and Cytosolic Domains." *Biochemistry* 46(51): 15162-15174.
- Morita, T., D. Hussain, et al. (2008). "Interaction sites among phospholamban, sarcolipin, and the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase." *Biochem Biophys Res Commun* 369(1): 188-94.
- Morrissey, R. E., W. P. Norred, et al. (1985). "Toxicity of the Mycotoxin, Cyclopiazonic Acid, to Sprague-Dawley Rats." *Toxicology and Applied Pharmacology* 77(1): 94-107.
- Morth, J. P., B. P. Pedersen, et al. (2007). "Crystal structure of the sodium-potassium pump." *Nature* 450(7172): 1043-9.
- Mukerjee, P. and K. J. Mysels (1955). "A Re-evaluation of the Spectral Change Method of Determining Critical Micelle Concentration." *Journal of the American Chemical Society* 77(11): 2937-2943.

- Muller, M., C. Meijer, et al. (1994). "Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 13033-7.
- Murata, K., K. Mitsuoka, et al. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." *Nature* 407(6804): 599-605.
- Murata, N., P. S. Mohanty, et al. (1992). "Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving complex." *FEBS Lett* 296(2): 187-9.
- Murphy, A. J. and R. J. Coll (1992a). "Fluoride is a slow, tight-binding inhibitor of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 267(8): 5229-35.
- Murphy, A. J. and R. J. Coll (1992b). "Fluoride binding to the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum converts its transport sites to a low affinity, lumen-facing form." *J Biol Chem* 267(24): 16990-4.
- Murphy, A. J. and R. J. Coll (1993). "Formation of a stable inactive complex of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase with magnesium, beryllium, and fluoride." *J Biol Chem* 268(31): 23307-10.
- Murphy, A. J., M. Pepitone, et al. (1982). "Detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase: hydrodynamic and catalytic properties." *J. Biol. Chem.* 257: 3551.
- Muthu Periasamy and Anuradha Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease." *Muscle & Nerve* 35(4): 430-442.
- Nagy, Z., C. Montigny, et al. (2006). "Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification." *Biochimie* 88(11): 1665-71.
- Neutze, R., E. Pebay-Peyroula, et al. (2002). "Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport." *Biochim Biophys Acta* 1565(2): 144-67.
- Newby, Z. E., J. O'Connell, 3rd, et al. (2008). "Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQp from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*." *Nat Struct Mol Biol* 15(6): 619-25.
- Newton, B. A. (1954). "The Absorption of Polymyxin by Cell-Wall Preparations from *Pseudomonas-Aeruginosa*." *Journal of General Microbiology* 10(1): R3-R4.
- Nishie, K., R. J. Cole, et al. (1985). "Toxicity and Neuropharmacology of Cyclopiazonic Acid." *Food and Chemical Toxicology* 23(9): 831-839.
- Norregaard, A., B. Vilsen, et al. (1994). "Transmembrane segment M3 is essential to thapsigargin sensitivity of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase." *J Biol Chem* 269(43): 26598-601.
- Nury, H., F. Manon, et al. (2008). "Mitochondrial bovine ADP/ATP carrier in detergent is predominantly monomeric but also forms multimeric species." *Biochemistry* 47(47): 12319-31.
- Obara, K., N. Miyashita, et al. (2005). "Structural role of countertransport revealed in Ca2+ pump crystal structure in the absence of Ca2+." *PNAS* 102(41): 14489-14496.
- Odermatt, A., K. Barton, et al. (2000). "The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease." *Hum Genet* 106(5): 482-91.
- Odermatt, A., P. E. Taschner, et al. (1996). "Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase, are associated with Brody disease." *Nat Genet* 14(2): 191-4.
- Odermatt, A., P. E. Taschner, et al. (1997). "Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease." *Genomics* 45(3): 541-53.
- Oganesyan, N., I. Ankoudinova, et al. (2007). "Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization." *Protein Expr Purif* 52(2): 280-5.
- Ogawa, Y., H. Harafuji, et al. (1980). "Comparison of the Characteristics of 4 Metallochromic Dyes as Potential Calcium Indicators for Biological Experiments." *Journal of Biochemistry* 87(5): 1293-1303.
- Ohnishi, S. T. (1978). "Characterization of Murexide Method - Dual-Wavelength Spectrophotometry of Cations under Physiological Conditions." *Analytical Biochemistry* 85(1): 165-179.
- Olesen, C., M. Picard, et al. (2007). "The structural basis of calcium transport by the calcium pump." *Nature* 450(7172): 1036-42.
- Olesen, C., T. L.-M. Sorensen, et al. (2004). "Dephosphorylation of the Calcium Pump Coupled to Counterion Occlusion." *Science* 306(5705): 2251-2255.
- Ollivon, M., O. Eidelman, et al. (1988). "Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside." *Biochemistry* 27(5): 1695-703.
- O'Neal, S. G., D. B. Rhoads, et al. (1979). "Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase and other ATPases." *Biochem Biophys Res Commun* 89(3): 845-50.
- Orlowski, S. and P. Champeil (1991a). "Kinetics of calcium dissociation from its high-affinity transport sites on sarcoplasmic reticulum ATPase." *Biochemistry* 30(2): 352-61.
- Ottolia, M., S. John, et al. (2007). "Shedding light on the Na+/Ca2+ exchanger." *Ann N Y Acad Sci* 1099: 78-85.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* 289(5480): 739-45.
- Palmgren, M. G. and K. B. Axelsen (1998). "Evolution of P-type ATPases." *Biochim Biophys Acta* 1365(1-2): 37-45.
- Paternostre, M. T., M. Roux, et al. (1988). "Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate." *Biochemistry* 27(8): 2668-77.

