

Vers une étude structurale du mécanisme catalytique de la superoxyde réductase (SOR) de *Desulfoarcus baarsii*

Virgile Adam^{ab}, Antoine Royant^c, Vincent Nivière^d & Dominique Bourgeois^{ab}

^aLCCP, UMR 9015, IBS, 41 avenue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

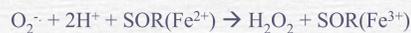
^bESRF, 6 rue Jules Horowitz, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France

^cEMBL, 6, rue Jules Horowitz, BP181, 38042 Grenoble Cedex 9, France

^dLCBCRB, DRDC-CEA, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble, Cedex 9, France

1) Introduction

La superoxyde réductase (SOR) est une métalloenzyme récemment découverte [1] chez certaines bactéries anaérobiques et microaérophiles. Son rôle de puissant détoxifiant permet d'éliminer le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) sans production d'oxygène dans la cellule, par un processus de réduction à un électron:



Cette réaction correspond à la deuxième demi-réaction de la superoxyde dismutase (SOD).

Nous avons résolu la structure la SOR de *Desulfoarcus baarsii* à 1.5 Å de résolution. Le repliement observé est globalement similaire à celui de la SOR de *D. desulfuricans* [2]. Par contre, la résolution nettement supérieure de nos données permet d'observer un atome de chlore fixé dans le site actif. Nos résultats ainsi que d'autres non exposés ici, permettent de mettre en évidence certaines propriétés électrostatiques remarquables du site actif.

Notre but est de caractériser d'un point de vue structural le mécanisme réactionnel de la SOR. La mise au point d'inhibiteurs de la SOR pourrait en effet déboucher sur des applications médicales concernant par exemple *T. pallidum*, l'agent de la syphilis, qui est une bactérie pathogène ne possédant que la SOR comme défense contre le stress oxydant [3]. Le développement de composés bio-mimétiques de la SOR pourrait aussi permettre de lutter plus efficacement contre les radicaux responsables de maladies neurodégénératives chez l'homme.

Les études présentées ici concernent la structure du mutant E47A de l'enzyme, stabilisant un état intermédiaire supposé de type (hydro)peroxo [4] et que nous avons l'espoir de piéger en utilisant les techniques de cristallographie cinétique.

4) La structure

La SOR de *D. baarsii* est un homodimère possédant une symétrie d'ordre deux [Figure 2]. Chaque monomère comprend deux domaines contenant chacun un centre à fer.

Le domaine 1 est typique d'un centre desulfuredoxine. L'atome de fer s'y trouve à l'état oxydé, coordiné par quatre cystéines dans une conformation pyramidale carrée de type rubredoxine. Le rôle éventuel dans la catalyse du centre I n'est pas connu.

Le domaine 2 est formé par 7 feuillets β adoptant un repliement de type immunoglobuline. Il contient le centre actif constitué d'un atome de fer à l'état réduit, coordiné par quatre histidines et une cystéine dans une conformation de type néclaredoxine [Figure 3].

Les domaines 1 et 2 sont reliés par une hélice 3_{10} .

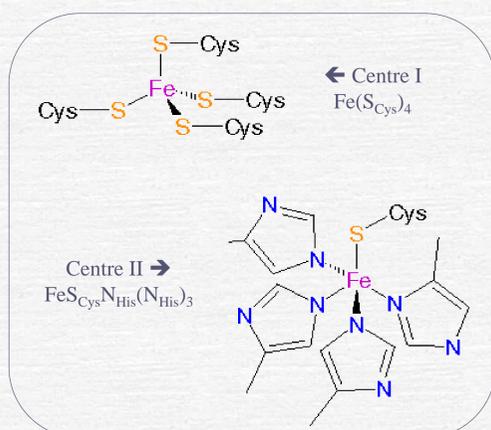


Fig. 3 Centres à fer présents dans la SOR

2) Purification et cristallisation

La protéine a été purifiée par une succession de 3 colonnes de chromatographie :

- Tamisage moléculaire (ACA54 de Pharmacia)
- Echange anionique (UnoQ6 de BioRad)
- Echange hydrophobe (Phenyl Superose 10 de Pharmacia)

Nous obtenons ainsi la protéine pure, correctement métallée, et concentrée à environ 20 mg.mL⁻¹ dans 10 mM de tampon Tris.

Les cristaux [Figure 1] en forme de baguette sont obtenus après environ 2 semaines de croissance à 20°C, en utilisant la technique de la goutte suspendue (2 μ L de SOR + 2 μ L de puits), dans les conditions suivantes :

- ✓ pH de 7.8 à 8.0 tampon Tris base 100 mM
- ✓ PEG 4K 18%
- ✓ CaCl₂ 100 mM

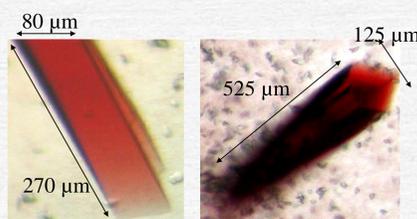


Fig.1 Cristaux de SOR du mutant E47A de *D. baarsii*.

