

Un équilibre rapide gouverne le transfert d'électron à travers une réductase diflavine multidomaine

Ewen Lescop
Laboratoire de Chimie et Biologie structurales
ICSN – CNRS (Gif sur Yvette - France)

Ewen Lescop

1999-2000 DEA cristallographie et RMN biologiques (Paris XI, Grenoble, Strasbourg)

2000-2003 Thèse à l'ICSN Gif-sur-Yvette (Dir Eric Guittet)
Structure, dynamique et interaction d'une protéine de liaison aux odeurs chez l'abeille par RMN

2004-2006 Postdoc à l'Université de Pékin (Changwen Jin)
Structure d'un complexe facteur de transcription/ ADN (RX/RMN).
Structure et dynamique d'une phosphatase à phosphotyrosine (RMN)
Structure et dynamique de l'enzyme HPPK (RMN)

2006-2007 Postdoc à l'IBS (Grenoble) (Bernhard Brutscher)
Développements méthodologiques en RMN des protéines: RMN rapide (BEST), analyse automatique des spectres (COBRA), nouvelles séquences d'impulsion (HADAMAC, …)

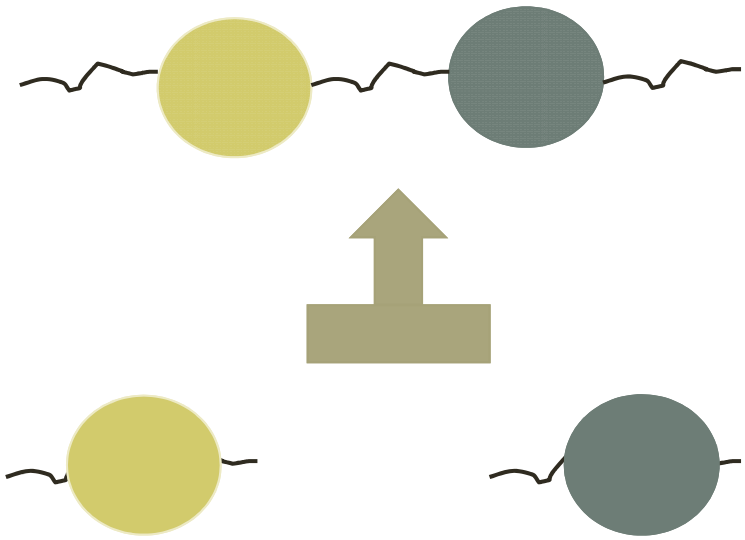
depuis 2007 Chargé de recherche CNRS à l'ICSN (Gif-sur-Yvette)
Développements méthodologiques en RMN des protéines et petites molécules
Dynamique et interaction impliquant des protéines (redox) par biologie structurale intégrée





Plus de 80% des protéines des organismes supérieurs possèdent plusieurs domaines assemblés

Apic G, Gough J, Teichmann SA. J Mol Biol. 2001



Et résultent de la combinaison de domaines isolés (fusion de gènes)

Comment les domaines communiquent au sein de protéines multidomaines?

Techniques structurales abordées ce matin

Cristallographie

SAXS

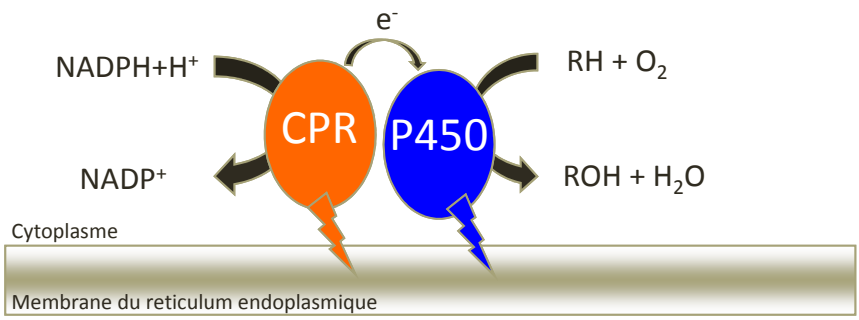
RMN

Spectrométrie de Masse Mobilité ionique

FRET (Stopped-flow)

PELDOR

La NADPH Cytochrome P450 réductase (CPR)

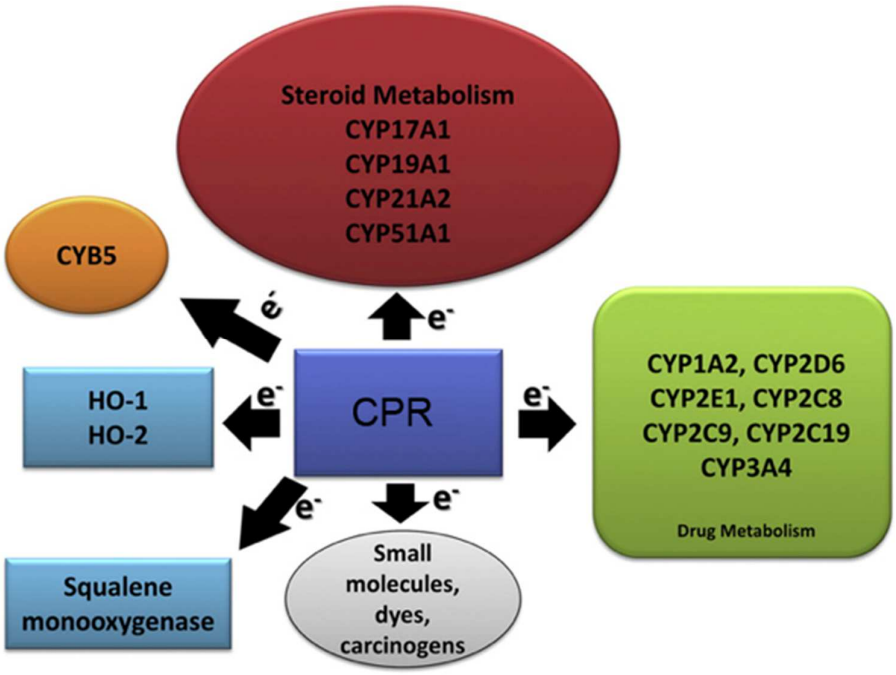


Régénère le cytochrome P450 dans son cycle:

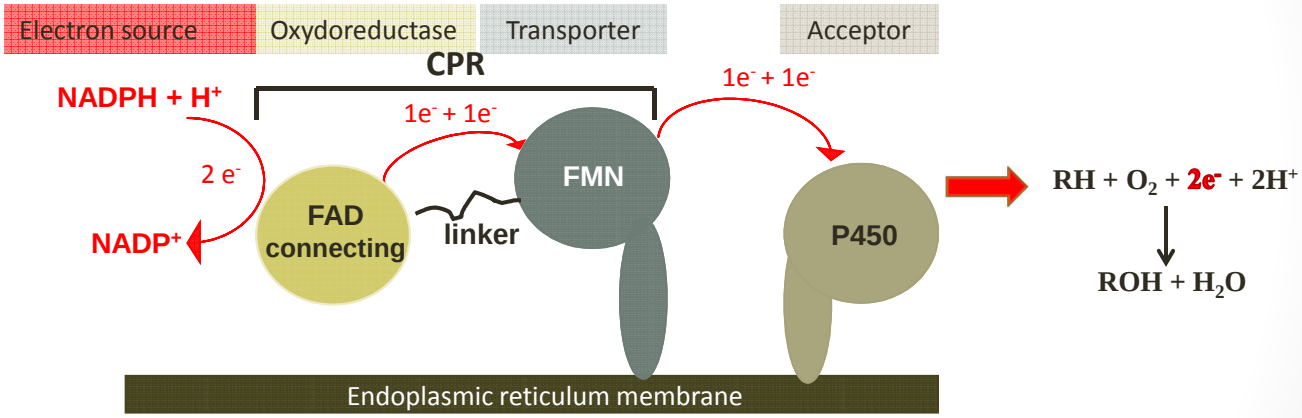
1. biosynthèse et dégradation de molécules endogènes
2. détoxification et biodégradation de xénobiotiques (drugs)

Impliqués dans l'activation de prodrug (cancer)

La NADPH Cytochrome P450 réductase (CPR)

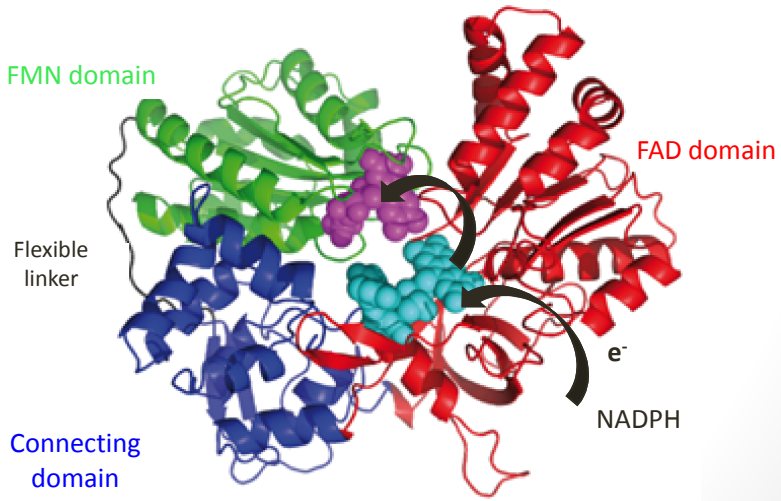


La NADPH Cytochrome P450 réductase (CPR)



Structure : une conformation fermée

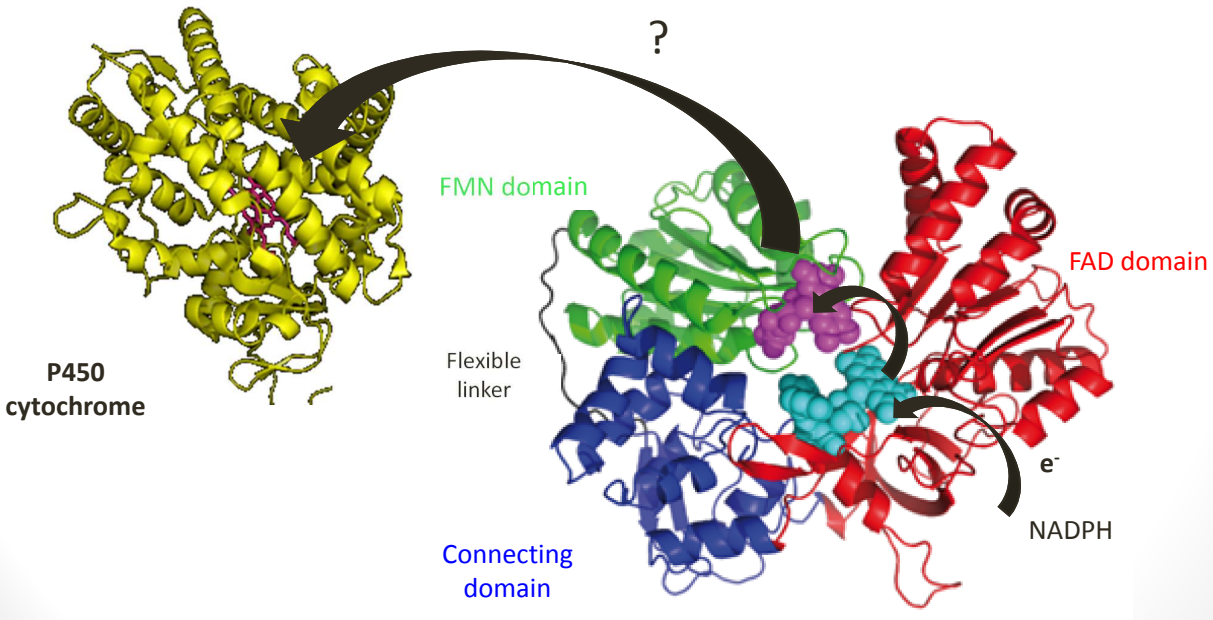
- Structure compatible avec un transfert d'électron rapide (ps) entre les deux flavines : **FAD** and **FMN**



Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BS, Kim JJ. PNAS 1997

Structure : une conformation fermée

- Structure compatible avec un transfert d'électron rapide (ps) entre les deux flavines : **FAD** and **FMN**
- Mais pas avec le transfert FMN->P450

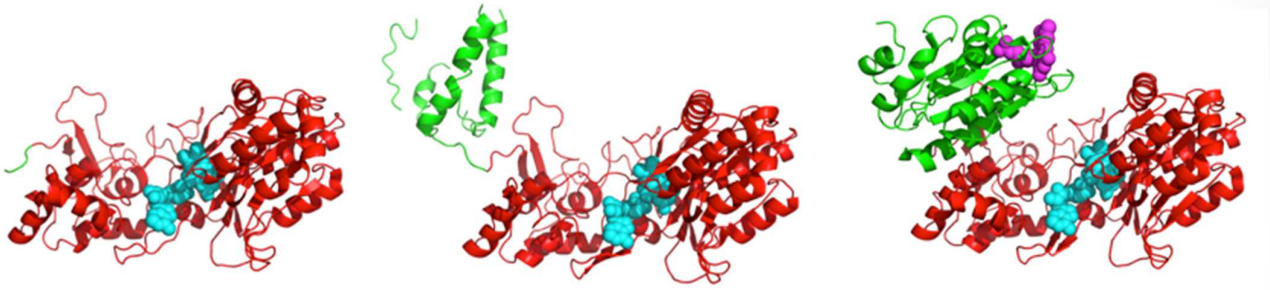


Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BS, Kim JJ. PNAS 1997

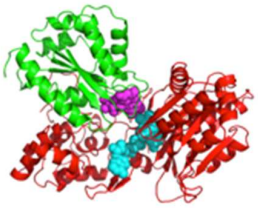
Recherche de conformations alternatives

1ère approche: réduire la longueur du linker interdomain (-4 residues)

Hamdane D, Xia C, Im SC, Zhang H, Kim JJ, Waskell L. J Biol Chem. 2009



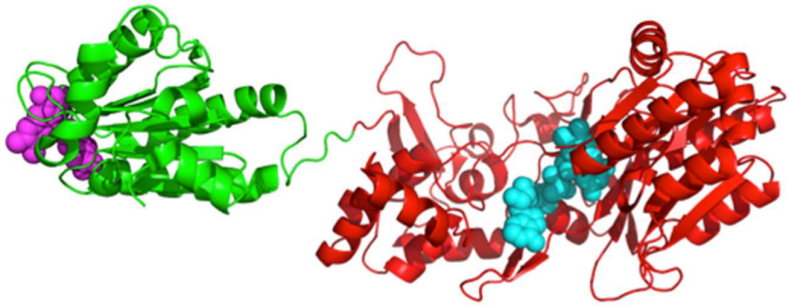
- Trois conformations ouvertes
- Pb: le transfert FMN->P450 est possible
  mais le transfert FAD->FMN est rendu impossible



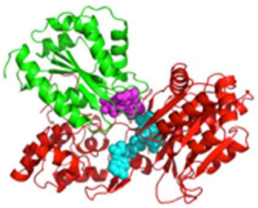
Recherche de conformations alternatives

2ème approche : une CPR chimérique
Le domaine FMN de la levure / le domaine FAD de l'humain

Aigrain L, Pompon D, Moréra S, Truan G. EMBO Rep. 2009



- Une conformation ouverte
- L' enzyme reste largement active (~10%)



Cette conformation est-elle stable en solution?
Qu'en est il pour la forme sauvage?
Relier réorientation des domaines et activité?