- Patkar, S. A., U. Rasmussen, et al. (1979). "On the mechanism of histamine release induced by thapsigargin from *Thapsia garganica* L." *Agents Actions* 9(1): 53-7.
- Pebay-Peyroula, E. (2008). *Biophysical analysis of membrane proteins. Investigating structure and function*. Weinheim.
- Pebay-Peyroula, E. and G. Brandolin (2004). "Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level." *Curr Opin Struct Biol* 14(4): 420-5.
- Pebay-Peyroula, E., C. Dahout-Gonzalez, et al. (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." *Nature* 426(6962): 39-44.
- Pebay-Peyroula, E., R. Neutze, et al. (2000). "Lipidic cubic phase crystallization of bacteriorhodopsin and cryotrapping of intermediates: towards resolving a revolving photocycle." *Biochim Biophys Acta* 1460(1): 119-32.
- Pebay-Peyroula, E., G. Rummel, et al. (1997). "X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases." *Science* 277(5332): 1676-81.
- Pedersen, B. P., M. J. Buch-Pedersen, et al. (2007). "Crystal structure of the plasma membrane proton pump." *Nature* 450(7172): 1111-4.
- Pedersen, P. A., J. H. Rasmussen, et al. (1996). "Expression in high yield of pig alpha 1 beta 1 Na,K-ATPase and inactive mutants D369N and D807N in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 271(5): 2514-22.
- Pendini, N. R., L. M. Bailey, et al. (2008). "Biotin protein ligase from *Candida albicans*: expression, purification and development of a novel assay." *Arch Biochem Biophys* 479(2): 163-9.
- Peng, X., J. Du, et al. (2007). "A Selective Fluorescent Sensor for Imaging Cd²⁺ in Living Cells." *Journal of the American Chemical Society* 129(6): 1500-1501.
- Penninckx, M. J. (2002). "An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts." *FEMS Yeast Res* 2(3): 295-305.
- Perozo, E. and D. C. Rees (2003). "Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels." *Curr Opin Struct Biol* 13(4): 432-42.
- Perrin, D. D. and A. E. Watt (1971). "Complex Formation of Zinc and Cadmium with Glutathione." *Biochimica Et Biophysica Acta* 230(1): 96-&.
- Picard, M., T. Dahmane, et al. (2006). "Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study." *Biochemistry* 45: 1861-69.
- Picard, M., A.-M. L. Jensen, et al. (2007). "Ca²⁺ versus Mg²⁺ Coordination at the Nucleotide-binding site of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase." *Journal of Molecular Biology* 368(1): 1-7.
- Picard, M., C. Toyoshima, et al. (2005). "The Average Conformation at Micromolar [Ca²⁺] of Ca²⁺-ATPase with Bound Nucleotide Differs from That Adopted with the Transition State Analog ADP.AIFx or with AMPPCP under Crystallization Conditions at Millimolar [Ca²⁺]." *J. Biol. Chem.* 280(19): 18745-18754.
- Picard, M., C. Toyoshima, et al. (2006). "Effects of Inhibitors on Luminal Opening of Ca²⁺ Binding Sites in an E2P-like Complex of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase with Be²⁺-fluoride." *J. Biol. Chem.* 281(6): 3360-3369.
- Pick, U. (1981b). "Interaction of fluorescein isothiocyanate with nucleotide-binding sites of the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum." *Eur J Biochem* 121(1): 187-95.
- Pick, U. (1982). "The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 257(11): 6111-9.
- Pick, U. and S. Bassilian (1981a). "Modification of the ATP binding site of the Ca²⁺ -ATPase from sarcoplasmic reticulum by fluorescein isothiocyanate." *FEBS Lett* 123(1): 127-30.
- Pick, U. and S. Karlish (1982). "Regulation of the conformation transition in the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum by pH, temperature, and calcium ions." *J. Biol. Chem.* 257(11): 6120-6126.
- Pick, U. and S. J. Karlish (1980). "Indications for an oligomeric structure and for conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase labelled selectively with fluorescein." *Biochim Biophys Acta* 626(1): 255-61.
- Pikula, S., N. Mullner, et al. (1988). "Stabilization and crystallization of Ca²⁺-ATPase in detergent- solubilized sarcoplasmic reticulum." *J. Biol. Chem.* 263(11): 5277-5286.
- Pinto Fde, T. and H. P. Adamo (2002). "Deletions in the acidic lipid-binding region of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A mutant with high affinity for Ca²⁺ resembling the acidic lipid-activated enzyme." *J Biol Chem* 277(15): 12784-9.
- Plenge-Tellechea, F., F. Soler, et al. (1997). "On the Inhibition Mechanism of Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPases by Cyclopiazonic Acid." *J. Biol. Chem.* 272(5): 2794-2800.
- Pol, D. (1997). *Travaux Pratiques de Biologie des Levures.*, Ellipses.
- Pompon, D., B. Louerat, et al. (1996). "Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments." *Methods Enzymol* 272: 51-64.
- Pornillos, O., Y. J. Chen, et al. (2005). "X-ray structure of the EmrE multidrug transporter in complex with a substrate." *Science* **310**(5756): 1950-3.
- Post, R. L. and S. Kume (1973). "Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase." *J Biol Chem* 248(20): 6993-7000.
- Powl, A. M., J. Carney, et al. (2005). "Lipid interactions with bacterial channels: fluorescence studies." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 905-9.
- Powl, A. M., J. M. East, et al. (2003). "Lipid-protein interactions studied by introduction of a tryptophan residue: the mechanosensitive channel MscL." *Biochemistry* 42(48): 14306-17.

