



HAL
open science

Etudes Biochimique et Structurale de DsbA1, DsbA2 et DsbA3 : les trois homologues à l'oxydoréductase de Thiol-disulfure DsbA chez *Neisseria meningitidis*.

Céline Lafaye

► To cite this version:

Céline Lafaye. Etudes Biochimique et Structurale de DsbA1, DsbA2 et DsbA3 : les trois homologues à l'oxydoréductase de Thiol-disulfure DsbA chez *Neisseria meningitidis*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00440935

HAL Id: tel-00440935

<https://theses.hal.science/tel-00440935>

Submitted on 14 Dec 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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement
par

Céline LAFAYE

le 26 novembre 2009

Etude Biochimique et Structurale de DsbA1, DsbA2 et DsbA3 :
Les trois homologues à l'oxydoréductase de Thiol-disulfure DsbA chez
Neisseria meningitidis

Composition du jury

Marc JAMIN	Président du jury
Jean-Rome VOULHOUX	Rapporteur
David PIGNOL	Rapporteur
Jean-François COLLET	Examineur
Laurence SERRE	Directrice de thèse

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel
UMR 5075 CEA/CNRS/UJF

MERCI

Le plus grand MERCI sera pour **Laurence Serre** qui a été mon «chef» pendant ces 3 années ! Ce fut un grand bonheur tant scientifique qu'humain de travailler à tes côtés. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris en biochimie et en cristallographie, pour m'avoir donné confiance en moi et pour m'avoir constamment soutenue. Merci encore pour TOUT.

Un merci particulier à Céline Juillan-Binard qui m'a tout appris ou presque à la paillasse et qui m'a permis de me sortir de nombreuses situations délicates !!! Merci Céline pour ta patience, tes conseils et surtout ta gentillesse et ton amitié.

Merci à Mickaël Griat de m'avoir si bien accueillie lors de mon arrivée au laboratoire et de m'avoir montré les premières techniques indispensables à la purification des NmDsbA.

Merci à Jean-François Collet et à toute son équipe : Hayat, Matthieu, Pauline et tous les autres, de m'avoir si chaleureusement accueillie dans votre laboratoire à Bruxelles. Cette collaboration a vraiment été très enrichissante tant sur le point de vue scientifique qu'humain. Merci à tous de m'avoir toujours soutenue dans la quête de ces potentiels redox....

Je remercie Marc Jamin, David Pignol, Jean-Rome Voulhoux et Jean-François collet pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Merci pour le temps que vous y avez consacré.

Merci à Philippe Carpentier pour nous avoir permis de réaliser les expériences de spectrométrie Raman afin de percer les mystères de ce pont disulfure chez les NmDsbA. Merci pour ta gentillesse et ta grande disponibilité. On l'aura vu finalement ce pic à 490 nm !!!

Merci à Thomas Iwema pour sa collaboration, *à l'issu de son plein grès*, dans la résolution de la structure de DsbA1.

Et, merci à toutes les personnes qui ont contribué à ces travaux durant ces 3 années: Delphine Blot pour la cristallographie, l'équipes de RoBioMol pour les clonages, Eric Forest et son équipe pour les expériences de spectrométrie de masse, Jean-Pierre Andrieux pour le séquençage et tous les autres...

Merci à tous les membres du LPM, auprès de qui j'ai passé 3 années très agréables. Corinne, Antoine pour vos nombreux conseils en biologie moléculaire. Richard, Aurélien, Michel, Manu, Iulia, Julien, Lydia, Carmen, Isabelle et tous les autres pour m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse. Je vous souhaite bonheur et réussite.

Un énorme Merci à toute ma famille et plus particulièrement à mes parents pour leur soutien pendant toutes ces années d'études. Merci pour m'avoir fait confiance et m'avoir toujours encouragée, surtout dans les moments de découragements.

Merci à Yoann, mon « petit » frère qui a passé de nombreuses heures à relire ce manuscrit pour traquer toutes les fautes d'orthographe. Merci beaucoup pour ton grand professionnalisme et cette aide si importante.

Merci à tous mes amis de course et à mon entraîneur Jean-Louis. Merci pour votre amitié et votre soutien de tous les jours qui ont contribué pleinement à mon épanouissement personnel et donc à la réussite de ces travaux.

Céline

Résumé de la thèse

Neisseria meningitidis est le principal agent responsable de méningites bactériennes. Les interactions hôte-pathogène dépendent du repliement correct de nombreuses protéines de surface, qui nécessite souvent la formation de ponts disulfures. Chez les bactéries à Gram-négatif, la synthèse de ces ponts est catalysée par l'oxydoréductase de thiol-disulfure DsbA. *N. meningitidis* possède trois gènes qui codent pour trois DsbA actives : DsbA1, DsbA2 et DsbA3. DsbA1 et DsbA2 sont des lipoprotéines impliquées dans la virulence alors que DsbA3 est une enzyme soluble périplasmique non reliée à la virulence. Les travaux de cette thèse se rapportent aux caractérisations biochimiques de ces trois enzymes et structurales de DsbA1 et DsbA3. DsbA1 et DsbA3 adoptent le repliement classique de DsbA d'*Escherichia coli*. La caractéristique la plus étonnante partagée par ces trois enzymes est leur exceptionnel pouvoir oxydant. Avec un potentiel redox de -80 mV, les DsbA de *Neisseria* sont les enzymes de la famille des thiorédoxines les plus oxydantes connues à ce jour. En accord avec cela, les études de stabilité thermale indiquent que leur forme réduite est extrêmement stable. Pour chacune de ces enzymes, les études montrent que le résidu Thréonine, retrouvé dans la région du site actif, joue un rôle clé dans la détermination de cet extraordinaire pouvoir oxydant. L'ensemble de ces résultats montrent comment des résidus situés en dehors du motif actif CXXC peuvent influencer le potentiel redox de membres de la famille des thiorédoxines. Ils montrent également que le phénotype associé à DsbA3 chez *N. meningitidis* ne peut être expliqué par une différence d'activité redox ou de structure.

Mots clés : *Neisseria meningitidis*, pont disulfure, oxydoréductase, Thiorédoxine, DsbA.

Titre de la thèse en anglais

Biochemical and Structural Study of DsbA1, DsbA2 and DsbA3, the three homologues of the Thiol-Disulfide Oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*.

Résumé de la thèse en anglais

Neisseria meningitidis is an invasive bacterial pathogen causing life-threatening infection. Host-pathogen interactions depend on the correct folding of many surface-exposed proteins, which often requires disulfide bond formation. In Gram-negative bacteria, the synthesis of disulfide bonds is catalyzed by the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA. *N. meningitidis* possesses three genes encoding three active DsbA (DsbA1, DsbA2 and DsbA3). DsbA1 and DsbA2 are lipoproteins involved in the virulence while DsbA3 is a soluble periplasmic protein non related to the virulence. This work reports the biochemical characterisation of the three neisserial enzymes and the crystal structures of DsbA1 and DsbA3. DsbA1 and DsbA3 adopt the classical *Escherichia coli* DsbA fold. The most striking feature shared by all three proteins is their exceptional oxidizing power. With a redox potential of -80 mV, they are the most oxidizing thiorodoxin-like enzymes known to date. For each of these enzymes, the threonine residue found within the active site region plays a key role in dictating this extraordinary oxidizing power. Consistent with these findings, thermal studies indicate that their reduced form is also extremely stable. This result highlights how residues located outside the CXXC motif may influence the redox potential of members of the thiorodoxin family. In addition, this functional and structural study shows that the phenotype associated with DsbA3 in *N. meningitidis* cannot be explained by a difference of redox activity.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, disulfide bond, oxidoreductase, Thiorédoxine, DsbA.

Tables des matières

Introduction 11

I. *Neisseria meningitidis* : Agent de l'infection invasive à méningocoque 14

I.1. Les bactéries du genre *Neisseria* 14

I.2. *Neisseria meningitidis* 14

A) Description générale..... 14

B) Epidémiologie 16

C) L'infection invasive à méningocoque 17

D) Pathogénèse méningococcale et immunité..... 20

E) Biologie et microbiologie 21

I.3. Conclusion sur *N. meningitidis*..... 23

II. Le système de formation des ponts disulfures 24

II.1. Généralités 24

A) Ponts disulfures et protéines..... 24

B) Les enzymes impliquées dans les échanges thiol-disulfure 27

II.2. La voie de formation des ponts disulfures chez les bactéries à Gram-négatif .33

A) Les protéines de la famille des Dsb chez *E. coli*..... 33

B) Système Dsb et virulence bactérienne..... 34

C) La voie oxydative du repliement protéique 36

D) Diversité du système de formation des ponts disulfures chez les bactéries 49

III. Connaissances actuelles sur les DsbA de *Neisseria meningitidis* 52

III.1. La découverte du système Dsb chez *Neisseria meningitidis* 52

III.2. Comparaison et analyse des séquences protéiques des trois NmDsbA 54

III.3. Le système Dsb de *Neisseria meningitidis* est-il original ?..... 54

A) Parmi les bactéries à Gram-négatif ? 54

B) Parmi les bactéries du genre *Neisseria* ? 56

III.4. Premières caractérisations des DsbA de *N. meningitidis* 56

A) Localisations membranaires des deux lipoprotéines DsbA1 et DsbA2 56

B) Etudes des fonctions *in vivo* des NmDsbA..... 57

Principes Expérimentaux 61

I. Etudes biochimiques des DsbA de *Neisseria meningitidis* 63

I.1. Mesure de l'activité insuline réductase 63

I.2.	Détermination de l'état redox	64
A)	Méthode de l'AMS	64
B)	Test d'Ellman	65
I.3.	Détermination des potentiels redox	66
A)	Définitions	66
B)	Méthode de l'équilibre avec le glutathion et analyse par fluorimétrie	67
C)	Méthode de l'équilibre redox protéine-protéine	69
I.4.	Détermination de la stabilité thermique par Thermal Shift Assay	71
I.5.	Détermination du pKa de la cystéine nucléophile par mesure de l'absorption du groupement thiol	72
II.	Expérience de spectroscopie RAMAN	73
II.1.	Principe	73
II.2.	Pourquoi utiliser la spectroscopie Raman en biologie structurale ?	74
III.	Etudes cristallographiques des DsbA de <i>Neisseria meningitidis</i>	75
III.1.	Cristallogénèse	75
A)	Les paramètres influençant la solubilité des protéines	75
B)	Le diagramme de phases	76
C)	Technique de la goutte suspendue associée à la diffusion en phase vapeur	76
III.2.	Diffraction des rayons X par un cristal de protéine	77
A)	Principe général	77
B)	Le problème de la phase	78
C)	De la carte de densité électronique au modèle structural	80
D)	La qualité du modèle structural	80
IV.	Etudes <i>in vivo</i> des activités des NmDsbA	82
IV.1.	Suivi de la motilité	82
IV.2.	Mesure de l'activité phosphatase alcaline	83

Résultats : Les DsbA de *Neisseria meningitidis*85

I.	Production des NmDsbA	87
I.1.	Production périplasmique de DsbA3	87
I.2.	Production cytoplasmique des NmDsbA	89
A)	Expression et purification des NmDsbA	89
B)	Caractérisation des NmDsbA après purification	90

II. Etudes cristallographiques des NmDsbA	94
II.1. Cristallogenèse et résolution des structures cristallographiques	94
A) DsbA1	95
B) DsbA2.....	98
C) DsbA3.....	101
II.2. Description et analyse des structures cristallographiques	104
A) Les structures de DsbA1 et DsbA3	104
B) La structure de DsbA2.....	109
C) Comparaison des deux structures de DsbA3 :	110
D) Comparaison des structures de DsbA1 et DsbA3 avec la structure de DsbA réduite d' <i>E. coli</i> . ..	111
III. Etudes biochimiques des NmDsbA	114
III.1. Mesure du potentiel redox des NmDsbA	114
A) Application de la méthode de d'équilibre redox protéine-protéine aux NmDsbA	114
B) Détermination par équilibre avec le glutathion et fluorimétrie du potentiel redox des trois NmDsbA.....	118
III.2. Pk _a de la cystéine nucléophile des NmDsbA.....	120
III.3. Stabilités thermales des NmDsbA réduites et oxydées:	121
III.4. Ré-oxydation des NmDsbA par son partenaire membranaire	122
A) Production de NmDsbB	124
B) Ré-oxydation des NmDsbA par DsbB de <i>N. meningitidis</i> et d' <i>E. coli</i>	125
Résultats : Les mutants des NmDsbA	127
I. Introduction au travail de mutagenèse	129
I.1. Mutation dans la boucle de la <i>cis</i> -Proline.....	129
I.2. Mutation de la boucle d'interaction avec DsbB	130
II. Caractérisations des propriétés fonctionnelles de ces mutants	131
II.1. Etat redox et oxydation des enzymes	131
II.2. Activité insuline réductase	131
II.3. Potentiel redox.....	132
II.4. Stabilité thermique.....	133
II.5. Ré-oxydation des mutants NmDsbA par NmDsbB ou EcDsbB	133
III. Structure du mutant T176V _{DsbA1}	134

IV. Spectrométrie Raman	136
V. Etudes <i>in vivo</i> des mutants NmDsbA	138
V.1. Construction de différentes souches d' <i>E. coli</i>	138
V.2. Suivi de la motilité	139
V.3. Activité phosphatase alcaline	140
Discussions	141
Conclusions et Perspectives.....	149
Protocoles Expérimentaux	153
I. Biologie moléculaire	155
I.1. Souches bactériennes.....	155
I.2. Conditions de culture.....	156
I.3. Constructions.....	157
A) Oligonucléotides	157
B) Clonage.....	157
C) Mutagenèse dirigée.....	160
II. Expression et purification des protéines d'intérêt chez <i>E. coli</i>	161
II.1. Croissance cellulaire et surexpression protéique.....	161
II.2. Purification	162
A) DsbA3 (expression périplasmique).....	162
B) NmDsbA et leurs mutants (expression cytoplasmique)	163
C) DsbA2 et DsbA3 sélénées (expression cytoplasmique).....	164
D) NmDsbB et EcDsbB	164
II.3. Préparation de fragments stables de DsbA2 par protéolyse limitée	165
III. Etudes biochimiques.....	166
III.1. Mesure de l'activité insuline réductase	166
III.2. Détermination de l'état redox.....	166
A) Méthode de l'AMS.....	166
B) Test d'Ellman	167
III.3. Oxydation et réduction des DsbA.....	167
III.4. Détermination du potentiel d'oxydoréduction.....	167
A) Méthode de l'équilibre avec le glutathion et analyse par fluorimétrie.....	167

B) Méthode de l'équilibre redox protéine-protéine.....	168
III.5. Thermal Shift Assay	169
III.6. Ré-oxydation des DsbA par DsbB de <i>N. meningitidis</i> ou d' <i>E. coli</i>	169
IV. Expérience de spectroscopie RAMAN	169
V. Etudes <i>in vivo</i> des activités des NmDsbA	170
V.1. Suivi de la motilité	170
V.2. Mesure de l'activité phosphatase alcaline	171
Annexes	173
Annexe A : Techniques générales de biologie moléculaire	175
Préparation de cellules compétentes.....	175
Transformation	175
Préparation d'ADN plasmidique	176
Restriction et ligation	176
Mutagenèse dirigée.....	176
Annexe B : Clonage	177
Clonage de <i>dsbA3</i> dans pET20b(+).....	177
Clonage des parties solubles des NmDsbA	177
Clonage des DsbB de <i>N. meningitidis</i>	178
Annexes C : Abréviations.....	179
Annexes D : Publications	181
Références Bibliographiques.....	206

Table des figures

Figure 1 : <i>Neisseria meningitidis</i>	15
Figure 2 : Distribution mondiale des différents sérogroupes du méningocoque. (2006)	16
Figure 3 : Nasopharynx de l'homme: habitat principal du méningocoque.	18
Figure 4 : Processus d'infection de <i>Nisseria meningitidis</i>	19
Figure 5 : Vue en coupe du méningocoque.	22
Figure 6 : Réaction de formation d'un pont disulfure.....	25
Figure 7 : Mécanisme d'échange de ponts disulfures entre deux protéines.	26
Figure 8 : Alignement des séquences de TRX, GRX, PDIA et DsbA d' <i>E. coli</i> sur la base de leurs structures.....	27
Figure 9 : Structure 3D de la Thiorédoxine 1 d' <i>E. coli</i>	28
Figure 10 : Voies de formation des ponts disulfures chez <i>E. coli</i>	34
Figure 11 : Modèle topologique de la fusion MalF-LacZ λ 102 chez une souche sauvage et <i>dsbA</i> ⁻ d' <i>E. coli</i>	36
Figure 12 : Voie oxydative de formation des ponts disulfures dans le périplasma d' <i>E. coli</i>	38
Figure 13 : Structure cristallographique de DsbA d' <i>E. coli</i> réduite.	39
Figure 14 : Distribution des potentiels électrostatiques à la surface de DsbA d' <i>E. coli</i>	40
Figure 15 : Superposition des sites actifs de DsbA sauvage et du mutant P151A	42
Figure 16 : Site d'interaction DsbA d' <i>E. coli</i> -peptide.....	44
Figure 17 : Instantané des trois conformères de DsbB pendant la ré-oxydation de DsbA.....	47
Figure 18 : Comparaison des complexes DsbA/peptide et DsbA/DsbB	49
Figure 19 : Schématisation des différentes voies oxydatives chez les bactéries.	51
Figure 20 : Comparaison des séquences protéiques des DsbA de <i>N. meningitidis</i> et d' <i>E. coli</i>	53
Figure 21 : Comparaison graphique des séquences des protéines Dsb.	53
Figure 22: Test de motilité sur du LB agar.....	58
Figure 23 : Représentation schématique de la réaction d'alkylation par l'AMS.....	65
Figure 24: Réaction d'Ellman avec le DTNB	65
Figure 25 : Diagramme de Jablonski des états électroniques pour la fluorescence.....	67
Figure 26 : Propriétés de fluorescence de DsbA d' <i>E. coli</i>	68
Figure 27 : Courbe de détermination de E°(EcDsbA) par équilibre avec le glutathion et par fluorimétrie	69
Figure 28 : Détection de fluorescence lors de transitions de phases thermiques chez les protéines.	71
Figure 29 : Courbe de détermination du pKa d'EcDsbA.....	72
Figure 30 : Représentation simplifiée des processus de diffusion Raman.	73
Figure 31 : Diagramme de phases du processus de cristallogenèse.	76
Figure 32: Principe de la diffusion en phase vapeur utilisant la goutte suspendue	77
Figure 33 : Flagelle d'une bactérie à Gram négatif.....	82
Figure 34 : Alignement des séquences primaires N-terminales des NmDsbA et de EcDsbA.	87
Figure 35 : Représentation schématique de la construction génétique pET20(b)+-dsba3.	87
Figure 36: Analyse de la purification de DsbA3 par extraction périplasmique.	88
Figure 37 : Schéma de la construction génétique utilisée pour la surexpression des trois NmDsbA.....	89
Figure 38: Purification des trois NmDsbA exprimées dans le cytoplasme.	90
Figure 39 : Courbe de détermination de l'activité insuline réductase des NmDsbA.....	91
Figure 40 : Etat redox des NmDsbA.	92
Figure 41 : Mécanisme d'oxydation d'une chaîne latérale d'un résidu cystéine avec du peroxyde d'hydrogène... 93	
Figure 42 : Alignement des séquences des homologues à DsbA chez <i>N. meningitidis</i> , <i>E. coli</i> et <i>V. cholerae</i>	94
Figure 43 : Cristaux de DsbA1	95
Figure 44 : Cliché de diffraction d'un cristal de DsbA1 natif.	96

Figure 45 : Diagramme de Ramachandran de la structure de DsbA1.	97
Figure 46 : Cristaux de DsbA2.....	98
Figure 47 : Protéolyse limitée effectuée sur His6-DsbA2.....	99
Figure 48 : Localisation des sites de coupure par les protéases en N-terminal de His6-DsbA2.....	100
Figure 49 : Cristaux de DsbA3 natif.....	101
Figure 50 : Cristaux de DsbA3 sélénée.....	102
Figure 51 : Diagramme de Ramachandran de la structure de DsbA3.....	103
Figure 52 : Structure cristallographique de DsbA1 et DsbA3.....	104
Figure 53 : Alignement des séquences des domaines solubles de DsbA1 et DsbA3.....	105
Figure 54 : Comparaison des structures de DsbA1 et DsbA3.....	106
Figure 55: Zoom de la région du site actif de DsbA1 et DsbA3.....	107
Figure 56 : Distribution des charges à la surface des modèles de DsbA1, DsbA3.....	108
Figure 57 : Alignement des séquences des domaines solubles de DsbA1 et DsbA2.....	109
Figure 58 : Localisation des résidus non conservés entre DsbA1 et DsbA2 et entre DsbA1 et DsbA3.....	109
Figure 59 : Superposition des structures de DsbA3-3DVX et DsbA3-2ZNM.....	110
Figure 60: Comparaison des structures de DsbA1 et EcDsbA.....	112
Figure 61 : Chromatogramme de l'équilibre redox après le mélange de DsbA3 _{ox} et γ -DsbD _{red}	116
Figure 62 : Chromatogramme de l'équilibre redox après mélange de DsbA3 _{red} avec γ -DsbD _{ox}	117
Figure 63 : Courbe de détermination du potentiel redox des NmDsbA par équilibre avec le glutathion.....	118
Figure 64 : Propriétés de fluorescence des NmDsbA.....	119
Figure 65 : Echelle des potentiels redox standards des principales oxydoréductases de thiol-disulfure.....	120
Figure 66 : Courbe de détermination du pKa de la cystéine nucléophile des NmDsbA.....	121
Figure 67 : Echelle des Tm obtenues par Thermal Shift Assay pour les NmDsbA et EcDsbA sous leurs deux états redox.....	122
Figure 68 : Alignement des séquences des DsbB de <i>N. meningitidis</i> et d' <i>E. coli</i>	123
Figure 69 : Construction génétique de la fusion DsbB-GFP.....	124
Figure 70 : Analyse de la protéine fusion NmDsbB-GFP en fin de purification.....	124
Figure 71 : Ré-oxydation des trois NmDsbA par NmDsbB ou EcDsbB.....	125
Figure 72 : Ré-oxydation de DsbA par DsbB en fonction du temps:.....	126
Figure 73 : Superposition de la région d'interaction avec DsbB, des structures de DsbA1 et DsbA3 et de EcDsbA en complexe avec EcDsbB.....	130
Figure 74 : Etat redox des NmDsbA sauvages et des mutants étudiés.....	131
Figure 75 : Courbe de détermination de l'activité insuline réductase et du potentiel redox des mutants de DsbA1 et DsbA3.....	132
Figure 76 : Ré-oxydation des mutants de DsbA1 et DsbA3 par EcDsbB et NmDsbB.....	133
Figure 77 : Comparaison des modèles du mutant T176V _{DsbA1} et de l'enzyme sauvage DsbA1.....	135
Figure 78: Zoom de la région du site actif de DsbA1 incubée avec du GSSG.....	136
Figure 79: Spectre Raman des cristaux de DsbA1.....	137
Figure 80 : Test de complémentation: suivi de la motilité.....	140
Figure 81 : Zoom de la région du site actif des DsbA de <i>N. meningitidis</i> , d' <i>E. coli</i> et de <i>V. cholerae</i>	144
Figure 82 : Alignement des séquences nucléotidiques des résidus N-ter des NmDsbA avec EcDsbA.....	159

Table des tableaux

Tableau 1: Exemples des processus impliqués dans la pathogénicité dépendante de l'activité de protéines Dsb.	35
Tableau 2 : Homologues à EcDsbA chez les bactéries à Gram-négatif.	55
Tableau 3 : Distribution des gènes homologues à <i>dsbA</i> du méningocoque parmi les différents génomes de <i>Neisseria</i> .	56
Tableau 4: Statistiques des données de diffraction des cristaux de DsbA1.	96
Tableau 5 : Statistiques du modèle final de DsbA1.	97
Tableau 6 : Statistiques des données de diffraction des cristaux de DsbA3 sélénée.	103
Tableau 7 : Statistiques du modèle final de DsbA3.	103
Tableau 8 : Pourcentage d'identité et déviations standards entre les domaines solubles des trois NmDsbA et EcDsbA.	111
Tableau 9: Paramètres biochimiques des NmDsbA, de leurs mutants et de EcDsbA.	132
Tableau 10: Statistiques des données de diffraction des cristaux du mutant T176V _{DsbA1} et du modèle atomique final correspondant.	134
Tableau 11: Constructions réalisées pour les études biochimiques et cristallographiques des NmDsbA.	158
Tableau 12: Constructions réalisées pour les études <i>in vivo</i> des NmDsbA et leurs mutants.	159

Introduction

La bactérie *Neisseria meningitidis* est le principal agent responsable de méningites bactériennes qui constituent un sérieux problème de santé publique dans le monde entier, et causent près de 1.2 millions de cas par an, dont environ 10% sont mortels.

Lors de l'infection, *N. meningitidis* doit passer à travers l'épithélium de la muqueuse du nasopharynx humain puis rejoindre la circulation sanguine. Dans ce processus complexe, la bactérie exprime des facteurs protéiques de virulence comme des toxines, des complexes protéiques membranaires (des adhésines, des pili...). Pour être fonctionnelles, ces protéines doivent être correctement repliées. Une étape clé dans le repliement des protéines est la synthèse de ponts disulfures entre des résidus cystéines, qui est catalysée par un couple d'enzymes périplasmiques, appelées DsbA et DsbB chez *Escherichia coli*, dont DsbA est l'oxydase principale. L'implication de ce système enzymatique dans la virulence a été décrite pour plusieurs bactéries pathogènes. Le génome de *N. meningitidis* contient trois gènes codant potentiellement pour des enzymes du type DsbA : DsbA1, DsbA2, DsbA3. Les activités enzymatiques et les fonctions *in vivo* de ces trois protéines ne sont décrites que partiellement. La littérature a mis en évidence clairement que DsbA1 et DsbA2 étaient reliées à la virulence de la bactérie. Le rôle de DsbA3 est par contre moins clair. L'importance de la biosynthèse des ponts disulfures par rapport à la virulence de ce pathogène nous a conduit à nous intéresser de plus près à ce système enzymatique et à nous poser la question de la nécessité d'un système aussi complexe, alors que chez *E. coli*, une seule DsbA est suffisante pour assurer les fonctions biologiques de la bactérie. Y aurait-il des différences de spécificités, de propriétés redox qui pourraient expliquer cette diversité chez *N. meningitidis* ? Est-ce un avantage pour la pathogénicité de cette bactérie ? Il est intéressant de noter que d'autres *Neisseria* ne possèdent qu'un seul ou deux gène(s) *dsbA*.

Pour répondre à ces questions, nous avons entrepris la caractérisation biochimique et structurale des trois enzymes de *N. meningitidis*.

Dans une première partie, nous ferons les rappels bibliographiques sur la biologie de *N. meningitidis* et sur les DsbA. Ceux-ci porteront sur :

- la description de la bactérie *N. meningitidis* et les infections qu'elle peut causer.
- la description du système de formation des ponts disulfures Dsb (Disulfide bond) chez les bactéries et son lien avec la pathogénicité bactérienne.
- les connaissances actuelles sur les DsbA de *N. meningitidis*.

I. *Neisseria meningitidis* : Agent de l'infection invasive à méningocoque

*Le paragraphe qui suit porte sur la description générale de la bactérie *Neisseria meningitidis* et des maladies qu'elle peut causer. Cette partie a été largement inspirée des revues "Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*" (Stephens et al. 2007) et "Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*" (Stephens 2009).

I.1. Les bactéries du genre *Neisseria*

Les *Neisseria* forment un genre de bactéries à Gram-négatif appartenant à la famille des Neisseriaceae, dans le groupe des Proteobacteria. Les *Neisseria* sont des coques le plus souvent par paires (c'est-à-dire des diplocoques) ressemblant à des grains de café. Ce sont des bactéries immobiles, aérobies strictes, chimiohétérotrophes et oxydative positive. Les différentes espèces peuvent être différenciables par des tests de métabolisation des sucres comme le glucose, le maltose, le lactose et le sucrose.

Les *Neisseria* vivent sur la muqueuse des mammifères et la majorité des espèces ne sont pas pathogènes. Le genre comprend cependant deux pathogènes importants :

- *Neisseria gonorrhoeae* ou gonocoque responsable d'une maladie sexuellement transmissible : la gonorrhée ou blennorragie.
- *Neisseria meningitidis* ou méningocoque responsable de rhinopharyngite contagieuse et de méningite.

Le genre *Neisseria* doit son nom au bactériologiste allemand Albert Neisser, qui fit la découverte de son premier représentant pathogène. Pour l'anecdote, Neisser participa également à la découverte du bacille de Hansen, l'agent de la lèpre.

I.2. *Neisseria meningitidis*

A) Description générale

Neisseria meningitidis, également connue sous le nom de meningococcus ou méningocoque, est une bactérie du genre des *Neisseria*. Ce n'est pas une simple bactérie commensale de l'appareil respiratoire humain (nasopharynx) mais également un important pathogène humain causant dans le monde entier des épidémies de méningites. Elle a été isolée

en 1887 par le médecin autrichien Anton Weichselbaum dans le liquide céphalo-rachidien d'un sujet atteint de méningite purulente.

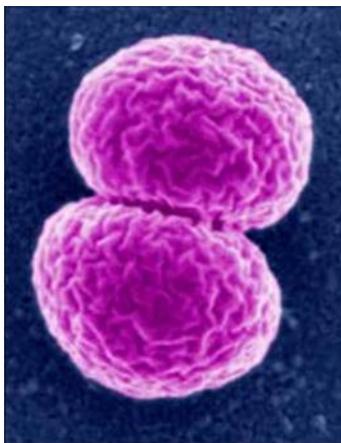


Figure 1 : *Neisseria meningitidis*.

C'est un diplocoque aérobie à Gram-négatif (Figure 1). Sa structure est typique de ce groupe de bactéries, avec une fine couche de peptidoglycane localisée entre les membranes cytoplasmiques interne et externe. La membrane externe contient des lipo-oligosaccharides (LOS) constitués d'un lipide A et d'un corps oligosaccharidique mais qui ne possède pas l'antigène polysaccharidique O retrouvé chez la plupart des bactéries à Gram-négatif.

La bactérie est entourée d'une capsule polysaccharidique qui est un facteur majeur de virulence. Les méningocoques sont classés en sérogroupes, sérotypes et séro sous-types sur la base de différences antigéniques portant respectivement sur leurs polysaccharides capsulaires et sur leurs protéines de la membrane externe. Ainsi, *N. meningitidis* a pu être divisée en 13 sérogroupes A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y et Z. Les souches pathogènes sont encapsulées et les sérogroupes A, B, C W135 et Y, causent plus de 90 % des infections invasives dans le monde entier.

Environ 50 % des souches isolées de porteurs sains n'ont pas de capsules et ne peuvent être classées en sérogroupes. Certains méningocoques dépourvus de capsules ont tout de même les gènes associés à l'expression de la capsule et peuvent ou non la synthétiser à une fréquence élevée. D'autres méningocoques n'ont pas d'opérons capsulaires et donc pas de capsule. De plus des recombinaisons génétiques entre les méningocoques sont à l'origine de l'émergence de nouvelles souches.

B) Epidémiologie

N. meningitidis est l'une des principales causes de méningite bactérienne et de septicémie chez les enfants, en particulier entre 6 et 24 mois. Son taux d'incidence entre les épidémies dans les pays industrialisés varie de 1 à 3 pour 100 000 habitants avec un taux de mortalité de 10 %. Dans les pays en voie de développement, l'incidence dans les années non épidémiques est de 30 pour 100 000 habitants, c'est-à-dire 10 fois plus élevée que dans les pays industrialisés. Pendant les épidémies, le taux d'attaque peut atteindre 1 % de la population avec un taux de mortalité entre 10 et 15% (van Deuren et al. 2000; WHO 2005). 10 à 20% des survivants développent des séquelles permanentes comme l'épilepsie, un retard mental ou un déficit neural sensoriel.

Le sérotype A cause des épidémies à large échelle dans les pays en voie de développement mais reste rare en Europe et en Amérique du Nord (Figure 2). Il est la cause majeure des méningites épidémiques et endémiques dans l'Afrique sub-saharienne. Les trois quarts des cas touchent les jeunes de moins de 15 ans. Les épidémies à sérotype A surviennent tous les 5 à 12 ans et durent 2 à 3 ans avec des pics en mars et avril, c'est-à-dire à la fin de la saison sèche, puis disparaissent pendant la saison des pluies.

Le sérotype B est la cause la plus importante de méningite endémique dans les pays industrialisés et est responsable de 30 à 40% des cas en Amérique du Nord et 30 à 80% des cas en Europe. Le reste est causé par le sérotype C en Europe et C et Y en Amérique du Nord (Figure 2) (van Deuren et al. 2000; WHO 2005).

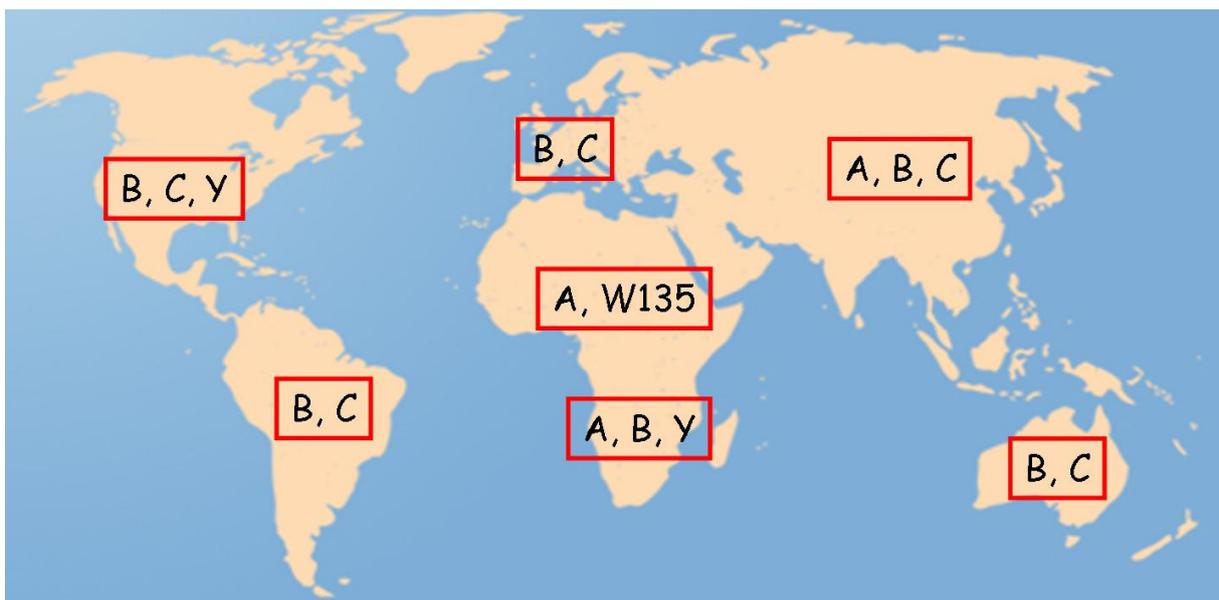


Figure 2 : Distribution mondiale des différents sérogroupes du méningocoque. (2006)

La méningococcie frappe le plus lourdement l'Afrique subsaharienne, connue pour être la «ceinture de la méningite», une zone s'étendant du Sénégal à l'Ouest jusqu'à l'Ethiopie à l'Est, dont la population totale est estimée à 300 millions d'habitants. Cette zone d'hyperendémie est caractérisée par un climat et des habitudes sociales particuliers : au cours de la saison sèche, entre décembre et juin, à cause des vents chargés de poussières et des infections des voies respiratoires supérieures contractées à cause des nuits froides, l'immunité locale du pharynx est diminuée, ce qui augmente le risque de méningite. Par ailleurs, la transmission de *N. meningitidis* est favorisée par un habitat familial surpeuplé et les grands déplacements de population engendrés par les pèlerinages et les marchés traditionnels régionaux. Cette conjonction de facteurs explique les grandes épidémies qui se produisent au cours de cette saison dans la ceinture de la méningite. *N. meningitidis* A, C et W135 constituent aujourd'hui les principaux sérogroupes impliqués dans l'activité de la méningite à méningocoques en Afrique.

Les premiers stades de l'infection à méningocoque ressemblent aux infections virales comme la grippe mais son évolution est ensuite très rapide. Par conséquent, il est très difficile d'identifier et de traiter la maladie dans ses débuts. La progression rapide de l'infection de la bactériémie à la méningite peut survenir dans les premières heures qui suivent les premiers symptômes. En raison de tous ces paramètres, la prévention par la vaccination reste la meilleure solution pour contrôler cette infection dans une communauté.

C) L'infection invasive à méningocoque

N. meningitidis est une bactérie commensale facultative de la muqueuse rhinopharyngée (Figure 3). Le rhinopharynx constitue la porte d'entrée et l'habitat principal de *N. meningitidis*. Porteurs sains et malades sont les réservoirs du germe. Plus de 10% de la population seraient colonisés au niveau du rhinopharynx. La transmission se fait par voie aérienne à des distances courtes en raison de la fragilité du germe. La promiscuité et le sous-développement favorisent donc la transmission.

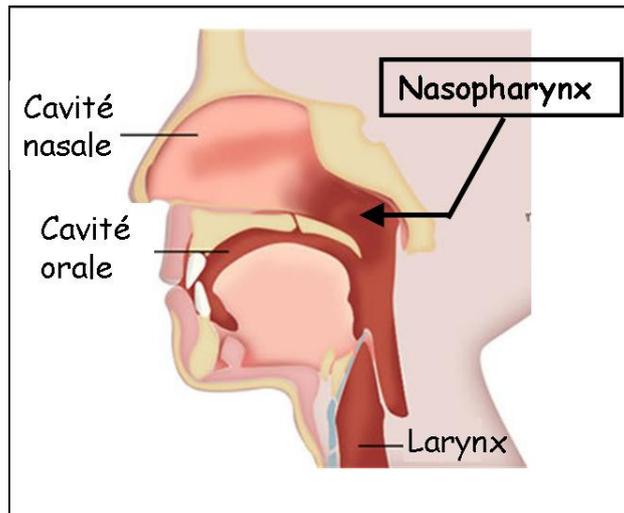


Figure 3 : Nasopharynx de l'homme: habitat principal du méningocoque.

Dans un petit nombre de cas, les bactéries traversent le rhinopharynx pour envahir la circulation sanguine (Figure 4). Dans cette phase de dissémination, une septicémie, avec ou sans choc, se développe. Une fois dans le sang, le méningocoque peut se multiplier très rapidement jusqu'à des concentrations très élevées. Le méningocoque peut également coloniser l'endothélium des vaisseaux cérébraux. Ensuite, les bactéries traversent la barrière hémato-méningée et ensemencent les méninges avec les manifestations cliniques de la méningite. L'infection invasive à méningocoque survient de 1 à 14 jours après le premier contact avec la bactérie. La durée du portage peut varier de quelques jours à quelques mois. Certains facteurs environnementaux qui affectent l'intégrité des muqueuses du nasopharynx comme le tabac, l'exposition à une faible humidité, la poussière et les co-infections augmentent l'incidence des infections invasives à méningocoque.

N. meningitidis peut pénétrer entre les cellules de l'épithélium ou de l'endothélium par transcytose ou alors être transportée à travers les barrières épithéliales ou endothéliales à l'intérieur de cellules. Les principales molécules du méningocoque qui influencent l'apparition d'une infection sont: le polysaccharide capsulaire, des facteurs de surface comme les pili, des porines de la membrane externes (comme PorA, PorB, Opa, Opc), et le lipooligosaccharide (LOS). La résistance à la lyse induite par le complément et la phagocytose est déterminée par l'expression de la capsule et du LOS. Les endotoxines méningococciques libérées des vésicules de la membrane externe jouent également un rôle majeur dans les événements inflammatoires de la méningococcémie et de la méningite méningococcale.

Les anticorps, le complément et les phagocytes constituent les mécanismes principaux de défenses de l'hôte face aux infections à méningocoque. L'état de portage du méningocoque constitue un processus d'immunisation naturelle.

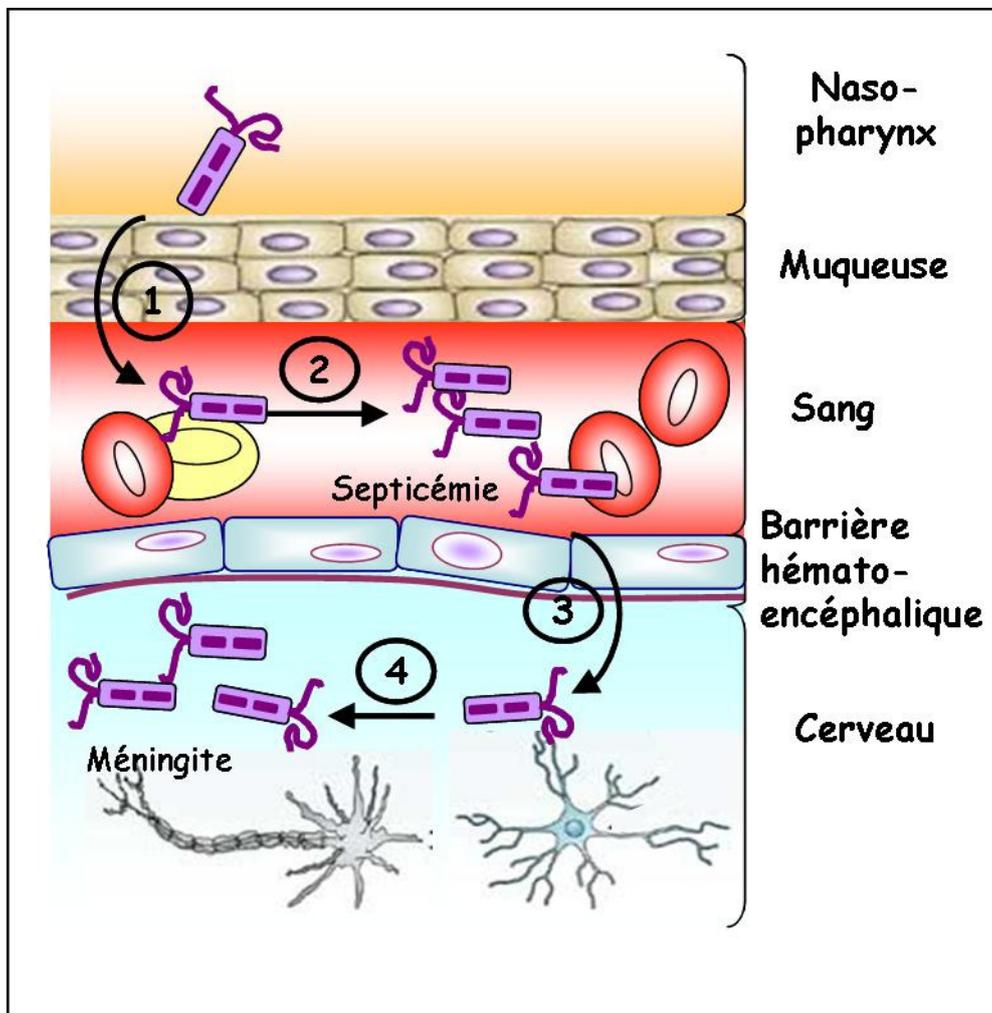


Figure 4 : Processus d'infection de *Nisseria meningitidis*.

Les connaissances portant sur les co-facteurs favorisant la propagation et la gravité de l'infection à méningocoque sont assez limitées. Un faible taux d'humidité endommagerait les muqueuses nasales permettant au méningocoque de passer plus facilement à travers les barrières de la muqueuse ou d'être transmis lors de quintes de toux. Dans les pays aux climats tempérés, les infections à méningocoque prédominent en hiver quand les taux d'humidité sont bas. La présence d'autres infections virales telles la grippe ou des infections de l'appareil respiratoire prédisposent également aux infections à méningocoque, probablement en raison d'une altération des surfaces et donc de l'immunité des muqueuses.

D) Pathogénèse méningococcale et immunité

1. Caractéristiques de la méningite à méningocoque :

Les symptômes les plus fréquents sont les suivants: raideur de la nuque, fièvre élevée, photophobie, état confusionnel, céphalées et vomissements. Même lorsque l'on diagnostique la maladie très tôt et qu'un traitement approprié est institué, 5 à 10 % des malades décèdent habituellement dans les 24 à 48 heures suivant l'apparition des symptômes. La méningite bactérienne peut entraîner des lésions cérébrales, une surdité partielle ou des troubles de l'apprentissage chez 10 à 20 % des survivants. La septicémie méningococcique est une forme de méningococcie plus rare mais plus grave, puisque souvent mortelle. Elle se caractérise par un rash hémorragique et un collapsus circulatoire rapide.

2. Vaccination :

Il existe actuellement deux types de vaccins: les vaccins polysaccharidiques et les vaccins polysaccharidiques conjugués qui sont efficaces contre les quatre souches: A, C, Y, et W135.

Les vaccins polysaccharidiques contre les méningocoques ont été introduits dans les années 1970 et 1980. L'immunité apportée par ces vaccins est limitée à une période de 3 à 5 ans et l'hypersensibilité immunologique n'est induite que par des doses répétées de polysaccharides des groupes C et parfois A. Les vaccins polysaccharidiques n'induisent pas de mémoire immunologique et ont peu ou pas d'effet sur le portage au niveau du nasopharynx.

Le deuxième type de vaccin, le vaccin polysaccharidique conjugué, permet d'améliorer les réponses vaccinales. La capsule polysaccharidique a été conjuguée à une protéine porteuse devenant ainsi un antigène T-dépendant capable d'induire une réponse immune dès l'enfance et de produire une immunité mémoire. Il existe des vaccins polysaccharidiques conjugués pour les sérogroupes A, C, Y et W-135.

En ce qui concerne le séro groupe B, aucun vaccin n'existe actuellement car, contrairement aux autres sérogroupes, l'utilisation d'un polysaccharide de capsule comme antigène n'est pas possible. Le polysaccharide de ce séro groupe a en effet une structure identique à celle d'un carbohydrate [l'acide (2 → 8) N-acétyl neuraminique, ou acide polysialique] exprimé naturellement chez l'Homme. Il est donc peu immunogène, et susceptible de provoquer le développement d'auto-anticorps. Par conséquent, les recherches

se sont focalisées sur des antigènes non capsulaires comme les porines et les vésicules de la membrane externe et les lipo-oligosaccharides.

E) Biologie et microbiologie

La virulence de *N. meningitidis* est directement reliée à la fois à l'expression de sa capsule, et d'autres structures de surface, et aux génotypes sous-jacents.

1. Génétique :

Les génomes des souches de *N. meningitidis* MC58 (séro groupe B), Z2491 (séro groupe A), FAM18 (séro groupe C) et de la souche de *N. gonorrhoeae* FA1090 (Genbank AE004959) ont été séquencés. Le génome de *N. meningitidis* est composé de plus de 2 mégabases contenant environ 2000 gènes.

Ces quatre génomes diffèrent d'environ 10 % entre eux. D'importants îlots génétiques (comme IHT-A1 [8.5 kb], IHT-A2 [5.4 kb], IHT-B [17.1 kb], IHT-C [32.6 kb]) présents dans ces différentes souches rassemblent les gènes codant pour des gènes homologues de bactériophages et de nombreuses enzymes de restriction associées à la structure globale du génome. La plupart de ces îlots génétiques coderaient pour d'hypothétiques protéines de surface et des facteurs de virulence. Le potentiel de changement génétique et la variabilité structurelle de la surface du méningocoque sont assez surprenants.

2. Les facteurs de virulences :

La majorité des molécules présentes à la membrane externe du méningocoque (Figure 5) (polysaccharide de surface, protéines de la membrane externe, lipo-oligosaccharide) ou sécrétées sont importantes pour l'adhésion, l'invasion et la survie de la bactérie chez l'hôte Humain. Ces molécules de surface sont également associées à d'autres mécanismes de virulence, tels qu'une vitesse de croissance augmentée, la libération de vésicules de la membrane externe, des mimétismes moléculaires, et la possibilité de libérer des toxines.

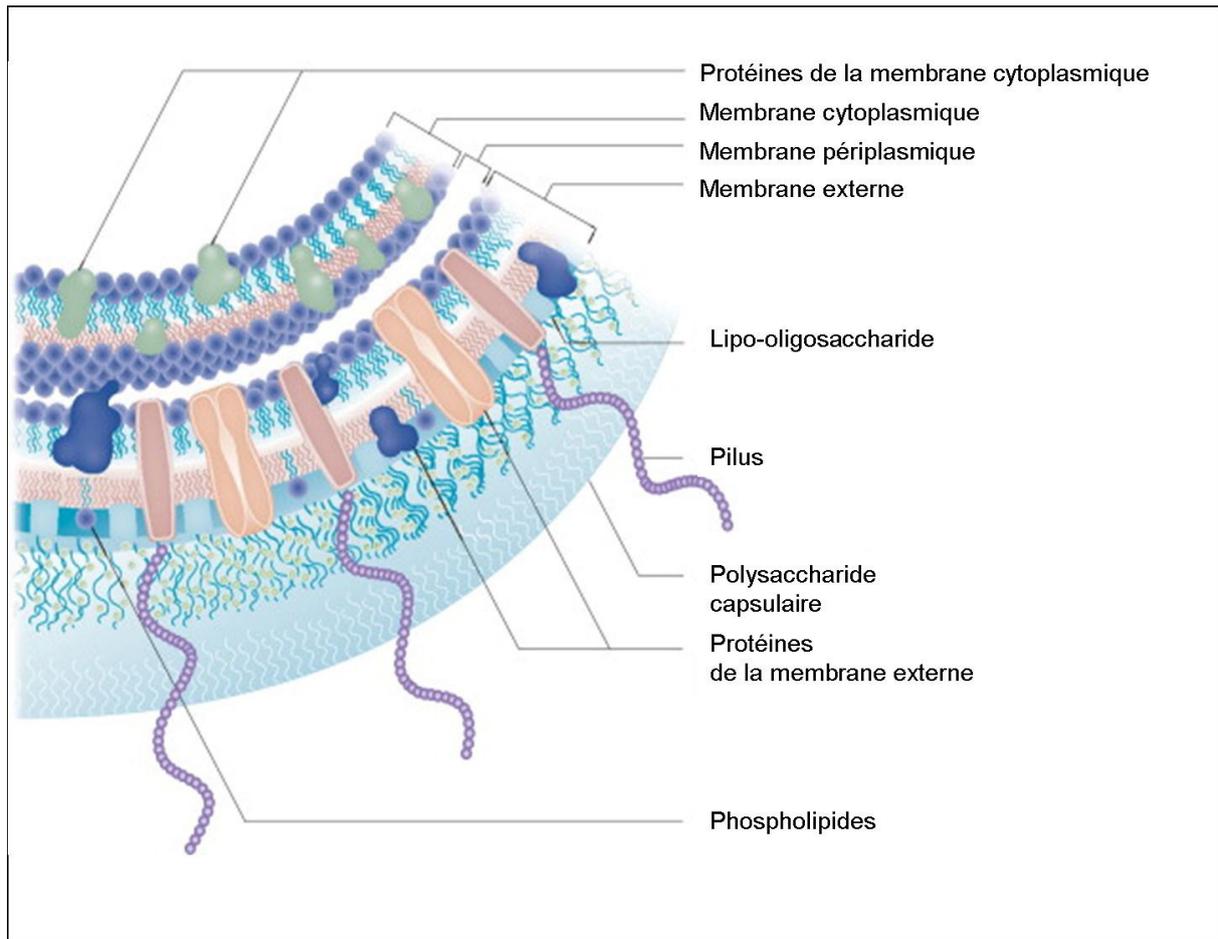


Figure 5 : Vue en coupe du méningocoque.
 (Stephens et al. 2007)

Le potentiel épidémique de *N. meningitidis* est directement relié à sa capacité à exprimer et à modifier sa capsule. La capsule de *N. meningitidis* joue un rôle majeur pour sa transmission et sa colonisation, et protège la bactérie de la dessiccation et de l'action phagocytaire et bactéricide des facteurs du complément sérique. Les anticorps dirigés vers la capsule assurent la protection contre les infections à méningocoque et les capsules constituent les bases dans le développement des vaccins polysaccharidiques et polysaccharidiques conjugués contre les méningocoques (à l'exception du sérotype B).

Environ un tiers des isolats de méningocoques retrouvés dans le nasopharynx de l'Homme n'expriment pas de polysaccharides capsulaires. Ces souches ne peuvent pas être classées dans l'un des 13 sérotypes. Ceci leur conférerait un avantage de sélection (Stephens et al. 1993; Jones et al. 1998) car l'absence de capsule démasquerait certaines structures de surface (par exemple, les porines Por, Opa, et Opc et le lipo-oligosaccharide) et faciliterait l'adhérence puis l'entrée du méningocoque dans l'épithélium (Stephens et al. 1993; Hammerschmidt et al. 1996).

Les méningocoques ont également développé au cours de leur évolution la capacité de changer de type de capsule par transformation et échange horizontal d'ADN *in vivo*. Ceci leur permettrait de se protéger vis à vis de l'immunité induite par un vaccin ou acquise naturellement (Swartley et al. 1997). En effet, aux USA, en Espagne, en République Tchèque, en Allemagne, en France et au Canada, certaines éclosions de méningocoque ont été causées par des souches des sérogroupes B et C ayant des sérotypes et génotypes identiques.

Les protéines de la membrane externe contribuent également à la virulence du méningocoque (Figure 5) (Tzeng et al. 2000). Les pili qui forment des appendices filamenteux protéiques de la membrane externe pouvant atteindre plusieurs centaines de nm facilitent l'adhésion aux épithéliums et la mobilité. Ils sont donc importants pour le passage de la bactérie à travers la couche de mucus et ses déplacements sur les surfaces épithéliales (Merz et al. 2000). Les porines de la membrane externe sont impliquées dans les interactions avec les cellules hôtes et sont des cibles pour les anticorps bactéricides (Tzeng et al. 2000). Le méningocoque exprime également des protéines variables comme Opa et Opc, importantes dans l'adhésion.

Les endotoxines comme les lipo-oligosaccharides sont des composés majoritaires de la membrane externe et sont essentielles dans la voie de signalisation inflammatoire (Zughaier et al. 2004), l'adhésion, la colonisation et dans la méningococcémie septique. La structure de la chaîne α du lipo-oligosaccharide du méningocoque est identique aux antigènes humains I et i, et constitue un exemple de mimétisme moléculaire développé par les bactéries pour échapper à l'immunité (Mandrell et al. 1988).

I.3. Conclusion sur *N. meningitidis*

Ainsi, *N. meningitidis* est un organisme pathogène opportuniste qui possède un large arsenal de facteurs de virulence et est responsable de la majorité des méningites bactériennes dans le monde entier. Les traitements antibiotiques sont de moins en moins efficaces car la bactérie développe de multiples résistances. Ajoutés à cela, les vaccins méningococaux ne sont pas toujours suffisants pour éradiquer les épidémies et aucun vaccin n'existe pour le méningocoque du séro groupe B. Les recherches de nouvelles stratégies vaccinales pour contrôler ce problème de santé publique sont donc toujours d'actualité. Mieux comprendre et caractériser les mécanismes moléculaires du processus d'infection de la bactérie pourrait y contribuer.

II. Le système de formation des ponts disulfures

Comme nous venons de le voir, les protéines de la membrane externe ainsi que les protéines sécrétées constituent d'importants facteurs de virulence chez *N. meningitidis*. Ces protéines sont souvent riches en ponts disulfures, indispensables à la stabilité de leur conformation native. Par exemple, le pilus de type IV permettant l'adhésion de *N. meningitidis* aux cellules de l'hôte est composé de multiples copies de piline, protéine qui possède un pont disulfure intramoléculaire essentiel à son activité.

Chez les bactéries à Gram-négatif, dont fait partie *N. meningitidis*, ces ponts disulfures sont introduits par les oxydoréductases de thiol-disulfure de la famille des Dsb avec l'enzyme DsbA comme oxydase principale. Chez de nombreux pathogènes comme *Enteropathogenic E. coli* et *Vibrio cholerae*, cette enzyme a été décrite comme étant reliée à la virulence. Chez *N. meningitidis*, cette voie enzymatique a la particularité de posséder trois homologues à DsbA : DsbA1, DsbA2 et DsbA3. La description des systèmes de formation des ponts disulfures chez les bactéries à Gram-négatif est donc importante pour étudier ce système chez *N. meningitidis* et sera développée dans cette partie.

II.1. Généralités

A) Ponts disulfures et protéines

1. Rôle du pont disulfure au sein des protéines :

Les ponts disulfures sont indispensables pour le repliement correct et la stabilité des structures tertiaires des protéines. La formation d'un pont disulfure entre des résidus cystéines stabilise la structure protéique, essentiellement en diminuant l'entropie conformationnelle de l'état dénaturé. L'effet stabilisateur peut aller jusqu'à 4 kcal/mol par pont disulfure formé. Il confère également une plus grande résistance face aux protéases.

2. Quelles sont les protéines contenant des ponts disulfures ?

Les protéines qui possèdent des ponts disulfures peuvent être divisées en deux groupes :

- les protéines dont la liaison cystéine-cystéine est indispensable à la stabilité de leur conformation native.
- les protéines qui possèdent un couple de cystéines alternant entre une forme oxydée (présence du pont) et une forme réduite. Le cycle d'oxydation-réduction du pont

disulfure ainsi généré sera soit à la base de leur activité protéique en tant qu'enzyme (exemple de la ribonucléotide réductase (Jordan et al. 1998)), soit impliqué dans l'activation-inactivation de la protéine en question (exemple du facteur de transcription OxyR (Zheng et al. 1998)).

3. Localisation des protéines contenant des ponts disulfures :

Chez les procaryotes, les protéines qui possèdent un pont disulfure se trouvent dans les compartiments extra-cytoplasmiques ou sont sécrétées dans le milieu, alors que chez les eucaryotes, elles sont présentes dans les compartiments cellulaires, tels le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique ou sont sécrétées dans le milieu. Une des hypothèses quant à la localisation non cytoplasmique de ces protéines est le caractère réducteur du cytoplasme par opposition au caractère oxydant de certains autres compartiments et du milieu extérieur. L'absence de protéines avec des ponts disulfures dans le cytoplasme ne peut être expliquée uniquement par le caractère généralement réducteur de ce compartiment. En effet, il est possible d'observer la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme d'*E. coli*, sans modifier la nature réductrice de ce compartiment, mais en altérant par mutagénèse certaines voies de transfert d'électrons (Stewart et al. 1998). Ces altérations provoquent une accumulation de Thiorédoxine oxydée, qui joue alors un rôle de catalyseur dans la formation de ponts disulfures.

4. La formation d'un pont disulfure : mécanisme spontané dans la cellule ?

La formation d'un pont disulfure entre deux groupements sulfhydriles (-SH) est une réaction d'échange de deux électrons entre un oxydant et un accepteur d'électron (Figure 6).

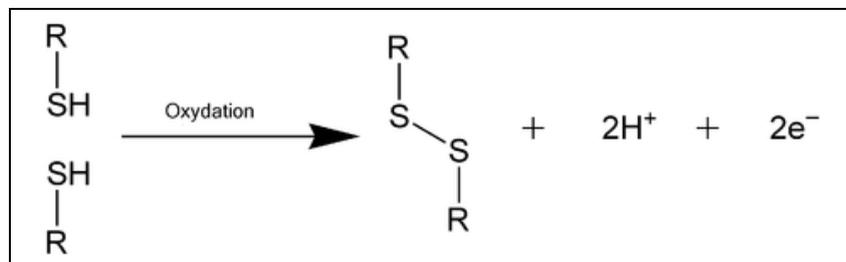


Figure 6 : Réaction de formation d'un pont disulfure.

R représente les autres atomes de l'acide aminé.

Les ponts disulfures peuvent se former spontanément en présence d'oxygène. Cependant, leur synthèse *in vitro* est un processus extrêmement lent ($t_{1/2} > 15$ min) et les ponts

ne sont pas forcément corrects (Freedman et al. 1989; Freedman 1991). A l'opposé, la formation des ponts disulfures dans la cellule est un processus extrêmement rapide et précis. Par exemple, les 17 ponts disulfures de l'albumine de rat se forment en 30 secondes *in vivo* alors qu'*in vitro* ce processus prend plusieurs heures (Peters et al. 1982). Autre exemple, le repliement de la Rnase A, qui possède deux ponts disulfures, prend plusieurs heures *in vitro* et moins de 2 minutes *in vivo*. Ces différences entre les vitesses de réaction observées *in vivo* et *in vitro* ont permis de découvrir le premier catalyseur de la formation des ponts disulfures, la Protein Disulfide Isomerase (PDI) (Freedman et al. 1989; Freedman 1991). PDI est une protéine eucaryote présente dans le réticulum endoplasmique. Elle fait partie du réseau complexe des protéines impliquées dans la formation des ponts disulfures.

5. Mécanisme de la formation des ponts disulfures *in vivo* (eucaryotes et procaryotes) :

C'est une réaction d'échange thiol-disulfure entre des thiols libres (-SH) et une molécule avec un pont disulfure (S-S) déjà formé. Cet échange peut avoir lieu entre une protéine et un substrat contenant des groupements sulfhydriles, telles de petites molécules contenant des thiols comme le glutathion ou des protéines contenant des ponts disulfures (Figure 7). Une réaction thiol-disulfure peut alors être vue comme le transfert de deux électrons entre le groupement SH d'une molécule A vers le pont disulfure d'une molécule B ou encore comme le transfert d'un pont disulfure de B vers A. La vitesse de la réaction va dépendre de l'accessibilité des sites actifs, de la différence de potentiels redox entre les partenaires redox et de la probabilité des atomes de soufre à pouvoir se placer à la distance nécessaire pour que l'échange thiol-disulfure puisse avoir lieu. Cette réaction a lieu dans le réticulum endoplasmique chez les cellules eucaryotes et dans l'espace périplasmique chez les cellules procaryotes.

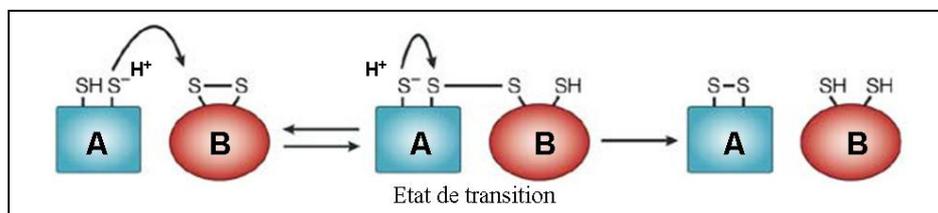


Figure 7 : Mécanisme d'échange de ponts disulfures entre deux protéines.

Le mécanisme de l'échange [thiol / disulfure] entre deux protéines A et B se fait en deux étapes. 1/ Le pont disulfure de la protéine B subit une attaque nucléophile par l'anion thiolate de la première cystéine de la protéine A. 2/ L'intermédiaire disulfure mixte résultant subit à son tour une attaque intramoléculaire par l'anion thiolate issu de la deuxième cystéine du site actif de la protéine A. Ceci conduit à la formation du pont disulfure sur la protéine A.

B) Les enzymes impliquées dans les échanges thiol-disulfure

1. La super famille des thiorédoxines :

La super famille des thiorédoxines est composée de thioltransférases dont les mieux caractérisées sont les Thiorédoxine TRX1 et TRX2 (Miranda-Vizueté et al. 1997; Stewart et al. 1998) et les Glutarédoxine GRX1, GRX2, GRX3 (Aslund et al. 1994). Cette famille comprend également des protéines eucaryotes qui appartiennent à la famille des PDI, comme Erp57, PDIP etc, et des protéines bactériennes, comme les enzymes DsbA, DsbC, DsbD, DsbG et DsbE d'*E. coli*, impliquées dans la synthèse de ponts disulfures des protéines extracytoplasmiques. Il y a d'autres membres au sein de cette super famille mais nous nous intéresserons seulement aux réductases, isomérases et oxydases de ponts disulfures, à savoir les TRX, GRX, DsbA et PDI.

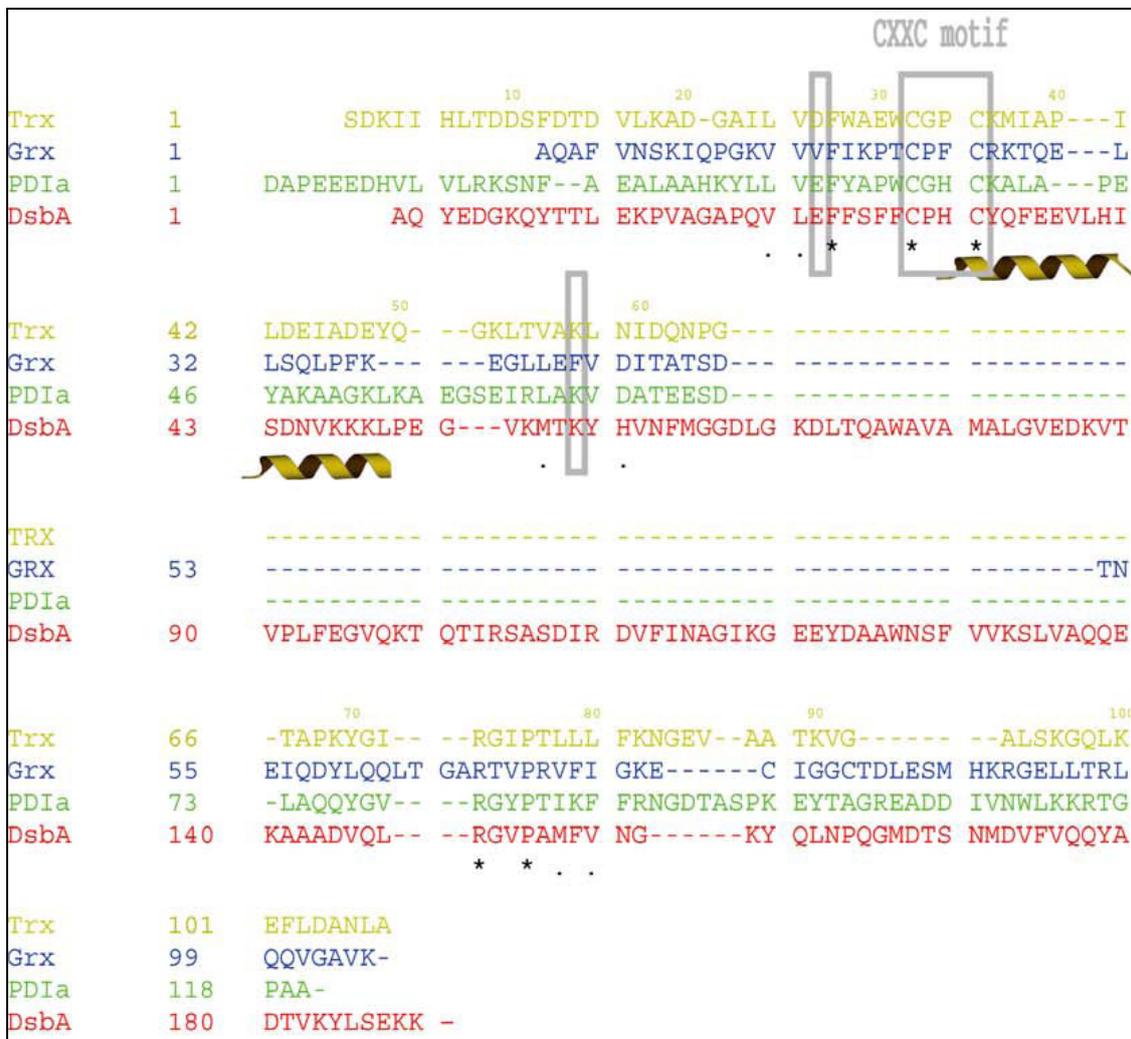


Figure 8 : Alignement des séquences de TRX, GRX, PDIA et DsbA d'*E. coli* sur la base de leurs structures. Le motif CXXC et les résidus chargés conservés à proximité du site actif sont encadrés ; l'hélice $\alpha 1$ de la TRX est également représentée.

Bien que ces enzymes n'aient pas une grande identité de séquence (Figure 8), leurs structures 3D sont assez proches. Elles possèdent toutes un ou plusieurs domaines de type TRX, dont le repliement est similaire à celui de TRX1 d'*E. coli* (Figure 9A), une réductase de ponts disulfures qui maintient un environnement réducteur dans le cytoplasme. Ce domaine est composé de 4 hélices α caractéristiques et d'un feuillet β central (β - α - β - α - β - α - β - α).

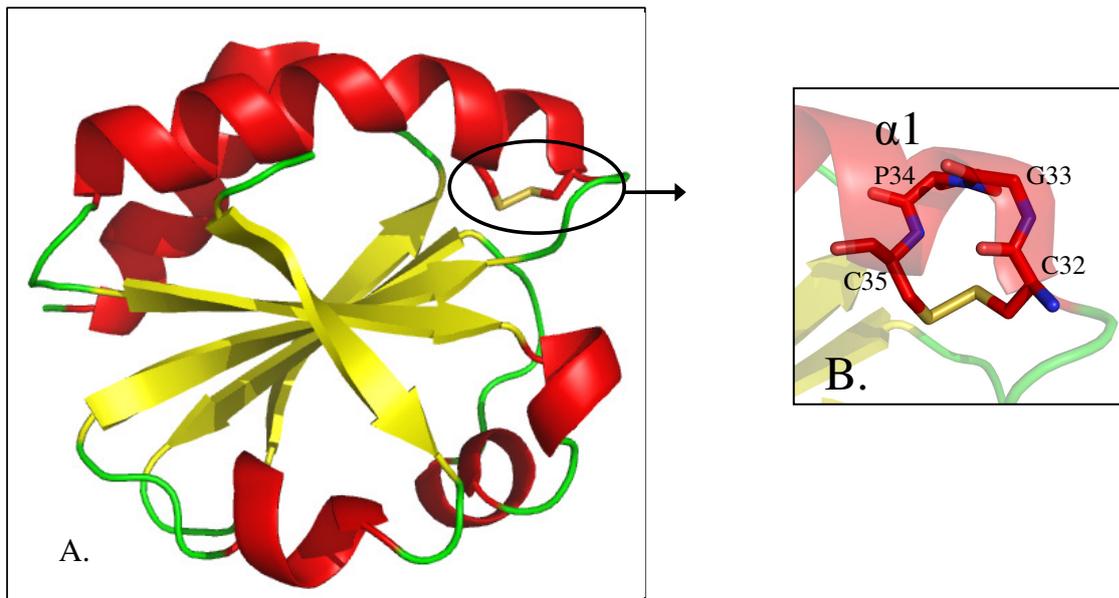


Figure 9 : Structure 3D de la Thiorédoxine 1 d'*E. coli* (code PDB 2TRX).

A Les structures secondaires sont schématisées. **B.** Zoom de la région du site actif: les résidus du térapeptide CXXC sont représentés en bâtons. C32 est la cystéine nucléophile.

Les Thiorédoxine et Glutarédoxine sont constituées d'un seul domaine TRX d'environ 100 résidus. Toutes les enzymes de cette super famille sont des monomères à l'exception de DsbC qui est un dimère. DsbA et PDI sont des protéines de 189 et 510 résidus respectivement, qui ont au moins deux domaines. DsbA a deux domaines, l'un possède un repliement de type TRX et le second composé uniquement d'hélices α est inséré au sein du domaine TRX. La structure de PDI est beaucoup plus complexe puisqu'elle est composée de 4 domaines de type TRX.

La région la plus conservée par ces enzymes concerne la région du site actif contenant le motif CXXC. Ce motif est situé au sein du domaine TRX, en N-terminal de la première hélice ($\alpha 1$) (Figure 8 et Figure 9B). La cystéine située la plus en N-terminal est déprotonée à pH physiologique et est exposée au solvant: elle correspond à la cystéine nucléophile (CysN). L'autre cystéine est plus enfouie et généralement protonée. La nature des acides aminés situés entre les deux cystéines varie largement au sein de cette super famille d'enzymes (Figure 8).

Malgré des similarités structurales, ces enzymes ont des propriétés biochimiques différentes. Parmi les enzymes cytoplasmiques, TRX1 qui possède la séquence CGPC, et GRX1 la séquence CPYC ont des potentiels redox de -270 mV (Krause et al. 1991) et -233 mV (Aslund et al. 1997), respectivement. Par comparaison, dans le périplasma d'*E. coli*, DsbA a un site actif CPHC et un potentiel redox de -120 mV (Xia et al. 1992; Wunderlich et al. 1993a; Huber-Wunderlich et al. 1998). Les valeurs de leurs pKa sont également variables : il est de 7.2 pour TRX1 ou TRX2 (Ren et al. 2009), de 3.8 pour les trois GRX (Yang et al. 1991), de 4.5 pour PDI (Kortemme et al. 1995) et 3.5 pour DsbA (Grauschopf et al. 1995).

Les TRX sont des protéines omniprésentes qui participent à la réduction d'enzymes cytoplasmiques (Holmgren 1988; Holmgren 1989; Prinz et al. 1997; Kern et al. 2003). Les GRX sont des réductases, mais seule GRX1 peut réduire les ponts disulfures à la fois *in vivo* et *in vitro* (Aslund et al. 1997; Stewart et al. 1998). Les activités de GRX2 et 3 sont limitées à la réduction de ponts disulfures mixtes avec le glutathion (Aslund et al. 1994).

La PDI est impliquée dans la maturation de protéines secrétées en tant que chaperone et catalyseur de la formation et du réarrangement de ponts disulfures dans la lumière du réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes (Shorosh et al. 1993; Puig et al. 1994).