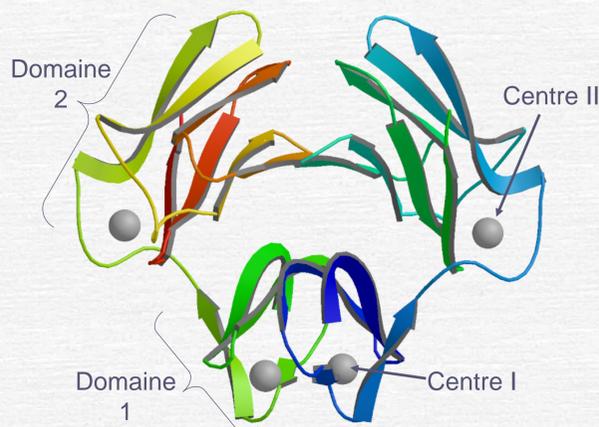


Fig. 2 Structure tridimensionnelle de la SOR de *D. baarsii*

De façon inattendue, un ion chlorure (venant du milieu de cristallisation) est observé au sein du site actif, à environ 4 Å du fer [Figure 4]. Cet atome n'occupe pas la sixième coordination vacante du fer, mais semble stabilisé par des interactions électrostatiques fortes, en particulier avec la lysine 48. La présence d'un ion chlore à proximité d'un centre à fer n'a jamais été observée dans les structures déposées à la PDB (bien que dans le cas de la Myohémerythrine de *Thermotoga zosteri*, code : 1A7D) [5], une coordination directe Chlore-Fer soit décrite). Ce résultat met en évidence la spécificité du site actif de la SOR pour les petites molécules anioniques, et donc en particulier pour l'ion superoxyde.

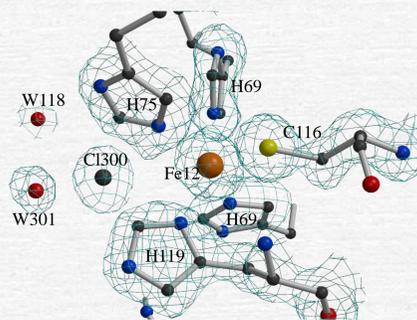


Fig.4 Détail du site actif de la SOR et d'un atome de chlore stabilisé proche de fer.

(La densité $2F_{obs} - F_{calc}$ est contourée à 1.2σ)

3) Collecte et résolution de la structure

Les données ont été collectées sur la ligne ID29 de l'ESRF à 1.5Å de résolution avec une longueur d'onde de 0,92 Å. Les statistiques sont présentées dans la Table 1.

La structure a été obtenue par remplacement moléculaire à partir de celle de la desulfuredoxine de *Desulfovibrio desulfuricans* [2] (code pdb : 1DFX).

Statistique	Valeur
Groupe d'espace	I4,22
Résolution (Å)	1.5
Maille (Å / °)	a = b = 123.70 c = 72.60 / $\alpha = \beta = \gamma = 90$
R _{sym} (dernière tranche, %)	6.3 (41.2)
Réflexions uniques	49583
Nombre d'atomes total	2219
Multiplicité (dernière couche)	10.2 (4.6)
Part de solvant (%)	50.2
Facteur B moyen (Å ²)	41.6888
R _{crys} (%)	19.51
R _{free} (%)	20.85
Hétéroatomes	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻

Table 1: Statistiques de collecte et d'affinement

5) Microspectrophotométrie

L'état d'oxydo-réduction de la protéine a pu être vérifié par microspectrophotométrie d'absorption dans les cristaux, grâce à l'installation CryoBench [6] de l'ESRF/IBS.

Les spectres, globalement identiques à ceux obtenus en solution, ont confirmé l'état semi-réduit de la protéine [Figure 5].

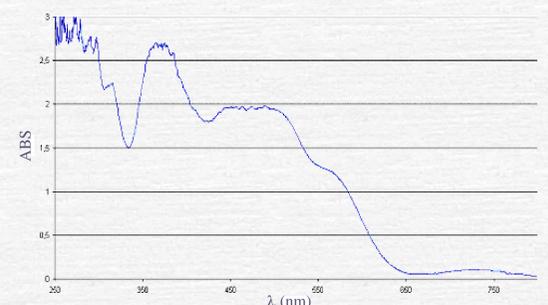


Fig. 5 L'état de réduction de la protéine est vérifié par absorbance directe dans le cristal

6) Perspectives

Les résultats présentés ici constituent une base de travail pour caractériser structurellement les intermédiaires réactionnels de la SOR.

Il a été démontré [4] qu'il était possible d'oxyder la SOR par le produit de la réaction (le peroxyde d'hydrogène H_2O_2) et que dans le cas du mutant E47A un intermédiaire identique à celui de la réaction physiologique était stabilisé. Dans le but de déterminer la structure de cet intermédiaire réactionnel que nous pensons être un fer (hydro)peroxo [Fe-O-O(-H)], nous cherchons à oxyder la protéine par diffusion à température ambiante de H_2O_2 dans le cristal.

Ces expériences de cristallographie cinétique, qui consistent à suivre en temps réel l'apparition de l'oxydation de la SOR sur le spectre d'absorbance puis à congeler rapidement le cristal, peuvent être effectuées grâce au laboratoire CryoBench [6].

Nous espérons de cette façon avancer dans la compréhension du mécanisme réactionnel de la SOR.

Références

- [1] Jenney, F. *et al.* (1999) *Science* **286**(5438): 306-309
- [2] Coelho, A. V. *et al.* (1997) *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**: 680-689
- [3] Lombard, M. *et al.* (2000) *J. of Biol. Chem.* **275**(35): 27021-27026
- [4] Mathé, C. *et al.* (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**(18): 4966-4967
- [5] Martins, L. J. *et al.* (1997) *Biochemistry* **36**: 7044
- [6] Bourgeois, D. *et al.* (2002) *J. App. Cryst.* **35**: 329-326

Remerciements