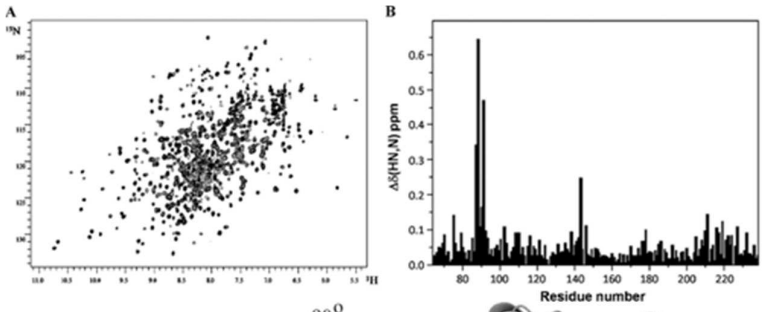
Une étude RMN/SAXS en solution

Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, Huang WC, Grossmann JG, Roberts GC. J Biol Chem. 2009

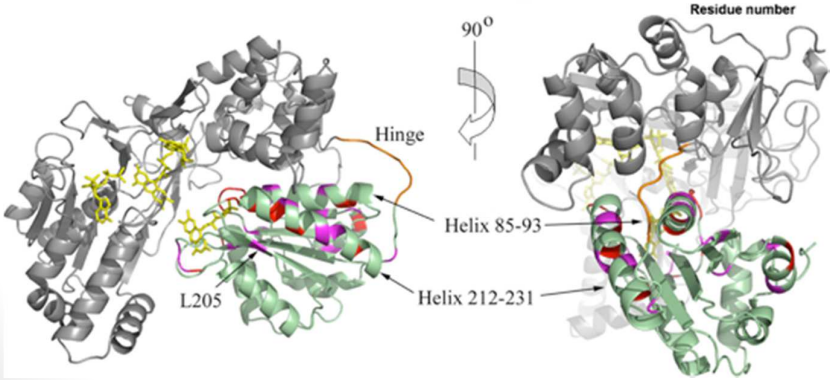
Approche: comparer les déplacements chimiques $^{1}H/^{15}N$ des résidus du domaine FMN dans un contexte isolé et dans la protéine entière

Principe: les résidus à l'interface FMN/FAD auront des déplacements chimiques différents

^{15}N HSQC de la CPR entière



Δppm
(isolé vs entière)



L'interface identifiée ne correspond qu'en partie à la structure fermée

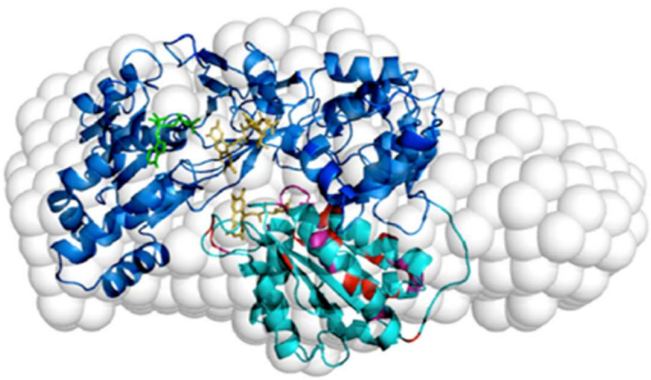
-> conformation alternative en équilibre?

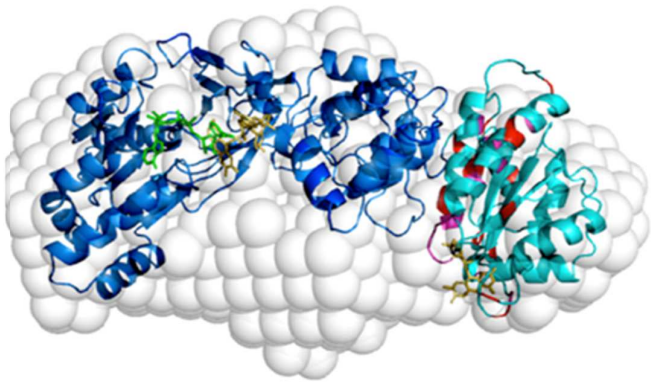
Une étude RMN/SAXS en solution

Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, Huang WC, Grossmann JG, Roberts GC. J Biol Chem. 2009

Approche: collecte de la courbe de diffusion de SAXS

Résultat: la courbe de SAXS ne fitte pas avec la structure fermée
Reconstruction de la structure par des « dummy residues » (GASBOR)



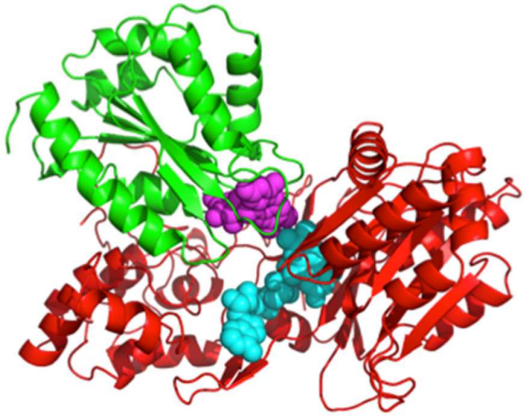


La conformation fermée « rentre » dans la « densité »

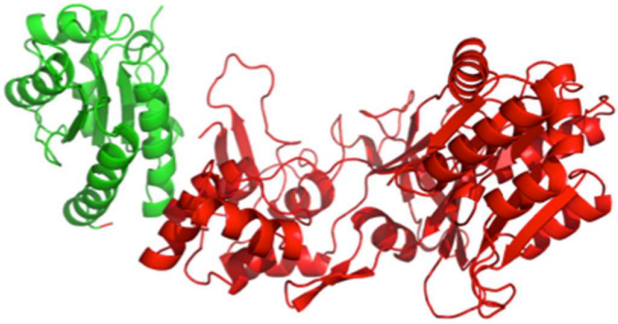
Nécessité d'introduire une nouvelle conformation « ouverte » pour expliquer la « densité »

Une étude RMN/SAXS en solution

Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, Huang WC, Grossmann JG, Roberts GC. J Biol Chem. 2009



Conformation fermée



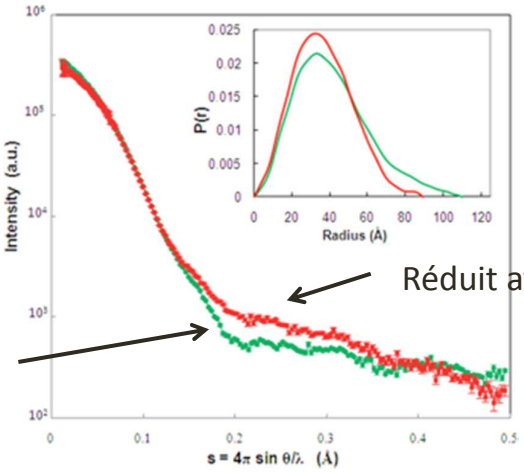
Conformation ouverte compatible avec le SAXS et la RMN

Les conformations sont en équilibre 50%/50% en solution

Une étude RMN/SAXS en solution

Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, Huang WC, Grossmann JG, Roberts GC. J Biol Chem. 2009

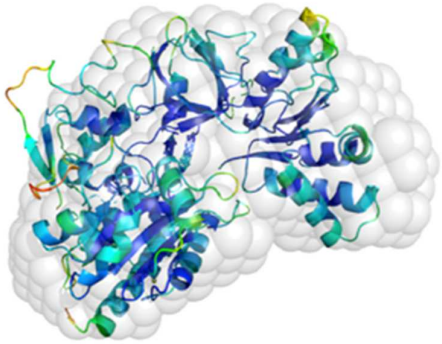
Effet de la réduction et de la fixation du substrat/produit (NADPH)



Réduit avec NADPH

Oxydé

Sample	D_{max} Å	R_g Å
Oxidized	110	32.3
Oxidized + 2′,5′-ADP	100	30.1
4e⁻-reduced (by NADH, no coenzyme remaining bound)	109	32.4
2e⁻-reduced (by NADPH, with $NADP^+$ remaining bound)	99	30.5
4e⁻-reduced (by NADPH, with $NADP^+$ remaining bound)	89	28.1



La réduction et la fixation du produit ($NADP^+$) contribuent à sélectionner la conformation fermée

Le point en 2009

Ce qui est acquis:

-Les domaines peuvent se réorienter en solution, y compris pendant le cycle catalytique

-Un équilibre semble exister en solution

-La réduction et la fixation de substrat semble perturber l'équilibre

Questions en suspens en 2009:

-Quel est la dynamique des domaines :

- ie la conformation ouverte est-elle forcément un corps rigide?
- Quelle est la vitesse de transition fermée/ouverte?
- Peut-on relier équilibre et activité?
- Quels sont les paramètres qui contrôlent l'équilibre au-delà de la réduction/fixation de substrat

Objectif de l'étude RMN

- La RMN permet de sonder la structure et la dynamique de protéine en solution:

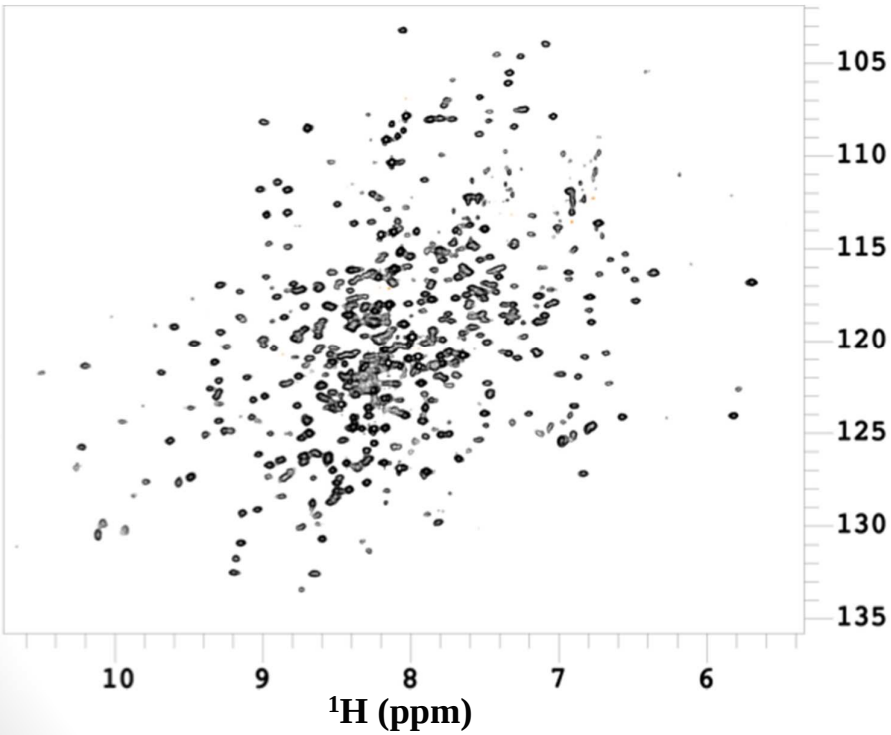
  Amplitude / Echelle de temps / Equilibre conformationnel (cf cours mercredi)

- Prérequis:
  - Obtenir un spectre ^{15}N HSQC (ou TROSY) de qualité
  - Arriver à attribuer les résonances
  - Extraire des informations des spectres en manipulant l'échantillon ou par des expériences RMN complémentaires

- La CPR 70kDa (622 acides aminés): un défi pour la RMN

Premiers contacts avec la CPR en RMN

- La protéine est produite deutérée (culture en milieu M9 D_2O)
- La purification est faite en H_2O: les protons ^1H échangeables s'échangent



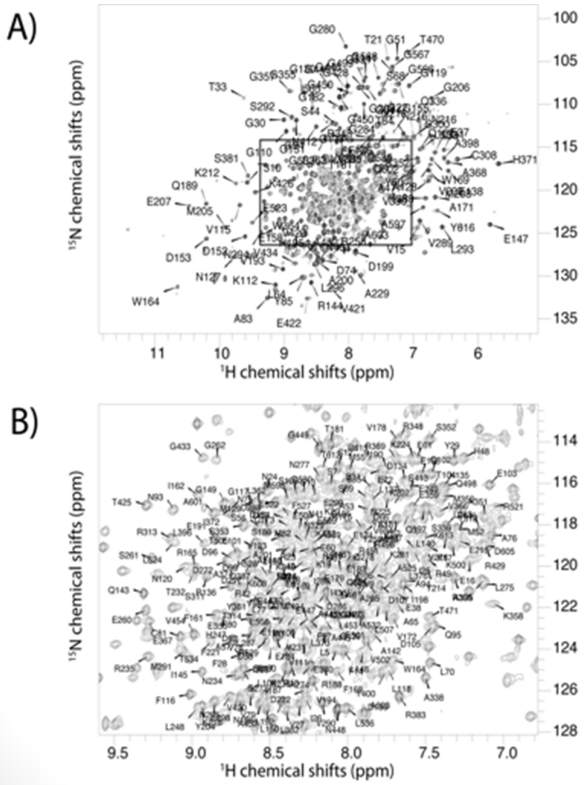
1 pic de corrélation
= une liaison H-N

Spectre ^1H-^{15}N TROSY à T=37° C et 950MHz

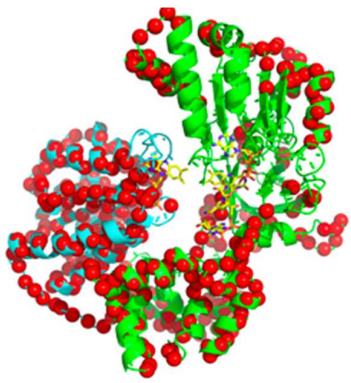
Vincent B, Morellet N, Fatemi F, Aigrain L, Truan G, Guittet E, Lescop E. J Mol Biol. 2012

Attribution des résonances

- Collecte de spectres de corrélation 3D: HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HN(CA)CO + NOESY-HSQC



~60% de la protéine attribuée

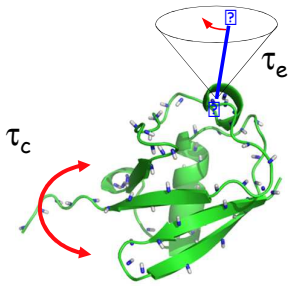


Bonne distribution le long de la séquence et la structure: autant de sondes

Vincent B, Morellet N, Fatemi F, Aigrain L, Truan G, Guittet E, Lescop E. J Mol Biol. 2012

La relaxation ^{15}N: une source d'information sur la dynamique

- Collecte des paramètres de relaxation ^{15}N R_1 et R_2 pour chaque acide aminé
- Ils sont sensibles aux mouvements de la liaison N-H
- Décomposition du mouvement d'une liaison N-H:
  - Mouvement **global** de réorientation de la protéine
    (temps de corrélation τ_c)
  - Mouvements **internes**: amplitude S^2 et vitesse (τ_e)

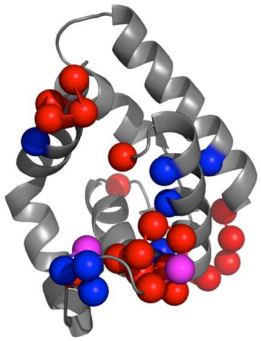


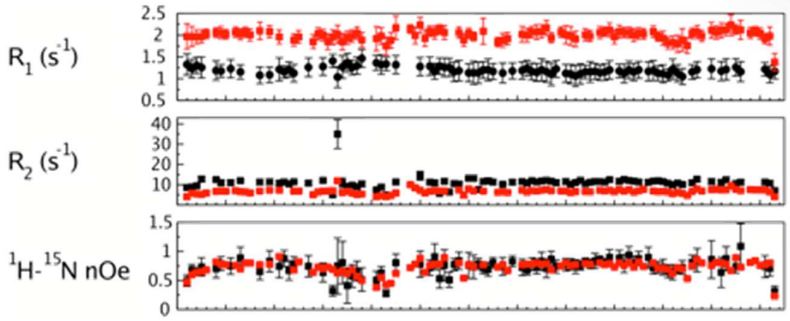
$$R_1(^{15}N) = a_1J(\omega_N)+b_1J(\omega_H-\omega_N)+c_1J(\omega_H+\omega_N)$$
$$R_2(^{15}N) = a_2J(0)+b_2J(\omega_N)+c_2J(\omega_H-\omega_N)+d_2J(\omega_H)+e_2J(\omega_H+\omega_N)$$
$$\{^1H\}-(^{15}N)NOE = a_3J(\omega_H-\omega_N)+b_3J(\omega_H+\omega_N)$$

avec $J(\omega)=\dfrac{\tau_c}{1+(\omega\tau_c)^2}$

Le rapport R_2/R_1 ne dépend que des mouvements globaux (i.e. τ_c)