DsbA catalyse la formation des ponts disulfures sur les protéines en cours de maturation (Wunderlich et al. 1993a; Zapun et al. 1993; Zapun et al. 1994). Elle est localisée dans le périplasma d'*E. coli*. L'oxydation des cystéines protéiques par DsbA est très rapide et conduit le plus souvent à la formation de ponts disulfures non natifs. Le réarrangement de ces ponts est alors catalysé par l'enzyme périplasmique dimérique DsbC qui a également une activité de chaperone (Zapun et al. 1993; Rietsch et al. 1996; Rybin et al. 1996; Sone et al. 1997; Darby et al. 1998; Chen et al. 1999).

2. Facteurs déterminant la fonction des enzymes de la famille des TRX :

Les membres de la famille des TRX ont des fonctions d'oxydant ou de réducteur dans la cellule. Dans les conditions physiologiques, ces protéines ont un seul de ces deux rôles.

Quels sont donc les facteurs qui déterminent leur activité enzymatique ?

- **La séquence du motif CXXC :**

La fonction physiologique des oxydoréductases de thiol-disulfure est habituellement corrélée aux propriétés d'oxydoréduction ou redox de son motif catalytique CXXC. Pour les enzymes de la super famille des TRX, un déterminant majeur de leur potentiel redox est la nature des acides aminés situés entre les deux cystéines actives (Huber-Wunderlich et al.

1998; Mossner et al. 1999; Inaba et al. 2002). Le remplacement des deux acides aminés centraux du motif CXXC permet de déplacer son potentiel redox vers un potentiel plus oxydant ou plus réducteur. Par exemple, le remplacement du dipeptide G-P du site actif de la TRX par la séquence P-H présente dans le site actif de DsbA, ou par la séquence P-T présente dans le site actif de GRX entraîne une augmentation du potentiel redox de la TRX de 66 mV et 75 mV, respectivement (Mossner et al. 1999). Ces mutants ne peuvent plus donner d'électrons à la réductase du 3'-phosphoadenylylsulfate (PAPS) et à la réductase de méthionine sulfoxide (MsrA) qui utilisent la TRX comme source d'électrons pour restaurer leur forme active (Moskovitz et al. 1995; Stewart et al. 1998; Lillig et al. 1999; Lowther et al. 2000). De plus, lorsque la TRX1 est exportée dans le périplasme d'une souche d'*E. coli dsbA* elle ne peut rétablir le phénotype sauvage alors que les mutants TRX qui possèdent la séquence CPHC de DsbA peuvent totalement compléter la déficience en DsbA de cette souche (Debarbieux et al. 1998; Jonda et al. 1999; Debarbieux et al. 2000). Ces deux mutants sont donc des oxydants dans le périplasme d'*E. coli*.

Des études similaires ont été menées sur la TRX1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Lorsque cette enzyme sauvage est exportée dans le réticulum endoplasmique, elle ne peut pas compléter un mutant de délétion du gène de la PDI chez la levure. Cependant, un mutant TRX avec un potentiel redox se rapprochant de celui de la PDI peut compléter la souche de levure dont le gène de la PDI a été enlevé (Chivers et al. 1996).

Une autre caractéristique de DsbA qui influence les propriétés redox de la séquence CXXC est sa localisation à l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 1$. A cette position, l'anion thiolate de C30 est stabilisé par l'effet de dipôle de l'hélice $\alpha 1$.

Ces expériences sont-elles suffisantes pour conclure que le potentiel redox du site actif est le facteur principal qui détermine la fonction d'une oxydoréductase de thiol-disulfure?

L'étude d'une série de mutants *dsbA*, dans lesquels les deux acides aminés centraux du motif CXXC ont été mutés de façon aléatoire, montre que ce n'est pas le cas (Bessette et al. 2001). Les résultats indiquent qu'il n'y a pas qu'une simple corrélation entre le potentiel redox de ces mutants et leur efficacité à oxyder *in vivo* des substrats protéiques de DsbA. Par exemple, aucune des mutations du peptide central n'affecte l'activité de l'enzyme β -lactamase (une enzyme qui a un pont disulfure), même pour les mutants qui ont un potentiel redox de -220 mV. La formation d'une murine urokinase active clonée chez *E. coli* est cependant fortement affectée par la séquence du dipeptide du site actif. Deux des mutants les moins oxydants, CSFC (-152 mV) et CPSC (-173 mV), ont des activités urokinases qui sont trois à

quatre fois plus importantes que celle de la souche sauvage. Les mutants avec des potentiels redox semblables ont des niveaux d'activité urokinase assez variables. Plus particulièrement, le mutant CQLC qui a un potentiel redox *in vitro* similaire à celui du mutant CPSC a une activité très faible. Le mutant le moins oxydant (-220 mV) a une activité urokinase qui est seulement diminuée de moitié par rapport à celle de la souche sauvage. Par conséquent, il est clair que même si la séquence CPHC du motif de DsbA influence fortement la capacité de la cellule à replier correctement l'urokinase, son rôle dans la détermination du potentiel redox n'en est pas l'unique raison. Une explication possible serait que le potentiel redox, souvent mesuré par l'équilibre avec un mélange de glutathion réduit et oxydé (GSH/GSSG), ne reflète que la réactivité de l'enzyme vis-à-vis du glutathion qui est sûrement différente de celle avec des thiols présents dans les substrats protéiques.

▪ L'environnement redox :

Un autre facteur pouvant influencer la fonction d'une oxydoréductase de thiol-disulfure est la nature de l'environnement subcellulaire dans lequel elle se trouve. Quand les différents mutants de la TRX1 pour le motif CXXC sont étudiés *in vivo*, leurs fonctions physiologiques reflètent parfaitement leur potentiel redox (Mossner et al. 1998; Mossner et al. 1999). Par exemple le mutant TRX1 qui a le motif CXXC de DsbA est beaucoup moins efficace pour réduire des substrats cytoplasmiques, ce qui induit des différences observables de phénotypes. Cependant, dans le cas de DsbA, le potentiel redox à lui seul semble être moins critique pour satisfaire ses fonctions *in vivo*, les mutants du site actif qui sont des oxydants deux à trois fois moins puissants que DsbA *in vitro* peuvent toujours remplir les fonctions de DsbA dans des conditions normales de culture (Grauschopf et al. 1995). En accord avec cela, quand la TRX1 est exprimée dans le périplasme d'*E. coli*, elle peut agir, même si ce n'est que faiblement en tant qu'oxydant de protéines de la membrane cellulaire. Si la séquence du site actif de la TRX1 exprimée dans le périplasme est remplacée par la séquence CPHC de DsbA, la TRX1 agira comme un puissant oxydant. Ces résultats montrent que l'environnement redox, et plus précisément la nature des partenaires redox, joue un rôle important dans le potentiel redox des protéines de cette famille. Ces conclusions ne sont pas surprenantes car les enzymes de la famille des TRX peuvent effectuer des transferts d'électrons dans les deux directions : oxydation et réduction.

3. D'autres enzymes non oxydoréductases de thiol-disulfure interviennent dans la formation du pont disulfure :

D'autres enzymes n'appartenant pas à la super famille des TRX utilisent également des cystéines actives pour transférer des électrons dans les voies d'oxydation et de réduction. Ces enzymes ont des structures tridimensionnelles totalement différentes de celle de la Thiorédoxine et ont des cystéines actives qui sont éloignées par plus de deux acides aminés. De plus, elles utilisent soit de petites molécules donneuses d'électrons, soit des cofacteurs, comme le FAD, le NADPH, le NADH, des quinones ou encore l'acide lipoïque (Bryk et al. 2002). Contrairement à la famille des TRX, les structures de ce groupe d'enzymes ont peu de points communs. La plupart interagissent avec les enzymes de la famille des TRX en tant qu'accepteurs ou donneurs d'électrons. L'exemple le plus classique est la protéine DsbB, qui ne contient pas de domaine du type TRX dans sa structure et qui transfère des électrons via deux paires de cystéines actives entre l'oxydase DsbA et une quinone présente dans la membrane. Par contre, les enzymes qui assurent la dernière étape de ces voies de transfert d'électrons, à savoir la formation de ponts disulfures dans les compartiments extra cytoplasmiques et la réduction de ces ponts dans le cytoplasme, appartiennent toutes à la super famille des TRX et non à ce dernier groupe d'enzymes.

Les réactions d'échange thiol-disulfure constituent les fondements de la catalyse de la formation de ponts disulfures des protéines dans toutes les cellules vivantes. Dans les paragraphes qui suivent, nous nous intéresserons plus particulièrement à la voie de biosynthèse des ponts disulfures chez les bactéries et plus particulièrement chez *E. coli* qui est la mieux caractérisée à ce jour.

Mes travaux portant sur des homologues à l'oxydase DsbA d'*E. coli*, chez le pathogène *Neisseria meningitidis*, les parties concernant la voie oxydative du repliement protéique et la description de l'enzyme DsbA, acteur majeur de cette voie, seront plus largement détaillées.

II.2. La voie de formation des ponts disulfures chez les bactéries à Gram-négatif

Alors que le caractère enzymatique de la synthèse des ponts disulfures chez les eucaryotes a été découvert dans les années 1960 avec la PDI, on a longtemps pensé que ces réactions étaient spontanées chez les procaryotes. Ce n'est qu'en 1991 que J. Beckwith et son équipe ont pu identifier les premières oxydoréductases de thiol-disulfure dans le périplasma bactérien (Bardwell et al. 1991). Depuis, deux voies impliquées dans la formation des ponts disulfures ont été très bien caractérisées : la voie oxydative, responsable de la formation de ponts disulfures, et la voie d'isomérisation, qui rétablit les ponts disulfures mal formés. De nombreuses revues ont été publiées sur ce sujet et seront largement utilisées comme support bibliographique de ce travail (Collet et al. 2002a; Kadokura et al. 2003; Ortenberg et al. 2003; Messens et al. 2006; Ito et al. 2008).

A) Les protéines de la famille des Dsb chez *E. coli*

Pour protéger la cellule des agents oxydants qui pourraient endommager les protéines cytoplasmiques, les bactéries ont développé des systèmes enzymatiques comme ceux de la thiorédoxine-thiorédoxine réductase et de la glutarédoxine-glutarédoxine réductase (Carmel-Harel et al. 2000). Dans le cytoplasme bactérien la concentration en glutathion, d'environ 5 mM avec un rapport GSH/GSSG allant de 50/1 à 200/1, permet en partie d'empêcher la formation de ponts disulfures protéiques (Kosower et al. 1978; Hwang et al. 1992).

Par opposition, les protéines sécrétées dans le périplasma sont oxydées. Ce compartiment contient une famille de protéines qui catalysent la formation de ponts disulfures sur les protéines nouvellement transférées. Ces protéines font parties de la famille des Dsb. Les Dsb périplasmiques ont un domaine de type TRX (à l'exception de DsbB) contenant le motif CXXC au sein de leur site actif. Selon la fonction redox de l'enzyme, ce motif est soit réduit (Dsb-(SH)₂ avec un dithiol) soit oxydé (Dsb-S₂ avec un pont disulfure formé). Ces protéines sont impliquées dans deux voies principales : une voie d'oxydation (DsbA et DsbB) et une voie d'isomérisation (DsbC, DsbG, DsbD) des ponts disulfures (Figure 10). Nous ne décrirons pas cette seconde voie enzymatique.

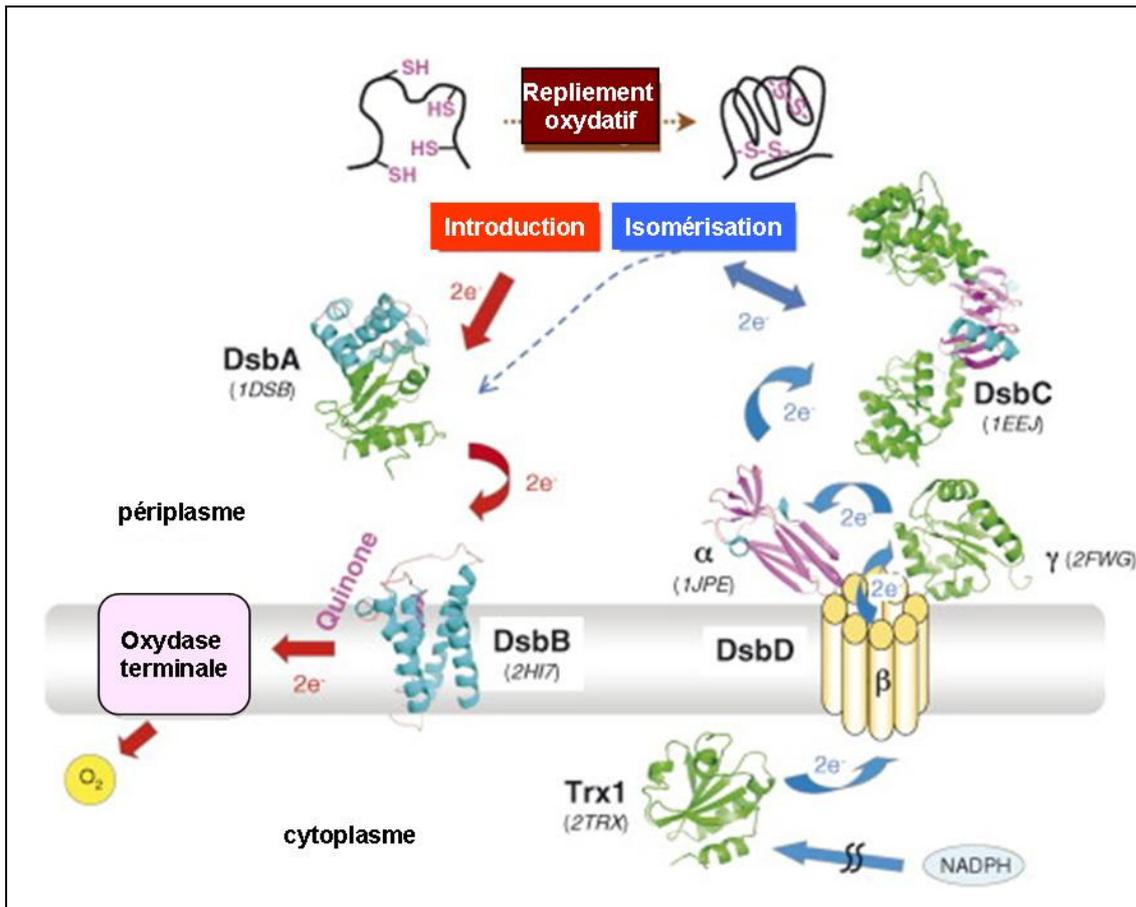


Figure 10 : Voies de formation des ponts disulfures chez *E. coli*.

Représentation du flux d'électrons mis en jeu dans les voies d'oxydation et de réduction/isomérisation dans le processus de repliement oxydatif des protéines chez *E. coli*

B) Système Dsb et virulence bactérienne

Les protéines Dsb et surtout l'oxydase DsbA jouent un rôle important dans la biogénèse de toxines bactériennes et de facteurs de virulence (Yu et al. 1999; Lasica et al. 2007). En général, les mutants de délétion *dsbA*⁻ ou *dsbB*⁻ sont beaucoup moins mobiles et la virulence des bactéries mutantes est diminuée (Bardwell et al. 1991; Peek et al. 1992; Tomb 1992; Yu et al. 1999; Lee et al. 2001; Meima et al. 2002; Ha et al. 2003; Burall et al. 2004; Bringer et al. 2007; Coulthurst et al. 2008; Lin et al. 2008). La mutation du gène *dsbA* altère plusieurs phénotypes associés à la pathogénicité soit de façon directe soit à cause d'effets pléiotropiques. DsbA est nécessaire, par exemple, pour l'adhésion médiée par les pili d'*Enteropathogenic E. coli* (Zhang et al. 1996) et *Vibrio cholerae* (Peek et al. 1992), pour le repliement correct de protéines responsables de la sécrétion de protéines invasives chez

Yersinia pestis (Jackson et al. 1999) et pour la survie intracellulaire de *Shigella flexneri* (Watarai et al. 1995).

Le tableau ci-dessous (Tableau 1) présente des exemples de processus de virulence qui sont affectés par les mutations de protéines du système Dsb chez des bactéries pathogènes à Gram-négatif.

Tableau 1: Exemples des processus impliqués dans la pathogénicité dépendante de l'activité de protéines Dsb. (Lasica et al. 2007)

Processus/ Souche bactérienne	Cible du système Dsb	Protéine Dsb impliquée*	Référence
Motilité			
<i>Salmonella enterica</i>	FliC et FliB	DsbA	Agudo et al. (2004)
<i>Escherichia coli</i>	FlgI et FliC	DsbA	Hiniker & Bardwell (2004)
<i>Campylobacter jejuni</i>	inconnue	DsbI et DsbB	Raczko et al. (2005)
Système de sécrétion de Type III			
<i>Salmonella enterica</i>	SpiA, InvH?	DsbA	Miki et al. (2004), Altmeyer et al. (1993)
<i>Shigella flexneri</i>	Spa32	DsbA	Watarai et al. (1995), Yu et al. (2000)
<i>Yersinia pestis</i>	YscC	DsbA	Jackson & Plano (1999)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ExsA	DsbA	Ha et al. (2003)
Système de sécrétion de Type IV			
<i>Bordetella pertussis</i>	Une des protéines de Ptl	DsbC	Stenson & Weiss (2002)
Adhésion			
<i>Neisseria meningitidis</i>	Protéines impliquées dans la biogenèse du pili	DsbAs	Tinsley et al. (2004)
<i>Salmonella enterica</i>	PefA	SrgA et DsbA	Bouwman et al. (2003)
<i>Escherichia coli</i>	Bfp	DsbA	Zhang & Donnenberg (1996)
Toxines			
<i>Bordetella pertussis</i>	Sous-unités A et B de la toxine PTX	DsbA	Stenson & Weiss (2002)
<i>Vibrio cholerae</i>	Subunit B of the CT toxin	DsbA	Yu et al. (1992)
<i>Escherichia coli</i>	Sous-unités A et B de la toxine LT	DsbA	Okamoto et al. (1998), Hardy & Hedges (1996)
Enzymes extracellulaires			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Elastase, lipase	DsbA	Braun et al. (2001), Urban et al. (2001)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Pectinase, cellulase	DsbA	Shevchik et al. (1995)

La majorité des expériences sont effectuées sur des cellules mutantes *dsbA*. Le rôle de DsbC a été trouvé uniquement sur le système de sécrétion de *Bordetella pertussis* PTX. On peut également penser que les autres systèmes de sécrétion de type IV, qui jouent un rôle important dans la virulence de nombreuses espèces de bactéries, sont également affectés par DsbC.

C) La voie oxydative du repliement protéique

1. DsbA, acteur majeur de la formation des ponts disulfures chez les bactéries à Gram-négatif :

DsbA fut la première enzyme de la formation des ponts disulfures isolée chez les bactéries. Elle a été identifiée simultanément par deux approches génétiques.

Dans une première approche, une mutation affectant la formation des ponts disulfures (*dsbA*) a été isolée à partir d'une sélection, conçue pour étudier les facteurs impliqués dans l'insertion de protéines dans les membranes. Cette sélection utilisait la fusion MalF-LacZ λ 102, dans laquelle la β -galactosidase, une protéine cytoplasmique, est fusionnée au domaine périplasmique de MalF, une protéine membranaire d'*E. coli* (Froshauer et al. 1988).

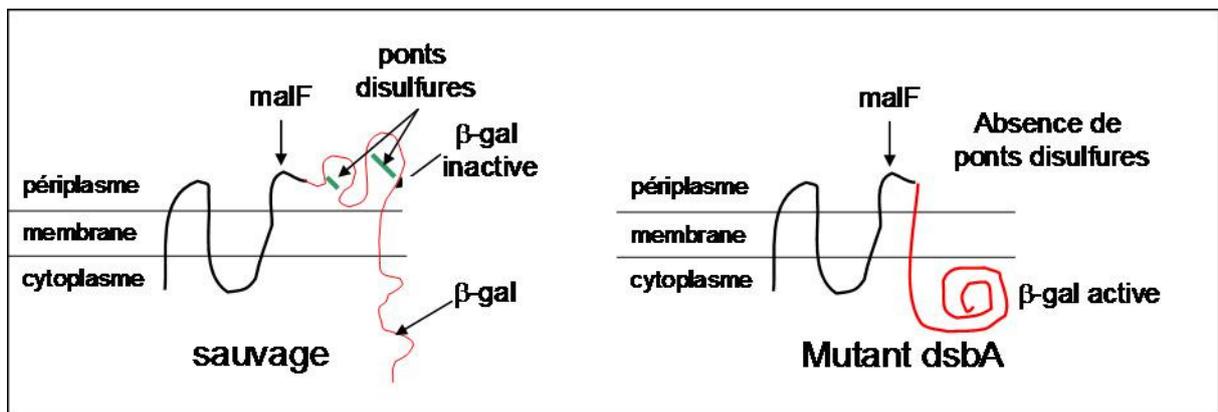


Figure 11 : Modèle topologique de la fusion MalF-LacZ λ 102 chez une souche sauvage et *dsbA*⁻ d'*E. coli*. (Bardwell et al. 1991)

Ainsi, lorsque cette protéine fusion est exprimée, la translocation de la β -galactosidase à travers la membrane est seulement partielle; l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique est localisée dans le périplasmie tandis que le reste de la chaîne est enchâssé dans la membrane et donc la β -galactosidase est inactive (Figure 11). La mutation du gène *dsbA* permet de restaurer l'activité β -galactosidase. La portion de l'enzyme qui se trouve dans le périplasmie possède plusieurs cystéines. Dans la souche sauvage où les ponts disulfures peuvent se former, la β -galactosidase adopte une conformation qui stabilise la structure transmembranaire inactive. La mutation *dsbA*⁻ empêche la formation de ces ponts disulfures, ce qui déstabilise la structure transmembranaire et conduit le domaine catalytique de la β -galactosidase dans le cytoplasme où elle a une conformation native pleinement active (Figure 11).

Dans la deuxième approche, une série de bactéries mutantes a été étudiée afin d'identifier les gènes impliqués dans le repliement de la phosphatase alcaline qui possède deux ponts disulfures indispensables à son activité (Kamitani et al. 1992). Certains mutants possédant une activité phosphatase alcaline diminuée, en raison de l'absence de ponts disulfures, présentaient une mutation dans le gène *dsbA*. Ce résultat confirmait l'implication de l'enzyme DsbA dans la formation de ponts disulfures.

DsbA est le principal oxydant des protéines exportées dans le périplasma d'*E. coli*. En accord avec son rôle dans le repliement de ces protéines, les souches mutantes *dsbA*⁻ sont associées à un grand nombre de phénotypes. Chez ces mutants, les protéines périplasmiques telles que la phosphatase alcaline ou encore la protéine de la membrane externe OmpA sont rapidement dégradées (Bardwell et al. 1991). Ces bactéries mutantes présentent également une motilité fortement diminuée car les protéines FlgI, constituant le moteur du flagelle, ne sont pas correctement assemblées. Les mutants *dsbA*⁻ sont hypersensibles aux réducteurs comme le dithiothréitol (DTT) et la benzylpénicilline et à certains métaux comme le mercure et le cadmium (Missiakas et al. 1993; Stafford et al. 1999). De plus, les bactéries pathogènes mutantes *dsbA*⁻ ne sont plus virulentes car les molécules constituant le pilus ou certaines toxines riches en ponts disulfures ne sont pas fonctionnelles (Peek et al. 1992).

La DsbA la mieux caractérisée est celle de la bactérie *E. coli*. C'est une référence pour l'étude des homologues identifiés depuis lors chez d'autres organismes. Les données structurales et biochimiques sur DsbA d'*E. coli* seront ainsi largement présentées dans ce mémoire.

- **Propriétés biochimiques : DsbA d'*E. coli*, une enzyme très oxydante :**

Le gène *dsbA* code pour une protéine monomérique périplasmique de 21 kD. DsbA possède un site actif redox composé du motif CXXC (C30-P31-H32-C33) présent dans le domaine TRX (Martin et al. 1993a) qui est actif dans son état oxydé (Kishigami et al. 1995). Le pont disulfure catalytique est instable (Zapun et al. 1993) et peut être rapidement transféré à une protéine nouvellement sécrétée dans le périplasma par un échange thiol-disulfure (Figure 12). Après la formation transitoire d'un intermédiaire covalent entre C30, la cystéine N-terminale du motif CXXC de DsbA et le substrat protéique, le pont disulfure est transféré à la protéine en cours de repliement et DsbA est libérée sous son état réduit.

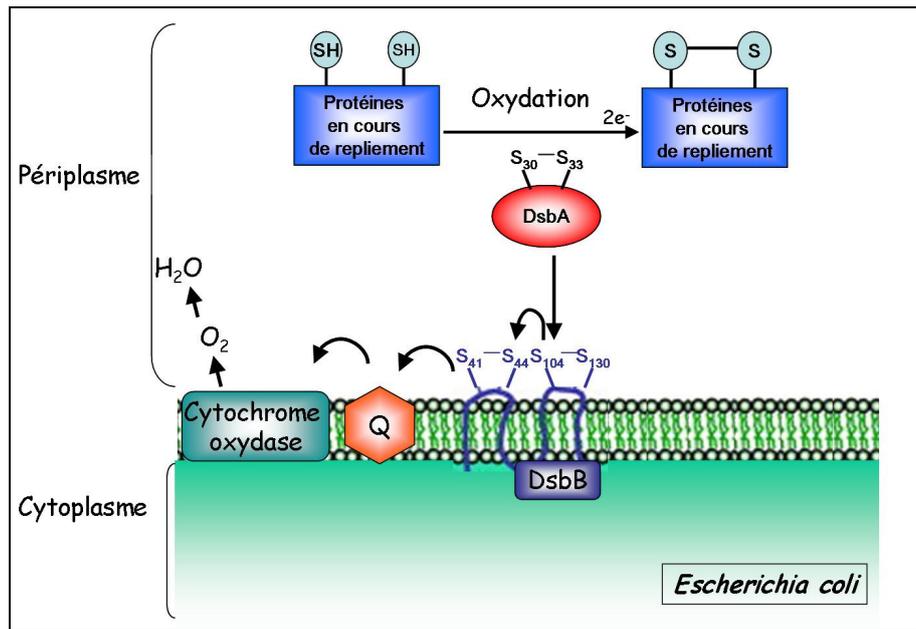


Figure 12 : Voie oxydative de formation des ponts disulfures dans le périplasma d'*E. coli*.
La direction du flux d'électrons est représentée par les flèches noires. (Messens et al. 2006)

DsbA d'*E. coli* est l'une des enzymes les plus oxydantes de cette famille d'oxydoréductases. Cette caractéristique peut s'expliquer par la structure de son motif catalytique CXXC et par ses propriétés biochimiques inhabituelles. La cystéine nucléophile, C30 a un pka exceptionnellement acide (pka = 3.5) (Nelson et al. 1994) en comparaison avec la valeur normale du pka d'une cystéine libre qui est de 8.3. C30 est par conséquent sous forme thiolate à pH physiologique. Comme cela sera expliqué plus loin, l'anion thiolate est probablement stabilisé par des éléments structuraux, ce qui rend la forme oxydée de DsbA beaucoup moins stable et plus réactive que la forme réduite et ceci oriente la réaction vers la réduction de DsbA et l'oxydation des protéines en cours de repliement (Wunderlich et al. 1993a; Wunderlich et al. 1993b; Zapun et al. 1993).

Le potentiel redox de DsbA d'*E. coli* est de -120 mV (Zapun et al. 1993), ce qui est en accord avec son rôle d'oxydant. En comparaison, la TRX d'*E. coli*, qui est un réducteur dans le cytoplasme, a un potentiel redox standard de -270 mV. Récemment, il a été reporté que DsbL, une protéine issue de la souche uropathogénique d'*E. coli*, possédait un potentiel redox de -95 mV, encore plus oxydant que DsbA d'*E. coli*. DsbL serait impliquée dans l'oxydation de l'arylsulfate sulfotransférase, qui participe à la pathogénicité de la souche, mais pas dans l'oxydation générale des protéines périplasmiques en cours de repliement (Grimshaw et al. 2008).

▪ **Structure tridimensionnelle de DsbA d'*E. coli* :**

La structure tridimensionnelle de DsbA d'*E. coli* a été résolue à l'état réduit et oxydé par cristallographie (Martin et al. 1993a; Schirra et al. 1998). Son domaine TRX est composé de cinq brins β et de trois hélices α . Son domaine hélical assez compact est composé de quatre hélices α (Figure 13A). Ce dernier serait important pour la spécificité de l'enzyme et aussi pour empêcher l'interaction entre DsbA et DsbD, l'une des enzymes qui corrigent les ponts disulfures (Haebel et al. 2002). Les cystéines actives, C30 et C33, sont situées en N-terminal de l'hélice α_1 du domaine TRX. La structure de la forme réduite montre que la forme thiolate du résidu C30 serait stabilisée par la charge positive du dipôle de l'hélice α_1 , par l'interaction avec H32 (Figure 13B) et par des liaisons hydrogènes entre les groupements NH de la chaîne peptidique principale du motif CXXC (Guddat et al. 1998; Schirra et al. 1998).

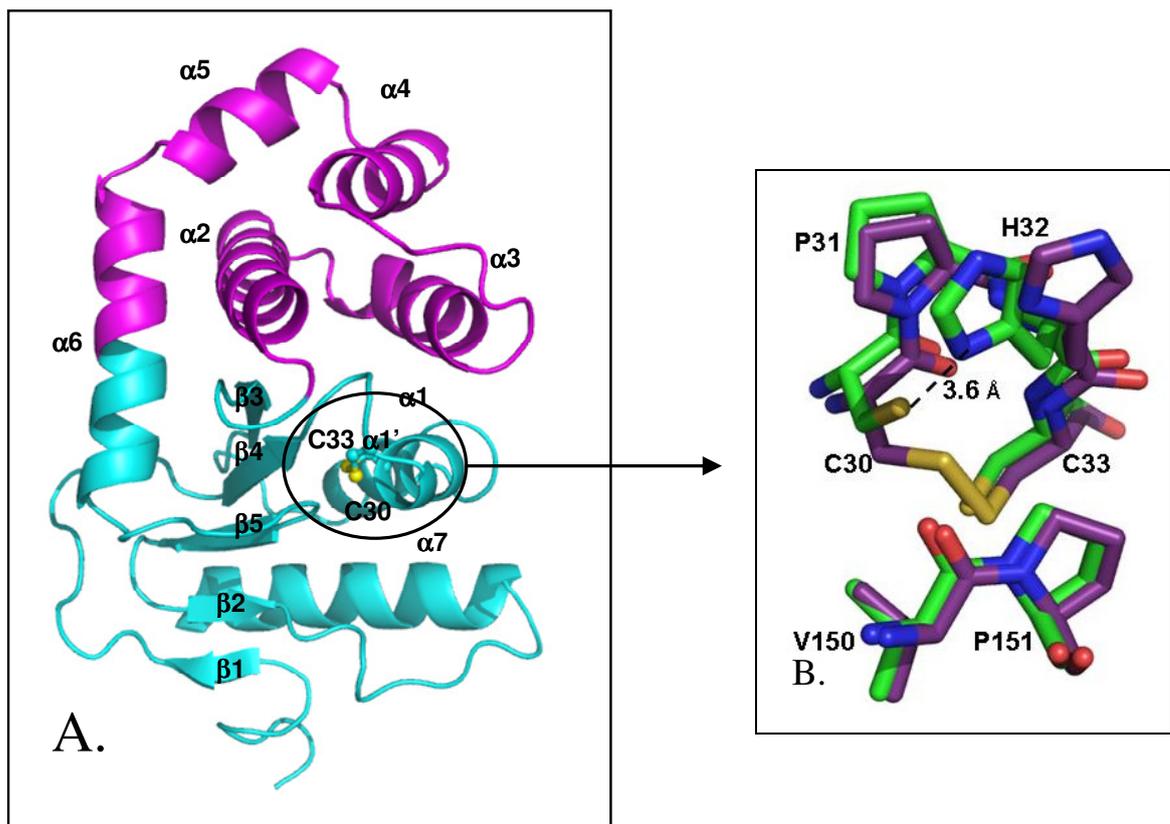


Figure 13 : Structure cristallographique de DsbA d'*E. coli* réduite.

A. Le domaine hélical est en rose et le domaine TRX en cyan. Les structures secondaires sont numérotées. Les chaînes latérales des deux cystéines actives sont représentées. **(B)** Superposition de la région du site actif des formes oxydée en violet et réduite en vert (Guddat et al. 1998). Les liaisons hydrogènes au sein du motif CXXC qui maintiennent la cystéine 30 dans sa forme thiolate sont indiquées.

Le motif CXXC est entouré d'une cavité dont la surface n'est pas chargée (Figure 14a). Une poche relativement profonde et hydrophobe au sein de cette cavité se trouve le long du site actif et peut lier des peptides via des interactions hydrophobes (Figure 14b) (Guddat et al. 1997b; Couprie et al. 2000). Sur l'autre face du site actif, il y a une Proline conservée (P151) dans une conformation *cis* (Figure 13B) qui participe également à la stabilité de la protéine. Des expériences de dénaturation ont montré une différence de plus de 4.8 kcal/mol du ΔG entre le mutant P151A et la protéine sauvage (Moutiez et al. 1999). L'équipe de Jon Beckwith à Harvard a observé que le remplacement de P151 par une Thréonine déplace l'équilibre de la réaction d'oxydation vers la formation d'un pont disulfure mixte stable entre DsbA et certains substrats (Kadokura et al. 2004).

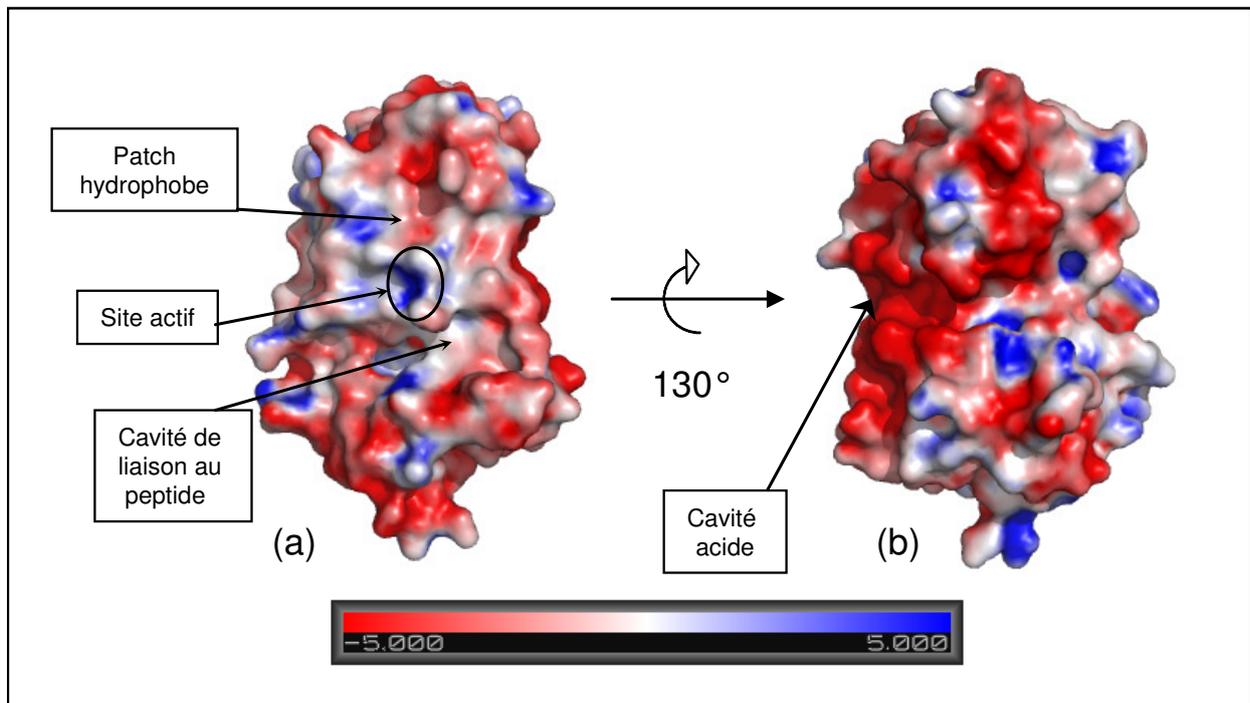


Figure 14 : Distribution des potentiels électrostatiques à la surface de DsbA d'*E. coli* (calculée avec APBS).

▪ **Quels sont les éléments structuraux importants pour la fonction de DsbA ?**

Des études combinant approches structurales et mutagenèse dirigée ont permis d'explorer le mécanisme réactionnel de DsbA d'*E. coli*.

Le dipeptide X-X du motif CXXC:

Le dipeptide XX du site actif de DsbA est important dans sa fonction d'oxydase. La mutagenèse montre que le remplacement de ce dipeptide chez DsbA a un effet à la fois sur la valeur de son potentiel redox (Lundstrom et al. 1992; Kortemme et al. 1996; Chivers et al. 1997) et sur la valeur du pka de la cystéine nucléophile C30 (Grauschopf et al. 1995).

Au sein du dipeptide P-H, la chaîne latérale de l'histidine semble jouer un rôle-clé dans la détermination des propriétés redox et dans la relative instabilité de sa forme oxydée. La mutation de ce résidu par une tyrosine, une sérine ou une leucine augmente nettement la stabilité (d'environ 5 à 7 kcal/mol) de la forme oxydée de ces mutants en comparaison à la protéine oxydée sauvage. Cependant, la mutation de H32 n'affecte pas la structure tridimensionnelle de DsbA. L'effet déstabilisant de H32 serait plutôt d'ordre électrostatique (Guddat et al. 1997b).

La boucle contenant la *cis*-Proline :

En plus du motif CXXC, DsbA contient, comme les autres oxydoréductases de la famille des TRX, une Proline en conformation *cis* (P151) au sein du motif dit de la *cis*-Proline « V150-*cis*P151-A152 » qui relie le brin $\beta 5$ à l'hélice $\alpha 6$ (Figure 15). Ce motif est situé à proximité de la séquence CXXC. Une étude portant sur le mutant P151A a mis en évidence l'importance de cette *cis*-Proline dans la fonction et la stabilité de DsbA d'*E. coli*. La substitution de la *cis*-Proline par une Alanine, qui adopte une conformation *trans* dans la structure 3D, déstabilise fortement la structure de DsbA et la diminution de l'énergie libre de repliement (DsbA ($\Delta G_{ox} = -48.5 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta G_{red} = -65.9 \text{ KJ mol}^{-1}$) et DsbA_{P151A} ($\Delta G_{ox} = -25.0 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta G_{red} = -37.6 \text{ KJ mol}^{-1}$)). Bien qu'*in vivo*, le mutant soit correctement oxydé, son activité oxydase est diminuée de moitié par rapport à l'enzyme sauvage. Ses propriétés biochimiques sont peu modifiées mais la légère diminution de la constante d'équilibre de la réaction d'oxydation (K_{ox}) suffirait à expliquer en partie cette perte d'activité ($K_{ox}(\text{DsbA}) = 0.145 \text{ mM}$ et $K_{ox}(\text{DsbA}_{P151A}) = 0.82 \text{ mM}$). Les changements de conformation au niveau du site actif sur la structure de DsbA_{P151A} expliqueraient également cette perte d'activité. En effet, la chaîne principale de la boucle 149-152 adopte une nouvelle conformation avec A151 en

conformation *trans*. Ce réarrangement est lié à la disparition de liaisons de van-der-Waals entre la boucle et le pont disulfure. La *cis*-Proline joue un rôle dans la stabilisation des formes oxydée et réduite de DsbA, ce qui expliquerait qu'elle soit conservée au sein de la super famille des TRX.

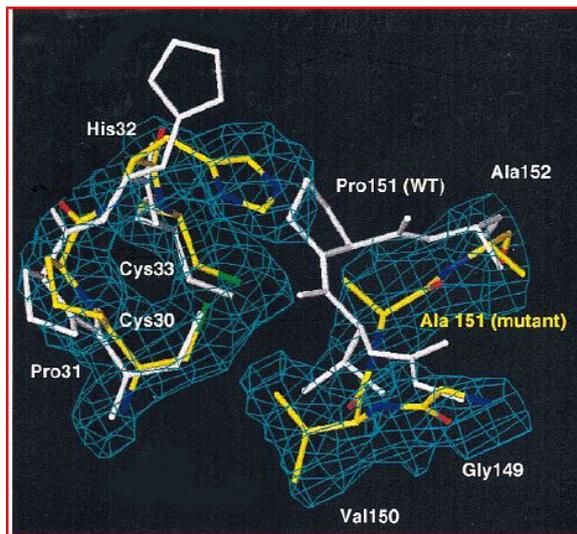


Figure 15 : Superposition des sites actifs de DsbA sauvage et du mutant P151A

DsbA sauvage est en blanc et le mutant P151A est en jaune. La carte de densité électronique $2F_o - F_c$ (résolution de 2.8Å) calculée autour du site actif de DsbA_{P151A} contournée à 1.5σ est représentée. (Charbonnier et al. 1999)

▪ Les substrats de DsbA :

DsbA catalyse la formation de ponts disulfures chez les protéines périplasmiques et de la membrane externe. L'équipe de Jim Bardwell a montré que parmi les 700 protéines périplasmiques et de la membrane externe recensées dans la banque de données « Swiss Protein Database », plus de la moitié ont au moins deux résidus cystéines, suggérant ainsi potentiellement plus de 300 substrats *in vivo* pour DsbA d'*E. coli* (Hiniker et al. 2004). L'implication de DsbA dans le processus de repliement de certaines de ces protéines a été mise en évidence, suggérant une faible spécificité de substrat de DsbA. Grâce au mutant P151T, Kadokura et al. (2004) ont isolé plusieurs complexes covalents DsbA-substrat. Ils ont montré que DsbA catalysait le repliement de: 1) LivK, un précurseur protéique qui se lie spécifiquement aux leucines et qui possède deux cystéines; 2) YodA une protéine liant des métaux avec deux cystéines; 3) RcsF, un régulateur d'exopolysaccharide avec six cystéines. D'autres substrats ont également été identifiés comme les protéines PhoA et FlgI en analysant par électrophorèse 2D les extraits périplasmiques d'une souche mutante *dsbA*⁻ (Hiniker et al. 2004).

Comment DsbA peut-elle reconnaître autant de substrats différents ?

Les surfaces topographiques de DsbA lors des différentes phases de son cycle catalytique (état oxydé, état réduit et un complexe covalent intermédiaire) étudiées par protéolyse limitée couplée à de la spectrométrie de masse (Vinci et al. 2002) a montré que la forme oxydée de DsbA était plus flexible que sa forme réduite. Celle-ci faciliterait la fixation d'un grand nombre de substrats, alors que la rigidité de la forme réduite permettrait de libérer le substrat oxydé et de limiter l'interaction de DsbA à la seule protéine DsbB pour sa ré-oxydation. DsbA est encore plus rigide lorsqu'elle est en complexe avec un peptide de DsbB de 14 résidus, ce qui faciliterait également la libération du substrat oxydé (Couprie et al. 2000).

L'étude par RMN de l'interaction de DsbA avec un substrat modèle indique que DsbA lierait les chaînes polypeptidiques via des interactions hydrophobes (Couprie et al. 2000). Par conséquent, seules les protéines non repliées peuvent être substrats de DsbA. Ceci constitue une explication partielle du transfert d'électrons extrêmement lent qui a été observé *in vitro* entre DsbA oxydée et les protéines périplasmiques repliées réduites (Zapun et al. 1995) (Collet et al. 2002b) .

Comment DsbA détermine-t-elle avec quels résidus cystéines du substrat elle doit interagir?

On a longtemps pensé que DsbA interagissait avec les cystéines du substrat de façon aléatoire car un grand nombre de ponts disulfures ne sont pas correctement formés dans le périplasme. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* est synthétisée en tant que pro-enzyme. La formation des ponts disulfures de cette enzyme se passe en trois temps (Braun et al. 2001). En premier, DsbA catalyse la formation du pont disulfure situé en N-terminal de la pro-enzyme. Cette étape est essentielle pour les processus auto-catalytiques de ces pro-enzymes. Dans un deuxième temps, DsbA catalyse la formation du pont disulfure situé plus en C-terminal avant la translocation de l'enzyme mature à travers la membrane.

Par conséquent, la formation du pont disulfure par DsbA *in vivo* peut être un processus ordonné guidé par les changements structuraux de la protéine en cours de repliement (Braun et al. 2001).

Description et analyse de la structure du complexe DsbA-peptide (Paxman et al. 2009)

La structure de DsbA en complexe avec un peptide de neuf résidus dérivé de la protéine auto-transportrice de *Shigella flexneri* SigA vient d'être résolue et donne des informations complémentaires et précieuses pour comprendre cette interaction (Paxman et al. 2009). Elle permet entre autres de localiser les résidus impliqués partiellement dans l'interaction DsbA-substrat (Figure 16) et suggère comment DsbA peut être à la fois si peu spécifique vis-à-vis de ses substrats et si spécifique vis-à-vis de son partenaire membranaire DsbB.

Cette structure montre que le peptide se lie en dehors de la cavité hydrophobe de DsbA. La surface d'interaction est inférieure à 800 \AA^2 . Les résidus autour du site actif ($^{29}\text{FCPH}^{32}$), ceux de la boucle reliant les deux domaines (F63 et M64) ainsi que les résidus situés dans la boucle précédant la *cis*-P151 (R148, G149, et V150) forment plus de 95% de la surface de liaison (Figure 16a). Le mode d'interaction observé dans le complexe DsbA-peptide est extrêmement proche de celui observé dans le complexe Thiorédoxine-substrat (Maeda et al. 2006). Dans les deux cas, le complexe est stabilisé par des liaisons hydrogènes entre la chaîne principale du substrat et la boucle *cis*-Proline, de telle sorte que les deux chaînes peptidiques soient antiparallèles l'une par rapport à l'autre (Figure 16b).

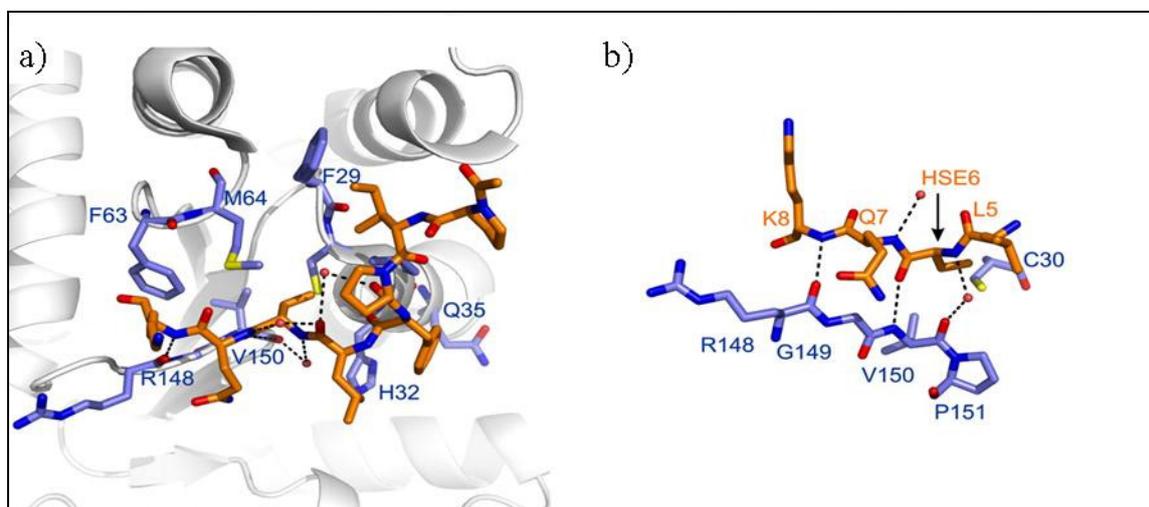


Figure 16 : Site d'interaction DsbA d'*E. coli* -peptide (Paxman et al. 2009).

a) Interactions polaires existant dans le complexe DsbA d' *E. coli* -SigA peptide (pointillés noirs). Le peptide est en orange et la molécule de DsbA d' *E. coli* est représentée en ruban. Les résidus de DsbA impliqués dans l'interaction avec le peptide sont représentés en bleus. Les molécules d'eau sont représentées par des petites sphères rouges. **b)** Conformation antiparallèle du peptide (orange) et des résidus de la boucle *cis*-Proline de DsbA (bleu).

Le fait que le mode d'interaction se fasse principalement entre les chaînes principales et que la surface d'interaction soit assez faible dans le complexe DsbA-peptide est en accord avec la faible spécificité de substrat de DsbA (Kadokura et al. 2004). Les expériences de calorimétrie ont montré que les interactions entre DsbA et ses substrats sont relativement faibles (Couprie et al. 2000), indiquant que de faibles changements au sein du site actif de l'enzyme doivent être suffisants pour modifier la spécificité de substrat. Ceci a été confirmé par l'étude de mutagenèse qui a montré que la mutation V150G chez DsbA empêchait la formation du complexe avec des substrats protéiques (Kadokura et al. 2004). Un mode similaire d'interaction a été observé pour d'autres enzymes de la super famille des TRX, comme la Thiorédoxine (Qin et al. 1995; Qin et al. 1996; Maeda et al. 2006), la Glutarédoxine (Nordstrand et al. 1999), la glutathion transférase (Ladner et al. 2004) et aussi le complexe entre DsbC et DsbD (Haebel et al. 2002). Ce mode d'interaction constitue une caractéristique de la reconnaissance du substrat dans les complexes « domaine TRX-substrat » (Maeda et al. 2006).

Les structures des oxydoréductases DsbA de *Staphylococcus aureus* (Heras et al. 2008) et DsbL d'*E. coli* (Grimshaw et al. 2008) présentent, contrairement à DsbA, une plus grande spécificité. La comparaison de ces structures avec celle de DsbA d'*E. coli* montre des différences dans les régions d'interactions avec le peptide. DsbA de *S. aureus* a la séquence TcP dans la boucle *cis*-Proline et la mutation de la séquence TcP en VcP, plus généralement retrouvée chez les DsbA, augmente l'activité oxydoréductase, mesurée par le test de la réduction de l'insuline (Heras et al. 2008). Cela confirme l'importance de cette boucle *cis*-Proline dans l'interaction substrat/DsbA, comme cela a également été observé avec d'autres protéines de la famille des TRX (Hiniker et al. 2007; Ren et al. 2009). Bien que DsbL ait la séquence VcP dans la boucle *cis*-Proline, elle n'a pas les surfaces hydrophobes qui entourent le site actif chez les DsbA d'*E. coli* et de *S. aureus*, ce qui confirme également l'importance de ces régions pour la liaison du substrat et sa spécificité.

L'aspect dynamique serait également un élément important pour l'activité catalytique de DsbA. Des analyses de la dynamique moléculaire des formes oxydée et réduite de DsbA de *Vibrio cholerae* ont révélé la présence de mouvements inter domaines dans la forme réduite (Horne et al. 2007), qui résulte en une ouverture de la cavité hydrophobe. Chez DsbA d'*E. coli*, les conformations des différents états redox sont similaires, mais des changements dans la dynamique semblent permettre à la forme réduite d'adopter une conformation plus ouverte qui faciliterait l'interaction avec la boucle de DsbB et permettrait la formation d'un pont disulfure mixte entre les cystéines C104 de DsbB et C30 de DsbA.

2. DsbB maintient DsbA oxydée :

Après l'échange thiol/disulfure, DsbA se retrouve réduite. Pour effectuer un autre cycle d'oxydation catalytique, DsbA doit être ré-oxydée par l'enzyme de la membrane interne DsbB (Bardwell et al. 1993). DsbB ré-oxyde DsbA en utilisant le pouvoir oxydant de la chaîne de transport des électrons (Kobayashi et al. 1997; Bader et al. 1999) (Figure 12). En présence d'oxygène, DsbB transfère deux électrons de DsbA vers l'ubiquinone (UQ) oxydée (Bader et al. 1999; Bader et al. 2000). L'ubiquinone réduite est ensuite ré-oxydée par les cytochromes oxydases terminales *bd* et *bo*, qui finalement transfèrent des électrons à l'oxygène. En condition anaérobie, DsbB transfère les électrons de DsbA à une ménaquinone (Bader et al. 1999). Les électrons sont ensuite transférés de la ménaquinone vers l'accepteur final d'électron autre que l'oxygène. Ces quinones sont les accepteurs d'électrons de DsbB et expliquent pourquoi le processus oxydatif de formation de ponts disulfures se passe également en absence d'oxygène. DsbB est une enzyme de 21 kDa de la membrane interne avec quatre segments transmembranaires et deux boucles périplasmiques, P1 et P2, qui possèdent chacune une paire de cystéines oxydées *in vivo*, C41/C44 et C104/C130, respectivement (Jander et al. 1994).

Les études biochimiques, cristallographiques et théoriques ont permis de reconstituer le schéma général de la formation de ponts disulfures à travers la coopération de DsbB et UQ (Figure 17) (Inaba et al. 2004; Raczkó et al. 2005; Inaba et al. 2006a)..

Le fait que les potentiels redox standards de C41-C44 de -210 mV et de C104-C130 de -220 mV soient plus faibles que celui de DsbA (-120 mV) ne peut pas expliquer le flux d'électrons physiologique de DsbA vers DsbB. Une des possibilités serait que la liaison de DsbA induirait des changements conformationnels de DsbB qui faciliteraient le transfert d'électrons entre ces deux enzymes. Les structures cristallographiques du mutant DsbB (C41S) représentant l'état initial avec le pont disulfure formé entre C104 et C130 (Inaba et al. 2009) et du complexe intermédiaire DsbA-DsbB avec une liaison covalente entre C104 (DsbB) et C30 (DsbA) (Inaba et al. 2006a; Malojcic et al. 2008) ont été résolues (Figure 17). Une comparaison structurale de ces deux états de DsbB montre que des transitions conformationnelles importantes dans la deuxième boucle périplasmique de DsbB ont lieu pendant la catalyse de l'oxydation de DsbA. La boucle de la C104 de DsbB, qui est libérée

lors de la formation du complexe, se loge dans la cavité hydrophobe de DsbA (Inaba et al. 2006b), conduisant à la rupture du pont disulfure entre C104 et C130 (Figure 17).

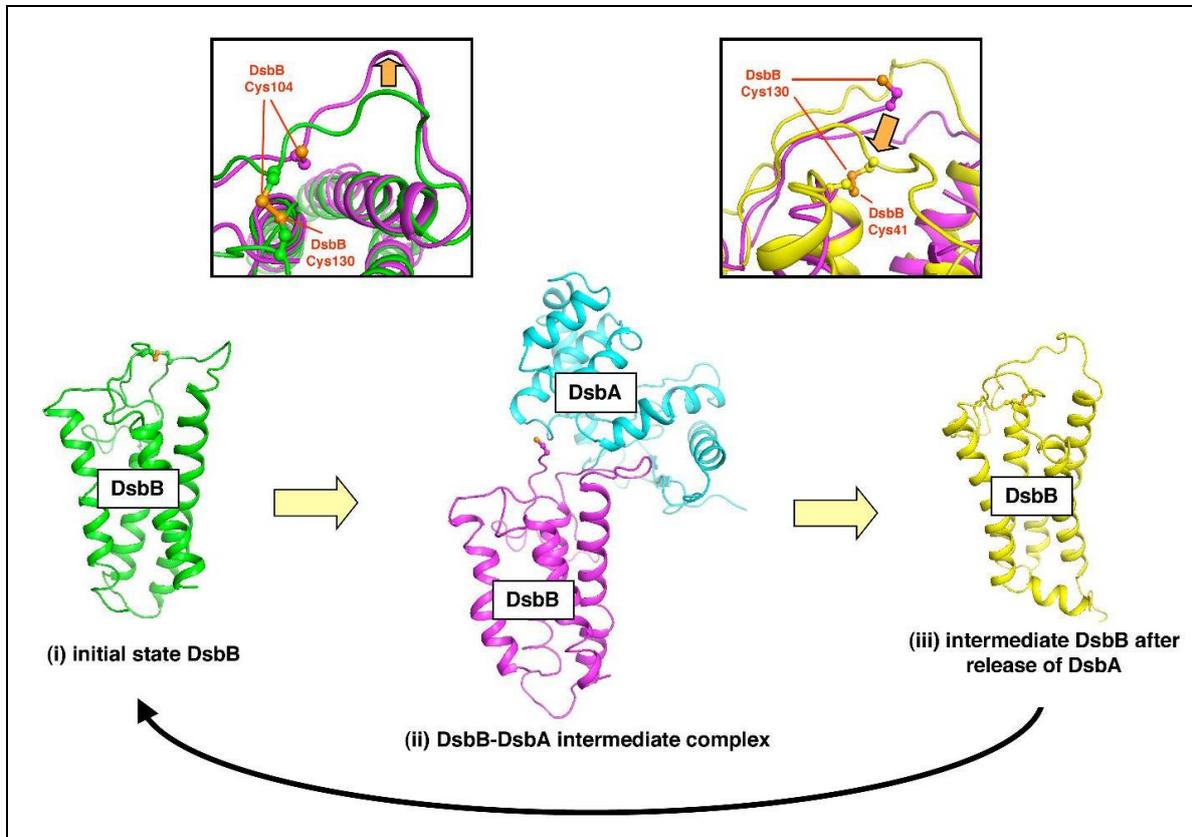


Figure 17 : Instantané des trois conformères de DsbB pendant la ré-oxydation de DsbA.

La structure cristallographique de DsbB dans son état initial avec le pont C104-C130 formé est en vert. Dans le complexe intermédiaire DsbB-DsbA, DsbA et DsbB sont en cyan et magenta. La structure RMN de DsbB avec un pont réarrangé C41-C130 est en jaune. L'encadré gauche montre les changements conformationnels dans la boucle de C104 de DsbB suite à la formation du complexe avec DsbA; l'encadré de droite montre le rapprochement de C130 vers C41 après la libération de DsbA pour former le pont C41-C130. Ces trois changements conformationnels joueraient un rôle dans l'oxydation de DsbA par DsbB.

Les structures cristallographiques montrent que la distance entre les atomes C^α de C104 et C130 passe de 6.3 Å à 8.9 Å après la liaison de DsbA (Inaba et al. 2009). Dans une telle géométrie, C130 ne peut attaquer le pont disulfure C30(DsbA)-C104(DsbB) ce qui bloque le flux d'électrons retour de DsbB vers DsbA. La structure du mutant isolé DsbB[CSSC] avec le pont disulfure réarrangé C41-C130 a été résolue par la RMN (Zhou et al. 2008) (Figure 17). Ce mutant mime DsbB après la libération de DsbA oxydée. La structure de DsbB[CSSC] montre que C130 non appariée, après la réduction du pont C104-C130, se rapproche de la paire C41-C44 de la première boucle pour former le pont C41-C130. Les études biochimiques ont montré que ce rapprochement de C130 peut avoir lieu pendant la

formation du complexe DsbA-DsbB (Inaba et al. 2009) et la formation de ce pont transitoire C41-C130 serait un avantage pour empêcher C130 d'attaquer C30(DsbA)-C104(DsbB) (Kadokura et al. 2002). Dans ce contexte, le rôle fonctionnel de l'hélice α de la deuxième boucle périplasmique de DsbB, parallèle à la membrane, semble avoir un rôle important. Cette hélice est amphiphile et est associée à la périphérie du feuillet de la membrane cytoplasmique (Inaba et al. 2009). Elle divise également la boucle P2 de DsbB de telle sorte que les deux cystéines de cette boucle, C104 et C130, soient régulées séparément. En effet, l'introduction d'acides aminés chargés dans la région de la boucle P2 qui fait face à la membrane rompt l'association avec la membrane, et diminue de façon importante la capacité de DsbB à ré-oxyder DsbA. L'hélice α de la boucle P2 jouerait donc un rôle dans le flux d'électrons en contrôlant la position et la flexibilité de cette boucle (Inaba et al. 2009). DsbB adopte des conformations différentes qui faciliteraient le transfert énergiquement défavorable des électrons de DsbA vers DsbB.

3. Comparaison des interactions DsbA-peptide et DsbA-DsbB :

La comparaison du complexe DsbA-peptide (Paxman et al. 2009) avec celui DsbA-DsbB (Inaba et al. 2006a) montre que la conformation de DsbA est similaire dans les deux cas (Figure 18). Le peptide SigA et la boucle périplasmique de DsbB interagissent tous les deux avec $^{148}\text{RVG}^{150}$ de la boucle de la *cis*-Proline de DsbA, cependant les chaînes latérales des résidus $^{99}\text{PFA}^{101}$ de la boucle de DsbB sont enfouies dans la cavité hydrophobe de DsbA, où ils interagissent avec P151, P163, Q164, T168, M171 et F174 (Figure 18b). Par conséquent, DsbB semble établir plus de liaisons avec la cavité hydrophobe de la surface de DsbA que le peptide. Cela se traduit par une surface d'interaction plus grande observée dans le complexe DsbA-DsbB (1340 \AA^2) (Inaba et al. 2006b), expliquant par la même occasion la plus grande spécificité de l'interaction DsbA-DsbB. Malgré ces ressemblances, il y a des différences structurales entre DsbA pris dans les complexes DsbA-peptide et DsbA-DsbB. La différence la plus importante concerne le résidu H32, qui adopte une conformation gauche dans DsbA-peptide et dont sa chaîne latérale, située en travers de la cavité hydrophobe, bloque l'accès au peptide substrat. Dans le complexe avec DsbB, H32 adopte une conformation *trans*, qui faciliterait l'accès à la cavité hydrophobe de DsbA et où sa chaîne latérale peut établir des interactions de type van-der-Waals avec A102-T103 de la boucle de DsbB. H32 déstabiliserait la forme oxydée de DsbA (Guddat et al. 1997a) et des mouvements de ce résidu seraient nécessaires pour permettre l'accès du substrat au site actif (Guddat et al. 1997a)

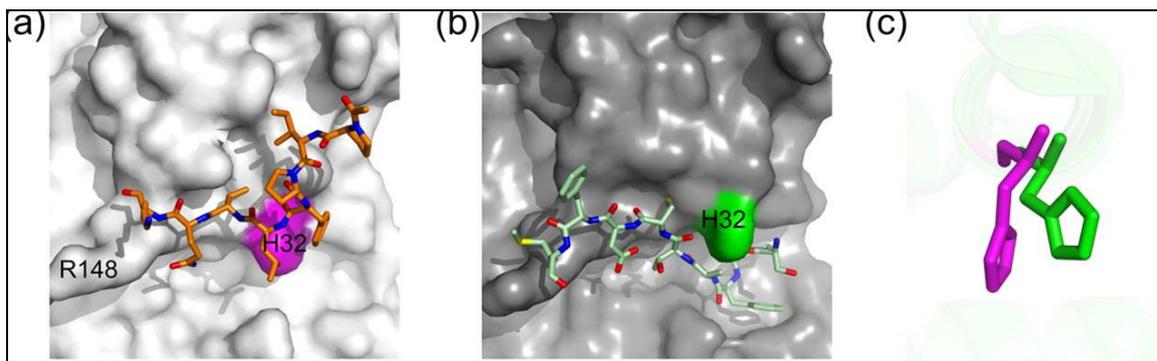


Figure 18 : Comparaison des complexes DsbA/peptide et DsbA/DsbB

(Paxman et al. 2009) **a)** Vue de la surface d'interaction entre DsbA et le peptide SigA. La surface de DsbA est représentée en gris avec le peptide SigA en orange. La position de H32 est en magenta. **b)** Structure du complexe *E. coli* DsbB-DsbA. La surface de DsbA est représentée avec la boucle contenant C104 et la position de H32 en vert. **c)** La superposition des deux complexes montre que H32 dans le complexe avec le peptide SigA (en magenta) adopte une conformation différente de celle observée dans le complexe avec DsbB (en vert).

D) Diversité du système de formation des ponts disulfures chez les bactéries

Le système enzymatique de formation de ponts disulfures est extrêmement variable chez les bactéries et le système Dsb décrit chez *E. coli* (Figure 19a) n'est pas un modèle standard pour toutes les bactéries. Une analyse récente, portant sur les systèmes Dsb de 375 génomes de bactéries montre que la plupart des Protéobactéries possèderaient un système Dsb avec une DsbA et une DsbB, mais qu'une grande diversité de systèmes Dsb existe également parmi les bactéries (Dutton et al. 2008).

Par exemple, *Staphylococcus aureus* qui est une bactérie à Gram-positif, possède une DsbA mais pas de DsbB (Figure 19b). DsbA de *S. aureus* serait aussi stable sous forme réduite qu'oxydée (Heras et al. 2008) contrairement à son homologue chez *E. coli*, suggérant qu'un environnement oxydant maintiendrait DsbA de *S. aureus* sous sa forme oxydée au lieu d'une enzyme homologue à DsbB d'*E. coli*.

Streptococcus pyogènes est un cas extrême et ne possèderait ni DsbA ni DsbB. Chez cet organisme, des liaisons isopeptides remplaceraient les liaisons disulfures et stabiliseraient les structures de certaines protéines sécrétées (Kang et al. 2007). (Dutton et al. 2008) ont également décrit certaines bactéries comme *Streptomyces coelicolor*, qui possèderaient une DsbA et une réductase de la vitamine K époxyde (VKOR) qui jouerait le rôle d'un analogue à

DsbB d'*E. coli* (Figure 19c). Dans quelques cas DsbA et VKOR sont fusionnées et forment un unique système Dsb (Dutton et al. 2008; Singh et al. 2008).

De nombreux pathogènes à Gram-négatif ont un arsenal étendu de protéines Dsb, qui faciliterait la production de facteurs de virulence (Sinha et al. 2004). Par exemple, la souche UPEC CFT073 possède, en plus du système classique DsbA-DsbB, similaire à celui d'*E. coli*, deux autres protéines Dsb, DsbL et DsbI, qui partagent 19 et 24 % d'identité de séquence avec DsbA et DsbB (Grimshaw et al. 2008) (Figure 19d). La caractérisation de DsbL et DsbI montre que ces enzymes ont des propriétés redox similaires à leurs analogues chez *E. coli* (DsbA et DsbB) et qu'elles catalysent la formation d'un pont disulfure sur l'aryl-sulphate sulphotransférase (ASST). La production d'une ASST active est nécessaire pour l'interaction hôte-pathogène (Grimshaw et al. 2008). Ce type de voie de formation de ponts disulfures est également présent chez d'autres souches comme certaines *E. coli* responsables d'infections intestinales (par exemple *E. coli* 536, UT189 et F11), ou des souches de *Salmonella*, *Shewanella* et *Campylobacter*.

En plus du système de Dsb retrouvé chez *E. coli* et de la paire DsbL-DsbI décrite ci-dessus, *Salmonella enterica serovars* possède un autre homologue à DsbA: SrgA (Figure 19e). Les trois paralogues de DsbA de cette bactérie, nommés DsbA, DsbL et SrgA, partagent un faible pourcentage d'identité entre elles et ont des séquences CXXC différentes, ce qui suggère que ces enzymes auraient des spécificités de substrats et des activités *in vivo* différents.

Enfin, *Neisseria meningitidis* a également un système Dsb plus complexe qu'*E. coli*. Son génome code en fait pour trois homologues à DsbA (Figure 19f): DsbA1 et DsbA2 qui sont des lipoprotéines et DsbA3, une enzyme soluble périplasmique. Les deux lipoprotéines sont nécessaires pour la formation d'un pilus fonctionnel, essentiel pour l'adhésion de la bactérie avec l'hôte (Tinsley et al. 2004) et pour le repliement de PilQ, une protéine impliquée dans la compétence des bactéries (Sinha et al. 2008). La troisième enzyme, DsbA3, n'est impliquée dans aucune de ces fonctions et à ce jour n'est pas reliée à un phénotype connu. Bien que *N. meningitidis* ait trois DsbA, elle ne possède qu'une seule DsbB.

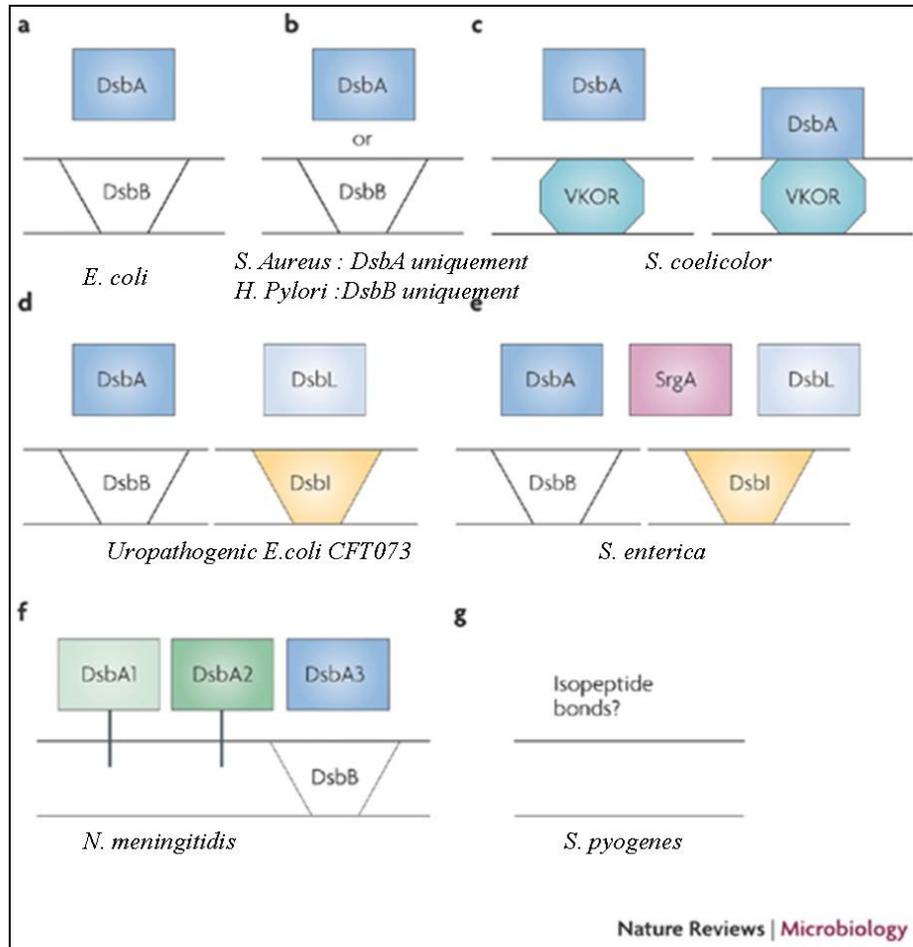


Figure 19 : Schématisation des différentes voies oxydatives chez les bactéries. (Heras et al. 2009)

III. Connaissances actuelles sur les DsbA de *Neisseria meningitidis*

Pour distinguer plus facilement les enzymes d'*Escherichia coli* et de *Neisseria meningitidis*, nous utiliserons les notations suivantes : EcDsbA et EcDsbB pour les enzymes d'*E. coli* et NmDsbA et NmDsbB pour les homologues chez *N. meningitidis*.

III.1. La découverte du système Dsb chez *Neisseria meningitidis*

L'équipe de Xavier Nassif à l'hôpital Necker à Paris, est à la base de la caractérisation du système Dsb chez *N. meningitidis* en 2004 (Tinsley et al. 2004).

Le gène *nmb0294* a été identifié en premier à la suite d'une analyse comparative des génomes des deux *Neisseria* pathogènes: *N. meningitidis* et *N. gonorrhoea* (Tinsley et al. 1996; Klee et al. 2000). Le gène *nmb0294* est spécifique du méningocoque et est localisé dans un îlot génétique absent du génome de *N. gonorrhoea*. Il code pour une protéine NMB0294 qui possède les motifs caractéristiques des enzymes de la famille des thiorédoxines à savoir le motif CPHC (identique à celui d'EcDsbA) et une Proline située plus en C-terminal (*cis*-Proline conservée chez les TRX) (Figure 20). La séquence en acides aminés de NMB0294 contient un peptide signal relativement court et hydrophobe se terminant par la séquence consensus LAA(S)C (la Lipobox) qui est reconnue par la « lipoprotein-specific signal peptidase II ». Ceci indique que cette DsbA serait une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe après lipodation de son résidu N-terminal. Ceci laissait supposer que NMB0294 pourrait constituer une cible antigénique.

(Tinsley et al. 2004) ont ainsi montré que NMB0294 avait bien une activité oxydoréductase comparable à celle d'EcDsbA, et était bien une lipoprotéine, mais que l'inactivation du gène *nmb0294* ne confèrait pas à la bactérie un phénotype *dsbA*⁻ et n'affectait pas sa virulence.

Ce dernier résultat, concernant l'absence de phénotypes associés à l'inactivation de *nmb0294*, a poussé l'équipe de X. Nassif à revenir au génome du méningocoque et à identifier deux autres gènes codant potentiellement pour des homologues à NMB0294 et à DsbA. Ceux-ci sont localisés à des loci différents sur le chromosome. Le génome de *N. meningitidis*

contient donc trois gènes *nmb0278*, *nmb0294* et *nmb0407* qui seront notés *dsbA1*, *dsbA2* et *dsbA3*, par la suite. Bien que *N. meningitidis* ait trois gènes *dsbA*, il n'a été trouvé qu'un seul gène codant pour une hypothétique DsbB.