- Powl, A. M., J. M. East, et al. (2005). "Heterogeneity in the binding of lipid molecules to the surface of a membrane protein: hot spots for anionic lipids on the mechanosensitive channel of large conductance MscL and effects on conformation." *Biochemistry* 44(15): 5873-83.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, et al. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." *Science* 256(5055): 385-7.
- PubChem_database 2,5-di-tert-butylhydroquinone (2-tert-butylhydroquinone - Compound Summary (CID 16043)), NCBI.
- Pullman, M. E., H. S. Penefsky, et al. (1960). "Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. I. PURIFICATION AND PROPERTIES OF SOLUBLE, DINITROPHENOL-STIMULATED ADENOSINE TRIPHOSPHATASE." *J. Biol. Chem.* 235(11): 3322-3329.
- Punzengruber, C., R. Prager, et al. (1978). "Calcium gradient-dependent and calcium gradient-independent phosphorylation of sarcoplasmic reticulum by orthophosphate. The role of magnesium." *Eur J Biochem* 92(2): 349-59.
- Rabenstein, D. L. (1989). Chapter 5 : Metal Complexes of Glutathione and their Biological Significance. Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects - Part A. D. Dolphin, R. Poulson and O. Avramovic, John Wiley & Sons, Inc: 147-186.
- Rabenstein, D. L., R. Guevremont, et al. (1979). Glutathione and its metal complexes. Metal Ions in Biological Systems. H. Sigel. New York and Basel, Marcel Dekker Inc. 9: 103-141.
- Rajendran, L. and K. Simons (2005). "Lipid rafts and membrane dynamics." *J Cell Sci* 118(6): 1099-1102.
- Raju, B., E. Murphy, et al. (1989). "A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium." *Am J Physiol* 256(3 Pt 1): C540-8.
- Rees, D. C., E. Johnson, et al. (2009). "ABC transporters: the power to change." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(3): 218-227.
- Ren, X.-Q., T. Furukawa, et al. (2000). "Functional Comparison between YCF1 and MRP1 Expressed in Sf21 Insect Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270(2): 608-615.
- Rink, T. J., R. Y. Tsien, et al. (1982). "Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes." *J Cell Biol* 95(1): 189-96.
- Rotman, B., J. A. Zderic, et al. (1963). "Fluorogenic substrates for beta-D-galactosidases and phosphatases derived from fluorescein (3,6-dihydroxyfluoran) and its monomethylether." *Proc Natl Acad Sci U S A* 50: 1-6.
- Rouessac, F. and A. Rouessac (2000). *Analyse Chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes*.
- Rousselot-Pailley, P., O. Seneque, et al. (2006). "Model peptides based on the binding loop of the copper metallochaperone Atx1: Selectivity of the consensus sequence MxCxxC for metal ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II)." *Inorganic Chemistry* 45(14): 5510-5520.