Application à une petite protéine globulaire: ASP2

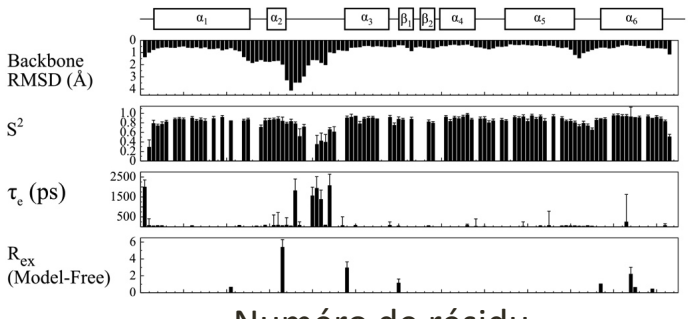




□□□□□□□□□□□□□

τ_c = 9.3 ns @283K
4.9 ns @310K

Approche model-free

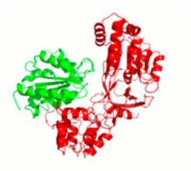


Numéro de résidu

Lescop E, Briand L, Pernollet JC, Guittet E. Biochemistry. 2009

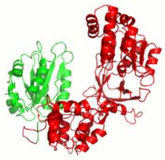
Le cas des protéines modulaires

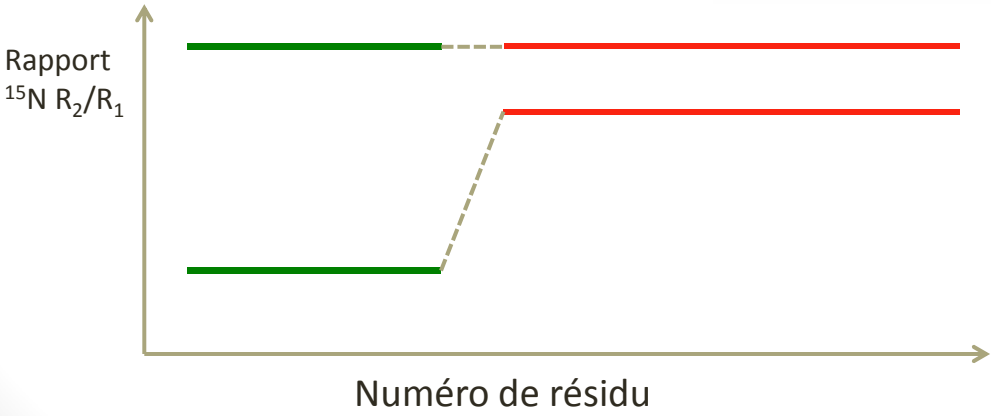
- En cas d'absence de mobilité entre domaine:
  La protéine se comporte comme un corps rigide, et donc comme une grosse protéine globulaire (τ_c long)



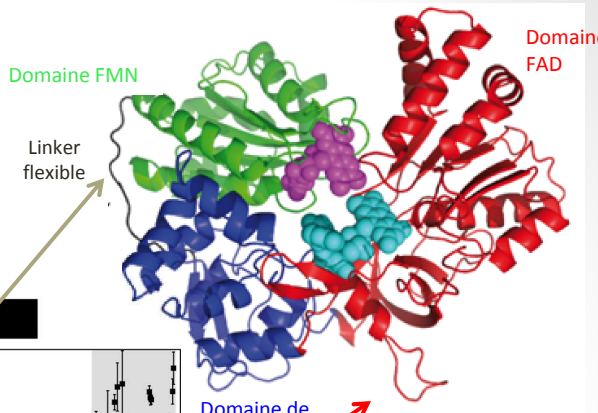
- En cas de mobilité entre domaines:

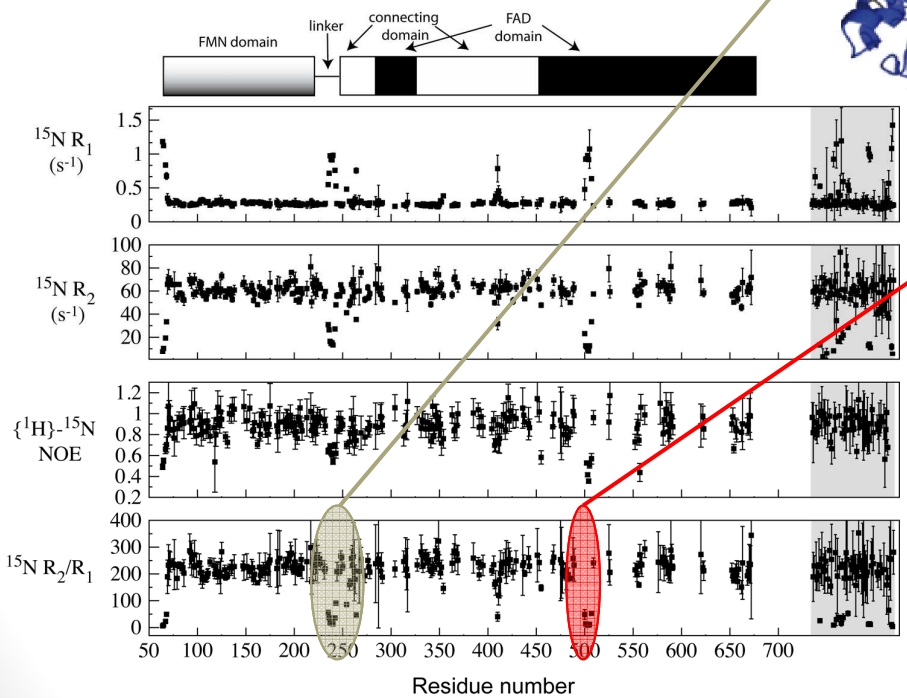
  Chaque domaine se comporte différemment avec des τ_c apparents dépendants de leur taille





Relaxation ^{15}N





Temps de corrélation apparent (30 ns) identique pour les deux domaines

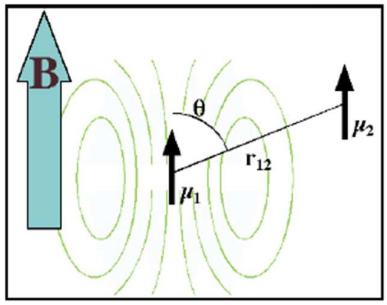
Prédiction à partir de la structure fermée (hydroNMR): 30 ns

Mais quelle structure rigide?

- Les couplages dipolaires résiduels: une information sur les orientations relatives de liaison N-H
- Principes:

$$D_{IS}(\theta) = \frac{\hbar \gamma_I \gamma_S}{4\pi^2 r_{IS}^3}[1 - 3\cos^2\theta].$$

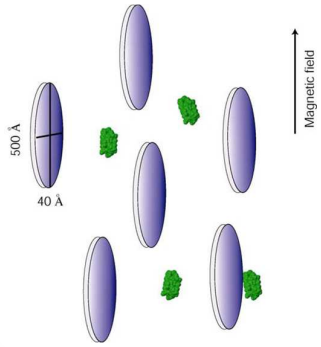
En solution: réorientation isotrope et le couplage dipolaire est nul

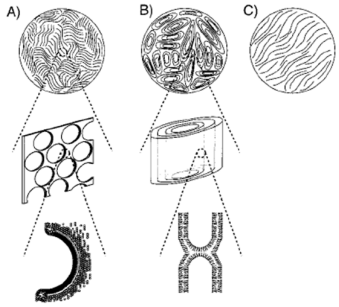


En milieu anisotrope, le couplage ne s'annule plus et devient mesurable

(RDC: Residual Dipolar Coupling)

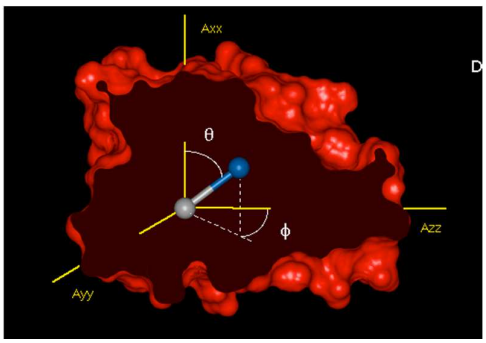
Dépend de l'orientation du vecteur N-H dans un repère donné.

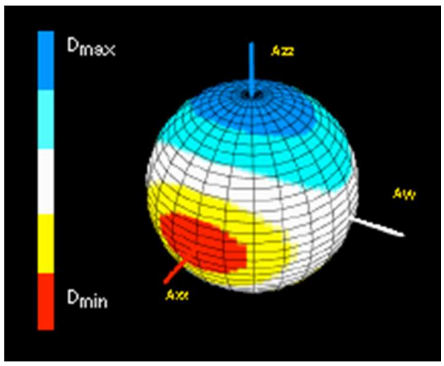




Mais quelle structure rigide?

Chaque vecteur N-H a une orientation (θ, φ) qui correspond à une valeur de couplage dipolaire résiduel (entre D_{min} et D_{max}) pour une certaine propriété de l'alignement (tenseur d'alignement).





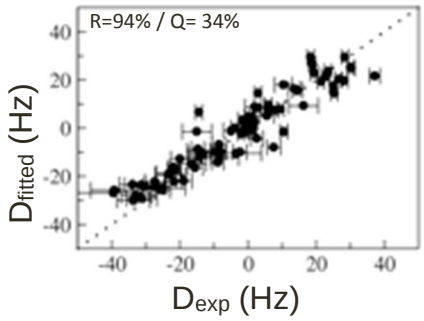
Si on connaît la structure 3D, on peut prédire le tenseur d'alignement (forme ou distribution de charge)

Si on connaît la structure 3D et RDC, on peut en déduire le tenseur d'alignement expérimental

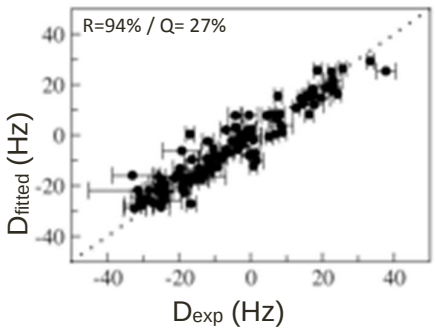
CPR et RDC

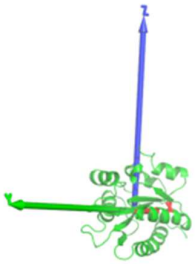
Mesuré dans PEG/hexanol

Domaine FMN



Domaine FAD

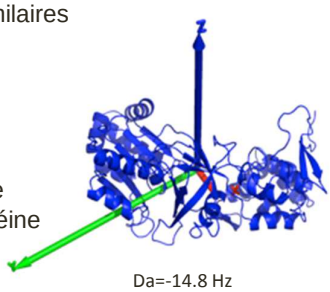




Da=-14.4 Hz
R=0.59

Les deux tenseurs ont des formes similaires

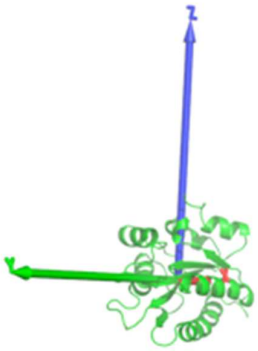
Ils correspondent à un seul et unique tenseur décrivant la forme de la protéine

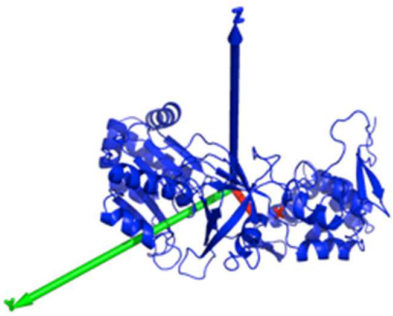


Da=-14.8 Hz
R=0.58

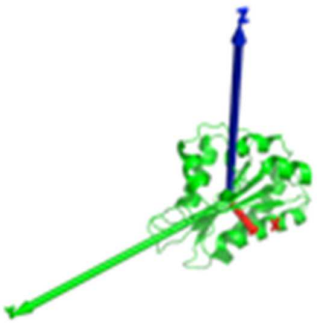
Vincent B, Morellet N, Fatemi F, Aigrain L, Truan G, Guittet E, Lescop E. J Mol Biol. 2012

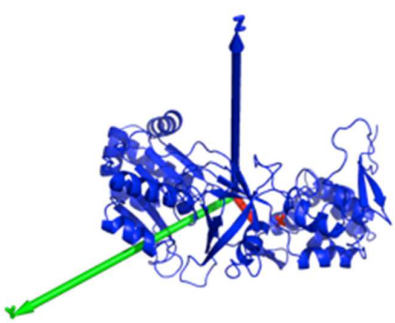
Les RDC permettent d'orienter deux domaines….





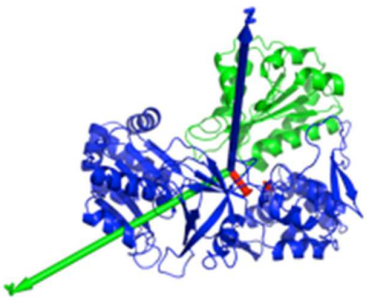
Rotation des domaines pour aligner les tenseurs



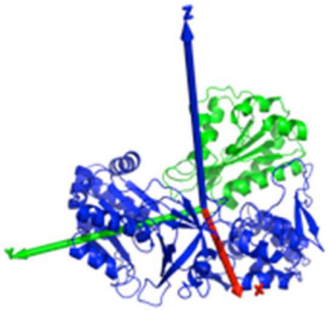


Vincent B, Morellet N, Fatemi F, Aigrain L, Truan G, Guittet E, Lescop E. J Mol Biol. 2012

… ou de valider des modèles structuraux

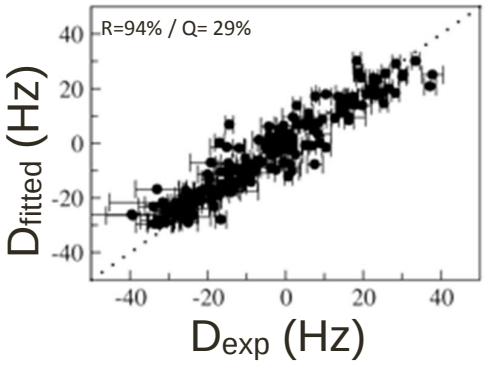


Da=-14.6 Hz / R=0.61

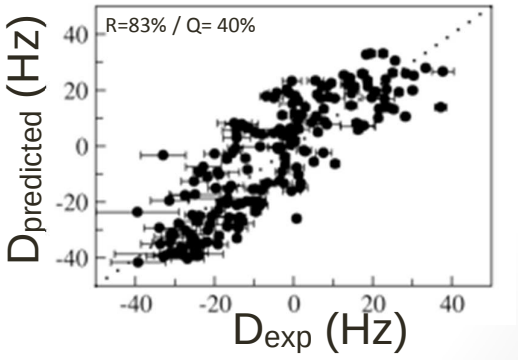


Da=-20 Hz / R=0.43

Tenseur expérimental
(fit des RDC à la conformation fermée)



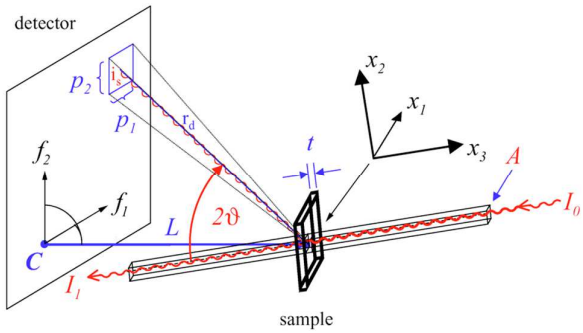
Tenseur prédit
(à partir de la conformation fermée)

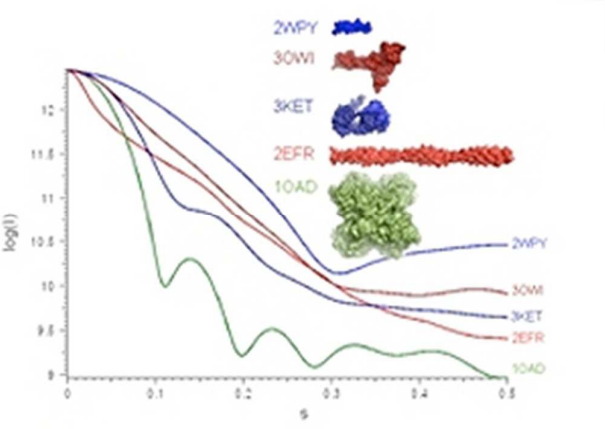


Conclusion: les RDC sont compatibles avec la conformation fermée en solution (20mM Tris pH 7.4)

Vincent B, Morellet N, Fatemi F, Aigrain L, Truan G, Guittet E, Lescop E. J Mol Biol. 2012

Le SAXS





- Un échantillon liquide diffuse les rayons X incidents
- Courbe de diffusion qui renseigne sur la distribution de distances interatomiques

http://www.esrf.eu
http://www.rigaku.com

Le SAXS à Soleil (Swing, J. Pérez)