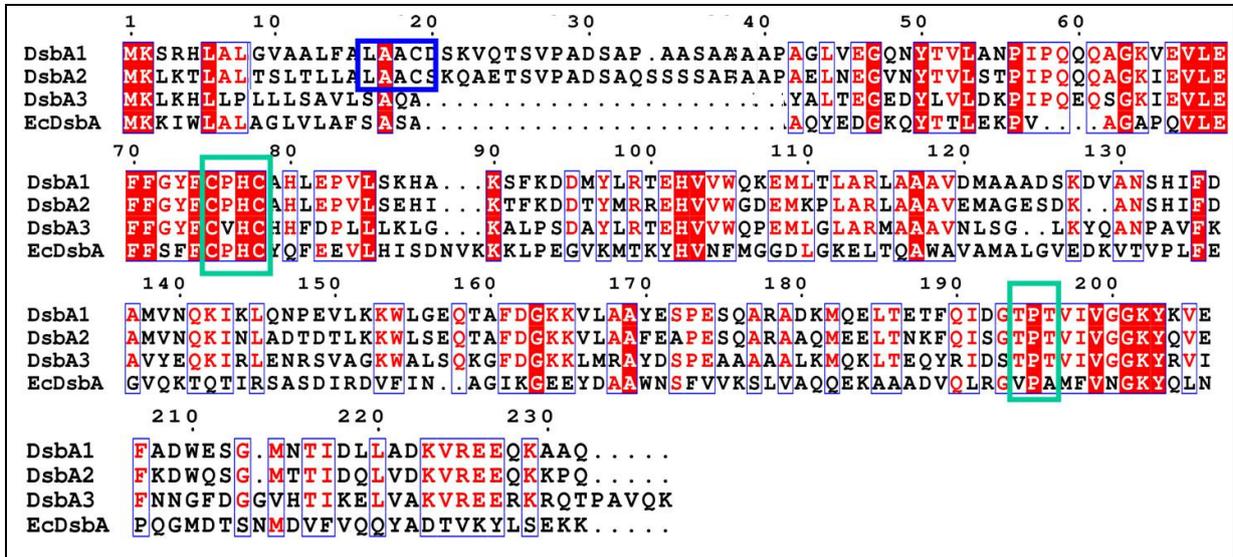


Figure 20 : Comparaison des séquences protéiques des DsbA de *N. meningitidis* et d'*E. coli*. DsbA1 (NMB0278), DsbA2 (NMB0294), DsbA3 (NMB0407) avec DsbA d'*E. coli*. Les acides aminés identiques entre les quatre DsbA sont surlignés en rouge et ceux qui sont conservés chez trois des quatre DsbA sont en rouge. Le motif actif CXXC et la *cis*-Proline sont indiqués par des cadres verts. Les séquences signal lipoprotéiques sont encadrées en bleu.

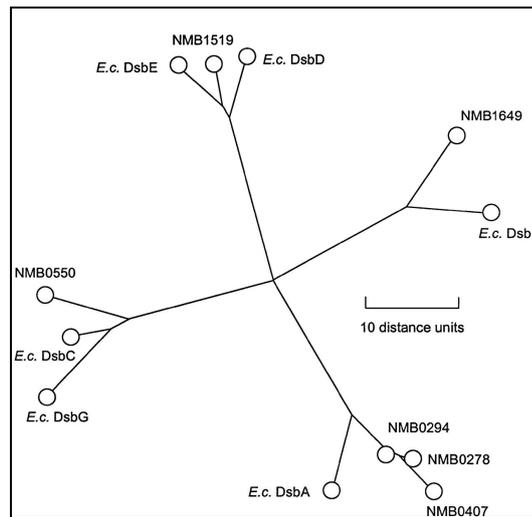


Figure 21 : Comparaison graphique des séquences des protéines Dsb. Toutes les séquences sont issues de GenBank.

L'équipe de J. S. Kroll a confirmé, sur la base de leurs séquences protéiques, que les trois gènes identifiés chez *N.meningitidis* codaient bien pour des homologues à EcDsbA. Pour cela, ils ont représenté les pourcentages d'identités entre chacune des séquences protéiques graphiquement (Figure 21).

Les séquences des NmDsbA sont proches entre elles et avec celle de EcDsbA.

III.2. Comparaison et analyse des séquences protéiques des trois NmDsbA

L'alignement des séquences des trois NmDsbA avec leur homologue EcDsbA est représenté Figure 20.

Les cadres ouverts de lecture des NmDsbA commencent toutes par une séquence N-terminale caractéristique d'un peptide signal pour le périplasme. DsbA1 et DsbA2 possèderaient en plus un ancrage membranaire alors que DsbA3 serait soluble dans le périplasme. Ces localisations ont été confirmées par X. Nassif et al (2004).

L'identité de séquences entre les trois NmDsbA et EcDsbA est d'environ 20 % et concerne essentiellement la région du site actif.

DsbA1 et DsbA2 ont la séquence catalytique de EcDsbA : CPHC. Les deux lipoprotéines partagent 73% d'identités de séquence et sont composées de 230 acides aminés environ ce qui suggère que ces deux gènes résulteraient d'une duplication. Ceci est en accord avec le contenu en (G+C) des gènes *dsbA1* et *dsbA2* qui est identique (56.47 %) et plus élevé que le contenu moyen en (G+C) du génome entier de *N. meningitidis* (53.7 % pour la souche MC58) et considérablement plus élevé que celui de *dsbA3* (49.22 %). La séquence protéique de DsbA3 est composé de 214 acides aminés seulement et a un site catalytique légèrement différent, CVHC. DsbA3 partage 50 % d'identité de séquence avec les deux autres NmDsbA. La région du site actif est également similaire avec celles de DsbA1 et DsbA2.

III.3. Le système Dsb de *Neisseria meningitidis* est-il original ?

A) Parmi les bactéries à Gram-négatif ?

L'analyse des génomes de bactéries à Gram-négatif disponibles a montré que la présence de plusieurs gènes *dsbA* n'était pas limitée à *N. meningitidis*. Bien que la plupart des bactéries étudiées n'aient qu'un seul gène *dsbA*, les exemples de génomes possédant deux gènes ne sont donc pas rares. *N. meningitidis* est originale avec trois gènes mais *Shewanella*

oneidensis avec quatre gènes *dsbA* est un cas encore plus extrême. (Tableau 2) Ces études ont également montré que bien que la plupart des DsbA soient périplasmiques, certains homologues chez les bactéries à Gram-négatif seraient membranaires comme DsbA1 et DsbA2.

Tableau 2 : Homologues à EcDsbA chez les bactéries à Gram-négatif. (Tinsley et al. 2004)

Espèces (souches)	Classe de proteobacteria	N° du gène	<i>E</i>	Lipobox des séquences signal des lipoprotéines potentielles
<i>Campylobacter jejuni</i> (NCTC 11168)	ε	6968312	3×10^{-8}	
<i>Caulobacter crescentus</i> (CB15)	α	16124630	4×10^{-4}	LAA-C ₍₂₁₎
<i>Escherichia coli</i> (K12)	γ	1790291		
<i>Geobacter metallireducens</i>	δ	23053477	6×10^{-8}	
<i>Haemophilus influenzae</i> (Rd KW20)	γ	1573860	2×10^{-47}	
<i>Neisseria meningitidis</i> (MC58)	β	7225518	5×10^{-15}	LAA-C ₍₁₉₎
		7225503	3×10^{-9}	LAA-C ₍₁₉₎
		7225629	8×10^{-11}	
<i>Nitrosomonas</i> (ATCC 19718)	β	30248383	7×10^{-8}	
<i>Pasteurella multocida</i> (PM70)	γ	12722222	8×10^{-45}	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)	γ	15600682	3×10^{-18}	
<i>Pseudomonas putida</i> (KT2440)	γ	26986872	2×10^{-17}	
<i>Pseudomonas syringae</i> (pv. tomato str. DC3000)	γ	28867572	5×10^{-19}	
<i>Ralstonia solanacearum</i>	β	17427294	3×10^{-11}	
		17431370	9×10^{-10}	
<i>Rickettsia conori</i> (M7)	α	15619063	6×10^{-4}	LSS-C ₍₁₇₎
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	γ	16422558	1×10^{-103}	
		16421749	11×10^{-14}	
<i>Shewanella oneidensis</i> MRI	γ	24371931	3×10^{-34}	
		24375215	6×10^{-20}	
		24374389	2×10^{-17}	
		24375360	8×10^{-11}	
<i>Shigella flexneri</i> (2a_301)	γ	24115149	1×10^{-118}	
<i>Vibrio cholerae</i> (N16961)	γ	9654427	2×10^{-39}	
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. campestris str. ATCC 33913)	γ	21232829	2×10^{-10}	LVA-C ₍₁₉₎
		21232828	3×10^{-10}	LAA-C ₍₂₀₎
<i>Xylella fastidiosa</i> (Temecula1)	γ	28198567	4×10^{-13}	LVA-C ₍₁₉₎
		28198666	3×10^{-8}	
<i>Yersinia pestis</i> (CO92)	γ	15978131	7×10^{-84}	

Pour chaque homologue à EcDsbA la présence du motif CXXC et de la *cis*-Proline conservée est contrôlée. Pour les homologues lipoprotéiques, la Lipobox et la position de la cystéine conservée (entre parenthèses) sont indiquées

B) Parmi les bactéries du genre *Neisseria* ?

J.S. Kroll et son équipe ont étudié la présence de gènes potentiels *dsbA* parmi les génomes séquencés complètement des bactéries du genre *Neisseria* (Sinha et al. 2004) (Tableau 3).

N. meningitidis est la seule *Neisseria* à posséder trois gènes *dsbA* quel que soit le sérotype étudié (A, B et C). De façon surprenante, les *Neisseria* qui ont deux gènes *dsbA* ne possèdent pas le gène spécifique du méningocoque *nmb0294*, alors que les *Neisseria* qui possèdent un seul gène *dsbA* ont uniquement le gène spécifique du méningocoque.

Espèces	<i>nmb0278 probe</i>	<i>nmb0294 probe</i>	<i>nmb0407 probe</i>
<i>N. meningitidis</i> (sérotype B)	+	+	+
<i>N. meningitidis</i> (autres sérotypes)	+	+	+
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	+
<i>N. lactamica</i>	+	-	+
<i>N. cinerea</i>	+	-	+
<i>N. polysaccharea</i>	+	-	+
<i>N. flava</i>	-	+	-
<i>N. subflava</i>	-	+	-
<i>N. flavescens</i>	-	+	-
<i>N. sicca</i>	-	-	-
<i>N. mucosa</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-

Tableau 3 : Distribution des gènes homologues à *dsbA* du méningocoque parmi les différents génomes de *Neisseria*. (Sinha et al. 2004)

III.4. Premières caractérisations des DsbA de *N. meningitidis*

A) Localisations membranaires des deux lipoprotéines DsbA1 et DsbA2

DsbA1 et DsbA2 sont des lipoprotéines, cependant dans le périplasme elles peuvent être ancrées soit à la membrane interne soit à la membrane externe. Chez *E. coli*, il a été montré que cette localisation serait déterminée par la nature de l'acide aminé qui suit la

cystéine qui subit la lipidation. Ainsi, DsbA2 qui a une sérine à cette position devrait être ancrée à la membrane externe, alors que DsbA1 qui possède un résidu aspartate devrait être ancrée à la membrane interne. L'équipe de X. Nassif a démontré, par fractionnement cellulaire, que cette règle n'est pas respectée chez *N. meningitidis* car les deux lipoprotéines DsbA1 et DsbA2 sont attachées à la membrane interne (Tinsley et al. 2004).

B) Etudes des fonctions *in vivo* des NmDsbA

1. Analyse mutationnelle chez *N. meningitidis*

L'équipe de X. Nassif a entrepris des analyses mutationnelles chez *N. meningitidis* pour mieux caractériser les rôles biologiques des trois NmDsbA. Pour cela ils ont construit différentes souches de *N. meningitidis* simple, double ou triple mutantes pour les gènes *nmdsbA* et ont étudié les phénotypes correspondant. Ils ont montré que :

- Seule la délétion simultanée des trois gènes *nmdsbA* affectait la croissance de *N. meningitidis* à 37°C.
- L'expression de l'une des deux lipoprotéines (mais pas DsbA3) était suffisante pour la croissance de *N. meningitidis* en conditions réductrices.
- L'expression de l'une des deux lipoprotéines (mais pas DsbA3) était suffisante pour la biogénèse du pilus de type IV.

En conclusion, cette étude mutationnelle indique que les trois NmDsbA auraient des fonctions d'oxydase *in vivo* (puisque seul le mutant triple ne peut pousser à 37°C). Cependant parmi ces trois enzymes, seules les deux lipoprotéines peuvent rétablir un phénotype *dsbA* sauvage et affectent la virulence de la souche. DsbA3 aurait une faible activité oxydoréductase et sa spécificité de substrat serait différente par rapport aux deux lipoprotéines.

- **Altération de la compétence naturelle chez *N. meningitidis* délétée des gènes *dsbA1* et *dsbA2***

Une étude complémentaire a été effectuée par l'équipe de J.S. Kroll à l'Impérial College (Londres) sur l'origine de la perte de compétence naturelle de la souche *N. meningitidis* dont les gènes *dsbA1* et *dsbA2* ont été délétés (Sinha et al. 2008). Ils ont montré que ce défaut n'était pas relié à une efficacité moindre de DsbA3 en tant qu'oxydoréductase

car sa surexpression chez *N. meningitidis* ne changeait rien, confirmant l'hypothèse d'une différence de spécificité de substrat chez les trois NmDsbA.

La compétence naturelle de *N. meningitidis* est dépendante de l'expression du pilus de type IV qui est expulsé et rétracté par la sécrétine de la membrane externe PilQ. J.S. Kroll et son équipe ont montré que les deux lipoprotéines DsbA1 et DsbA2 pouvaient se lier spécifiquement à PilQ. De plus, la délétion des deux gènes *dsbA1* et *dsbA2* diminue les taux d'expression de PilQ confirmant l'implication de DsbA1 et DsbA2 dans le repliement de PilQ, alors que l'expression du pilus n'est apparemment pas modifiée. La sécrétine PilQ est impliquée dans la liaison de l'ADN et la mobilité de la bactérie. Les altérations des gènes *dsbA1* et *dsbA2* entraînent un défaut de liaison à l'ADN et de son incorporation chez la bactérie qui serait due à un mauvais repliement de PilQ.

2. Analyse mutationnelle chez *E. coli*

L'équipe de J.S. Kroll a effectué un second type d'analyses pour évaluer les rôles biologiques des NmDsbA. Ils ont ainsi étudié les capacités de chacun des gènes *nmdsbA* à rétablir plusieurs phénotypes sauvages chez une souche d'*E. coli* privée de son gène *dsbA* (notée JCB571). Ils ont montré que :

- Seule la souche JCB571 transformée avec *dsbA1* est motile.

Comme le montre la Figure 22, la motilité de la souche JCB571 est nettement diminuée car le flagelle n'est pas fonctionnel. Par contre la souche JCB571 complétementée par le gène *dsbA1* a un phénotype de motilité similaire à celui de la souche sauvage (JCB570) (Figure 22).

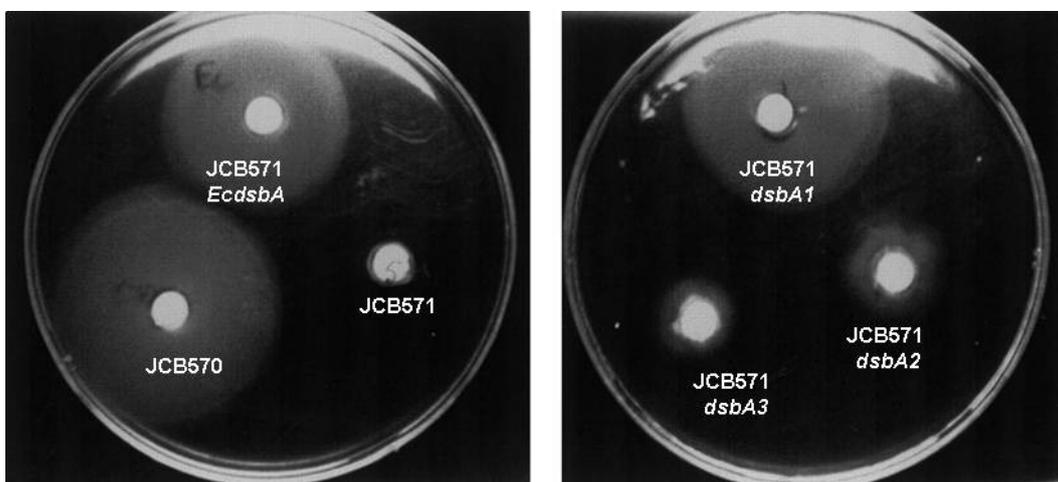


Figure 22: Test de motilité sur du LB agar.(Sinha et al. 2004)

Une étude récente portant uniquement sur DsbA3 a montré que le défaut de nage de la souche JCB571 transformée avec le plasmide contenant *dsbA3* serait probablement dû à un faible taux d'expression de DsbA3 (Vivian et al. 2008). Lorsque la souche JCB571 est complémentée avec le gène de *dsbA3* cloné dans un plasmide d'expression avec un promoteur fort, la motilité de la souche transformée est rétablie. Par conséquent DsbA3 aurait la capacité de former le pont disulfure sur FlgI mais avec une activité plus faible que DsbA1 et DsbA2.

- DsbA1 et plus faiblement DsbA2 peuvent rétablir le repliement correct de la phosphatase alcaline d'*E. coli*.

La phosphatase alcaline est une enzyme périplasmique contenant un pont disulfure essentiel à son activité enzymatique. La souche JCB571 a une activité phosphatase alcaline diminuée en comparaison à la souche sauvage. La souche JCB571 qui possède *dsbA1* a une activité phosphatase alcaline similaire à la souche sauvage, celle qui possède *dsbA2* complémente seulement partiellement ce défaut d'activité tandis que celle qui a *dsbA3* n'a pas d'activité phosphatase alcaline.

- Seule DsbA2 peut catalyser la formation de ponts disulfures sur la protéine fusion MalF-LacZ λ 102.

Les souches d'*E. coli* sauvage et mutante pour *dsbA* utilisées pour cette étude sont NLM142 et NLM117. Celles-ci ont la capacité d'exprimer la protéine fusion MalF-LacZ λ 102 qui, en présence de DsbA, est bien repliée et confère un phénotype *lac*⁻. En absence de DsbA le phénotype sera *lac*⁺. Seule la souche NLM117 exprimant DsbA2 a une activité β -galactosidase comparable à la souche sauvage NLM142.

- Les gènes *nmdsbA* peuvent tous rétablir la résistance au DTT d'une souche *E. coli dsbA*⁻.

E. coli sans DsbA est incapable de croître en présence de DTT. Les souches JCB571 qui possèdent au moins l'un des trois gènes *nmdsbA* peuvent pousser en présence de DTT.

Cette étude de complémentation du phénotype *dsbA*⁻ chez *E. coli* suggère donc que les trois NmDsbA ont bien des activités DsbA quand elles sont exprimées chez *E. coli* (résistance au DTT) mais que leur spécificité semblerait différente.

Neisseria meningitidis est la seule des *Neisseria* à posséder trois homologues à DsbA. Les résultats obtenus par les équipes de J.S Kroll et X. Nassif (Sinha et al. 2004; Tinsley et al. 2004; Sinha et al. 2008) ont mis en évidence l'implication des deux lipoprotéines DsbA1 et DsbA2 dans le phénomène de virulence mais n'ont pas encore pu déterminer le rôle de DsbA3. Ces études ont également montré que les trois enzymes avaient des spécificités de substrat *in vivo* assez différentes entre elles.

Mon travail de thèse a donc eu pour but de faire les études fonctionnelles et structurales des trois NmDsbA afin de répondre aux questions suivantes :

- **Existe t'il des différences entre ces trois enzymes ?**
- **Quelles sont leurs spécificités ?**
- **Quels sont leurs rôles dans la cellule?**
- **Pourquoi *Neisseria meningitidis* possède t'elle trois DsbA ?**

Ce travail devait initialement comprendre deux phases :

1) Une phase « moléculaire » comprenant :

- La caractérisation atomique de chaque enzyme afin de mettre en évidence des différences structurales potentiellement impliquées dans la spécificité de chaque enzyme.
- La caractérisation de leur propriété biochimique, c'est-à dire leur propriété redox, leur interaction avec DsbB, leur stabilité sous forme réduite et oxydée afin de mettre l'accent sur leur différence et expliquer les phénotypes observés chez *Neisseria* par Tinsley et al (2004).

2) Une phase cellulaire chez *Neisseria* pour isoler des partenaires cellulaires propres à chaque enzyme en collaboration avec J.S. Kroll à Londres qui a les équipements nécessaires pour manipuler des souches pathogènes comme peut l'être *Neisseria meningitidis*. Cette dernière étude n'a pas donné les résultats escomptés.

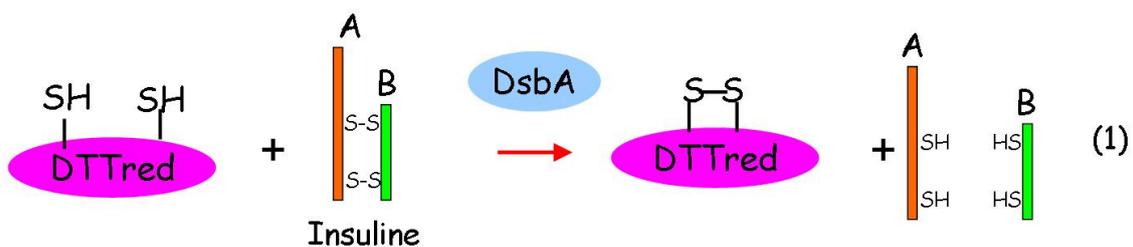
Principes Expérimentaux

Les principes expérimentaux utiles à la compréhension des expériences réalisées durant ce travail sont détaillés dans ce chapitre.

I. Etudes biochimiques des DsbA de *Neisseria meningitidis*

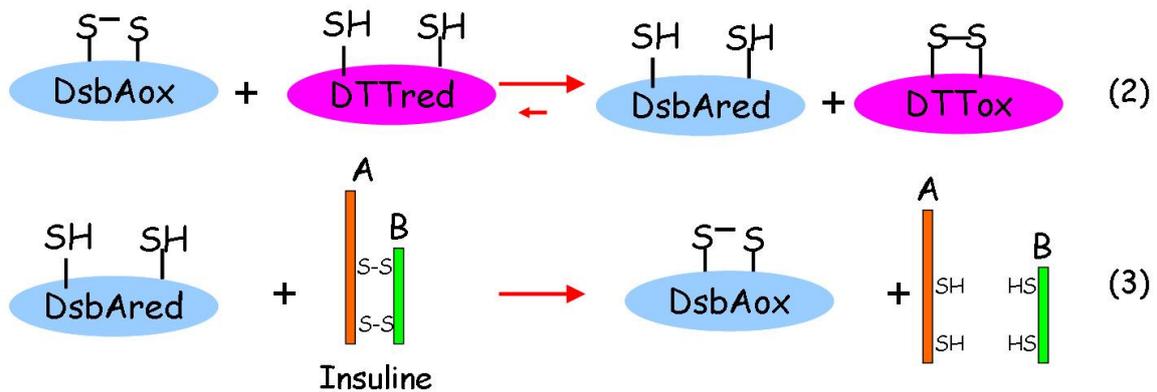
I.1. Mesure de l'activité insuline réductase

Les enzymes de la famille des oxydoréductases de thiol-disulfure catalysent l'échange de ponts disulfures entre une source de disulfure et des groupements thiols libres. La source de disulfure peut être une petite molécule comme le glutathion oxydé ou un pont disulfure présent au sein d'une protéine. L'activité enzymatique de cette famille d'enzymes peut être suivie par un test de spectroscopie UV rapide, développé par Holmgren et son équipe pour l'étude de la TRX d'*E. coli* (Holmgren 1979). Ce test mesure la capacité de l'enzyme à catalyser la réduction de l'insuline en présence de l'agent réducteur DTT (réaction (1)). L'insuline est composée de deux chaînes polypeptidiques A et B reliées par deux ponts disulfures. Lorsque ces ponts sont rompus, la chaîne B libérée est insoluble et sa précipitation est mesurée par spectrophotométrie en suivant l'augmentation de la turbidité à 650 nm (réaction (1)).



Le mécanisme précis de la réaction (1) décrit par Holmgren est applicable aux autres oxydoréductases comme les DsbA. Il se produit un mécanisme « ping pong » entre les deux réactions partielles (2) et (3) dans lesquelles l'insuline et le DTT sont les deux substrats de l'enzyme.

Le DTT en excès réduit très rapidement l'oxydoréductase (réaction (2)) qui va à son tour réduire l'insuline par un échange de ponts disulfures (réaction (3)) environ 4 fois plus rapidement que le DTT seul. Dans le cas de DsbA, ce test n'est pas adapté pour mesurer son activité oxydase mais son activité réductase, nettement moins importante que pour la TRX. Ce test simple permet de vérifier que l'enzyme a une activité d'échange de ponts disulfures et sera utilisé pour s'assurer de l'activité des protéines en fin de purification, comme contrôle de routine.



I.2. Détermination de l'état redox

L'état d'oxydoréduction des résidus cystéines d'une protéine peut être identifié par leur réaction avec l'AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid) (Zander et al. 1998; Jakob et al. 1999) ou le réactif d'Ellman: le DTNB ((5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)).

A) Méthode de l'AMS

L'AMS, molécule de 490 Daltons, va se lier de façon covalente avec les groupements thiols libres (SH) de la protéine, et augmenter à chaque alkylation le poids moléculaire de la protéine de 490 Da. Cette modification peut être visualisée par gel d'électrophorèse (Figure 23 : comparaison bandes 1 et 2). La forme oxydée n'est pas sensible à l'alkylation par l'AMS, sa mobilité électrophorétique n'est donc pas modifiée (Figure 23 : bandes 3 et 4), ce qui permet de la différencier de la forme réduite.

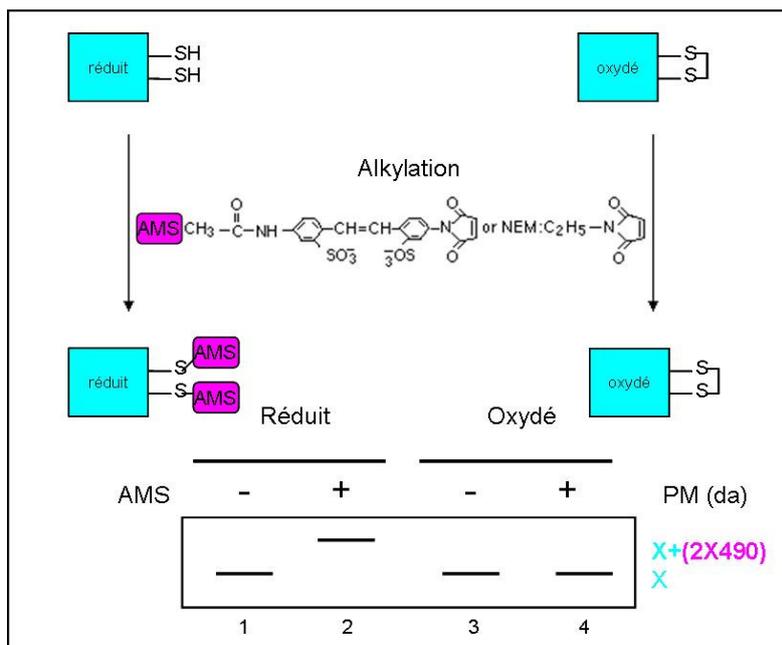


Figure 23 : Représentation schématique de la réaction d'alkylation par l'AMS.

L'alkylation des groupements thiols libres de la protéine sous sa forme réduite par l'AMS induit une augmentation de son poids moléculaire qui peut être visualisé sur un gel d'électrophorèse (comparaison bandes 1 et 2). La forme oxydée n'est pas sensible à l'alkylation par l'AMS, sa mobilité électrophorétique n'est donc pas modifiée (comparaison bandes 3 et 4).

B) Test d'Ellman

La méthode d'Ellman (Ellman 1959) permet de déterminer le contenu en groupements thiols libres d'une protéine en solution par une réaction colorimétrique. Le réactif d'Ellman ou DTNB réagit avec les extrémités -SH libres pour donner un produit coloré jaune à 412 nm: le TNB (Figure 24). Cette méthode est rapide et directe. Elle sera utilisée en complément de la méthode de l'AMS ou pour vérifier la bonne réduction ou oxydation des DsbA en vue des analyses biochimiques.

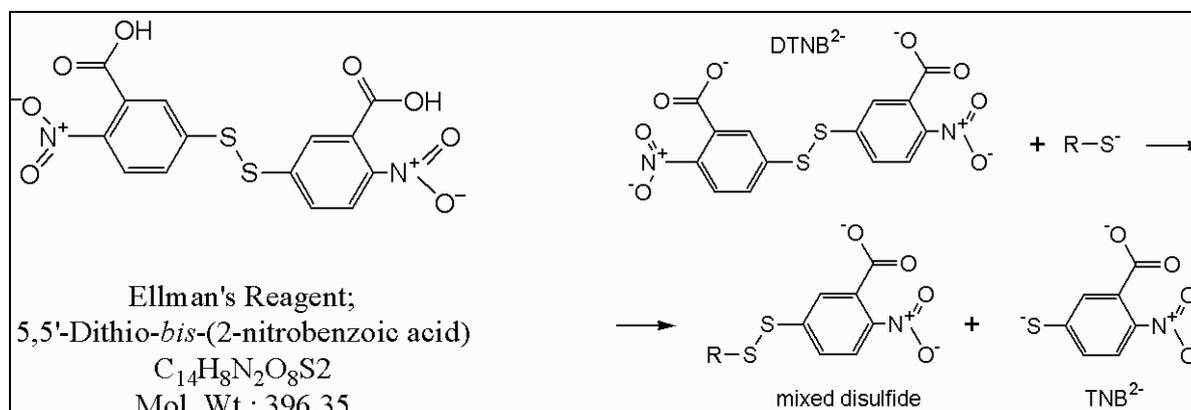


Figure 24: Réaction d'Ellman avec le DTNB

I.3. Détermination des potentiels redox

A) Définitions

1. Potentiel redox ou d'oxydoréduction :

C'est une grandeur empirique exprimée en volt et notée « E ». Cette mesure est appliquée aux couples d'oxydoréduction pour prévoir la réactivité des espèces chimiques entre elles. Par convention, le potentiel standard « E° » est mesuré par rapport au couple (eau/hydrogène) (H⁺/ H₂), de potentiel nul.

▪ Réaction d'oxydoréduction :

C'est une réaction chimique au cours de laquelle se produit un transfert d'électrons. L'atome qui capte les électrons est appelé « oxydant » ; celui qui les cède est le « réducteur ».

La référence du potentiel d'oxydoréduction est celui de l'eau pure, conventionnellement fixé à zéro. Les valeurs caractéristiques des potentiels pour des protéines sont de l'ordre du mV.

▪ Equation de Nernst :

Elle permet de calculer le potentiel d'un couple redox.

Soit la demi-pile :	a et b : les coefficients stœchiométriques
$a \text{ Ox} + n e^- \rightleftharpoons b \text{ Red}$	n : le nombre d'électrons échangés

L'équation de Nernst s'écrit :	- E : le potentiel en Volt
	- E° : le potentiel standard en Volt
$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]^a}{[\text{Red}]^b}$	- R : constante des gaz parfaits = 8,3145 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
	- T : la température en Kelvin (K)
	- F : la constante de Faraday = 96 485 C·mol ⁻¹
	- n : le nombre d'électrons échangés

2. Equation de Nernst pour un système redox :

$a \text{ Ox}_1 + b \text{ Red}_2 + n e^- \rightleftharpoons c \text{ Red}_1 + d \text{ Ox}_2$	
Avec a, b, c et d les coefficients stœchiométriques, n le nombre d'électrons échangés.	
$E = E^\circ + \frac{0.06}{n} \ln \frac{[\text{Ox}_1]^a [\text{Red}_2]^b}{[\text{Red}_1]^c [\text{Ox}_2]^d}$	
Avec RT/F = 0.06	

B) Méthode de l'équilibre avec le glutathion et analyse par fluorimétrie

Dans ce paragraphe, le principe de cette méthode sera expliqué en prenant comme exemple DsbA d'*E. coli* (Zapun et al. 1993).

1. Principe de la fluorescence :

La fluorescence moléculaire est un processus d'émission dans lequel des molécules, comme des poly-aromatiques ou hétérocycle, sont excitées à l'état S_1' par absorption d'un rayonnement électromagnétique ($h\nu_{EX}$). Les espèces reviennent à leur état fondamental en libérant l'excès d'énergie sous forme de photons ($h\nu_{EM}$) (Figure 25).

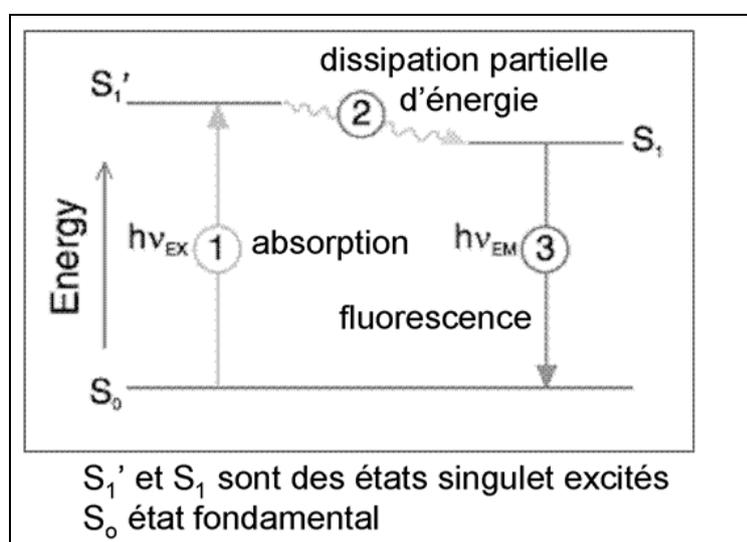


Figure 25 : Diagramme de Jablonski des états électroniques pour la fluorescence.

En fluorimétrie, le seuil de détection d'un composé fluorescent en solution est souvent 1000 fois plus faible qu'en absorption UV/visible (colorimétrie). Les composés qui contiennent des noyaux aromatiques produisent l'émission fluorescente moléculaire la plus intense et donc la plus utilisée. Le rendement quantique de fluorescence moléculaire, noté Φ , est le rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre total de molécules excitées (ou le rapport entre les photons émis et les photons excités). Pour des molécules très fluorescentes, Φ est environ égal à 1. Le Φ (Trp) et Φ (Tyr) sont égaux à 0.13 et 0.14, respectivement, et sont les plus élevés parmi les acides aminés (en comparaison Φ (Phe) = 0.02).

2. Fluorescence spécifique de DsbA d' *E. coli* :

DsbA d' *E. coli* a des propriétés de fluorescence différentes selon ses deux états redox. Sa fluorescence à 330 nm (excitation à 295 nm) est augmentée d'environ trois fois lorsque les cystéines de son site actif sont réduites (Figure 26A). Dans la forme oxydée de DsbA, la fluorescence du résidu W76 est éteinte par un processus dynamique intramoléculaire qui implique un transfert d'énergie de W76 via F26 jusqu'au pont disulfure (Figure 26B).

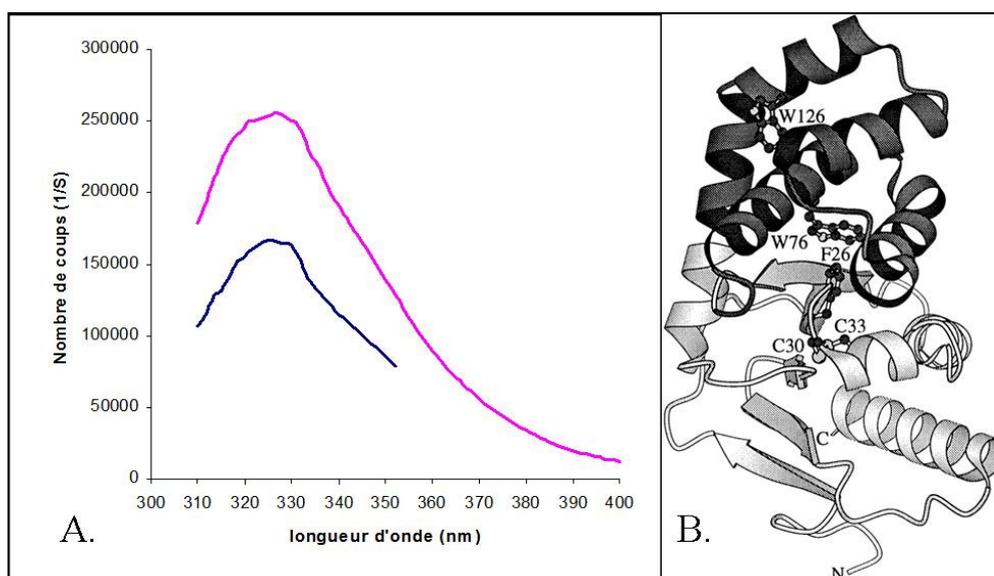
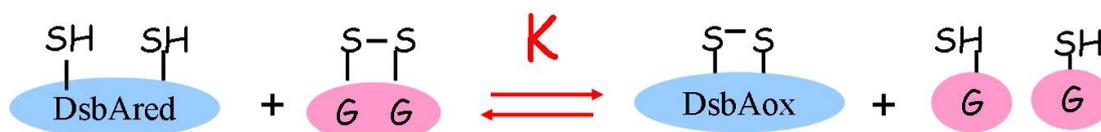


Figure 26 : Propriétés de fluorescence de DsbA d' *E. coli*.

A. Spectre d'émission de fluorescence de DsbA d' *E. coli* réduite (rose) et oxydée (bleu). B. Structure cristallographique de DsbA d' *E. coli* oxydée (Martin *et al.*, 1993). Le domaine TRX et le domaine hélicale sont en blanc et noir, respectivement. Les chaînes latérales des cystéines et des tryptophanes et de F26 sont représentées (Hennecke *et al.* 1997).

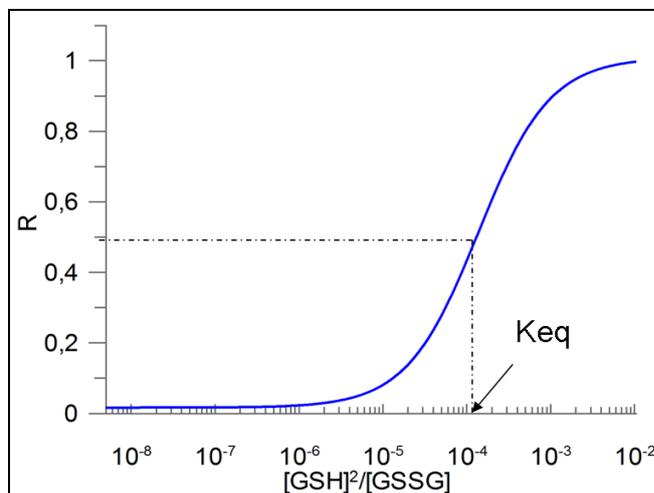
3. Principe de la mesure du potentiel d'oxydoréduction d'EcDsbA par équilibre avec le glutathion et par fluorimétrie :

DsbA est incubée avec des solutions composées de 0.1 mM de glutathion oxydé (GSSG) et différentes concentrations en glutathion réduit (GSH) (0.2 μ M à 1 mM).



$$K = \frac{[\text{DsbA}_{\text{Ox}}][\text{GSH}]^2}{[\text{DsbA}_{\text{Red}}][\text{GSSG}]}$$

A l'équilibre, les proportions relatives des DsbA_{ox} et DsbA_{red} (R) seront mesurées en utilisant la fluorescence spécifique à 330 nm (excitation à 295 nm). La constante d'équilibre K est déterminée en appliquant aux valeurs obtenues l'équation précédente (Figure 27).



$$R = \frac{[\text{DsbA}_{\text{Ox}}]}{[\text{DsbA}_{\text{Red}}]} = \frac{[\text{GSH}]^2 \times [\text{GSSG}]}{K + ([\text{GSH}]^2 [\text{GSSG}])}$$

Figure 27 : Courbe de détermination de E°(EcDsbA) par équilibre avec le glutathion et par fluorimétrie

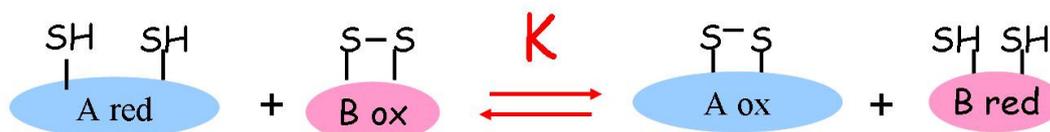
Le potentiel redox est calculé en utilisant l'équation de Nernst et la valeur de (-240 mV) comme potentiel standard du glutathion (Wunderlich et al. 1993a) :

$$E^{\circ}_{(\text{DsbA})} = E^{\circ}_{(\text{GSSG/GSH})} - \frac{RT}{2F} \ln K$$

C) Méthode de l'équilibre redox protéine-protéine

1. Equilibre redox « protéine-protéine »:

Cette méthode repose sur la réaction redox entre la protéine étudiée (protéine B) et une protéine dont le potentiel redox est connu (protéine A).



A l'équilibre, la mesure des proportions relatives des formes oxydées et réduites des deux protéines permet de calculer la constante d'équilibre K de la réaction puis le potentiel redox de A par la loi de Nernst (Huber-Wunderlich et al. 1998).

$K = \frac{[A_{Ox}][B_{Red}]}{[A_{Red}][B_{Ox}]}$	Loi de Nernst :	$\Delta E^{\circ}_{(A,B)} = E^{\circ}_A - E^{\circ}_B = \frac{RT}{nF} \times \ln K$
---	-----------------	---

La mesure des différentes espèces à l'équilibre se fait par HPLC en phase inverse. Le succès d'une telle méthode dépend de la non-spécificité des échanges des ponts disulfures entre les protéines, mais aussi de la qualité de l'arrêt de la réaction à l'équilibre et du dosage des différentes espèces en présence. Ces deux dernières étapes sont obtenues par acidification puis par séparation et quantification de chacune des espèces au cours d'une seule étape de chromatographie. Cette méthode a donc l'avantage d'être directe.

Il est également nécessaire de s'assurer que l'équilibre redox a bien été atteint entre les deux protéines en question. Pour cela, les constantes d'équilibre obtenues doivent être identiques pour chaque paire de protéines indépendamment de l'état redox du mélange initial (c'est-à-dire A_{Ox} et B_{Red} ou A_{Red} et B_{Ox}). Les temps d'éluion des protéines complètement réduites ou oxydées sont obtenus par injections séparées sur l'HPLC de quantités identiques de chacune des protéines.

2. HPLC en phase inverse pour la mesure des différentes espèces en présence.

La phase inverse est une phase normale, c'est-à-dire une phase composée de petites particules de silice, sur lesquelles ont été greffées des fonctions chimiques, le plus souvent de chaînes alkyles à 8 ou 18 atomes de carbone. Les fonctions silanols (Si-OH) qui sont restées libres engendrent des interactions hydrophiles parasites, qui rendent les résultats non reproductibles surtout pour les molécules basiques. Pour éviter cela, la surface de la silice est généralement recouverte par une fonction méthyle et les fonctions silanols ne sont plus libres mais sous la forme (Si-O-CH₃), cette étape est appelée "end-capping". Les fonctions chimiques utilisées pour le "end-capping" peuvent être de nature très diverses. Les colonnes de dernières générations peuvent résister à des pH extrêmes car l'étape de « end-capping » est effectuée avec des fonctions proposant une gêne stérique importante, telle que le tert-butyle (Si-O-C(CH₃)₃). Selon le taux de greffage, on obtient une plus ou moins grande résolution.

Cette phase est dite "inverse" car de polaire et hydrophile (sans les "greffes"), la phase devient apolaire et hydrophobe.

I.4. Détermination de la stabilité thermique par Thermal Shift Assay

La méthode « Thermal Shift Assay » (TSA) est basée sur l'utilisation d'un fluorophore comme indicateur de l'état de dénaturation de la protéine étudiée. L'une des sondes les plus utilisées est le SYPRO Orange dans le Diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les fluorophores utilisés possèdent une fluorescence faible dans les solvants de haute constante diélectrique comme l'eau et une grande fluorescence dans les solvants de faible constante diélectrique comme les solvants organiques. Du fait de cette propriété, ils constituent une sonde extrinsèque de l'état d'une protéine. En effet, les régions hydrophobes d'une protéine deviennent plus exposées au solvant lors du processus de dénaturation. Les protéines dénaturées possèdent donc de faibles propriétés diélectriques. Ainsi, la répartition du fluorophore autour de la protéine fournira un taux de fluorescence caractéristique de l'état de repliement de la protéine. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du SYPRO Orange sont respectivement de 470 nm et 570 nm.

La fluorescence détectée est représentée en fonction de la température T . La température mesurée au point d'inflexion de la courbe correspond à la transition de phase thermique vers la dénaturation de la protéine, notée T_m . Les résultats sont présentés sous la forme de la dérivée première des données brutes. La modification de la valeur de T_m dans différentes conditions est indicative d'un changement dans la stabilité de la protéine. Un déplacement de T_m vers les températures plus hautes témoigne d'une augmentation de la stabilisation de la protéine. A l'inverse, le T_m sera plus bas dans le cas d'une déstabilisation de la protéine (Geerlof et al. 2006) (Figure 28).

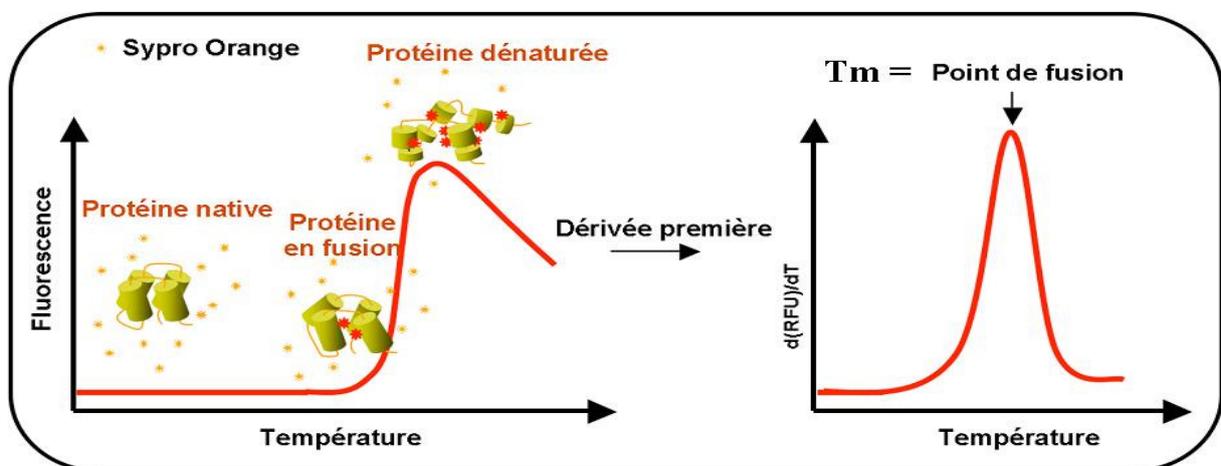


Figure 28 : Détection de fluorescence lors de transitions de phases thermiques chez les protéines.
(Rfu : unité arbitraire de fluorescence)

I.5. Détermination du pKa de la cystéine nucléophile par mesure de l'absorption du groupement thiol

L'ionisation du groupement thiol de la cystéine nucléophile en fonction du pH peut être suivie par mesure de l'absorbance spécifique de l'anion thiolate à 240 nm (Nelson et al. 1994).

Le pka peut est déterminé à partir de la courbe du pH en fonction du signal spécifique du thiolate ($S = (A_{240}/A_{280})_{red}/(A_{240}/A_{280})_{ox}$) qui est tracée selon l'équation de Henderson-Hasselbalch (Figure 29):

$$A_{exp} = A_{SH} + ((A_S - A_{SH}) / 1 + 10^{(pKa-pH)})$$

Avec : $A_{exp} = A_{240}/A_{280}$ représentant les données expérimentales, $A_{SH} = A_{240}/A_{280}$ correspond à la valeur de la forme protonée et $A_S = A_{240}/A_{280}$ celle de la forme déprotonée

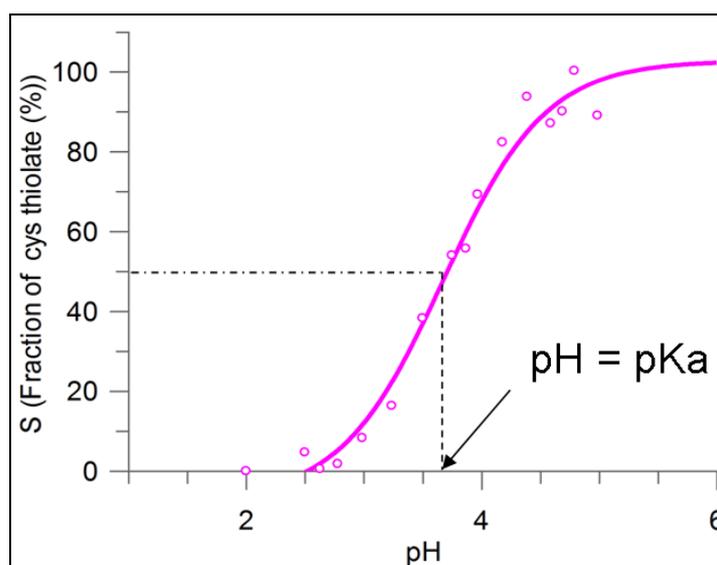


Figure 29 : Courbe de détermination du pKa d'EcDsbA

II. Expérience de spectroscopie RAMAN

II.1. Principe

La spectroscopie Raman est fondée sur un phénomène optique découvert par C.V. Raman, prix Nobel de physique en 1930.

Son principe est relativement simple : il consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon à étudier et à analyser la lumière diffusée. Lorsque l'on illumine un matériau que l'on veut analyser à l'aide d'un faisceau lumineux intense comme une source laser monochromatique, une faible fraction des photons est diffusée de façon inélastique par les molécules constituant le matériau avec une longueur d'onde décalée par rapport à la longueur d'onde d'excitation. Des échanges énergétiques entre photons et molécules s'instaurent, et l'énergie gagnée (correspondant à la diffusion anti-Stokes) ou perdue (diffusion Stokes) par un photon diffusé est exactement complémentaire au changement énergétique vibrationnel de la molécule cible collisionnée (Figure 30). Il en découle que l'on peut sonder les différentes transitions vibrationnelles des molécules constituant le matériau étudié en analysant l'ensemble des décalages en longueur d'onde par rapport à la longueur d'onde d'excitation des photons diffusés.

L'ensemble de ces transitions vibrationnelles caractérisent la structure et la nature chimique des liaisons des molécules analysées ainsi que leur environnement proche.

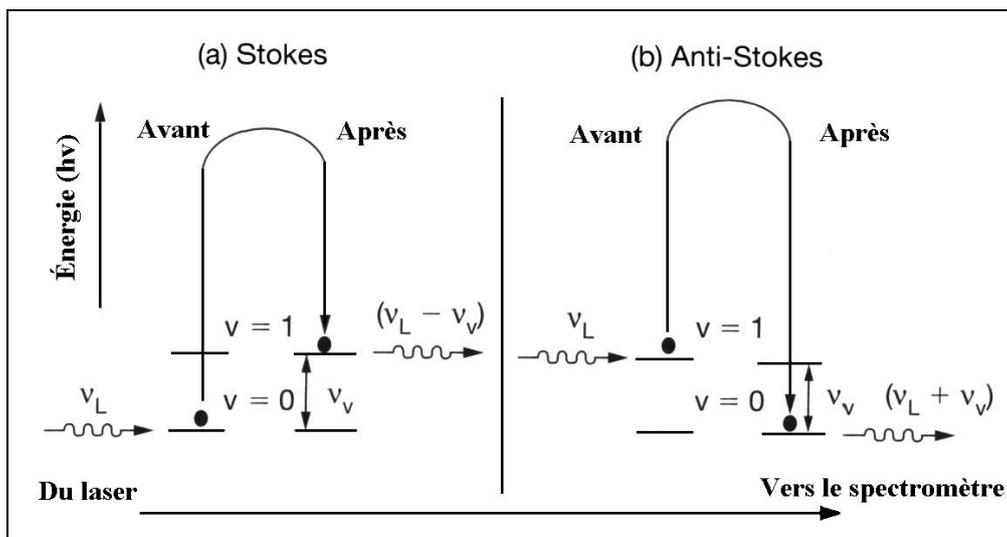


Figure 30 : Représentation simplifiée des processus de diffusion Raman donnant lieu aux bandes Stokes et anti-Stokes.

II.2. Pourquoi utiliser la spectroscopie Raman en biologie structurale ?

Dans le contexte de la biologie structurale, la spectroscopie Raman est utilisée en complément de la cristallographie. L'enregistrement de spectres Raman (supposé non destructif) avant et après l'expérience de diffraction permet de s'assurer de la validité de la structure résolue, potentiellement affectée par les rayons X au pouvoir très réducteur.

Cette complémentarité permet également d'identifier l'apparition de liaisons chimiques ou de ligands dans les macromolécules. Les spectres Raman fournissent alors des informations sur la nature chimique de ces nouvelles liaisons, leur densité électronique et sur leur morphologie et leur structure.

La spectroscopie Raman permet enfin de suivre les réactions directement « in crystallo », que l'on peut bloquer au cours des étapes intermédiaires par cryo-congélation pour en résoudre les structures par diffraction des rayons X. La liste des applications de la « Cristallographie-Raman » est bien évidemment non exhaustive.

III. Etudes cristallographiques des DsbA de *Neisseria meningitidis*

La résolution de la structure atomique des macromolécules implique l'utilisation d'ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde est de l'ordre de grandeur de l'atome. Dans le cas de la cristallographie aux rayons X, la longueur d'onde du rayonnement X utilisé est de l'ordre de l'Angström ($\text{\AA}=10^{-10}$ m).

III.1. Cristallogénèse

A) Les paramètres influençant la solubilité des protéines

La cristallisation d'une protéine est le passage de cette dernière d'un état soluble en solution vers un état solide organisé. Ceci s'effectue par une diminution de sa solubilité en fonction de facteurs tels que :

- La nature et la concentration des agents précipitants. On peut les séparer en trois familles majoritaires :
 - Les polymères qui agissent par exclusion du solvant au voisinage de la protéine. Les polymères de Poly-Ethylène Glycol (PEG) sont les plus utilisés.
 - Les sels non chaotropiques, non dénaturants pour les protéines, qui modifient la force ionique de la solution et augmentent les interactions hydrophobes entre les molécules de protéine en excluant le solvant. Le sulfate d'ammonium est le plus classique.
 - Les solvants organiques qui diminuent la constante diélectrique du milieu comme les petites molécules avec des fonctions alcools comme le Methyl-Pentane-Diol et l'isopropanol.

- Le pH de la solution;

- La nature et la concentration d'additifs ;

- La concentration de la protéine ;

- La température à laquelle s'effectue l'expérience.

B) Le diagramme de phases

Le diagramme de phases, présenté dans la Figure 31, est obtenu en faisant varier l'un des paramètres influençant la cristallisation comme ici la concentration en agent précipitant en fonction de la concentration de protéine et permet de définir plusieurs régions :

- La zone en dessous de la limite de solubilité de la protéine: la solution est sous-saturée et il n'y a pas de cristallisation possible.
- La zone métastable qui se trouve entre la limite de solubilité et la limite de précipitation. C'est la phase la plus importante pour la cristallogenèse puisque c'est dans cette phase que la nucléation et la croissance d'un cristal s'effectuent. La solution est dite « sur-saturée ».
- La zone de précipitation. Pour ces concentrations en protéine et précipitant, la protéine précipite.

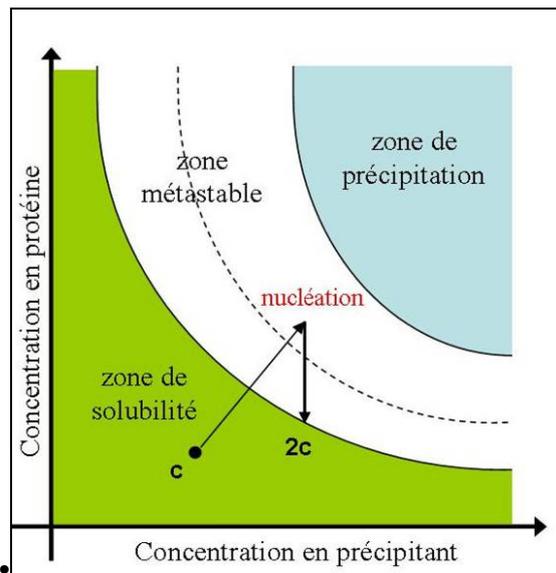


Figure 31 : Diagramme de phases du processus de cristallogenèse.

La flèche indique l'évolution des concentrations lors d'une expérience de cristallisation de diffusion en phase vapeur.

C) Technique de la goutte suspendue associée à la diffusion en phase vapeur

La cristallisation de diffusion en phase vapeur associée à la technique de la goutte suspendue est très utilisée (Wlodawer and Hodgson, 1975).

Son principe est le suivant : on dépose une goutte contenant la protéine purifiée et une concentration C_1 d'agent précipitant sur une lamelle siliconée pour éviter que la goutte ne s'étale sur la lamelle. Celle-ci est alors retournée sur un puits hermétiquement fermé par de la graisse au silicone. Le puits contient une solution réservoir d'agent précipitant à la

concentration C_2 différente de C_1 . En général, C_2 est deux fois plus concentrée que C_1 . Cette différence de concentration entre la goutte et le réservoir va progressivement diminuer grâce à l'échange vapeur entre les deux compartiments. Le volume de la goutte va diminuer et sa concentration en agent précipitant va augmenter jusqu'à atteindre celle de C_2 (Figure 31- Figure 32). Le système est alors à l'équilibre.

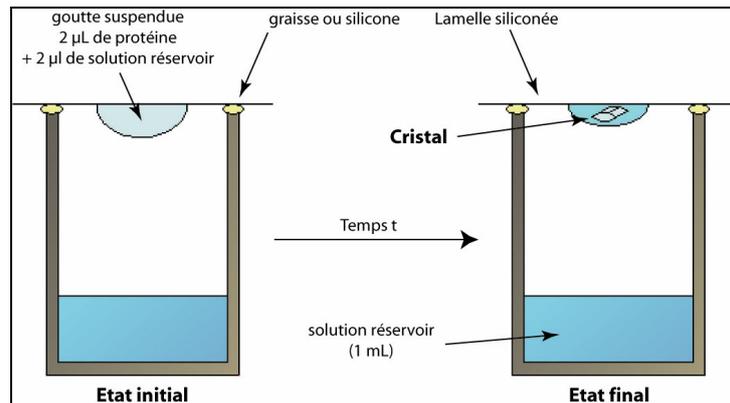


Figure 32: Principe de la diffusion en phase vapeur utilisant la goutte suspendue

Si les conditions de réservoir ont été bien choisies, il y aura apparition des premiers germes de cristallisation dans la goutte qui vont croître jusqu'à ce que la solution soit à l'équilibre (Figure 32).

III.2. Diffraction des rayons X par un cristal de protéine

A) Principe général

Un cristal se caractérise par sa périodicité. Il est constitué d'un motif (une ou plusieurs molécules de protéine, par exemple) qui se répète dans les trois dimensions de l'espace. C'est ce que l'on appelle la maille élémentaire du cristal. Celle-ci est décrite par trois vecteurs et trois angles. A l'intérieur de la maille, l'existence de relations de symétrie définit le système cristallin et le groupe d'espace auquel appartient le cristal.

La périodicité est l'élément essentiel du phénomène de diffraction. Les bases physiques de la diffraction sont expliquées dans de nombreux ouvrages comme celui de T. L. Blundell et L. N. Johnson (Blundell et al. 1976). Seuls les aspects généraux seront exposés ici.

L'onde diffractée par le cristal est la somme cohérente de la diffusion de l'onde par les couches électroniques de tous les atomes présents dans la maille élémentaire. Elle correspond donc à la transformée de Fourier de la densité électronique. Le rayonnement incident a une longueur d'onde du même ordre de grandeur que les distances inter-atomiques que l'on

cherche à mesurer, c'est pourquoi on utilise un faisceau de rayons X dont la longueur d'onde est d'environ $10^{-10}\text{m}=0.1\text{nm}=1\text{Å}$, pour étudier la structure atomique des protéines. Dans la pratique, le cristal est placé devant un faisceau de rayons X et le phénomène de diffraction est observé au niveau d'un détecteur. L'instrumentation et le traitement des données permettent de mesurer l'intensité des réflexions et leurs positions dans l'espace de diffraction. On enregistre des clichés de diffraction pour plusieurs orientations du cristal.

B) Le problème de la phase

L'étape finale d'une étude cristallographique est l'obtention de la densité électronique de la protéine, $\rho(x,y,z)$. Cette carte de densité est la transformée de Fourier des facteurs de structure $\mathbf{F}(hkl)$, vecteurs qui décrivent les ondes diffractées:

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} \mathbf{F}(hkl) e^{i\phi(hkl)} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Avec :

- x, y, z : les coordonnées des atomes de la protéine (espace réel) ; h, k, l : les indices de Miller associés aux réflexions dans l'espace réciproque;
- V : le volume de la maille ;
- $F(h,k,l)$: les modules des ondes diffractées dans la direction définie par h, k, l ;
- $\phi(hkl)$: les phases des ondes diffractées dans la direction définie par h, k, l .

Expérimentalement, on a accès aux modules des ondes diffractées mais pas à leurs phases. Il est donc impossible de calculer la densité électronique. L'information de phase n'est accessible que par des méthodes indirectes comme le remplacement moléculaire (MR), le remplacement isomorphe multiple (MIR), la diffusion anormale multiple (MAD).

1. Le remplacement moléculaire :

Cette méthode n'est applicable que s'il existe la structure tridimensionnelle d'une protéine homologue à celle que l'on étudie. Le but est de positionner le modèle atomique connu dans la maille du cristal étudié afin de pouvoir obtenir une première estimation des phases des facteurs de structure. Le problème consiste à trouver la matrice de rotation R et le vecteur de translation T permettant de positionner la protéine modèle dans la maille du cristal étudié dont on connaît les modules des facteurs de structure grâce à une expérience de

diffraction. On peut alors calculer une première carte de densité électronique avec les modules enregistrés par l'expérience.

2. Le remplacement isomorphe multiple :

La méthode du remplacement isomorphe passe par l'obtention d'un cristal dérivé qui comporte un ou plusieurs atomes lourds. Un atome lourd est caractérisé par une forte densité électronique. Il contribue de façon non négligeable à l'intensité diffractée totale.

Expérimentalement, l'obtention de cristaux dérivés est réalisée de deux manières : un cristal déjà formé est trempé dans une solution contenant l'atome lourd. L'atome lourd peut aussi être incorporé par co-cristallisation. Les cristaux natifs et dérivés doivent être isomorphes, c'est-à-dire que la présence de l'atome lourd ne doit modifier ni la maille, ni la symétrie, ni la position de la protéine.

La différence de signal mesurée sur les intensités enregistrées sur les cristaux natifs et dérivés permet d'évaluer les positions (x, y, z) des atomes lourds. On procède par la fonction de Patterson, fonction d'auto-corrélation de la carte de densité électronique, qui met en évidence les vecteurs interatomiques. Dans une carte de différence de Patterson, les vecteurs interatomiques correspondant aux atomes lourds constituent les pics principaux. Connaissant les positions des atomes lourds, on peut calculer les modules et les phases des facteurs de structure correspondant aux atomes lourds et remonter aux phases de la protéine native.

3. La diffusion anormale :

La diffusion anormale est due à l'interaction entre les photons incidents et les électrons proches du noyau. Une partie de l'énergie des photons est alors absorbée à des seuils précis, pour un type d'atome donné. La méthode de diffusion anormale multiple consiste à enregistrer plusieurs jeux de données sur un même cristal, à différentes longueurs d'onde, voisines des seuils d'absorption du diffuseur anormal. Cette stratégie permet de déterminer les positions des atomes responsables du signal anormal et, comme pour la méthode MIR, de remonter aux phases de la protéine. La méthode MAD ne fait appel qu'à un seul cristal et pallie donc les problèmes potentiels de non-isomorphisme de la méthode MIR. Le signal anormal d'un atome lourd peut également être combiné avec son signal isomorphe pour obtenir des phases initiales plus précises encore.

C) De la carte de densité électronique au modèle structural

La connaissance des amplitudes et des phases des facteurs de structure permet de tracer la carte de densité électronique de la protéine. Ces phases et donc la carte de densité électronique peuvent être améliorées en appliquant des méthodes de modification comme l'aplatissement du solvant. Celui-ci permet de réduire la densité du « bruit de fond » (le solvant) pour augmenter le signal correspondant à la chaîne polypeptidique. Il reste alors à construire le modèle atomique dans la carte de densité résultante. Le modèle final est obtenu par des alternances de calculs de minimisation d'énergie et de dynamique moléculaire avec des corrections manuelles ajustant les positions (x, y, z) et leurs facteurs d'agitation thermique (B) de façon à augmenter l'accord entre les données théorique (F_{calc}) et les données expérimentales (F_{obs}).

D) La qualité du modèle structural

La qualité des données et du modèle final est évaluée par différents facteurs expérimentaux comme :

- *La limite de résolution :*

La résolution correspond à la distance minimale, exprimée en Å, séparant deux informations que l'on parvient à discerner.

- *Le facteur R_{sym} :*

Le facteur R_{sym} reflète l'accord entre les intensités des réflexions équivalentes par symétrie et doit être le plus faible possible. Il est exprimé de la façon suivante :

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

▪ *La complétude :*

La complétude exprime le nombre de réflexions expérimentalement mesurées par rapport au nombre théorique attendu.

▪ *La redondance :*

La redondance traduit le nombre de mesures faites sur un type de réflexion unique. Plus une réflexion est redondante et plus l'information moyennée sera précise.

Un modèle est construit à partir des données expérimentales. Sa compatibilité avec la stéréochimie des acides aminés est contrôlée par le calcul des déviations des valeurs des angles de liaison et des distances interatomiques par rapport aux valeurs standards. La validité du modèle est également évaluée par le tracé du diagramme de Ramachandran qui rend compte des valeurs permises des angles de torsions φ et ψ de la chaîne peptidique.

Les facteurs R traduisent le pourcentage d'accord entre les amplitudes des facteurs de structure observés dans l'expérience et de ceux calculés d'après le modèle. Ils sont exprimés de la manière suivante :

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

Le facteur R_{factor} prend en compte toutes les données expérimentales utilisées lors de l'affinement du modèle alors que le facteur R_{free} ne fait intervenir qu'une partie de ces données : en général entre 5 et 10 % des données collectées ne sont jamais prise en compte dans l'étape d'affinement, ceci pour s'affranchir du biais inhérents à la méthode d'affinement qui tend toujours à diminuer la différence entre les modules observés et calculés.

Pour résumer, le modèle est d'autant plus proche de la réalité expérimentale que les valeurs de ces deux facteurs sont faibles. On admet que des valeurs de l'ordre de 20 à 25 % correspondent à des modélisations structurales exploitables.

IV. Etudes *in vivo* des activités des NmDsbA

Les activités DsbA peuvent être étudiées *in vivo* en mesurant leurs capacités à compléter une souche déficiente en DsbA (phénotype *dsbA*⁻), dont le phénotype se caractérise par une perte de motilité de la bactérie et une activité phosphatase alcaline diminuée.

IV.1. Suivi de la motilité

Escherichia coli est une bactérie motile qui utilise un ou plusieurs flagelles pour se déplacer. Chaque flagelle est formé de trois parties: le filament, le crochet et le corps basal (Figure 33). Le corps basal ressemble à une petite tige entourée de quatre anneaux (L,P,M,S). L'anneau L est lié à la membrane externe et l'anneau P est lié au peptidoglycane. Les deux anneaux internes M et S constituent le moteur flagellaire. Leur rotation transmet le mouvement au flagelle. L'anneau P est constitué de 26 copies de la protéine FlgI.

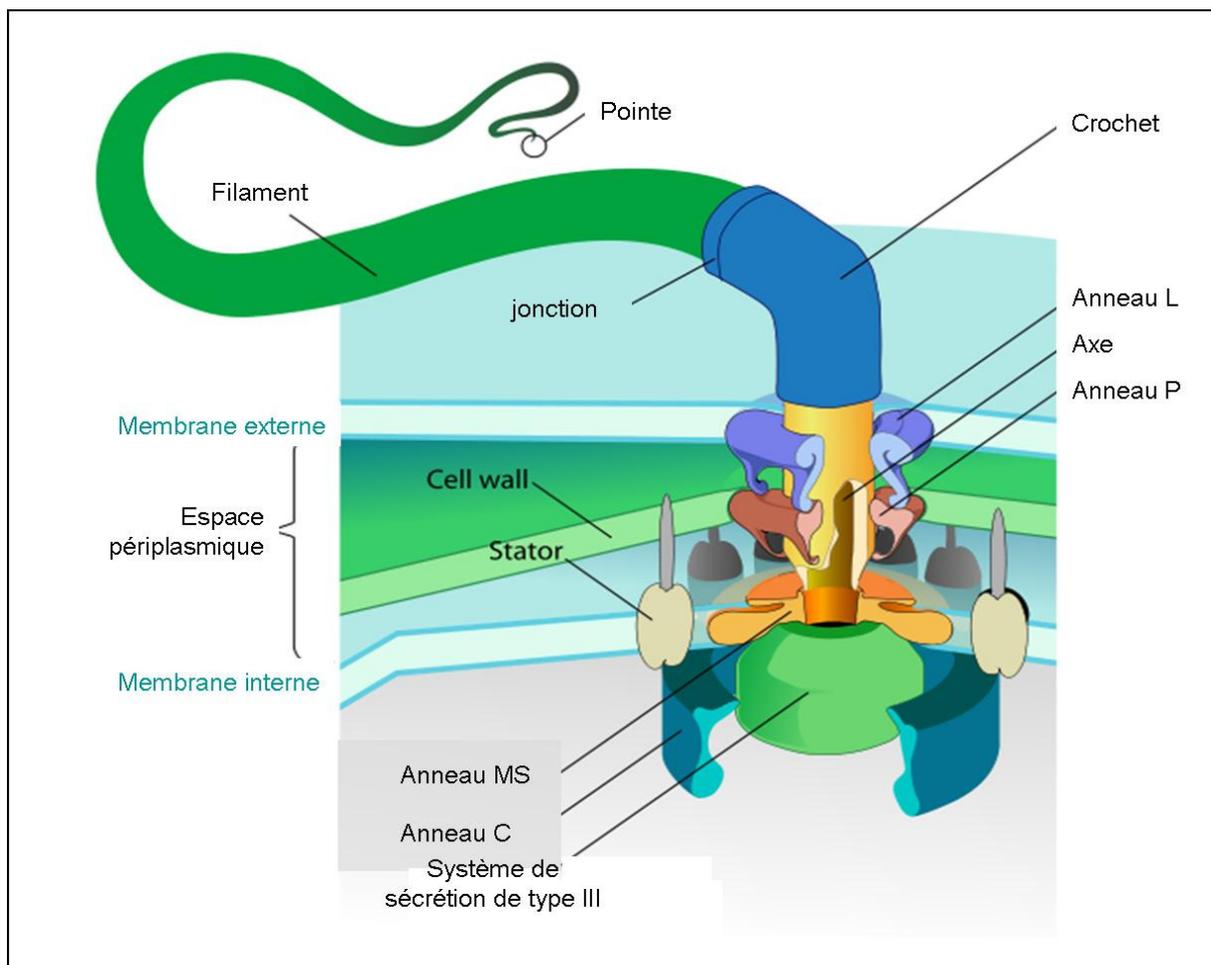


Figure 33 : Flagelle d'une bactérie à Gram négatif.

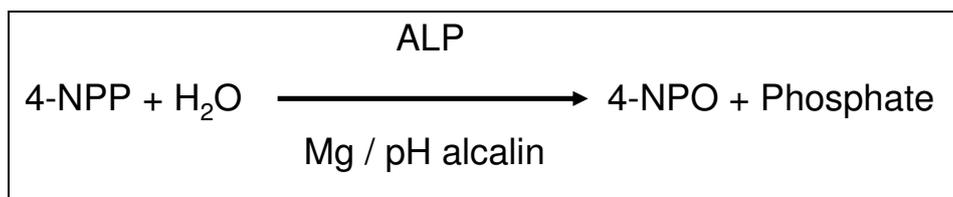
Dans le périplasme, DsbA facilite la formation d'un pont disulfure intramoléculaire essentiel à la maturation de FlgI (Dailey et al. 1993). Dans ce compartiment, la chaperonne périplasmique FlgA permet aux copies de FlgI de s'assembler pour former l'anneau P. La morphogénèse du flagelle ne peut s'effectuer correctement que lorsque l'anneau P est correctement formé. La souche mutante *dsbA*⁻ est incapable de synthétiser des protéines FlgI matures, ce qui entraîne une perte de motilité de cette souche, contrairement à la souche sauvage qui est capable de se déplacer en milieu semi-liquide comme l'agar mou.

Les activités *in vivo* des NmDsbA seront étudiées en mesurant leurs capacités à restaurer le phénotype de motilité de la bactérie mutante.

IV.2. Mesure de l'activité phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) est une enzyme périplasmique qui possède deux ponts disulfures essentiels pour son activité (Kim et al. 1991). Ainsi, une souche d'*E. coli* défectueuse en DsbA a une activité phosphatase alcaline fortement diminuée par rapport à une souche sauvage.

In vitro l'ALP catalyse la réaction de transphosphorylation suivante en utilisant du 4-nitrophenylphosphate (4-NPP) comme substrat.



A pH alcalin, le produit de la réaction, le 4-nitrophenoxide (4-NPO) a une couleur jaune intense et la réaction est suivie en mesurant l'absorbance à 405 nm.