- Ruiz, A. and J. Arino (2007). "Function and Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA Sodium ATPase System." *Eukaryotic Cell* 6(12): 2175-2183.
- Rutherford, A. W. and A. Boussac (2004). "Biochemistry. Water photolysis in biology." *Science* 303(5665): 1782-4.
- Sachs, G., H. H. Chang, et al. (1976). "A nonelectrogenic H⁺ pump in plasma membranes of hog stomach." *J. Biol. Chem.* **251**(23): 7690-7698.
- Sagara, Y. and G. Inesi (1991). "Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations." *J. Biol. Chem.* 266(21): 13503-13506.
- Sagara, Y., J. Wade, et al. (1992). "A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum ATPase with thapsigargin." *J. Biol. Chem.* 267(2): 1286-1292.
- Saier, M. H., Jr., J. T. Beatty, et al. (1999). "The major facilitator superfamily." *J Mol Microbiol Biotechnol* 1(2): 257-79.
- Saito, K., Y. Imamura, et al. (1984). "Effect of temperature and added ligands on the susceptibility of Ca²⁺, Mg²⁺-adenosine triphosphatase of the sarcoplasmic reticulum to trypsin." *J Biochem* 95(5): 1297-304.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, M. M., Y. Liu, et al. (1992). "Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes." *Biochemistry* 31(23): 5278-83.
- Scales, D. J. and G. Inesi (1976). "Localization of ATPase protein in sarcoplasmic reticulum membrane." *Arch Biochem Biophys* 176(1): 392-4.
- Scarpa, A. (1979). Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Methods in Enzymology : Biomembranes Part G: Bioenergetics: Biogenesis of Mitochondria, Organization, and Transport*. A. Press: 301-338.
- Scarpa, A., F. J. Brinley, et al. (1978). "Antipyrilazo-III, a Middle Range Ca²⁺ Metallochromic Indicator." *Biochemistry* 17(8): 1378-1386.
- Schobert, B. and H. Tschesche (1978). "Unusual Solution Properties of Proline and Its Interaction with Proteins." *Biochimica Et Biophysica Acta* 541(2): 270-277.
- Schultz, L. D., K. J. Hofmann, et al. (1987). "Regulated overproduction of the GAL4 gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast." *Gene* **61**(2): 123-33.
- Seekoe, T., S. Peall, et al. (2001). "Thapsigargin and Dimethyl Sulfoxide Activate Medium Pileft-right-arrow HOH Oxygen Exchange Catalyzed by Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase." *J. Biol. Chem.* 276(50): 46737-46744.
- Seidler, N. W., I. Jona, et al. (1989). "Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 264(30): 17816-23.
- Shechter, E. (2000). *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. Paris.
- Sherwood, L. (2000). *Bases moléculaires de la contraction du muscle squelettique. Physiologie humaine*. D. B. Université. Paris: 172-189.
- Shigekawa, M. and A. A. Akowitz (1979). "On the mechanism of Ca²⁺-dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. Occurrence of two types of phosphoenzyme intermediates in the presence of KCl." *J Biol Chem* 254(11): 4726-30.