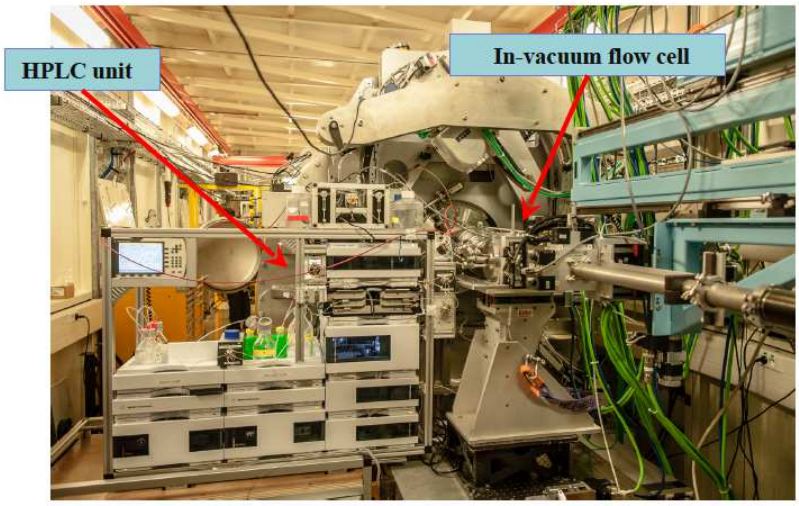
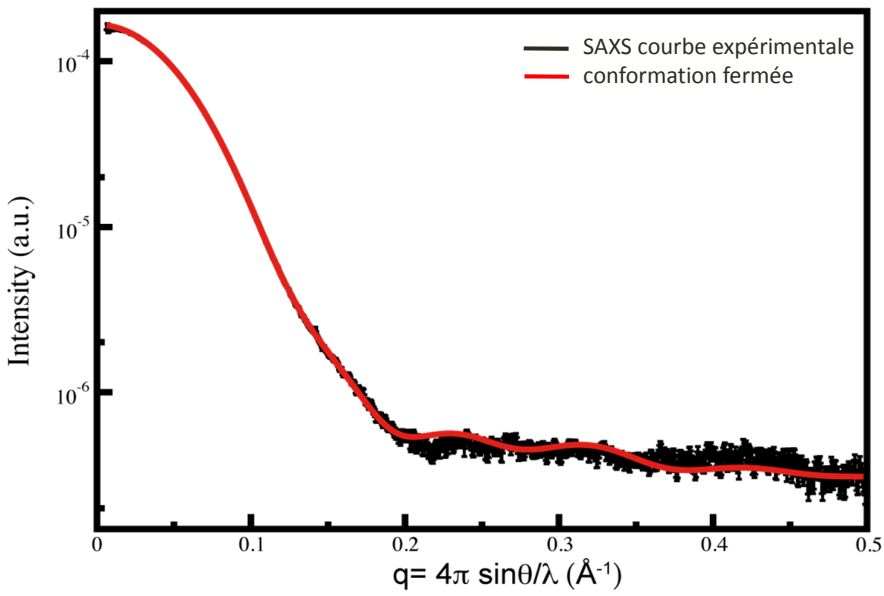


Photo: J. Pérez

- L'échantillon passe sur une colonne HPLC avant de recevoir les RX
- Avantages:
  - Gros aggrégats éliminés, monodispersité
  - Tampon mieux contrôlé (blanc)

Le SAXS confirme l'étude RMN

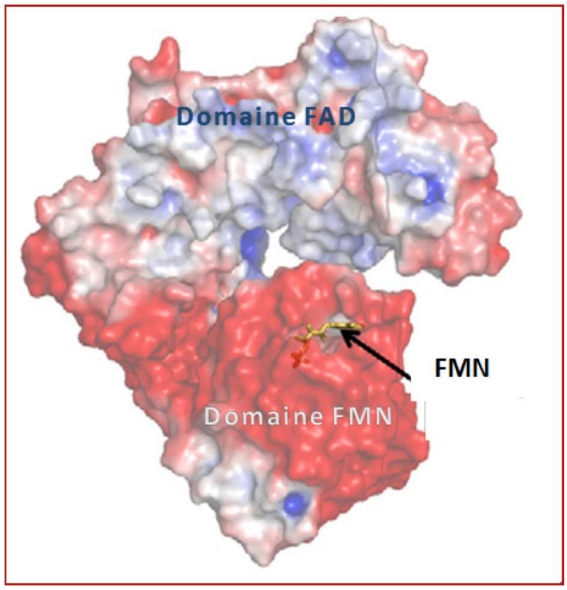
Mesurée dans les mêmes conditions que la RMN (sauf RT)

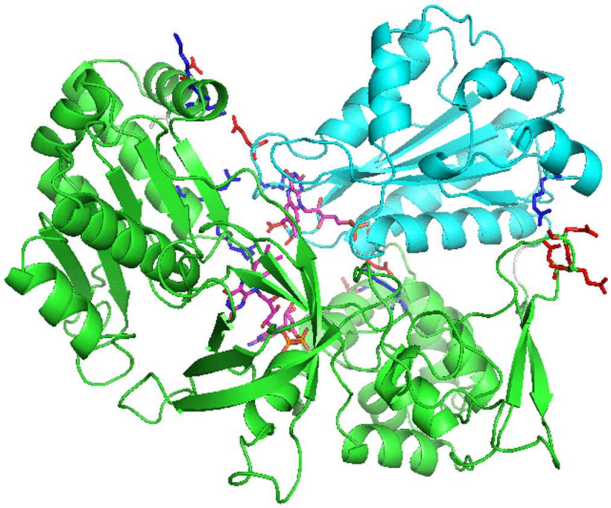


- Courbe SAXS expérimentale vs conformation fermée
- Intérêt: 2h de mesure + 5 mn d'analyse pour le SAXS

vs ~1 an pour la RMN (attribution + analyse)

Surface électrostatique de la CPR (conformation ouverte)

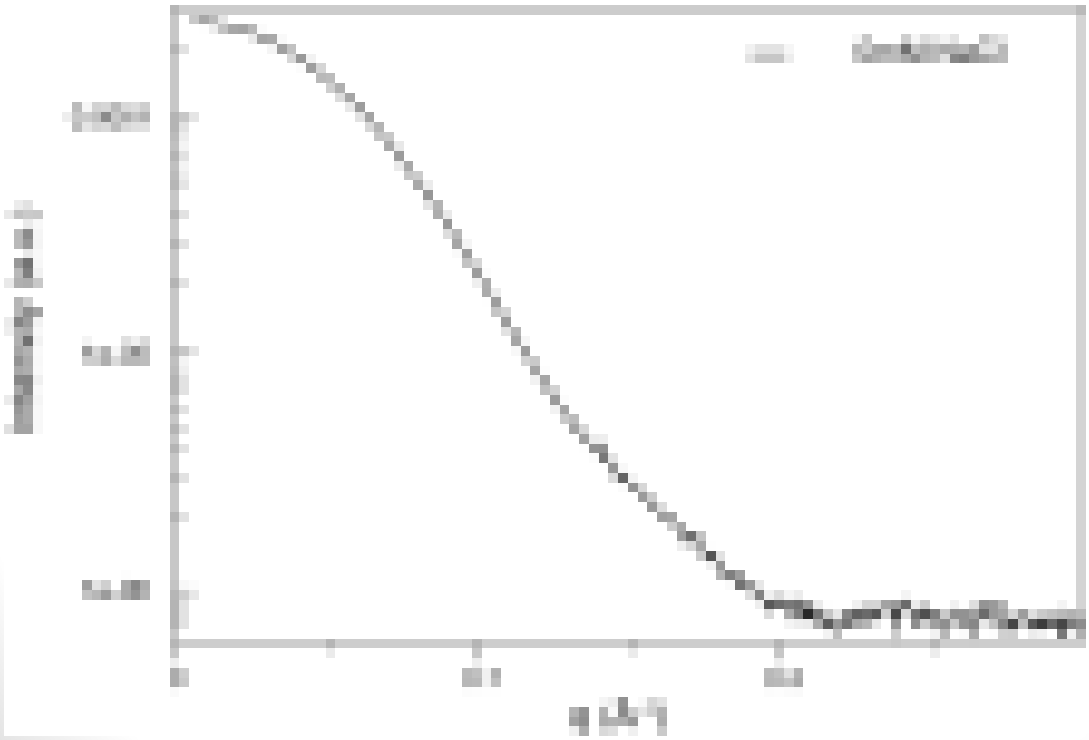




Et si augmenter la force ionique pouvait jouer sur la stabilité de l'interface?

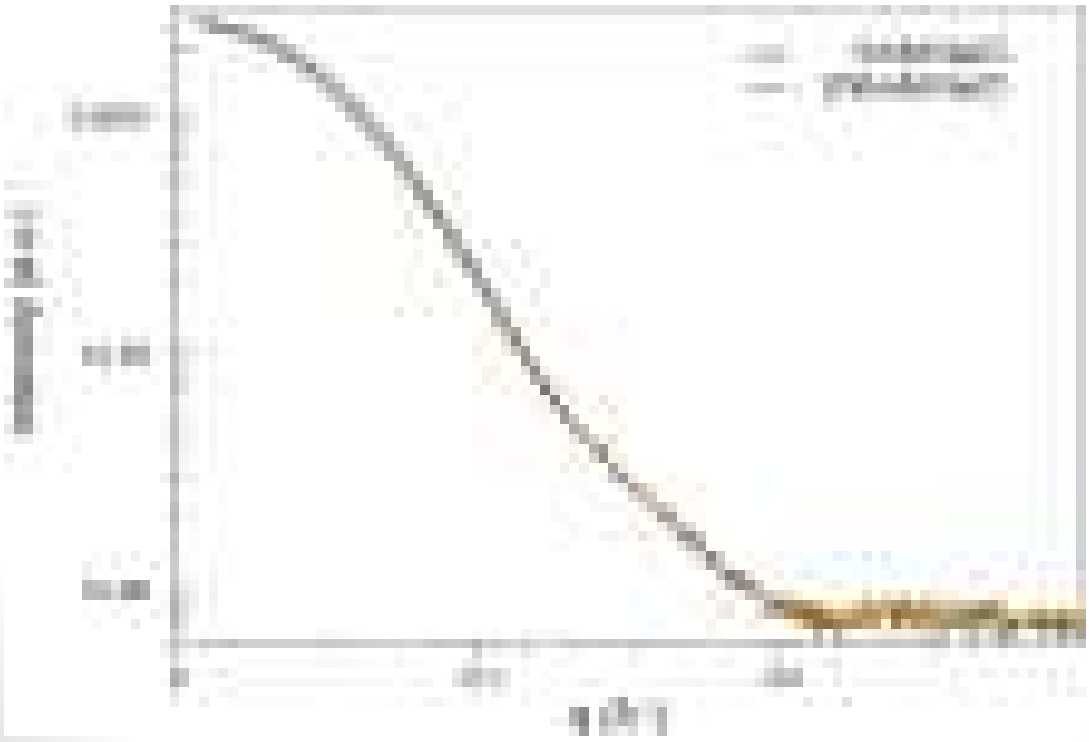
La force ionique affecte la courbe SAXS

Courbe SAXS I=f(Q)



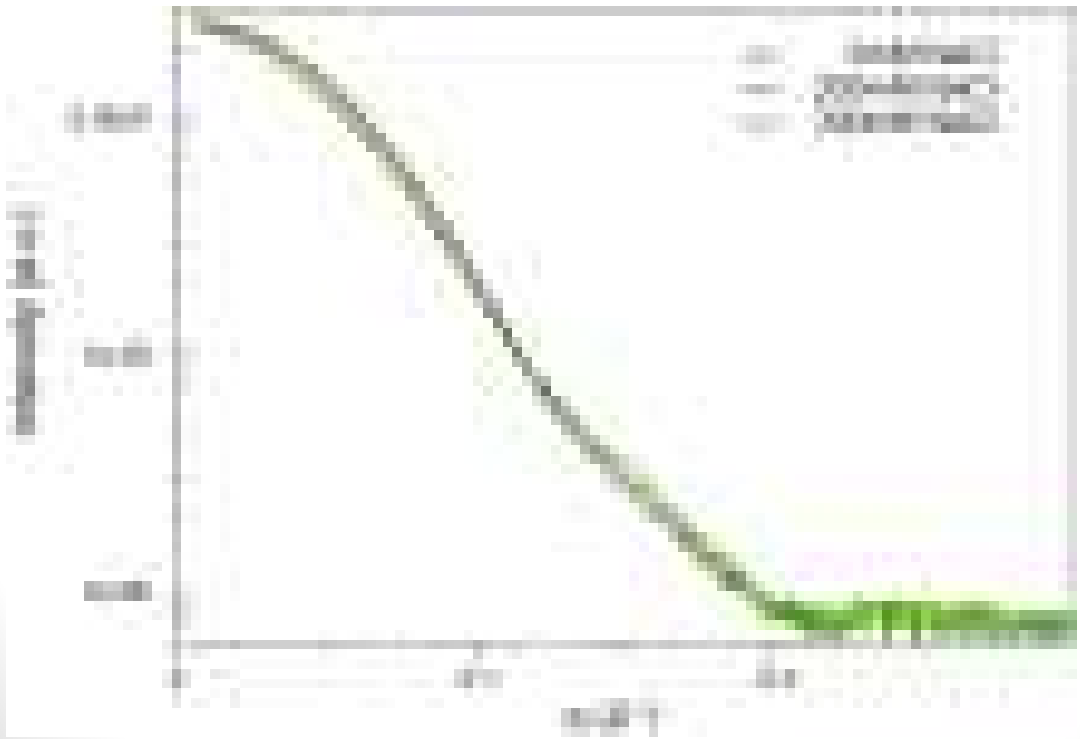
La force ionique affecte la courbe SAXS

Courbe SAXS I=f(Q)



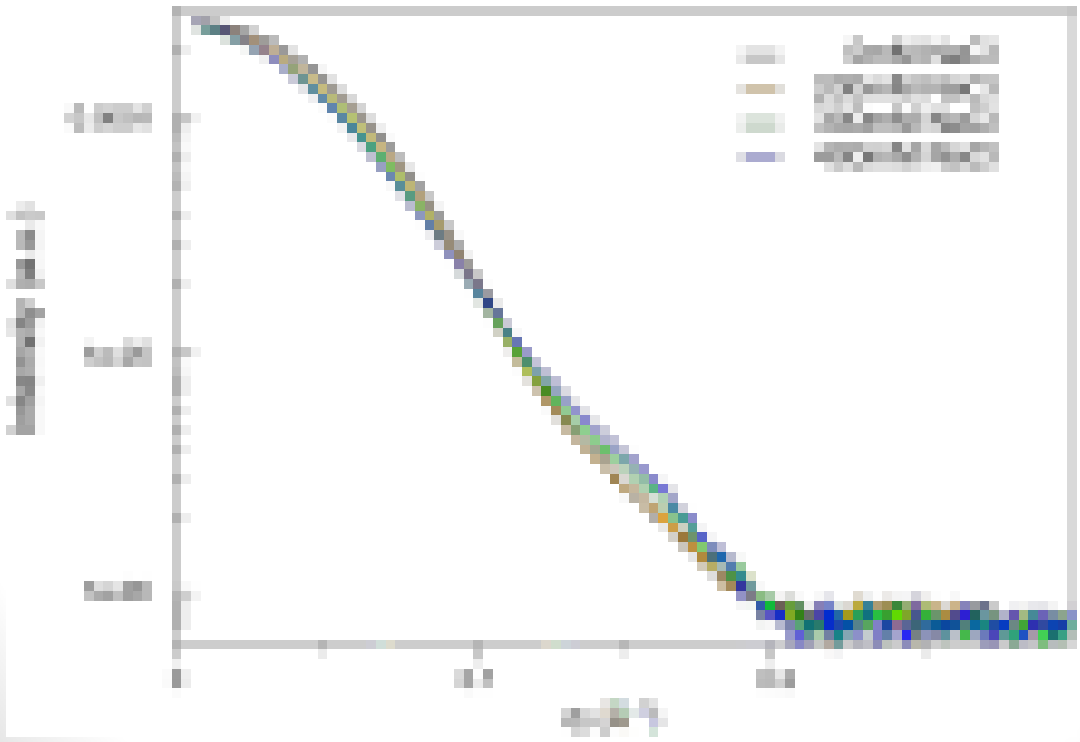
La force ionique affecte la courbe SAXS

Courbe SAXS I=f(Q)