L'activité phosphatase alcaline, notée AP, est obtenue selon la formule suivante:

$$\text{AP} = 1000 \times \frac{\text{DO}_{405\text{nm}} - 1,75 \times \text{DO}_{550\text{nm}}}{\text{Temps} \times \text{DO}_{600\text{nm}}} \times \text{facteur de dilution}$$

Résultats

Les DsbA de *Neisseria meningitidis*

I. Production des NmDsbA

Nous avons choisi d'étudier DsbA3 en premier car, d'après les données *in vivo* obtenues par Tinsley et al (2004), elle semblait la plus originale des trois NmDsbA, aussi bien en terme de fonction qu'en terme de séquence (Figure 20). C'est en effet la seule qui ne soit pas membranaire et qui ne possède pas la séquence catalytique CPHC. Elle est aussi très basique par rapport à DsbA1, DsbA2 et EcDsbA.

I.1. Production périplasmique de DsbA3

Notre premier choix a été d'exprimer DsbA3 dans le périplasma, comme cela avait été réalisé avec succès pour DsbA d'*E. coli*.

La séquence codante du gène de DsbA3 a été clonée sans la séquence signal de sécrétion dans le périplasma de *N. meningitidis* (Figure 34) dans le vecteur d'expression périplasmique pET20b(+) qui possède sa propre séquence d'adressage au périplasma, celle du gène « *pelB* ».

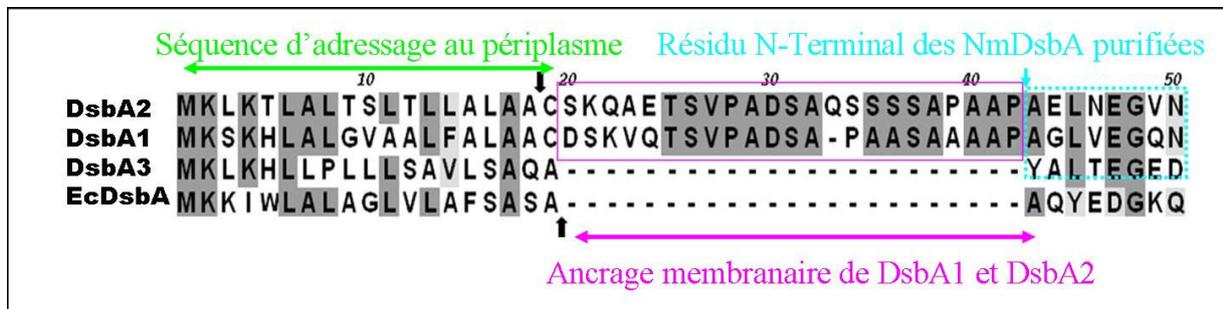


Figure 34 : Alignement des séquences primaires N-terminales des NmDsbA et de EcDsbA.



Figure 35 : Représentation schématique de la construction génétique pET20(b)+-dsba3.

Pel B: séquence signal de sécrétion dans le périplasma du plasmide pET20b(+).

Le plasmide résultant pET20b(+)-dsba3 (Figure 35) a été utilisé pour transformer la souche BL21(DE3) d'*E. coli*.

La Figure 36 montre que l'expression de DsbA3 après induction a bien lieu (Figure 36-bandes 1 et 2). Pour extraire la protéine, un choc osmotique permet d'isoler les molécules solubles contenues dans le périplasma. L'analyse par gel SDS-PAGE indique cependant qu'après l'extraction périplasmique, DsbA3 se trouve dans le culot final (Figure 36-bande 4 et 5). L'analyse de la séquence N-terminale du produit de surexpression montre cependant qu'il y a bien eu coupure de la séquence signal.

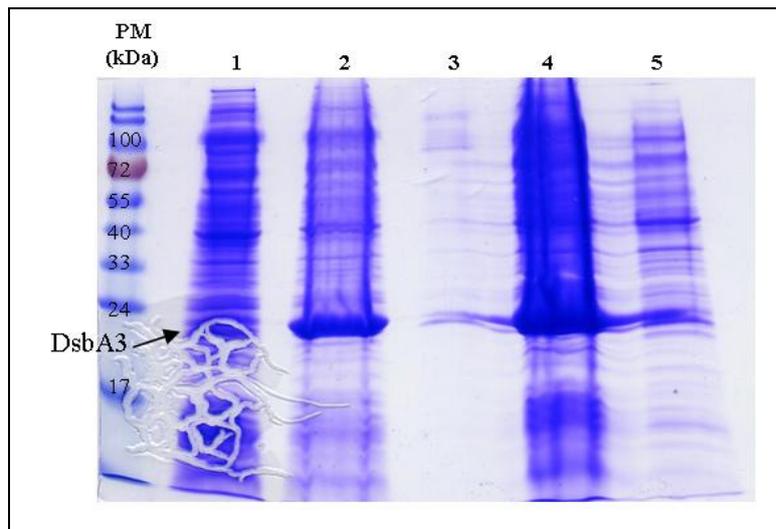


Figure 36: Analyse de la purification de DsbA3 par extraction périplasmique.

PM : marqueur de poids moléculaires; Expression totale: (1) avant induction; (2) après induction; Extraction périplasmique: (3) surnageant sucrose; (4) culot final contenant les molécules insolubles totales; (5) surnageant final contenant les molécules solubles périplasmiques

Le phénomène d'agrégation est probablement dû à un mauvais repliement de la chaîne polypeptidique dans le périplasma d'*E. coli*.

Le processus de repliement des protéines dans le périplasma est assez mal connu. Une fraction de la protéine serait mal repliée et s'agrègerait pour former des « corps d'inclusion » dans l'espace périplasmique. L'accumulation de protéine insoluble se produit par exemple si le taux d'expression est trop élevé et qu'il y a saturation du système chaperon (Bowden et al. 1990). Les chaînes polypeptidiques en excès adoptent une mauvaise conformation et s'associent entre elles ou avec des composés membranaires pour former des complexes insolubles.

Nous avons fait varier la quantité d'inducteur IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (0.5 M et 0.1 M) et la température d'induction (30°C et 20°C). Ceci n'a pas eu d'effet sur la solubilité de DsbA3. Nous avons testé d'autres souches de bactérie, comme les souches d'*E. coli* C41(DE3) et C43(DE3) (Miroux et al, 1996). Ces

souches mutantes de BL21(DE3) sont utilisées pour la production de protéines membranaires ou des protéines toxiques pour la bactérie sauvage, grâce vraisemblablement à un taux réduit de transcription (Miroux et al. 1996). Cette propriété réside en une mutation dans le promoteur *lacUV5*, qui contrôle la synthèse de la T7 ARN polymérase en réponse à l'IPTG, conduisant à une synthèse réduite de cette enzyme (Wagner et al. 2008). L'utilisation de ces nouvelles souches n'a pas empêché l'agrégation de DsbA3 surexprimée.

L'addition de sucres non métabolisables comme le sucrose, dans le milieu de culture pendant la phase d'induction, permet d'améliorer l'hydratation du polypeptide, ce qui stabiliserait la conformation native (Bowden et al. 1988). Ceci a été testé sur l'expression de DsbA3 en ajoutant 0.1 M et 0.3 M de sucrose, mais n'a pas permis d'améliorer de façon significative la solubilité de DsbA3. Nous avons donc changé de stratégie et les essais d'expression dans le périplasme se sont arrêtés là.

I.2. Production cytoplasmique des NmDsbA

A) Expression et purification des NmDsbA

Les trois NmDsbA ont donc été surexprimées dans le cytoplasme d'*E. coli*. Les gènes des NmDsbA sans leur séquence signal ont été clonés dans le vecteur pLIM01 sur la plateforme de clonage de l'IBS « RoBioMol ». Ce vecteur permet la surexpression cytoplasmique d'une protéine fusionnée à une étiquette hexahistidine (His6) du côté N-terminal suivie d'un site de coupure de la TEV (Tabacco Etch Virus) (Figure 37). Les séquences codantes pour les ancrages membranaires N-terminaux des deux lipoprotéines, DsbA1 et DsbA2, ont également été exclues de la construction génétique (Figure 34).

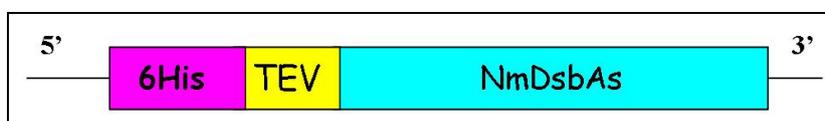


Figure 37 : Schéma de la construction génétique utilisée pour la surexpression des trois NmDsbA.
TEV : site de coupure pour la protéase TEV

Ces constructions ont permis de produire les trois NmDsbA sous forme soluble, en grande quantité (Figure 38A-2) et d'établir un protocole de purification commun aux trois enzymes, simple et rapide, basé sur une première étape de chromatographie d'affinité sur résine de nickel (Figure 38A-3) et une étape finale de tamis moléculaire (Figure 38B). Pour la

purification de DsbA3, 500 mM de NaCl sont rajoutés dans tous les tampons utilisés pour l'étape finale de concentration.

L'étiquette hexahistidine sera conservée pour les études biochimiques, sa présence ne semblant pas affecter l'activité enzymatique. Par contre, elle sera enlevée systématiquement pour l'étape de cristallisation, ce qui sera confirmée par séquençage des résidus N-terminaux après coupure par la TEV. Il est à remarquer que les séquences des NmDsbA débutent toutes par une Glycine additionnelle, provenant du site de coupure de la TEV (GPAELNEG, GPAGLVE et GYALTEGE pour DsbA1, DsbA2 et DsbA3 respectivement),

Enfin, les analyses par spectrométrie de masse donnent des poids moléculaires expérimentaux en accord avec les données théoriques (21477 Da pour DsbA1, 21461 Da pour DsbA2 et 21887 Da pour DsbA3). Le rendement final de purification pour chaque enzyme est de 50 mg de protéine pure par litre de culture (Figure 38-B).

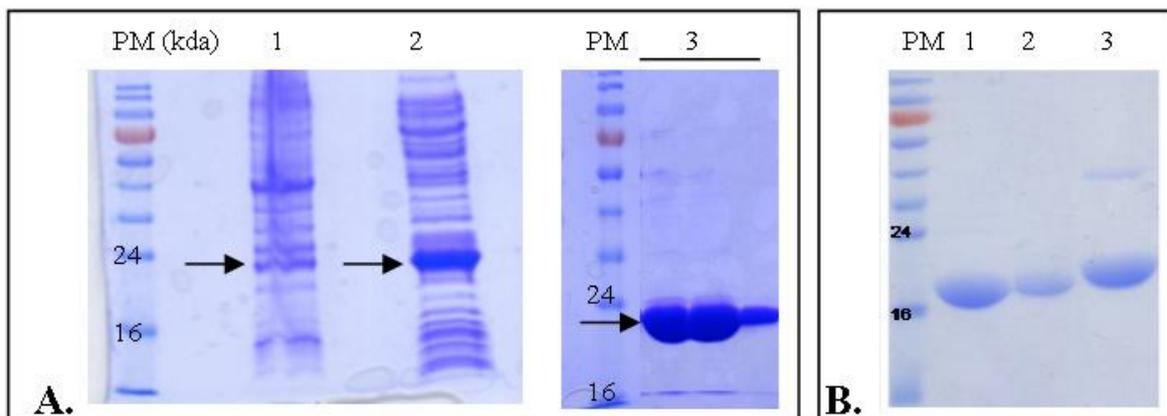


Figure 38: Purification des trois NmDsbA exprimées dans le cytoplasme. (GEL SDS-PAGE 12%)
 PM: marqueur de poids moléculaires. **A/** Purification de His6-DsbA3 (résultats similaires pour DsbA1 et DsbA2). Étape de lyse bactérienne par la presse de French : **1.** culot contenant les molécules insolubles. **2.** surnageant contenant les molécules solubles. **3.** Fractions contenant His6-DsbA3 après l'étape de chromatographie d'affinité sur résine de nickel. **B/** Echantillons protéiques des NmDsbA à l'issue de la purification : **1-2-3** : protéines recombinantes DsbA1, DsbA2 et DsbA3 sans étiquette polyhistidine.

B) Caractérisation des NmDsbA après purification

Avant de commencer les études structurales et fonctionnelles des trois enzymes, nous sommes assurés qu'elles avaient une conformation native après purification en testant leur capacité à réduire l'insuline, test couramment utilisé pour la Thiorédoxine et DsbA d'*E. coli*.

1. Activité insuline réductase des NmDsbA purifiées :

Les activités oxydoréductases des trois NmDsbA ont été caractérisées *in vitro*, en mesurant leur capacité à catalyser la réduction de l'insuline et en la comparant à celle d'EcDsbA. Ce test communément utilisé chez les enzymes de la famille des oxydoréductases mesure l'activité réductase de l'enzyme comme nous l'avons vu dans la partie *Principes expérimentaux*.

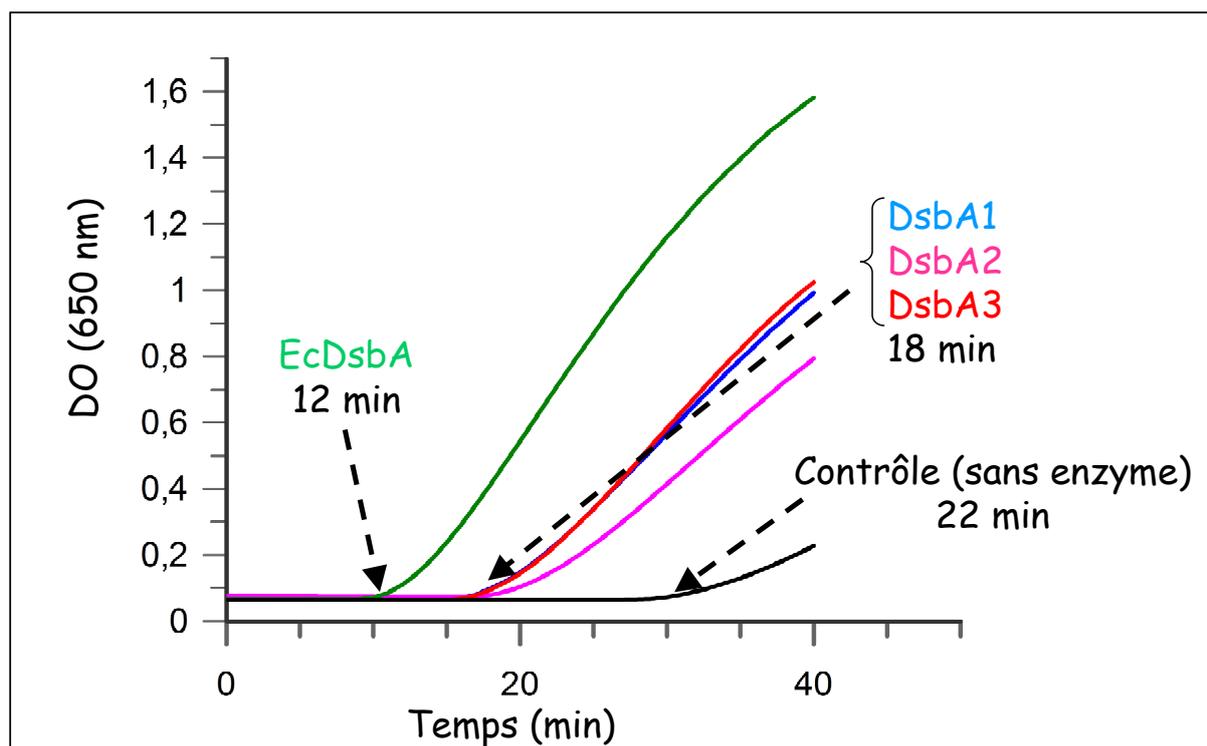


Figure 39 : Courbe de détermination de l'activité insuline réductase des NmDsbA.

La précipitation de la chaîne B de l'insuline est mesurée après addition de 5 μM du catalyseur : EcDsbA, DsbA1, DsbA2, DsbA3. L'absorbance due à la précipitation de l'insuline par une réduction non-enzymatique est mesurée dans un échantillon contrôle contenant du DTT seulement.

Les résultats présentés dans la Figure 39 montrent que les trois NmDsbA peuvent réduire l'insuline de façon similaire (« lag time » de 17 min) mais moins rapidement qu'EcDsbA (« lag time » de 12 min). Ceci suggère que les NmDsbA seraient faiblement actives en tant que réductase de ponts disulfures et seraient par contre de meilleures oxydases qu'EcDsbA.

Ce test de l'insuline a été utilisé tout au long de ces travaux, pour tester facilement l'activité des NmDsbA après chaque purification.

2. Etat d'oxydoréduction des NmDsbA purifiées :

Ces enzymes alternent entre deux états ou redox : 1) un état oxydé où le pont disulfure est formé entre les cystéines du motif catalytique CXXC ; 2) un état réduit où les cystéines sont sous forme thiol (-SH).

La différence de stabilité entre ces deux états constitue la force motrice de la réaction catalysée par ces enzymes. Une oxydase aura une forme réduite stable contrairement à une réductase. L'état redox des NmDsbA sera déterminé par la méthode de l'AMS (cf *Principes expérimentaux*).

Certaines caractérisations biochimiques ou structurales nécessitent que les enzymes soient totalement réduites ou oxydées. Alors que la réduction totale des NmDsbA est obtenue très facilement avec le réducteur DTT (Figure 40-d), leur oxydation par le glutathion oxydé (GSSG), habituellement utilisé pour oxyder EcDsbA, ne permet une oxydation totale des NmDsbA que s'il est utilisé en large excès (100 mM de GSSG pour 1 μ M d'enzyme) (Figure 40-b). Pour des concentrations supérieures à 1 μ M d'enzymes, seule l'incubation avec H₂O₂ a permis d'obtenir une oxydation totale (Figure 40-c).

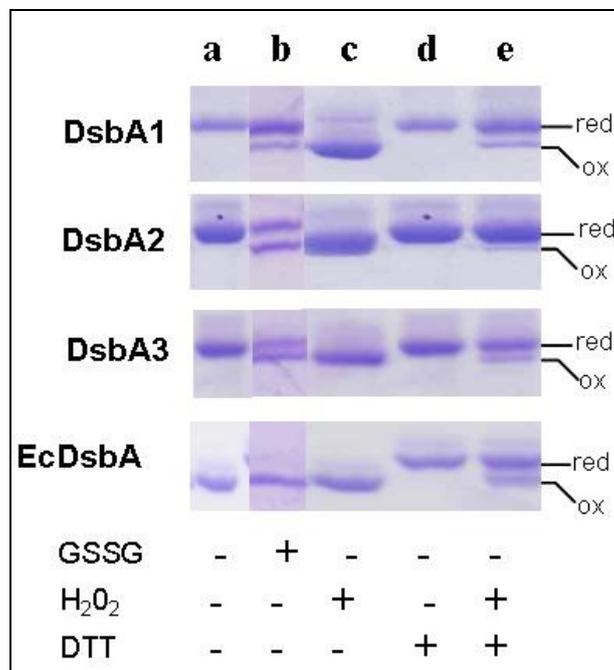


Figure 40 : Etat redox des NmDsbA.

Chaque échantillon (50 μ M d'enzymes) traité avec 10% de TCA a été alkylé avec de l'AMS. Les protéines réduites (red; AMS- modifiée) et oxydées (ox; non-modifiée) ont été séparées sur gel SDS-PAGE 15% en conditions non réductrices. A la fin de la purification : (a). Après incubation avec: 100 mM de GSSG (b) ; 40 mM de H₂O₂ (c), 10 mM de DTT (d). Les protéines oxydées par 40 mM de H₂O₂ sont incubées 1h avec 10 mM de DTT (e).

H_2O_2 est un oxydant très puissant qui peut modifier les groupements thiols des cystéines et former un acide sulfinique (Figure 41). Nous avons vérifié que cela n'était pas le cas. La formation d'un acide sulfinique est irréversible et inactive les enzymes. Les analyses par spectrométrie de masse et la mesure des activités insuline réductase des enzymes incubées avec du H_2O_2 suggèrent en effet qu'il n'y a pas formation d'acide sulfinique. Les enzymes oxydées par du H_2O_2 peuvent être réduites à nouveau par du DTT, ce qui confirme les résultats précédents (Figure 40-e).

Nous avons également montré que les trois enzymes étaient réduites à l'issue de la purification contrairement à EcDsbA qui est oxydée dans les mêmes conditions (Figure 40-a).

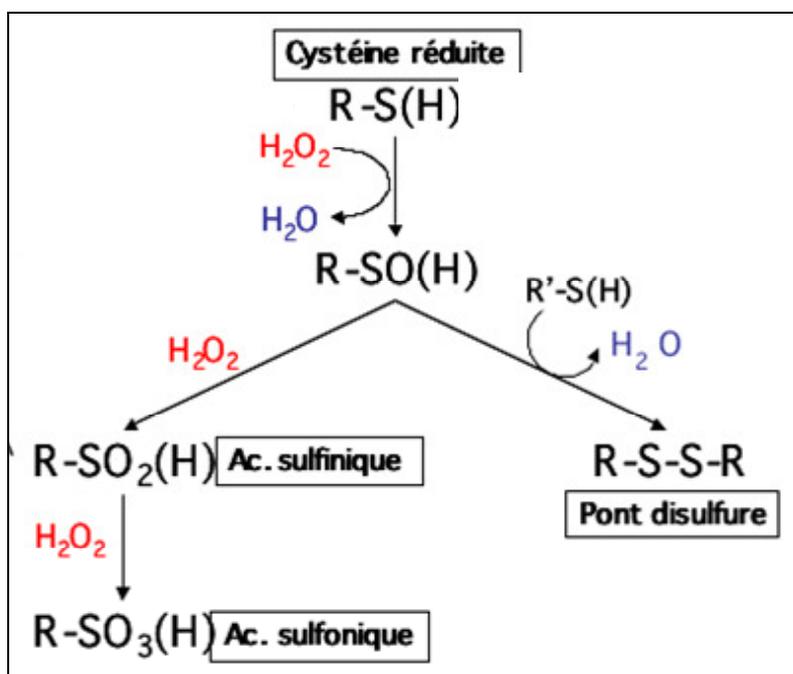


Figure 41 : Mécanisme d'oxydation d'une chaîne latérale d'un résidu cystéine avec du peroxyde d'hydrogène.

Le résidu cystéine est en premier oxydé en acide sulfinique. Cet intermédiaire peut réagir une nouvelle fois avec une molécule d' H_2O_2 irréversiblement pour former un acide sulfonique, ou réagir avec un groupement SH pour former un pont disulfure. Le pont disulfure peut être réduit par du DTT contrairement au groupement $-SO_2H$.

II. Etudes cristallographiques des NmDsbA

Certaines spécificités structurales pourraient expliquer les différences *in vivo* observées pour les trois enzymes (Sinha et al. 2004; Tinsley et al. 2004) de *Neisseria meningitidis*. C'est dans ce but que nous avons entrepris l'étude cristallographique de ces enzymes.

II.1. Cristallogénèse et résolution des structures cristallographiques

Afin d'optimiser la cristallisation d'une protéine, les sources de flexibilité doivent être minimisées. C'est pourquoi, pour leurs études cristallographiques, nous avons purifié les lipoprotéines DsbA1 et DsbA2 sans leurs ancrages membranaires (résidus 20 à 40 (Figure 34)) et éliminé les étiquettes polyhistidine des trois enzymes.

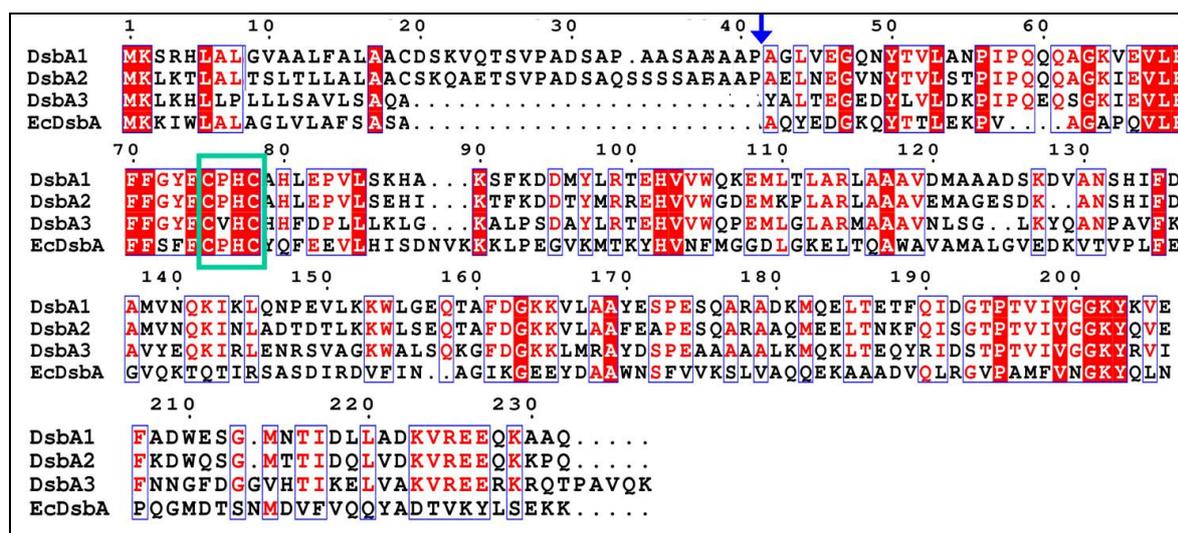


Figure 42 : Alignement des séquences des homologues à DsbA chez *N. meningitidis* (DsbA1, DsbA2 et DsbA3), *E. coli* (DsbA) et *V. cholerae* (Tcpg).

Les résidus identiques sont surlignés en rouge et les résidus fortement conservés sont encadrés. La flèche indique le résidu N-terminal des trois NmDsbA des formes étudiées. Le térapeptide conservé du site actif, CXXC est encadré en vert.

Les trois NmDsbA partagent une grande homologie de séquence (Figure 42). Les deux lipoprotéines présentent 73% d'identité entre elles et 50% d'identité avec DsbA3. Elles cristallisent toutes dans des conditions similaires, c'est-à-dire en présence d'une forte concentration en sulfate d'ammonium. Ces conditions sont cependant assez éloignées de celles utilisées pour les DsbA de *Vibrio cholerae* (Tcpg) (Hu et al. 1997) ou d'*E. coli* (EcDsbA) qui cristallisent dans du polyéthylène glycol (Martin et al. 1993b), avec lesquelles les trois NmDsbA partagent environ 20 à 25 % d'identité de séquence.

A) DsbA1

Les premiers cristaux obtenus sont ceux de DsbA1 et ont conduit à la résolution de sa structure. Ce travail a été effectué en collaboration avec Thomas Iwema (LCCP-IBS).

1. Cristallogénèse :

Les premiers essais de cristallisation, effectués à l'aide de la plateforme de cristallisation (PSB-Grenoble), ont permis de cristalliser DsbA1 dans deux conditions:

- la condition (A1-1), 2.4 M de sulfate d'ammonium, 0.1 M Bicine pH 9.0, qui conduit à des pyramides tétraogonales, d'environ 150 μm de longueur (Figure 43-A).

- la condition (A1-2), 1.6 M citrate de trisodium, qui conduit à des plaques de 200 μm de longueur (Figure 43-B).

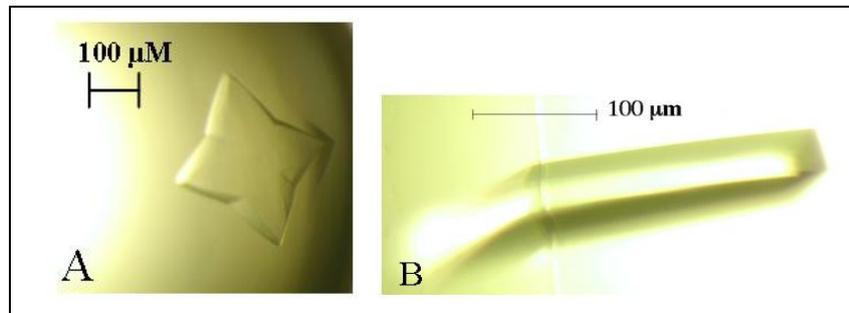


Figure 43 : Cristaux de DsbA1

2. Résolution de la structure cristallographique:

Nous avons enregistré un jeu de données de diffraction avec un cristal natif de DsbA1, dans le but de résoudre le problème de la phase par la méthode du remplacement moléculaire en utilisant les modèles des DsbA d'*E. coli* ou de *V. cholerae*, avec lesquels DsbA1 partage 20% d'identité. Ceci n'ayant pas donné de résultats probants (le pourcentage d'identité entre les protéines est peut être insuffisant), nous avons choisi de résoudre le problème de la phase par la méthode des atomes lourds, en optimisant le signal anomal de l'atome lourd, ici l'Or. Dans ce but, un cristal de DsbA1 obtenu dans la condition A1-2 a été trempé pendant 1h30 dans 10 μl de la condition A1-2 additionnée de 5mM d'AuCN.

▪ Enregistrement des données et indexation:

Les données de diffraction des cristaux de DsbA1, natif et dérivé or, ont été enregistrées sur la ligne de lumière BM30 de l'ESRF à 100 K.

Jeu de données du cristal natif:

L'enregistrement du jeu de données natif a été fait à une longueur d'onde de 0.979 Å. Les cristaux de DsbA1 ont diffracté les rayons X jusqu'à une résolution de 1.5 Å (Figure 44). L'indexation et le traitement des données ont été effectués par les logiciels MOSFLM (Leslie 1999) et SCALA (Evans 1993). Les statistiques sont résumées dans le Tableau 4. Ils appartiennent au groupe d'espace $P2_12_12_1$ ($a= 44.08$ Å, $b= 46.44$ Å, $c= 79.97$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$). Le coefficient de Matthews est de 1.9 Å³/Da et correspond à un pourcentage de solvant de 35 % pour une molécule dans l'unité asymétrique.

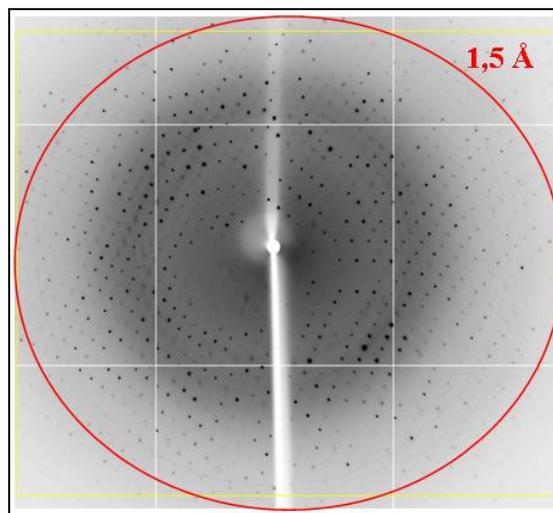


Figure 44 : Cliché de diffraction d'un cristal de DsbA1 natif.
Enregistrement effectué sur BM30 (ESRF-Grenoble) à 100 K à $\lambda=0.979$ Å

Jeux de données du dérivé Or:

Le seuil d'absorption de l'Or au sein du cristal a été déterminé à partir du spectre de fluorescence, enregistré sur l'un des cristaux trempés dans la solution d'Or: les longueurs d'onde extraites de ce spectre et correspondantes au maximum de f'' et au minimum de f' sont 1.0398 Å pour le pic et 1.0378 Å pour le point d'inflexion.

Les deux jeux de données, enregistrés à ces deux longueurs d'onde, ont été traités avec le programme XDS (Kabsch 1993) jusqu'à la résolution de 1.6 Å (Tableau 4).

	Dérivé or		DsbA1
	Pic	Inflexion	
Enregistrement des données sur BM30			
Longueur d'onde (Å)	1.0398	1.0378	0.979
Résolution (Å) ^a	20-1.6 (1.7-1.6)	20-1.6 (1.7-1.6)	40-1.5 (1.58-1.50)
a, b, c (Å, Å, Å)	44.08, 46.44, 79.97		
Groupe d'espace	$P2_12_12_1$		
Réflexions observées	237391	117686	274425
Réflexions uniques	35475	34868	26907
R_{sym}^a	0.056 (0.380)	0.041 (0.287)	0.064 (0.241)
Complétude (%)	83.9	82.5	99.5
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle^a$	20.0 (3.6)	19.8 (3.4)	6.8 (3.1)
Redondance	6.7	3.38	10.2

Tableau 4: Statistiques des données de diffraction des cristaux de DsbA1.

^a les valeurs entre parenthèses correspondent à la coquille de plus haute résolution.

▪ **Phasage et construction du modèle :**

La comparaison des données obtenues avec le dérivé Or et les données natives ont montré que les cristaux n'étaient pas forcément isomorphes. Nous avons donc exploité seulement le signal anomal des données Or.

Le signal anomal provenant des atomes d'or a été utilisé pour localiser les atomes d'or fixés à la protéine. Quatre atomes d'or ont été localisés par les programmes Solve (Terwilliger et al. 1999) et Shake-and-Bake (Miller et al. 1994). Ceux-ci ont ensuite permis le phasage avec le programme SHARP (De La Fortelle et al. 1997). Finalement, après aplatissage du solvant, le programme ARP/wARP (Perrakis et al. 1999) a construit automatiquement dans la carte de densité électronique expérimentale 165 des 193 résidus de DsbA1. L'affinement a été effectué avec le programme REFMAC (Murshudov et al. 1997), en alternance avec des reconstructions manuelles avec le programme COOT (Emsley et al. 2004), dans la carte de densité électronique calculée avec les données natives jusqu'à 1.5 Å de résolution. Ceci a permis de construire l'ensemble de la chaîne polypeptidique.

Le modèle final, affiné jusqu'à 1.5 Å, correspond à un R_{factor} de 0.179 et un R_{free} de 0.213 (Tableau 5).

La structure de DsbA1 a été déposée à la PDB sous le code 3DVW.

DsbA1-modèle affiné	
Code	3DVW
Résolution (Å)	20.5-1.5
R_{factor}	0.179 (0.210)
R_{free}^a	0.213 (0.249)
Facteur B moyen (Å ²)	12.8
Nombre de résidus	191
Nombre de molécules d'eau	178
Nombre d'atomes	
-Protéine	1533
-Solvant	178
R.m.s.d. :	
-Liaisons (Å)	0.010
-Angles (°)	1.21
Diagramme de Ramachandran (Figure 45)	
-régions de préférence	98.35
-régions autorisées	1.65
-régions non autorisées	-

Tableau 5 : Statistiques du modèle final de DsbA1.

^a R_{free} est calculé avec 10% des données de diffraction sélectionnées au hasard

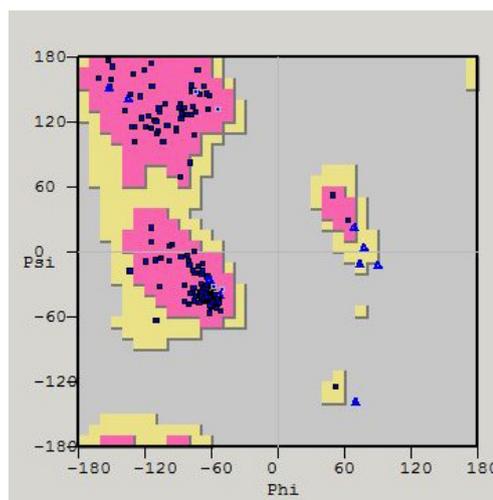


Figure 45 : Diagramme de Ramachandran de la structure de DsbA1. d'après COOT (Emsley et al. 2004)

B) DsbA2

1. Cristallogénèse :

Les premiers cristaux ont été obtenus dans 0.1 M d'acide acétique à pH 5.0, 2.4 M de sulfate d'ammonium. De plus gros cristaux d'environ 100 μm , comme ceux présentés dans la Figure 46, apparaissent dans 0.1 M MES pH 5.0, 2.4 M sulfate d'ammonium à température ambiante. Ces cristaux ne diffractent les rayons X qu'à une résolution de 6 \AA , quelle que soit la source de rayons X.

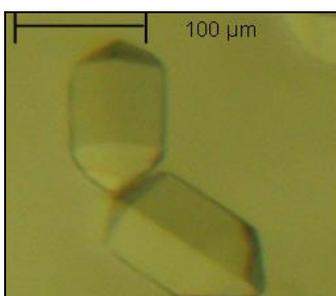


Figure 46 : Cristaux de DsbA2

2. Optimisation de la cristallisation de DsbA2 :

Pour améliorer la qualité des cristaux de DsbA2, nous avons joué sur plusieurs paramètres de cristallisation comme: le pH, la concentration en sulfate d'ammonium, la température, la concentration en protéine, la présence d'additifs, la présence ou l'absence de l'étiquette polyhistidine, l'utilisation de DTT (pour avoir 100% de protéine réduite apparemment plus stable) et enfin la production d'une protéine sélénio-méthionylée. Comme décrit dans le paragraphe qui suit, le fait de produire une DsbA3 avec des méthionines sélénées a permis d'améliorer les cristaux. Sur la base de cet exemple, nous avons essayé de cristalliser une DsbA2 sélénée, mais cela n'a pas conduit à de meilleurs cristaux.

Production d'un fragment stable de DsbA2 par protéolyse limitée :

Comme les régions flexibles peuvent gêner la cristallisation, nous avons essayé d'éliminer d'éventuelles régions flexibles de DsbA2 par protéolyse limitée. Ces tests ont été effectués en incubant His6-DsbA2 avec plusieurs protéases (trypsine, thermolysine, élastase, et papaïne) à température ambiante, selon des rapports enzyme/protéine de 1/1000 puis 1/100 sur des durées de 30 min à 12 h (cf. *Protocoles expérimentaux*). Les échantillons sont tout d'abord analysés sur gel SDS-PAGE (Figure 47) après ce traitement.

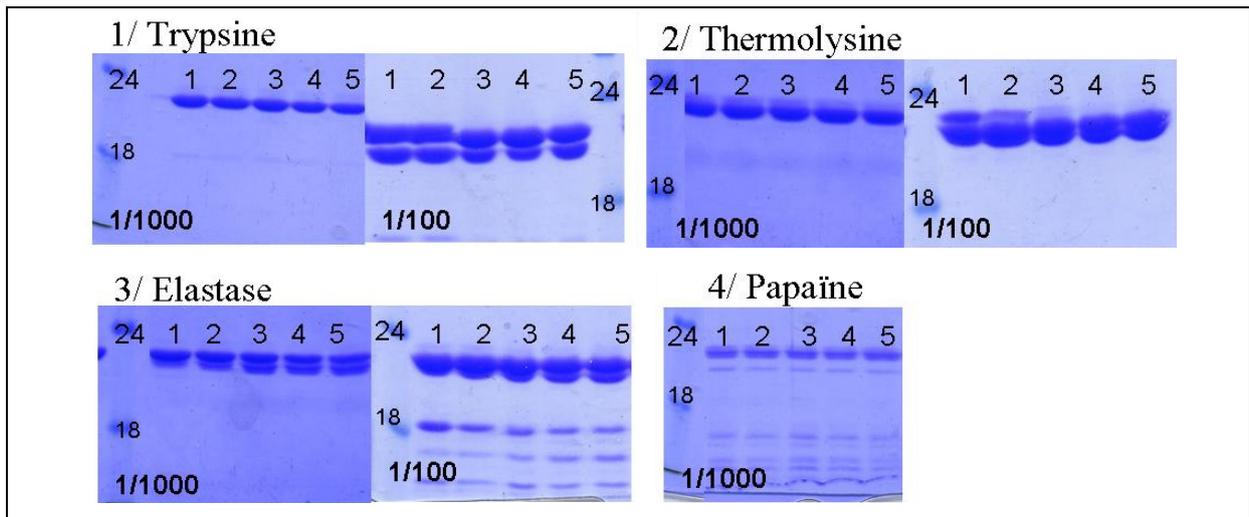


Figure 47 : Protéolyse limitée effectuée sur His6-DsbA2.

Deux rapports protéase/enzyme. Temps d'incubations : 1=0 min; 2=30 min; 3=2 h 4=5 h; 5=12 h.

Le résultat le plus intéressant a été obtenu avec l'élastase qui coupe DsbA1 très efficacement (1/1000) et permet d'obtenir des fragments protéolytiques stables (Figure 47-3). La trypsine ainsi que la thermolysine permettent également d'obtenir des fragments stables mais leur efficacité de coupure est moindre (aucune coupure avec un rapport 1/1000) (Figure 47-1 et 2). La papaïne, quant à elle, coupe la protéine en de nombreux fragments avec le rapport (enzyme/protéine) de 1/1000 (Figure 47-4).

Les échantillons donnant les meilleurs résultats (rapport 1/100 des protéases thermolysine, trypsine et élastase pour un temps d'incubation de 12 heures) sont ensuite analysés par:

- 1) spectrométrie de masse pour déterminer le nombre et la masse des fragments stables contenus dans l'échantillon digéré.
- 2) séquençage N-terminal des différentes bandes du gel d'électrophorèse afin de connaître les premiers acides aminés de chaque fragment.

La combinaison de ces deux types d'information a permis de définir les fragments résistants à la protéolyse (Figure 48).

Ainsi il apparaît que les trois protéases coupent seulement les premiers acides aminés N-terminaux de DsbA2, ce qui indiquerait l'absence de grandes régions flexibles au sein de la structure de DsbA2. Comme la thermolysine coupe la protéine à deux endroits, elle ne sera pas utilisée pour la cristallogénèse. La trypsine, quant à elle, coupe DsbA2 au sein de l'étiquette histidine, ce qui ne présente aucun intérêt pour la suite de l'expérience, étant donné que la TEV permet d'éliminer la totalité de l'étiquette. Finalement, l'élastase est la plus intéressante des enzymes puisqu'elle ne produit qu'un seul fragment en éliminant 4 acides aminés N-terminaux.

Nous avons donc préparé ce fragment « DsbA2* » à une concentration finale de 9 mg/ml. La mesure de son activité insuline réductase permet de voir que DsbA2* est active.

Les essais de cristallisation n'ont cependant pas conduit à la formation de cristaux. Les essais de cristallisation de DsbA2 n'ont pas été poursuivis.

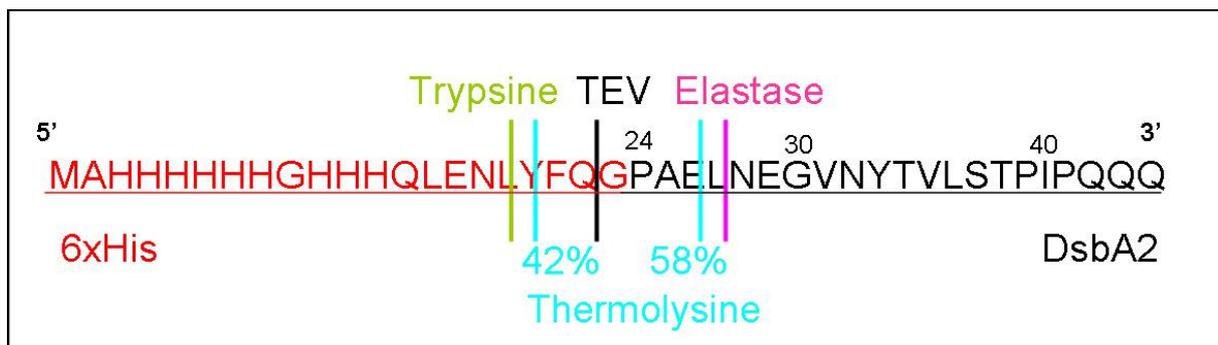


Figure 48 : Localisation des sites de coupure par les protéases en N-terminal de His6-DsbA2.

C) DsbA3

1. DsbA3 natif :

▪ Cristallogénèse :

Les premiers essais de cristallisation de DsbA3 ont conduit à des cristaux en forme de bâtonnets de 50 μM de long (Figure 49-A) dans 0.45 M tartrate de sodium et potassium, 0.1 M citrate de sodium dihydraté pH 5.6, 2.0 M sulfate d'ammonium. L'addition de 3.6 mM de chlorure de cobalt hexahydraté a ensuite permis d'obtenir des cristaux en forme de bâtons plus épais (Figure 49-B).

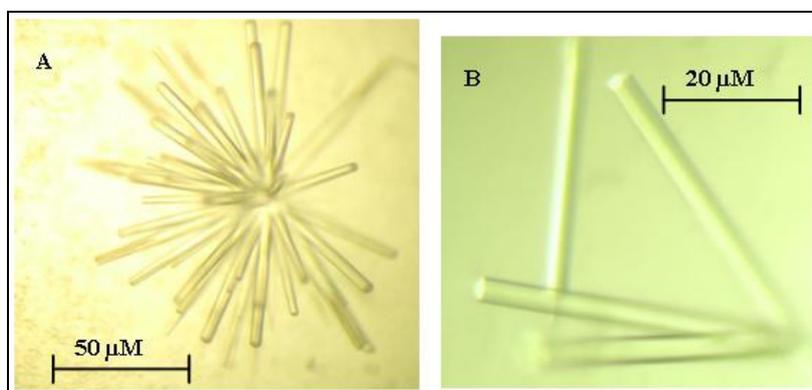


Figure 49 : Cristaux de DsbA3 natif.

▪ Essai de résolution de la structure par remplacement moléculaire :

Nous avons dans un premier temps essayé de résoudre la structure de DsbA3 par la méthode du remplacement moléculaire à partir des DsbA d'*E. coli* et de *V. cholerea*, car nous n'avions pas encore résolu la structure de DsbA1.

L'enregistrement du jeu de données à partir des cristaux de DsbA3 natif a été effectué sur la ligne de lumière ID14-EH2 de l'ESRF, à une longueur d'onde de 0.931 \AA . L'indexation et le traitement des données ont été effectués de la même façon que pour DsbA1 jusqu'à une résolution de 3.0 \AA , ce qui a permis de déterminer le groupe d'espace de ces cristaux : *P6* ($a = 126.6 \text{ \AA}$, $b = 126.6 \text{ \AA}$, $c = 54.14 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$).

Le phasage par remplacement moléculaire n'ayant pas abouti, nous avons opté pour la méthode MAD (Multiple-wavelength Anomalous Diffraction) au seuil du sélénium.

2. DsbA3 sélénée

▪ Cristallogénèse :

La purification de DsbA3 sélénée a été réalisée selon le protocole décrit pour la protéine native en ajoutant 10 mM de DTT dans tous les tampons de purification. Les analyses en spectrométrie de masse ont montré qu'au terme de la purification nous avons un adduit de 200 Da sur la masse de DsbA3, correspondant à l'incorporation des 4 méthionines sélénées de la protéine. Le rendement de purification représente 7.5 mg de protéine sélénée pour 1 L de culture en milieu minimum M9.

De petits parallélépipèdes de 50 μm de long et 20 μm de large sont obtenus dans 2.2 M sulfate d'ammonium, 0.25 M malonate, 0.1 M MES pH 5.0, à 8°C (Figure 50).

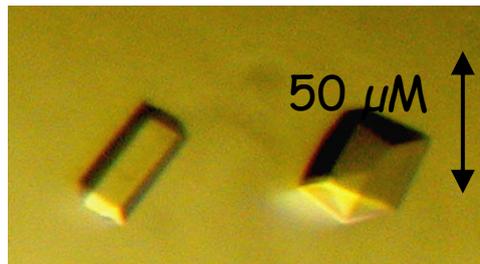


Figure 50 : Cristaux de DsbA3 sélénée

▪ Résolution de la structure :

Enregistrement des données et indexation

Les cristaux de DsbA3 sélénés se sont révélés de meilleure qualité que ceux obtenus avec la protéine native. L'enregistrement du jeu de données s'est fait sur la ligne de lumière ID14-EH3 de l'ESRF à 100K à une longueur d'onde de 0.931 Å. Les données ont été indexées de la même façon que pour DsbA1.

Les cristaux de DsbA3 appartiennent au groupe d'espace $I4_122$ ($a = b = 160.0$ Å, $c = 76.8$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). Le coefficient de Matthews est compris entre 1.6 et 4.0 Å³/Da, suggérant que l'unité asymétrique contiendrait probablement 2 molécules de DsbA3 avec un pourcentage de solvant de 56%. Les cristaux ont diffracté jusqu'à 2.8 Å. Les statistiques sont présentées dans le Tableau 6.

DsbA3 séléniée	
Enregistrement des données sur ID14-EH3	
Longueur d'onde (Å)	0.931
Résolution (Å) ^a	20.5-2.8 (2.95-2.8)
<i>a, b, c</i> (Å, Å, Å)	160.0, 160.0, 76.8
Groupe d'espace	I4 ₁ 22
Nombre de Monomère par unité asymétrique†	2
Coefficient de Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2.8
Solvant (%)	56
Réflexions observées	162296
Réflexions uniques	12295
<i>R</i> _{sym} ^a	0.102 (0.282)
Complétude (%)	100
<I>/<σ(I)> ^a	6.1 (2.7)
Redondance	12.9

Tableau 6 : Statistiques des données de diffraction des cristaux de DsbA3 séléniée.

^a les valeurs entre parenthèses correspondent à la coquille de plus haute résolution.

Construction du modèle et affinement :

La structure de DsbA3 a été résolue par remplacement moléculaire à l'aide du programme MOLREP (Vagin et al. 2000) en prenant pour modèle la structure affinée de DsbA1 à 1.5 Å. Le modèle final de DsbA3 a été affiné jusqu'à une résolution de 2.8 Å avec un *R*_{factor} de 0.219 et un *R*_{free} de 0.287. Les deux monomères de DsbA3 contenus dans l'unité asymétrique sont équivalents avec un r.m.s.d. de 0.218 Å calculé sur 185 C^α (LSQKAB (CCP4 1994)). Pour simplifier, notre analyse structurale sera basée uniquement sur l'un des deux monomères de DsbA3. Les statistiques relatives au modèle final sont présentées dans le Tableau 7. La structure de DsbA3 a été déposée dans la PDB sous le code 3DVX.

DsbA3-séléniée-Modèle affiné	
Code PDB	3DVX
<i>R</i> _{factor}	0.219 (0.293)
<i>R</i> _{free} ^a	0.287 (0.401)
Facteur B moyen (Å ²)	12.9
Nombre de résidus	189 187
Nombre de molécules d'eau	34
Nombre d'atomes	
-Protéine	2949
-Solvant	24
R.m.s.d.:	
-Liaisons (Å)	0.017
-Angles (°)	1.86
Diagramme de Ramachandran: (Figure 51)	
-régions de préférence	87.8
-régions autorisées	12.2
-régions non autorisées	-

Tableau 7 : Statistiques du modèle final de DsbA3.

^a *R*_{free} est calculé avec 10% des données de diffraction sélectionnées au hasard.

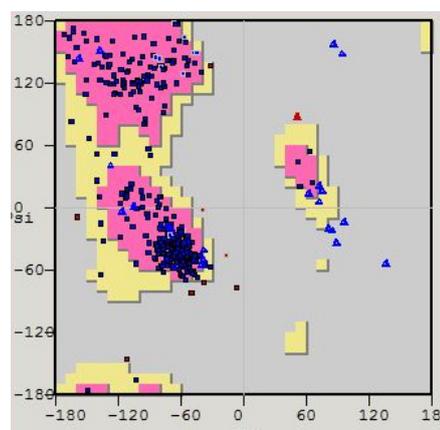


Figure 51 : Diagramme de Ramachandran de la structure de DsbA3 (d'après COOT) (Emsley et al. 2004)

II.2. Description et analyse des structures cristallographiques

A) Les structures de DsbA1 et DsbA3

Les structures des domaines solubles de DsbA1 et DsbA3 (la séquence nucléotidique codante pour l'ancrage membranaire de DsbA1 a été exclue lors du clonage) adoptent le repliement classique des DsbA, composé d'un domaine thiorédoxine sur lequel est inséré le domaine hélical. Le site actif composé du motif classique CXXC est situé dans le domaine TRX à l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 1$.

1. Description des structures résolues de DsbA1 et DsbA3

Dans la structure de DsbA1, le domaine TRX s'étend des résidus 23 à 84 et 165 à 213 (en jaune vif sur la Figure 52-A) (Martin 1995). Il est formé par un feuillet β -anti parallèle composé de 5 brins ($\beta 1$ à $\beta 5$) et de deux hélices α ($\alpha 1$ et $\alpha 7$) situées sur une face du feuillet. Le domaine hélical est composé des résidus restants (89 à 164 en jaune pâle). Il comprend quatre hélices α ($\alpha 2$ à $\alpha 5$) et une partie de l'hélice $\alpha 6$. Le site actif présent dans le domaine TRX est composé de la séquence C57-P58-H59-C60 (en rouge) où les cystéines sont réduites.

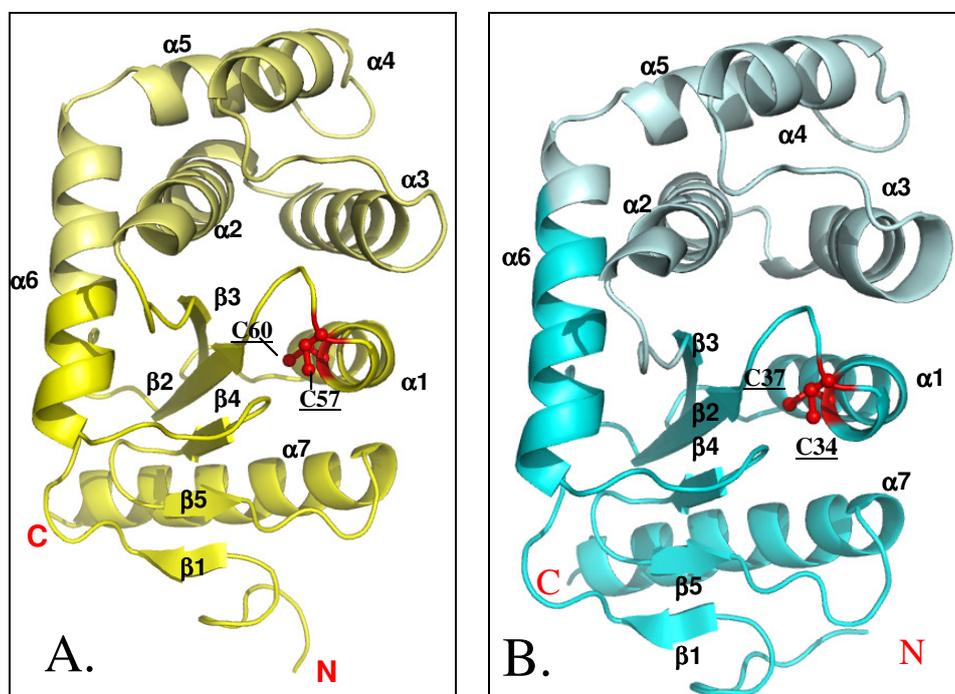


Figure 52 : Structure cristallographique de DsbA1 (A) et DsbA3 (B)

Les domaines TRX sont représentés respectivement en jaune vif et cyan, les chaînes latérales des cystéines actives (C57-C60 (DsbA1)) et (C34-C37 (DsbA3)) sont colorées en rouge, les domaines hélicaux sont en jaune et bleu pâle. Les structures secondaires sont numérotées.

Dans la structure de DsbA3, la composition en feuillets β et hélices α est la même que celle de la structure de DsbA1. Le domaine TRX est composé des résidus 1 à 67 et 140 à 189 et le domaine hélical des résidus 68 à 139 (Figure 52-B). Le motif CXXC du site actif de DsbA3, également localisé à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_1 , est composé par la séquence C34-V35-H36-C37. Les cystéines sont également réduites.

2. Comparaison des structures de DsbA1 et DsbA3 :

▪ Structure globale :

Les modèles atomiques de DsbA1 et DsbA3 se superposent avec un r.m.s.d. de 1.1 Å calculée sur la comparaison de 186 C $^\alpha$ (Figure 54). Cette faible valeur de r.m.s.d. montre que les structures des domaines solubles des deux enzymes sont extrêmement proches, ce qui est en accord avec leur forte identité de séquence (Figure 53).

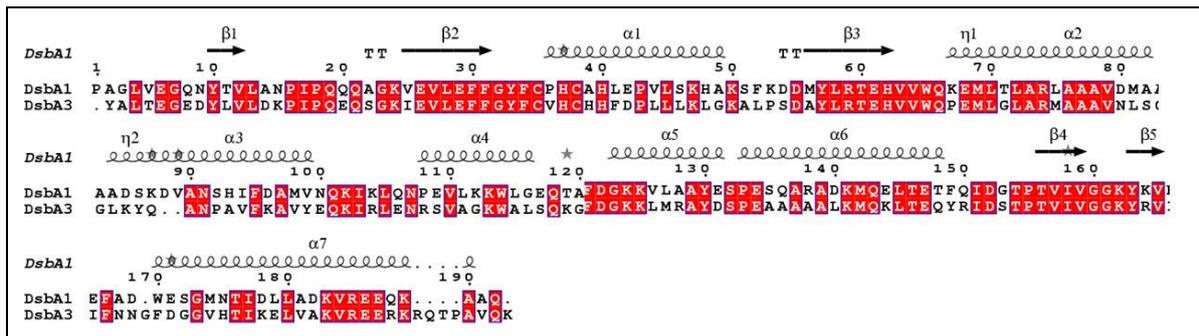


Figure 53 : Alignement des séquences des domaines solubles de DsbA1 et DsbA3.

Les résidus conservés sont encadrés en rouge et les structures secondaires de DsbA1 sont schématisées au-dessus de l'alignement.

Nous pouvons cependant observer quelques différences entre ces deux structures, dont la plus importante concerne l'orientation du domaine hélical (Figure 54-2). Des petits décalages sont également observables au niveau de deux boucles de ce même domaine, faisant la connexion entre les hélices α_4 et α_5 et les hélices α_2 et α_3 , toutes deux situées sur la face opposée à celle du site actif. Les domaines TRX des deux structures se superposent très bien, à l'exception de la région du motif β_5 - α_7 située à proximité du site actif dont les orientations sont légèrement différentes (Figure 54-1). Dans la structure de DsbA d'*E. coli*, cette région fait partie de la cavité hydrophobe impliquée dans l'interaction avec DsbB (Inaba et al. 2006a; Inaba et al. 2006b).

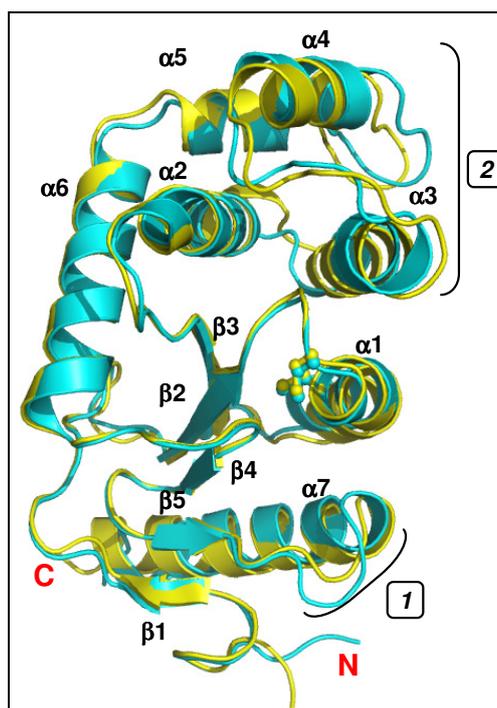


Figure 54 : Comparaison des structures de DsbA1 et DsbA3.

Représentation en ruban. Superposition de DsbA1 (jaune) et DsbA3 (cyan) avec un r.m.s.d. de 1.1 Å sur 186 C α . Les différences majeures concernent le motif β 5- α 7 (1) et le domaine hélical (2).

▪ **Site actif :**

Les homologues de séquences dans la famille des thiorédoxines sont assez faibles à l'exception du site actif qui est caractérisé par deux motifs conservés importants :

- le motif CXXC, composé de deux cystéines actives ;
- le motif de la boucle *cis*-Proline composé d'une Proline en conformation *cis*, située à proximité spatiale du site actif. Ce résidu a un rôle dans la reconnaissance et la stabilisation du substrat, par des interactions de type van-der-Waals (Qin et al. 1996; Charbonnier et al. 1999; Kadokura et al. 2004).

Chez les NmDsbA, ces deux régions sont conservées. Au niveau du motif CXXC, les résidus centraux, décrits comme étant importants dans la fonction des oxydoréductases de thiol-disulfure (Grauschopf et al. 1995; Martin 1995) sont différents chez les deux enzymes de *N. meningitidis* (VH pour DsbA3 et PH pour DsbA1). Cela n'a cependant pas d'effet sur la conformation tridimensionnelle du site actif (Figure 55).

Le motif de la boucle *cis*-Proline chez les enzymes de *N. meningitidis* (résidus 176 à 178 et 151 à 153 chez DsbA1 et DsbA3, respectivement) est composé de la séquence TcP.

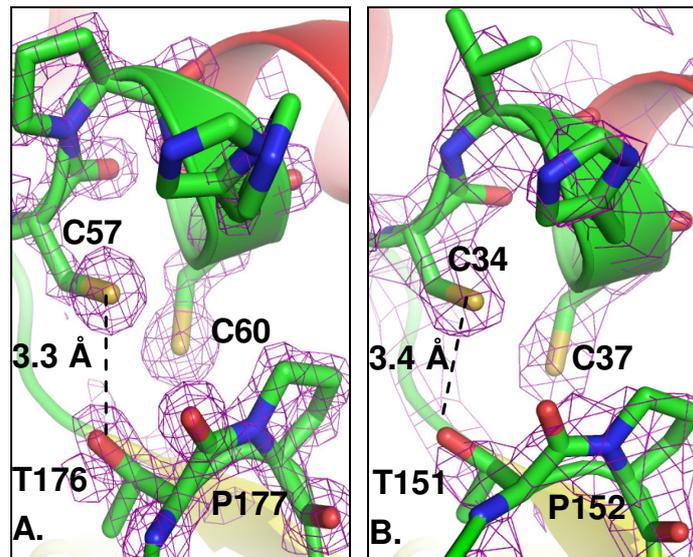


Figure 55: Zoom de la région du site actif de DsbA1 (A) et DsbA3 (B)..

Seuls les résidus du motif CXXC et de la boucle *cis*-Proline sont représentés. La carte de densité électronique ($2mF_{obs}-DF_{calc}$) calculée autour du site actif est représentée en violet (la carte est contourée à 1.2σ).

Curieusement, cette séquence (TcP) est également retrouvée chez les isomérases d'*E. coli* DsbC et DsbG mais pas chez DsbA d'*E. coli* qui a une Valine à la place de la Thréonine. Le groupement hydroxyle de la Thréonine (T176_{DsbA1} et T151_{DsbA3}) est à seulement 3.5 Å de l'atome de soufre de C57_{DsbA1} (C34_{DsbA3}) et pourrait constituer une caractéristique remarquable des structures de DsbA1 et DsbA3, car cette distance autorise la formation d'une liaison hydrogène avec la cystéine nucléophile.

▪ Répartition des charges de surface:

Le calcul du potentiel électrostatique de surface à partir des structures des NmDsbA a été effectué par le logiciel APBS (Baker et al. 2001).

En accord avec leurs valeurs éloignées de point isoélectrique, ($pI(DsbA1) = 5.6$, $pI(DsbA3) = 9$), la distribution des charges à la surface des deux protéines est également différente (Figure 56).

Bien que, globalement, le domaine TRX soit plutôt acide et le domaine hélical soit plutôt basique pour les deux NmDsbA, le domaine TRX est plus acide chez DsbA1 et le domaine hélical est plus basique chez DsbA3 (Figure 56-(a,c)).

Les régions situées autour du site actif (appelées « patch hydrophobe » et « cavité de liaison au peptide » sur la surface électrostatique d'EcDsbA) sont relativement bien conservées chez DsbA1 et DsbA3 ((Figure 56-(a,c)) (Martin et al. 1993a). Néanmoins, la

cavité de liaison au peptide chez DsbA1 est plus acide et d'une forme différente par rapport à celle de DsbA3 et l'hydrophobicité du « patch hydrophobe » est moins marquée chez DsbA3 (Figure 56-(b,d)).

Les différences majeures dans la répartition des charges de surface sont surtout localisées sur la face opposée à celle du site actif, qui est acide chez DsbA1 et basique chez DsbA3.

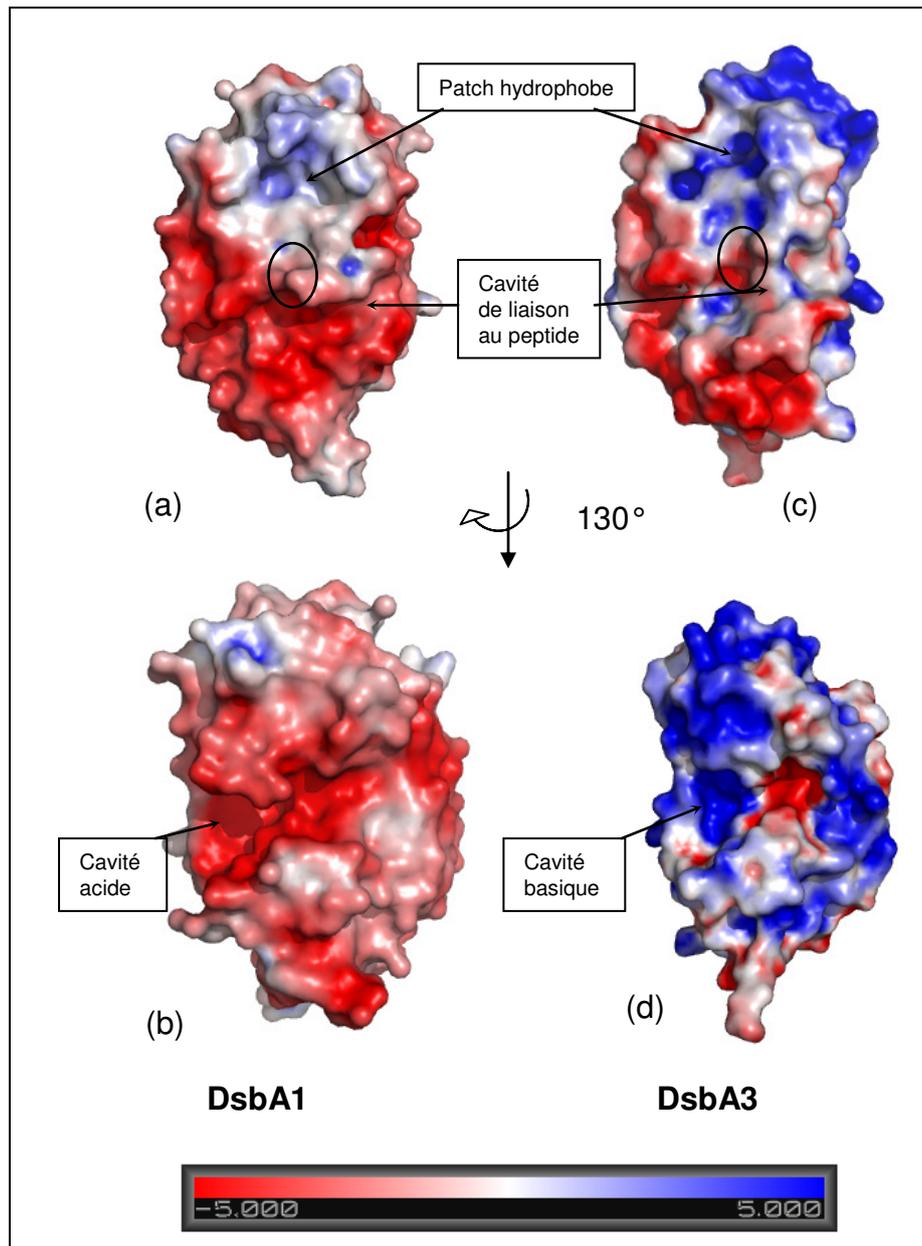


Figure 56 : Distribution des charges à la surface des modèles de DsbA1 (a,b), DsbA3 (c,d).
La position de la cystéine nucléophile est indiquée par un cercle noir

B) La structure de DsbA2

La structure de DsbA2 n'a pas pu être résolue lors de cette étude. Cependant, le fort pourcentage d'identité que partagent les deux lipoprotéines (73%) suggère que la structure tridimensionnelle de DsbA2 serait assez proche de celle de DsbA1 (Figure 57).

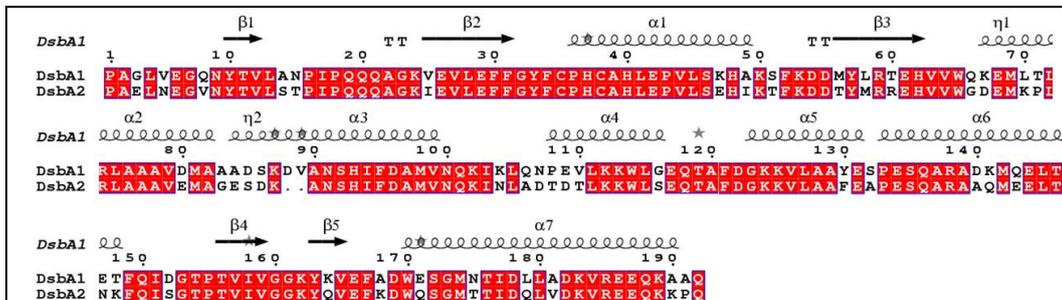


Figure 57 : Alignement des séquences des domaines solubles de DsbA1 et DsbA2.

Les résidus conservés sont encadrés en rouge et les structures secondaires de DsbA1 sont représentées au-dessus de chaque alignement.

La Figure 58-A montre que les résidus non conservés entre DsbA1 et DsbA2 ne se trouvent pas à proximité du site actif et par conséquent ne devraient pas affecter la fonction de l'enzyme, ni la reconnaissance du substrat.

Lorsque le même type de comparaison est fait entre DsbA1 et DsbA3 (Figure 58-B), nous constatons que la région située autour du site actif est beaucoup moins bien conservée entre ces deux enzymes. Cela pourrait expliquer en partie le comportement différent *in vivo* de DsbA3 par rapport aux deux lipoprotéines.

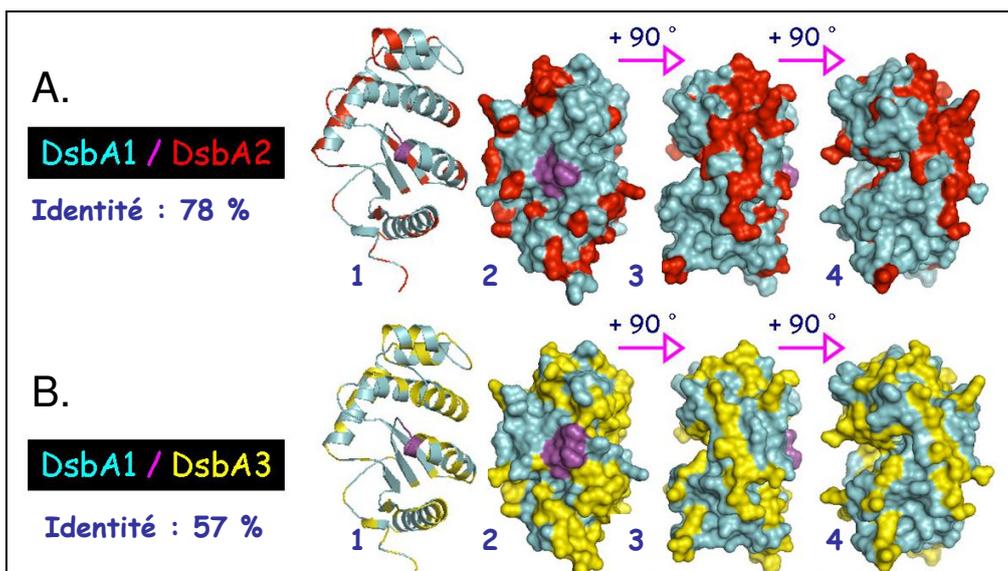


Figure 58 : Localisation des résidus non conservés entre DsbA1 et DsbA2 (A) et entre DsbA1 et DsbA3 (B).
 1. Structure de DsbA1; 2, 3 et 4 : représentation de la surface accessible. Les résidus conservés entre DsbA1 et DsbA2 ou entre DsbA1 et DsbA3 sont en bleu. Les résidus non conservés entre DsbA1 et DsbA2 sont en rouge et entre DsbA1 et DsbA3 sont en jaune. La région du site actif est en violet.

C) Comparaison des deux structures de DsbA3 :

La résolution de la structure de DsbA3 dans un autre système cristallin (code PDB 2ZNM) a été publiée au cours de cette thèse (Vivian et al. 2008). De façon étonnante, DsbA3 a cristallisé dans des conditions bien différentes de celles décrites dans ces travaux: PEG 4000 à 20 %, tampon Tris 0.1 M, pH 8.0 et 0.2 M d'acétate de sodium. Les cristaux appartiennent au groupe d'espace $P2_1$ ($a= 54.5 \text{ \AA}$, $b=88.6 \text{ \AA}$, $c=84.4 \text{ \AA}$, $\beta = 106.9^\circ$) et contiennent 4 molécules par unité asymétrique, ce qui correspond à un empilement bien différent. La résolution de cette structure a été effectuée par la méthode MAD au seuil du sélénium et affinée jusqu'à une résolution de 2.3 \AA avec des valeurs de R_{factor} et de R_{free} de 21.0 et 26.3 %, respectivement.