- Shigekawa, M. and J. P. Dougherty (1978b). "Reaction mechanism of Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the absence of added alkali metal salts. II. Kinetic properties of the phosphoenzyme formed at the steady state in high Mg^{2+} and low Ca^{2+} concentrations." *J Biol Chem* 253(5): 1451-7.
- Shigekawa, M. and J. P. Dougherty (1978c). "Reaction mechanism of Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the absence of added alkali metal salts. III. Sequential occurrence of ADP-sensitive and ADP-insensitive phosphoenzymes." *J Biol Chem* 253(5): 1458-64.
- Shigekawa, M., J. P. Dougherty, et al. (1978a). "Reaction mechanism of Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the absence of added alkali metal salts. I. Characterization of steady state ATP hydrolysis and comparison with that in the presence of KCl." *J Biol Chem* 253(5): 1442-50.
- Shinoda, T., H. Ogawa, et al. (2009). "Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution." *Nature* 459(7245): 446-50.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387(6633): 569-72.
- Simos, G., A. Segref, et al. (1996). "The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases." *Embo J* 15(19): 5437-48.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(23): 720-31.
- Skerjanc, I. S., T. Toyofuku, et al. (1993). "Mutation of glutamate 309 to glutamine alters one Ca^{2+} -binding site in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum expressed in Sf9 cells." *J Biol Chem* 268(21): 15944-50.
- Skou, J. C. (1957). "The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves." *Biochim Biophys Acta* 23(2): 394-401.
- Slavik, J. (1982). "Anilinonaphthalene Sulfonate as a Probe of Membrane-Composition and Function." *Biochimica Et Biophysica Acta* 694(1): 1-25.
- Soler, F., F. Plenge-Tellechea, et al. (1998). "Cyclopiazonic acid effect on Ca^{2+} -dependent conformational states of the sarcoplasmic reticulum ATPase. Implication for the enzyme turnover." *Biochemistry* 37(12): 4266-4274.
- Sorensen, T. L.-M., J. V. Møller, et al. (2004). "Phosphoryl Transfer and Calcium Ion Occlusion in the Calcium Pump." *Science* 304(5677): 1672-1675.
- Sorensen, T. L.-M., C. Olesen, et al. (2006). "Crystals of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase." *Journal of Biotechnology* 124(4): 704-716.
- Soubias, O., W. E. Teague, et al. (2006). "Evidence for specificity in lipid-rhodopsin interactions." *J Biol Chem* 281(44): 33233-41.
- Soulié, S., J. V. Møller, et al. (1996). Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 236: 363-4.
- Starling, A. P., J. M. East, et al. (1993). "Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the Ca^{2+} -ATPase." *Biochemistry* 32(6): 1593-600.
- Steyn, P. S. and C. J. Rabie (1976). "Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from Phoma sorghina." *Phytochemistry* 15(12): 1977-1979.
- Stokes, D. L., F. Delavoie, et al. (2005). "Structural Studies of a Stabilized Phosphoenzyme Intermediate of Ca^{2+} -ATPase." *J. Biol. Chem.* 280(18): 18063-18072.
- Stokes, D. L. and J. J. Lacapere (1994). "Conformation of Ca^{2+} -ATPase in two crystal forms. Effects of Ca^{2+} , thapsigargin, adenosine 5'-(beta, gamma-methylene)triphosphate, and chromium(III)-ATP on crystallization." *J Biol Chem* 269(15): 11606-13.
- Stroebe, D., Y. Choquet, et al. (2003). "An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex." *Nature* 426(6965): 413-8.
- Suelter, C. H., R. Singleton, Jr., et al. (1966). "Studies on the interaction of substrate and monovalent and divalent cations with pyruvate kinase." *Biochemistry* 5(1): 131-9.
- Sukharev, S. I., P. Blount, et al. (1994). "A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone." *Nature* 368(6468): 265-8.
- Sumbilla, C., L. Lu, et al. (1993). " Ca^{2+} -dependent and thapsigargin-inhibited phosphorylation of Na^{+} , K^{+} -ATPase catalytic domain following chimeric recombination with Ca^{2+} -ATPase." *J Biol Chem* 268(28): 21185-92.
- Swarts, H. G., H. P. Hermesen, et al. (1998). "Constitutive activation of gastric H^{+} , K^{+} -ATPase by a single mutation." *EMBO J.* 17: 3029.
- Swarts, H. G., J. B. Koenderink, et al. (2005). "Asn792 participates in the hydrogen bond network around the K^{+} -binding pocket of gastric H^{+} , K^{+} -ATPase." *J. Biol. Chem.* 280: 11488.
- Swoboda, G. and W. Hasselbach (1988). "Inactivation of detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase." *Eur J Biochem* 172(2): 325-32.
- Szczypka, M., J. Wemmie, et al. (1994). "A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein." *J. Biol. Chem.* 269(36): 22853-22857.
- Takahashi, M., Y. Kondou, et al. (2007). "Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors." *PNAS* 104(14): 5800-5805.
- Tate, C. G., J. Haase, et al. (2003). "Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter." *Biochim Biophys Acta* 1610(1): 141-53.
- Taylor, L. S., P. York, et al. (1995). "Sucrose Reduces the Efficiency of Protein Denaturation by a Chaotropic Agent." *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1253(1): 39-46.
- Thastrup, O., P. J. Cullen, et al. (1990). "Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7): 2466-70.