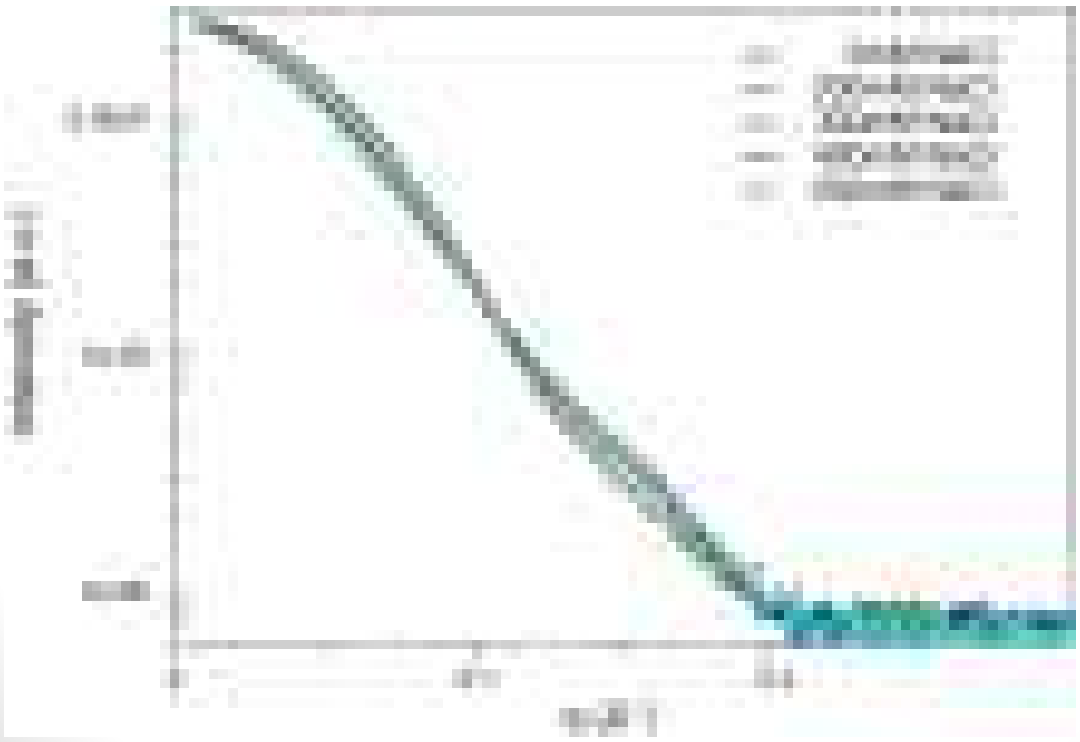
La force ionique affecte la courbe SAXS

Courbe SAXS I=f(Q)



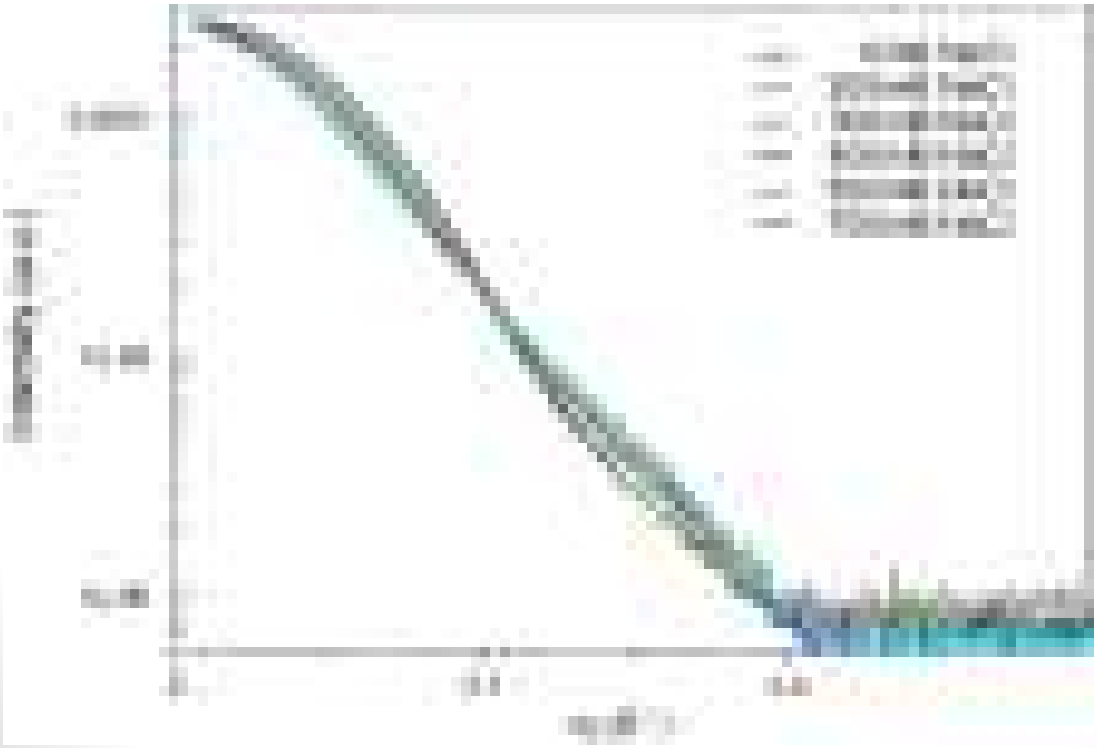
La force ionique affecte la courbe SAXS

Courbe SAXS I=f(Q)



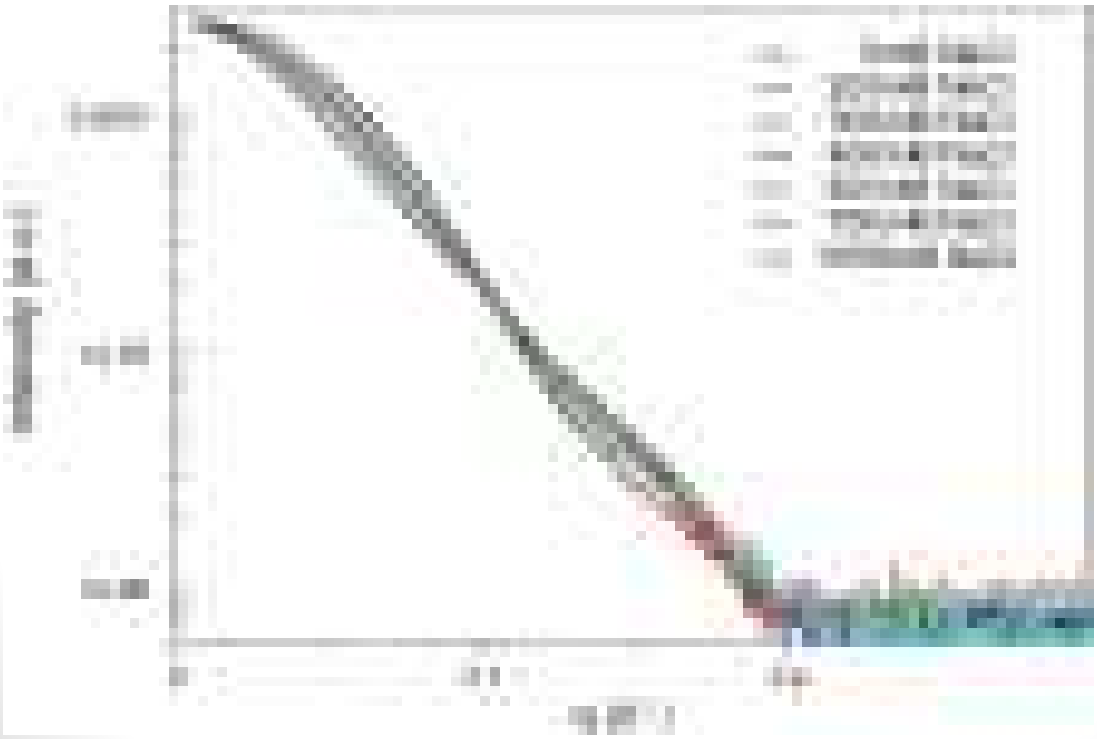
La force ionique affecte la courbe SAXS

Courbe SAXS I=f(Q)



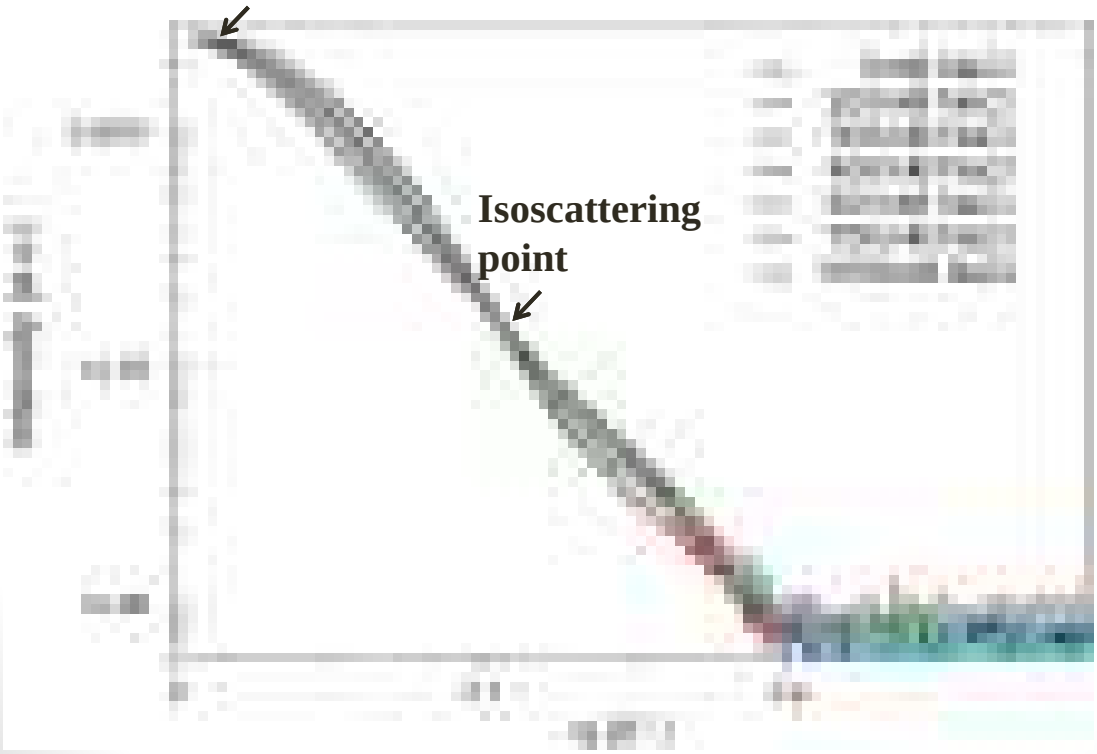
La force ionique affecte la courbe SAXS

Courbe SAXS I=f(Q)



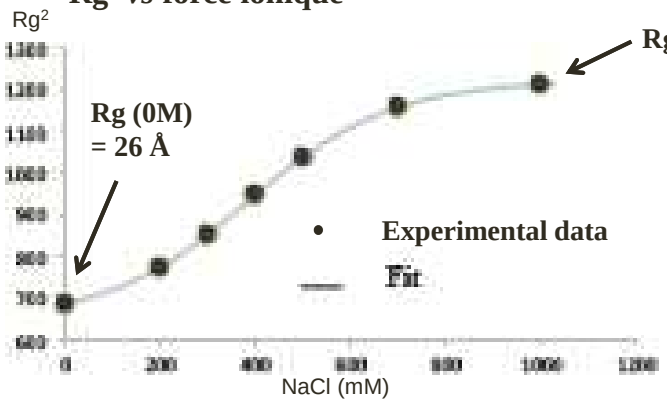
La force ionique contrôle une transition entre deux états

La pente définit le rayon de giration



La force ionique contrôle une transition entre deux états

Rg^2 *vs* force ionique



- Rg suit une courbe de dénaturation

  $\Delta G=\Delta G^{w}$-m [NaCl]

- Transition à 400mM (50/50 de chaque espèce)

Une haute force ionique favorise un nouvel état



Conformation fermée
(NaCl concentration 0M)

k_a ⇄ k_b

Equilibre $K=k_a/k_b$ contrôlé par la force ionique

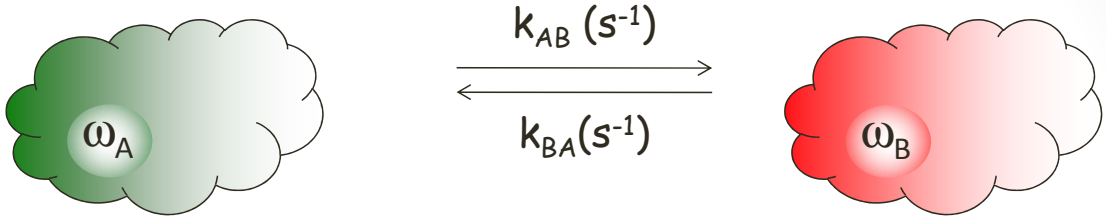
?

Nouvel état
(concentration NaCl infinite)

Peut-on avoir une idée de k_a et k_b ou de $k_{ex}=k_a+k_b$?

Peut-on avoir une idée du nouvel état?

Echange et RMN



Etat *A*
ω_A
p_A

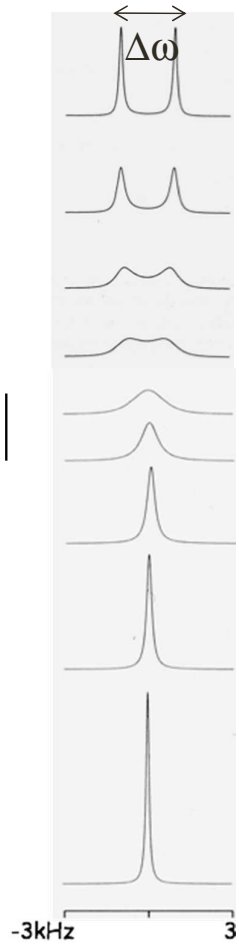
conformation *A*

$k_{ex} = k_{AB} + k_{BA}$

Etat B
ω_B
p_B

conformation B

Echange et RMN



$\Delta\omega = |\omega_B - \omega_A|$

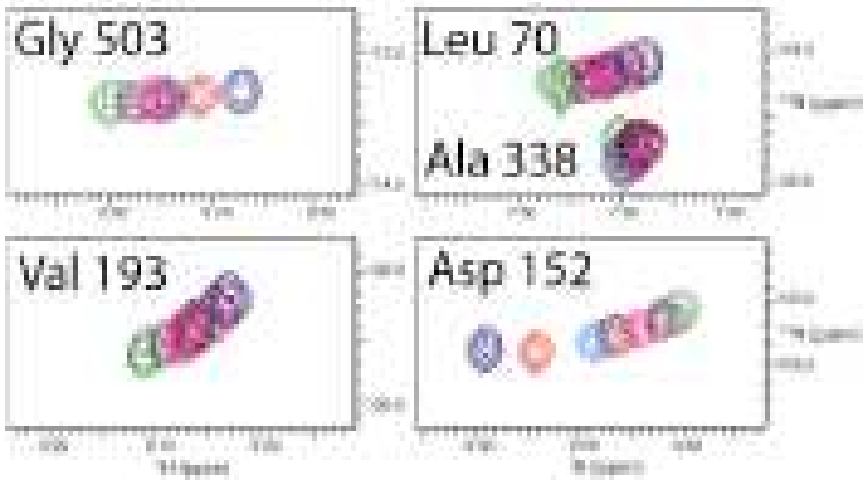
$k_{ex} <<< \Delta\omega$ Echange lent

$k_{ex} \approx \Delta\omega$ Echange intermédiaire

$k_{ex} >>> \Delta\omega$ Echange rapide

RMN et force ionique croissante

Spectres ^{15}N TROSY



0M [NaCl] à 1M [NaCl]

En échange rapide à l'échelle des déplacements chimiques (ie $k_{ex} >>> 10^3\ s^{-1}$)

Vitesse d'interconversion relativement rapide



Conformation fermée (NaCl concentration 0M)

$k_{ex}=k_a+k_b$ >>> 1000 s^{-1}

k_a ⇄ k_b

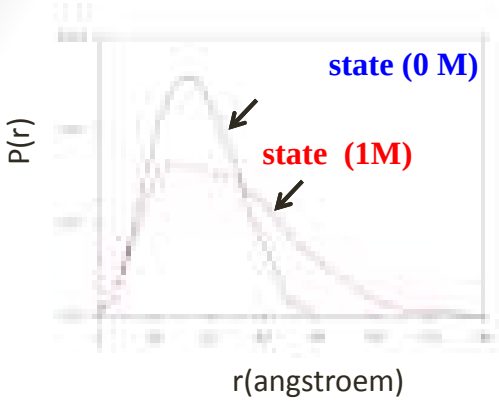
Equilibre $K=k_a/k_b$ contrôlé par la force ionique

?