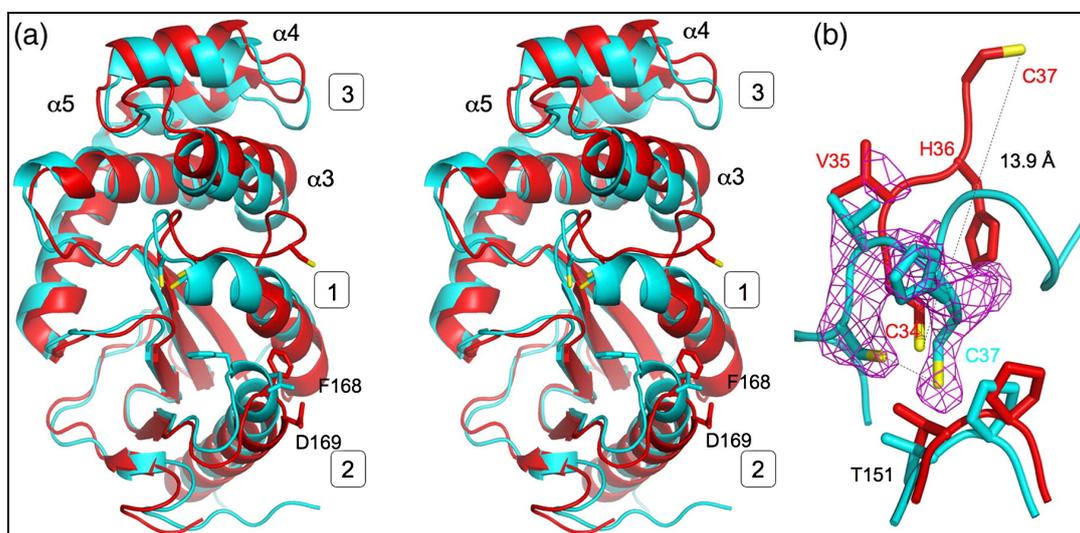


Figure 59 : Superposition des structures de DsbA3-3DVX (cyan) et DsbA3-2ZNM (rouge).

(a) Vue en stéréo de la superposition, montrant les principales différences structurales au niveau de la région du site actif (1), de la boucle importante dans l'interaction avec DsbB (2) et dans le domaine hélicale (3). (b) Zoom de la région du site actif: seuls les résidus du térapeptide CXXC et de la boucle *cis*-Proline sont représentés. La carte de densité électronique (ici une « omit-map » (Fosbs – Fcalc)) calculée autour de la séquence CXXC est également représentée et contourée à 3σ (Lafaye et al. 2009).

Ces deux modèles se superposent avec un r.m.s.d. de 2.3 \AA sur 183 paires d'atomes C^α (r.m.s.d. de 2.1 \AA si la séquence CXXC est exclue du calcul effectué par le programme LSQKAB (CCP4 1994)). La comparaison des modèles met en évidence une différence de conformation très importante au niveau du motif CXXC du site actif (Figure 59-a(1)), avec un déplacement du squelette carboné compris entre 2.5 et 10 \AA . Dans la structure 2ZNM, le motif CXXC adopte une conformation étendue précédant l'hélice $\alpha 1$ (Figure 59-a(1)), avec une distance entre les deux atomes de soufre des cystéines catalytiques (C34 et C37) de 14 \AA (Figure 59-b). Cette conformation est tout à fait inhabituelle pour une enzyme présentant un

repliement du type TRX et la distance importante séparant les cystéines C34 et C37 est incompatible avec la formation d'un pont disulfure. Par opposition, notre structure de DsbA3 obtenue sous son état réduit présente un site actif comparable à celui généralement retrouvé dans la famille des TRX, avec une distance séparant les deux atomes de soufre des cystéines catalytiques de 3.5 Å, plus compatible avec la formation d'un pont disulfure (Figure 59-b).

Une autre différence entre les deux modèles est située dans la région impliquée dans l'interaction avec DsbB et plus précisément la boucle située entre le brin $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 7$ (Figure 59-a(2)). Dans cette région, les positions des résidus F168 et D169 situés à l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 7$ sont déplacés de 3.7 et 4.8 Å, respectivement (ce déplacement est calculé pour la position des atomes C $^\alpha$). Enfin, les domaines hélicaux des deux structures présentent également des différences de conformation au niveau de la région composée par les hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ et les deux boucles situées entre les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ et les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (Figure 59-a(3)). Cette région participe à des contacts intermoléculaires dans la structure du cristal de 2ZNM. Cette différence est probablement causée par l'empilement cristallin.

D) Comparaison des structures de DsbA1 et DsbA3 avec la structure de DsbA réduite d'*E. coli*.

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, la première DsbA découverte chez les bactéries à Gram-négatif est celle d'*E. coli* (EcDsbA). Elle a été très bien étudiée et constitue une référence pour l'étude des autres DsbA. Dans ce paragraphe, nous allons compléter l'analyse structurale des NmDsbA en les comparant avec la structure réduite d'EcDsbA (Martin et al. 1993a; Guddat et al. 1998) (Tableau 8), afin de mettre en évidence les différences et ressemblances qui existent entre les DsbA de ces deux bactéries. DsbA3 et DsbA1 étant très proches structuralement, nous considérerons que les comparaisons seront analogues pour les deux enzymes de *N. meningitidis*.

	DsbA1 DsbA2	DsbA1 DsbA3	DsbA2 DsbA3	DsbA1 EcDsbA	DsbA2 EcDsbA	DsbA3 EcDsbA
R.m.s.d.	-	1.1 Å (186 C $^\alpha$)	-	2.2 Å (161C $^\alpha$)	-	2.4 Å (163C $^\alpha$)
Identité	76 %	54.5 %	49 %	21.2 %	26.4 %	21.5 %

Tableau 8 : Pourcentage d'identité et déviations standards entre les domaines solubles des trois NmDsbA et EcDsbA.

Les identités sont calculées par le logiciel ClustalW (Thompson et al. 1994) et les r.m.s.d. avec le logiciel COOT (n.c. non connu) (Emsley et al. 2004).

A l'exception de leur répartition de charges de surface, les structures des domaines solubles de DsbA1 et de DsbA3 se ressemblent beaucoup. Leurs structures tridimensionnelles se superposent avec l'enzyme d'*E. coli* avec des déviations standards similaires (Figure 60A et Tableau 8).

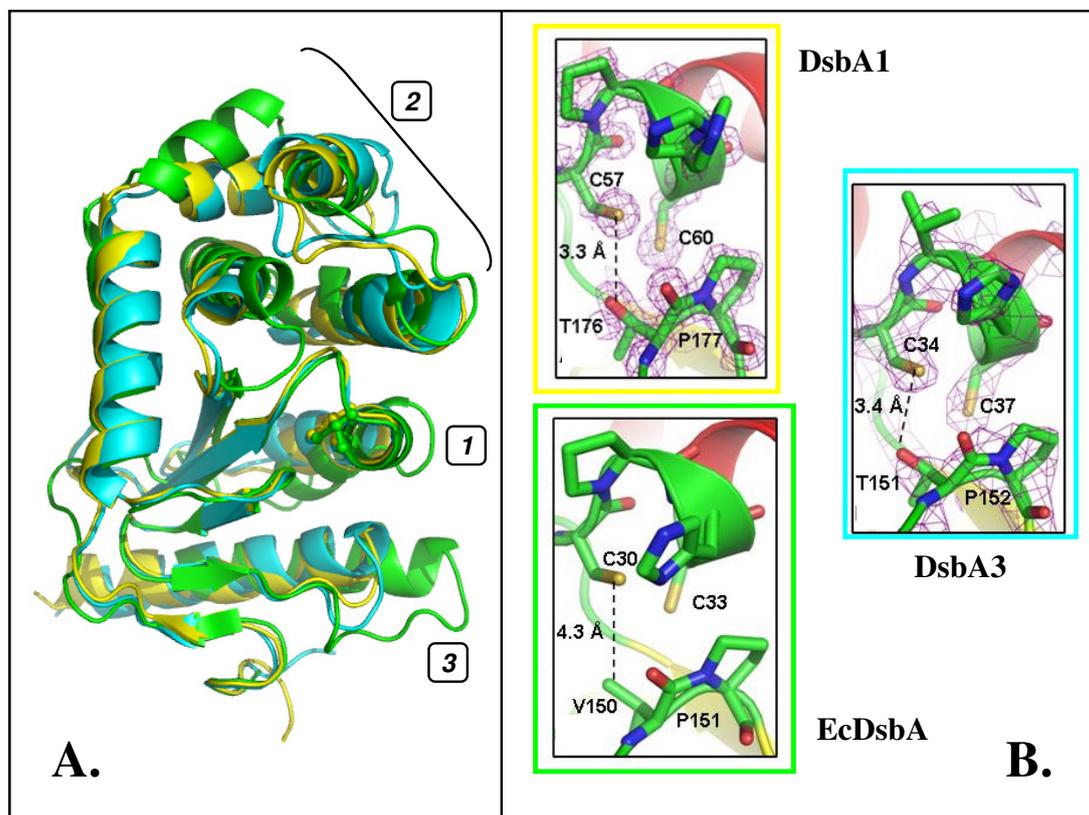


Figure 60: A. Comparaison des structures de DsbA1 (jaune) et EcDsbA (vert).

Les différences principales sont localisées au niveau de l'hélice $\alpha 1$ (1), du domaine hélical (2) et du motif $\beta 5-\alpha 7$ (3). **B. Zoom de la région des sites actifs de DsbA1, DsbA3 et EcDsbA :** Seuls les résidus du motif CXXC et de la boucle *cis*-Proline sont représentés. Les cartes de densité électronique pour DsbA1 et DsbA3 ($2mF_{obs}-DF_{calc}$) calculées autour du site actif sont représentées en violet (la carte est contourée à 1.2σ).

Une première différence importante concerne la séquence du site actif (Figure 60A(1) et B). Le térapeptide CPHC est conservé entre DsbA1 et EcDsbA, alors que chez DsbA3 la Proline est remplacée par une Valine. Comme nous l'avons vu, cela n'affecte cependant pas la configuration tridimensionnelle du site actif (Figure 60B).

Les échecs de cristallisation des formes oxydées de DsbA1 ou de DsbA3 semblent indiquer que leur forme oxydée serait moins stable par rapport à celle d'EcDsbA, dont la structure oxydée a été résolue en 1993 (Martin et al. 1993a; Guddat et al. 1998). Cette différence de stabilité pourrait être expliquée par la différence de séquence au niveau de la

boucle « *cis*-Proline », située à proximité du site actif (Qin et al. 1996; Charbonnier et al. 1999; Kadokura et al. 2004). Chez les trois NmDsbA, la *cis*-Proline suit une Thréonine alors que c'est une Valine chez EcDsbA (V150). Dans la structure réduite d'EcDsbA, le groupement méthyle de V150 est à 4.5 Å de l'atome de soufre de la cystéine nucléophile (Figure 60B).

D'autres différences structurales existent autour du site actif. Premièrement, la boucle en C-Terminal de la chaîne polypeptidique, reliant le brin $\beta 5$ à l'hélice $\alpha 7$, est sensiblement plus courte chez les enzymes de *Neisseria* (Figure 60A(3)). En terme de surface, cette région correspond à la cavité d'interaction avec DsbB chez *E. coli* et sera donc plus petite pour les NmDsbA. L'hélice $\alpha 1$ constitue une autre différence importante entre les trois enzymes (Figure 60A(1)). Elle est constituée de deux segments ($\alpha 1$ et $\alpha 1'$) chez *E. coli* et de seulement un segment chez DsbA1 et DsbA3.

Des différences plus mineures sont présentes au niveau de la conformation de la boucle connectant le domaine TRX et le domaine hélical, entre le brin $\beta 3$ et l'hélice $\alpha 2$ (Figure 60A(2)). Enfin, la superposition des structures indique une certaine variabilité du domaine hélical (Figure 60A(2)) avec les orientations des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ légèrement différentes chez les NmDsbA.

III. Etudes biochimiques des NmDsbA

III.1. Mesure du potentiel redox des NmDsbA

Le potentiel redox d'une oxydoréductase est un facteur qui influence sa fonction *in vivo* et permet d'évaluer ses capacités à modifier ses substrats. Il existe plusieurs méthodes pour obtenir le potentiel redox d'une protéine. Comme nous l'avons déjà mentionné, la méthode la plus largement utilisée mesure le potentiel redox par équilibre de la protéine d'intérêt avec différents ratios d'une petite molécule redox, comme le glutathion ou le DTT (Roos et al. 2007). La deuxième méthode, détermine le potentiel redox par équilibre directe entre deux protéines redox (Aslund et al. 1997).

La détermination des potentiels redox des NmDsbA a été effectuée en collaboration avec Jean-François Collet de l'Université Catholique de Louvain à Bruxelles.

A) Application de la méthode de d'équilibre redox protéine-protéine aux NmDsbA

Dans un premier temps, nous avons essayé de déterminer les potentiels redox des NmDsbA par la méthode des équilibres redox protéine-protéine (ERPP) développée par (Aslund et al. 1997), qui permet de quantifier toutes les espèces présentes dans l'échange thiol-disulfure en une seule étape de chromatographie.

En comparaison avec la méthode utilisant le mélange redox GSH/GSSG, cette méthode présente de nombreux avantages. Les principales difficultés qui ont accompagné les déterminations des potentiels redox d'EcDsbA (Kortemme et al. 1996) et de PDI (Wunderlich et al. 1993b) étaient liées à un arrêt incomplet de la réaction d'échange thiol-disulfure. Ce problème est nécessairement plus prononcé en présence de concentrations milli molaires de GSH/GSSG que dans la méthode ERPP qui est réalisée à des concentrations micro molaires des seules formes oxydées et réduites des protéines.

1. Mise au point de la méthode pour les NmDsbA :

- **Séparation des formes redox des NmDsbA par HPLC en phase inverse :**

Afin de pouvoir appliquer cette technique aux NmDsbA, il a fallu dans un premier temps mettre au point l'étape de chromatographie en phase inverse afin de séparer les formes

réduite et oxydée. Une colonne en phase inverse en C18 (WATERS Delta-Pak C18 300 Å column 5µm 3.9x150mm) qui a déjà permis de déterminer les potentiels redox d'autres protéines TRX a été choisie pour réaliser cette expérience.

Nous avons obtenu une bonne séparation pour DsbA3, mais pas pour DsbA1 ni DsbA2. Nous avons donc poursuivi notre étude sur DsbA3 uniquement.

▪ **Choix de la protéine B pour l'équilibre avec DsbA3 :**

Comme décrit dans les principes expérimentaux, le choix de la protéine B est très important pour le succès de cette méthode et dépend des paramètres suivants :

- la valeur de son potentiel redox $E^{\circ}(B)$; elle doit être connue et avoir été déterminée de façon très précise avec la même méthode des équilibres redox protéine-protéine. En effet, le calcul de $E^{\circ}(DsbA3)$ est directement relié à cette valeur par la relation:

$$\Delta E^{\circ}_{DsbA3-B} = E^{\circ}_{DsbA3} - E^{\circ}_B$$

- la différence de potentiel entre la protéine B et DsbA3 ($\Delta E^{\circ}_{DsbA3-B}$) ; cette valeur ne doit pas être supérieure à 40 mV pour que les quatre espèces soient présentes en quantité suffisante pour donner des pics visibles sur le chromatogramme.
- les pics de chromatographie des formes oxydée et réduite de la protéine B et de DsbA3 devront pouvoir être séparés pour une bonne quantification des quatre populations à l'équilibre.

-

Nous disposons de trois protéines redox dont les potentiels ont été préalablement déterminés par la méthode de F. Aslund:

- EcDsbA : $E^{\circ} = -125$ mV (Wunderlich et al. 1993a);
- EcDsbC : $E^{\circ} = -158$ mV (Zapun et al. 1995);
- γ -DsbD : $E^{\circ} = -241$ mV (Collet et al. 2002b).

Les activités réductases mesurées précédemment donnent une première information des activités des trois NmDsbA, qui seraient des protéines plus oxydantes que DsbA d'*E. coli*. Si ceci est vrai, les deux protéines EcDsbA et EcDsbC permettront alors d'obtenir une valeur de $\Delta E^{\circ}_{DsbA3-B}$ acceptable pour déterminer $E^{\circ}(DsbA3)$, contrairement à γ -DsbD dont le potentiel redox est trop électro-négatif.

En réalité, seule la séparation par HPLC des pics de DsbA3 de et γ -DsbD a été exploitable.

2. Analyse de l'équilibre redox entre DsbA3 et γ -DsbD :

Le premier équilibre a été réalisé en incubant pendant 12h, 50 μ M de DsbA3_{ox} avec 50 μ M de γ -DsbD_{red}. Nous observons, à partir de l'aire des pics du chromatogramme (Figure 61), que 50 % de DsbA3 est réduite et 50 % de γ -DsbD est oxydée. Cela permet d'obtenir une valeur de potentiel redox pour DsbA3 comparable à celle de γ -DsbD de -240 mV. Ce résultat est très surprenant car il indique que DsbA3 serait une réductase.

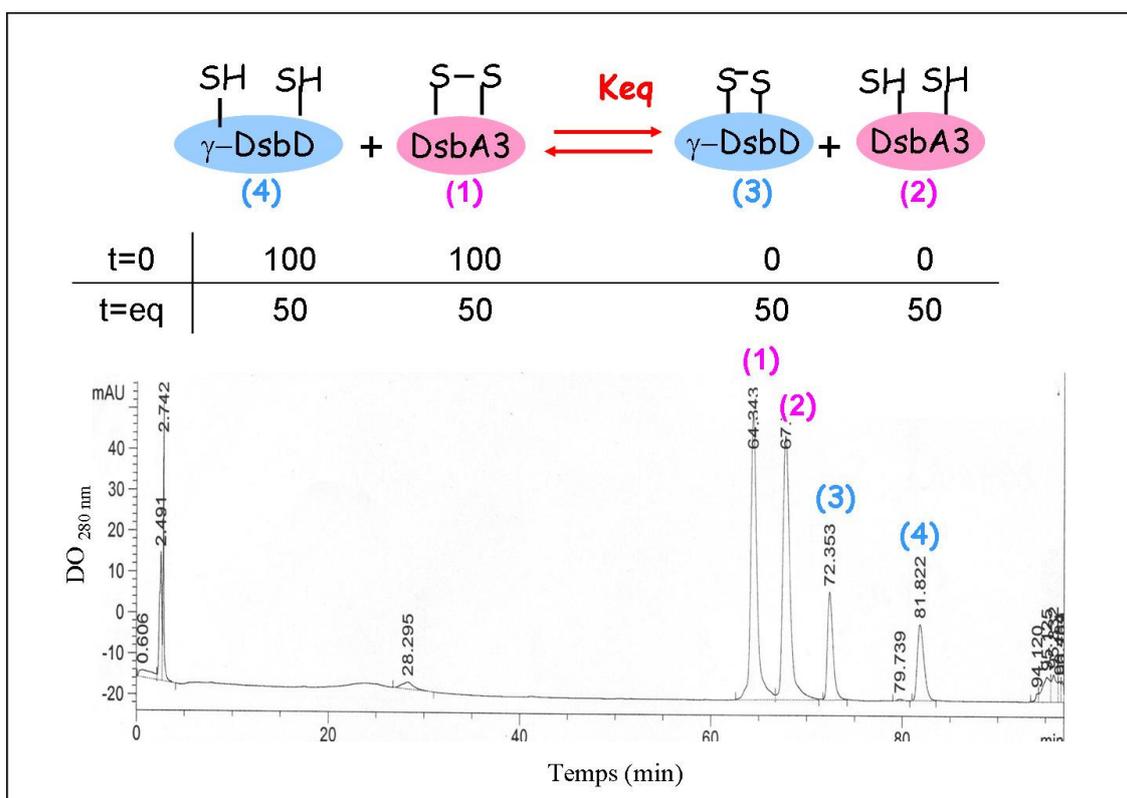


Figure 61 : Chromatogramme de l'équilibre redox après le mélange de DsbA3_{ox} et γ -DsbD_{red}.
Les pics 1 et 2 correspondent à DsbA3_{ox} et DsbA3_{red} et les pics 3 et 4 à γ -DsbD_{ox} et γ -DsbD_{red}.

Pour confirmer ce résultat, nous avons effectué la réaction inverse en incubant dans les mêmes conditions 50 μ M de DsbA3_{red} avec 50 μ M de γ -DsbD_{ox}. Sur le chromatogramme obtenu après 12 h d'incubation, nous n'observons que deux pics correspondant à 100 % de DsbA3_{red} et 100 % de γ -DsbD_{ox} (Figure 62). Aucun échange redox n'a eu lieu entre les deux protéines. A la vue de ce résultat, DsbA3 aurait donc un potentiel redox beaucoup moins électro-négatif que γ -DsbD. Ce résultat est cette fois-ci en accord avec la mesure de l'activité réductase de DsbA3 et avec notre première hypothèse.

Le chromatogramme présenté sur la Figure 61 ne correspond pas à un état d'équilibre entre DsbA3 et γ -DsbD. La difficulté à atteindre cet état est probablement due à une trop grande différence de potentiel entre les deux protéines.

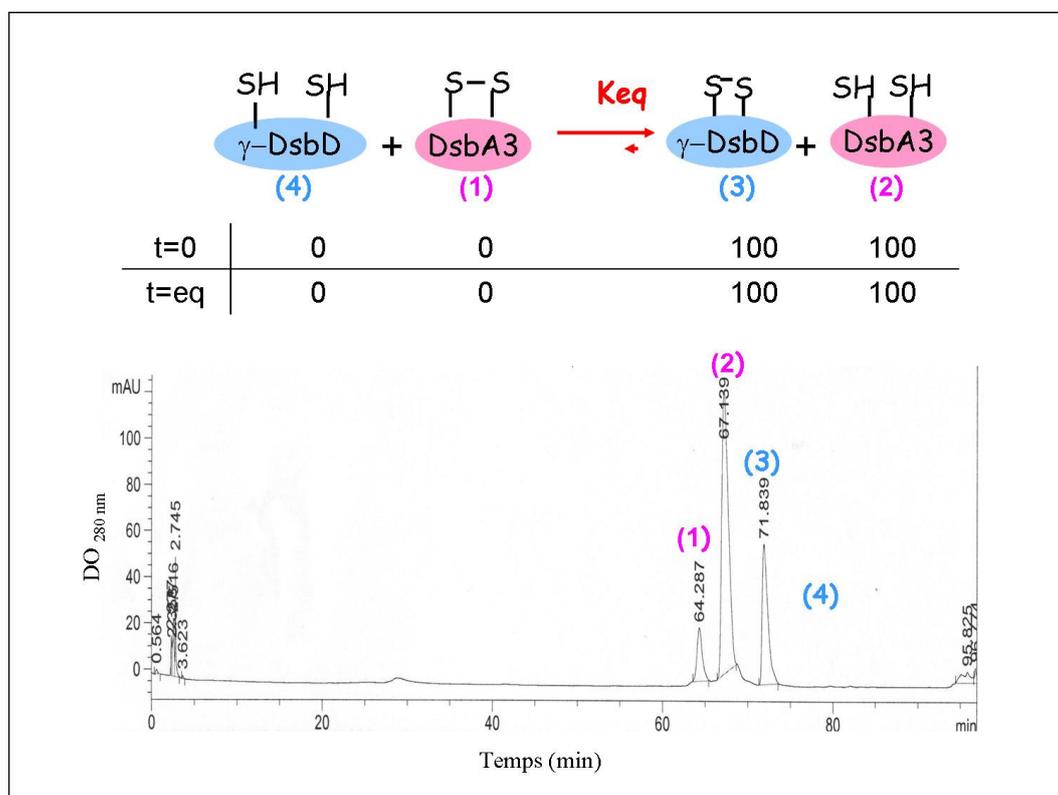


Figure 62 : Chromatogramme de l'équilibre redox après mélange de DsbA3_{red} avec γ -DsbD_{ox}.
Les pics 2 et 3 correspondent à DsbA3_{red} et à γ -DsbD_{ox}.

Même si cette expérience ne nous a pas permis de déterminer le potentiel redox de DsbA3, elle nous indique que $E^\circ(\text{DsbA3})$ serait beaucoup moins électro-négatif que $E^\circ(\gamma\text{-DsbD})$, ce qui est en accord avec un rôle d'oxydase. Ainsi, pour pouvoir déterminer le potentiel redox de DsbA3, il faudrait réaliser cette expérience avec une protéine B qui a un potentiel redox supérieur à (-160 mV). Cependant, comme nous l'avons dit plus haut, les deux protéines B disponibles au laboratoire, EcDsbA et EcDsbC, qui seraient de bonnes candidates pour l'équilibre avec DsbA3, ne peuvent être utilisées, car leurs pics d'élutions sur HPLC sont confondus avec ceux de DsbA3.

Par conséquent, cette technique n'a pas pu être utilisée pour la détermination des potentiels redox des NmDsbA. Il a donc fallu revenir à une méthode plus classique.

B) Détermination par équilibre avec le glutathion et fluorimétrie du potentiel redox des trois NmDsbA

Comme les potentiels redox ne peuvent être déterminés avec la méthode des équilibres redox protéine-protéine, nous nous sommes tournés vers une autre méthode basée également sur un équilibre de la protéine oxydée/réduite contre une petite molécule : le glutathion oxydé et réduit.

Dans cette méthode, le potentiel redox est mesuré à pH 7.0 et à 20°C, à partir de la constante d'équilibre (K_{eq}) avec le glutathion en utilisant la valeur de -240 mV pour le potentiel redox du couple GSSG/GSH (Roos et al. 2007). La constante d'équilibre est déterminée à partir de la courbe expérimentale « R (fraction des NmDsbA réduites) en fonction de différents ratios ($[GSH]^2/[GSSG]$) (Figure 63). La fraction des NmDsbA réduites est mesurée par fluorimétrie à partir de l'augmentation de la fluorescence des tryptophanes suite à la réduction du pont disulfure (Figure 64).

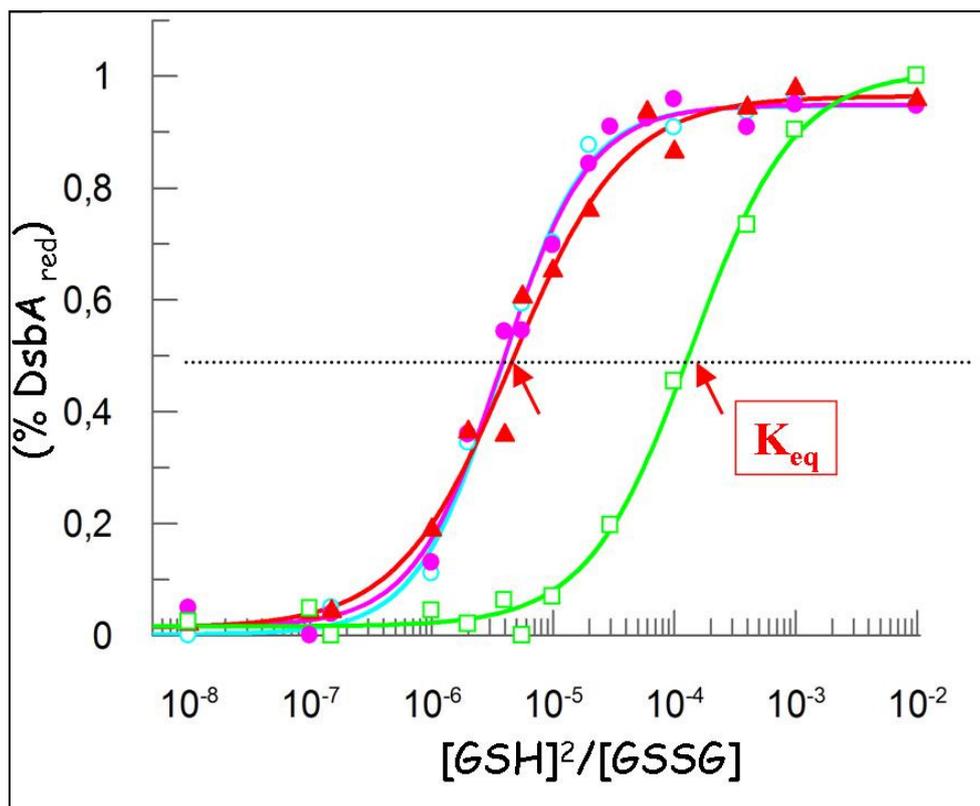


Figure 63 : Courbe de détermination du potentiel redox des NmDsbA par équilibre avec le glutathion. La fraction (R) de chaque protéine réduite à l'équilibre est mesurée en utilisant la fluorescence spécifique des protéines à 330 nm (excitation à 295 nm). DsbA1 (cyan), DsbA2 (rose), DsbA3 (rouge) et EcDsbA (vert).

1/ Spectre de fluorescence des NmDsbA :

Les trois NmDsbA oxydées présentent une augmentation de leur spectre de fluorescence, suite à la réduction de leur pont disulfure (Figure 64). Les spectres de fluorescence des trois enzymes de *Neisseria* sont similaires avec un λ_{max} à 334 nm.

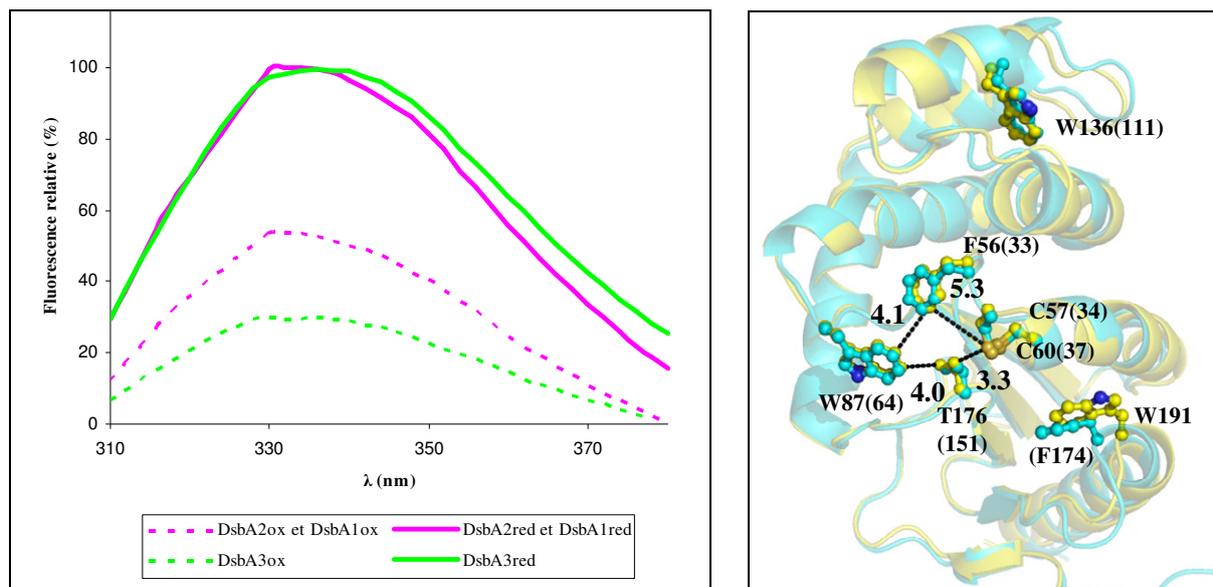


Figure 64 : Propriétés de fluorescence des NmDsbA.

A. Spectre d'émission de fluorescence des NmDsbA. Les spectres ont été enregistrés pour une concentration protéique de 1 μ M à 25°C dans un tampon 100mM KPhosphate, pH 7.0, 1mM EDTA (excitation à 295 nm). Les NmDsbA réduites ont été incubées avec 10 mM DTT et les NmDsbA oxydées avec 40 mM GSSG. Localisation sur les structures de DsbA1 et DsbA3 des résidus potentiellement impliqués dans la fluorescence. **B.** Superpositions des structures de DsbA1 (cyan) et DsbA3 (jaune). Les chaînes latérales des résidus potentiellement impliqués dans la fluorescence des enzymes sont représentées. Les nombres entre parenthèses correspondent aux résidus de DsbA3.

Les analyses des deux structures de DsbA1 et DsbA3 permettent de repérer les tryptophanes dans la structure (Figure 64) et d'expliquer le processus qui serait impliqué dans cette extinction de fluorescence. Parmi les trois tryptophanes de DsbA1 (W136-W87-W191) et les deux de DsbA3 (W111 et W64), W87_{DsbA1} et W64_{DsbA3} sont les plus proches du site actif mais ne sont pas en contact direct avec les cystéines catalytiques. La diminution de fluorescence pourrait s'expliquer par un processus d'extinction dynamique intramoléculaire, semblable à celui déjà décrit chez EcDsbA (Hennecke et al. 1997) qui implique un transfert d'énergie depuis W87_{DsbA1} ou W64_{DsbA3} vers les cystéines actives via les résidus F56 et T176 pour DsbA1 et F33 et T151 pour DsbA3.

2. Détermination des potentiels redox des trois NmDsbA

Les données obtenues permettent de déterminer graphiquement les constantes d'équilibre K_{eq} , qui sont de 3.7×10^{-6} M pour DsbA1 et DsbA2 et de 4.5×10^{-6} M pour DsbA3 (Figure 63). Ces valeurs donnent des potentiels redox de (-79 mV) pour DsbA1 et DsbA2 et (-81 mV) pour DsbA3. Afin de valider ces résultats, nous avons également mesuré le potentiel redox d'EcDsbA. Nous obtenons un potentiel redox de (-120 mV) en accord avec la littérature (Wunderlich et al. 1993a; Wunderlich et al. 1993b; Zapun et al. 1993), ce qui confirme la fiabilité de la méthode que nous avons utilisée. Les NmDsbA sont à ce jour les enzymes de la famille des oxydoréductases de thiol-disulfure les plus oxydantes (Figure 65), ce qui est en accord avec leur activité réductase plus faible par rapport à celle d'EcDsbA.

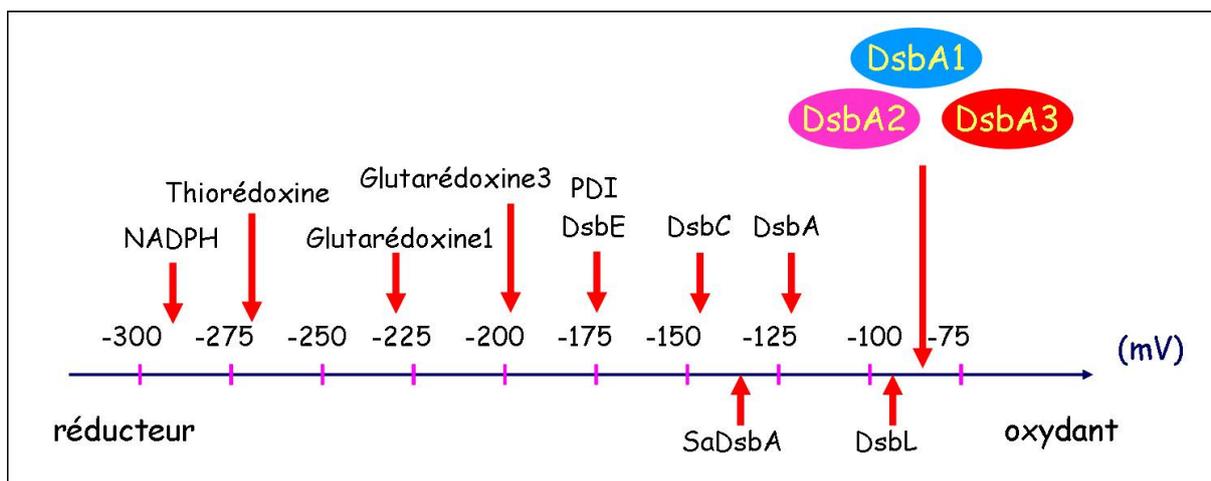


Figure 65 : Echelle des potentiels redox standards des principales oxydoréductases de thiol-disulfure

III.2. Pk_a de la cystéine nucléophile des NmDsbA

Le pK_a de la cystéine nucléophile du site actif des enzymes de la famille des oxydoréductases de thiol-disulfure permet d'évaluer la réactivité de ce résidu et donc de préciser la fonction de l'enzyme en tant qu'oxydase ou réductase.

L'anion thiolate a une absorption à 240 nm qui est augmentée par rapport à celle du groupement thiol (Nelson et al. 1994). Cette caractéristique permet de déterminer le pK_a de la cystéine nucléophile des trois NmDsbA ($C57_{DsbA1-A2}$ et $C34_{DsbA3}$) et de $C30$, la cystéine nucléophile chez EcDsbA en tant que contrôle, en suivant l'absorption UV à cette longueur d'onde pendant une titration de pH (Figure 66) (cf p72). La cystéine nucléophile a un pK_a de

3.0 pour DsbA1 et DsbA3 et de 3.3 pour DsbA2. La valeur de 3.7 obtenue pour EcDsbA est en accord avec la littérature (Grauschopf et al. 1995), ce qui permet de valider la méthode utilisée. Les NmDsbA ont un pKa légèrement plus acide que celui d'EcDsbA, ce qui est en accord avec leur potentiel redox et leur activité oxydase exceptionnelle.

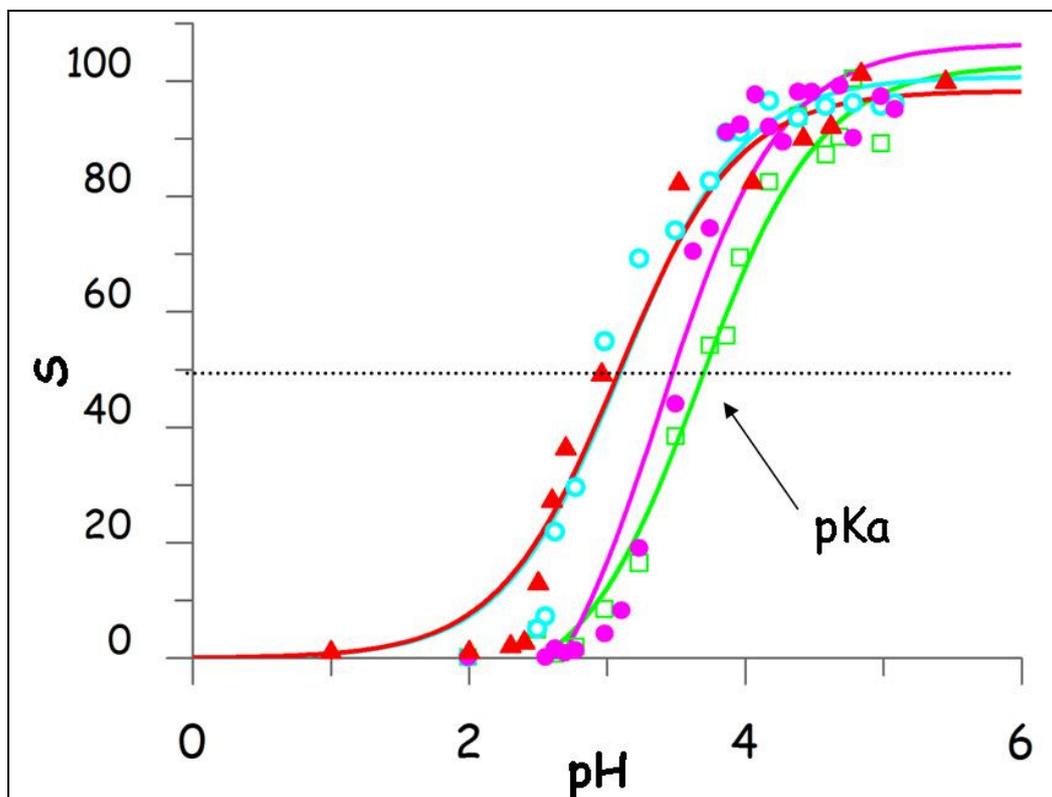


Figure 66 : Courbe de détermination du pKa de la cystéine nucléophile des NmDsbA.

Les cystéines nucléophiles correspondent aux résidus C57 chez DsbA1 et DsbA2, C34 chez DsbA3, C30 chez EcDsbA. La relation de dépendance entre le pH et l'absorbance spécifique du groupement thiol, défini comme $S = (A_{240}/A_{280})_{red}/(A_{240}/A_{280})_{ox}$, est ajustée selon l'équation d'Henderson-Hasselbach (les protéines oxydées ont été utilisées comme références).

III.3. Stabilités thermales des NmDsbA réduites et oxydées:

Chez les enzymes de la famille des oxydoréductases, la stabilité de leur forme réduite ainsi que la différence de stabilité entre leur forme réduite et oxydée sont deux éléments moteurs dans la réaction d'oxydation d'un substrat. Ces stabilités peuvent être évaluées par plusieurs méthodes. T.E. Creighton et son équipe ont montré par calorimétrie que la forme réduite d'EcDsbA était 3.6 (+/-) 1.4 kcal plus stable que sa forme oxydée (Zapun et al. 1993). Dans notre cas, nous avons utilisé la méthode de « Thermal Shift Assay » (TSA) basée

sur le signal de fluorescence d'une sonde colorée qui est affine des régions hydrophobes des protéines (cf p. 71) (Pantoliano et al. 2001; Ericsson et al. 2006). Nous l'avons utilisée pour les trois NmDsbA et EcDsbA en tant que système de référence. La différence de température de dénaturation (ΔT_m), mesurée chez EcDsbA entre les formes réduite et oxydée de l'enzyme, est de 10°C, c'est-à-dire comparable avec les mesures effectuées par A. Zapun par calorimétrie, ce qui valide cette approche. Avec des ΔT_m compris entre 15 et 18°C, les différences de stabilité entre les formes oxydées et réduites des NmDsbA sont plus importantes que pour EcDsbA. De plus, les T_m des NmDsbA réduites sont toutes plus élevées par rapport au T_m d'EcDsbA réduite (75, 70, 62 et 53 °C pour DsbA1, DsbA2, DsbA3 et EcDsbA, respectivement) (Figure 67).

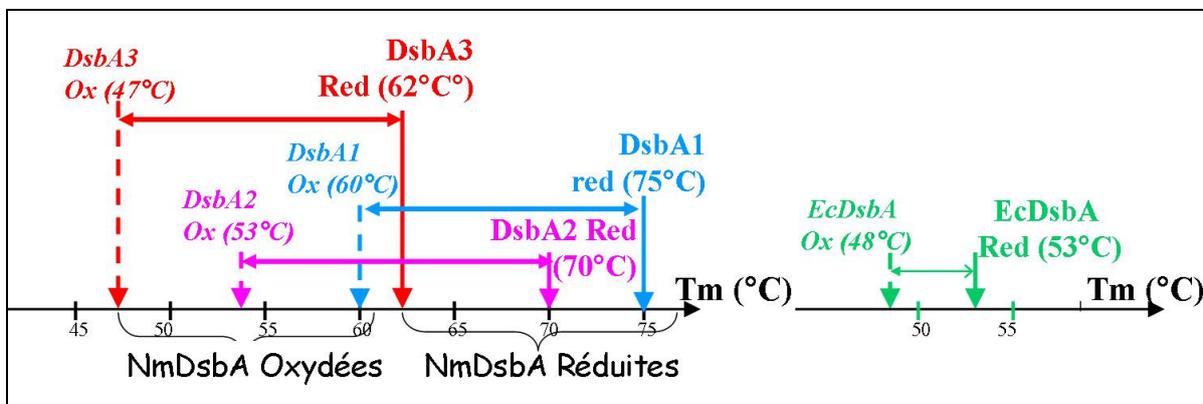


Figure 67 : Echelle des T_m obtenues par Thermal Shift Assay pour les NmDsbA et EcDsbA sous leurs deux états redox.

Ces résultats indiquent que la catalyse d'oxydation du substrat par les NmDsbA serait plus efficace que celle d'EcDsbA. Ces résultats sont en accord avec les résultats biochimiques présentés dans les paragraphes précédents.

III.4. Ré-oxydation des NmDsbA par son partenaire membranaire

Pour être à nouveau active, DsbA est ré-oxydée par l'enzyme localisée dans la membrane interne du périplasm: DsbB. En aérobie, DsbB ré-oxyde DsbA via les cystéines C104 et C130 puis transfère deux électrons à une molécule, l'ubiquinone, via les cystéines C41 et C44 du motif CXXC (Inaba et al. 2006b).

Bien que *N. meningitidis* possède trois DsbA, son génome ne possède qu'un seul gène (*nmb1649*) codant potentiellement pour un homologue à DsbB d'*E. coli* (EcDsbB). Cette DsbB (NmDsbB) présente 26 % d'identité de séquence avec EcDsbB (Figure 68).

Sur la base des prédictions de structures secondaires, comme son homologue chez *E. coli*, NmDsbB posséderait quatre hélices transmembranaires (résidus 9-25 ; 44-60 ; 142-160) et deux boucles périplasmiques (résidus 26-43 ; 86-141) contenant chacune une paire de cystéines (Figure 68 : astérisques roses):

- **C35-C38** situées dans la première boucle périplasmique au sein du motif CXXC conservé avec EcDsbB.
- **C101-C128** présentes dans la deuxième boucle périplasmique dont la séquence primaire est moins conservée avec EcDsbB.

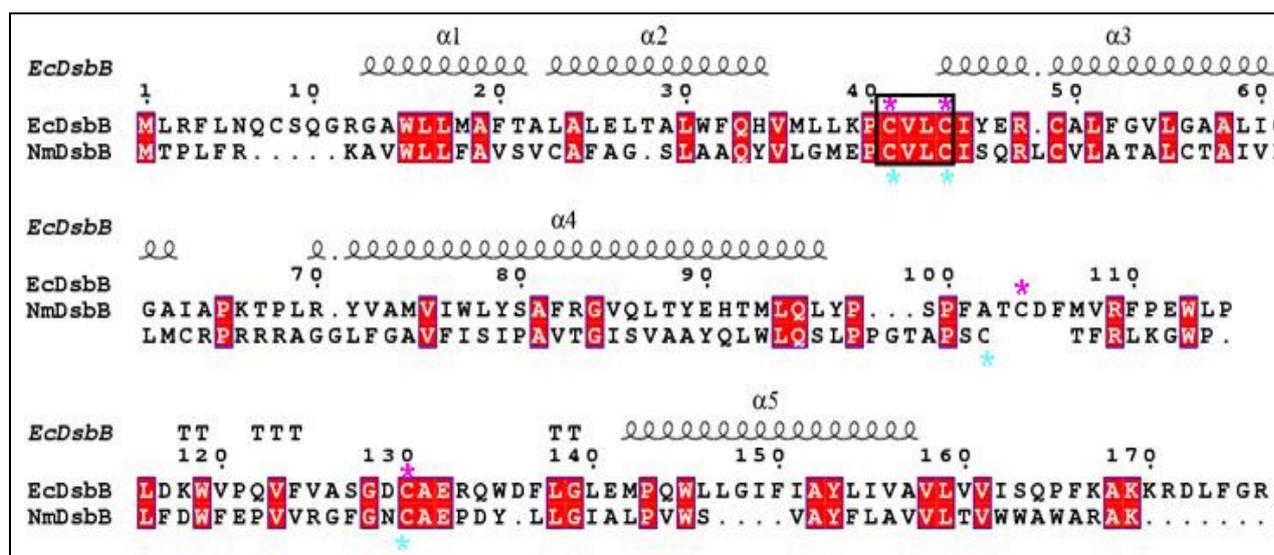


Figure 68 : Alignement des séquences des DsbB de *N. meningitidis* (NmDsbB) et d'*E. coli* (EcDsbB) (ESPrpt (Gouet et al. 1999)). Les résidus encadrés en rouge sont strictement conservés. Les quatre cystéines importantes dans le mécanisme de ré-oxydation de DsbA sont indiquées par des astérisques roses chez *E. coli* et des astérisques bleus chez *N. meningitidis*. Le motif conservé CXXC est encadré en noir. Les structures secondaires de la structure d'EcDsbB (code PDB 2ZUQ) sont superposées à l'alignement.

Afin d'évaluer si les trois NmDsbA présentent des différences par rapport à leur ré-oxydation par NmDsbB, nous avons isolé le gène codant pour NmDsbB et surexprimé la protéine chez *E. coli*.

A) Production de NmDsbB

Pour la production de la protéine NmDsbB, nous avons repris le protocole mis au point pour EcDsbB.

Après avoir récupéré par PCR le gène *nmdsbB* à partir du génome entier de la souche MC58 de *N. meningitidis*, nous l'avons inséré dans le vecteur pL-GFP. Ce vecteur contient le gène de la Green Fluorescent Protein (GFP) associée à une étiquette polyhistidine (Figure 69). Le but est d'exprimer une forme fusion DsbB-GFP.

La présence de la GFP facilite la mise au point de l'étape d'expression. Tout d'abord, c'est un test visuel de l'expression : si le gène est exprimé, les culots bactériens sont fluorescents. Deuxièmement, la fluorescence de la GFP dépend de son environnement. La GFP est fluorescente quand elle est exprimée dans le cytoplasme sous forme non agrégée.

Par conséquent, la fluorescence est un indicateur de l'expression de la protéine membranaire fusionnée à la GFP. La GFP permet d'améliorer le rendement de purification de protéines membranaires en leur assurant un meilleur repliement dans la membrane et de suivre la protéine durant les étapes de purification grâce à sa fluorescence (Drew et al. 2001).

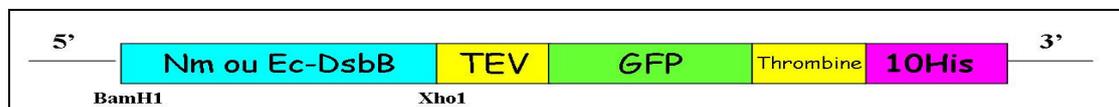


Figure 69 : Construction génétique de la fusion DsbB-GFP

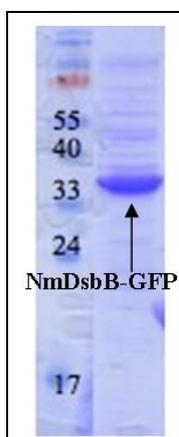


Figure 70 : Analyse de la protéine fusion NmDsbB-GFP en fin de purification.

Selon le protocole décrit dans la partie « *Protocole expérimentaux* » à l'issue de l'étape d'induction le culot bactérien est fluorescent.

En fin de purification, nous obtenons un rendement d'environ 73 nmol de NmDsbB-GFP par litre de milieu de culture LB et une pureté suffisante pour réaliser des études biochimiques (Figure 70).

B) Ré-oxydation des NmDsbA par DsbB de *N. meningitidis* et d'*E. coli*

Pour évaluer les capacités respectives de NmDsbB ou EcDsbB à oxyder les trois NmDsbA et EcDsbA, 10 μM de chacune des NmDsbA ont été incubés avec différentes concentrations de NmDsbB ou EcDsbB en présence ou en absence de la quinone Q1 (Figure 71). L'état redox des enzymes a été déterminé par la technique de l'AMS.

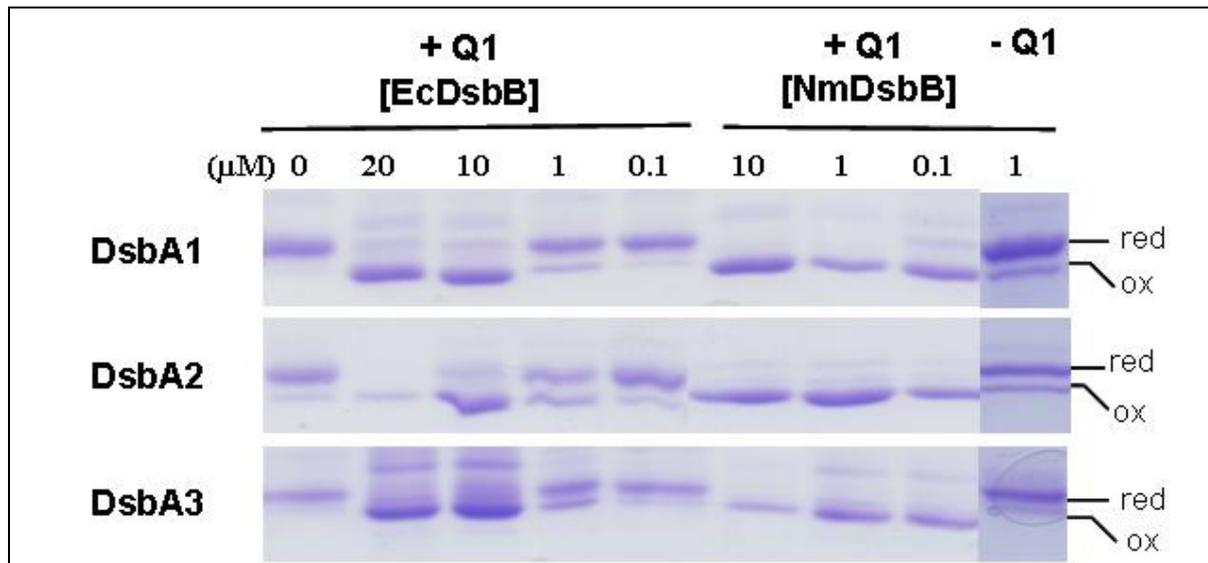


Figure 71 : Ré-oxydation des trois NmDsbA par NmDsbB ou EcDsbB.

10 μM de NmDsbA réduite ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante avec des concentrations définies de EcDsbB ou NmDsbB (+/-) 10 μM de Q1. L'oxydation naturelle (non enzymatique) de chaque DsbA est évaluée avec un échantillon sans DsbB.

En conditions catalytiques (0.1 μM de DsbB pour 10 μM de DsbA) et en présence de 10 μM de quinone Q1, les trois NmDsbA sont totalement ré-oxydées par NmDsbB mais pas par EcDsbB. Inversement, dans les mêmes conditions, EcDsbA est ré-oxydée par EcDsbB mais pas par NmDsbB.

En conditions stœchiométriques (10 μM d'EcDsbB pour 10 μM de NmDsbA), EcDsbB est capable de ré-oxyder les trois NmDsbA, ce qui indique que la réaction entre les NmDsbA et NmDsbB est relativement spécifique. La réaction entre les enzymes de *Neisseria* est également quinone dépendante. Enfin, les études cinétiques de la ré-oxydation des DsbA par DsbB montrent que la réaction serait plus rapide entre les enzymes d'*E. coli* qu'entre les enzymes de *N. meningitidis* (Figure 72).

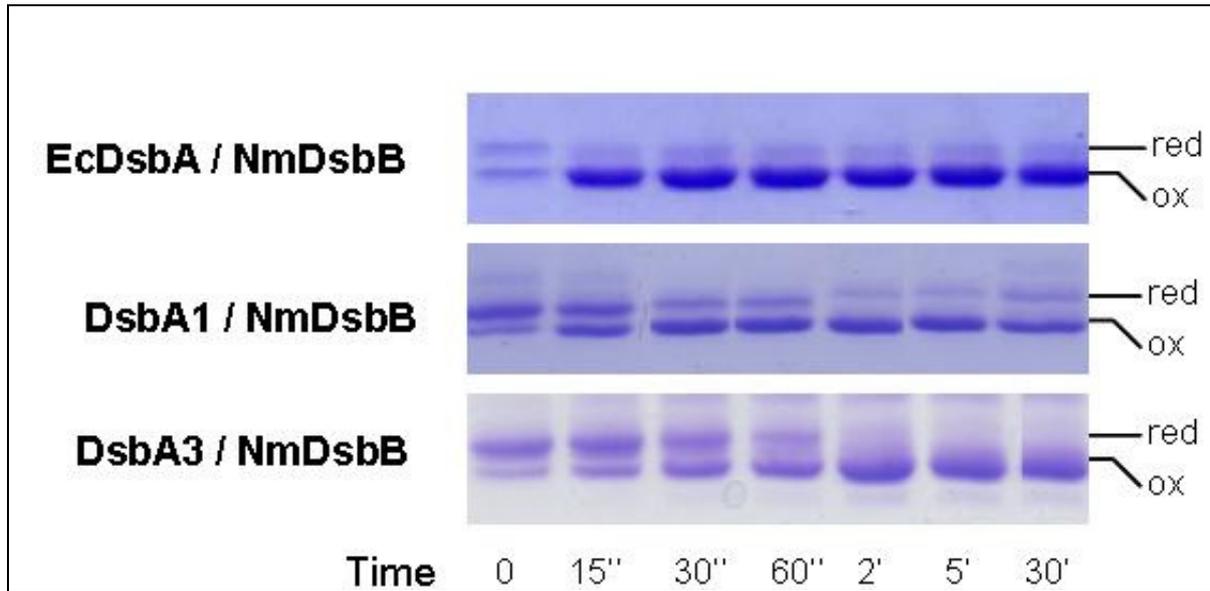


Figure 72 : Ré-oxydation de DsbA par DsbB en fonction du temps:
 10 μ M de DsbA réduites sont incubées avec 1 μ M de DsbB.

En conclusion, ces expériences nous montrent que le gène *nmb1649* code bien pour une protéine homologue à EcDsbB, dont la fonction serait de ré-oxyder les trois NmDsbA avec la même efficacité. Il n'y a donc pas de différences entre les trois NmDsbA à ce niveau-là.

Les différentes études biochimiques et structurales décrites jusque-là confirment que les enzymes sont bien toutes des oxydases et que leurs propriétés *in vitro* sont similaires. Les différences observées *in vivo* ne peuvent donc s'expliquer seulement au niveau de la fonction des protéines.

Résultats

Les mutants des NmDsbA

Les résultats des travaux énoncés ci-dessus montrent que les NmDsbA possèdent des caractéristiques fonctionnelles et structurales qui leur sont propres et qui les distinguent de leur homologue EcDsbA :

- Leur forme réduite est extrêmement stable, comme en témoigne leur caractéristique redox et leur étude structurale.
- Leur potentiel redox est de -80 mV : elles sont les oxydoréductases de thiol-disulfure les plus oxydantes actuellement connues.

Afin de mettre en évidence quelles régions de la structure seraient impliquées dans ces particularités, nous avons étudié des mutants de DsbA1 et DsbA3 suggérés par les structures tridimensionnelles. Nous nous sommes concentrés sur DsbA1 et DsbA3 pour lesquelles nous disposons de données cristallographiques. La séquence primaire de DsbA2 étant très proche de celle de DsbA1, nous supposons que sa structure 3D est proche également et que les résultats obtenus pour DsbA1 peuvent être extrapolés à DsbA2.

I. Introduction au travail de mutagenèse

Deux régions nous ont paru intéressantes à étudier dans ce contexte: la région contenant le motif *cis*-Proline qui est conservée chez les TRX et la boucle d'interaction avec DsbB.

I.1. Mutation dans la boucle de la *cis*-Proline

Les enzymes de la famille des thiorédoxines ont peu d'identité de séquence entre elles, mais possèdent des structures relativement proches (Heras et al. 2007) et ont surtout une large gamme d'activités redox (oxydase comme DsbA, isomérase comme DsbC, réductase comme TRX). Outre le motif catalytique CXXC, un motif très conservé au sein de cette super famille est la boucle de la *cis*-Proline, qui se trouve dans l'environnement du CXXC.

Chez les NmDsbA, cette boucle est composée de la séquence *TcisP* alors que EcDsbA et d'autres oxydases possèdent la séquence *VcisP* (Ren et al. 2009). L'étude structurale des NmDsbA suggère que ce résidu aurait un rôle important pour expliquer la grande stabilité de la forme réduite des NmDsbA et leur exceptionnel pouvoir oxydant. Le groupement hydroxyle de cette thréonine est en effet à 3.3 et 3.4 Å du soufre de C57 et C34 dans les structures de DsbA1 et DsbA3, respectivement. Il pourrait établir une liaison hydrogène stabilisant la forme thiolate de la cystéine nucléophile (Figure 55). Chez *E. coli*, la Valine qui

se superpose à cette Thréonine est par contre trop éloignée de l'atome de soufre et la Valine n'a pas le caractère polaire d'une Thréonine. Pour étudier plus précisément le rôle de ce résidu sur les propriétés redox des enzymes, nous avons muté cette Thréonine en Valine chez les enzymes de *Neisseria* et étudié son effet sur la structure et sur les propriétés enzymatiques de DsbA1 et DsbA3.

I.2. Mutation de la boucle d'interaction avec DsbB

Une autre région importante dans la fonction des DsbA concerne la boucle reliant le feuillet $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 7$ qui est impliquée chez *E. coli* dans l'interaction avec EcDsbB (Regeimbal et al. 2002). Cette région est assez différente entre les NmDsbA et EcDsbA en terme de séquence primaire et de conformation (Figure 73).

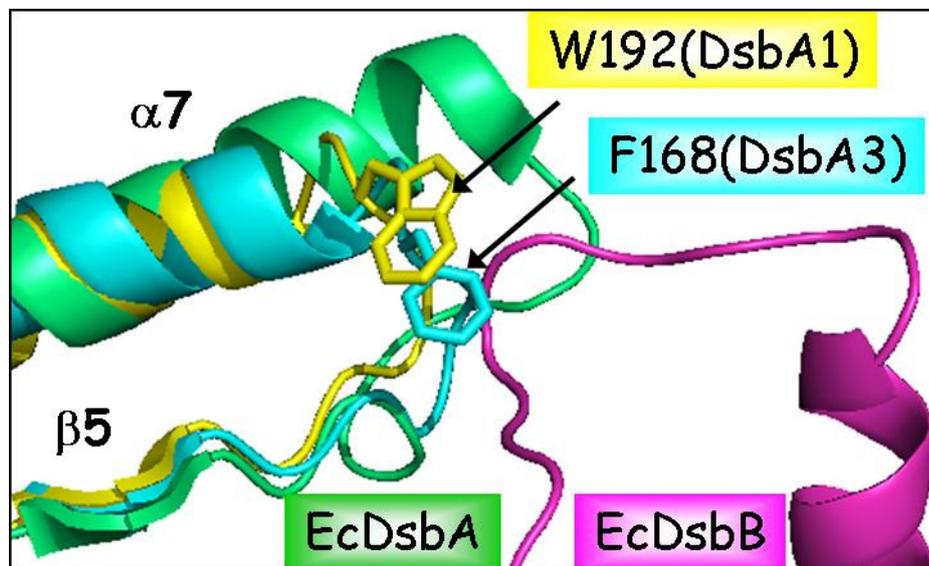


Figure 73 : Superposition de la région d'interaction avec DsbB, des structures de DsbA1 (jaune) et DsbA3 (cyan) et de EcDsbA en complexe avec EcDsbB (code PDB 2IH7) (rose).

Seuls les chaînes latérales des résidus mutés chez les deux NmDsbA sont représentés. DsbA1 et DsbA3 ont été superposées au modèle de EcDsbA dans le complexe avec EcDsbB

Nos études montrent que l'interaction des NmDsbA avec NmDsbB est spécifique. Les trois enzymes peuvent être également ré-oxydées par EcDsbB mais de façon moins efficace. La superposition de la structure cristallographique de DsbA-DsbB chez *E. coli* (code 2HI7) (Inaba et al. 2006a) avec celles de DsbA1 et de DsbA3 (Figure 73) suggère que les résidus W192_{DsbA1} et F168_{DsbA3} pourraient avoir un rôle dans la reconnaissance de l'enzyme membranaire chez NmDsbB. Nous avons testé cette hypothèse par mutagenèse.

II. Caractérisations des propriétés fonctionnelles de ces mutants

II.1. Etat redox et oxydation des enzymes

Les mutants T176V_{DsbA1} et T151V_{DsbA3} sont naturellement oxydés à la fin de la purification, alors que les mutants W192A_{DsbA1} et F168A_{DsbA3} sont réduits et ne peuvent être oxydés totalement par un excès de GSSG (Figure 74-f et i) comme les enzymes sauvages. Par conséquent, la Thréonine de la boucle *cis*-Proline affecterait l'état redox du site actif.

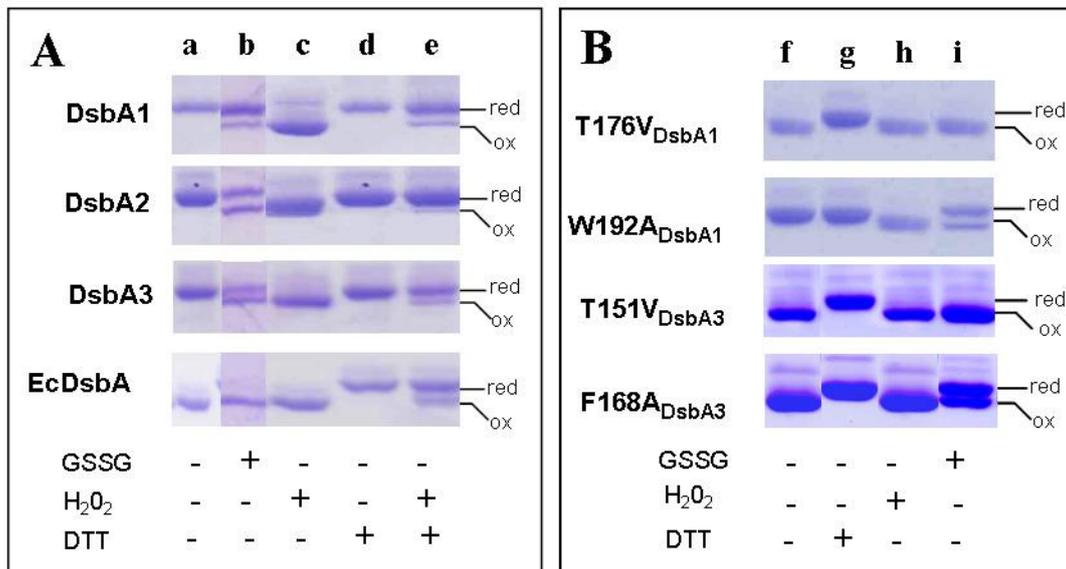


Figure 74 : Etat redox A) des NmDsbA sauvages et B) des mutants étudiés.

Les protéines réduites (red ; AMS- modifiée) et oxydées (ox ; non-modifiée) ont été séparées sur gel SDS-PAGE 15% en conditions non réductrices : bandes a,f : à la fin de la purification. Après incubation avec : bandes b,i : 100 mM de GSSG, bandes c, h : 40 mM de H₂O₂, bandes d, g : 10 mM de DTT. Bande e : les protéines oxydées par 40 mM de H₂O₂ sont incubées 1h avec 10 mM de DTT.

II.2. Activité insuline réductase

Les activités insuline réductase des mutants T176V_{DsbA1} et T151V_{DsbA3}, avec des « lag time » de 5 min pour les deux, sont augmentées par rapport aux enzymes sauvages de *Neisseria* (lag time de 18 min) mais aussi d'EcDsbA (lag time de 12 min) (Figure 75-A) suggérant que la Thréonine de la boucle *cis*-Proline stimule la réduction de l'insuline par les enzymes de *N. meningitidis*. Les résidus W192_{DsbA1} et F168_{DsbA3} par contre, ne modifient pas la réactivité des enzymes (Figure 75-A).

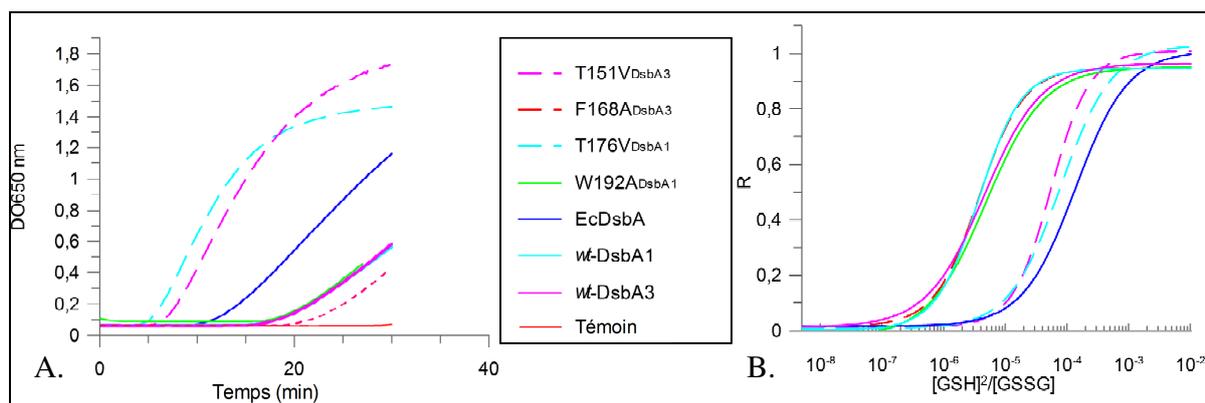


Figure 75 : Courbe de détermination A) de l'activité insuline réductase et B) du potentiel redox des mutants de DsbA1 et DsbA3.

Les courbes obtenues avec les enzymes sauvages (DsbA1 ; DsbA3 et EcDsbA) sont également représentées.

II.3. Potentiel redox

La Thréonine de la boucle *cis*-Proline joue un rôle dans le pouvoir oxydant des NmDsbA car les potentiels redox des deux mutants T176V_{DsbA1} et T151V_{DsbA3} sont augmentés de 36 et 31 mV respectivement, et deviennent comparables à celui de EcDsbA (Figure 75-B). Les potentiels redox des deux autres mutants W192A_{DsbA1} et F168A_{DsbA3} sont inchangés (Tableau 9).

	Activité insuline réductase ^a (lag time (min))	E°' (mV) ^b	Tm (°C) ^c		ΔTm(°C)
			réduite	oxydée	$\left \frac{Tm_{red}}{Tm_{ox}} \right $
<i>Enzymes sauvages</i>					
DsbA1	18	-79	75±2	60±2	15
DsbA2	18	-79	70±2	53±2	18
DsbA3	18	-81	62±2	47±2	15
EcDsbA	12	-120	58±2	48±2	6
<i>Enzymes mutantes</i>					
T176V _{DsbA1}	5	-115	73±2	73±2	0
W192A _{DsbA1}	18	-80	59	52	7
T151V _{DsbA3}	5	-112	65±2	62±2	3
F168A _{DsbA3}	18	-80	53	50	3

Tableau 9: Paramètres biochimiques des NmDsbA, de leurs mutants et de EcDsbA

^a Activité insuline réductase déterminée par le « lag time » à partir de la Figure 75

^b Les valeurs des potentiels redox ont été déterminées à partir de la Figure 75

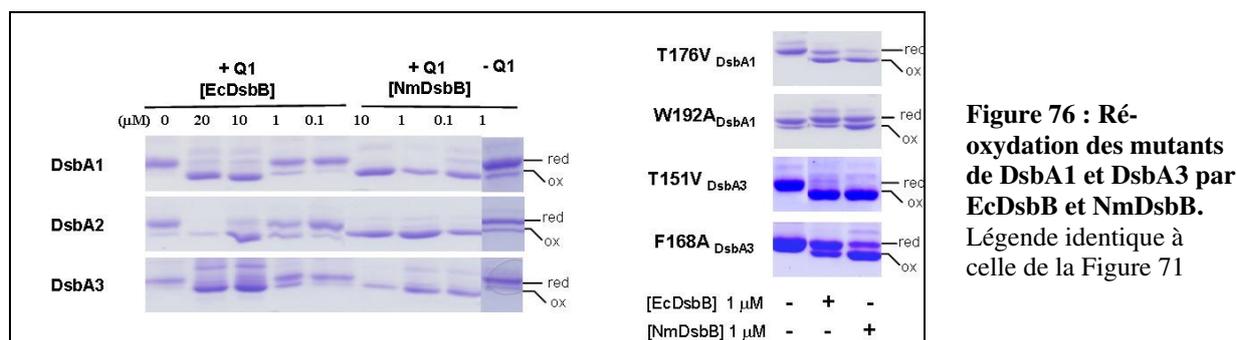
^c Stabilité thermique des enzymes oxydées et réduites par Thermal Shift Assay.

II.4. Stabilité thermique

Les études de Thermal-Shift-Assay montrent que les mutations T176V_{DsbA1} et T151V_{DsbA3} augmentent nettement les stabilités des formes oxydées qui deviennent aussi stables que les formes réduites observées chez les enzymes sauvages (Tableau 9). C'est donc bien la forme oxydée qui est affectée par la mutation de la Thréonine. Concernant les mutants W192A_{DsbA1} et F168A_{DsbA3}, leur forme réduite est déstabilisée en comparaison avec celles des NmDsbA sauvages alors que la stabilité de leur forme oxydée reste inchangée (Tableau 9).

II.5. Ré-oxydation des mutants NmDsbA par NmDsbB ou EcDsbB

La mutation T/V favorise la ré-oxydation des enzymes de *Neisseria* par EcDsbB mais n'affecte pas la ré-oxydation par NmDsbB (Figure 76). Les mutations W192A_{DsbA1} et F168A_{DsbA3} diminuent l'efficacité de la ré-oxydation de DsbA et DsbA3 par NmDsbB (Figure 76). Ce résultat confirme l'implication de la boucle située entre l'hélice $\alpha 7$ et le brin $\beta 5$ dans la réoxydation des NmDsbA par NmDsbB comme cela a déjà été montré entre EcDsbA et EcDsbB (Regeimbal et al. 2002).



Ces études biochimiques de nos mutants nous apportent des informations importantes sur les résidus qui déterminent les propriétés des NmDsbA.

La Thréonine présente dans la boucle *TcisP* n'est pas retrouvée chez EcDsbA. Elle pourrait expliquer en partie les différences observées entre l'enzyme d'*E. coli* et les trois NmDsbA. Ce résidu déstabiliserait la forme oxydée des NmDsbA et, par voie de conséquence, serait également à l'origine de leur extraordinaire pouvoir oxydant.

Les mutations W192A_{DsbA1} ou F168A_{DsbA3} localisées dans la boucle d'interaction avec NmDsbB montrent que cette région de DsbA1 et DsbA3 serait impliquée dans l'interaction spécifique entre NmDsbB et les NmDsbA, car la réoxydation de ces mutants par NmDsbB est diminuée. Ces résidus ne semblent pas être impliqués dans la fonction d'oxydase des NmDsbA.

III. Structure du mutant T176V_{DsbA1}

Afin de comprendre le rôle structural de la Thréonine de la boucle *cis*-Proline, nous avons entrepris l'étude de cristallographie du mutant T176V_{DsbA1}.