- Thorley-Lawson, D. A. and N. M. Green (1977). "The reactivity of the thiol groups of the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum and their location on tryptic fragments of the molecule." *Biochem J* 167(3): 739-48.
- Thuriaux, P. (2004). La levure, Belin Sup.
- Tommasini, R., R. Evers, et al. (1996). "The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1." *PNAS* 93(13): 6743-6748.
- Ton, V. K. and R. Rao (2004). "Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(3): C580-9.
- Tornroth-Horsefield, S., Y. Wang, et al. (2006). "Structural mechanism of plant aquaporin gating." *Nature* 439(7077): 688-94.
- Toyoshima, C. (2008). "Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476(1): 3-11.
- Toyoshima, C. and G. Inesi (2004). "Structural Basis of Ion Pumping by Ca²⁺-ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum." *Annual Review of Biochemistry* 73(1): 269-292.
- Toyoshima, C. and T. Mizutani (2004). "Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue." *PNAS* 101(11): 529-535.
- Toyoshima, C., M. Nakasako, et al. (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution." *Nature* 405(6787): 647-655.
- Toyoshima, C. and H. Nomura (2002). "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 418(6898): 605-611.
- Toyoshima, C., H. Nomura, et al. (2003). "Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *FEBS Letters* 555(1): 106-110.
- Toyoshima, C., H. Nomura, et al. (2004). "Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues." *PNAS* 101(3): 361-368.
- Toyoshima, C., Y. Norimatsu, et al. (2007). "How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(50): 19831-19836.
- Toyoshima, C., Y. Norimatsu, et al. (*to be published*). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue in the absence of calcium., Protein Databank. 2006.
- Toyoshima, C., H. Sasabe, et al. (1993). "Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane." *Nature* 362(6419): 467-71.
- Traaseth, N. J., K. N. Ha, et al. (2008). "Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca(2+)-ATPase." *Biochemistry* 47(1): 3-13.
- Troullier, A., J. L. Girardet, et al. (1992). "Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase." *J Biol Chem* 267(32): 22821-9.
- Tsien, R. Y. (1980). "New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures." *Biochemistry* 19(11): 2396-404.
- Ujwal, R., D. Cascio, et al. (2008). "The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46): 17742-7.
- Unwin, N. (2003). "Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy." *FEBS letters* 555(1): 91-95.
- Unwin, N. (2005). "Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution." *J Mol Biol* 346(4): 967-89.
- Valeur, B. (2004). Invitation à la Fluorescence Moléculaire, de Boeck Université.
- van der Lee, J., L. De Windt, et al. (2002). JCHESS version 2.0 - Software for Geochemistry, Hydrology and Environmental Science. E. N. S. d. Mines. Paris, ARMINES - Centre d'Informatique Géologique.
- van Klompenburg, W., I. Nilsson, et al. (1997). "Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology." *Embo J* 16(14): 4261-6.
- Vianna, A. L. (1975). "Interaction of calcium and magnesium in activating and inhibiting the nucleoside triphosphatase of sarcoplasmic reticulum vesicles." *Biochim. Biophys. Acta* 410(2): 389-406.
- Vilsen, B., J. Andersen, et al. (1989). "Functional consequences of proline mutations in the cytoplasmic and transmembrane sectors of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J. Biol. Chem.* 264(35): 21024-21030.
- Vilsen, B. and J. P. Andersen (1987). "Effect of phospholipid, detergent and protein-protein interaction on stability and phosphoenzyme isomerization of soluble sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." *Eur. J. Biochem.* 170: 421.
- Vilsen, B. and J. P. Andersen (1998). "Mutation to the Glutamate in the Fourth Membrane Segment of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase Affects Cation Binding from Both Sides of the Membrane and Destabilizes the Occluded Enzyme Forms." *Biochemistry* 37(31): 10961-10971.
- von Heijne, G. (1986). "The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology." *Embo J* 5(11): 3021-3027.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." *Embo J* 1(8): 945-51.
- Walkup, G. K. and B. Imperiali (1997). "Fluorescent Chemosensors for Divalent Zinc Based on Zinc Finger Domains. Enhanced Oxidative Stability, Metal Binding Affinity, and Structural and Functional Characterization." *Journal of the American Chemical Society* 119(15): 3443-3450.