Nouvel état (concentration NaCl infinite)

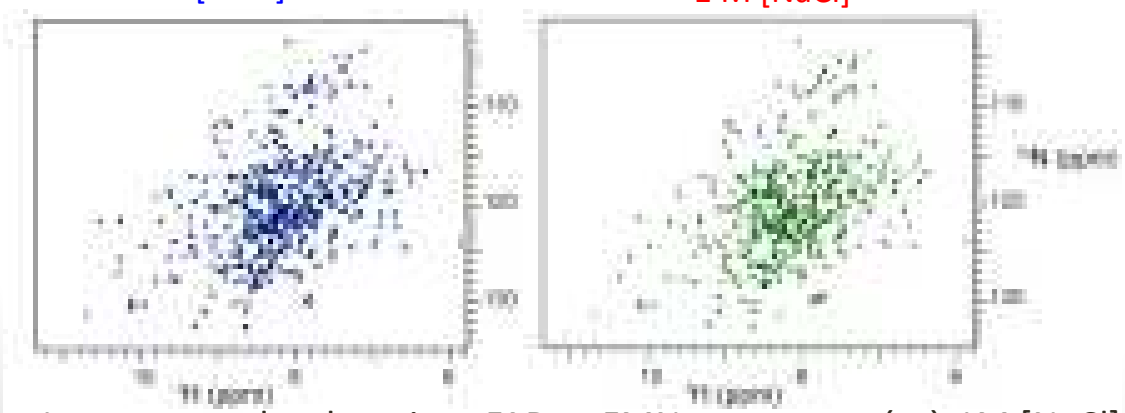
Mais peut-on avoir une idée du nouvel état?

RMN et SAXS du nouvel état



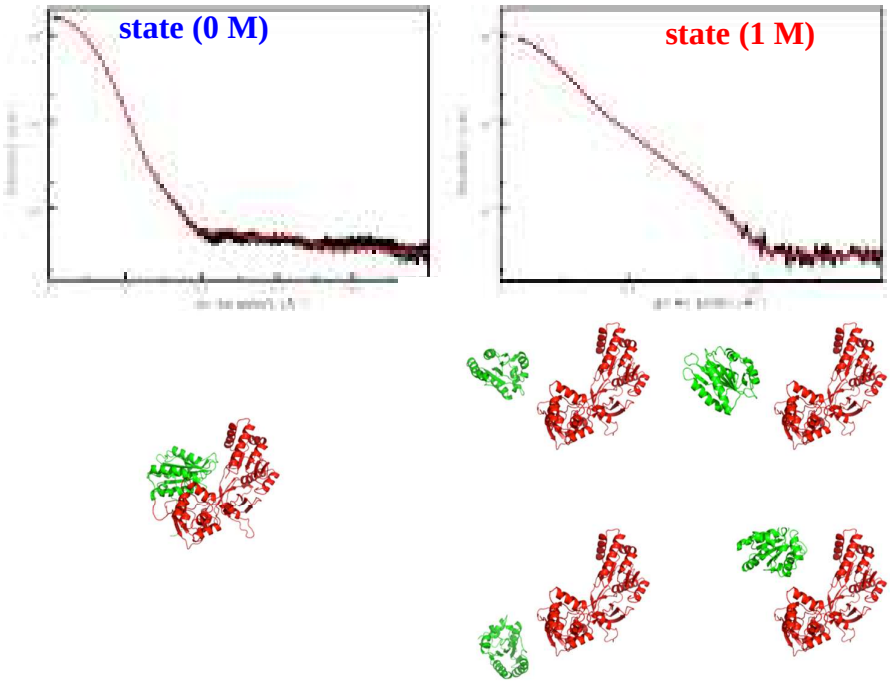
- La distribution de distances est en accord avec un état plus allongé où les domaines seraient plus éloignés
- Rg (0M) = 26 **Å**
- Rg (1M) = 36 Å

0 M [NaCl] 1 M [NaCl]



La structure des domaines FAD et FMN est conservée à 1M [NaCl]

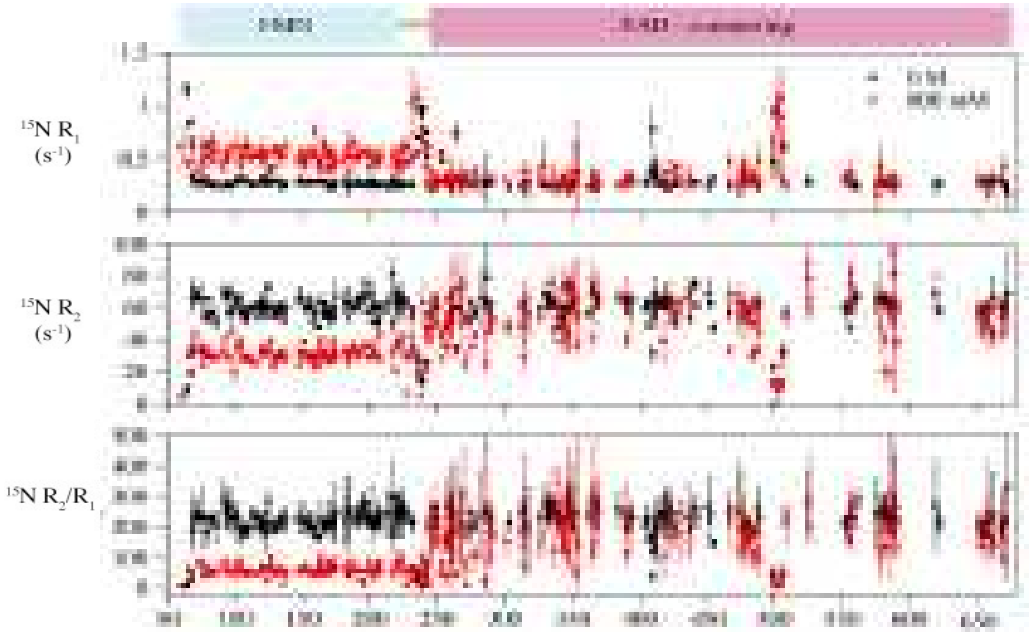
SAXS et structures



Données à 0mM NaCl
Dadimodo

Données extrapolées à concentration infinie
EOM

Le nouvel état est très flexible



	Domaine FAD	Domaine FMN
τ_c (0 M)	30 ns	30 ns
τ_c (0.8 M)	25 ns	15 ns

➡ **Nouvel état = ensemble de conformations en équilibre dynamique (sub τ_c)**

La CPR est dans un équilibre dynamique

Etat verrouillé (locked, L)



k_{ex} >>> 10^3 s^{-1}

Equilibre contrôlé par la force ionique

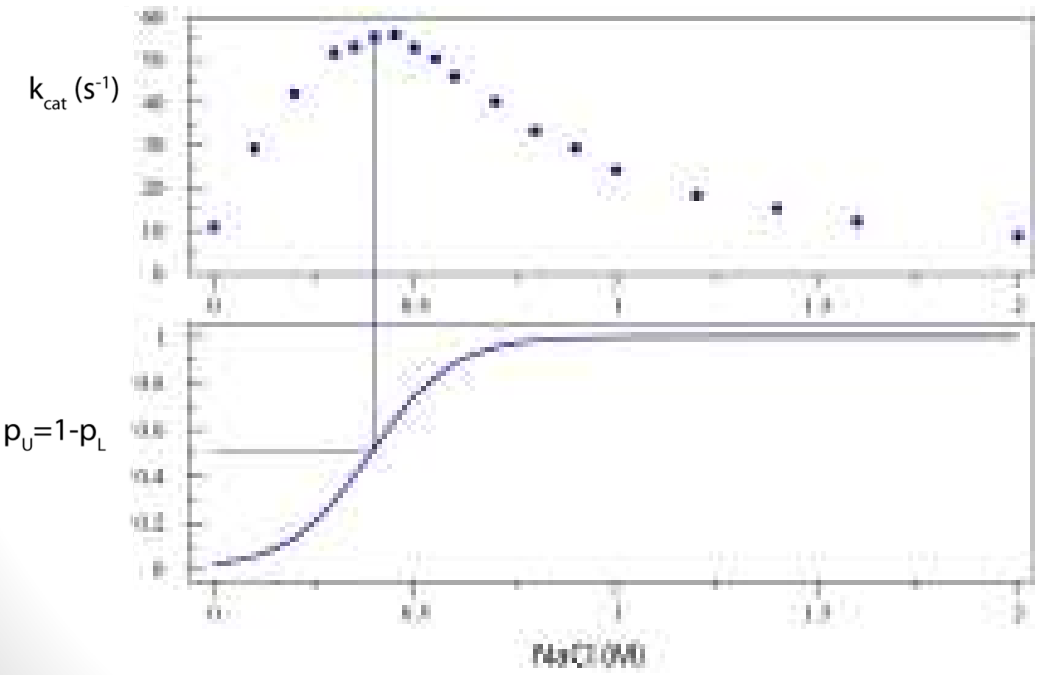
Etat déverrouillé (unlocked, U)



- Nouvel état: les deux domaines diffusent librement (à part le linker)
- Une haute force ionique rompt les interactions électrostatiques à l'interface
- Pas d'autres interfaces stables ne semblent être créées
- La NADP+ n'affecte pas l'équilibre
- **Mais la protéine est-elle toujours active à 1M?**

Le flux d'électron à travers la CPR est contrôlé par l'équilibre

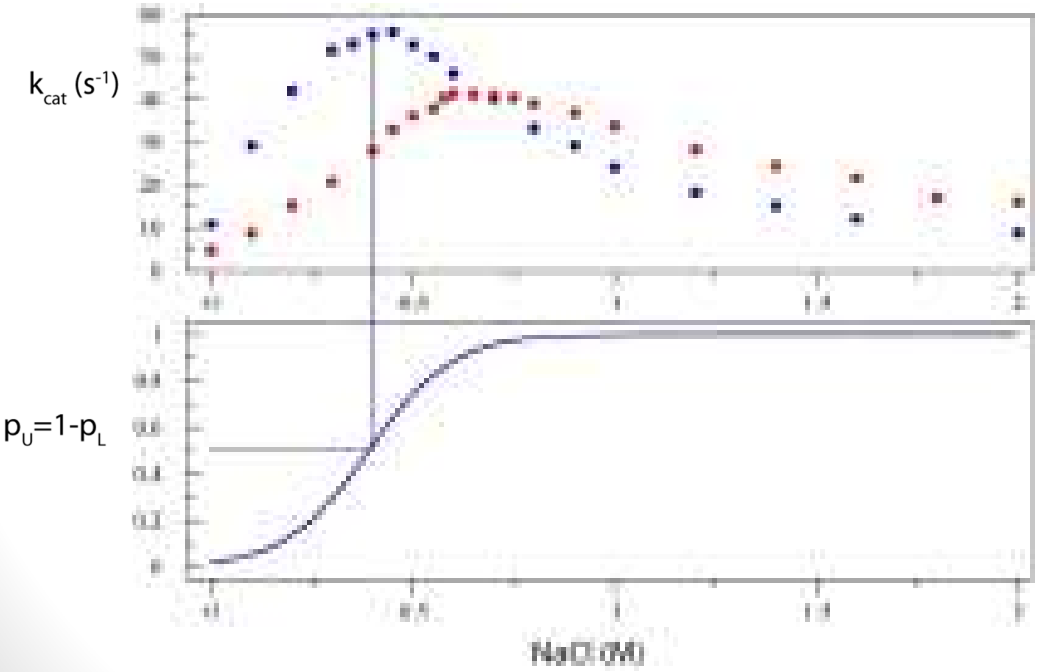
- k_{cat} : vitesse de réduction du cytochrome *c* à pH 7.4



Population de la forme ouverte

Le flux d'électron à travers la CPR est contrôlé par l'équilibre

- k_{cat} : vitesse de réduction du cytochrome *c* à pH 7.4 et pH 6.7

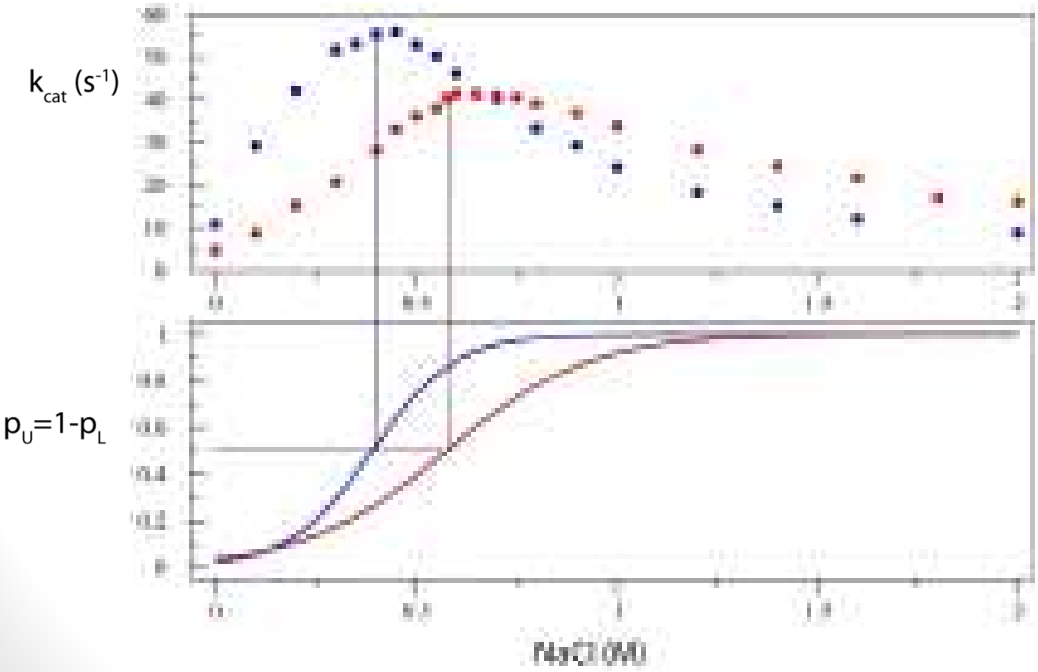


Population de la forme ouverte

Le flux d'électron à travers la CPR est contrôlé par l'équilibre

- k_{cat} : vitesse de réduction du cytochrome *c* à pH 7.4 et pH 6.7

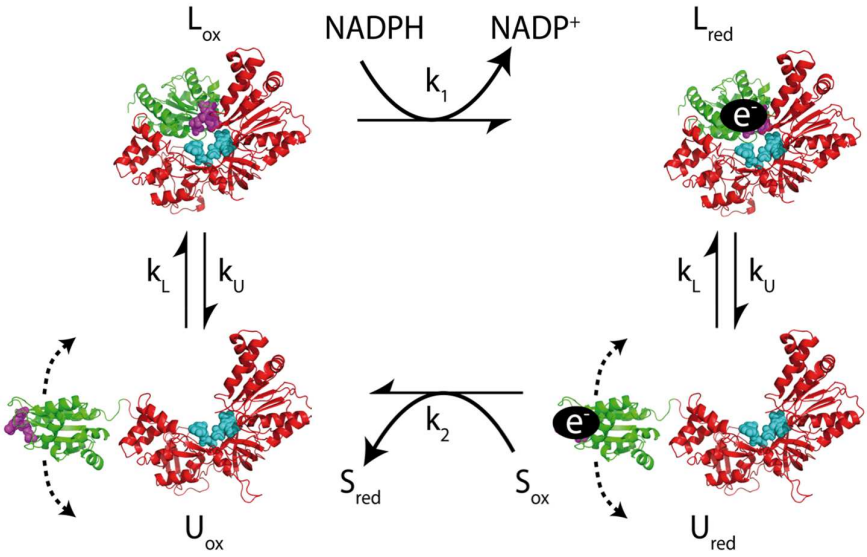
➡ Lien direct entre l'équilibre L/U et le cycle catalytique