Le mutant T176V_{DsbA1} cristallise dans les mêmes conditions que l'enzyme sauvage. Les cristaux sont de très bonne qualité et diffractent les rayons X à une résolution de 1.4 Å. Les paramètres de la maille cristalline sont cependant légèrement différents. La structure cristallographique a été résolue par remplacement moléculaire à partir de la structure de DsbA1 sauvage. Les statistiques complètes de traitement des données et d'affinement sont résumées dans le Tableau 10.

T176V_{DsbA1}	
Enregistrement des données sur BM30	
Longueur d'onde (Å)	0.979
Résolution (Å)	44.2-1.45 (1.52-1.45)
<i>a, b, c</i> (Å, Å, Å)	44.29, 47.64, 79.7
Groupe d'espace	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Nombre de monomères par unité asymétrique	1
Coefficient de Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	1.96
Solvant (%)	37.3
Réflexions observées	194796
Réflexions uniques	30676
<i>R</i> _{sym}	0.061 (0.233)
Complétude (%)	99.4
< <i>I</i> >/<σ(<i>I</i>)>	6.2 (3.0)
Redondance	6.4

Modèle final	
Code	3HZ8
<i>R</i> _{factor}	0.191 (0.24)
<i>R</i> _{free}	0.226 (0.32)
Facteur B moyen (Å ²)	16.2
Nombre de résidues	191
Nombre de molécules d'eau	246
Nombre d'atomes	
-Protéine	1541
-Solvant	246
R.m.s.d. :	
-Liaisons (Å)	0.009
-Angles (°)	1.17
Diagramme de Ramachandran:	
- régions de préférences	94.8
- régions autorisées	5.2
- régions non autorisées	

Tableau 10: Statistiques des données de diffraction des cristaux du mutant T176V_{DsbA1} et du modèle atomique final correspondant.

Les valeurs entre parenthèses correspondent à la coquille de plus haute résolution. Le *R*_{free} est calculé avec 10% des données de diffraction sélectionnées au hasard et exclues de l'affinement.

Le mutant T176V_{DsbA1} est totalement oxydé après la purification et cristallise naturellement sous cet état sans additifs oxydants.

La superposition des structures du mutant oxydé avec celle de DsbA1 réduite (r.m.s.d. 0.33 Å sur la base de 178 atomes de C^α) montre que la formation du pont disulfure n'est pas accompagnée de changements structuraux majeurs (Figure 77-A). Les sites actifs du mutant et de l'enzyme sauvage se superposent parfaitement (Figure 77-B). En effet, la distance entre le groupement méthyle de la Valine mutée et l'atome de soufre de la cystéine nucléophile est identique à celle qui sépare le groupement hydroxyle de T176 et le même atome de soufre chez DsbA1 sauvage. Les seules différences observables sont la présence de deux molécules d'eau additionnelles qui interagissent avec la cystéine nucléophile chez l'enzyme oxydée et un léger réarrangement de la chaîne latérale de H59 du site actif.

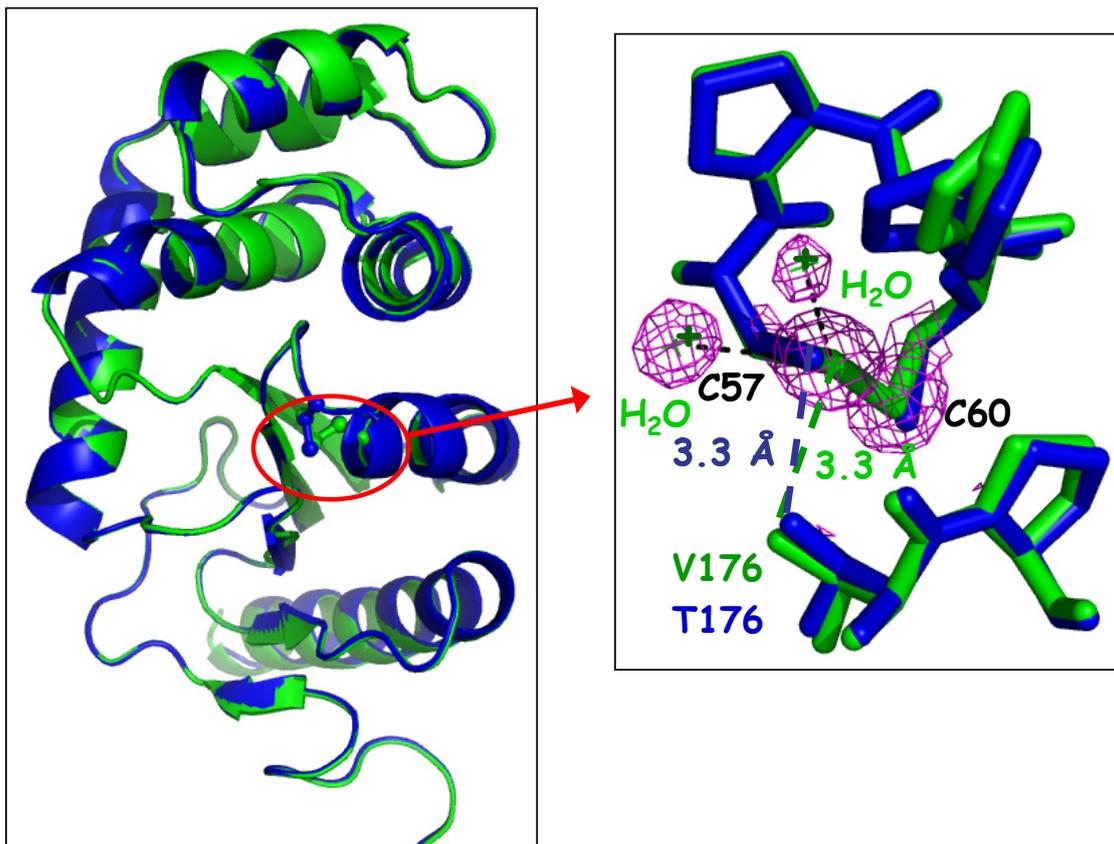


Figure 77 : Comparaison des modèles du mutant T176V_{DsbA1} et de l'enzyme sauvage DsbA1.
 A) Superposition des deux modèles T176V_{DsbA1} (vert) et *wt*-DsbA1 (bleu). B) Zoom de la région du site actif. Seuls les résidus du motif CXXC et de la boucle *cis*-Proline sont représentés. La carte de densité électronique ($2mF_o - DF_c$) calculée autour du pont disulfure est représentée en violet (la carte est contourée à 1.2 σ).

IV. Spectrométrie Raman

Afin d'étudier les changements structuraux occasionnés par la formation du pont disulfure, nous avons voulu cristalliser DsbA1 et DsbA3 sous leur forme oxydée.

Pour cela, nous avons incubé les enzymes avec de fortes concentrations de GSSG (100 mM de GSSG pour 50 μ M de DsbA1 ou DsbA3). Dans ces conditions, nous avons obtenu uniquement des cristaux de DsbA1 (DsbA3 oxydée ne cristallise pas dans ces conditions).

La structure obtenue ne contient cependant pas de ponts disulfures. Les cystéines du site actif adoptent deux conformations (Figure 78). Pour l'une, la distance entre les deux atomes de soufre des cystéines est de 3.5 Å, montrant clairement que le pont est réduit, et dans l'autre, la distance est de 2.4 Å ce qui est encore trop long pour un pont disulfure classique.

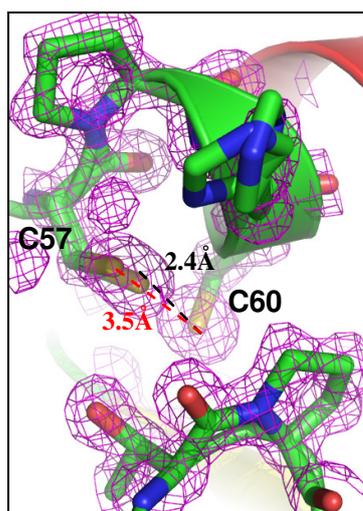


Figure 78: Zoom de la région du site actif de DsbA1 incubée avec du GSSG.

Seuls les résidus du motif CXXC et de la boucle *cis*-Proline sont représentés. La carte de densité électronique ($2mF_o - DF_c$) calculée autour du site actif est représentée en violet (la carte est contourée à 1.2σ).

Le pont disulfure est-il cassé pendant l'enregistrement des données de diffraction ? Cela a déjà été observé pour d'autres membres de la famille des TRX (Roberts et al. 2005). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris deux types d'expériences.

Tout d'abord, nous avons enregistré des données de diffraction sur une anode tournante à partir de cristaux incubés au préalable avec du GSSG ou du H_2O_2 . Dans ce cas, également, le site actif était sous forme réduite.

Ceci suggérait soit que le pont disulfure de DsbA1 était particulièrement sensible aux rayons X, soit que DsbA1 cristallisait seulement sous sa forme réduite.

Pour différencier ces deux hypothèses, nous avons utilisé la spectroscopie Raman en collaboration avec Philippe Carpentier (IBS) au « Cryobench » de l'ESRF. Cette technique permet d'identifier la signature spectrale d'un pont disulfure qui se situe dans la région 490-530 cm^{-1} du spectre Raman (Sugeta 1975).

Les spectres Raman obtenus à partir des cristaux incubés avec un oxydant (GSSG ou H_2O_2) ne possèdent pas cette bande caractéristique de la liaison S-S (Figure 79-courbe noire). Par opposition, cette bande a pu être visualisée à 496 cm^{-1} sur le spectre enregistré avec un cristal du mutant T176V_{DsbA1} (Figure 79-courbe rouge), dont la structure cristallographique montre clairement la présence du pont disulfure. De plus, lorsque ce cristal est incubé avec du DTT avant l'expérience de spectroscopie, cette bande à 496 cm^{-1} disparaît (Figure 79-courbe bleue).

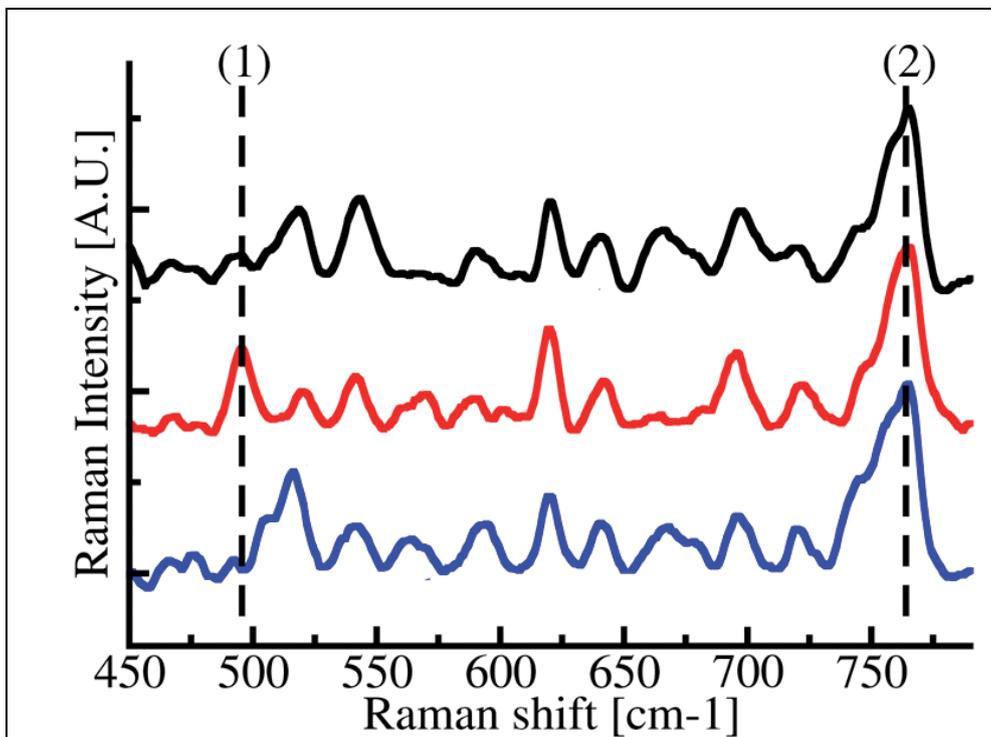


Figure 79: Spectre Raman des cristaux de DsbA1

Le mutant T176V présente une bande caractéristique de la vibration de la liaison S-S à 496 cm^{-1} (pic (1), rouge) qui disparaît après addition de DTT (bleu). Cette bande est systématiquement absente sur le spectre enregistré sur un cristal de DsbA1 sauvage préalablement incubé avec un agent oxydant (noir). Les trois spectres sont mis à l'échelle sur la base de la bande correspondante à la vibration du tryptophane à 765 cm^{-1} (pic (2)).

La combinaison de ces deux techniques confirme que DsbA1 ne cristallise que sous sa forme réduite même après incubation avec un oxydant et que ce ne sont pas les rayons X qui détruisent la liaison disulfure.

V. Etudes *in vivo* des mutants NmDsbA

La mutation de la Thréonine de la boucle *cis*-Proline a un impact important sur les propriétés redox *in vitro* des NmDsbA. Nous avons voulu étudier quel pouvait être cet effet *in vivo*. Nous nous sommes concentrés sur les études des mutants T176V_{DsbA1} et T151V_{DsbA3}.

Dans ce paragraphe, je décrirai les premiers résultats obtenus. Comme nous ne disposons pas de l'outil *Neisseria*, nous avons utilisé *E. coli* pour notre étude *in vivo*.

Les activités enzymatiques *in vivo* des enzymes homologues à DsbA peuvent être évaluées en étudiant leur capacité à rétablir le phénotype *dsbA*⁺ d'une souche d'*E. coli* déficiente en DsbA.

V.1. Construction de différentes souches d'*E. coli*

Cette étude a nécessité une nouvelle série de clonage car l'expression des protéines devait être périplasmique. Il a donc fallu réintroduire les bonnes séquences signal en amont des séquences codantes et nous avons également voulu suivre l'influence de la force des promoteurs sur le phénotype. Deux types de plasmide ont donc été utilisés :

- pTrc99A qui a un promoteur fort inductible à l'IPTG;
- pBadHisB qui a un promoteur faible inductible à l'arabinose.

Afin de suivre l'expression de chaque protéine par immunoblot, une séquence polyhistidine a été rajoutée du côté C-terminal de chaque construction.

Des études récentes de complémentation avec le gène *dsbA3* ont montré que le taux d'expression est un paramètre important (Vivian et al. 2008).

La souche d'*E. coli* déficiente en DsbA a été transformée avec ces plasmides et l'expression des enzymes a été vérifiée par immuno-blot avec un anticorps anti-polyhistidine commercial. Ces analyses montrent que toutes les enzymes (DsbA1, DsbA3 et leurs mutants respectifs) sont produites dans la bactérie, fortement pour les constructions avec pTrc99A et plus faiblement avec les constructions avec pBadHisB.

Toutes ces souches peuvent donc être utilisées pour évaluer les capacités de nos enzymes à restaurer le phénotype sauvage.

V.2. Suivi de la motilité

L'un des phénotypes associés à l'absence de l'enzyme DsbA chez *E. coli* est la perte de motilité de la bactérie sur de l'agar mou en raison de l'altération de son flagelle. Pour évaluer les capacités de nage des différentes souches d'*E. coli*, nous ensemençons par piqûre une boîte de culture contenant 0.3 % d'agar. Ce milieu de croissance est assez mou pour permettre aux bactéries de nager de façon ordonnée en formant un cercle régulier autour du point d'ensemencement. L'efficacité de la nage est alors suivie par la mesure du diamètre de ce cercle qui est le cercle de nage.

La composition du milieu de croissance (source de carbone, présence ou absence d'inducteur) qui permet à une bactérie de nager de façon optimale varie d'une souche à une autre. La détermination de la composition de ce milieu est nécessaire avant toute expérience et se fera avec les souches *E. coli dsbA*⁻ transformées avec les plasmides pTrc99A-dsbA1, pTrc99A-dsbA3 ou pBadHiB-dsbA1, qui selon la littérature devraient restaurer la motilité. Par contre, la souche transformée avec le plasmide pBadHisB-dsbA3 ne devrait pas être capable de nager car l'expression de DsbA3 est trop faible (Sinha et al. 2004; Vivian et al. 2008).

Pour la mise au point du milieu de croissance, nous avons fait varier deux paramètres:

- la source de carbone (milieu riche LB, ou milieu minimum M63), qui influence la croissance de la bactérie et affecte la vitesse de formation et la qualité du cercle de nage.
- la concentration en inducteur, qui permet de contrôler le niveau de surexpression de la DsbA. Pour obtenir une activité enzymatique optimale de la protéine surexprimée, son taux d'expression doit être ajusté. En effet, un excès de protéine dans le périplasme peut avoir un effet négatif sur l'activité enzymatique car le système chaperon de la bactérie sera saturé et les protéines produites seront mal repliées. A l'inverse, s'il y a trop peu d'enzyme dans le périplasme, l'activité enzymatique résultante ne sera pas suffisante pour compenser la déficience en DsbA.

Le milieu de culture permettant d'observer la nage des souches d'*E. coli* transformées avec les plasmides pTrc99A-dsbA1 et pTrc99A-dsbA3 a été défini. Il est composé de LB et contient l'inducteur IPTG à la concentration de 1 mM.

Dans ce milieu, la souche avec le plasmide pTrc99A-dsbA3 nage plus lentement (Figure 80-3) que la souche transformée par le plasmide pTrc99A-dsbA1 (Figure 80-2), ce qui est en accord avec l'activité oxydoréductase *in vivo* plus faible de DsbA3 déjà observée par d'autres équipes (Sinha et al. 2004; Vivian et al. 2008).

Les témoins négatifs, c'est-à-dire les souches mutantes non transformées (Figure 77-4) ou transformées avec le plasmide pTrc99A vide (Figure 80-5), ne nagent pas et la bactérie sauvage nage normalement (Figure 80-1), ce qui valide notre protocole par rapport à la littérature.

Par contre, dans le milieu minimum M63, la croissance de ces différentes souches n'est pas assez rapide pour observer la formation d'un cercle de nage.

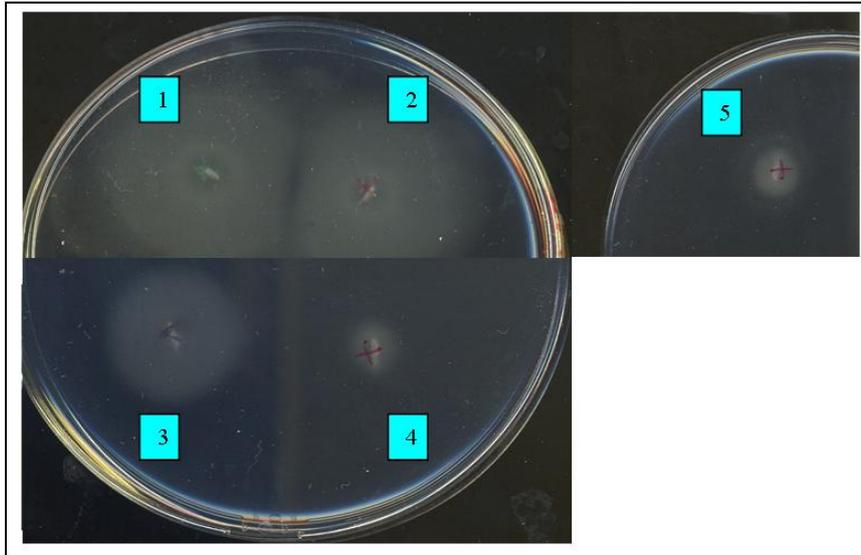


Figure 80 : Test de complémentation: suivi de la motilité.

La motilité de la souche mutante *dsbA*⁻ est rétablie complètement par pTrc99A- *dsbA1* (2) et partiellement par pTrc99A- *dsbA3* (3). La souche *E. coli* sauvage (1) est motile alors que les souches mutantes sans (4) et avec le plasmide pTrc99A vide (5) ne le sont pas.

Les expériences de suivi de motilité n'ont pas été poursuivies faute de temps. Ainsi il n'a pas été possible d'effectuer :

- La mise au point du milieu de culture pour les souches mutantes transformées avec les plasmides dérivés du vecteur pBadHisB.
- l'étude des effets des mutations de la Thréonine de la boucle *cis*-Proline de DsbA1 et DsbA3 sur la nage de la bactérie.

V.3. Activité phosphatase alcaline

Un autre phénotype *dsbA*⁻ est la perte d'activité phosphatase alcaline. Ceci constitue un autre moyen pour évaluer l'activité enzymatique de nos enzymes *in vivo*. Nous envisagions donc de l'appliquer à nos différentes constructions mais, faute de temps, ce travail n'a pas pu être réalisé : j'ai cependant pu me familiariser avec le protocole en mesurant l'activité phosphatase alcaline de la souche sauvage et de la souche déficiente en *dsbA*.

Discussions

L'analyse du génome de *N. meningitidis* a mis en évidence la présence de trois gènes codant pour des homologues à l'enzyme très bien caractérisée EcDsbA, à savoir DsbA1, DsbA2 et DsbA3 (Tinsley et al. 2004). Des études effectuées *in vivo* chez *E. coli* et *N. meningitidis* indiquent que chacune de ces enzymes auraient des rôles distincts (Sinha et al. 2004; Tinsley et al. 2004). Ainsi, DsbA1 et DsbA2 seraient clairement impliquées dans la virulence de la bactérie et sa compétence naturelle. Elles sont également capables de rétablir la croissance bactérienne en présence d'agents réducteurs, contrairement à DsbA3 pour laquelle ces phénotypes ne sont pas observés. Les auteurs de ces études avaient donc émis l'hypothèse que cette troisième enzyme serait plutôt un homologue à l'enzyme EcDsbE, qui est un oxydant assez faible en comparaison à EcDsbA. Le rôle biologique de ce troisième gène fait toujours l'objet de controverses, car aucun phénotype précis n'a pu être identifié chez *Neisseria*. Cependant des tests de complémentation fonctionnelle d'une souche d'*E. coli* déficiente en DsbA suggèrent que les trois NmDsbA ont bien une activité d'oxydoréductase mais avec des substrats différents (Tinsley et al. 2004). Ces expériences de complémentation ont également montré que le phénotype observé dépendrait du nombre de copies de chaque enzyme présente dans la cellule (Sinha et al. 2004; Vivian et al. 2008).

Afin de compléter nos connaissances sur ces trois enzymes, nous les avons caractérisées d'un point de vue biochimique et nous avons résolu les structures cristallographiques de DsbA1 et DsbA3.

In vitro, ces enzymes présentent les mêmes propriétés. La caractéristique principale qu'elles partagent est un exceptionnel pouvoir oxydant. Avec un potentiel redox de -80 mV, elles sont toutes les trois plus oxydantes qu'EcDsbA et *E. coli* DsbL, les oxydoréductases de thiol-disulfure les plus oxydantes connues à ce jour (Wunderlich et al. 1993a; Grimshaw et al. 2008). Cette valeur de potentiel redox est également en accord avec leur capacité à réduire les ponts disulfures de l'insuline. Cette activité est comparable chez les trois NmDsbA et légèrement inférieure à celle mesurée chez EcDsbA (Lafaye et al. 2008).

La réactivité de leur résidu nucléophile du site actif est cependant proche de celui d'EcDsbA car la valeur du pKa est faible pour les trois NmDsbA (environ 3.0 pour DsbA1 et DsbA2 ; 3.2 pour DsbA3 et 3.7 pour EcDsbA). Le pKa est un paramètre important pour la réactivité de la cystéine nucléophile et il a été montré qu'une diminution du pKa était

généralement corrélée avec une augmentation du potentiel redox (Nelson et al. 1994; Grauschopf et al. 1995). Les résultats décrits ici pour les enzymes de *Neisseria* sont donc en accord avec ces observations.

Les trois NmDsbA sont plus stables sous leur forme réduite et leur oxydation totale *in vitro* par un processus non-enzymatique est difficile à atteindre. Seule l'utilisation d'un oxydant fort comme le H_2O_2 ou un large excès de GSSG permet d'obtenir une oxydation totale des NmDsbA en solution, ce qui n'a pas été décrit pour EcDsbA. Cette propriété n'est pas due à un problème de repliement des enzymes sur-exprimées chez *E. coli* car chacune d'entre elles est efficacement réoxydée par DsbB de *Neisseria* (Figure 71). La difficulté à cristalliser les enzymes sauvages sous leur forme oxydée suggère que les enzymes oxydées seraient moins stables en solution, ce qui est confirmé par les expériences de « Thermal Shift Assay » (Tableau 10). Nous supposons que cette propriété est liée aux extraordinaires propriétés redox des enzymes de *Neisseria*.

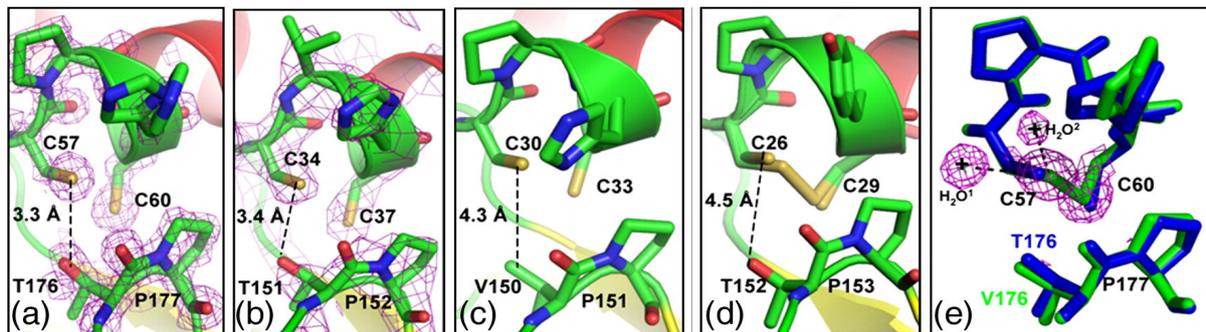


Figure 81 : Zoom de la région du site actif des DsbA de *N. meningitidis*, d'*E. coli* et de *V. cholerae*
 Forme réduite de (a) DsbA1. (b) DsbA3. (c) EcDsbA. (Guddat et al. 1998) et (d) mélange des deux états redox de SaDsbA (Heras et al. 2008). Seuls les résidus du motif CXXC et de la boucle *cis*-Proline sont représentés. La carte de densité électronique ($2mF_{obs}-DF_{calc}$) calculée autour du site actif sur les figures (a, b) est superposée aux modèles et contourée à 1.2σ . (e) Superposition des structures de DsbA1 sauvage (bleu) et du mutant T176V_{DsbA1} (vert). La carte de densité électronique ($2mF_{obs}-DF_{calc}$) calculée autour du site actif de T176V_{DsbA1} est contourée à 1.5σ (violet). Dans la structure de l'enzyme mutante, les deux atomes de soufre sont distants de 2.1 Å. Les molécules d'eau interagissant avec l'atome de soufre de la C57 sont représentées, ainsi que leur distance avec le soufre de C57 (distances: $H_2O^1-S_{C57} = 3.6 \text{ \AA}$ and $H_2O^2-S_{C57} = 3.5 \text{ \AA}$).

Les analyses des structures cristallographiques des NmDsbA donnent des informations sur leur extraordinaire pouvoir oxydant.

Une des différences majeures entre EcDsbA et les NmDsbA concerne la boucle contenant la *cis*-Proline. Dans les modèles des formes réduites de DsbA1 et DsbA3, le

groupement hydroxyle de T176_{DsbA1} (ou T151_{DsbA3}) est situé à 3.4 Å de l'atome de soufre de la cystéine nucléophile, ce qui autorise la formation d'une liaison hydrogène qui pourrait stabiliser la forme thiolate (Figure 81a et b). Chez EcDsbA, la Valine qui remplace cette Thréonine est située à distance de van-der-Waals du résidu nucléophile (4.3 Å dans la forme réduite; (Figure 81c)). Curieusement, chez les NmDsbA, la mutation T176V_{DsbA1} (ou T151V_{DsbA3}) change les propriétés redox des enzymes de *Neisseria*. Le potentiel redox de chacun des mutants T/V est diminué d'au moins 35 mV et la valeur obtenue est proche du potentiel redox mesuré chez EcDsbA. Cette mutation ponctuelle favorise la formation du pont disulfure chez les NmDsbA *in vitro*.

Les mesures des températures de fusion (T_m) indiquent clairement que la stabilité thermique de la forme réduite n'est pas modifiée par la mutation mais que le pont disulfure est plus stable quand la Thréonine est remplacée par une Valine. Cet effet est observé pour DsbA1 et DsbA3. Cette mutation a permis de cristalliser et de résoudre la structure de la forme oxydée de DsbA1. Etant donné que DsbA1 sauvage ne cristallise que sous sa forme réduite, nous n'avons pas de données structurales pour comprendre comment la mutation T/V augmente la stabilité du pont disulfure.

Chez le mutant oxydé de DsbA1, le groupement méthyle de la valine est aussi loin de l'atome de soufre que ne l'est le groupement hydroxyle chez T176V_{DsbA1} et l'insertion d'une valine ne bouleverse pas la structure du site actif (Figure 81e). Nous supposons que l'effet est probablement dû à une augmentation de l'hydrophobicité autour du résidu catalytique. Curieusement, une Thréonine est également trouvée à cette position chez l'homologue à la DsbA de *Staphylococcus aureus* (SaDsbA) (Figure 81d). La mutation équivalente de ce résidu chez SaDsbA n'a pas d'effet sur son potentiel redox, contrairement à ce que nous observons chez les enzymes de *Neisseria* (Heras et al. 2008). Dans la structure réduite de SaDsbA sauvage, la Thréonine équivalente présente dans la boucle de la *cis*-Proline est distante de plus de 4.5 Å du résidu nucléophile (Figure 81d). Ceci pourrait expliquer pourquoi cette mutation n'affecte pas son potentiel redox. Bien entendu, d'autres différences de séquence retrouvées dans la région du site actif peuvent également contribuer aux propriétés redox de SaDsbA. Des études effectuées sur SaDsbA et EcDsbA ont conduit à émettre l'hypothèse que cette Thréonine serait importante pour la reconnaissance du substrat (Wunderlich et al. 1993b). Ici, il est montré que le résidu T176_{DsbA1} (ou T151_{DsbA3}) de la boucle de la *cis*-Proline aurait un rôle important dans la détermination des propriétés redox des NmDsbA et par conséquent dans la catalyse.

Cette région de la boucle *cis*-Proline serait également impliquée dans l'interaction des NmDsbA avec EcDsbB. EcDsbB peut réoxyder le mutant T176V_{DsbA1} (ou T151V_{DsbA3}) plus facilement que les NmDsbA sauvages (Figure 76). Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons: soit cette mutation spécifique améliore l'interaction spécifique protéine-protéine entre les deux partenaires, soit la réaction d'oxydoréduction est facilitée car la différence de potentiel entre les mutants NmDsbA et EcDsbB est diminuée de 35 mV. Le potentiel redox d'une oxydoréductase est en effet un facteur qui influence ses fonctions *in vivo* et détermine son efficacité à modifier ses substrats. Ces résultats sont parfaitement en accord avec les études récentes du mutant V150T d'EcDsbA (Ren et al. 2009). Cette mutation produit un effet inverse, elle augmente le potentiel redox générant ainsi une enzyme plus oxydante, et affecte également négativement la réoxydation d'EcDsbA par EcDsbB (Ren et al. 2009).

Concernant DsbA3, notre étude montre que cette troisième enzyme n'est pas un homologue à DsbE et qu'elle possède des propriétés redox tout à fait similaires à celles de DsbA1 et DsbA2. Cela rend bien compte des études de complémentation effectuées chez *E. coli* par l'équipe de J.S. Kroll (Sinha et al. 2004). DsbA3 diffère des autres NmDsbA essentiellement par sa séquence primaire puisqu'elle ne partage que 50 % d'identité de séquence avec DsbA1 et DsbA2 et la séquence du dipeptide du motif CXXC diffère d'un résidu également.

La comparaison des structures de DsbA1 et DsbA3 montre que les deux protéines se superposent très bien (Figure 54-A). Les différences structurales principales concernent l'orientation du domaine hélical, ce qui a été décrit pour d'autres DsbA comme TcpG chez *Vibrio cholerae* par exemple (Hu et al. 1997). Cette différence est probablement liée à la spécificité de substrat de chacune de ces enzymes. Il a été décrit que la séquence du dipeptide situé entre les deux cystéines actives influençait les propriétés redox des oxydoréductases de thiol-disulfure (Chivers et al. 1997; Huber-Wunderlich et al. 1998; Mossner et al. 1998; Quan et al. 2007), cependant la présence d'une séquence CXXC moins canonique pour DsbA3 n'a d'effet ni sur la structure du site actif (Figure 54-A et Figure 81) ni sur les propriétés redox de l'enzyme (Tableau 10). La structure de la séquence CVHC de DsbA3 se superpose à celle du tétrapeptide CPHC de DsbA1 (surement de DsbA2) et de EcDsbA. Par conséquent, chez les DsbA de *Neisseria*, la composition du dipeptide n'est pas critique pour leur activité redox. Une autre différence structurale de DsbA3 concerne la distribution des charges à la surface de l'enzyme. La surface moléculaire de DsbA3 est plutôt basique mais la plupart des zones

basiques ne sont pas situées dans l'environnement proche de la région catalytique (Figure 56-c et d) et ne devraient pas affecter l'activité catalytique.

Le modèle tridimensionnel de DsbA3 résolu dans cette étude présente des changements conformationnels avec la structure de DsbA3 résolue dans un autre système cristallin (Vivian et al. 2008). Ces divergences concernent principalement la région du site actif (Figure 59b). Bien que cela renforcerait l'hypothèse d'une grande plasticité du site actif des DsbA (Ondo-Mbele et al. 2005), cette divergence structurale ne peut pas expliquer les propriétés redox singulières de DsbA3. La structure de DsbA3 résolue dans notre étude confirme en effet que, sous sa forme réduite, la structure de son site actif est semblable aux structures des sites actifs décrits chez les autres DsbA (Figure 81). Cette étude montre également que les phénotypes associés à DsbA3 chez *N. meningitidis* ne peuvent pas non plus être expliqués par une différence d'activité redox. DsbA3 est en effet un oxydant aussi puissant que DsbA1 et DsbA2 et les différences phénotypiques observées entre les trois NmDsbA sont probablement reliées à des différences de spécificité de substrat et de régulation de gène. *N. meningitidis* est une bactérie commensale de l'épithélium du nasopharynx de l'homme qui de temps en temps réussit à passer dans la circulation sanguine pour causer des infections mortelles. Une adaptation à autant d'environnements fait vraisemblablement appel à des mécanismes de régulation variés pour que ces enzymes puissent oxyder efficacement un large éventail de substrats.

Conclusions

et

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces trois années de recherche contribuent à une meilleure caractérisation du système enzymatique Dsb impliqué dans la formation des ponts disulfures chez *Neisseria meningitidis*. Ce système plus complexe que celui décrit chez *E.coli* serait composé de trois oxydases homologues à DsbA d'*E. coli* et d'une oxydase membranaire homologue à DsbB.

D'un point de vue structural, ces résultats confirment que DsbA1 et DsbA3 adoptent le repliement classique de DsbA d'*E. coli*. Les structures de DsbA1 et DsbA3, et probablement DsbA2, sont également très proches l'une de l'autre. Ces similarités se retrouvent également au niveau de leurs propriétés redox *in vitro*. La caractéristique la plus frappante partagée par les NmDsbA est leur extraordinaire pouvoir oxydant: avec un potentiel redox de -80 mV, ce sont les enzymes les plus oxydantes de la famille des thiorédoxines décrites à ce jour. *In vitro*, leur forme réduite est extrêmement stable, contrairement à leur forme oxydée beaucoup plus difficile à caractériser d'un point de vue structurale, ceci n'étant pas corrélé à un problème de repliement des protéines purifiées puisqu'elles peuvent être oxydées efficacement par leur partenaire membranaire NmDsbB.

Par mutagenèse dirigée, nous avons montré que cet extraordinaire pouvoir oxydant serait dépendant de la Thréonine présente dans la boucle dite « de la *cis*-Proline » qui se situe à proximité du site catalytique des enzymes (T176 pour DsbA1 et T151 pour DsbA3). Dans les structures cristallographiques de DsbA1 et DsbA3 réduites, le groupement hydroxyle de cette Thréonine forme une liaison hydrogène avec la cystéine nucléophile du site actif. Deux effets résulteraient de cette interaction: d'une part une meilleure stabilisation de la forme thiolate dans la forme réduite, et d'autre part une déstabilisation du pont disulfure dans la forme oxydée. La mutation de cette Thréonine chez DsbA1 et DsbA3 conduit également à une diminution de leur potentiel redox d'environ 30 mV. Ces mutants sont facilement oxydables *in vitro* par l'oxygène atmosphérique et par DsbB d'*E. coli*. La forme oxydée de ces mutants est aussi stable que la forme réduite.

La structure du mutant T176V_{DsbA1} a été résolue au cours de cette thèse et montre que le changement T/V n'altère pas la conformation du site actif de DsbA1. L'effet sur le potentiel redox et sur la stabilité de la forme oxydée est difficile à expliquer en l'absence de la structure de la forme sauvage oxydée. Nous supposons que cet effet serait dû à une

augmentation de l'hydrophobicité autour du site actif. Ce résultat montre qu'un résidu situé en dehors du motif actif CXXC peut influencer le potentiel redox d'enzymes de la famille des thiorédoxines.

Finalement, concernant l'activité de l'enzyme DsbA3 à laquelle aucun phénotype n'est associé chez *Neisseria*, nous avons montré qu'elle avait toutes les caractéristiques d'une oxydase aussi puissante que les lipoprotéines DsbA1 et DsbA2. Notre étude cristallographique infirme les résultats obtenus par l'équipe de M.J. Scanlon qui suggère que DsbA3 a un site actif non canonique expliquant ces propriétés originales *in vivo* (Vivian et al. 2008).

Pour compléter cette étude, nous aurions aimé utiliser l'approche *in vivo* d'une part pour caractériser l'effet du mutant T/V, et d'autre part pour accéder à la spécificité de chacune de ces enzymes chez *Neisseria*.

Ceci avait été envisagé au début de notre étude, en collaboration avec J.S. Kroll. Cependant, nous nous sommes heurtés à des problèmes expérimentaux qui nous ont empêchés d'avancer. Nous nous sommes alors tournés vers le système *E. coli* qui est plus simple à mettre en œuvre mais par manque de temps, l'étude des phénotypes de motilité n'a pu être achevée.

Pour compléter cette étude, il serait important de pouvoir résoudre la structure cristallographique de la forme sauvage oxydée de l'une de ces trois enzymes. Cela n'a pas été possible au cours de cette thèse et cette information fait défaut pour comprendre le rôle de la T176_{DsbA1} (ou T151_{DsbA3}) dans la déstabilisation du pont disulfure.

Finalement, comment expliquer les différences observées *in vivo* chez *Neisseria* entre DsbA3 et les deux lipoprotéines DsbA1 et DsbA2 ?

Nous supposons que cela serait relié à une différence d'expression dans la bactérie, mais ceci reste à vérifier chez *Neisseria*.

Finalement, caractériser les partenaires cellulaires de chaque enzyme est aussi une étape importante pour affiner nos connaissances sur le rôle de chaque NmDsbA au cours de l'infection.

Protocoles Expérimentaux

I. Biologie moléculaire

I.1. Souches bactériennes

Souche (<i>Escherichia coli</i>)	Génotype / Description	Utilisation	Source
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , <i>lon</i> , <i>ompT</i> , prophage λ DE3, contenant le gène de la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur <i>lacUV5</i> ; délétion des protéases Lon et OmpT	Surexpression de protéines	Stratagene
BL21(DE3) Codon Plus-RIL	F ⁻ , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , <i>lon</i> , <i>ompT</i> , prophage λ DE3, <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^r] dérivée de BL21(DE3), délétion de l'endonucléase I, possède le plasmide codant pour <i>argU</i> , <i>ileY</i> et <i>leuW</i>	Surexpression de protéines issues d'organisme avec un génome riche en bases A et T. Expression des gènes codant pour les ARNt rare reconnaissant les codons arginine AGA et AGG, isoleucine AUA et leucine CUA.	Stratagene
C41 et C42 (DE3)	Mutant dérivé de BL21(DE3), possède une mutation non identifiée empêchant la mort cellulaire associée à la production de protéines toxiques	Surexpression de la plupart des protéines toxiques, souvent utilisée pour la production de protéines membranaires.	(Miroux et al. 1996)
TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> Délétion de l'endonucléase I : amélioration de la préparation d'ADN. Absence du site de recombinaison (<i>recA</i>) pour une plus grande stabilité de l'insert. Mutation <i>hsdR</i> et <i>mcrA</i> : meilleure efficacité de la transformation d'ADN méthylé (<i>hsdR</i>) ou non (<i>mcrA</i>). Gène <i>lacZ</i> Δ M15 : sélection de bactéries par leur couleur blanche ou bleue.	Préparation d'ADN plasmidique de haute qualité ; Très fort taux de transformation permettant de l'utiliser pour les transformations ne nécessitant pas de souche particulière.	Invitrogen
JFC209	Souche sauvage. MC1000	Etude <i>in vivo</i> des mutants NmDsbA	J.F. Collet (Bruxelles, Belgique)
JFC207	Souche mutante <i>dsbA</i> ⁻ MC1000 <i>dsbA</i> ::kan1		

I.2. Conditions de culture

Milieu	Composition	Utilisation
Luria-Bertani (LB)	10 g/l bactotryptone (<i>Difco</i>), 5 g/l extrait de levure (<i>Difco</i>), 10 g/l NaCl, ou formulation mélangée achetée chez <i>Sigma</i>	Culture d' <i>E. coli</i> destinées à des fins de clonage ou mutagenèse. Production de toutes les protéines recombinantes étudiées à l'exception des protéines sélénées. Etudes <i>in vivo</i> des NmDsbA et ses mutants.
Luria-Bertani - agar	LB additionné de 15g/L d'agar (<i>Difco</i>)	Culture en milieu solide
Milieu minimum M9	sels (42mM Na ₂ HPO ₄ , 24mM KH ₂ PO ₄ , 9mM NaCl, 19mM NH ₄ Cl), 1mM MgSO ₄ , 0.1mM CaCl ₂ , 2.0% glucose, 0.5µg/ml thiamine.	Production des protéines sélénées
Milieu minimum M63	Pour 1L : 3g KH ₂ PO ₄ , 7g K ₂ HPO ₄ , 2g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.5 ml 1mg/ml FeSO ₄ , 2 ml 0.5M MgSO ₄ , 20 ml 1.5M Glycérol, 20 ml 5mg/ml thiamine, 100 mM Kpi à pH 7.0..	Etude <i>in vivo</i> des NmDsbA et ses mutants. Suivi de la motilité.
Milieu minimum MOPS	Milieu minimum préparé selon les indications du site internet: http://www.genome.wisc.edu/resources/protocols/mopsminimal.htm (Neidhardt et al. 1974)	Etude <i>in vivo</i> des NmDsbA et leurs mutants. Activité phosphatase alcaline

Les cultures d'*E. coli* destinées à des fins de clonage ou de mutagenèse ont été réalisées dans du milieu LB à 37°C. La surexpression de protéines, sauf précisé autrement, a été effectuée dans du milieu LB, en incubant la culture bactérienne à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0.6, puis à 37°C pendant 3 heures après ajout d'IPTG à 1 mM. En fonction des déterminants de résistance des plasmides ou souches (cf. « Constructions » et « Souches bactériennes »), des antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations suivantes : 100 µg/ml ampicilline, 50 µg/ml kanamycine.

I.3. Constructions

A) Oligonucléotides

1. Utilisés pour le clonage :

Amorces	Séquence (5'>3'), site de restriction en italique et gras
Clonage de dsbA3 dans pET20b(+) (sans sa séquence d'adressage au périplasma résidus 1 à 19)	
pdsba3-5'	<i>at gat atc</i> tat gcc ctg acg gaa ggg (<i>EcoRV</i>)
pdsba3-3'	<i>at gga tcc</i> cta ttt ctg tac agc agg (<i>BamHI</i>)
Modification de pL-EC-DSBBGFP	
Ecdsbbhis_5'	tc tac aaa aag ctt gtg ccg cgc ggc agc cac cac cat cat cat cac cac
Ecdsbbhis_3'	gtg gtg atg atg atg gtg gtg gct gcc gcg cgg cac aag ctt ttt gta ga
Clonage de nmdsbB	
Nmdsbb_5'	aa ctc gag atg acc ccg tta ttt aga aaa gcc
Nmdsbb_3'	tt gga tcc ttt agc cct tgc cca cgc cca cgc
Clonage des gènes entiers des nmdsbA (avec leurs séquences d'adressage au périplasma) pour les tests <i>in vivo</i> (séquence codante pour l' étiquette histidine en vert)	
dsba3all_5'	cc <i>tc</i> atg aag ctc aaa cat ctg ttg ccg ctg ctg ctg (<i>BspHI</i>)
dsba3all_3'	Cc <i>aag ctt</i> cta <i>atg gtg atg gtg atg gtg</i> ttt ctg tac agc agg (<i>HindIII</i>)
dsba2all_5'	Cc <i>tc</i> atg aaa tcc aga cac ctt gcc ctc ggc gtt (<i>BspHI</i>)
dsba2all_3'	Cc <i>aag ctt</i> cta <i>atg grg atg gtg atg gtg</i> ctg cgc ggc ttt ttg ttc (<i>HindIII</i>)

2. Utilisés pour la mutagenèse :

Amorces	Séquence (5'>3'), les bases correspondant à la mutation sont soulignées
dsba1T176V_5'	acc ttc caa atc gac ggt <u>gtt</u> ccc acg gtt atc gtc ggc
dsba1T176V_3'	gcc gac gat aac cgt ggg <u>aac</u> acc gtc gat ttg gaa ggt
dsba1W192A_5'	gtt gaa ttt gcc gac <u>gcg</u> gag tcc ggt atg aac
dsba1W192A_3'	gtt cat acc gga ctc <u>cgc</u> gtc ggc aaa ttc aac
dsba3T151V_5'	caa tac ggt att gac agc <u>gtt</u> ccg acc gtt att gtc
dsba3T151V_3'	gac aat aac ggt cgg <u>aac</u> gct gtc aat acc gta ttg
dsba3F168A_5'	gtt atc ttc aat aat ggc <u>gcg</u> gac ggc ggc gtt cat acg
dsba3F168A_3'	cgt atg aac gcc gcc gtc <u>cgc</u> gcc att att gaa gat aac

B) Clonage

Les clonages réalisés pendant ce travail sont résumés dans les tableaux ci-dessous. Les protocoles qui ont permis d'obtenir ces constructions sont détaillés en annexe A, ainsi que les techniques générales de biologie moléculaire utilisées en annexe B.

1. Clonage pour l'expression et la purification des trois NmDsbA et de NmDsbB :

Tableau 11: Constructions réalisées pour les études biochimiques et cristallographiques des NmDsbA.

Construction	Récupération du gène d'intérêt par PCR (gène, matrice d'ADN, oligonucléotides)	plasmide :	Digestion	Bactérie d'expression Etude
<p>pET20b(+)-dsbA3</p>	<p>Gène : <i>dsbA3</i> : la séquence signal d'adressage au périplasma est exclue du clonage (Figure 82). ADN matrice : plasmide contenant le gène complet <i>dsbA3</i> de la souche MC58 de <i>N. meningitidis</i>. Oligonucléotides : pdsba3-3' et pdsba3-5'</p>	<p>pET20b(+) Novagen Inducteur : IPTG Surexpression périplasmique de protéines dans le périplasma</p>	<p>EcorV BamHI</p>	<p>BL21(DE3) C41 (DE3) C42 (DE3) Expression périplasmique de DsbA3.</p>
<p>pdsbA1, pdsbA2, pdsbA3</p>	<p>Clonage effectué par la plateforme RoBioMol (IBS)⁴ Gènes : <i>dsbA1</i>, <i>dsbA2</i>, <i>dsbA3</i>. Les séquences signal d'adressage au périplasma des trois gènes ainsi que les ancrages membranaires de <i>dsbA1</i> et <i>dsbA2</i> ont été exclues du clonage (Figure 82).. ADN Matrice : génome de la souche MC58 de <i>N. meningitidis</i> Oligonucléotides : NC (Non Communiqué)</p>	<p>pLIM01 Inducteur : IPTG</p>	<p>NC</p>	<p>BL21(DE3) codon plus RIL Expression cytoplasmique des NmDsbA en fusion avec une étiquette hexahistidine en N-terminal</p>
<p>pL-NmDsbBGFP</p>	<p>Gènes : <i>nmdsbB</i>. ADN Matrice : génome de la souche MC58 de <i>N. meningitidis</i> Oligonucléotides : Nmdsbb-5' et Nmdsbb-3'</p>	<p>pL-EcDsbBGFP⁵ préalablement ouvert avec BamHI et XhoI Inducteur : IPTG</p>	<p>BamHI XhoI</p>	<p>C41(DE3) Expression de la protéine membranaire NmDsbB en fusion avec la GFP.</p>

¹ : pelB : séquence signal d'adressage au périplasma du vecteur pET20b(+), ² : TEV : site de coupure pour la protéase Tabacco Etch Virus, ³ : GFP : Green Fluorescente Protein, ⁴ : Clonage effectué sur la plate-forme de biologie moléculaire et de purification des protéines RoBioMol au LIM (Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules) par Benoit Gallet et Marjolaine Noirclerc-Savoie, ⁵ : Le plasmide pL-EC-DSBBGFP a été modifié par C. Juillan-Binard (LPM-IBS Grenoble) et a été utilisé pour l'expression de la protéine membranaire DsbB d'*E. coli* en fusion avec la GFP et une étiquette polyhistidine. Il dérive de la construction initiale EcDsbD-GFP (Drew et al. 2001) (vecteur pL-GFP), à laquelle un site de coupure à la thrombine a été inséré entre l'étiquette polyhistidine et la GFP et deux Histidines ont également été ajoutées à l'étiquette 8xHis initiale afin d'améliorer les étapes de purifications

2. Clonage pour les études *in vivo* des NmDsbA :

Tableau 12: Constructions réalisées pour les études *in vivo* des NmDsbA et leurs mutants

Construction	Récupération du gène d'intérêt par PCR (gène, matrice d'ADN, oligonucléotides)	plasmide :	Digestion	Bactérie d'expression Etude
<p>pBadHisB-all-dsbA1(ou dsbA3)</p>	<p>Gènes : <i>all-dsbA(ou dsbA3)</i> : gènes complets des deux enzymes avec leurs séquences signal d'adressage au périplasma et pour <i>all-dsbA1</i> sa séquence d'ancrage membranaire (Figure 82)..</p> <p>ADN matrice : génome de la souche MC58 de <i>N. meningitidis</i>.</p> <p>Oligonucléotides :</p> <ul style="list-style-type: none"> - dsba3all-3' et dsba3all-5' - dsba1all-3' et dsba1all-5' 	<p>pTrc99A (vecteur d'expression avec un promoteur fort) Amersham Pharmacia Inducteur : IPTG</p>	<p>Les gènes <i>all-dsbA1(ou dsbA3)</i> amplifiés par PCR sont digérés par BspHI et HindIII</p> <p>Les plasmides pTRC99A et pBadHisB sont digérés par NcoI et HindIII.</p>	<p>JFC207</p> <p>Expression périplasmique des NmDsbA en fusion avec une étiquette polyhistidine en C-ter pour des études <i>in vivo</i>..</p>
<p>pTrc99A-all-dsbA1(ou dsbA3)</p>		<p>pBadHisB (vecteur d'expression avec un promoteur faible) Invitrogen Inducteur arabinose</p>	<p>(*)Les sites de restriction de NcoI et BspHI sont compatibles entre eux pour la ligation de l'insert avec le plasmide. Après ligation les plasmides obtenus n'ont plus de site de restriction en N-ter.</p>	



Figure 82 : Alignement des séquences nucléotidiques des résidus N-ter des NmDsbA avec EcDsbA

C) Mutagenèse dirigée

Les mutations ponctuelles des gènes des enzymes DsbA1 et DsbA3 ont été réalisées grâce au kit de mutagenèse dirigée « Quick Change mutagenesis kit » (Stratagene) à partir des plasmides pdsbA1, pdsbA3, pTrc99A-all-dsbA1/A3 et pBadHisB-all-dsbA1/A3. Les séquences des amorces portant les mutations désirées sont fournies p.157.

II. Expression et purification des protéines d'intérêt chez *E. coli*

La purification de DsbA d'*E. coli* a été réalisée selon le protocole décrit dans la littérature (Ondo-Mbele et al. 2005).

II.1. Croissance cellulaire et surexpression protéique

Protocole 1: Une souche d'expression d'*E. coli* est transformée avec le plasmide d'intérêt. Une colonie isolée sur boîte de pétri est mise en culture dans 20 ml de milieu LB additionné de l'antibiotique correspondant à la résistance du plasmide. La préculture laissée à 37°C pendant une nuit sert d'inoculum à une culture (volume, milieu de culture). La croissance se fait sous agitation à 37°C, elle est suivie par la mesure de la turbidité à l'aide d'un spectrophotomètre (absorbance à 600 nm) et la production de la protéine est induite à une Densité Optique à 600 nm (DO_{600nm}) de B avec C mM d'IPTG pendant D heures sous agitation à E°C.

Etude	Plasmide	Souche d'expression	Milieu de culture -volume -type de milieu	Phase d'induction : B DO _{600nm} d'induction ; C Inducteur ; D durée ; E Température
Expression de DsbA3 périplasmique	pET20b(+)-dsbA3	BL21(DE3)	1 L de LB	DO _{600nm} de 0.6, IPTG 1 mM ; 3 heures ; 37°C
Test d'expression de DsbA3 périplasmique		BL21(DE3), C41(DE3) C42(DE3)	200 ml LB	DO _{600nm} de 0.6, IPTG 1 ou 0.5 mM ; 3 heures ; 20, 30 ou 37°C / Ajout dans le LB de sucrose à différentes concentrations : 0, 0.1 ou 0.3 M
Production des NmDsbA et de leurs mutants	pdsbA1, pdsbA2, pdsbA3	BL21(DE3) codon plus RIL	1L LB	DO _{600nm} de 0.6, IPTG 1 mM ; 3 heures ; 37°C
	Plasmides mutés	BL21(DE3) ^o		
Production de NmDsbB et EcDsbB	pL-EcDsbBGFP pL-NmDsbBGFP	C41(DE3)	1L LB	DO _{600nm} de 0.6, IPTG 1 mM ; 12 heures ; 16°C

Protocole 2 : Croissance cellulaire et surexpression de protéines sélénées :

La production de protéines sélénées s'effectue à partir des mêmes souches bactériennes d'*E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL (RoBioMol) que celles utilisées pour la production des protéines native.

Les bactéries d'une préculture sont tout d'abord centrifugées pendant 15 minutes à 3500 rpm, lavées dans du milieu minimum M9 puis sont utilisées pour inoculer 600 ml de milieu minimum M9 au 1/6^{ème}. La culture est ensuite laissée sous agitation à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} maximum de 0.7, à partir de laquelle les cellules commencent à lyser. Cette culture est ensuite utilisée pour inoculer 2 L de milieu minimum M9 au 1/16^{ème} jusqu'à une DO_{600nm}=0.6. A ce moment, la synthèse de méthionine est bloquée par inhibition de la voie de synthèse des acides aminés dérivant de l'acide aspartique. Ceci est réalisé par addition de lysine, phénylalanine et thréonine à 100 mg/ml qui ont un contrôle allostérique négatif sur la production d'aspartate et d'isoleucine. La leucine et la valine sont ajoutées à 50 mg/ml pour leur rôle dans le contrôle allostérique négatif de la production de thréonine. Enfin on ajoute 60 mg/ml de méthionine sélénée (Sigma). Les cellules sont laissées à 16°C pendant 30 minutes avant induction de la synthèse de protéines par ajout de 1 mM d'IPTG pendant une nuit, à 16°C.

II.2. Purification

A) DsbA3 (expression périplasmique)

Après la phase d'expression protéique, les cellules sont centrifugées à 5000 rpm 20 min et le culot de cellules est alors soumis à un choc osmotique pour libérer les protéines périplasmiques. Pour cela, le culot est repris dans 200 ml de solution contenant 0.5 M de sucrose, 0.1 M de Tris-HCl pH 7.8. Après 5 min à température ambiante, les cellules sont centrifugées 15 min à 10 000 rpm et resuspendues dans 200 ml d'eau glacée puis laissées 5 min dans la glace. 1mM de MgCl₂ est alors ajouté à la suspension qui est à nouveau centrifugée 15 min à 15 000 rpm. La présence dans le surnageant final (protéines solubles) des protéines d'intérêt est vérifiée par gel SDS-PAGE.

B) NmDsbA et leurs mutants (expression cytoplasmique)

Les trois NmDsbA et leurs mutants ont été purifiés selon le même protocole. Les tampons utilisés pour la purification de DsbA3 sont additionnés de 500 mM de NaCl afin de résoudre le problème d'agrégation de la protéine lors de sa concentration.

Après la phase d'expression protéique, les cellules sont centrifugées à 5000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots des cellules sont repris dans 30 ml de tampon A (10 mM HEPES, pH 7.0) puis lysés à l'aide de la presse de French. Le lysat obtenu est centrifugé 30 minutes à 18 000 g afin de séparer les protéines solubles du matériel insoluble.

1. Chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA :

Le surnageant contenant les protéines solubles est alors incubé une nuit avec 5 ml d'une suspension de résine Ni-NTA (QIAGEN) préalablement équilibrée avec le tampon A. La résine est alors chargée sur une colonne et lavée avec 50 ml de tampon A, contenant 50 mM d'imidazole afin d'éliminer les protéines fixées non spécifiquement. Les protéines d'intérêt sont alors éluées par un gradient linéaire de 50 à 400 mM d'imidazole. Après analyse sur gel SDS-PAGE, les fractions d'intérêt sont regroupées et dialysées contre le tampon A pour enlever l'imidazole.

2. Coupure de l'étiquette hexahistidine :

L'étiquette hexahistidine (His6) peut être éliminée par la protéase « His-tagged-TEV » grâce au site de reconnaissance (ENLYFQGS) situé entre His6 et la protéine d'intérêt. Des tests de coupure à petite échelle sont réalisés au préalable afin de déterminer les conditions de coupure optimales en termes de rapport « DO₂₈₀ de TEV / DO₂₈₀ de protéine à couper » (entre 1/5 et 1/500), de temps d'incubation (30 minutes à 7 heures) et de température (20°C et 4°C). La réaction se fait dans le tampon de la TEV contenant 50 mM Tris-HCL pH 8.0, 0.5 mM EDTA. Les échantillons provenant des différentes conditions de coupure sont alors analysés sur gel SDS-PAGE et la meilleure condition (1 /100 (protéase/enzyme) pendant 1h à 20°C puis 2h à 4°C) est appliquée à grande échelle sur la protéine purifiée. A la fin de ces 3h, la solution protéique est centrifugée à 40 000 rpm 20 min, afin d'éliminer les agrégats protéiques, provenant essentiellement de la précipitation de la TEV, puis dialysée contre du tampon A pour être à nouveau incubée avec une résine neuve de Ni-NTA. Lors de cette dernière étape, les protéines d'intérêt sans l'étiquette His6 ne seront pas retenues par la résine et pourront ainsi être isolées des autres protéines avec une étiquette His6 (TEV, protéines non

coupées et fragments d'étiquettes His6 résiduels) par élution avec le tampon A supplémenté par 50 mM d'imidazole. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont analysées par gel SDS-PAGE à 15% afin de vérifier que la coupure de l'étiquette a bien eu lieu. La protéine purifiée est dialysée contre le tampon A.

3. Chromatographie par exclusion de taille :

Les fractions contenant la protéine d'intérêt, avec l'étiquette His6 ou non, sont alors concentrées à environ 10 mg/ml par ultra filtration (Amicon, seuil de coupure de 10 000 Da) et des volumes de 1 ml de la solution protéique sont chargés en plusieurs fois sur une colonne FPLC de type chromatographie de filtration sur gel (Hiload Superdex 75, 16/60, GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon A. Les protéines sont éluées avec le même tampon à un débit de 1 ml/min. Les fractions protéiques sont enfin regroupées et concentrées à environ 12 mg/ml. La pureté de la protéine est contrôlée par gel SDS-PAGE et par spectrométrie de masse et la coupure de l'étiquette His6 est vérifiée par séquençage N-terminal. La concentration protéique finale est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant un coefficient d'absorption égal à 24 075, 22 585 et 24 535 M⁻¹.cm⁻¹ pour DsbA1, DsbA2 et DsbA3 respectivement.

C) DsbA2 et DsbA3 sélénées (expression cytoplasmique)

Les étapes de purification sont identiques à celles décrites plus haut pour la protéine native, avec un ajout de 10 mM de DTT dans tous les tampons pour réduire la totalité des méthionines.

D) NmDsbB et EcDsbB

Après la phase d'expression, les cellules sont centrifugées à 4600 g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots de cellules sont repris dans 35 ml de tampon 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) contenant un mélange d'anti-protéase (ROCHE, complete EDTA free) puis les cellules sont lysées à l'aide de la presse de French. Les membranes sont isolées après centrifugation à 40 000 rpm pendant 45 min à 4°C. Le culot des membranes est lavé plusieurs fois dans le tampon 1 et finalement resuspendu dans 10 ml de ce même tampon. A cette étape, la concentration totale en protéines membranaires est mesurée par le kit « BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay » (Pierce, 1L)). Les membranes sont ensuite solubilisées par addition de

1.2 mg de *N*-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) par mg de protéines et conservées dans la glace pendant 1 heure. Le lysat obtenu est centrifugé 30 minutes à 40 000 g afin de séparer les protéines solubles du matériel insoluble.

1. Chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA :

Le surnageant contenant les protéines solubles est alors incubé une nuit avec 5 ml d'une suspension de résine Ni-NTA (QIAGEN) préalablement équilibrée avec le tampon 1 supplémenté avec 10 mM d'imidazole et 0.0016 % (w/v) de DDM. La résine est alors chargée sur une colonne et lavée avec 50 ml de ce même tampon. Les DsbB-GFP sont alors élués avec 40 ml de tampon 1 contenant 300 mM d'imidazole et 0.0016 % (w/v) de DDM, puis concentrées par ultra filtration (Amicon, 10 000 Da) dans un volume final de 2.5 ml. Après analyse sur gel SDS-PAGE, la solution protéique est chargée sur une colonne de dessalage PD10 (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.016 % de DDM, pour enlever l'imidazole. La concentration protéique finale est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant un coefficient d'absorption égal à 79465 et 70820 M⁻¹.cm⁻¹ pour NmDsbB-GFP et EcDsbB-GFP, respectivement. Les deux DsbB-GFP sont exprimées et purifiées selon le même protocole. Les tampons utilisés pour purifier NmDsbB sont supplémentés avec 300 mM de NaCl et le tampon de lavage de la colonne Ni-NTA ne contient pas d'imidazole.

II.3. Préparation de fragments stables de DsbA2 par protéolyse limitée

Des tests de protéolyse ont été effectués au préalable avec différentes enzymes. Pour cela, la protéine His6-DsbA2 à 1 mg/ml a été incubée avec 4 protéases différentes (thermolysine, élastase, trypsine et papaïne) dans des rapports (protéase / DsbA2) de (1/1000) et (1/100) pendant des temps variables (30 min, 1h, 1h30min, 2h, 2h30 min, 3h et 12h). 10 μ l de mélange réactionnel sont alors prélevés et la réaction est arrêtée par ajout de 5 μ l de tampon de chargement pour gel SDS-PAGE et congélation. Ces échantillons sont alors analysés par gel SDS-PAGE à 15 % et par les méthodes de séquençage N-terminal et de spectrométrie de masse afin de localiser les sites de coupure.

Après analyse des tests précédents, l'élastase, donnant les meilleurs résultats de coupure, est alors choisie pour préparer la solution protéique de DsbA2* destinée aux essais de cristallisation. Pour cela, environ 3 mg de His6-DsbA2 sont incubés avec 0.06 mg d'élastase, dans un volume réactionnel de 2 ml, pendant 12 heures à température ambiante.

L'élastase est alors séparée de DsbA2* par chromatographie échangeuse d'ions. Pour ce faire, le mélange est chargé sur 1 ml de résine CM-sépharose équilibrée avec un tampon A (10 mM HEPES pH. 7.0). A ce pH, l'élastase, avec un pI (potentiel isoélectrique) de 8.5 est retenue par les billes contrairement à DsbA2* (pI=5.2) qui sera éluée lors du lavage avec 10 ml de tampon A. Après analyse par gel SDS-PAGE à 15 %, les fractions contenant DsbA2* sont concentrées à 9 mg/ml et conservées à 4 °C pour ensuite être utilisées pour des essais de cristallisation.

III. Etudes biochimiques

III.1. Mesure de l'activité insuline réductase

La catalyse de la réduction de l'insuline par les enzymes EcDsbA et NmDsbA en présence de DTT est étudiée selon la méthode décrite par Holmgren (Holmgren 1979). Brièvement, le mélange réactionnel (0.2 ml) est préparé dans une cuve, et contient 150 µM d'insuline et 10 µM d'enzyme dans un tampon de phosphate de potassium à 0.1 M, pH 7.0, EDTA 2 mM. La réaction est initiée par addition de DTT à une concentration finale de 1 mM. Après agitation, la densité optique à 650 nm est mesurée toutes les 30 secondes. La réduction non catalytique de l'insuline par le DTT est mesurée en l'absence de catalyseur.

III.2. Détermination de l'état redox

A) Méthode de l'AMS

Un échantillon de 100 µl de chaque enzyme à la concentration de 2 µM est précipité avec 10% de TCA (trichloroacetic acid), incubé 15 minutes dans la glace puis centrifugé 5 minutes à 4°C et 13 000 rpm. Le culot est lavé avec de l'acétone et resuspendu dans 30 µl d'une solution contenant 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM AMS, 0.1% SDS, 10 mM EDTA. L'échantillon est ensuite analysé par gel SDS-PAGE à 15% et coloré par du bleu de Coomassie.

B) Test d'Ellman

Le protocole utilisé a été décrit par (Riddles et al. 1983). Brièvement, 10 μM de protéine, incubés ou non avec un réducteur ou un oxydant, puis dessalés sur une colonne de dessalage (Nap-5 GE Healthcare) équilibrée avec le tampon (0.1 M Kpi, pH 8.0, 1 mM EDTA), sont incubés à température ambiante avec 1 mM de DTNB (Sigma). Après 10 minutes, la DO à 412 nm est mesurée et la quantité de SH libre peut être calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire pour le TNB dans ce tampon de $\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III.3. Oxydation et réduction des DsbA

La réduction des NmDsbA et de EcDsbA en tant que contrôle se fait par incubation des protéines avec 10 mM de DTT 1 heure à température ambiante. Pour l'oxydation, les enzymes sont incubées soit avec 100 mM de glutathion oxydé (GSSG) pendant 30 minutes à température ambiante, soit avec 40 mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pendant 30 minutes à 4°C. L'excès de DTT, GSSG et H_2O_2 est éliminé par une colonne de dessalage (Nap-5 GE Healthcare) équilibrée avec le tampon approprié. Le nombre de thiols libres de la solution protéique est mesuré par la méthode d'Ellman et l'état redox des enzymes est suivi par la méthode de l'AMS.

III.4. Détermination du potentiel d'oxydoréduction

A) Méthode de l'équilibre avec le glutathion et analyse par fluorimétrie

Les expériences de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluorimètre SLM-Amino 8000C. Le potentiel redox est obtenu en mesurant la constante d'équilibre entre les DsbA et le glutathion. 1 μM de chaque enzyme est en premier incubé pendant 12 heures à température ambiante, sous une atmosphère riche en azote pour éviter l'oxydation due à l'oxygène atmosphérique (boîte à gants Jacomex haute performance au Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines (LCCP)/IBS - Grenoble) avec 0.1 mM de GSSG et différentes concentrations en glutathion réduit (GSH) (0.2 μM à 1 mM) dans un tampon de phosphate de potassium à 100 mM, pH 7.0, 1 mM EDTA. Les proportions relatives des DsbA réduites à l'équilibre (R) sont mesurées en utilisant la fluorescence spécifique des enzymes à une longueur d'onde comprise entre 300 et 400 nm (excitation à 295 nm) où l'on observe la différence maximum de fluorescence entre les états réduit et oxydé. Les DsbA présentent une augmentation de leur intensité de fluorescence dans cette

zone de longueur d'onde (maximum à 330 nm pour d'DsbA d'*E. coli*) après réduction totale de leur forme oxydée (Wunderlich et al. 1993; Hennecke et al. 1997). La constante d'équilibre (K_{eq}) est déterminée en appliquant aux valeurs obtenues l'équation suivante :

$$R = ([GSH]^2/[GSSG]) / (K_{eq} + ([GSH]^2/[GSSG])). \quad (1)$$

Le potentiel redox est calculé en utilisant l'équation de Nernst (équation 2) et la valeur de (-240 mV) comme potentiel standard (E°) du glutathion :

$$E^{\circ}_{DsbA} = E^{\circ}_{GSH/GSSG} - (RT/2F) \ln K_{eq} \quad (2)$$

B) Méthode de l'équilibre redox protéine-protéine

La réaction d'équilibre protéine-protéine (100 μ l) est composée classiquement de 50 μ M de chacune des deux protéines redox actives, dans un tampon de phosphate de potassium (Kpi) à 100 mM, pH 7.0, 1 mM EDTA, purgé avec de l'argon. Dans notre cas ces deux protéines sont :

- la DsbA dont le potentiel redox est inconnu
- une deuxième protéine dont le potentiel redox est connu : protéine B.

Les formes réduites et oxydées des protéines sont préparées juste avant leur utilisation selon le protocole indiqué dans p.167 avec du DTT comme réducteur et du GSSG comme oxydant. La réaction d'oxydoréduction est initiée par l'ajout d'une des deux molécules sous son état réduit avec la deuxième sous son état oxydé. Après 14 heures d'incubation à température ambiante, l'équilibre redox est atteint et l'on va procéder à la mesure de la concentration de chaque espèce en présence. Pour cela, une aliquote de 50 μ l du mélange réactionnel, préalablement traité avec 1 % d'acide phosphorique (v/v), afin de figer la réaction, est analysée sur une colonne HPLC en phase inverse en C18 (WATERS Delta-Pak C18 300 Å column 5 μ m 3.9x150mm). Les formes oxydées et réduites des protéines présentes dans l'échantillon sont séparées par un gradient d'élution de 20 à 50% (v/v) en acétonitrile dans 0.1% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) pendant 15 minutes, à une vitesse d'élution de 0.5 ml/min à température ambiante. L'élution de la colonne est mesurée à 280 nm. Les quantités des formes oxydées et réduites de chaque protéine sont obtenues à partir des aires des pics après intégration du chromatogramme, ce qui permet de calculer la constante d'équilibre K et de déterminer le potentiel redox des DsbA à l'aide de l'équation de Nernst et avec $E^{\circ}_{(B)}$ connu :

$$\Delta E^{\circ}_{(B, DsbA)} = E^{\circ}_{(B)} - E^{\circ}_{(DsbA)} = RT/nF \ln K_{eq}.$$

III.5. Thermal Shift Assay

Les expériences de « Thermal Shift Assay » (TSA) ont été menées au Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules (LIM/IBS-Grenoble) sur un Thermocycler iQ5 (Bio-Rad) selon le protocole décrit par (Pantoliano et al. 2001). Le système contient un dispositif de chauffage/refroidissement pour jouer sur la température et un détecteur permettant de visualiser les changements de fluorescence. Brièvement, 120 μM de chaque protéine sous leur état oxydé ou réduit dans 10 mM HEPES pH 7.0 (complémenté par 500 mM NaCl pour DsbA3) sont mélangés avec du SYPRO Orange (2 μl de solution stock concentrée 5000x et diluée au 1/50^{ème} dans l'eau) dans un volume total de 25 μl . Comme le SYPRO Orange est relativement instable dans l'eau, la solution est préparée juste avant l'analyse. Chaque puits de la plaque est rempli avec 23 μl d'échantillon. La plaque est disposée dans l'appareil et l'analyse est effectuée entre 293 K et 368 K (équilibration de la température à 293 K pendant 10 minutes avant l'analyse), suivant une évolution de la température de 1 K/min.

III.6. Ré-oxydation des DsbA par DsbB de *N. meningitidis* ou d'*E. coli*

Les capacités de ré-oxydation des DsbA de *N. meningitidis* par les DsbB de *N. meningitidis* ou d'*E. coli* sont étudiées par mesure du statut redox des DsbA par alkylation avec l'AMS (cf. p59). En tant que contrôle, la ré-oxydation de EcDsbA par EcDsbB a également été étudiée. 10 μM de chaque enzyme, réduite juste avant l'expérience, sont incubés avec différentes concentrations en EcDsbB ou NmDsbB à 20°C dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.0, contenant 300 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % de DDM en présence et en absence de 10 μM de coenzyme Q1 (Sigma). Afin de suivre la cinétique de la réaction, 10 μM de chaque NmDsbA ont été incubés avec 1 μM de NmDsbB en présence de 10 μM de Q1. La réaction est arrêtée à différents temps (0 s, 15 s, 30 s, 1 min et 30 min), puis analysée par la technique de l'AMS. La même expérience est effectuée en parallèle entre EcDsbA et EcDsbB, en tant que contrôle (Regeimbal et al. 2002).