- Wang, Q. P., J. Scheigetz, et al. (1999). "Fluorescein monophosphates as fluorogenic substrates for protein tyrosine phosphatases." *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1431(1): 14-23.
- Ward, A., C. L. Reyes, et al. (2007). "Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(48): 19005-10.
- Ward, C., M. Lawrence, et al. (2008). "Structural insights into ligand-induced activation of the insulin receptor." *Acta Physiol (Oxf)* 192(1): 3-9.
- Weber, G. (1952). "Polarization of the Fluorescence of Macromolecules .2. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin." *Biochemical Journal* 51(2): 155-168.
- Wei, Y., J. Chen, et al. (2000). "Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport." *J Biol Chem* 275(31): 23927-32.
- Weis, W. I. and B. K. Kobilka (2008). "Structural insights into G-protein-coupled receptor activation." *Curr Opin Struct Biol* 18(6): 734-40.
- White, S. (*database updated monthly*). Stephen White's database for membrane protein of known 3D structure (updated monthly).
- Wictome, M., Y. Khan, et al. (1995). "Binding of sesquiterpene lactone inhibitors to the Ca^{2+} -ATPase." *Biochem. J.* 310: 859-868.
- Wictome, M., F. Michelangeli, et al. (1992). "The inhibitors thapsigargin and 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone favour the E2 form of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase." *FEBS Letters* 304(2-3): 109-113.
- Wiener, M. C. (2004). "A pedestrian guide to membrane protein crystallization." *Methods* 34(3): 364-72.
- Wilson, R. H., H. J. Evans, et al. (1967). "The effect of univalent cation salts on the stability and on certain physical properties of pyruvate kinase." *J Biol Chem* 242(17): 3825-32.
- Yamamoto, T. and Y. Tonomura (1968). "Reaction mechanism of the Ca^{++} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. II. Intermediate formation of phosphoryl protein." *J Biochem* 64(2): 137-45.
- Yamasaki, K., T. Daiho, et al. (2002). "Remarkable stability of solubilized and delipidated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with tightly bound fluoride and magnesium against detergent-induced denaturation." *J Biol Chem* 277(16): 13615-9.
- Yancey, P. H., M. E. Clark, et al. (1982). "Living with water stress: evolution of osmolyte systems." *Science* 217(4566): 1214-22.
- Yancey, P. H. and G. N. Somero (1979). "Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes." *Biochem J* 183(2): 317-23.
- Yau, W. M., W. C. Wimley, et al. (1998). "The preference of tryptophan for membrane interfaces." *Biochemistry* 37(42): 14713-8.
- Yu, M., L. Zhang, et al. (1998). "Specific Substitutions at Amino Acid 256 of the Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Transport ATPase Mediate Resistance to Thapsigargin in Thapsigargin-resistant Hamster Cells." *J. Biol. Chem.* 273(6): 3542-3546.
- Yu, X., S. Carroll, et al. (1993). " H^{+} countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in reconstituted proteoliposomes." *Biophys J* 64(4): 1232-42.
- Zhang, P., C. Toyoshima, et al. (1998). "Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-A resolution." *Nature* 392(6678): 835-9.
- Zhang, Z., D. Lewis, et al. (2000). "Detailed Characterization of the Cooperative Mechanism of Ca^{2+} Binding and Catalytic Activation in the Ca^{2+} Transport (SERCA) ATPase." *Biochemistry* 39(30): 8758-8767.