Population de la forme ouverte

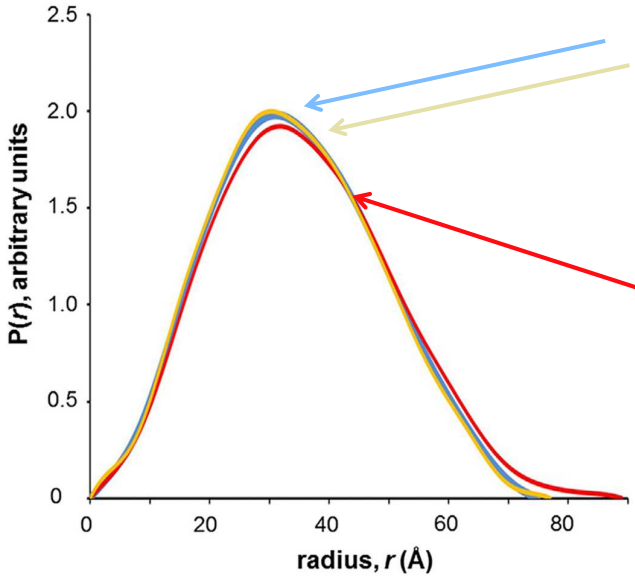
Modèle cinétique

Stuehr DJ. FEBS J. (2011)



La réduction n'affecte pas l'équilibre

Des données parfois contradictoires



CPR oxydée

CPR réduite à 2 e- par NADPH

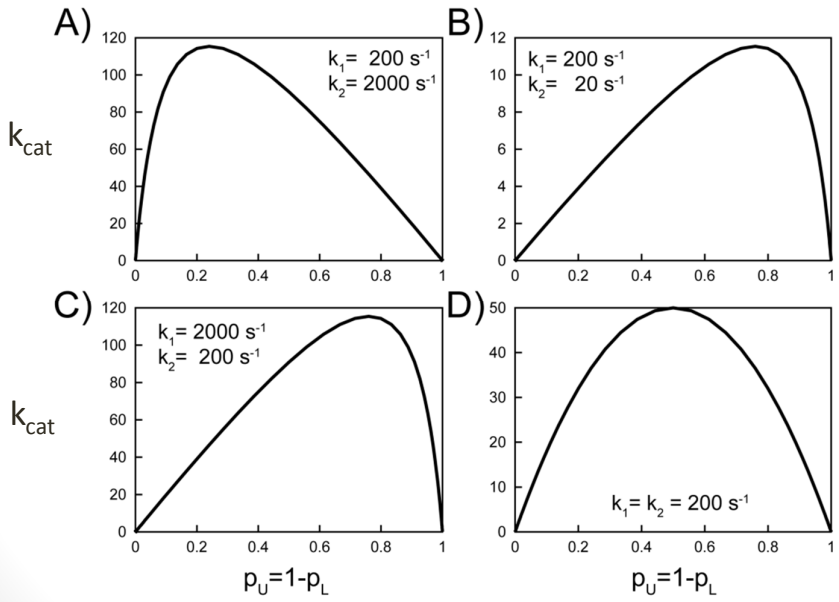
CPR réduite à 2 e- par dithionite

Attention à la méthode: les RX peuvent générer des radicaux en solution

Huang WC, Ellis J, Moody PC, Raven EL, Roberts GC. Structure. 2013

Exploration du modèle cinétique

Sous l'hypothèse que k_U, k_L >> k_1, k_2, on obtient une équation assez simple



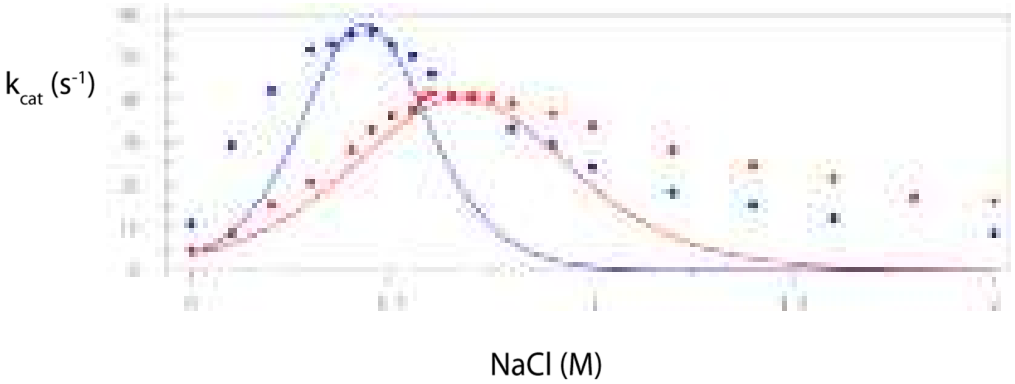
- Pour $k_1 = k_2 = k$:

$$k_{cat} = p_u (1-p_u)k$$

Reproduction des données expérimentales

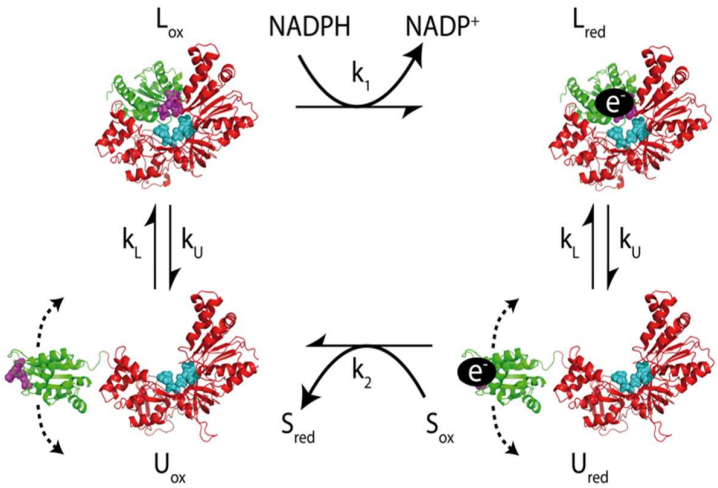
pH 7.4: k_1 = 330 s^{-1} / k_2 = 160 s^{-1}

pH 6.7: k_1 = 300 s^{-1} / k_2 = 100 s^{-1}



- Contrôle direct de l'activité enzymatique par la proportion relative des états vérrouillé et déverrouillé, qui sont en échange rapide.
- Chaque état est probablement compétent à une étape du cycle.

Quelques conclusions sur le modèle



- Les mouvements de domaines ne sont pas nécessairement limitants
- Il n'y a pas nécessairement de changement de conformation lors d'un cycle catalytique bien que plusieurs conformations soient requises à différentes étapes
- Les mouvements rapides permettent l'échantillonnage rapide de ces états.
- Pas de besoin de mécanismes synchronisés pour la communication interdomaines

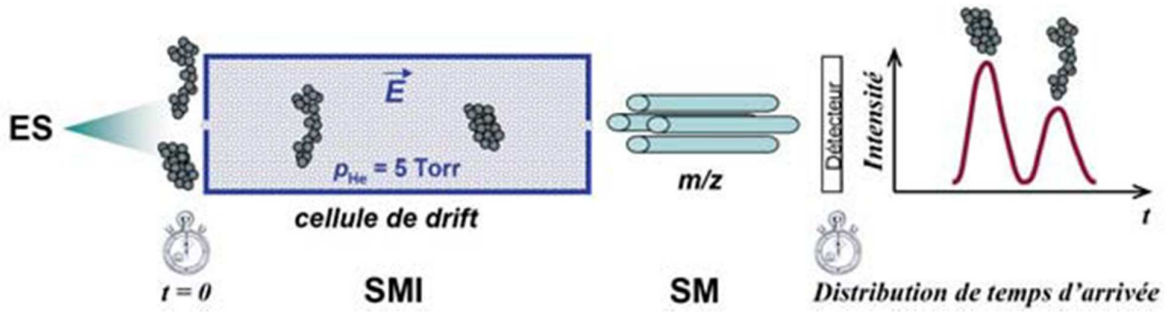
RMN/SAXS: deux techniques très complémentaires

- La cristallographie fournit des structures haute résolution mais dans le cristal
- La RMN et le SAXS fonctionnent en solution: un atout
- Le SAXS est rapide mais l'information structurale est sous-déterminée
  - -> idéal pour valider un modèle structural
  - -> information rapide sur un changement de conformation
- La RMN fournit des informations dynamiques (vitesse d'échange, mobilité relatives, …) mais est lente (collecte + analyse)

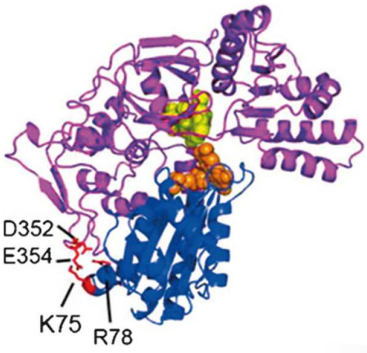
Quid d'autres techniques appliquées à la CPR?

Spectrométrie de mobilité ionique (en phase gazeuse)

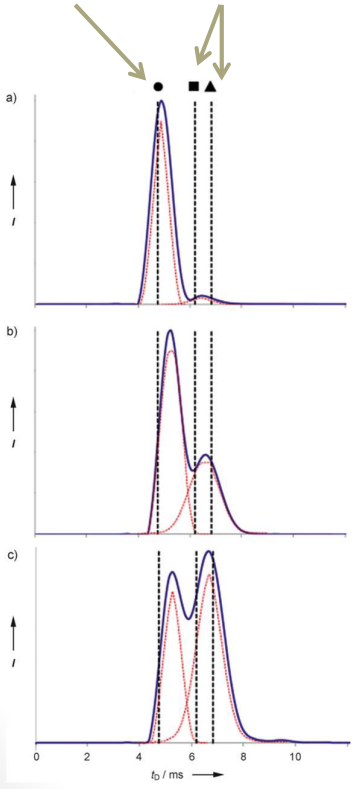
- Principes: suite à ionisation (ES) l'échantillon diffuse sous l'action d'un champ électrique dans la cellule de drift. En fonction de la forme, le temps de dérive sera différent.



ESI-TWIMS-MS et CPR



compact étendue



Temps de dérive

250 mM ammonium acetate

Haute force ionique favorise formes étendues

1M ammonium acetate

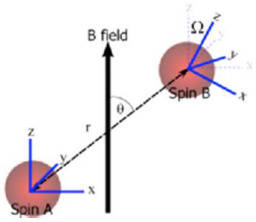
Mutation à l'interface favorise formes étendues

D352N/E354Q double-mutant
1M ammonium acetate

Jenner M, Ellis J, Huang WC, Lloyd Raven E, Roberts GC, Oldham NJ. Angew Chem Int Ed Engl. 2011

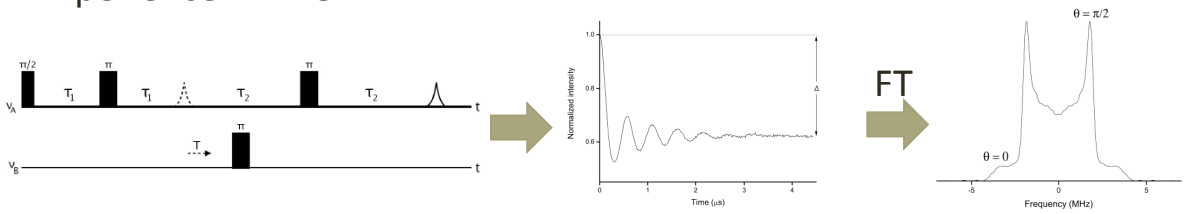
PELDOR

- Principes: deux électrons libres interagissent, la force de l'interaction dépend de leur distance (et orientation)



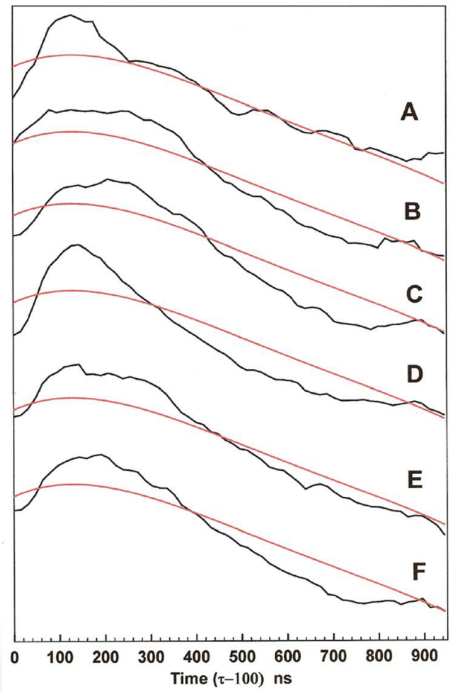
$$\omega_{dip} = \frac{\mu_0 g_A g_B \beta_e^2}{4\pi\hbar r^3}\left(1 - 3cos^2\theta\right)$$

- L'échantillon est congelé à T < 78K pour éviter l'annulation du couplage dipolaire
- Expérience PELDOR:



PELDOR et CPR

- Les flavines FMN/FAD réduit à un électron sont paramagnétiques (RPE)
- Dans un mélange complexe de flavines oxydées et réduites à 1 ou 2 e^-, seul l'état FMN° /FAD° (disemiquinone) donne un signal PELDOR



NADP+ [KCl] =0M

[KCl] =0M

2',5'-ADP [KCl] =0M

NADP+ [KCl] =0.5M

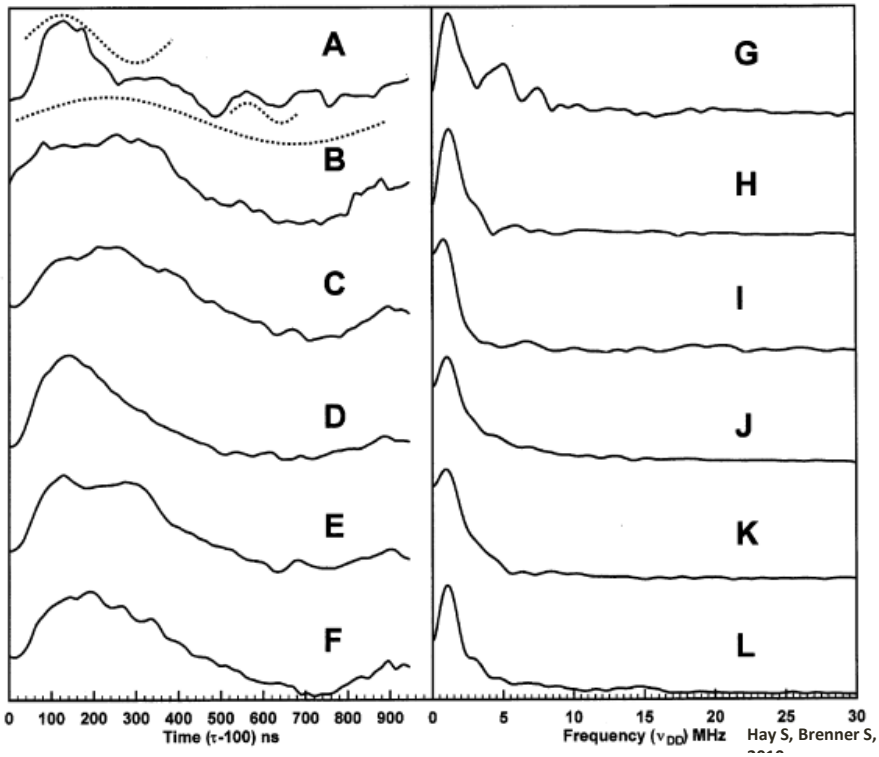
[KCl] =0.5M

2',5'-ADP [KCl] =0.5M

Hay S, Brenner S, Khara B, Quinn AM, Rigby SE, Scrutton NS. JACS

PELDOR et CPR

- Les flavines FMN/FAD réduit à un électron sont paramagnétiques (RPE)
- Dans un mélange complexe de flavines oxydées et réduites à 1 ou 2 e^-, seul l'état FMN° /FAD° (disemiquinone) donne un signal PELDOR



NADP+ [KCl] =0M

[KCl] =0M

2',5'-ADP [KCl] =0M

NADP+ [KCl] =0.5M

[KCl] =0.5M

2',5'-ADP [KCl] =0.5M

Hay S, Brenner S, Khara B, Quinn AM, Rigby SE, Scrutton NS. JACS

PELDOR et CPR

Table 1. Inter-Flavin Distance Measured Using ELDOR

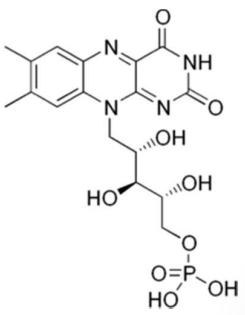
ligand	[KCl] (mM)	distance (Å)	trace[a]
$NADP^+$	0	19.0, 21.6, 36.1	A, G
	0	36.1	B, H
2',5'-ADP	0	40.2	C, I
$NADP^+$	500	15.4−25.8[b], 37.2	D, J
	500	19.2−25.8[b], 37.2	E, K
2',5'-ADP	500	19.2−25.8[b], 37.2	F, L

[a] ELDOR traces in Figure 2. [b] A continuum of distances was measured rather than discrete values.