IV. Expérience de spectroscopie RAMAN

Les expériences de Raman ont été effectuées au laboratoire « Cryobench » de l'ESRF (Grenoble – France) en collaboration avec Philippe Carpentier (LCCP/IBS) à l'aide d'un microspectrophotomètre qui permet de mesurer des spectres Raman sur des nano-échantillons, tels que des cristaux de protéines (Carpentier et al. 2007). Le spectromètre InVia

de Renishaw permet théoriquement de mesurer tous les modes de vibration interne observables dans les macromolécules (de 150 cm^{-1} à 4000 cm^{-1}). Une source d'excitation laser dans le proche infra-rouge (785 nm) avec une puissance de 50 mW a été choisie afin de diminuer l'émission de fluorescence des échantillons biologiques pouvant affecter la qualité des données. Les mesures sont réalisées en configuration de rétro-diffusion avec un faisceau de $20\text{ }\mu\text{M}$ de diamètre adapté aux dimensions classiques des cristaux biologiques ($<100\mu\text{M}$).

Les cristaux sont plongés dans une solution cryo-protectrice, puis montés sur un support standard (boucle « spine » pour la bio-cristallographie), puis congelés directement sur le microspectrophotomètre sous un flux d'azote à 100K. Les spectres Raman sont enregistrés entre 200 cm^{-1} et 2000 cm^{-1} avec un temps d'exposition de 20 minutes pour obtenir un rapport signal/bruit exploitable. Ces spectres Raman sont exploités uniquement entre 450 cm^{-1} et 800 cm^{-1} qui correspond à la zone d'intérêt de nos protéines où se situent les vibrations des ponts disulfures.

Une correction de la ligne de base, un lissage des données et une suppression des artefacts (rayons cosmiques) à l'aide du programme Wire 2 développé par Renishaw sont dans un premier temps réalisés sur les spectres Raman, qui sont ensuite mis à l'échelle à partir de la bande intense de vibration du tryptophane à 765 cm^{-1} (Figure 79-pic 2). Par souci de statistique, chaque spectre Raman est enregistré trois fois sur des cristaux différents mais préparés dans les mêmes conditions.

V. Etudes *in vivo* des activités des NmDsbA

V.1. Suivi de la motilité

Le suivi de motilité est effectué suivant le protocole décrit par (Macnab 1986). Des souches d'*E. coli* déficientes en *dsbA* (JFC207) et transformées avec les plasmides pTrc99A-all-dsbA1, pTrc99A-all-dsbA3, pBadHisB-all-dsbA1, pBadHisB-all-dsbA3, et les mêmes plasmides avec les mutations T176V_{DsbA1}, T151V_{DsbA3} (voir p.157) sont mises en préculture durant une nuit à 37°C dans du milieu riche LB ou du milieu minimum M63 additionné de 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. Des boîtes de milieu M63 ou LB contenant 0.3 % d'agar et 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, additionnées ou non avec l'inducteur approprié (1 mM IPTG pour le plasmide pTrc99A ; 0.2 % arabinose pour le plasmide pBadHisB) sont fraîchement préparées etensemencées par piqûre avec les différentes précultures, préalablement standardisées à une

$DO_{600nm}=1$. Ces boîtes sont incubées à 30°C pendant 7h pour le milieu LB et 24h pour le milieu minimum M63 et la motilité de la souche est estimée par la taille du cercle formé.

V.2. Mesure de l'activité phosphatase alcaline

L'activité phosphatase alcaline est mesurée selon le protocole établi par (Brickman et al. 1975). Les bactéries transformées avec le plasmide contenant le gène d'intérêt (cf. p157) sont mises en préculture durant une nuit à 37°C dans du milieu minimum MOPS(complet) (Morpholinepropanesulfonic acid) (MOPS(complet) = MOPS + (0.4 % (w/v) glycérol comme source de carbone, un mélange de 19 acides aminés (sans cystéine) et 100 µg/ml d'ampicilline). Une culture est d'abordensemencée dans 5 ml de MOPS(complet) puis incubée à 37°C avec agitation jusqu'à $DO_{600nm}=0,5$ (phase exponentielle). Quand la DO est atteinte : 2ml de culture est centrifugée (2.5 min, 13000 rpm). Le culot bactérien est repris dans 2 ml de Tris 1M pH 8.0 et la DO_{600nm} de cette suspension bactérienne est mesurée. 100µL de solution de pNPP (pNitrophenyl phosphate disodium salt) (pNPP 0,4% dans Tris 1M, pH 8.0) sont ajoutés à 1 ml de cette suspension qui est incubée à 37°C jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune. Cette coloration apparaît d'autant plus vite que l'activité phosphatase est importante. La durée de cette incubation est notée précisément. La réaction est stoppée en ajoutant 100 µl de K_2HPO_4 1M. Les DO_{405nm} et DO_{550nm} sont mesurées. Le blanc correspond à un échantillon où le ml de suspension bactérienne a été remplacé par 1 ml de Tris 1M pH 8.0.

Annexes

Annexe A : Techniques générales de biologie moléculaire

Préparation de cellules compétentes

Les bactéries peuvent être rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium, qui a un effet perméabilisant sur la membrane et permet l'incorporation d'ADN exogène par la bactérie.

La technique décrite est dérivée de la méthode de traitement au CaCl_2 (Inoue, H. *et al.* 1990). Toutes les étapes se déroulent stérilement. Une préculture, dans 10 ml de LB, à partir d'une colonie de la souche voulue, est incubée sous agitation pendant une nuit à 37°C. Une culture d'environ 200 ml estensemencée avec 2 ml de la préculture. Les bactéries sont cultivées à 37°C, sous agitation, jusqu'en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 0,4$). La croissance bactérienne est alors arrêtée par un passage à 4°C durant 15 minutes. A partir de là, toutes les manipulations se font à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 15 minutes à 4500 rpm (rotor SLC-6000 - Sorvall). Le culot bactérien est repris dans 20 ml de CaCl_2 à 0,1 M froid et maintenu à 4°C pendant 30 minutes. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris en douceur dans 10 ml de CaCl_2 0,1 M avec 20% de glycérol. Les cellules sont alors aliquotées par 200 μl , congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Transformation

Dans un tube Eppendorf stérile, 50 μl de cellules compétentes sont incubées avec 50 à 100 ng d'ADN plasmidique à 4°C pendant 30 minutes. Après un choc thermique de 90 secondes à 42°C, les bactéries sont remises durant 2 minutes à 4°C avant d'être reprises dans 250 μl de LB. Après une heure d'incubation à 37°C, sous agitation, les cellules sont centrifugées 4 minutes à 6500 rpm (centrifugeuse de paillasse). Le culot est repris dans 100 μl de LB et étalé sur boîte de pétri contenant du milieu LB-agar additionné des antibiotiques adéquats à la sélection des transformants, puis incubé à 37°C pendant 16 à 18 heures.

Préparation d'ADN plasmidique

La préparation des plasmides pour la transformation des souches bactériennes a été réalisée grâce au kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » de Qiagen.

Restriction et ligation

Les réactions de restriction ont été réalisées selon les indications du fournisseur des enzymes (*Fermentas, New England Biolabs*). La purification des fragments a été effectuée après migration sur gel d'agarose et excision de la bande correspondante, en utilisant le kit QIAquick Gel extraction de QIAGEN. Ce même kit peut être utilisé pour purifier l'ADN en solution et changer de tampon, si ceci est nécessaire afin de réaliser une digestion sérielle avec des enzymes dont les tampons préconisés ne sont pas compatibles.

La ligation de fragments d'ADN (typiquement plasmide et insert) a été faite en présence de la T4 DNA ligase (*Fermentas ou Invitrogen*) selon les recommandations du fournisseur.

Mutagenèse dirigée

La réaction de mutagenèse est initiée sur un volume de 50 µl, contenant 10 ng d'ADN parental, 125 ng de chaque oligonucléotide, 10 mM dNTP, 2.5 unités d'enzyme polymérase Pfu Turbo (Proméga) et le tampon de la polymérase (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X- 100, 1 mg/ml BSA sans nucléase).

La mutagenèse s'effectue par PCR avec le programme suivant : (95°C pour 30 secondes, 55°C pour 1 minute, 68°C pour 14 minutes) 18 fois. Les produits de réaction de PCR sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction DpnI ne coupant que les sites méthylés, ceci sélectionnant spécifiquement l'ADN non méthylé et donc synthétisé *in vitro*.

1 à 10 µl de ce mélange servent à transformer des cellules Top 10 compétentes. L'ADN obtenu est vérifié par séquençage et restriction. Lorsque le résultat du séquençage est positif, les souches d'expression appropriées sont transformées avec les plasmides issus de la mutagenèse.

Annexe B : Clonage

Clonage de *dsbA3* dans pET20b(+)

La séquence du gène codant pour la protéine mature de DsbA3 a été amplifiée par PCR avec la *Pfu* Turbo DNA polymérase (Stratagene), à partir d'un plasmide contenant la partie codante du gène de DsbA3 sans sa séquence signalé d'adressage au périplasma (J.S. Kroll). Les amorces utilisées : pdsba3-5' et pdsba3-3'(p157) portent respectivement les sites de restriction des enzymes EcoRV et BamH1 (Fermentas). Le produit de PCR est en premier sous-cloné dans le vecteur pCR[®]II-Blunt-TOPO[®] grâce au kit « Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning kit » (*Invitrogen*) qui permet un clonage rapide et simple d'un produit de PCR à bouts francs sans avoir recours aux étapes de restriction et ligation. Le système « Zero Blunt » a l'avantage de sélectionner négativement les bactéries Top10 transformées avec un plasmide vide, car celui-ci entraîne l'expression d'une protéine létale (CcdB) pour ces bactéries.

Les cellules Top10 (*Invitrogen*) super-compétentes sont alors transformées avec le plasmide contenant le gène *dsbA3* appelé « pTOPO-dsbA3 » et l'ADN amplifié est ensuite extrait selon les protocoles détaillés plus haut.

Le plasmide pTOPO-dsbA3 est digéré par les enzymes de restriction EcoRV et BamH1 puis inséré par ligation dans le vecteur pET20b(+), préalablement ouvert par les mêmes enzymes de restriction. Le vecteur pET20b(+) possède une séquence signalé « pelB » pour l'adressage des protéines exprimées dans le périplasma. Des cellules *E. coli* Top 10 sont transformées par le produit de ligation et étalées sur boîtes LB-ampicilline afin de sélectionner uniquement les clones contenant la construction « pET20(b)+-dsbA3 » (Tableau 11). La présence du gène d'intérêt est vérifiée par restriction et séquençage (Génome Express, Meylan France). Les résistances des vecteurs pCR[®]II-Blunt-TOPO[®] (kanamycine) et pET20b(+) (ampicilline) sont différentes, ce qui permet d'éviter l'étape de purification de l'insert sur gel d'agarose.

Clonage des parties solubles des NmDsbA

L'ADN génomique de la souche MC58 séro-groupe B de *Neisseria meningitidis* (J.S. Kroll) a servi de matrice pour l'amplification des différents gènes recombinants des DsbA de *Neisseria* (*nmb0278*, *nmb0294* et *nmb0407* codant pour les protéines DsbA1, DsbA2 et DsbA3). Le clonage a été effectué sur la plate-forme de biologie moléculaire et de purification

des protéines RoBioMol au LIM (Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules) par Benoît Gallet et Marjolaine Noirclerc-Savoie. Brièvement, les gènes ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec l'ADN polymérase Phusion (Finnzymes) ainsi que des amorces spécifiquement dessinées pour un clonage de type LIC (Ligation-Independent-Cloning). Cette technique, développée par Novagen, permet un clonage directionnel et direct des produits de PCR évitant ainsi les étapes de restriction et de ligation. Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite clonés dans le vecteur pLIM01 (His6, AmpR), pour une expression cytoplasmique des trois NmDsbA en fusion avec une étiquette polyhistidine en N-terminal et un site de reconnaissance à la TEV (Tobacco Etch Virus) (MAHHHHHHGHHHQLENLYFQG) permettant d'éliminer l'étiquette. Les plasmides obtenus (pdsba1, pdsba2 et pdsba3) sont ensuite transformés dans des cellules *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus RIL (Stratagene). Les séquences codantes pour les peptides signal d'adressage au périplasme des gènes des trois NmDsbA ont été exclues lors du clonage ainsi que les séquences nucléotidiques codant pour les ancrages membranaires des deux lipoprotéines DsbA1 et DsbA2, dont la flexibilité pourrait empêcher leur bonne cristallisation.

Clonage des DsbB de *N. meningitidis*

La souche MC58 de *N. meningitidis* possède un gène codant pour un potentiel homologue de l'enzyme EcDsbB (appelé *nmdsbB*). Ce gène a été amplifié par PCR à partir du même ADN génomique que celui utilisé pour l'amplification des gènes des *nmdsbA*, avec les amorces Nmdsbb-5' et Nmdsbb-3'. Le produit de PCR est en premier sous-cloné dans le vecteur pCR® II-Blunt-TOPO® (Invitrogen) puis coupé par les enzymes de restriction BamHI et XhoI et finalement inséré par ligation dans le plasmide d'expression pL-EC-DsbBGFP préalablement ouvert par BamHI et XhoI.

Annexes C : Abréviations

3 D	Tridimensionnel
4 – NPO	4- nitrophenoxide
4 – NPP	4-nitrophenylphosphate
Å	Angström
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALP	Phosphatase alcaline
AMS	Acide 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic
AP	Activité phosphatase alcaline
ARN	Acide ribonucléique
ASST	Aryl-Sulphate Sulphotransférase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CysN	Cystéine Nucléophile
Da	Dalton
DDM	n-dodecyl- β -D-maltoside
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	désoxy Nucléotide Tri Phosphate
DO	Densité optique
Dsb	<i>Disulfide Bond</i>
DsbA2*	Fragment protéolytique de la protéine DsbA2 digérée par l'élastase
DsbB-GFP	Protéine DsbB en fusion avec la protéine fluorescente GFP
DTNB	Réactif d'Ellman ou 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothréitol
E et E°	Potentiel redox et Potentiel redox standard
EcDsbA / EcDsbB	DsbA / DsbB d' <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ERPP	Méthode de détermination du potentiel redox par Equilibres Redox protéine-protéine
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRX	Glutarédoxine
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique
His6	Étiquette Hexahistidine
His6-DsbA	protéine DsbA en fusion avec une étiquette hexahistidine
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IBS	Institut de Biologie Structurale
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Keq	Constante d'équilibre d'une réaction chimique
Kox	Constante d'équilibre d'une réaction d'oxydation
LB	Lurian Bertoni
LCCP	Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines
LIC	<i>Ligation-Independent-Cloning</i>
LIM	Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules
LOS	Lipo-OligoSaccharides
LPM	Laboratoire des Protéines Membranaires

MAD	<i>Multiwavelength Anomalous Dispersion</i> ou Diffusion anormale multiple
MES	Acide 4-morpholineéthanesulfonique
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i> ou Remplacement multiple isomorphe
MOPS	Acide 4-morpholinepropanesulfonique
MR	<i>Molecular Replacement</i> ou Remplacement moléculaire
MsrA	Réductase de Méthionine Sulfoxyde
NAD(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme oxydée
NmDsbA/NmDsbB	protéines homologues à DsbA ou DsbB chez <i>N. meningitidis</i>
NTP	Nucléotide-5'-TriPhosphate
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
Ox	Oxydé
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAPS	3'-phosphoadenylylsulfate
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDI	<i>Protein Disulfide Isomerase</i>
PEG	Poly Ethylene Glycol
pelB	Séquence signal d'adressage au périplasma
pI	Point Isoélectrique
Pi	Phosphate inorganique
pNPP	pNitrophenyl phosphate disodium salt
PSB	Partnership for Structural Biology
Red	Réduit
Redox	Oxydoréduction
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rmsd	<i>Root Mean Square Deviation</i>
rpm	<i>Round per minute</i>
SaDsbA	Homologue à DsbA chez <i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodium DodécylSulfate
TCA	Acide TriChloroAcétique
TEV	Tabacco Etch Virus
TFA	Acide trifluoroacétique
Tm	<i>melting Temperature</i> ou Température de fusion
TNB	Acide 2-nitro-5-thiobenzoic
Tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
TRX	Thiorédoxine
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i>
UQ	Ubiquinone
UV	Ultra violet (200 nm- 400 nm)
VKOR	Vitamine K époxyde

Annexes D : Publications

Publication 1 :

Lafaye, C., T. Iwema, J. L. Ferrer, J. S. Kroll, M. Griat and L. Serre.

"Preliminary crystallographic data of the three homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*."

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun (2008) 64(Pt 2): 111-4

Céline Lafaye,^a Thomas Iwena,^b
Jean-Luc Ferrer,^b J. Simon Kroll,^c
Mickaël Griat^a and Laurence
Serre^{a*}^aLaboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble CEDEX 01, France, ^bLaboratoire de Cristallogénèse et Cristallisation des Protéines, Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble CEDEX 01, France, and ^cDepartment of Paediatrics, Imperial College London, St Mary's Hospital Campus, Norfolk Place, London W2 1PG, England

Correspondence e-mail: laurence.serre@ibs.fr

Received 19 December 2007

Accepted 9 January 2008

© 2008 International Union of Crystallography
All rights reserved

Preliminary crystallographic data of the three homologues of the thiol–disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*

Bacterial virulence depends on the correct folding of surface-exposed proteins, a process that is catalyzed by the thiol–disulfide oxidoreductase DsbA, which facilitates the synthesis of disulfide bonds in Gram-negative bacteria. Uniquely among bacteria, the *Neisseria meningitidis* genome possesses three genes encoding active DsbAs: DsbA1, DsbA2 and DsbA3. DsbA1 and DsbA2 have been characterized as lipoproteins involved in natural competence and in host-interactive biology, while the function of DsbA3 remains unknown. In an attempt to shed light on the reason for this multiplicity of *dsbA* genes, the three enzymes from *N. meningitidis* have been purified and crystallized in the presence of high concentrations of ammonium sulfate. The best crystals were obtained using DsbA1 and DsbA3; they belong to the orthorhombic and tetragonal systems and diffract to 1.5 and 2.7 Å resolution, respectively.

1. Introduction

Neisseria meningitidis is an invasive bacterial pathogen that causes life-threatening infection in children worldwide. The host–pathogen interactions and therefore the virulence depend on the correct folding of many surface-exposed proteins, a process that is catalyzed by the thiol–disulfide oxidoreductase DsbA, which performs the synthesis of disulfide bonds in the periplasm of Gram-negative bacteria (Bardwell *et al.*, 1991). This reaction is essential for the folding of virulence components, such as elements of the type IV secretion system, that require the formation of several disulfide bonds (Tinsley *et al.*, 2004) to be functionally active. While *Escherichia coli* and many other Gram-negative bacteria, including human pathogens such as *Shigella* and *Haemophilus*, have a single *dsbA* gene, *N. meningitidis* uniquely possesses three genes (named *nmb0278*, *nmb0294* and *nmb0407* in the sequenced genome of the serogroup B strain MC58) encoding three active DsbAs (DsbA1, DsbA2 and DsbA3), each of which shows different enzymatic properties (Sinha *et al.*, 2004; Tinsley *et al.*, 2004). DsbA1 and DsbA2 are membrane-associated lipoproteins, while DsbA3 is a soluble periplasmic protein like its well studied *E. coli* counterpart. Deletion of each of these genes has highlighted that the presence of at least one of the membrane-anchored enzymes is sufficient to restore full neisserial virulence (Tinsley *et al.*, 2004) or to maintain natural competence for DNA uptake at the wild-type level (Sinha *et al.*, 2008). In contrast, the role of the periplasmic enzyme seems to be unrelated to either of these phenotypes. The neisserial enzymes share 21% sequence identity with their *E. coli* homologue, the crystal structure of which is composed of one thioredoxin domain and one helical domain (Martin, Bardwell *et al.*, 1993). The three proteins are sufficiently similar to be defined unambiguously as DsbAs, but their primary sequences differ markedly, notably around the active-site domain (Fig. 1; Sinha *et al.*, 2004; Tinsley *et al.*, 2004). These differences, with their anticipated structural consequences, may underlie the distinct properties of each protein (Ondo-mbele *et al.*, 2005). Strikingly, the presence of three *dsbA* genes is a feature of *N. meningitidis* alone among neisserial species. *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica* and some

other commensals only possess homologues of *nmb0278* and *nmb0407*, while other commensals such as *N. flava* possess only one *dsbA*, a homologue of *nmb0294* (Sinha *et al.*, 2004). These differences may reflect the striking differences in host–pathogen interactive biology, which is plausibly related in part to the folding of the substrates of DsbA. In order to begin to understand the specific contributions of each of these enzymes to neisserial biology, we have initiated structural study of these three enzymes; here, we present preliminary crystallographic data obtained on the three *N. meningitidis* DsbAs.

2. Experimental and results

2.1. Cloning

Cloning of each of the *N. meningitidis dsbA* genes was achieved using the ROBIOMOL platform (Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France).

PCR amplification was achieved with Phusion enzyme (Finnzymes) using a template containing the different recombinant neisserial *dsbA* genes (*nmb0278*, *nmb0294* and *nmb0407*) and specific primers containing the sequence essential for ligation-independent cloning. The PCR products were inserted into the vector pLIM01 (His₆ fusion, AmpR) by annealing to promote the cytoplasmic expression of the protein of interest in fusion with a N-terminal MAHHHHHHG-HHHQLENLYFQG tag (pLIM01) containing a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site. The ligation products were transformed into *E. coli* and the presence of the gene of interest in the vector was verified by restriction-endonuclease analysis. The nucleotide sequences encoding the periplasmic secretion signal and

the membrane-anchor sequence of the DsbA1 and DsbA2 proteins were excluded (Fig. 1).

2.2. Purification

The three recombinant proteins were expressed and purified at 277 K according to the same protocol, except that all the buffers used to purify DsbA3 were supplemented with 500 mM NaCl in order to avoid protein aggregation.

Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3)-Codon Plus-RIL. 1 l LB broth medium containing 1 mM ampicillin was inoculated with 20 ml of an overnight culture at 310 K. At an OD₆₀₀ of approximately 0.6, expression of the recombinant enzymes was induced by the addition of 1 mM IPTG and cells were grown for an additional 3 h. Cells were pelleted by centrifugation (5000g), resuspended in 10 mM HEPES pH 7.0 (buffer A) and disrupted using a French press. The soluble fraction was recovered by centrifugation at 18 000g and mixed with 5 ml of a suspension of Ni-NTA resin (Qiagen) pre-equilibrated with buffer A at 277 K. The resin was then loaded onto a column. To remove unbound proteins, the resin was extensively washed with 50 ml buffer A containing 50 mM imidazole. The proteins were eluted using a linear gradient of buffer A containing 50–400 mM imidazole. The pooled peak fractions were dialysed against buffer A and incubated in TEV buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT) with recombinant His₆-tagged TEV protease in a 1:100 molar ratio for 1 h at room temperature followed by 2 h at 277 K. The protein solution was dialysed against buffer A and loaded onto Ni-NTA beads to remove all His-tagged proteins. The purified proteins were then concentrated to approximately 10 mg ml⁻¹ using Centricon devices (Amicon,

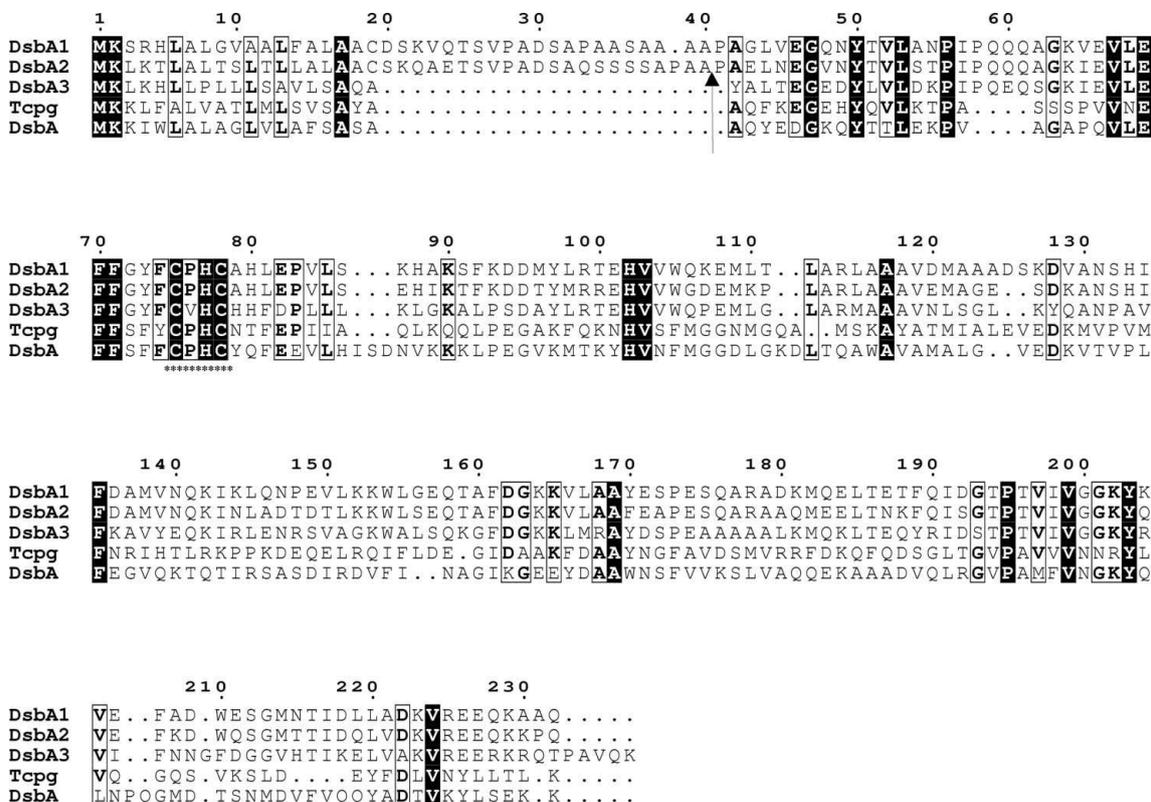


Figure 1

Sequence alignment of the DsbA homologues in *N. meningitidis* (DsbA1, DsbA2 and DsbA3), *E. coli* (DsbA) and *V. cholerae* (Tcpg). Identities (black shading) and highly conserved residues are highlighted. The arrow indicates the N-terminal residue of the three neisserial enzymes studied in this work. The conserved active-site tetrapeptide, Cys-X-X-Cys, is underlined.

10 000 Da cutoff) and loaded onto a size-exclusion chromatography column (HiLoad Superdex 75, 16/60, GE Healthcare) for the final step of the purification procedure. The column was equilibrated with buffer *A* and the pooled peak fractions were concentrated to 12 mg ml⁻¹. The purity of the protein solutions was confirmed by SDS-PAGE (Fig. 2). The molecular weights obtained by mass spectrometry were 21 477, 21 461 and 21 836 Da for DsbA1, DsbA2 and DsbA3, respectively. The final protein concentrations were determined by UV spectrometry assuming molar absorption coefficients at 280 nm of 24 075, 22 585 and 245 35 M⁻¹ cm⁻¹ for DsbA1, DsbA2 and DsbA3, respectively. The final yield of each enzyme was 50 mg pure protein per litre of LB medium.

2.3. Oxidoreductase activity of the recombinant enzymes

To check the oxidoreductase activity of the three purified recombinant proteins, we tested their ability to catalyze the reduction of insulin interchain disulfide bonds by dithiothreitol (Holmgren, 1979). This reduction leads to insulin B-chain precipitation, which was monitored by the change in absorbance at 650 nm. Bovine insulin was concentrated to 1.7 mM in 25 mM HEPES and the final pH of the solution was adjusted to 8.0. A typical reaction mixture (0.2 ml) contained 150 µM insulin in 100 mM potassium phosphate pH 7.0, 2 mM EDTA and 1 mM DTT. The precipitation of insulin was measured after the addition of 5 µM of each enzyme and compared with a control that did not contain any protein. Fig. 3 shows that for all the DsbAs the reaction lag time is shorter than with the control, indicating that the three purified proteins exhibit thiol-disulfide oxidoreductase activity.

2.4. Crystallization

For crystallization, each protein was concentrated to 12 mg ml⁻¹ in buffer *A*. As in the purification steps, buffer *A* was supplemented with 500 mM NaCl for the crystallization of DsbA3. Initial trials were performed using the sitting-drop method and commercial crystallization screening kits from Qiagen and Hampton Research. For the initial trials, we used a Tecan Genesis robot coupled with 96-well plates. 1 µl protein solution was mixed with 1 µl reservoir solution and the resulting drops were equilibrated against 100 µl reservoir solution. After optimization of the conditions in larger crystallization boxes (NeXTal, 1 ml reservoir), the best DsbA1 crystals grew at

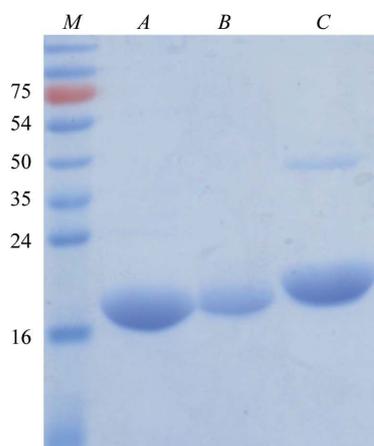


Figure 2
Analysis of the purified protein samples after gel-filtration chromatography. The purified samples were loaded onto a Coomassie Blue-stained 12% SDS-PAGE gel. Lanes *M*, *A*, *B* and *C* contain molecular-weight markers (kDa), recombinant DsbA2, DsbA1 and DsbA3, respectively.

room temperature in 2.4 M ammonium sulfate, 0.1 M bicine pH 9.0 or in 1.6 M trisodium citrate as thick plates or tetragonal bipyramids (Fig. 4*a*). DsbA2 crystals appeared in 2.4 M ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 5.0 as hexagonal bipyramids at room temperature (Fig. 4*b*). DsbA3 crystallized as small rectangular prisms in 2.2 M ammonium sulfate, 0.25 M sodium malonate, 0.1 M MES pH 5.0 at 281 K (Fig. 4*c*). These crystals were routinely reproduced using the hanging-drop method of crystallization, mixing 2 µl protein solution with 2 µl reservoir solution.

2.5. Crystal parameters and X-ray diffraction

Prior to diffraction, the crystals were soaked in their respective crystallization solutions containing 30% glycerol as cryoprotectant. The crystals were then flash-cooled directly in liquid nitrogen. X-ray diffraction experiments were performed at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France). Data were collected at 100 K on BM30 for DsbA1 crystals and on ID14-EH3 for DsbA2 and DsbA3. Diffraction data sets were processed using *MOSFLM* (Leslie, 1999) and intensities were scaled and reduced with *SCALA* (Evans, 1993) from the *CCP4* program suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Of the three proteins, only the DsbA2 crystals exhibited a poor diffraction pattern that did not allow us to determine the crystal parameters. The crystal parameters of DsbA1 and DsbA3 and their corresponding data-collection statistics are summarized in Table 1.

3. Conclusion

In this work, we cloned and purified the three DsbA enzymes from the pathogenic bacterium *N. meningitidis*. All the purified proteins were expressed at high levels in soluble form, lacking N-terminal signal sequences, in the cytoplasm of *E. coli*. The insulin-precipitation assay commonly used to test DsbA activity (Holmgren, 1979) shows that the three neisserial enzymes exhibit similar oxidoreductase activity and that the removal of the membrane anchor of the two lipoproteins does not abrogate this. The neisserial DsbAs are highly

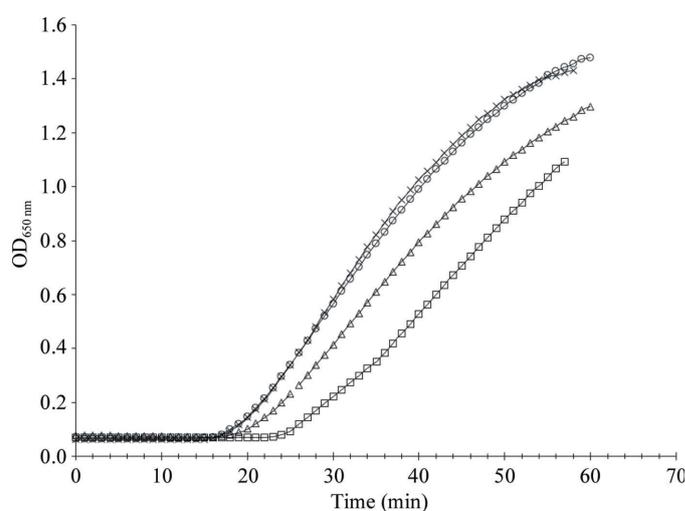


Figure 3
Assay of the disulfide oxidoreductase activity of meningococcal DsbAs. The precipitation of insulin was measured after the addition of 5 µM DsbA1 (black triangles), DsbA2 (white circles) or DsbA3 (crosses). The absorbance owing to background precipitation of insulin by non-enzymatic reduction was measured in control tubes containing DTT but no added protein catalyst (white squares). The lag times measured for the control and the three meningococcal DsbAs are around 22 and 17 min, respectively.

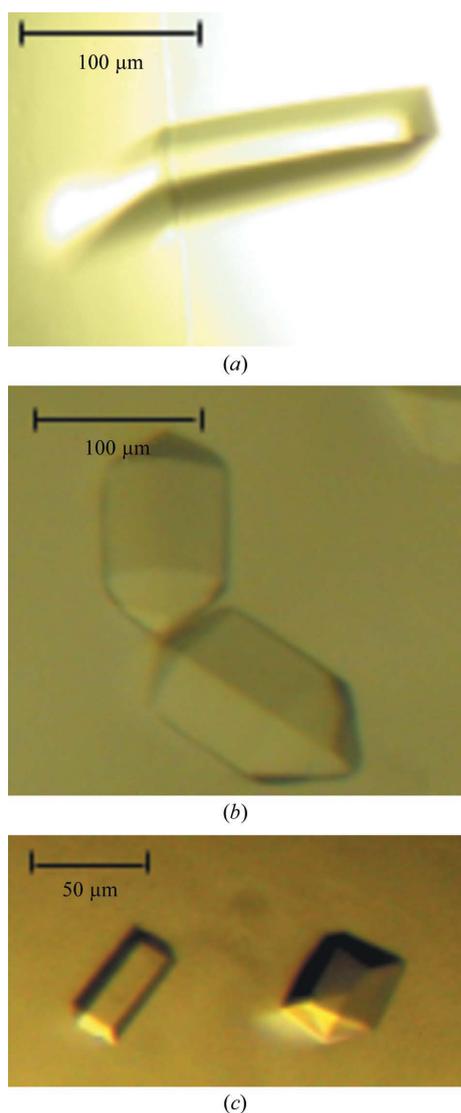


Figure 4
Crystals of the three *N. meningitidis* DsbA enzymes. All the enzymes crystallized in the presence of ammonium sulfate. Detailed crystallization conditions are described in the text. (a) DsbA1, (b) DsbA2, (c) DsbA3.

homologous; in particular, the two anchored membrane proteins are more than 70% identical. Accordingly, all three proteins crystallized under similar conditions requiring a high concentration of ammonium sulfate. This requirement is markedly different from the conditions employed for the successful crystallization of the *Vibrio cholerae* or *E. coli* DsbAs in polyethylene glycol (Martin, Waksman *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1997). The neisserial enzymes share 21% sequence identity with their *E. coli* and *V. cholerae* counterparts, the crystal structures of which are known (Martin, Bardwell *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1997). While this identity level might appear sufficient to solve the neisserial enzyme structures by molecular replacement either with the *E. coli* or *V. cholerae* models, no obvious solution has been obtained so far for DsbA1 or DsbA3 using this method of phasing.

Table 1

Crystal parameters and data-collection statistics calculated using *SCALA* (Evans, 1993).

Values in parentheses are for the last resolution shell.

Protein	DsbA1	DsbA2	DsbA3
<i>N. meningitidis</i> B serogroup gene	<i>nmb0278</i>	<i>nmb0294</i>	<i>nmb0407</i>
Space group	$P2_12_12_1$	Not determined	$I4_122$
Unit-cell parameters (Å)	$a = 44.08, b = 46.42, c = 79.93$		$a = b = 160.0, c = 76.80$
Molecules per ASU†	1		2
V_M (Å ³ Da ⁻¹)	1.9		2.8
Solvent content (%)	35		56
Resolution (Å)	20.5–1.5 (1.58–1.5)		20–2.8 (2.95–2.8)
ESRF beamline	BM30		ID14-EH3
Wavelength (Å)	0.979		0.931
$R_{\text{merge}}‡$	0.064 (0.241)		0.102 (0.282)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	6.8 (3.1)		6.1 (2.7)
Total observations	274425		162296
Unique reflections	26907		12695
Multiplicity	10.2		12.9
Data completeness (%)	99.5		100

† Estimated from the Matthews coefficient value (Matthews, 1968). ‡ $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \bar{I}(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ is the i th measurement of the intensity of the hkl reflection and $\bar{I}(hkl)$ is the average intensity obtained with these i measurements.

While it is clear on the basis of the sequence that the three neisserial proteins exhibit the DsbA general fold, it seems highly likely that their three-dimensional structures include some significant differences from the *E. coli* and *V. cholerae* enzyme structures. Heavy-atom derivative research is currently in progress in order to solve these crystal structures.

The authors would like to thank the cloning and expression platform of the Institut de Biologie Structurale (Grenoble), Delphine Blot for her assistance with the crystallization robots and Bernard Blot for the mass spectroscopy. CL was the recipient of a CEA PhD student fellowship. JSK was supported by the Livanos Trust.

References

- Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). *Cell*, **67**, 581–589.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Evans, P. R. (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing*, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, pp. 114–122. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Holmgren, A. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 9627–9632.
- Hu, S. H., Peek, J. A., Rattigan, E., Taylor, R. K. & Martin, J. L. (1997). *J. Mol. Biol.* **268**, 137–146.
- Leslie, A. G. W. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 1696–1702.
- Martin, J. L., Bardwell, J. C. A. & Kuriyan, J. (1993). *Nature (London)*, **365**, 464–468.
- Martin, J. L., Waksman, G., Bardwell, J. C. A., Beckwith, J. & Kuriyan, J. (1993). *J. Mol. Biol.* **230**, 1097–1100.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Please provide reference – Ondo-mbele *et al.* (2005).**
- Sinha, S., Ambur, O. H., Langford, P. R., Tønjum, T. & Kroll, J. S. (2008). *Microbiology*, **154**, 217–225.
- Sinha, S., Langford, P. R. & Kroll, J. S. (2004). *Microbiology*, **150**, 2993–3000.
- Tinsley, C. R., Voulhoux, R., Beretti, J. L., Tommassen, J. & Nassif, X. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 27078–27087.

Publication 2 :

Lafaye, C., T. Iwema, P. Carpentier, C. Jullian-Binard, J. S. Kroll, J. F. Collet
and L. Serre

"Biochemical and Structural Study of the Homologues of the Thiol-Disulfide
Oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*."

J Mol Biol (2009) **392**(4): 952-66

Biochemical and Structural Study of the Homologues of the Thiol–Disulfide Oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*

Céline Lafaye¹, Thomas Iwema², Philippe Carpentier²,
Céline Jullian-Binard¹, J. Simon Kroll³, Jean-François Collet⁴
and Laurence Serre^{1*}

¹Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 01, France

²Laboratoire de Cristallogénèse et Cristallisation des Protéines, Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 01, France

³Department of Paediatrics, Imperial College London, St. Mary's Hospital Campus, Norfolk Place, London W2 1PG, UK

⁴de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, B-1200 Brussels, Belgium

Received 10 May 2009;
received in revised form
15 July 2009;
accepted 18 July 2009
Available online
23 July 2009

Edited by M. Guss

Bacterial virulence depends on the correct folding of surface-exposed proteins, a process catalyzed by the thiol–disulfide oxidoreductase DsbA, which facilitates the synthesis of disulfide bonds in Gram-negative bacteria. The *Neisseria meningitidis* genome possesses three genes encoding active DsbAs: DsbA1, DsbA2 and DsbA3. DsbA1 and DsbA2 have been characterized as lipoproteins involved in natural competence and in host interactive biology, while the function of DsbA3 remains unknown.

This work reports the biochemical characterization of the three neisserial enzymes and the crystal structures of DsbA1 and DsbA3. As predicted by sequence homology, both enzymes adopt the classic *Escherichia coli* DsbA fold. The most striking feature shared by all three proteins is their exceptional oxidizing power. With a redox potential of –80 mV, the neisserial DsbAs are the most oxidizing thioredoxin-like enzymes known to date. Consistent with these findings, thermal studies indicate that their reduced form is also extremely stable. For each of these enzymes, this study shows that a threonine residue found within the active-site region plays a key role in dictating this extraordinary oxidizing power. This result highlights how residues located outside the CXXC motif may influence the redox potential of members of the thioredoxin family.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Neisseria*; thioredoxin; DsbA; crystal structure

*Corresponding author. Partnership for Structural Biology, Carl-Ivar Bränden Building, BP181, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble, France.
E-mail address: laurence.serre@esrf.fr.

Abbreviations used: TRX, thioredoxin; WT, wild type; MAD, multiwavelength anomalous diffraction; EcDsbA, *Escherichia coli* DsbA; NmDsbA, *Neisseria meningitidis* DsbA; SaDsbA, *Staphylococcus aureus* DsbA; GFP, green fluorescent protein; NTA, nitrilotriacetic acid; DDM, N-dodecyl- β -D-maltoside.

Introduction

Neisseria meningitidis is an invasive bacterial pathogen causing life-threatening infection in children worldwide. Host–pathogen interactions, and therefore virulence, depend on the correct folding of many surface-exposed proteins, which often requires disulfide-bond formation.¹ In Gram-negative bacteria, the synthesis of disulfide bonds takes place in the periplasm and is catalyzed by the thiol–disulfide oxidoreductase DsbA.² This reaction is essential for

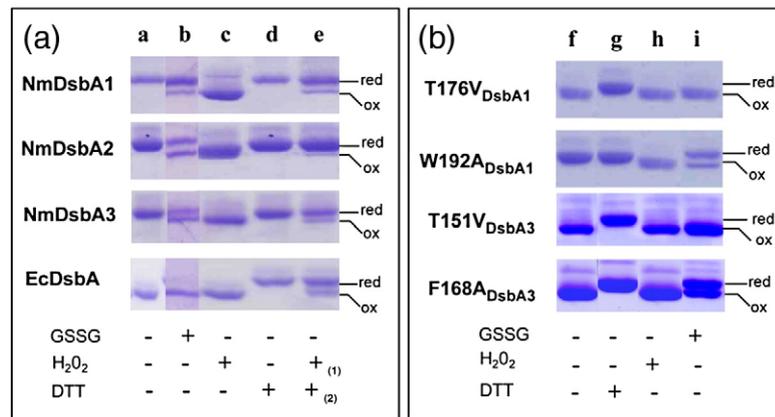


Fig. 1. Redox state of the DsbAs: (a) WT NmDsbAs and WT EcDsbA and (b) NmDsbA mutants. Each sample was treated with 10% trichloroacetic acid, followed by alkylation with AMS. Reduced (*red*; AMS modified) and oxidized (*ox*; non-modified) proteins were separated on 15% SDS-PAGE under non-reducing conditions: lanes a and f, at the end of the purification; lanes b and i, after incubation with 100 mM GSSG; lanes c and h, after incubation with 40 mM H₂O₂; lanes d and g, after incubation with 10 mM DTT; lane e, protein previously oxidized by 40 mM H₂O₂ incubated for 1 h with 10 mM DTT.

tion with 40 mM H₂O₂; lanes d and g, after incubation with 10 mM DTT; lane e, protein previously oxidized by 40 mM H₂O₂ incubated for 1 h with 10 mM DTT.

the folding of virulence components that require the formation of several disulfide bonds to be functionally active.³ While *Escherichia coli* and other Gram-negative bacterial species, such as *Shigella* and *Haemophilus*, have a single *dsbA* gene, *N. meningitidis* possesses three genes (named *nmb0278*, *nmb0294* and *nmb0407* in the sequenced genome of the serogroup B strain MC58) encoding three active DsbAs (DsbA1,

DsbA2 and DsbA3), each showing different enzymatic properties. DsbA1 and DsbA2 are lipoproteins associated with the inner membrane, while DsbA3 is a soluble periplasmic protein similar to its well-studied *E. coli* counterpart. Deletion of each of these genes has highlighted that the presence of at least one of the membrane-anchored enzymes is sufficient for full virulence³ or to maintain natural competence

Table 1. Data collection and structure refinement statistics

	Gold derivative				
	Peak	Inflection	WT DsbA1	WT DsbA3	T176V _{DsbA1}
Cell parameters (Å)		44.09–46.44–79.97		159.98–159.98–76.89	44.29–47.61–79.82
Space group		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		I4 ₁ 22	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Monomer per asymmetric unit		1		2	1
<i>Data collection</i>					
Beamline	BM30 ^a	BM30 ^a	BM30 ^b	ID14-3 ^b	BM30 ^b
Data collection wavelength (Å)	1.0398	1.0378	0.979	0.931	0.979
Resolution range (Å)	20–1.6 (1.7–1.6) ^c	20–1.6 (1.7–1.6)	40–1.5 (1.58–1.50)	80–2.8 (2.95–2.8)	44.3–1.45 (1.52–1.45)
Observed reflections	237,391	117,686	274,425	162,303	194,796
Unique reflections	35,475	34,868	26,907	12,602	30,676
I/σ(I)	22.0 (3.6)	19.8 (3.3)	6.8 (3.1)	6.3 (2.7)	6.2 (3.0)
Average redundancy	6.7	3.38	10.2	12.9	6.4
R _{merge} ^d	0.056 (0.380)	0.041 (0.287)	0.064 (0.241)	0.099 (0.276)	0.061 (0.233)
Completeness (%)	83.8	82.4	99.5	100	99.4
Wilson B-factor (Å ²)	23.24	23.36	17.40	61.00	14.20
<i>Refinement</i>					
Accession code		3DVW		3DVX	2HZ8
Resolution range (Å)		20.5–1.5		20.5–2.8	20.5–1.45
R-factor/R _{free} ^e		0.179/0.213 (0.210/0.249)		0.219/0.289 (0.293/0.401)	0.191/0.226 (0.24/0.32)
No. of protein atoms		1533		2954	1514
No. of water molecules		178		23	273
No. of sulfate ions		—		4	—
Average B-factor (Å ²)		12.8		31.07	16.2
r.m.s.d. from ideality					
Bond lengths (Å)		0.010		0.017	0.009
Bond angles (°)		1.21		1.86	1.17
Ramachandran plot (%)					
Preferred regions		98.35		87.8	94.8
Allowed regions		1.65		12.2	5.2
Outliers		—		—	—

^a Statistics from XDS output with unmerged Bijvoet pairs.

^b Statistics from SCALA (CCP4) output.

^c Values in parentheses refer to the highest-resolution shell.

^d $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_j(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_j(hkl)}$.

^e $R\text{-factor} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs},(hkl)} - F_{\text{calc},(hkl)}|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs},(hkl)}|}$, where $F_{\text{obs},(hkl)}$ and $F_{\text{calc},(hkl)}$ are the observed and calculated structure factor amplitudes for each hkl , respectively.

for DNA uptake at the wild-type (WT) level.⁴ In contrast, the role of the periplasmic enzyme seems unrelated to any of these phenotypes. The neisserial enzymes share about 20% sequence identity with their *E. coli* homologue, the crystal structure of which is composed of one thioredoxin (TRX) domain and one helical domain.⁵ The primary sequences of the three neisserial proteins are similar, but some discrepancies found in the active-site domain may underlie the distinct properties of each protein.^{3,6,7} Strikingly, the presence of three *dsbA* genes is a feature of *N. meningitidis* alone among neisserial species. *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica* and some other commensals possess homologues of *nmb0278* (DsbA1) and *nmb0407* (DsbA3) alone, while *Neisseria flava* possesses only one *dsbA*, a homologue of *nmb0294* (DsbA2).⁷ This may reflect striking differences in host–pathogen interactive biology, plausibly related in part to the folding of substrates of DsbA. To understand the specific contributions of each of these enzymes to neisserial biology, we have characterized the biochemical properties of each and solved the crystal structures of DsbA1 and DsbA3. This work shows that all three are strong oxidizing enzymes and that a conserved threonine residue found within the active-site area plays a key role in dictating their extraordinary oxidizing power.

Results

Crystallographic study of the *N. meningitidis* DsbAs

DsbA1 and DsbA2 are both lipoproteins and share 78% sequence identity. As described earlier, we studied the soluble forms of these enzymes deprived of 1–20 residues.⁸ DsbA1, DsbA2 and DsbA3 were all produced in the reducing environment of the *E. coli* cytoplasm. Although no reducing agent was used during the purification steps, all neisserial DsbAs were

fully reduced after purification (Fig. 1, lane a) and crystallized in their reduced states. All attempts to crystallize the oxidized forms were unsuccessful so far.

The crystal structure of DsbA1 was determined by the multiwavelength anomalous diffraction (MAD) method at the gold edge. There is one DsbA1 monomer per asymmetric unit, and the final model was refined to 1.5 Å resolution with R -factor and R_{free} values of 0.179 and 0.213, respectively (Table 1). The DsbA3 model was solved by molecular replacement using the refined structure of DsbA1 as search model and then refined to 2.8 Å resolution with resulting R -factor and R_{free} values of 0.219 and 0.287, respectively. There are two monomers of DsbA3 per asymmetric unit that are structurally similar (r.m.s.d. of 0.218 Å calculated on 185 C α atom pairs; LSQKAB-CCP4⁹). Accordingly, our structural analysis will be based on one monomer of DsbA3 only. We also attempted to solve the structure of DsbA2, but no crystal of suitable quality could be obtained. As DsbA2 shares 78% sequence identity with DsbA1, its three-dimensional structure is anticipated to be very similar. Most of the non-conserved residues are predicted to lie far from the active-site region and should not affect the structure of the functional regions.

DsbA1 and DsbA3 structures are similar

DsbA1 and DsbA3 structures adopt the canonical *E. coli* DsbA (EcDsbA) fold, consisting of a TRX domain and an embedded helical domain (Fig. 2a). In agreement with the high degree of sequence identity between the two neisserial proteins (57%), their atomic models superimpose with an r.m.s.d. of 1.1 Å over 186 C α atoms, indicating that the structure of DsbA3 and that of the soluble domain of DsbA1 are similar.

In the DsbA1 structure, the classic TRX domain is composed of residues 23–84 and residues 165–213 (Fig. 2a).¹¹ It comprises a mixed β -sheet of five strands (β 1– β 5) flanked by two α -helices (α 1 and α 7) on one side of the sheet. The helical domain of

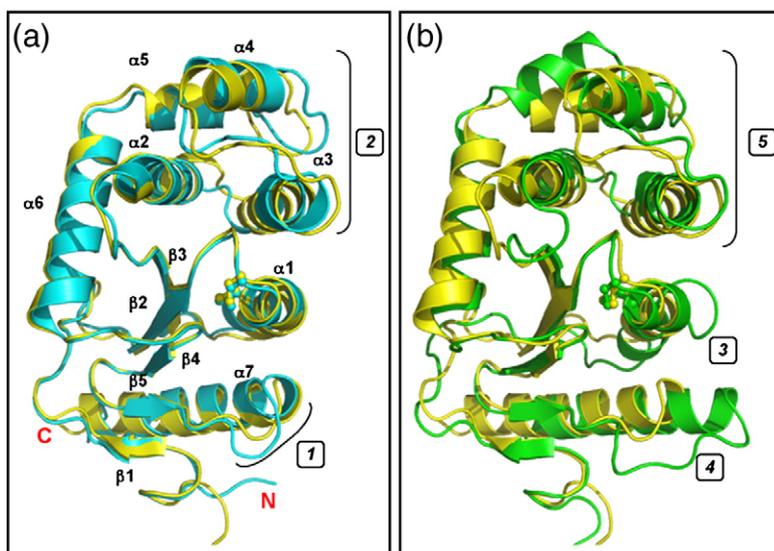


Fig. 2. Comparison of different DsbA structures. Each model is represented by ribbons, with the helical domain at the top of the view and the CXXC sequence in ball-and-stick representation. Only secondary structures of DsbA1 are labeled. (a) Superimposition of DsbA1 (yellow) and DsbA3 (cyan). Main differences involve the β 5– α 7 motif (1) and the helical domain (2). (b) Superimposition of DsbA1 (yellow) to EcDsbA (green). Major differences are located in the α 1 helix (3), the β 5– α 7 motif (4) and the helical domain (5). This figure was generated by PyMOL.¹⁰

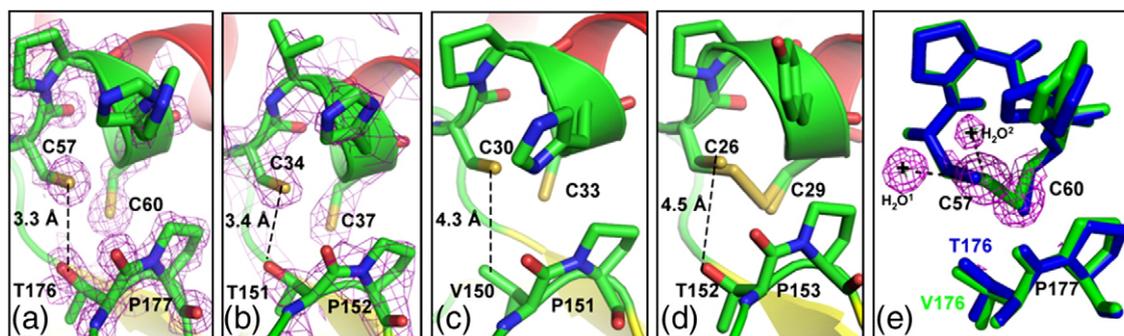


Fig. 3. Focused view of the active site regions: (a) DsbA1, (b) DsbA3, (c) EcDsbA (Protein Data Bank code 1A2L¹⁶) and (d) SaDsbA (Protein Data Bank code 3BCI¹⁷). Only residues of the CXXC motif and the *cis*-Pro loop are represented. ($2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$) electron density map calculated around the active site is shown in purple (map contoured at 1.2σ). SaDsbA is modeled as a mixture of both redox forms. The other structures are in their reduced form. (e) Superimposition of wt DsbA1 (blue) and T176V_{DsbA1} mutant (green). ($2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$) electron density map calculated around the active site of T176V_{DsbA1} is contoured at 1.5σ (purple). In the structure of the mutant enzyme, the sulfur atoms are 2.1 Å away and two water molecules interact with the sulfur atom of C57 (distances: $\text{H}_2\text{O}^1 - \text{S}_{\text{C57}} = 3.6$ Å and $\text{H}_2\text{O}^2 - \text{S}_{\text{C57}} = 3.5$ Å).

DsbA1 is composed of residues 89–164, including four α -helices ($\alpha 2$ – $\alpha 5$) and an extension to helix $\alpha 6$. The CXXC (C57–P58–H59–C60) catalytic-site motif is located on the N-terminal side of the $\alpha 1$ helix.

In the DsbA3 structure, the classic TRX domain is composed of residues 1–67 and residues 140–189, and the helical domain comprises residues 68–139 (Fig. 2a). The CXXC catalytic motif located on the N-terminal side of the $\alpha 1$ helix is composed by the C34–V35–H36–C37 sequence.

The major structural difference between DsbA1 and DsbA3 is the orientation of the helices in the

helical domain observed after superimposition of the TRX domains of the two proteins [Fig. 2a(2)]. Small discrepancies are observed for loops connecting $\alpha 4$ to $\alpha 5$ helices or those connecting $\alpha 2$ to $\alpha 3$ helices found at the opposite side of the catalytic region. Differences are also observed next to the active site in DsbA enzymes in the $\beta 5$ – $\alpha 7$ motif that is part of the hydrophobic groove involved in the interaction with DsbB in *E. coli* [Fig. 2a(1)].^{12,13}

In the active-site region, the two central residues of the CXXC motif suggested by previous studies to be

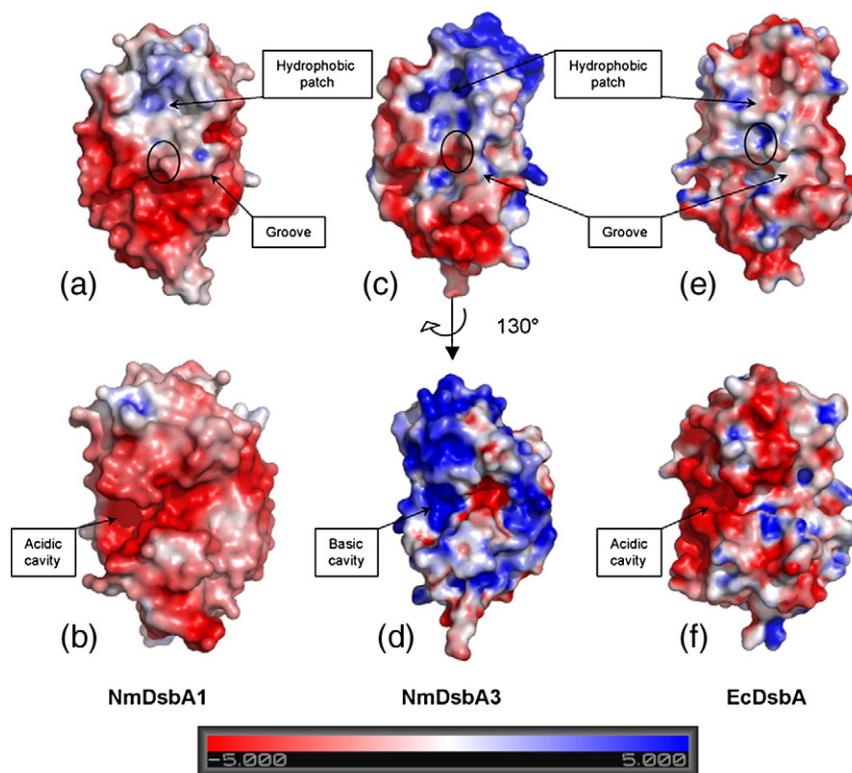


Fig. 4. Electrostatic surface potentials calculated with APBS:²¹ (a and b) DsbA1, (c and d) DsbA3 and (e and f) EcDsbA. The position of the nucleophilic cysteine is highlighted by a black oval.

functionally critical are different in the two enzymes (VH for DsbA3 and PH for DsbA1).^{11,14,15} This does not affect the conformation of the active site, however (Fig. 3).

A remarkable characteristic of the DsbA1 and DsbA3 structures is the presence of the hydroxyl group of T176_{DsbA1} (and T151_{DsbA3}) 3.5 Å away from the sulfur atom of the Cys57_{DsbA1} (Cys34_{DsbA3}), suggesting that it can form a hydrogen bond with the nucleophilic cysteine (Fig. 3a and b) in the reduced form. This threonine is present inside a short motif called the *cis*-Pro loop located at the N-terminal side of the β4 strand. The *cis*-Pro loop is conserved among the TRX family and is important in substrate recognition and stabilization.^{18–20}

Charge surface analysis reveals some differences between the neisserial enzymes

As anticipated by their different isoelectric points (*pI*=6 for DsbA1 and *pI*=9 for DsbA3), DsbA1 and DsbA3 differ significantly in surface charge distribution (Fig. 4). Although globally the TRX domain is rather acidic and the helical domain is rather basic for both enzymes, the TRX domain is more acidic in DsbA1 and the helical domain is more basic in DsbA3 (Fig. 4a and c).

The regions surrounding the active site (i.e., the so-called hydrophobic patch and the peptide binding groove in the TRX domain, two regions named after the EcDsbA structure) are well conserved (Fig. 4a and c).⁵ The peptide binding groove and the hydrophobic pocket are also narrower in DsbA3 than in DsbA1. Finally, there are also major differences between the two neisserial DsbAs regarding the surface charge distribution at the opposite side of the active site (Fig. 4b and d). This

region is composed mainly of acidic residues in DsbA1 and basic residues in DsbA3.

Striking differences between the structure of DsbA3 described here and that reported previously (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank code 2ZNM)

The structure of DsbA3 (2ZNM) has been solved previously in a different crystal system by Vivian *et al.*²² Both models superimpose with an r.m.s.d. of 2.3 Å over 183 C^α atom pairs (r.m.s.d. of 2.1 Å if the CXXC sequence is excluded from the calculation of the LSQKAB-CCP4⁹). As shown in Fig. 5a(1), the comparison of the models highlights a significant conformational change in the CXXC catalytic site (a displacement of the C^α backbone between 2.5 and 10 Å for the CXXC sequence). The CXXC motif of 2ZNM adopts an extended conformation that precedes the α1 helix [Fig. 5a(1)], and the two sulfur atoms of C34 and C37 are distant by 14 Å (Fig. 5b). This conformation is uncommon for a protein presenting a TRX fold, and the unusually long distance between C34 and C37 is incompatible with the formation of a disulfide bond. In contrast, in the structure of DsbA3 presented here, the CXXC motif adopts the classic conformation of the TRX superfamily and the two sulfur atoms are 3.5 Å away in the reduced form, compatible with the formation of a disulfide bond (Fig. 5b). A second difference between the two DsbA3 models is located in the region involved in the interaction with DsbB, namely the loop connecting strand β5 to helix α7 [Fig. 5a(2)]. In this region, the positions of residues F168 and D169 located at the N-terminal extremity of the α7 helix have shifted by 3.7 and 4.8 Å, respectively (shift calculated for the C^α atom positions).

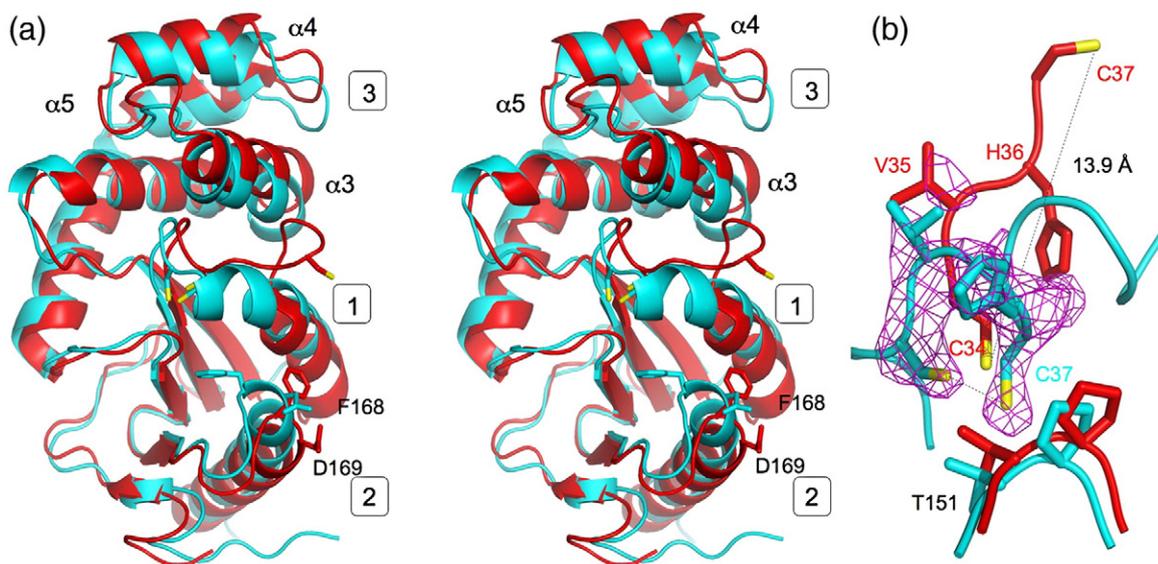


Fig. 5. Superimposition of DsbA3 (cyan) and 2ZNM model (red). (a) Stereo view of the superimposition highlights the structural discrepancies in the active-site region (1), in the loop important in DsbB interaction (2) and in the helical domain (3). (b) Zoom on the active-site region: Residues of the CXXC tetrapeptide and the *cis*-Pro loop are shown in stick representation. The $(F_{obs} - F_{calc})$ omit map calculated around the CXXC sequence is also shown in mesh representation (contoured at 3σ).

In addition, the helical domain of each model exhibits conformational differences located on the region composed by the $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ helices and the loops connecting helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ or helices $\alpha 3$ and $\alpha 4$ [Fig. 5a(3)]. This region makes intermolecular contacts in the 2ZNM crystal structure, and this discrepancy is probably caused by the crystal packing. In contrast, $\alpha 2$ and $\alpha 6$ helices and the central β -sheets are invariants (Fig. 5a).

Comparison between the *N. meningitidis* DsbAs and the reduced structure of EcDsbA

Apart from the surface charge distribution, the structures of DsbA1 and DsbA3 are similar. The structural comparisons with EcDsbA, their homologue from *E. coli*,^{5,16} are also analogous for both neisserial enzymes (Fig. 2a and b).

The sequence identity between the *N. meningitidis* DsbAs (NmDsbAs) and EcDsbA is on average 25%, and their three-dimensional structures superimpose with an r.m.s.d. of 2.2 Å (over 161 C α atom pairs; LSQKAB-CCP4⁹). Differences are observed within the active site of the three enzymes (Fig. 3). The CPHC active tetrapeptide is conserved in DsbA1 (and DsbA2) and EcDsbA, while the proline is replaced by a valine in DsbA3. In addition, in all neisserial DsbAs, the so-called *cis*-Pro loop (residues 176–178 and residues 151–153 in DsbA1 and DsbA3, respectively), conserved among the TRX family and important in substrate recognition and stabilization,^{18–20} is a TcP sequence as found in the *E. coli* disulfide isomerases DsbC and DsbG. In contrast, EcDsbA has a VcP²³ motif, and in the structure of the reduced EcDsbA, the V150 methyl group is 4.5 Å away from the sulfur atom of the nucleophilic cysteine. As mentioned previously, the hydroxyl group of the equivalent threonine is only 3.3 Å away in the NmDsbA structures (Fig. 3a–c).

Other structural differences are located in regions surrounding the active site. First, in the C-terminal end of the polypeptide chain, the loop connecting the $\beta 5$ strand and the $\alpha 7$ helix is notably longer in EcDsbA than in NmDsbAs [Fig. 2b(4)], resulting in a deeper binding groove in EcDsbA. The $\alpha 1$ helix conformation is also different in EcDsbA [Fig. 2b(3)]. It is formed by two segments ($\alpha 1$ and $\alpha 1'$) in the *E. coli* enzyme but is one single bent helix in the NmDsbAs. Additional differences are found in the loop connecting the TRX and the helical domains between the $\alpha 2$ helix and the $\beta 3$ strand. The superimposition of the structures reveals substantial variability in the helical domain similar to the orientation of the $\alpha 4$ and $\alpha 5$ helices [Fig. 2b(5)].

Crystallization of oxidized DsbA1

To study the structural changes driven by the oxidation of the active cysteines, we incubated the neisserial enzymes in a high concentration of GSSG or H₂O₂ prior to crystallization (Fig. 1, lanes b and c). Under these conditions, we obtained some DsbA1 crystals suitable for X-ray diffraction, but the re-

sulting structure revealed that the enzyme was in the reduced state. Raman spectroscopy was carried out on these crystals to check whether the reduction was induced by the power of intense X-ray beams as previously observed for other proteins of this family.²⁴ Prior to diffraction, no clear disulfide-bond signature could be identified in the 490 to 530 cm⁻¹ region of the Raman spectra (peak 1 in Fig. 6).²⁵ In contrast, the Raman spectrum obtained with the T176V_{DsbA1} mutant that is stable and crystallized in its oxidized form (Fig. 3e) exhibits a characteristic Raman band at 496 cm⁻¹ disappearing when the crystal is soaked in 50 mM dithiothreitol (DTT) before spectroscopy (Fig. 6). This band was therefore attributed unambiguously to the S–S stretching vibration in the mutant protein. This confirms that in the wt DsbA1 crystals the cysteines are not reduced during the diffraction experiment and that the wt enzyme only crystallized in its reduced form even after incubation with oxidizing agents.

Thermostability and oxidoreduction properties of the NmDsbAs

The three NmDsbAs have a similar oxidoreductase activity

The oxidoreductase activity of all three NmDsbAs was characterized *in vitro* by determining their individual abilities to reduce insulin and then compared with EcDsbA activity. The insulin reduction assay is a general assay for oxidoreductase activity and specifically measures the reductase activity of a protein. Reduction of the disulfide bonds present in insulin causes precipitation of the B chain, and the reaction can be monitored by following the increase of turbidity at 650 nm. The results show that the neisserial enzymes reduce insulin less efficiently than EcDsbA: the reaction lag time is longer (18 min) with the three neisserial

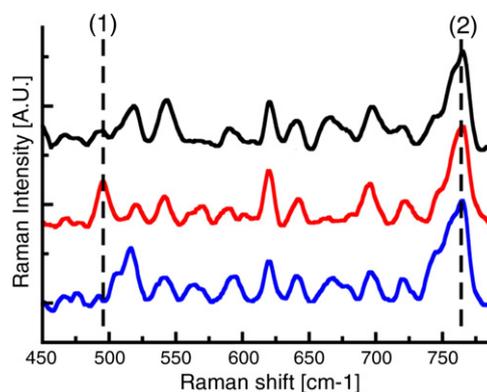


Fig. 6. Raman spectra obtained with the DsbA1 crystals. The T176V mutant reveals an S–S stretching band at 496 cm⁻¹ [peak (1), red] that disappears upon reduction with DTT (blue). This band is systematically absent in spectra recorded on crystals of wt DsbA1 previously incubated with oxidizing agents (black). The three spectra were scaled according to the tryptophan vibration band at 765 cm⁻¹ [peak (2)]. Band at 530 cm⁻¹ in the blue curve corresponds to the DTT.

Table 2. Redox properties of the neisserial DsbAs

	Insulin reductase activity [lag time (min)]	E° (mV)	T_m (°C)		ΔT_m $T_{mred} - T_{mox}$ (°C)
			Reduced	Oxidized	
<i>wt enzymes</i>					
DsbA1	18	-79	75±2	60±2	15
DsbA2	18	-79	70±2	53±2	17
DsbA3	18	-81	62±2	47±2	15
EcDsbA	12	-120	53±2	48±2	5
<i>Mutant enzymes</i>					
T176V _{DsbA1}	5	-115	73±2	73±2	0
W192A _{DsbA1}	18	-80	59±2	52±2	7
T151V _{DsbA3}	5	-112	65±2	62±2	3
F168A _{DsbA3}	18	-80	53±2	50±2	3

enzymes than with EcDsbA (12 min),⁸ which suggests that the NmDsbAs are poorly active as disulfide reductases and are therefore likely to function as oxidases in the *Neisseria* periplasm (Table 2).

NmDsbAs are more oxidizing than EcDsbA

We determined the redox properties of all three NmDsbAs by measuring their redox potentials. The intrinsic redox potentials were determined at pH 7.0 and 293 K from the equilibrium constant with glutathione using a value of -240 mV for the redox potential of the glutathione redox couple (Fig. 7a).²⁶ For different ratios of GSH and GSSG, the fraction of oxidized and reduced NmDsbAs was determined from the increase of the tryptophan fluorescence upon reduction. As for EcDsbA, a 3-fold increase in tryptophan fluorescence was observed for all three NmDsbAs upon reduction of the active-site cysteines. The data yielded an equilibrium constant of 3.7×10^{-6} M for both DsbA1 and DsbA2 and that of 4.5×10^{-6} M for DsbA3. These values translate into an intrinsic redox potential (E°) of -79 mV for DsbA1 and DsbA2 and

that of -81 mV for DsbA3 (Table 2). The redox potential determined for EcDsbA was -120 mV, consistent with other studies.²⁷⁻²⁹

pK_a of the nucleophilic cysteine

As there is generally a correlation between the redox potential and the pK_a , we also determined the pK_a of the nucleophilic residue for each enzyme. Since the thiolate ion has a higher absorption at 240 nm than the thiol group,³⁰ the pK_a of the nucleophilic cysteine (C57 in DsbA1/DsbA2 and C34 in DsbA3) was determined by monitoring UV absorption at this wavelength during pH titration. The pK_a of EcDsbA C30 was determined as a control. The nucleophilic cysteine has pK_a values of 3.0 in DsbA1 and DsbA3, 3.3 in DsbA2 and 3.7 in EcDsbA (Fig. 7b). The NmDsbAs therefore have a pK_a slightly more acidic than EcDsbA.¹⁵

The reduced forms of the NmDsbAs are more stable

The difference in stability between the oxidized and the reduced forms of an oxidoreductase is the driving force to reduce substrate proteins. The

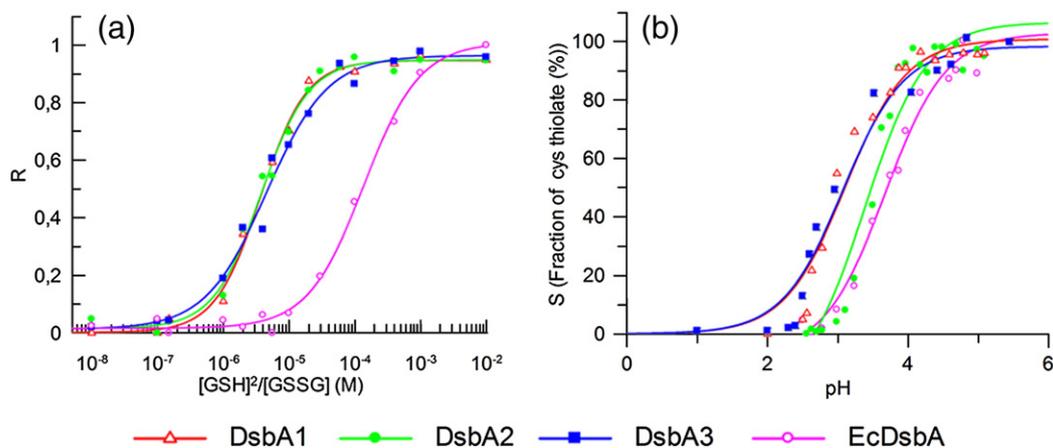


Fig. 7. Redox potential and pK_a of wt NmDsbAs and EcDsbA. (a) Redox equilibrium with glutathione. The fraction (R) of each reduced proteins at equilibrium was measured using the specific fluorescence of the proteins at 330 nm (excitation at 295 nm) (Δ , DsbA1; \bullet , DsbA2; \blacksquare , DsbA3; and \circ , EcDsbA). (b) Determination of the pK_a of the nucleophilic cysteine (C57 in DsbA1 and DsbA2, C34 in DsbA3 and C30 in EcDsbA). The pH dependence of the thiolate-specific absorbance signal $S = (A_{240}/A_{280})_{\text{reduced}} / (A_{240}/A_{280})_{\text{oxidized}}$ was fitted according to the Henderson-Hasselbalch equation (the oxidized proteins were used as a reference).

fluorescence-based thermal stability assay distinguishes folded and unfolded proteins through recognition of exposed hydrophobic areas by a dye probe.^{31,32} Thermal stability measurements were accordingly performed for the NmDsbAs and EcDsbA to assess stability of the reduced and the oxidized forms of these enzymes (Table 2). The observed melting temperature values indicate that the reduced form of each NmDsbA is more stable than the oxidized form, similar to EcDsbA. The reduced form of NmDsbAs is also more stable than the reduced form of EcDsbA. The ΔT_m calculated between the two redox states ranges between 15 and 17 °C for the NmDsbAs and is only 5 °C for EcDsbA. This indicates that the reduced form of the NmDsbAs is more stabilized compared with the oxidized form, which fits the very oxidizing character of the NmDsbAs (Table 2). This value of ΔT_m is also consistent with previous results obtained with EcDsbA by differential scanning calorimetry.³³

The three NmDsbAs are efficiently reoxidized by NmDsbB but not by EcDsbB

To be catalytically active, EcDsbA needs to be reoxidized by the inner-membrane enzyme DsbB (EcDsbB for the *E. coli* enzyme). Under aerobic conditions, EcDsbB reoxidizes EcDsbA and transfers electrons to ubiquinone.¹² In the *N. meningitidis* genome, a single gene encodes a putative homo-

logue of EcDsbB (named NmDsbB). This gene was cloned, expressed and purified to study the enzymatic reoxidation of the NmDsbAs.