ANNEXE

*Voici l'annonce de ma soutenance de thèse,
mise en image par Francis Haraux*

Merci Francis !



ET EN EFFET...

11 SEPTEMBRE 1968



CRASH DU VOL AJACCIO-NICE
95 MORTS

11 SEPTEMBRE 1973



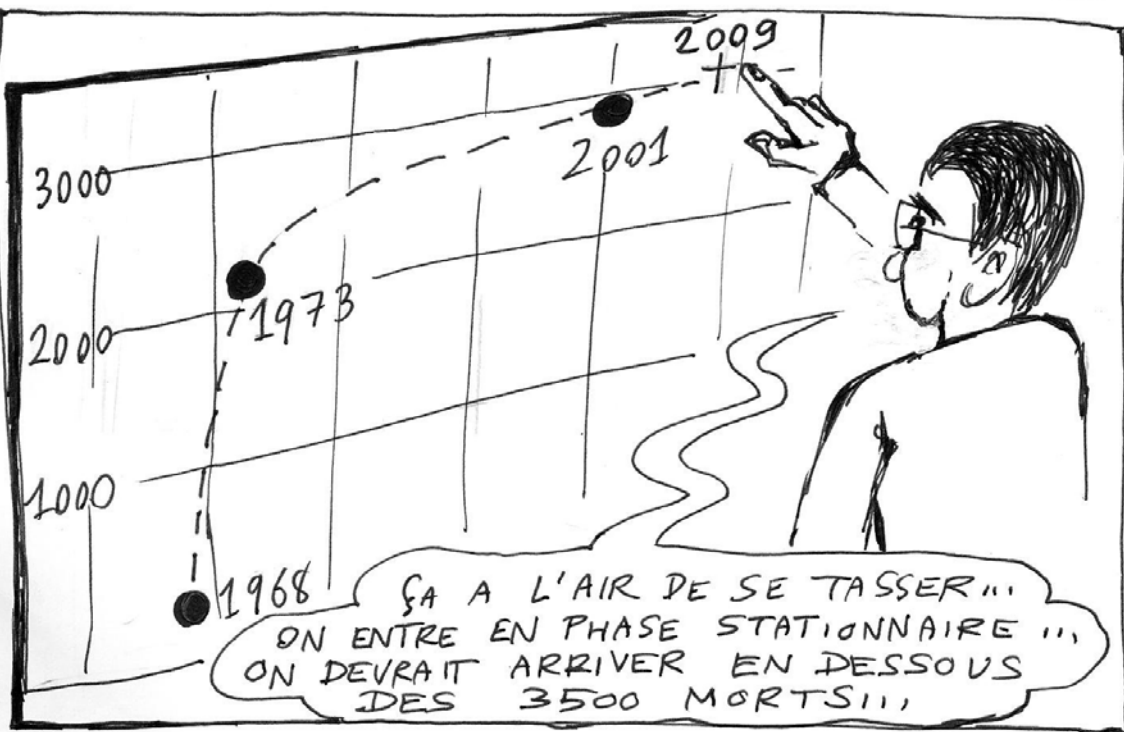
COUP D'ÉTAT AU CHILI
2 279 MORTS

11 SEPTEMBRE 2001



WORLD TRADE CENTER
2 973 MORTS

11 SEPTEMBRE 2009





Cédric Montigny

vous invite à la soutenance de thèse
 'Etudes fonctionnelles et structurales de l'ATPase- Ca^{2+} du réticulum
 sarcoplasmique de lapin et de la protéine recombinante
 exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae*'

VENDREDI 11 SEPTEMBRE 2009

à 14 heures

Ampithéâtre Claude Bloch, bât. 774,
 CEA Orme des Merisiers (ainsi qu'au pot...)