Hypothèses:

-les électrons sont centrés au centre du groupe isoalloxazine

-Les modifications de distance interflavine s'explique par des mouvements de domaines et non de flavines (ou électron)



Hay S, Brenner S, Khara B, Quinn AM, Rigby SE, Scrutton NS. JACS

PELDOR et CPR

Table 1. Inter-Flavin Distance Measured Using ELDOR

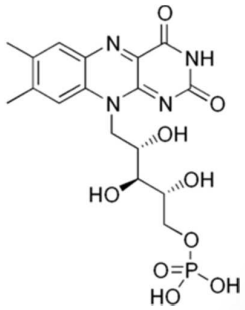
ligand	[KCl] (mM)	distance (Å)	trace[a]
$NADP^+$	0	19.0, 21.6, 36.1	A, G
	0	36.1	B, H
2′,5′-ADP	0	40.2	C, I
$NADP^+$	500	15.4−25.8[b], 37.2	D, J
	500	19.2−25.8[b], 37.2	E, K
2′,5′-ADP	500	19.2−25.8[b], 37.2	F, L

[a] ELDOR traces in Figure 2. [b] A continuum of distances was measured rather than discrete values.

Conclusions:

-NADP+ favorise des états plutôt fermés (courtes distances)

-KCl favorise des états plutôt fermés (courtes distances)



Conclusions contraires aux nôtres:

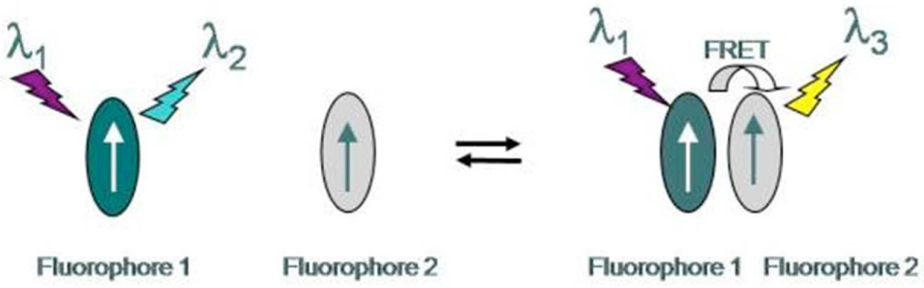
Est-ce lié à la technique (basse température? hypothèses précédentes? KCl vs NaCl?) ou l'état disemiquinone?

Hay S, Brenner S, Khara B, Quinn AM, Rigby SE, Scrutton NS. JACS

FRET: Förster Resonance Energy Transfer

Principes:

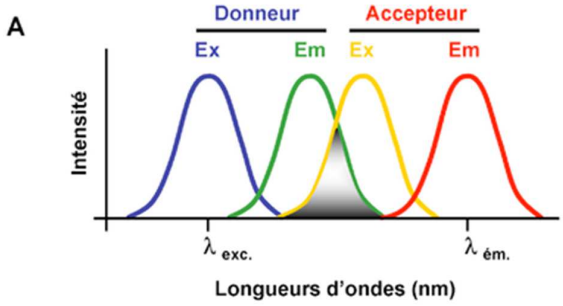
Transfert d'énergie non radiatif (sans émission de lumière) résultant d'une interaction dipôle-dipôle entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie).



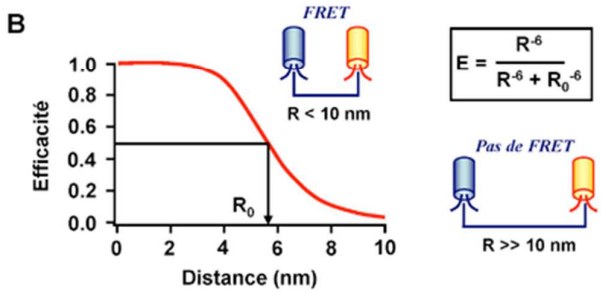
Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. PLoS Biol. 2011

FRET: Förster Resonance Energy Transfer

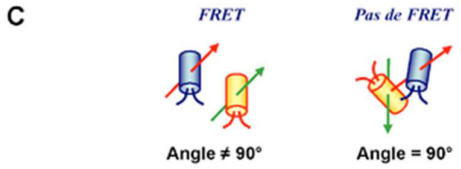
Conditions: un fluorophore donneur dont le spectre d'émission recouvre partiellement le spectre d'absorption de l'accepteur



Recouvrement partiel



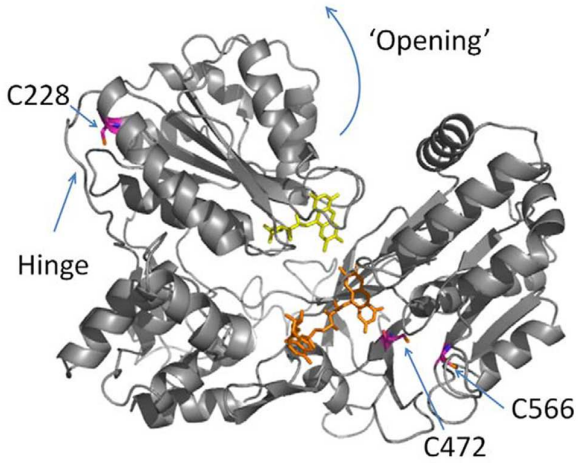
Efficacité dépend de la distance entre fluorophores



Mais aussi de l'orientation relative des fluorophores

FRET et CPR

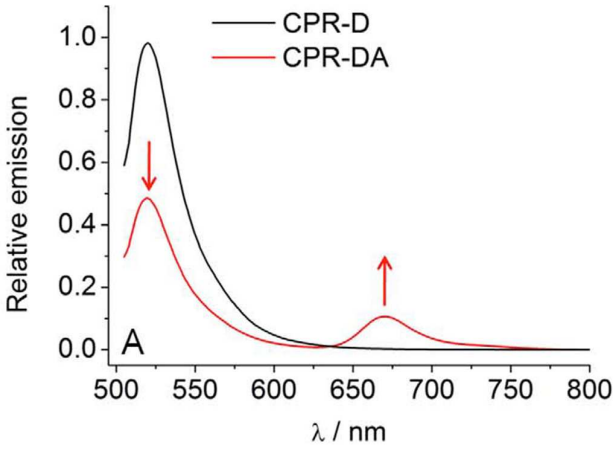
8 cystéines dans la CPR humaine dont plusieurs en surface
Marquage par donneur Alexa 488 (D) et accepteur Cy 5 (A)
Cystéines C228, C566 et C472 identifiées comme covalemment liées à D et A mais dans un mélange statistique



Les distances C228-C472 et C228-C566 sont supposées diminuer lors de l'ouverture

Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. PLoS Biol. 2011

FRET et CPR

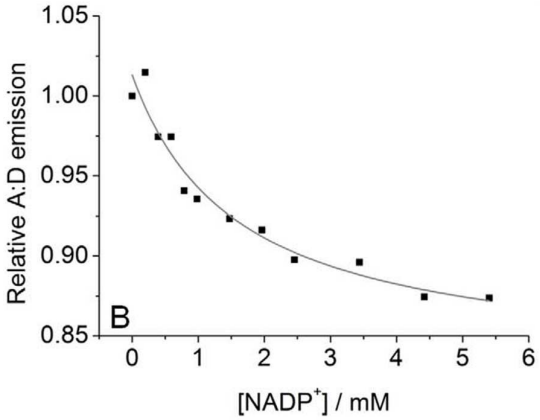


Spectre de fluorescence avec excitation à 495nm. Signal FRET à 670nm.

Pour interprétation du FRET en terme de distance interdomaines, contrôles nécessaires:
FRET inter-protéine vs intraprotéine
quenching des flavines
Prendre en compte toutes les paires D-A possibles sur les cystéines
…

Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. PLoS Biol. 2011

FRET et CPR: effet du $NADP^+$



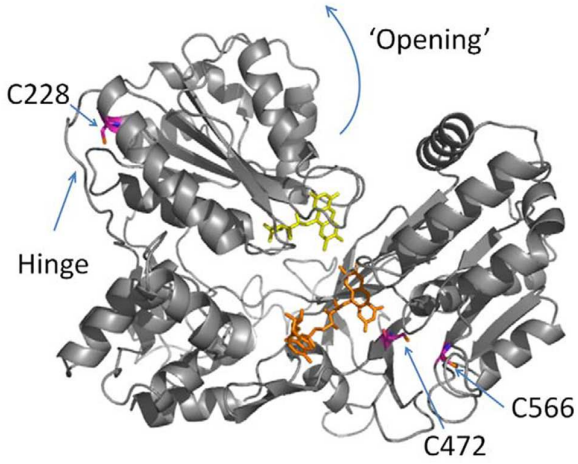
Le signal FRET disparaît avec des concentrations croissantes de $NADP^+$.
En accord avec une fermeture des domaines (distances Cys-Cys plus courtes)

Contrôle: quenching des fluorophores par le $NADP^+$
ou par des résidus aromatiques qui changent de conformation lors de la fixation du $NADP^+$

Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. PLoS Biol. 2011

FRET et CPR

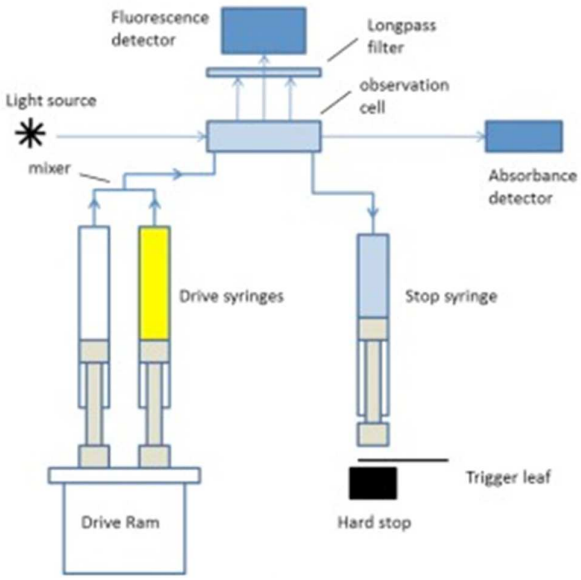
8 cystéines dans la CPR humaine dont plusieurs en surface
Marquage par donneur Alexa 488 (D) et accepteur Cy 5 (A)
Cystéines C228, C566 et C472 identifiées comme covalemment liées à D et A mais dans un mélange statistique



Les distances C228-C472 et C228-C566 sont supposées diminuer lors de l'ouverture

Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. PLoS Biol. 2011

Stopped-flow

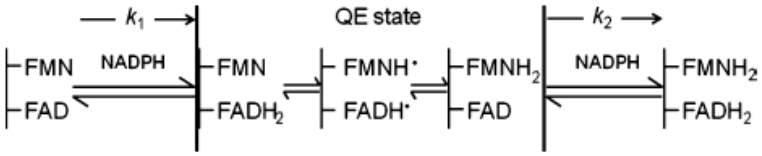


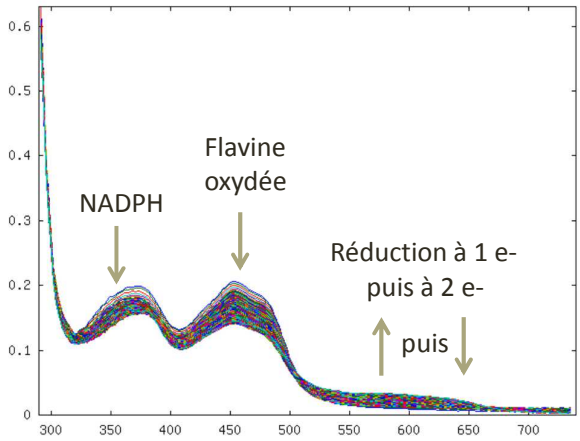
A t=0, deux solutions sont mélangées (mixer)

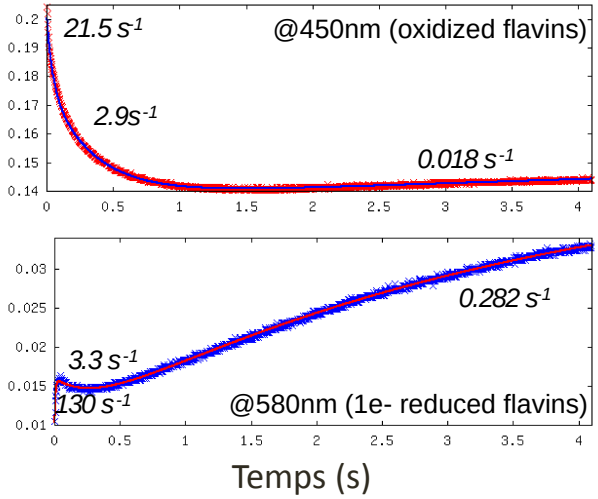
puis envoyées dans une cellule de détection (absorption ou fluorescence)

Un spectre chaque 5ms

Stopped-flow en UV-visible et CPR

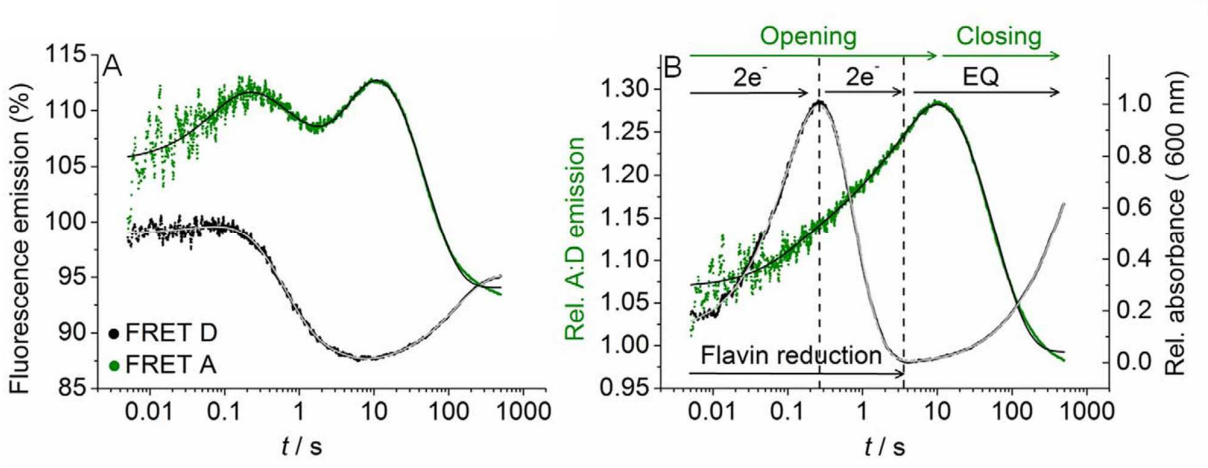






La technique du stopped-flow permet d'étudier la vitesse de transfert d'électron (réduction) et la redistribution dans la CPR lors de la l'ajout à t=0 de NADPH (source d'e$^-$)

Stopped-flow FRET et CPR: réduction et changement de conformation



50 mM potassium phosphate pH 7, 5 mM NADPH at 15° C.

Observation en temps réel du changement de conformation des domaines en fonction de l'état redox de la CPR:

- La réduction ouvre la structure
- La fixation du cofacteur ferme la structure

Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. PLoS Biol. 2011

Merci à :

- **Fataneh Fatemi (PhD)**
- **Oriane Frances (PhD Student)**
- **Bruno Vincent**
- Nelly Morellet
- Nadine Assrir
- **Eric Guittet**
- **Gilles Truan**
- **Javier Perez**



Merci de votre attention !