To test the ability of NmDsbB or EcDsbB to oxidize the three NmDsbAs, we incubated 10 μ M concentration of each NmDsbA with different concentrations of NmDsbB or EcDsbB in the presence or absence of the Q1 quinone (Fig. 8a). The redox state of the enzymes was checked by AMS trapping.

In catalytic concentrations and in the presence of quinone, the three NmDsbAs are fully reoxidized by NmDsbB but not by EcDsbB. Conversely, under the same conditions, EcDsbA is reoxidized by EcDsbB but not by NmDsbB. However, EcDsbB can reoxidize the three NmDsbAs when stoichiometric amounts of EcDsbB are used, indicating that the reaction between the NmDsbAs and NmDsbB is more specific compared with the reaction between neisserial and *E. coli* enzymes. The oxidation reaction between DsbA and DsbB is also slower between the *N. meningitidis* enzymes (Fig. 8b).

Mutation study

Among the sequence and structural differences between the NmDsbAs and EcDsbA, two are related to important functional regions. First, in the active-site region, the VcP motif in *E. coli* is replaced by TcP in the neisserial proteins (T176 in DsbA1/DsbA2 and T151 in DsbA3). Second, the loops connecting

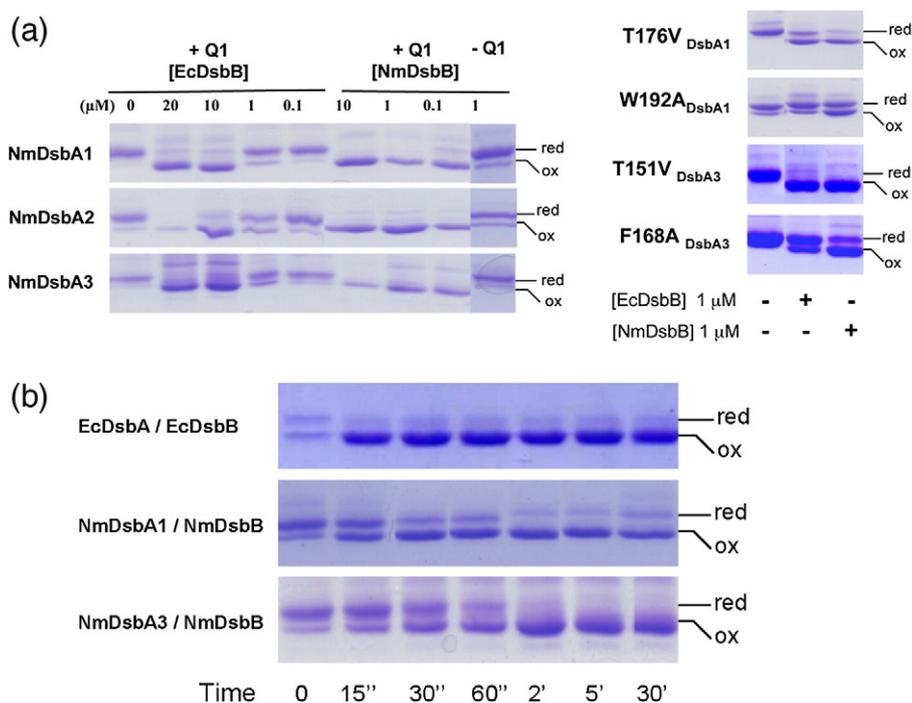


Fig. 8. Enzymatic oxidation of the NmDsbA by DsbB. (a) Interaction between wt and mutant NmDsbAs with NmDsbB or EcDsbB. AMS/gel-shift experiments were used to analyze the oxidation of 10 μ M reduced NmDsbAs, and their mutants were incubated for 1 h at room temperature with indicated concentrations of EcDsbB or NmDsbB with or without 10 μ M Q1. The spontaneous oxidation of each DsbA was assessed with a DsbB-free sample. (b) Reoxidation of DsbA by DsbB is slower between neisserial enzymes than between *E. coli* enzymes. Reduced DsbA at a concentration of 10 μ M was incubated with 1 μ M DsbB for the times indicated.

the $\beta 5$ strand to the $\alpha 7$ helix, important for the interaction with DsbB, are different in terms of sequence and conformation [Fig. 2a(1) and b(4)] in DsbA1, DsbA3 and EcDsbA. Both regions have been mutated for functional analysis for all neisserial enzymes. Our results will however focus on DsbA1 and DsbA3, as presented below.

Mutation of the *cis*-Pro loop

We replaced the neisserial TcP motif by the VcP sequence found in EcDsbA. The corresponding mutants, T176V_{DsbA1} and T151V_{DsbA3}, exhibit an improved insulin reductase activity compared with the wt proteins and EcDsbA, indicating that the threonine, present in the *cis*-Pro loop, is important for the reductase activity in this specific assay (Table 2). T176V_{DsbA1} and T151V_{DsbA3} mutants were fully oxidized at the end of the purification step without addition of oxidizing agents (Fig. 1b, lane f), suggesting that this mutation increases the stabilization of the disulfide bridge in DsbA1 and DsbA3. This hypothesis was confirmed by the crystallographic study, as the T176V_{DsbA1} mutant crystallized in its oxidized form without addition of oxidizing agent (Fig. 3e). Superimposition of the reduced wt DsbA1 and oxidized T176V_{DsbA1} mutant structures indicates an overlap between the T176 and the V176 positions. The major differences between the two models involve the presence of additional water molecules interacting with the catalytic cysteine in the oxidized enzyme and a slight rearrangement of the H59 side chain (Fig. 3e).

In comparison with the wt enzymes, the redox potential of T176V_{DsbA1} and T151V_{DsbA3} mutants decreased by 35 mV, reaching a potential equivalent to EcDsbA (Table 2).

Interestingly, for the T176V_{DsbA1} and T151V_{DsbA3} mutants, the oxidized form is as stable as the reduced form. Thus, mutation of the conserved threonine stabilizes the disulfide bridge but does not modify the stability of the reduced form (Table 2). The T176V_{DsbA1} and T151V_{DsbA3} mutants are also more easily oxidized by EcDsbB (Fig. 8a).

Mutation of the DsbB-interactive loop connecting the $\beta 5$ strand to the $\alpha 7$ helix

Two equivalent aromatic residues present at the N-terminal side of the $\alpha 7$ helix, namely W192 in DsbA1 (and DsbA2) and F168 in DsbA3, were mutated in alanine (Fig. 5a). In the wt neisserial enzymes, W192 and F168 interact by van der Waals contacts with the $\alpha 1$ helix that carries the active CXXC peptide and are present in the loop known to be involved in the interaction between EcDsbB and EcDsbA.¹³ Interestingly, the aromatic character is not conserved in EcDsbA and the conformation of this loop is clearly different between EcDsbA and DsbA1/DsbA3 crystal structures [Fig. 2b(4)]. Mutants in the DsbB-interactive loop connecting the $\beta 5$ strand to the $\alpha 7$ helix, W192A_{DsbA1} and

F168A_{DsbA3}, have a wt insulin reductase activity and are oxidized, similar to the wt enzymes (Fig. 1b, lanes f and i). The redox potential of W192A_{DsbA1} and F168A_{DsbA3} is also unaltered. As shown by the thermal shift assay, the reduced form of these two mutants is destabilized compared with the wt protein, while the stability of the oxidized form is unchanged (Table 2). The W192A_{DsbA1} and F168A_{DsbA3} mutations decreased the efficiency of the reoxidation of DsbA1 and DsbA3 by NmDsbB (Fig. 8a).

Discussion

Analysis of *N. meningitidis* genome highlighted the presence of three genes encoding thiol oxidases homologous to the well-characterized EcDsbA, namely DsbA1, DsbA2 and DsbA3.³ *In vivo* studies in *E. coli* and *N. meningitidis* have suggested a distinct role for each of these genes and enzymes.^{3,7} Thus, in *N. meningitidis*, DsbA1 and DsbA2 are clearly related to virulence and to DNA uptake and can restore bacterial growth in the presence of reducing agents in the medium in contrast to DsbA3, suggesting to the authors of these previous studies that DsbA3 might be a light oxidant, similar to DsbE.⁷ The biological role of this third gene is puzzling as no clear phenotype has so far been identified in *Neisseria*. However, genetic complementation of DsbA-deficient *E. coli* strains shows that the three enzymes have an oxidoreductase activity, interacting with different substrates.³ These complementation data have also shown that the phenotype observed depends on the number of copies of each enzyme present in the cell.^{7,22}

To advance our knowledge of these three enzymes, we have characterized the biochemical properties of each and solved the crystal structures of DsbA1 and DsbA3.

In vitro, these enzymes exhibit similar properties. The most striking feature shared by all three is their exceptional oxidizing power. With a redox potential of -80 mV, they are all more oxidizing than EcDsbA and *E. coli* DsbL, the most oxidizing members of this family described to date.^{34,35} This is also in agreement with the reduction of insulin reductase activity observed with the neisserial proteins compared with EcDsbA.⁸ The reactivity of their nucleophilic residue is however close to that of EcDsbA as the measured pK_a is acidic for all these enzymes (about 3.0 for DsbA1 and DsbA2, 3.3 for DsbA3 and 3.7 for EcDsbA). The pK_a is a key determinant of the reactivity of the nucleophilic cysteines, and previous studies have shown that a decrease in pK_a usually correlates with an increase in redox potential.^{15,30} The results described here for the neisserial enzymes fit this observation. The neisserial enzymes are more stable in their reduced form, and their *in vitro* oxidation by a non-enzymatic process is not straightforward (Fig. 1). Only the use of a strong oxidizing agent, such as H₂O₂ or a large excess of GSSG, led to almost complete oxidation of the

enzymes in solution, which was not as described for EcDsbA.³⁴ This property is not a reflection of a misfolding problem in the purified enzymes as each of them can be efficiently reoxidized by the neisserial DsbB in a 100:1 ratio (Fig. 8). The lack of success in crystallizing any of the oxidized wt proteins may indicate that the oxidized enzymes are less stable in solution, which is supported by the thermal shift assays performed in this study (Table 2). We speculate that this property is related to the extraordinary redox properties of the neisserial enzymes.

Analysis of the crystal structure of the NmDsbAs provides some clues to the extraordinary oxidizing properties of these enzymes. One major difference between EcDsbA and NmDsbAs is not the CXXC conformation itself, but the *cis*-Pro loop, conserved in the TRX domain. In the models of the reduced forms of DsbA1 and DsbA3, the T176_{DsbA1} (or T151_{DsbA3}) hydroxyl group is 3.4 Å away from the sulfur atom of the nucleophilic cysteine, making a potential hydrogen bond that may help in stabilizing the thiolate form (Fig. 3a and b). In EcDsbA, a valine found instead of this threonine is located at van der Waals distance from the nucleophilic residue (4.3 Å away in the reduced form; Fig. 3c). Interestingly, in NmDsbAs, a T176V_{DsbA1} (or T151V_{DsbA3}) mutation changes the redox properties of the neisserial enzymes. The redox potential of each T/V mutant is decreased by at least 35 mV, and the resulting values are close to the redox potential measured for EcDsbA. This single mutation favors the oxidized form of the neisserial enzymes *in vitro*. Measurement of the melting temperature indicates clearly that the thermal stability of the reduced form is unchanged by the mutation, but, in contrast, the disulfide bridge is more stable when a valine replaces the threonine. This effect is observed for DsbA1 and DsbA3. This mutation allowed crystallization and solving of the oxidized structure of DsbA1. As wt DsbA1 crystallized in the reduced form only, we do not have structural data to understand how the T/V mutation increases the stability of the disulfide bond. In the oxidized mutant DsbA1, the methyl group of the valine is actually as far from the sulfur atom as the hydroxyl group of T176_{DsbA1} in the wt reduced enzyme and the valine insertion does not disturb the active-site structure (Fig. 3e). Thus, the effect is probably due to an increase in hydrophobicity around the catalytic residue. Interestingly, a threonine is also found at this position in the more reducing *Staphylococcus aureus* DsbA (SaDsbA) (Fig. 3d). The equivalent mutation of this residue in SaDsbA does not affect the redox potential of the protein as we observed for the neisserial proteins.¹⁷ In the reduced structure of the wt SaDsbA, the equivalent threonine present in the *cis*-Pro loop is more than 4.5 Å away from the nucleophilic residue (Fig. 3), and this may explain why its mutation does not affect the redox potential. Of course, other sequence differences found within the active-site region can also dictate the redox properties of SaDsbA. From previous studies of SaDsbA and

EcDsbA, it has been postulated that this threonine is important for substrate recognition.³⁴ Here, it is shown that T176_{DsbA1} (or T151_{DsbA3}) present in the *cis*-Pro loop is important to explain the redox properties of the neisserial DsbAs and therefore for catalysis. This region affects the interaction of all NmDsbAs with EcDsbB as well. EcDsbB can indeed reoxidize the T176V_{DsbA1} (or T151V_{DsbA3}) mutants more easily than the wt NmDsbAs (Fig. 8a). Either this specific mutation enhances protein–protein interaction between the two partners or the oxidoreduction reaction is facilitated because the potential differences between the NmDsbA mutants and EcDsbB became more suitable as the redox potential of the T/V mutants has decreased by 35 mV. The redox potential of an oxidoreductase is indeed an important factor that influences its *in vivo* function and determines its catalytic efficiency toward substrate proteins. These results are in total agreement with the recent study of the V150T EcDsbA mutant.³⁶ This mutation produces an opposite effect—it increases the redox potential, leading to more oxidizing enzyme, and negatively affects the reoxidation of EcDsbA by EcDsbB.³⁶

Regarding the characterization of DsbA3, the present study shows that the third enzyme is not DsbE-like and has similar redox properties to DsbA1 and DsbA2. This reflects the complementation study performed in *E. coli*.⁷ DsbA3 differs from the other proteins in exhibiting only 50% sequence identity with the other enzymes, and its CXXC catalytic signature differs by one residue. Comparison of DsbA1 and DsbA3 crystal structures indicates that the two proteins superimpose (Fig. 2a). The main structural differences are found in relation to the orientation of the helical domain. Such a feature has been described for other DsbAs, such as *Vibrio cholerae* TcpG,³⁷ and is likely related to the different substrate specificity of each enzyme. The dipeptide sequence located between the cysteines in the active-site motif is known to be important for the redox properties of thiol–disulfide oxidoreductases,^{14,38–40} but the presence of a less canonical CXXC sequence for DsbA3 does not lead to structural rearrangement of the active site (Figs. 2 and 3) and different redox parameters (Table 2). The CVHC sequence of DsbA3 superimposes the CPHC peptide conformation of DsbA1 (and probably DsbA2) and EcDsbA. Thus, in the neisserial DsbAs, the dipeptide composition is not critical for the activity. The DsbA3 surface is rather basic, but most of the basic patches are not localized in the vicinity of the catalytic region (Fig. 4c and d). The DsbA3 model solved in this study exhibits conformational differences with DsbA3 solved in another crystal system.²² Discrepancies are observed within the active site (Fig. 5b). This supports the hypothesis that the active site of the DsbAs exhibits some structural plasticity that may have a role during the catalysis,⁶ but this structural discrepancy cannot explain the peculiar redox properties of DsbA3. The DsbA3 structure solved in the present study confirms indeed that, in its reduced state, the structure of its active site is similar

Table 3. Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence
Modification of pL-EC-DSBBGFP	
<i>Ecdsbb1</i>	tc tac aaa aag ctt gtg ccg cgc ggc agc cac cac cat cat cat cac cac
<i>Ecdsbb2</i>	gtg gtg atg atg atg gtg gtg gct gcc gcg cgg cac aag ctt ttt gta ga
NmDsbB cloning	
<i>NmDsbB1</i>	aa ctc gag atg acc ccg tta ttt aga aaa gcc
<i>NmDsbB2</i>	tt gga tcc ttt agc cct tgc cca cgc cca cgc
Directed mutagenesis	
<i>dsba1T176V_for</i>	acc ttc caa atc gac ggt gtt ccc acg gtt atc gtc ggc
<i>dsba1T176V_rev</i>	gcc gac gat aac cgt ggg aac acc gtc gat ttg gaa ggt
<i>dsba1W192A_for</i>	ggt gaa ttt gcc gac gcg gag tcc ggt atg aac
<i>dsba1W192A_rev</i>	ggt cat acc gga ctc cgc gtc ggc aaa ttc aac
<i>dsba3T151V_for</i>	caa tac ggt att gac agc gtt ccg acc gtt att gtc
<i>dsba3T151V_rev</i>	gac aat aac ggt cgg aac gct gtc aat acc gta ttg
<i>dsba3F168A_for</i>	ggt atc ttc aat aat ggc gcg gac ggc ggc gtt cat acg
<i>dsba3F168A_rev</i>	cgt atg aac gcc gcc gtc cgc gcc att att gaa gat aac

to the active-site structure described for other DsbAs (Fig. 3). This study shows that the phenotype associated with DsbA3 in *N. meningitidis* cannot be explained by a difference of redox activity. DsbA3 is indeed an oxidant as strong as DsbA1 and DsbA2, and we therefore speculate that the phenotypic differences observed between the three NmDsbAs are probably related to differences in substrate specificity and gene regulation. *N. meningitidis* is a human nasopharyngeal epithelial commensal that occasionally invades the bloodstream to cause life-threatening infection. Adaptation to these highly different environments plausibly calls for differentially regulated, efficient enzymes oxidizing different sets of substrates.

Materials and Methods

Gene cloning

The three neisserial DsbAs were cloned as previously described.⁸ *DsbB* genes from *N. meningitidis* (termed as *NmDsbB*) and *E. coli* (*EcdsB*) were fused to the green fluorescent protein (GFP) gene for expression in C41 strain *E. coli*.⁴¹ To improve the purification step, we first modified the initial *EcdsB-GFP* genetic construct⁴² (pL-GFP vector) by adding a thrombin cleavage site between the last C-terminal residue of GFP and the C-terminal His tag and then inserting two additional histidine residues to the initial 8×His sequence (oligonucleotides *Ecdsbb1* and *Ecdsbb2*; Table 3). The presence of a 10×His tag greatly improved the binding of the DsbB-GFP to the Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) beads (QIAGEN). The modified vector is called pL-EC-DSBBGFP.

dsbB-GFP from *N. meningitidis*

Analysis of the gene database highlighted the presence of one single gene homologue to *EcdsB* in *N. meningitidis* MC58 genome (Q9JYC6, namely *NmDsbB*). The *NmDsbB* gene was amplified by PCR from genomic DNA of serogroup B strain MC58 *N. meningitidis* using primers *NmDsbB1* and *NmDsbB2* (see Table 3). The amplified PCR fragment was subcloned into the Zero Blunt® TOPO® cloning vector (Invitrogen), the ends were modified by digestion by BamHI and XhoI restriction enzymes and the

product was finally ligated into the *E. coli* pL-EC-DSBBGFP expression vector previously opened by BamHI and XhoI. The resulting vector is named pL-NM-DSBBGFP. The correctness of the resulting nucleotide sequence was checked by DNA sequencing.

Site-directed mutagenesis

Mutagenesis of the *N. meningitidis dsbA3* and *dsbA1* genes was performed using a Stratagene QuickChange mutagenesis kit. Primers carrying the specific mutations are listed in Table 3. The plasmids used for the expression of wt DsbA1 and DsbA3 were used as the template for the mutagenesis reaction. Incorporation of the desired mutations was confirmed by DNA sequencing.

Protein purification

EcDsbA and the NmDsbA proteins were purified according to previously published protocols.^{6,8} The mutant enzymes were overexpressed, purified and biochemically characterized as described for the wt proteins.⁸ The poly-His tag of NmDsbB-GFP, EcDsbB-GFP and NmDsbAs was kept for biophysical and biochemical assays.

NmDsbB-GFP and *EcDsbB-GFP* purification

Twenty milliliters of an overnight culture of *E. coli* C41 derivatives containing pL-EC-DSBBGFP or pL-NM-DSBBGFP plasmid was used to inoculate 1 l of LB medium supplemented with 25 µg/ml of kanamycin. At an optical density at 600 nm of approximately 0.6, the temperature was switched to 293 K and overexpression of the membrane proteins was induced by the addition of 1 mM IPTG. After 12 h, cells were spun down at 4600 rpm for 20 min, resuspended in 35 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, supplemented by a cocktail of anti-proteases [ROCHE, complete EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) free] and broken by the French press method. Membranes were isolated after centrifugation of this suspension at 40,000 rpm for 45 min at 278 K. The membrane pellet was washed several times in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and finally resuspended in 10 ml of the same buffer. At this stage, the total membrane protein concentration was measured using a BCA Protein Assay kit (Pierce, IL).

Membranes were then solubilized by adding 1.2 mg of *N*-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) per milligram of protein,

and the mixture was kept on ice for 1 h. After removal of insoluble materials by centrifugation at 40,000 rpm for 30 min, the resulting supernatant was mixed overnight with 5 ml of a suspension of Ni-NTA resin (QIAGEN) preequilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM imidazole and 0.016% (w/v) DDM. The resin was then loaded onto a column and washed extensively with the same buffer. DsbB-GFP was then eluted with 40 ml of 300 mM imidazole, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 0.016% (w/v) DDM, concentrated by ultrafiltration (Amicon device, 10,000-Da cutoff) and loaded onto a PD10 column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 0.016% DDM. The amounts of purified NmDsbB-GFP and EcDsbB-GFP fusions were measured using UV spectrometry assuming molar absorption coefficients at 280 nm of 79,465 and 70,820 M⁻¹ cm⁻¹, respectively.

Both *N. meningitidis* and *E. coli* DsbB-GFP were expressed and purified according to the same protocol. However, for NmDsbB-GFP, all the buffers were supplemented by 300 mM NaCl and, to improve the protein binding to the Ni-NTA resin, we did not add imidazole to the buffer prior to protein elution. The final yields of EcDsbB-GFP and NmDsbB-GFP were 220 and 73 nmol per liter of LB medium, respectively.

Insulin disulfide reduction assay

The ability of EcDsbA and NmDsbAs to catalyze insulin reduction in the presence of DTT was determined as previously described.⁸ Briefly, reaction mixtures (0.2 ml) were prepared in cuvettes containing 150 μM insulin and 10 μM concentration of EcDsbA or NmDsbAs in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 2 mM EDTA. Reactions were started by adding DTT to a final concentration of 1 mM. After thorough mixing, the optical density at 650 nm was recorded every 30 s. The non-catalyzed reduction of insulin by DTT was monitored in a control reaction without addition of catalyst.

Determination of the protein redox state by AMS/gel-shift experiments

The redox state of each enzyme was followed by alkylation of free thiol groups by 4-acetamido-4'-maleimidyldistilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS Molecular Probes, Eugene, OR) essentially as described previously.^{43,44} AMS reacts covalently with free thiol groups, resulting in a molecular mass increase of 490 Da. A 100-μl sample of each enzyme concentrated at 2 μM was precipitated by 10% trichloroacetic acid, incubated for 15 min on ice and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The resulting pellet was then washed with acetone and resuspended in 30 μl of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM AMS, 0.1% SDS and 10 mM EDTA. The sample was then analyzed by 15% SDS-PAGE electrophoresis gel under non-reducing conditions and stained with Coomassie Blue. Mass spectrometry analysis confirmed the alkylation of the two cysteines in these conditions.

Oxidation and reduction of the neisserial enzymes

NmDsbAs and EcDsbA were reduced by incubation with 10 mM DTT for 1 h at room temperature. For the oxidation of NmDsbAs, the proteins were incubated with either 100 mM GSSG for 1 h at 310 K or 40 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 30 min at 277 K. The excesses of DTT,

GSSG and H₂O₂ were then removed by gel-filtration column (NAP-5, GE Healthcare) equilibrated with the appropriate buffer. The thiol content was measured using the Ellman assay.⁴⁵ The redox state of each DsbA enzyme was determined by AMS/gel-shift experiments.

Determination of the redox potential by equilibration against glutathione

The redox potentials were determined by fluorimetry (SLM-Aminco 8000C spectrofluorometer) by measuring the equilibrium constant between NmDsbAs (or EcDsbA as a control) and glutathione as described previously.²⁹ A 1 μM concentration of NmDsbAs or EcDsbA was first oxidized with a large excess of GSSG (100 mM) as described above. Oxidized protein was incubated for 12 h at 293 K under a nitrogen atmosphere with 0.1 mM GSSG mixed with different concentrations of GSH (0.2 μM to 1 mM) in 100 mM sodium phosphate, pH 7.0, and 1 mM EDTA. The relative amount of reduced NmDsbAs and EcDsbA at equilibrium (*R*) was measured using the specific fluorescence at 330 nm (excitation at 295 nm). DsbA proteins show an increase in fluorescence intensity at 330 nm after full reduction of the oxidized form.^{34,46} The equilibrium constant (*K*_{eq}) was determined by fitting the data to the following equation:

$$R = \left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \right) / \left(K_{\text{eq}} + \left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \right) \right). \quad (1)$$

The redox potential was calculated using the Nernst equation (see Eq. (2)) and a value of -240 mV as the standard redox potential of glutathione.³⁴

$$E^{\circ'}_{\text{DsbA}} = E^{\circ'}_{\text{GSH/GSSG}} - (RT/2F) \ln K_{\text{eq}} \quad (2)$$

Thermal shift assay

NmDsbAs and EcDsbA were first reduced with DTT or oxidized with H₂O₂ as described above. TSA experiments were carried out using an IQ5 96-well-format real-time PCR instrument (Bio-Rad) as previously described.³¹ Briefly, 120 μM concentration of each DsbA under its oxidized or reduced state in 10 mM Hepes at pH 7.0 (complemented with 500 mM NaCl for DsbA3) was mixed with 2 μl of 5000X Sypro Orange (Molecular Probes) diluted 100 times in water. Samples were heat denatured from 293 to 398 K at a rate of 1 K per minute. Protein thermal unfolding curves were monitored by detection of changes in fluorescence of the Sypro Orange. The inflection point of the fluorescence *versus* temperature curves was identified by plotting the first derivative over the temperature, and the minima were referred to the melting temperatures (*T*_m).

Determination of the p*K*_a of the nucleophilic cysteine by thiolate absorption measurements

The pH-dependent ionization of the nucleophilic cysteine thiol was followed by the specific absorbance of the thiolate anion at 240 nm.³⁰ As a reference, the pH-dependent absorbance for the oxidized form of the protein was monitored. All measurements were carried out at 298 K in buffer consisting of 10 mM K₂HPO₄, 10 mM boric acid, 10 mM sodium succinate, 1 mM EDTA, 200 mM KCl, pH 7.5, and an average initial protein concentration of 20 μM. The oxidized and reduced protein samples were

prepared as described above. The pH of the protein solution was lowered to 2.2 stepwise by the addition of aliquots of 0.2 or 0.1 M HCl. The absorbance at 240 and 280 nm was recorded on a Cary 50BIO UV-visible spectrophotometer and corrected for the volume increase. The pH dependence of the thiolate-specific absorbance signal [$S = (A_{240}/A_{280})_{\text{reduced}} / (A_{240}/A_{280})_{\text{oxidized}}$] was fitted according to the Henderson–Hasselbalch equation:

$$A_{\text{exp}} = A_{\text{SH}} + \left((A_{\text{S}^-} - A_{\text{SH}}) / (1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})}) \right)$$

in which $A_{\text{exp}} = A_{240}/A_{280}$ stands for the experimentally determined value, A_{SH} is the A_{240}/A_{280} value for the protonated form and A_{S^-} is the A_{240}/A_{280} value for the deprotonated form.

Reoxidation of each neisserial DsbA by DsbB from *E. coli* or *N. meningitidis*

The ability of EcDsbB and NmDsbB to reoxidize the NmDsbAs was investigated by monitoring the DsbA redox state with AMS trapping and protein analysis on SDS–PAGE (15%). As control, the reoxidation of EcDsbA by EcDsbB and NmDsbB was also studied. A total of 10 μM concentration of each freshly reduced DsbA was incubated with various concentrations of EcDsbB or NmDsbB at 293 K in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.1% DDM in the presence or absence of 10 μM UQ-1 (coenzyme Q1; Sigma). To follow the rate of the reaction, we incubated 10 μM NmDsbAs with 1 μM NmDsbB in the presence of 10 μM Q1, and the reaction stopped at different times (0 s, 15 s, 30 s, 1 min, 5 min and 30 min). In parallel, the same experiment was carried out between EcDsbA and EcDsbB, as control. At different reaction times, the DsbA redox state was determined by AMS trapping.⁴⁷

Crystallographic study

All native diffraction data were collected at the ESRF according to the protocol described previously.⁸ Prior to refinement, 5% of the diffraction data were set aside to monitor refinement progress with the R_{free} factor for each data set.

Crystal structure of DsbA1

Native DsbA1 crystals were soaked in 1.4 M trisodium citrate and 5 mM $\text{Au}(\text{CN})_2$ for 2 h. Prior to diffraction experiments, the heavy-atom derivative crystals were flash frozen in liquid nitrogen. MAD data were collected around the Au edge at 100 K on the BM30 beamline (ESRF, France) and allowed solution of the crystal structure of DsbA1 by the MAD method. Heavy-atom derivative data were integrated and reduced by XDS.⁴⁸ Four gold atom positions were determined by Solve⁴⁹ and Shake-and-Bake⁵⁰ as well. These positions were used for the initial phasing and further electron density modifications (SHARP⁵¹). Of 193 residues, 165 were built automatically by ARP/wARP.⁵² The missing residues were added during the refinement steps performed by REFMAC⁵³ with native data previously collected on BM30 ranging from 20- to 1.5-Å resolution. Solvent molecules and double conformations were also included in the model. Final R -factor and R_{free} values are 0.18 and 0.21, respectively, for all the data between 20- and 1.5-Å resolution. Complete statistics are presented in Table 1.

Crystal structure of DsbA3

The crystal structure of DsbA3 was solved by molecular replacement using the reduced DsbA1 coordinate set as the research model and diffraction data between 20- and 3.5-Å resolution (MOLREP⁵⁴). Two monomers were located in the asymmetric unit, leading to a starting R -factor and a correlation coefficient of 0.494 and 0.364, respectively. All mutations and insertions were introduced in the electron density map calculated with the resulting phases.⁵⁵ First steps of the refinement of the structure were performed by CNS.⁵⁶ After the introduction of the correct primary sequence using COOT,⁵⁷ the whole model was submitted to a cycle of simulated annealing (2500 K) and a first cycle of energy minimization combined to a B-group refinement keeping a tight non-crystallographic symmetry restraint. Water molecules were modeled at this stage. The final steps of the refinement were carried out with REFMAC.⁵³ The non-crystallographic symmetry restraint was loosened at the end of the refinement. Four sulfate ions were included in the model. The final R -factor and R_{free} are 0.22 and 0.287, respectively, for all the data between 20- and 2.8-Å resolution. Statistics are presented in Table 1.

Crystal structure of the T176V DsbA1 mutant

Crystals of T176V_{DsbA1} grew under the conditions reported for the wt DsbA1 and under the same crystal system (Table 1). After a rigid-body refinement cycle performed with the wt model of DsbA1 (REFMAC) against the mutant diffraction data, the resulting ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) Fourier map clearly revealed the presence of a disulfide bond between the sulfur atoms of C57 and C60 and additional water molecules within the active-site region. The mutant model was further refined using REFMAC. The final R -factor and R_{free} are 0.19 and 0.23, respectively, for all the data between 44 and 1.45 Å resolution. Complete statistics are presented in Table 1.

Raman spectroscopy

The Raman data were obtained at the ESRF Cryobench Laboratory on a Raman microspectrophotometer dedicated for biological crystals.⁵⁸ The spectrograph is an InVia system manufactured by Renishaw (Gloucestershire, United Kingdom) that covers mainly the internal vibration modes observable in macromolecules. The excitation light is a 50-mW near-infrared laser source at 785 nm, chosen for reducing the fluorescence emission of biological samples, and the optics operate in the back-scattering geometry with a selected focal spot of 20- μm diameter fitting with crystal sizes. Crystals were mounted in spine standard loop and cryo-cooled at 100 K for Raman data collection. Each full Raman spectrum (200–2000 cm^{-1}) required a total exposure time of 20 min to obtain a good signal-to-noise ratio. The spectra were displayed in the restricted range of interest, running from 450 to 800 cm^{-1} . Baseline correction, data smoothing and cosmic ray removal were carried out using the software Wire2 developed by Renishaw. Scaling of the different spectra was based on the strong tryptophan band at 765 cm^{-1} (peak 2 in Fig. 6). Each Raman spectrum was recorded three times using three crystals prepared under the same conditions.

Accession codes

The diffraction and coordinate data sets described in this study have been deposited in the Research Collaboratory

for Structural Bioinformatics database under accession codes 3DVW, 3DVX and 3HZ8 for DsbA1, DsbA3 and T176V DsbA1 mutant, respectively.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Commissariat à l'Energie Atomique. C.L. is a recipient of a CEA PhD student fellowship. J.-F.C. is «Chercheur Qualifié» of the Belgian FNRS. J.S.K. is supported by the Livanos Trust. We thank the High-Throughput Crystallization Platform of the Partnership for Structural Biology (Grenoble). We are also very grateful to the ESRF (Grenoble, France) for providing us with access to the MX and the BM30/FIP beamlines.

References

- Heras, B., Shouldice, S. R., Totsika, M., Scanlon, M. J., Schembri, M. A. & Martin, J. L. (2009). DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 215–225.
- Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell*, **67**, 581–589.
- Tinsley, C. R., Voulhoux, R., Beretti, J. L., Tommassen, J. & Nassif, X. (2004). Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J. Biol. Chem.* **279**, 27078–27087.
- Sinha, S., Ambur, O. H., Langford, P. R., TØnjum, T. & Kroll, J. S. (2008). Reduced DNA binding and uptake in the absence of DsbA1 and DsbA2 of *Neisseria meningitidis* due to inefficient folding of the outer-membrane secretin PilQ. *Microbiology*, **154**, 217–225.
- Martin, J. L., Bardwell, J. C. A. & Kuriyan, J. (1993). Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature*, **365**, 464–468.
- Ondo-Mbele, E., Vivès, C., Koné, A. & Serre, L. (2005). Intriguing conformation changes associated with the *trans/cis* isomerization of a prolyl residue in the active site of the DsbA C33A mutant. *J. Mol. Biol.* **347**, 555–563.
- Sinha, S., Langford, P. R. & Kroll, J. S. (2004). Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, **150**, 2993–3000.
- Lafaye, C., Iwema, T., Ferrer, J.-L., Kroll, J. S., Griat, M. & Serre, L. (2008). Preliminary crystallographic data of the three homologues of the thiol–disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 111–114.
- CCP4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **50**, 157–163.
- DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA.
- Martin, J. L. (1995). Thioredoxin: a fold for all reasons. *Structure*, **3**, 245–250.
- Inaba, K., Takahashi, Y., Ito, K. & Hayashi, S. (2006). Critical role of a thiolate–quinone charge transfer complex and its adduct form in *de novo* disulfide bond generation by DsbB. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 287–292.
- Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. & Ito, K. (2006). Crystal structure of the DsbB–DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, **127**, 789–801.
- Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1998). A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family. *Folding Des.* **3**, 161–171.
- Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. & Bardwell, J. C. A. (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell*, **83**, 947–955.
- Guddat, L. W., Bardwell, J. C. & Martin, J. L. (1998). Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure*, **6**, 757–767.
- Heras, B., Kurz, M., Jarrott, R., Shouldice, S. R., Frei, P., Robin, G. *et al.* (2008). *Staphylococcus aureus* DsbA does not have a destabilizing disulfide: a new paradigm for bacterial oxidative folding. *J. Biol. Chem.* **283**, 4261–4271.
- Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J. C. A. & Beckwith, J. (2004). Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science*, **303**, 534–537.
- Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. P., Kuszewski, J. & Gronenborn, A. M. (1996). The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure*, **15**, 613–620.
- Charbonnier, J. B., Belin, P., Moutiez, M., Stura, E. A. & Quemeneur, E. (1999). On the role of the *cis*-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Sci.* **8**, 96–105.
- Baker, N., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. & McCammon, J. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 10037–10041.
- Vivian, J. P., Scoullar, J., Robertson, A. L., Bottomley, S.P., Horne, J., Chin, Y. *et al.* (2008). Structural and biochemical characterization of the oxidoreductase NmDsbA3 from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 32452–32461.
- Messens, J. & Collet, J. F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1050–1062.
- Roberts, B. R., Wood, Z. A., Jönsson, T. J., Poole, L. B. & Karplus, P. A. (2005). Oxidized and synchrotron cleaved structures of the disulfide redox center in the N-terminal domain of *Salmonella typhimurium* AhpF. *Protein Sci.* **14**, 2414–2420.
- Sugeta, H. (1975). Normal vibrations and molecular conformations of dialkyl disulfides. *Spectrochim. Acta, Part A*, **31**, 1729–1737.
- Roos, G., Garcia-Pino, A., Van Belle, K., Brosens, E., Wahni, K., Vandenbussche, G. *et al.* (2007). The conserved active site proline determines the reducing power of *Staphylococcus aureus* thioredoxin. *J. Mol. Biol.* **368**, 800–811.
- Zapun, A., Bardwell, J. C. & Creighton, T. E. (1993). The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry*, **32**, 5083–5092.
- Wunderlich, M., Jaenicke, R. & Glockshuber, R. (1993). The redox properties of protein disulfide isomerase

- (DsbA) of *Escherichia coli* result from a tense conformation of its oxidized form. *J. Mol. Biol.* **233**, 559–566.
29. Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993). Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **2**, 717–726.
 30. Nelson, J. W. & Creighton, T. E. (1994). Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry*, **33**, 5974–5983.
 31. Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E. *et al.* (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screening*, **6**, 429–440.
 32. Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., Detitta, G. T., Dekker, N. & Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* **357**, 289–298.
 33. Moutiez, M., Burova, T. V., Haertle, T. & Quemeneur, E. (1999). On the non-respect of the thermodynamic cycle by DsbA variants. *Protein Sci.* **8**, 106–112.
 34. Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993). Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **2**, 717–726.
 35. Grimshaw, J. P., Stirnimann, C. U., Brozzo, M. S., Malojcic, G., Grutter, M. G., Capitani, G. & Glockshuber, R. (2008). DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **380**, 667–680.
 36. Ren, G., Stephan, D., Xu, Z., Zheng, Y., Tang, D., Harrison, R. S. *et al.* (2009). Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* **284**, 10150–10159.
 37. Hu, S.-H., Peek, J. A., Rattigan, E., Taylor, R. K. & Martin, J. L. (1997). Structure of TcpG, the DsbA protein folding catalyst from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* **268**, 137–146.
 38. Mössner, E., Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1998). Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.* **7**, 1233–1244.
 39. Chivers, P. T., Prehoda, K. E. & Raines, R. T. (1997). The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry*, **36**, 4061–4066.
 40. Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Von Hacht, A. & Bardwell, J. C. A. (2007). The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J. Biol. Chem.* **282**, 28823–28833.
 41. Miroux, B. & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298.
 42. Drew, D. E., von Heijne, G., Nordlund, P. & de Gier, J. W. (2001). Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **507**, 220–224.
 43. Jakob, U., Muse, W., Eser, M. & Bardwell, J. C. A. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, **96**, 341–352.
 44. Zander, T., Phadke, N. D. & Bardwell, J. C. (1998). Disulfide bond catalysts in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **290**, 59–74.
 45. Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77.
 46. Hennecke, J., Sillen, A., Huber-Wunderlich, M., Engelborghs, Y. & Glockshuber, R. (1997). Quenching of tryptophan fluorescence by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **36**, 6391–6400.
 47. Regeimbal, J. & Bardwell, J. C. A. (2002). DsbB catalyzes disulfide bond formation *de novo*. *J. Biol. Chem.* **277**, 32706–32713.
 48. Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800.
 49. Termilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **55**, 849–861.
 50. Miller, R., Gallo, S. M., Khalak, H. G. & Weeks, C. M. (1994). *SnB*: crystal structure determination via Shake-and-Bake. *J. Appl. Crystallogr.* **27**, 613–621.
 51. De la Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood parameter refinement program for MIR and MAD phasing. *Methods Enzymol.* **276**, 472–494.
 52. Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458–463.
 53. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255.
 54. Vagin, A. & Teplyakov, A. (2000). An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **56**, 1622–1624.
 55. Read, R. J. (1986). Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with error. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **42**, 140–149.
 56. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography & NMR System: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921.
 57. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
 58. Carpentier, P., Royant, A., Ohana, J. & Bourgeois, D. (2007). Advances in spectroscopic methods for biological crystals: Raman spectroscopy. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 1113–1122.

Références Bibliographiques

Aslund, F., K. D. Berndt and A. Holmgren (1997). "Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria." J Biol Chem **272**(49): 30780-6.

Aslund, F., B. Ehn, A. Miranda-Vizueté, C. Pueyo and A. Holmgren (1994). "Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9813-7.

Bader, M., W. Muse, D. P. Ballou, C. Gassner and J. C. Bardwell (1999). "Oxidative protein folding is driven by the electron transport system." Cell **98**(2): 217-27.

Bader, M. W., T. Xie, C. A. Yu and J. C. Bardwell (2000). "Disulfide bonds are generated by quinone reduction." J Biol Chem **275**(34): 26082-8.

Baker, N. A., D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst and J. A. McCammon (2001). "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10037-41.

Bardwell, J. C., J. O. Lee, G. Jander, N. Martin, D. Belin and J. Beckwith (1993). "A pathway for disulfide bond formation in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1038-42.

Bardwell, J. C., K. McGovern and J. Beckwith (1991). "Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo." Cell **67**(3): 581-9.

Bessette, P. H., J. Qiu, J. C. Bardwell, J. R. Swartz and G. Georgiou (2001). "Effect of sequences of the active-site dipeptides of DsbA and DsbC on in vivo folding of multidisulfide proteins in *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(3): 980-989.

Blundell, T. L. and L. N. Johnson (1976). "Protein crystallography." Academic Press, New York.

Bowden, G. A. and G. Georgiou (1988). "The Effects of sugars on β -lactamase aggregation in *Escherichia coli*." Biotechnol. Prog. **4**: 97-101.

Bowden, G. A. and G. Georgiou (1990). "Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*." J Biol Chem **265**(28): 16760-6.

Braun, P., C. Ockhuijsen, E. Eppens, M. Koster, W. Bitter and J. Tommassen (2001). "Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Formation of the disulfide bonds." J Biol Chem **276**(28): 26030-5.

Brickman, E. and J. Beckwith (1975). "Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and ϕ 80 transducing phages." J Mol Biol **96**(2): 307-16.

Bringer, M. A., N. Rolhion, A. L. Glasser and A. Darfeuille-Michaud (2007). "The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing." J Bacteriol **189**(13): 4860-71.

- Bryk, R., C. D. Lima, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and C. Nathan (2002). "Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein." Science **295**(5557): 1073-7.
- Burall, L. S., J. M. Harro, X. Li, C. V. Lockett, S. D. Himpsl, J. R. Hebel, D. E. Johnson and H. L. Mobley (2004). "Proteus mirabilis genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold." Infect Immun **72**(5): 2922-38.
- Carmel-Harel, O. and G. Storz (2000). "Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the Escherichia coli and saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress." Annu Rev Microbiol **54**: 439-61.
- CCP4 (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **50**(Pt 5): 760-3.
- Charbonnier, J. B., P. Belin, M. Moutiez, E. A. Stura and E. Quemeneur (1999). "On the role of the cis-proline residue in the active site of DsbA." Protein Sci **8**(1): 96-105.
- Chen, J., J. L. Song, S. Zhang, Y. Wang, D. F. Cui and C. C. Wang (1999). "Chaperone activity of DsbC." J Biol Chem **274**(28): 19601-5.
- Chivers, P. T., M. C. Laboissiere and R. T. Raines (1996). "The CXXC motif: imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell." Embo J **15**(11): 2659-67.
- Chivers, P. T., K. E. Prehoda and R. T. Raines (1997). "The CXXC motif: a rheostat in the active site." Biochemistry **36**(14): 4061-6.
- Collet, J. F. and J. C. Bardwell (2002a). "Oxidative protein folding in bacteria." Mol Microbiol **44**(1): 1-8.
- Collet, J. F., J. Riemer, M. W. Bader and J. C. Bardwell (2002b). "Reconstitution of a disulfide isomerization system." J Biol Chem **277**(30): 26886-92.
- Coulthurst, S. J., K. S. Lilley, P. E. Hedley, H. Liu, I. K. Toth and G. P. Salmond (2008). "DsbA plays a critical and multifaceted role in the production of secreted virulence factors by the phytopathogen Erwinia carotovora subsp. atroseptica." J Biol Chem **283**(35): 23739-53.
- Couprie, J., F. Vinci, C. Dugave, E. Quemeneur and M. Moutiez (2000). "Investigation of the DsbA mechanism through the synthesis and analysis of an irreversible enzyme-ligand complex." Biochemistry **39**(22): 6732-42.
- Dailey, F. E. and H. C. Berg (1993). "Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1043-7.
- Darby, N. J., S. Raina and T. E. Creighton (1998). "Contributions of substrate binding to the catalytic activity of DsbC." Biochemistry **37**(3): 783-91.

- De La Fortelle, E. and G. Bricogne (1997). "Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods." Methods Enzymol. **276**: 472-494.
- Debarbieux, L. and J. Beckwith (1998). "The reductive enzyme thioredoxin 1 acts as an oxidant when it is exported to the Escherichia coli periplasm." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10751-6.
- Debarbieux, L. and J. Beckwith (2000). "On the functional interchangeability, oxidant versus reductant, of members of the thioredoxin superfamily." J Bacteriol **182**(3): 723-7.
- Drew, D. E., G. von Heijne, P. Nordlund and J. W. de Gier (2001). "Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in Escherichia coli." FEBS Lett **507**(2): 220-4.
- Dutton, R. J., D. Boyd, M. Berkmen and J. Beckwith (2008). "Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(33): 11933-8.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." Arch Biochem Biophys **82**(1): 70-7.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallographica Section D **60**(12 Part 1): 2126-2132.
- Ericsson, U. B., B. M. Hallberg, G. T. Detitta, N. Dekker and P. Nordlund (2006). "Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies." Anal Biochem **357**(2): 289-98.
- Evans, P. R. (1993). "Proceedings of CCP4 Study Weekend." Data Collection & Processing: 114-122
- Freedman, R. B. (1991). "Protein disulfide isomerase. In: Nall, B.T. and Dill, K.A., Editors. Conformation and Forces in Protein Folding, American Association for the Advancement of Science, Washington, DC." 204-214.
- Freedman, R. B., N. J. Bulleid, H. C. Hawkins and J. L. Paver (1989). "Role of protein disulphide-isomerase in the expression of native proteins." Biochem Soc Symp **55**: 167-92.
- Froshauer, S., G. N. Green, D. Boyd, K. McGovern and J. Beckwith (1988). "Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of Escherichia coli." J Mol Biol **200**(3): 501-11.
- Geerlof, A., J. Brown, B. Coutard, M. P. Egloff, F. J. Enguita, M. J. Fogg, R. J. Gilbert, M. R. Groves, A. Haouz, J. E. Nettleship, P. Nordlund, R. J. Owens, M. Ruff, S. Sainsbury, D. I. Svergun and M. Wilmanns (2006). "The impact of protein characterization in structural proteomics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 10): 1125-36.
- Gouet, P., E. Courcelle, D. I. Stuart and F. Metz (1999). "ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript." Bioinformatics **15**(4): 305-8.

- Grauschopf, U., J. R. Winther, P. Korber, T. Zander, P. Dallinger and J. C. Bardwell (1995). "Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst?" Cell **83**(6): 947-55.
- Grimshaw, J. P., C. U. Stirnimann, M. S. Brozzo, G. Malojcic, M. G. Grutter, G. Capitani and R. Glockshuber (2008). "DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*." J Mol Biol **380**(4): 667-80.
- Guddat, L. W., J. C. Bardwell, R. Glockshuber, M. Huber-Wunderlich, T. Zander and J. L. Martin (1997a). "Structural analysis of three His32 mutants of DsbA: support for an electrostatic role of His32 in DsbA stability." Protein Sci **6**(9): 1893-900.
- Guddat, L. W., J. C. Bardwell and J. L. Martin (1998). "Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization." Structure **6**(6): 757-67.
- Guddat, L. W., J. C. Bardwell, T. Zander and J. L. Martin (1997b). "The uncharged surface features surrounding the active site of *Escherichia coli* DsbA are conserved and are implicated in peptide binding." Protein Sci **6**(6): 1148-56.
- Ha, U. H., Y. Wang and S. Jin (2003). "DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors." Infect Immun **71**(3): 1590-5.
- Haebel, P. W., D. Goldstone, F. Katzen, J. Beckwith and P. Metcalf (2002). "The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: crystal structure of the DsbC-DsbD α complex." Embo J **21**(18): 4774-84.
- Hammerschmidt, S., R. Hilse, J. P. van Putten, R. Gerardy-Schahn, A. Unkmeir and M. Frosch (1996). "Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element." Embo J **15**(1): 192-8.
- Hennecke, J., A. Sillen, M. Huber-Wunderlich, Y. Engelborghs and R. Glockshuber (1997). "Quenching of tryptophan fluorescence by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from *Escherichia coli*." Biochemistry **36**(21): 6391-400.
- Heras, B., M. Kurz, R. Jarrott, S. R. Shouldice, P. Frei, G. Robin, M. Cemazar, L. Thony-Meyer, R. Glockshuber and J. L. Martin (2008). "Staphylococcus aureus DsbA does not have a destabilizing disulfide. A new paradigm for bacterial oxidative folding." J Biol Chem **283**(7): 4261-71.
- Heras, B., M. Kurz, S. R. Shouldice and J. L. Martin (2007). "The name's bond.....disulfide bond." Curr Opin Struct Biol **17**(6): 691-8.
- Heras, B., S. R. Shouldice, M. Totsika, M. J. Scanlon, M. A. Schembri and J. L. Martin (2009). "DSB proteins and bacterial pathogenicity." Nat Rev Microbiol **7**(3): 215-25.
- Hiniker, A. and J. C. Bardwell (2004). "In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases." J Biol Chem **279**(13): 12967-73.

- Hiniker, A., G. Ren, B. Heras, Y. Zheng, S. Laurinec, R. W. Jobson, J. A. Stuckey, J. L. Martin and J. C. Bardwell (2007). "Laboratory evolution of one disulfide isomerase to resemble another." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(28): 11670-5.
- Holmgren, A. (1979). "Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide." J Biol Chem **254**(19): 9627-32.
- Holmgren, A. (1988). "Thioredoxin and glutaredoxin: small multi-functional redox proteins with active-site disulphide bonds." Biochem Soc Trans **16**(2): 95-6.
- Holmgren, A. (1989). "Thioredoxin and glutaredoxin systems." J Biol Chem **264**(24): 13963-6.
- Horne, J., E. J. d'Auvergne, M. Coles, T. Velkov, Y. Chin, W. N. Charman, R. Prankerd, P. R. Gooley and M. J. Scanlon (2007). "Probing the flexibility of the DsbA oxidoreductase from *Vibrio cholerae*--a 15N - 1H heteronuclear NMR relaxation analysis of oxidized and reduced forms of DsbA." J Mol Biol **371**(3): 703-16.
- Hu, S. H., J. A. Peek, E. Rattigan, R. K. Taylor and J. L. Martin (1997). "Structure of TcpG, the DsbA protein folding catalyst from *Vibrio cholerae*." J Mol Biol **268**(1): 137-46.
- Huber-Wunderlich, M. and R. Glockshuber (1998). "A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family." Fold Des **3**(3): 161-71.
- Hwang, C., A. J. Sinskey and H. F. Lodish (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." Science **257**(5076): 1496-502.
- Inaba, K. and K. Ito (2002). "Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade." Embo J **21**(11): 2646-54.
- Inaba, K., S. Murakami, A. Nakagawa, H. Iida, M. Kinjo, K. Ito and M. Suzuki (2009). "Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB." Embo J **28**(6): 779-91.
- Inaba, K., S. Murakami, M. Suzuki, A. Nakagawa, E. Yamashita, K. Okada and K. Ito (2006a). "Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation." Cell **127**(4): 789-801.
- Inaba, K., Y. H. Takahashi, N. Fujieda, K. Kano, H. Miyoshi and K. Ito (2004). "DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation." J Biol Chem **279**(8): 6761-8.
- Inaba, K., Y. H. Takahashi, K. Ito and S. Hayashi (2006b). "Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in de novo disulfide bond generation by DsbB." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(2): 287-92.
- Ito, K. and K. Inaba (2008). "The disulfide bond formation (Dsb) system." Curr Opin Struct Biol **18**(4): 450-8.

- Jackson, M. W. and G. V. Plano (1999). "DsbA is required for stable expression of outer membrane protein YscC and for efficient Yop secretion in *Yersinia pestis*." J Bacteriol **181**(16): 5126-30.
- Jakob, U., W. Muse, M. Eser and J. C. Bardwell (1999). "Chaperone activity with a redox switch." Cell **96**(3): 341-52.
- Jander, G., N. L. Martin and J. Beckwith (1994). "Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation." Embo J **13**(21): 5121-7.
- Jonda, S., M. Huber-Wunderlich, R. Glockshuber and E. Mossner (1999). "Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm." Embo J **18**(12): 3271-81.
- Jones, G. R., M. Christodoulides, J. L. Brooks, A. R. Miller, K. A. Cartwright and J. E. Heckels (1998). "Dynamics of carriage of *Neisseria meningitidis* in a group of military recruits: subtype stability and specificity of the immune response following colonization." J Infect Dis **178**(2): 451-9.
- Jordan, A. and P. Reichard (1998). "Ribonucleotide reductases." Annu Rev Biochem **67**: 71-98.
- Kabsch, W. (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." Journal of Applied Crystallography **26**(6): 795-800.
- Kadokura, H. and J. Beckwith (2002). "Four cysteines of the membrane protein DsbB act in concert to oxidize its substrate DsbA." Embo J **21**(10): 2354-63.
- Kadokura, H., F. Katzen and J. Beckwith (2003). "Protein disulfide bond formation in prokaryotes." Annu Rev Biochem **72**: 111-35.
- Kadokura, H., H. Tian, T. Zander, J. C. Bardwell and J. Beckwith (2004). "Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding." Science **303**(5657): 534-7.
- Kamitani, S., Y. Akiyama and K. Ito (1992). "Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme." Embo J **11**(1): 57-62.
- Kang, H. J., F. Coulibaly, F. Clow, T. Proft and E. N. Baker (2007). "Stabilizing isopeptide bonds revealed in gram-positive bacterial pilus structure." Science **318**(5856): 1625-8.
- Kern, R., A. Malki, A. Holmgren and G. Richarme (2003). "Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase." Biochem J **371**(Pt 3): 965-72.
- Kim, E. E. and H. W. Wyckoff (1991). "Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis." J Mol Biol **218**(2): 449-64.

- Kishigami, S., Y. Akiyama and K. Ito (1995). "Redox states of DsbA in the periplasm of *Escherichia coli*." FEBS Lett **364**(1): 55-8.
- Klee, S. R., X. Nassif, B. Kusecek, P. Merker, J. L. Beretti, M. Achtman and C. R. Tinsley (2000). "Molecular and biological analysis of eight genetic islands that distinguish *Neisseria meningitidis* from the closely related pathogen *Neisseria gonorrhoeae*." Infect Immun **68**(4): 2082-95.
- Kobayashi, T., S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi and K. Ito (1997). "Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 11857-62.
- Kortemme, T. and T. E. Creighton (1995). "Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family." J Mol Biol **253**(5): 799-812.
- Kortemme, T., N. J. Darby and T. E. Creighton (1996). "Electrostatic interactions in the active site of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase." Biochemistry **35**(46): 14503-11.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1978). "The glutathione status of cells." Int Rev Cytol **54**: 109-60.
- Krause, G., J. Lundstrom, J. L. Barea, C. Pueyo de la Cuesta and A. Holmgren (1991). "Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin." J Biol Chem **266**(15): 9494-500.
- Ladner, J. E., J. F. Parsons, C. L. Rife, G. L. Gilliland and R. N. Armstrong (2004). "Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1." Biochemistry **43**(2): 352-61.
- Lafaye, C., T. Iwema, P. Carpentier, C. Jullian-Binard, J. S. Kroll, J. F. Collet and L. Serre (2009). "Biochemical and structural study of the homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*." J Mol Biol **392**(4): 952-66.
- Lafaye, C., T. Iwema, J. L. Ferrer, J. S. Kroll, M. Griat and L. Serre (2008). "Preliminary crystallographic data of the three homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **64**(Pt 2): 111-4.
- Lasica, A. M. and E. K. Jagusztyn-Krynicka (2007). "The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis." FEMS Microbiol Rev **31**(5): 626-36.
- Lee, S. H., S. M. Butler and A. Camilli (2001). "Selection for in vivo regulators of bacterial virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6889-94.
- Leslie, A. G. (1999). "Integration of macromolecular diffraction data." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55**(Pt 10): 1696-702.

- Lillig, C. H., A. Prior, J. D. Schwenn, F. Aslund, D. Ritz, A. Vlamis-Gardikas and A. Holmgren (1999). "New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase." J Biol Chem **274**(12): 7695-8.
- Lin, D., C. V. Rao and J. M. Slauch (2008). "The Salmonella SPI1 type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system." J Bacteriol **190**(1): 87-97.
- Lowther, W. T., N. Brot, H. Weissbach and B. W. Matthews (2000). "Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme." Biochemistry **39**(44): 13307-12.
- Lundstrom, J., G. Krause and A. Holmgren (1992). "A Pro to His mutation in active site of thioredoxin increases its disulfide-isomerase activity 10-fold. New refolding systems for reduced or randomly oxidized ribonuclease." J Biol Chem **267**(13): 9047-52.
- Macnab, R. M. (1986). "Proton-driven bacterial flagellar motor." Methods Enzymol **125**: 563-81.
- Maeda, K., P. Hagglund, C. Finnie, B. Svensson and A. Henriksen (2006). "Structural basis for target protein recognition by the protein disulfide reductase thioredoxin." Structure **14**(11): 1701-10.
- Malojčić, G., R. L. Owen, J. P. Grimshaw and R. Glockshuber (2008). "Preparation and structure of the charge-transfer intermediate of the transmembrane redox catalyst DsbB." FEBS Lett **582**(23-24): 3301-7.
- Mandrell, R. E., J. M. Griffiss and B. A. Macher (1988). "Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes." J Exp Med **168**(1): 107-26.
- Martin, J. L. (1995). "Thioredoxin--a fold for all reasons." Structure **3**(3): 245-50.
- Martin, J. L., J. C. Bardwell and J. Kuriyan (1993a). "Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo." Nature **365**(6445): 464-8.
- Martin, J. L., G. Waksman, J. C. Bardwell, J. Beckwith and J. Kuriyan (1993b). "Crystallization of DsbA, an *Escherichia coli* protein required for disulphide bond formation in vivo." J Mol Biol **230**(3): 1097-100.
- Meima, R., C. Eschevins, S. Fillinger, A. Bolhuis, L. W. Hamoen, R. Dorenbos, W. J. Quax, J. M. van Dijl, R. Provvedi, I. Chen, D. Dubnau and S. Bron (2002). "The bdbDC operon of *Bacillus subtilis* encodes thiol-disulfide oxidoreductases required for competence development." J Biol Chem **277**(9): 6994-7001.
- Merz, A. J. and M. So (2000). "Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 423-57.

- Messens, J. and J. F. Collet (2006). "Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*." Int J Biochem Cell Biol **38**(7): 1050-62.
- Miller, R., S. M. Gallo, H. G. Khalak and C. M. Weeks (1994). "SnB: crystal structure determination via shake-and-bake." Journal of Applied Crystallography **27**(4): 613-621.
- Miranda-Vizuete, A. and G. Spyrou (1997). "The novel oxidoreductase KDRF (KM-102-derived reductase-like factor) is identical with human thioredoxin reductase." Biochem J **325** (Pt 1): 287-8.
- Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J Mol Biol **260**(3): 289-98.
- Missiakas, D., C. Georgopoulos and S. Raina (1993). "Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7084-8.
- Moskovitz, J., M. A. Rahman, J. Strassman, S. O. Yancey, S. R. Kushner, N. Brot and H. Weissbach (1995). "*Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage." J Bacteriol **177**(3): 502-7.
- Mossner, E., M. Huber-Wunderlich and R. Glockshuber (1998). "Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases." Protein Sci **7**(5): 1233-44.
- Mossner, E., M. Huber-Wunderlich, A. Rietsch, J. Beckwith, R. Glockshuber and F. Aslund (1999). "Importance of redox potential for the in vivo function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from *Escherichia coli*." J Biol Chem **274**(36): 25254-9.
- Moutiez, M., T. V. Burova, T. Haertle and E. Quemeneur (1999). "On the non-respect of the thermodynamic cycle by DsbA variants." Protein Sci **8**(1): 106-12.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin and E. J. Dodson (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 3): 240-55.
- Neidhardt, F. C., P. L. Bloch and D. F. Smith (1974). "Culture medium for enterobacteria." J Bacteriol **119**(3): 736-47.
- Nelson, J. W. and T. E. Creighton (1994). "Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo." Biochemistry **33**(19): 5974-83.
- Nordstrand, K., F. Aslund, S. Meunier, A. Holmgren, G. Otting and K. D. Berndt (1999). "Direct NMR observation of the Cys-14 thiol proton of reduced *Escherichia coli* glutaredoxin-3 supports the presence of an active site thiol-thiolate hydrogen bond." FEBS Lett **449**(2-3): 196-200.

Ondo-Mbele, E., C. Vives, A. Kone and L. Serre (2005). "Intriguing conformation changes associated with the trans/cis isomerization of a prolyl residue in the active site of the DsbA C33A mutant." J Mol Biol **347**(3): 555-63.

Ortenberg, R. and J. Beckwith (2003). "Functions of thiol-disulfide oxidoreductases in E. coli: redox myths, realities, and practicalities." Antioxid Redox Signal **5**(4): 403-11.

Pantoliano, M. W., E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane and F. R. Salemme (2001). "High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery." J Biomol Screen **6**(6): 429-40.

Paxman, J. J., N. A. Borg, J. Horne, P. E. Thompson, Y. Chin, P. Sharma, J. S. Simpson, J. Wielens, S. Piek, C. M. Kahler, H. Sakellaris, M. Pearce, S. P. Bottomley, J. Rossjohn and M. J. Scanlon (2009). "The structure of the bacterial oxidoreductase enzyme DsbA in complex with a peptide reveals a basis for substrate specificity in the catalytic cycle of DsbA enzymes." J Biol Chem **284**(26): 17835-45.

Peek, J. A. and R. K. Taylor (1992). "Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6210-4.

Perrakis, A., R. Morris and V. S. Lamzin (1999). "Automated protein model building combined with iterative structure refinement." Nat Struct Biol **6**(5): 458-63.

Peters, T., Jr. and L. K. Davidson (1982). "The biosynthesis of rat serum albumin. In vivo studies on the formation of the disulfide bonds." J Biol Chem **257**(15): 8847-53.

Prinz, W. A., F. Aslund, A. Holmgren and J. Beckwith (1997). "The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm." J Biol Chem **272**(25): 15661-7.

Puig, A., M. M. Lyles, R. Noiva and H. F. Gilbert (1994). "The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase." J Biol Chem **269**(29): 19128-35.

Qin, J., G. M. Clore, W. M. Kennedy, J. R. Huth and A. M. Gronenborn (1995). "Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B." Structure **3**(3): 289-97.

Qin, J., G. M. Clore, W. P. Kennedy, J. Kuszewski and A. M. Gronenborn (1996). "The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal." Structure **4**(5): 613-20.

Quan, S., I. Schneider, J. Pan, A. Von Hacht and J. C. Bardwell (2007). "The CXXC motif is more than a redox rheostat." J Biol Chem **282**(39): 28823-33.

Raczko, A. M., J. M. Bujnicki, M. Pawlowski, R. Godlewska, M. Lewandowska and E. K. Jagusztyn-Krynicka (2005). "Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of

Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria." Microbiology **151**(Pt 1): 219-31.

Regeimbal, J. and J. C. Bardwell (2002). "DsbB catalyzes disulfide bond formation de novo." J Biol Chem **277**(36): 32706-13.

Ren, G., D. Stephan, Z. Xu, Y. Zheng, D. Tang, R. S. Harrison, M. Kurz, R. Jarrott, S. R. Shouldice, A. Hiniker, J. L. Martin, B. Heras and J. C. Bardwell (2009). "Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue." J Biol Chem **284**(15): 10150-9.

Riddles, P. W., R. L. Blakeley and B. Zerner (1983). "Reassessment of Ellman's reagent." Methods Enzymol **91**: 49-60.

Rietsch, A., D. Belin, N. Martin and J. Beckwith (1996). "An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13048-53.

Roberts, B. R., Z. A. Wood, T. J. Jonsson, L. B. Poole and P. A. Karplus (2005). "Oxidized and synchrotron cleaved structures of the disulfide redox center in the N-terminal domain of Salmonella typhimurium AhpF." Protein Sci **14**(9): 2414-20.

Roos, G., A. Garcia-Pino, K. Van Belle, E. Brosens, K. Wahni, G. Vandebussche, L. Wyns, R. Loris and J. Messens (2007). "The conserved active site proline determines the reducing power of Staphylococcus aureus thioredoxin." J Biol Chem **282**(3): 800-11.

Rybin, V., A. Zapun, A. Torronen, S. Raina, D. Missiakas, T. E. Creighton and P. Metcalf (1996). "Crystallization of DsbC, the disulfide bond isomerase of Escherichia coli." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **52**(Pt 6): 1219-21.

Schirra, H. J., C. Renner, M. Czisch, M. Huber-Wunderlich, T. A. Holak and R. Glockshuber (1998). "Structure of reduced DsbA from Escherichia coli in solution." Biochemistry **37**(18): 6263-76.

Shorrosh, B. S., J. Subramaniam, K. R. Schubert and R. A. Dixon (1993). "Expression and Localization of Plant Protein Disulfide Isomerase." Plant Physiol **103**(3): 719-726.

Singh, A. K., M. Bhattacharyya-Pakrasi and H. B. Pakrasi (2008). "Identification of an atypical membrane protein involved in the formation of protein disulfide bonds in oxygenic photosynthetic organisms." J Biol Chem **283**(23): 15762-70.

Sinha, S., O. H. Ambur, P. R. Langford, T. Tonjum and J. S. Kroll (2008). "Reduced DNA binding and uptake in the absence of DsbA1 and DsbA2 of Neisseria meningitidis due to inefficient folding of the outer-membrane secretin PilQ." Microbiology **154**(Pt 1): 217-25.

Sinha, S., P. R. Langford and J. S. Kroll (2004). "Functional diversity of three different DsbA proteins from Neisseria meningitidis." Microbiology **150**(Pt 9): 2993-3000.

Sone, M., Y. Akiyama and K. Ito (1997). "Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds." J Biol Chem **272**(16): 10349-52.

- Stafford, S. J., D. P. Humphreys and P. A. Lund (1999). "Mutations in dsbA and dsbB, but not dsbC, lead to an enhanced sensitivity of Escherichia coli to Hg²⁺ and Cd²⁺." FEMS Microbiol Lett **174**(1): 179-84.
- Stephens, D. S. (2009). "Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis." Vaccine **27 Suppl 2**: B71-7.
- Stephens, D. S., B. Greenwood and P. Brandtzaeg (2007). "Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis." Lancet **369**(9580): 2196-210.
- Stephens, D. S., P. A. Spellman and J. S. Swartley (1993). "Effect of the (alpha 2-->8)-linked polysialic acid capsule on adherence of Neisseria meningitidis to human mucosal cells." J Infect Dis **167**(2): 475-9.
- Stewart, E. J., F. Aslund and J. Beckwith (1998). "Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins." Embo J **17**(19): 5543-50.
- Sugeta, H. (1975). "Normal vibrations and molecular conformations of dialkyl disulfides." Spectrochimica Acta Part A : Molecular Spectroscopy **31**(11): 1729-1737.
- Swartley, J. S., A. A. Marfin, S. Edupuganti, L. J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J. D. Wenger and D. S. Stephens (1997). "Capsule switching of Neisseria meningitidis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 271-6.
- Terwilliger, T. C. and J. Berendzen (1999). "Automated MAD and MIR structure solution." Acta Crystallographica Section D **55**(4): 849-861.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.
- Tinsley, C. R. and X. Nassif (1996). "Analysis of the genetic differences between Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11109-14.
- Tinsley, C. R., R. Voulhoux, J. L. Beretti, J. Tommassen and X. Nassif (2004). "Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in Neisseria meningitidis: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili." J Biol Chem **279**(26): 27078-87.
- Tomb, J. F. (1992). "A periplasmic protein disulfide oxidoreductase is required for transformation of Haemophilus influenzae Rd." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10252-6.
- Tzeng, Y. L. and D. S. Stephens (2000). "Epidemiology and pathogenesis of Neisseria meningitidis." Microbes Infect **2**(6): 687-700.
- Vagin, A. and A. Teplyakov (2000). "An approach to multi-copy search in molecular replacement." Acta Crystallographica Section D **56**(12): 1622-1624.

van Deuren, M., P. Brandtzaeg and J. W. van der Meer (2000). "Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management." Clin Microbiol Rev **13**(1): 144-66, table of contents.

Vinci, F., J. Couprie, P. Pucci, E. Quemeneur and M. Moutiez (2002). "Description of the topographical changes associated to the different stages of the DsbA catalytic cycle." Protein Sci **11**(7): 1600-12.

Vivian, J. P., J. Scoullar, A. L. Robertson, S. P. Bottomley, J. Horne, Y. Chin, J. Wielens, P. E. Thompson, T. Velkov, S. Piek, E. Byres, T. Beddoe, M. C. Wilce, C. M. Kahler, J. Rossjohn and M. J. Scanlon (2008). "Structural and biochemical characterization of the oxidoreductase NmDsbA3 from *Neisseria meningitidis*." J Biol Chem **283**(47): 32452-61.

Wagner, S., M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson and J. W. de Gier (2008). "Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14371-6.

Watarai, M., T. Tobe, M. Yoshikawa and C. Sasakawa (1995). "Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4927-31.

WHO (2005). "Weekly epidemiological record." 313-320.

Wunderlich, M. and R. Glockshuber (1993a). "Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*." Protein Sci **2**(5): 717-26.

Wunderlich, M., R. Jaenicke and R. Glockshuber (1993b). "The redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) of *Escherichia coli* result from a tense conformation of its oxidized form." J Mol Biol **233**(4): 559-66.

Xia, T. H., J. H. Bushweller, P. Sodano, M. Billeter, O. Bjornberg, A. Holmgren and K. Wuthrich (1992). "NMR structure of oxidized *Escherichia coli* glutaredoxin: comparison with reduced *E. coli* glutaredoxin and functionally related proteins." Protein Sci **1**(3): 310-21.

Yang, Y. F. and W. W. Wells (1991). "Identification and characterization of the functional amino acids at the active center of pig liver thioltransferase by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **266**(19): 12759-65.

Yu, J. and J. S. Kroll (1999). "DsbA: a protein-folding catalyst contributing to bacterial virulence." Microbes Infect **1**(14): 1221-8.

Zander, T., N. D. Phadke and J. C. Bardwell (1998). "Disulfide bond catalysts in *Escherichia coli*." Methods Enzymol **290**: 59-74.

Zapun, A., J. C. Bardwell and T. E. Creighton (1993). "The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo." Biochemistry **32**(19): 5083-92.

Zapun, A. and T. E. Creighton (1994). "Effects of DsbA on the disulfide folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor and alpha-lactalbumin." Biochemistry **33**(17): 5202-11.